



Efeito da hemólise sobre o perfil bioquímico sérico canino, bovino e equino

(Effect of hemolysis on canine, bovine and equine serum chemistry)

"Artigo Científico/Scientific Article"

BFM Almeida^{1*}, AS Zucatto¹, RFC Vieira², CS Soeiro³, MA Viol³, SRM Bomfim⁴, PC Ciarlini⁴

1-Laboratório de Patologia Clínica, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Odontologia, Campus Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araçatuba-SP, Brasil.

2-Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Londrina - PR, Brasil

3-Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Odontologia, Campus Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araçatuba-SP, Brasil.

4-Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Odontologia, Campus Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Araçatuba-SP, Brasil.

Resumo

A hemólise é a principal causa de rejeição de amostras para análises bioquímicas em laboratórios veterinários. Entretanto, o erro relativo causado pela hemoglobina sobre o perfil bioquímico sérico ainda não foi adequadamente estabelecido em várias espécies. Com o objetivo de estabelecer critérios de aceitação e rejeição de amostras hemolisadas destinadas a exames bioquímicos séricos, testou-se a hipótese de que a hemólise causa variação no perfil bioquímico canino, bovino e equino e que o erro laboratorial depende da espécie e do grau de hemólise. Para tal, soro não hemolisado foi contaminado com níveis crescentes de hemoglobina e utilizando-se reagentes comerciais de rotina foram quantificadas em triplicata as concentrações séricas de ácido úrico, albumina, colesterol, triglicérides e ureia, além da atividade de ALT, AST, CK e GGT. O erro relativo foi calculado comparando-se as amostras hemolisadas às não hemolisadas. A hemólise não causou erros significantes nas determinações de albumina nas três espécies, AST em caninos e bovinos, ALT em equinos, CK e colesterol em caninos. Houve aumento linear nos teores de ácido úrico em equinos e bovinos, de triglicérides nas três espécies. Observou-se aumento linear de ureia sérica nas três espécies, de CK e colesterol em bovinos e de colesterol em equinos. Atividade sérica de AST em equinos e de ALT em bovinos diminuiu de modo linear devido à hemólise. Conclui-se que a hemólise promove variações no perfil bioquímico sérico canino, equino e bovino, entretanto o erro laboratorial não necessariamente compromete o diagnóstico em todos os casos, pois este é dependente da espécie e do grau da hemólise *in vitro*.

Palavras-chave: hemoglobina, perfil sanguíneo, erro laboratorial, controle de qualidade.

Abstract

Hemolysis is the main cause of biochemical analysis rejection's in veterinary laboratories, however the relative error caused by hemoglobin on serum biochemical profile has not been properly established on several species. In order to establish criteria for approval and rejection of hemolyzed samples for serum biochemical tests, the hypothesis that hemolysis causes biochemical changes in canine, cattle and horses and that laboratorial error depends on species and hemolysis degree was tested. Thus, non-hemolyzed serum was contaminated with crescent hemoglobin levels and using commercial routine reagents, the serum concentrations of uric acid, albumin, cholesterol, triglycerides and urea, besides the activity of ALT, AST, CK and GGT were quantified in triplicate samples. The relative error was calculated by the comparison between hemolyzed and non-hemolyzed samples. Hemolysis did not cause significant error on the albumin determination in all three species, AST in canine and cattle, ALT in horses, CK and cholesterol in canine. There was a linear increase on uric acid levels in horses and cattle, triglycerides in all three species. A linear increase in serum urea in all species serum, CK and cholesterol in cattle and cholesterol in horses was observed. Serum AST activity on equine serum and ALT in cattle decreased linearly due to hemolysis. It was concluded that hemolysis promotes changes in canine, equine and bovine serum chemistry profile, however the laboratorial error not necessarily compromises the diagnosis in all cases, because the changes depends on species and degree of *in vitro* hemolysis.

Key-words: hemoglobin, blood profile, laboratory error, quality control.

Introdução

O termo hemólise se refere à lise das hemácias com conseqüente liberação do seu conteúdo intracelular (SNYDER et al., 2004), ocorrendo *in vivo* resultante de doenças hemolíticas e *in vitro*, forma mais comum, decorrente do manuseio ou colheita inadequada da amostra,

como temperaturas extremas, pressão negativa em excesso na seringa ou tubo e trauma durante a centrifugação ou homogeneização (LASSEN e WEISER, 2007).

