

# LA DETERMINAZIONE DELL'EMOGRAMMA E DEL FIBRINOGENO NEL CANE, GATTO E CAVALLO TRAMITE IL QBC® Vet Autoread™ System

GEORGE LUBAS<sup>1</sup>, ANNA PASQUINI<sup>2</sup>, ALESSANDRA GAVAZZA<sup>3</sup>, BIANCAURORA GUGLIUCCI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Professore Associato di Ematologia ed Immunologia Clinica Veterinaria, Diplomato ECVIM - CA [Internal Medicine]

<sup>2</sup> Libero Professionista

<sup>3</sup> Dottore di Ricerca in "Patologia Ambientale Veterinaria"

<sup>4</sup> Ricercatore Confermato gruppo V33B "Clinica Medica Veterinaria"

Università degli Studi di Pisa - Dipartimento di Clinica Veterinaria - Laboratorio di Ematologia - Viale delle Piagge, 2-56124 Pisa

## Riassunto

Il sistema QBC® Vet Autoread™ è il più recente strumento dedicato all'ematologia veterinaria, basato sul principio dell'analisi quantitativa del Buffy Coat. Infatti, il sangue con anticoagulante viene posto, e quindi centrifugato, in uno speciale capillare con all'interno una sonda flottante, in modo che lo strato del Buffy Coat si espanda così da rendere più evidente la stratificazione delle varie popolazioni cellulari. L'Autoreader™ effettua la scansione automatizzata del capillare, analizza i dati raccolti e li riporta sia sotto forma numerica e sia su un grafico a barre che su un grafico "Profilo Buffy Coat". Quest'ultimo, fornisce importanti informazioni aggiuntive sulle varie componenti cellulari che caratterizzano il campione analizzato. In taluni casi i risultati ottenuti vengono preceduti o seguiti da segnali di allarme o da messaggi di errore, che meritano la massima attenzione al momento della lettura della refertazione. Con il sistema QBC® Vet Autoread™ possono essere determinati fino a 12 parametri ematologici (Ematocrito, Emoglobina, MCHC, numero di Leucociti, numero assoluto e relativo di Neutrofili, numero assoluto e relativo di Linfociti e Monociti, numero di Piastrine, numero di Eosinofili, percentuale di Reticolociti e presenza di Eritrociti Nucleati). Grazie alla presenza di un precipitatore a caldo è possibile dosare anche il Fibrinogeno.

Nel presente lavoro sono stati analizzati 180 campioni di sangue con K<sub>3</sub> EDTA, di cui 100 di cane, 40 di cavallo e 40 di gatto. Una parte dei campioni analizzati apparteneva ad animali sani (47 di cane, 25 di gatto e 35 di cavallo), nei rimanenti (53 di cane, 15 di gatto e 5 di cavallo) erano invece presenti varie alterazioni ematologiche tra cui anemia rigenerativa e non rigenerativa, leucocitosi neutrofila, eosinofila o linfomonocitaria, leucopenia, trombocitosi e trombocitopenia. Dopo uno studio preliminare sugli effetti della conservazione del campione, è stata intrapresa la valutazione dello strumento esaminando la linearità, la precisione e l'accuratezza. Il QBC® Vet Autoread™ System ha mostrato di avere, nel complesso, un buon livello di linearità, precisione e accuratezza, che insieme ad una semplicissima manualità richiesta per il suo utilizzo e ad una facile manutenzione, lo rendono uno strumento valido per una struttura veterinaria di base o nell'urgenza, dal momento che può fornire delle informazioni affidabili sullo stato ematologico del paziente.

## Summary

The QBC® Vet Autoread™ System is the most recent tool devoted to veterinary hematology based on the quantitative analysis of the Buffy Coat. In fact, thanks to the use of a special tube, with an inside floating probe, where the blood is placed with an anticoagulant, and then centrifuged, the layer of the Buffy Coat expands and makes more evident the stratification of the several cellular populations. The Autoreader™ carries out the automated scanning of the tube, analyses the obtained data, and displays the results either numerically, on a bar graph as well as on a histogram. The histogram is the so-called Buffy Coat Profile, that supplies important additional information on the various cells that characterise the analysed sample. In some cases the obtained results are preceded or followed by signals of alarm or by messages of error, that should deserve the maximum attention at the reading of the results. With the QBC® Vet Autoread™ System up to 12 hematological parameters can be determined (Hematocrit, Hemoglobin, MCHC, number of Leukocytes, absolute and relative number of Neutrophils, absolute and relative number of Lymphocytes and Monocytes, number of Platelets, number of Eosinophils, percentage of Reticulocytes and presence of Nucleated Erythrocytes). Thanks to the presence of a heating device it is also possible to measure the Fibrinogen content.