A lise eritrocitária acresce ao plasma e ao soro o pigmento vermelho da hemoglobina, além de proteínas estruturais, enzimas, lipídeos

*Autor para correspondência/Corresponding author (bfmalmeida@yahoo.com.br).

⁶Recebido 30/11/2010 e aceito em 11/03/2011.

e carboidratos (TELEN e KAUFMAN, 2004). São cinco os mecanismos pelos quais a hemólise pode afetar os testes laboratoriais: extravasamento do conteúdo eritrocitário, efeito diluidor dos constituintes séricos, interferência na coloração da reação pela hemoglobina, aumento da turbidez e interação química com os reagentes nas análises (ALLEMAN, 1990).

O conteúdo hemático proveniente da hemólise dilui os constituintes séricos, que estão em menor quantidade nas hemácias que no soro e eleva aqueles com maior concentração intra-eritrocitária do que sérica (FRANK et al., 1975; GUDER, 1986; YÜCEL e DALVA, 1992; JAY e PROVASEK, 1993).

De modo direto, a coloração e a turbidez decorrentes da hemólise interferem positiva ou negativamente sobre a dosagem bioquímica sérica obtida por espectrofotometria, dependendo do método utilizado para dosagem (FRANK et al., 1975; YÜCEL e DALVA, 1992; JAY e PROVASEK, 1993; SNYDER et al., 2004; MERWE e REYERS, 2007; LASSEN e WEISER, 2007). A interferência é maior nas reações bioquímicas cuja leitura é feita na faixa de luz entre 540-590nm, espectro no qual a absorção de luz da hemoglobina é maior (DORNER et al., 1981; O'NEILL e FELDMAN, 1989). As reações colorimétricas de ponto final parecem ser as mais afetadas pela hemoglobina livre porque uma única leitura da absorbância é realizada ao final da reação. Como a concentração de hemoglobina é constante, as dosagens cinéticas sofrem menos efeito de hemólise neste método porque são realizadas várias leituras e quantificadas apenas as variações de absorbância que expressam a concentração da substância a ser dosada. Entretanto, a hemólise intensa também pode interferir nos métodos cinéticos elevando a absorbância para além da linearidade do teste (ALLEMAN, 1990).

A hemólise pode ser visualmente detectável quando os teores de hemoglobina séricos são maiores que 2g/L na maioria das espécies (SONNTAG, 1986) ou maior que 1g/L em cães (O'NEILL e FELDMAN, 1989). Animais jovens possuem maior fragilidade eritrocitária de modo que mesmo em indivíduos normais encontra-se pequena concentração de hemoglobina (<0,025g/L) no soro (FAIRBANKS, 1990). Para realização de exames bioquímicos, alguns laboratórios aceitam amostras de soro com até 17g/L de hemoglobina enquanto que outros rejeitam amostras com qualquer grau de hemólise (O'NEILL e FELDMAN, 1989).

Os constituintes intra-eritrocitários liberados pela hemólise competem com vários substratos e podem alterar o pH de algumas reações químicas (FRANK et al., 1975; GUDER, 1986;

YÜCEL e DALVA, 1992; JAY e PROVASEK, 1993).

O efeito da hemólise sobre os exames bioquímicos varia com o grau (Frank et al., 1975), a origem *in vitro* ou *in vivo* (ISMAIL et al., 2007), as espécies (JACOBS et al., 1992), os equipamentos (GLICK e RYDER, 1987) e com a metodologia analítica (SNYDER et al., 2004), porém tais estudos têm como base amostras humanas, sendo estes contraditórios, em parte, devido aos diferentes protocolos experimentais adotados pelos pesquisadores (MEITES, 1973). A possibilidade de correção matemática de erros laboratoriais também tem sido proposta (JAY e PROVASEK, 1993). O'Neill e Feldman (1989) sugerem que cada laboratório veterinário deva avaliar os efeitos da hemólise, levando-se em consideração as particularidades de seu sistema analítico (métodos, equipamentos, reagentes, etc.) a fim de orientar a decisão correta e racional quanto à aceitação ou rejeição das amostras

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer critérios de aceitação e rejeição de amostras hemolisadas destinadas a exames bioquímicos séricos. Para tal, testou-se a hipótese de que a presença de hemoglobina no soro causa variação no perfil bioquímico canino, bovino e equino e que o erro laboratorial é dependente do grau de hemólise *in vitro* e varia de acordo com a espécie.

Material e Métodos

Por flebotomia da jugular foram colhidos 20mL de sangue de cinco animais das espécies canina, bovina e equina de diferentes raças, faixa etária e sexo. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e mantidas em repouso até a separação do soro. Após isso, foram centrifugadas a 1512G durante 10 minutos, para a total separação do soro. Foi preparado um *pool* de soro com as amostras de cada espécie.

Para evitar excessiva diluição do soro, as amostras foram contaminadas com concentrado de hemoglobina conforme protocolo descrito por Meites (1973). A papa de hemácias de um animal de cada espécie foi lavada três vezes com solução salina isotônica após os processos de centrifugação. Depois da última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a papa de hemácias congelada a -12°C por 18 horas. Posteriormente foi descongelada e então centrifugada para exclusão do estroma e obtenção do concentrado de hemoglobina. Os valores de hemoglobina do concentrado para as espécies canina, equina e bovina foram 108,5g/L, 94g/L e 96,4g/L, respectivamente. Foi acrescentado às alíquotas constituídas de 1000µL do *pool* de soro de cada espécie 0µL, 10µL, 20µL, 30µL, 40µL e

50µL de concentrado de hemoglobina, sendo identificadas como ensaio A, B, C, D, E e F, respectivamente (Tabela 1).

Todas as análises bioquímicas foram processadas a 37°C e em triplicata utilizando-se analisador bioquímico semi-automático¹, com sistemas analíticos controlados com amostras de controles comerciais nível I² e II³. Utilizando conjunto de reativos comerciais, as concentrações séricas de hemoglobina⁴, ácido úrico⁵, albumina⁶, colesterol⁹, triglicérides⁹, ureia¹⁰, e atividade sérica de ALT⁹, AST¹⁰, CK⁷ e GGT¹¹ foram determinadas conforme sistema analítico descrito na Tabela 02.

Utilizando-se programa computadorizado, os erros relativos (%) devido à presença de hemoglobina foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula: $(V_h - V_n) / V_n * 100$, em que V_h corresponde à amostra hemolisada e V_n à amostra não hemolisada.

Resultados e Discussão

Conforme recomendação de O'Neill e Feldman (1989), considerando as diferenças entre as espécies quanto à composição química intra-eritrocitária, os resultados obtidos não puderam ser comparados com os de estudos realizados com amostras humanas. A comparação com outros estudos similares feito com animais foi comprometida por adotarem protocolo experimental e metodologias diferentes do presente estudo.

A hemólise promoveu um aumento linear dos valores de ácido úrico em bovinos e equinos, cujos erros variaram de 33 a 151% (Figura 2A) e de 74 a 131% (Figura 3A), respectivamente. Tal interferência da hemólise sobre o ácido úrico anteriormente foi verificada em sangue humano por Glick e Ryder (1987), porém Yücel e Dalva (1992) observaram uma suave diminuição nos teores de ácido úrico devido à presença de hemoglobina. Yücel e Dalva (1992) justificam que a hemoglobina humana causa decomposição prematura do peróxido de hidrogênio necessário para reação que quantifica o ácido úrico, porém ressaltam que este mesmo efeito não ocorreu na determinação de colesterol e triglicérides que utilizam o mesmo sistema cromógeno. É provável que o aumento linear de ácido úrico observado neste estudo tenha ocorrido devido à interferência do pigmento da hemoglobina na determinação da absorvância, uma vez que a dosagem foi realizada pelo método de ponto final no comprimento de onda entre 490 e 540nm, espectro que mais sofre interferência de pigmentos vermelhos (O'NEILL e FELDMAN, 1989).

As maiores variações de albumina sérica observadas nas espécies canina, equina e bovina foram, respectivamente, de 8 (Figura 1A), 7 (Figura

3B) e 6% (Figura 2B), valores inferiores ao erro total máximo (10%) considerado aceitável clinicamente por Freeman e Gruenwaldt (1999), concordando com outros estudos realizados em equinos (DORNER et al., 1981) e cães (JACOBS et al., 1992). Já O'Neill e Feldman (1989) observaram um aumento linear no teor de albumina canina devido à hemólise que varia muito de acordo o equipamento utilizado na análise laboratorial.

Segundo Freeman e Gruenwaldt (1999) em laboratórios clínicos veterinários, o erro laboratorial máximo aceitável para a atividade sérica das aminotransferases (ALT e AST) é de 20%. A hemólise promoveu erros de ALT dentro do aceitável em equinos (Figura 3B), acima do aceitável em cães apenas na amostra contendo 5,16g/L de hemoglobina (Figura 1B) e acima do tolerado em todas as amostras de bovinos com hemólise, observando-se erros superiores a 30% (Figura 2A) em todas os ensaios. Tais achados concordam com o estudo de O'Neill e Feldman (1989) que não observaram efeito da hemólise sobre a atividade de ALT canina e de Jacobs et al. (1992) que igualmente constataram diferenças entre as espécies quanto ao efeito da hemólise sobre esta aminotransferase. Dorner et al. (1981), diferentemente, observaram aumento da atividade de ALT em amostras de equinos contendo apenas 0,54g/L de hemoglobina. Segundo Dorner et al. (1981) e Alleman (1990) o aumento da atividade de ALT sérica ocorre devido à maior concentração dessa enzima nos eritrócitos que no soro. Os estudos em humanos divergem com relação aos valores de ALT, pois Blank et al. (1985) não constataram interferência da hemólise sobre a atividade de ALT enquanto que Yücel e Dalva (1992) observaram discreto aumento.

Concordando com estudos anteriores de O'Neill e Feldman (1989) e Jacobs et al. (1992), não foi constatado erro significativo (>20%) da hemólise sobre a atividade sérica de AST de cães (Figura 1B) e bovinos (Figura 2B). Já na espécie equina, a hemólise promoveu erros significativos de até 42% sobre a atividade de AST (Figura 3A), divergindo de Dorner et al. (1981) que não observaram interferência significativa da hemólise sobre a atividade dessa enzima nessa espécie.

A interferência da hemólise na atividade sérica de CK em cães (Figura 1A) não excedeu a 6%, variação bem inferior ao erro máximo de 30% para rejeição, conforme preconizado por Freeman e Gruenwaldt (1999), divergindo de O'Neill e Feldman (1989), porém concordando com achados

1-Analisador Bioquímico QuickLab II, Drake Eletrônica e Comércio Ltda, S. José do Rio Preto-SP.

2-Assayed control serum level I, BioSystems, Spain.

3-Assayed control serum level II, BioSystems, Spain.

4- Bioclin - Quibasa Quím. Básica Ltda, Belo Horizonte-MG.

5- Labtest Diagnóstica Ltda, Lagoa Santa-MG.

6- Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte-MG.

7- BioSystems Reagents & Instruments, Barcelona, Espanha.

8- Microsoft Excel 2007.

Tabela 1. Protocolo experimental para avaliação do efeito da hemólise *in vitro* sobre o perfil bioquímico canino, bovino e equino.

Ensaio	A	B	C	D	E	F
Soro sem hemólise (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Concentrado de Hb adicionado (µL)	0	10	20	30	40	50
Volume final (µL)	1000	1010	1020	1030	1040	1050
Concentração final de Hemoglobina (g/L)						
Canino	<0,1	1,07	2,12	3,16	4,17	5,16
Equino	<0,1	0,93	1,84	2,73	3,61	4,471
Bovino	<0,1	0,95	1,89	2,80	3,10	4,59

Tabela 1. Protocolo experimental para avaliação do efeito da hemólise *in vitro* sobre o perfil bioquímico canino, bovino e equino.

Constituinte sérico	Tipo de reação	Comprimento de onda (nm)	Metodologia
Hemoglobina	Ponto final	540	Cianohemoglobina
Ácido úrico	Ponto final	500	Método enzimático-colorimétrico (Uricase/POD)
Albumina	Ponto final	630	Método do verde de bromocresol
Colesterol	Ponto final	500	Método enzimático de hidrólise dos ésteres de colesterol a colesterol livre e ácidos graxos pela esterase
Triglicérides	Ponto final	500	Método enzimático de hidrólise dos triglicérides a glicerol pela lipase da lipoproteína
Ureia	Ponto final	600	Método enzimático da urease (Berthelot)
ALT	Cinético	340	Método cinético UV segundo IFCC
AST	Cinético	340	Método cinético UV segundo IFCC
CK	Cinético	340	Método cinético UV segundo IFCC
GGT	Cinético	405	Método cinético UV segundo IFCC

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry

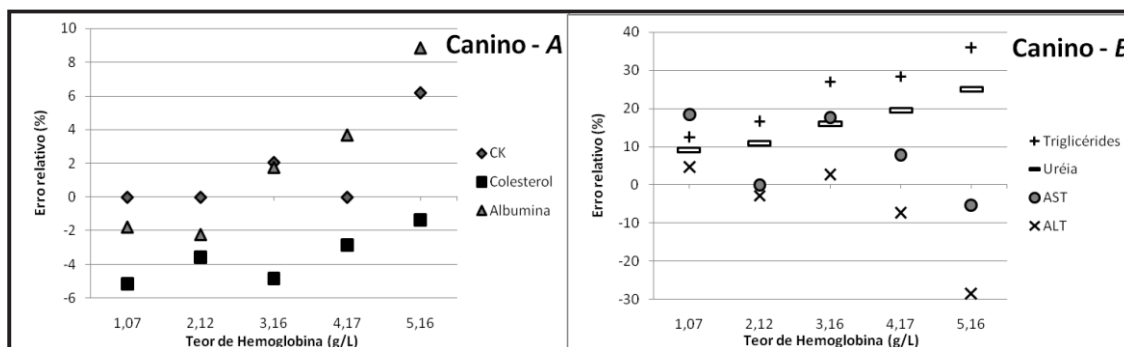
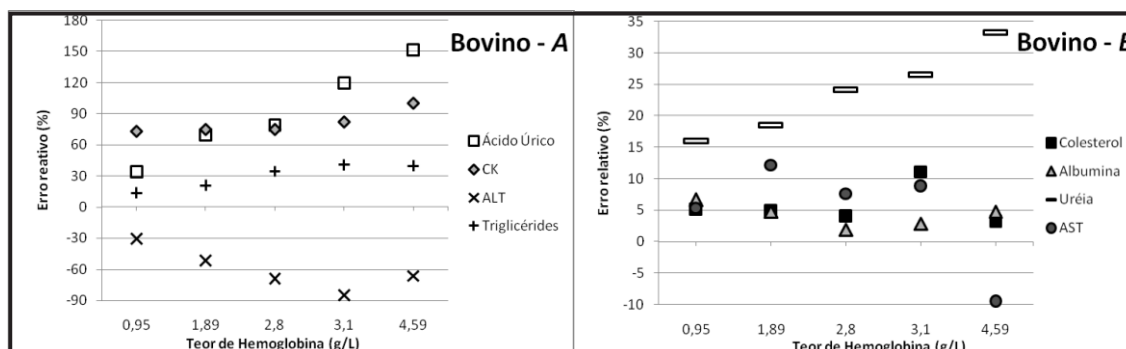
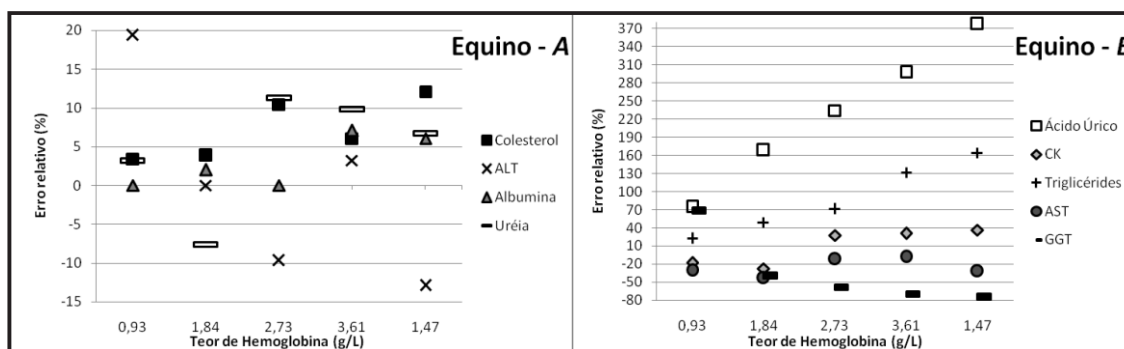
Figura 1. Valores médios do erro relativo de acordo com o grau de hemólise sérica referente a CK, colesterol e albumina (A), triglicérides, ureia, AST, e ALT (B) canino.**Figura 2.** Valores médios do erro relativo de acordo com o grau de hemólise sérica referente a ácido úrico, CK, ALT e triglicérides (A), colesterol, albumina, ureia e AST (B) bovino.

Figura 3. Valores médios do erro relativo de acordo com o grau de hemólise sérica referente a colesterol, ALT, albumina e ureia (A), ácido úrico, CK, triglicérides, AST e GGT (B) equino.



anteriores feitos por Jacobs et al. (1999). A presença da hemoglobina nas diferentes concentrações testadas promoveu expressiva elevação da atividade de CK em bovinos, variando de 72 a 99% (Figura 2A), e em equinos, -18 a 36% (Figura 3A), divergindo de Jacobs et al. (1992). Segundo Alleman (1990) o aumento de CK se deve à liberação de adenilato cinase presente nos eritrócitos que mimetiza a ação da CK, catalisando sua reação. Estes resultados corroboram com as afirmações de Frank et al. (1975) e Yücel e Dalva (1992) de que a interferência da hemólise varia entre as espécies devido às suas diferenças quanto às concentrações dos constituintes eritrocitários que podem competir com vários substratos e alterar o pH de algumas reações químicas (FRANK et al., 1975; GUDER, 1986; YÜCEL e DALVA, 1992; JAY e PROVASEK, 1993).

Na presença da menor concentração de hemoglobina, a atividade sérica de GGT de equinos aumentou em 68%, enquanto que a hemólise em maiores graus promoveu um declínio linear significativo que variou de -39 a -74% (Figura 3A). Esses resultados sugerem que o aumento de GGT sérica na menor concentração de hemoglobina deveu-se à interferência do pigmento da hemoglobina, enquanto que maiores graus de hemólise levaram à liberação de enzimas proteolíticas e inibidores intra-eritrocitários que afetaram a estabilidade e/ou reatividade da enzima.

Na presença de hemoglobina, os valores de ureia sérica de cães (Figura 1B) e bovinos (Figura 2B) aumentaram mais do que o erro máximo de 9% aceitável por Freeman e Gruenwaldt (1999), discordando de Jacobs et al. (1992) e O'Neill e Feldman (1989) que não observaram diferença significativa no teor de ureia nitrogenada em cães. Em soro equino, a concentração de ureia aumentou de modo não linear e significativo (11%) apenas na presença de 2,78g/L de hemoglobina (Figura 3B), concordando com observações Jacobs et al. (1992).

Em relação ao colesterol sérico canino

(Figura 1A), a hemólise não promoveu erro superior aos 10% considerados aceitáveis por Freeman e Gruenwaldt (1999), enquanto que em bovino (Figura 2B) e equino (Figura 3B) foi observado erro significativo apenas nas amostras com maiores concentrações de hemoglobina. O aumento de colesterolemia devido à hemólise nas espécies equina e bovina condiz com os outros estudos (DORNER et al. 1981; O'NEILL e FELDMAN, 1989; JACOBS et al., 1992) e segundo Dorner et al. (1981) deve-se em parte à liberação do colesterol da membrana eritrocitária. O'Neill e Feldman (1989) observaram que a hemólise pode aumentar ou diminuir os valores de colesterol de acordo com a característica do equipamento utilizado associado ao uso de amostra branco ou correção para hemólise.

Devido à interferência do pigmento da hemoglobina na reação de ponto final, observou-se um aumento linear no teor de triglicérides nas três espécies em estudo, sendo que variação superior aos 25% considerados como erro total aceitável por Freeman e Gruenwaldt (1999) foi observada à partir da concentração de hemoglobina de 1,84, 4,17 e 2,8g/L em equino (Figura 3A), cão (Figura 1B) e bovino (Figura 2A), respectivamente.

A interferência linear da hemólise sobre os teores de ácido úrico em equinos e bovinos, também ocorreu com a atividade de CK em bovinos, de GGT em equinos, de ureia em caninos e bovinos, e de triglicérides nas três espécies. Tais resultados de linearidade possibilitam a elaboração de modelos matemáticos que permitam corrigir tal interferência e, dessa forma, possibilitar a aceitação de amostras hemolisadas recém-colhidas.

Embora a hemólise não tenha promovido um erro total acima do aceitável clinicamente em todos os parâmetros estudados, algumas dessas variações podem ser consideradas inaceitáveis em estudos experimentais que exigem uma menor variabilidade dos resultados para adequada análise estatística. Há de se considerar também que os resultados obtidos no presente estudo se aplicam apenas a amostras

hemolisadas recém colhidas. É provável que o efeito da hemólise possa se amplificar com o prolongamento do tempo entre a colheita e análise laboratorial. Os resultados do presente estudo se limitam a laboratórios que adotam metodologias e equipamentos similares. Torna-se essencial que a interferência da hemólise sobre cada sistema analítico bioquímico seja determinada por cada laboratório considerando suas particularidades metodológicas e de equipamento.

Conclusão

A presença de hemoglobina promove variações no perfil bioquímico sérico canino, equino e bovino, entretanto o erro laboratorial não necessariamente compromete o diagnóstico, pois dependente do grau de hemólise *in vitro* e varia conforme a espécie.

Referências

- ALLEMAN, A. The effects of hemolysis and lipemia on serum biochemical constituents. **Veterinary Medicine**, New York, v.85, p.1272-1284, 1990.
- BLANK, D.W. et al. Hemoglobin interference from *in vivo* hemolysis. **Clinical Chemistry**, Washington, v.31, p.1566-1589, 1985. DORNER, J.L.; HOFFMANN, W.E. E LOCK, T.F. Effects of *in vitro* hemolysis on equine serum chemical values. **American Journal of Veterinary Research**, New York, v.42, p.1519-1522, 1981.
- FAIRBANKS, V. Hemoglobin, hemoglobin derivatives and myoglobin. In: Burtis, C.A. e Ashwood, E.R. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry**. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p.1272-1284.
- FRANK, J.J. et al. Effect of *in vitro* hemolysis on chemical values for serum. **Clinical Chemistry**, Washington, v.24, p.1966-1978, 1975.
- FREEMAN, K.P. e GRUENWALDT, J. Quality control validation in veterinary laboratories. **Veterinary Clinical Pathology**, Madinson, v.28, p.150-155, 1999.
- GUDER, W.G. Haemolysis as an influence and interference factor in clinical chemistry. **Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry**, Washington, v.24, p.125-126, 1986.
- JACOBS, R.M. et al. Effect of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine and feline sera. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.33, p.605-608, 1992.
- JAY, D.W. e PROVASEK, D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. **Clinical Chemistry**, Washington, v.39, p.1804-1810, 1993.
- LASSEN, E.D. e WEISER, G. Tecnologia laboratorial em Medicina Veterinária. In: Thrall, M.A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p.03-36.
- MEITES, S. Reproducibly simulating hemolysis, for evaluating its interference with chemical methods. **Clinical Chemistry**, Washington, v.19, p.1973, 1973.
- MERWE, L. e REYERS, F. The effect of hemolysis on plasma antithrombin activity as determined by a chromogenic method. **Veterinary Clinical Pathology**, Madinson, v.36 p.55-59, 2007.
- O'NEILL, S.L. e FELDMAN, B.F. Hemolysis as a factor in clinical chemistry and hematology of the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, Madinson, v.18, p.58-68, 1989.
- SNYDER, J.A. et al. The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic's ECI and Roche's elecsys immunoassay systems. **Clinica Chimica Acta**, Cambridge, v.384, p.181-187, 2004.
- SONNTAG, O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. **Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry**, Washington, v.24, p.127-139, 1986.
- TELEN, M.J. e KAUFMAN, R.J. The mature erythrocyte. In: Greer, J.P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p.217-247.
- YÜCEL, D. e DALVA, K. Effect of *in vitro* hemolysis on 25 common biochemical testes. **Clinical Chemistry**, Washington, v.38, p.575-577, 1992.