The present work analysed 180 samples of blood with K<sub>3</sub> EDTA, collected from 100 dogs, 40 horses and 40 cats. Part of the analysed samples were from healthy animals (47 dogs, 35 horses, and 25 cats). The remainder samples (53 dogs, 5 horses, and 15 cats) presented various hematological alterations among which regenerative and non regenerative anemia, neutrophilia, eosinophilia, lymphomonocytosis, leukopenia, thrombocytosis, and thrombocytopenia. After a preliminary study of the effects on sample storage, the evaluation of the instrument was undertaken, considering linearity, precision and accuracy. The QBC® Vet Autoread™ System had overall, a good level of linearity, precision and accuracy. At the same time this device is simple to operate and is easy to maintain. These features make it a valuable tool in a basic veterinary facility or in an emergency situation, because it can supply reliable information on the hematological status of the patient.

## INTRODUZIONE

Il sistema dell'analisi quantitativa del "Buffy Coat" (QBC® = Quantitative Buffy Coat) rappresenta un metodo analitico originale per la determinazione dell'emogramma nei mammiferi. Questa tecnica si basa su un'intuizione di Wintrobe (uno dei padri dell'ematologia umana), il quale aveva osservato che nei capillari da microematocrito da lui stesso ideati, quando erano sottoposti a forza centrifuga, si formava una stratificazione delle varie componenti ematiche. La sua attenzione fu attratta, in particolare, dal ristretto strato dei leucociti e piastrine denominato "Buffy Coat", il quale se ampliato, avrebbe potuto fornire una caratterizzazione delle sue componenti. Più tardi Bessis dimostrò che il "Buffy Coat" era formato da tre strati ben distinti: quello dei granulociti a contatto degli eritrociti, quello intermedio delle cellule mononucleate (linfociti e monociti) ed infine lo strato delle piastrine a contatto del plasma. Infine Wardlaw e Levine furono in grado di preparare un dispositivo che espandeva lo strato del "Buffy Coat" e forniva così una serie di dati ematologici su eritrociti, leucociti e piastrine.<sup>1,31</sup>

La prima applicazione del "Buffy Coat" in veterinaria risale al 1986 dove questa tecnica fu applicata alla determinazione dell'emogramma nel cane, gatto e cavallo (QBC®-V). Questa prima versione prevedeva che la lettura del capillare fosse svolta visivamente dall'operatore attraverso un oculare munito di una lente che esaminava lo speciale capillare.<sup>20</sup>

Il QBC® Vet Autoread™ System rappresenta la più recente versione veterinaria ove la scansione del capillare è stata automatizzata, grazie alla presenza di un lettore automatico dotato di un software specifico. Pertanto è in grado di raccogliere i dati ottenuti e di analizzarli, riportandoli sia su un grafico a barre che su un grafico "Profilo Buffy Coat", fornendo così ulteriori informazioni relative alle popolazioni cellulari presenti nel campione. Il software in questione ha la possibilità di segnalare errori di lettura od eventuali incongruenze dovute a problemi del sistema, dell'esame o del campione. Con questo sistema avanzato possono essere determinati fino a 12 parametri tra cui Ematocrito (HCT), Emoglobina (HGB), Concentrazione Emoglobinica Corpuscolare Media (MCHC), numero di Leucociti (WBC), numero di Granulociti polimorfonucleati espressi sia in valore assoluto che in percentuale (GRANS e % GRANS), numero di Linfociti e Monociti espressi sia in valore assoluto che in percentuale (L/M e % L/M), numero di Piastrine (PLT). In particolari casi lo strumento è in grado di rilevare il numero assoluto di Granulociti Neutrofili ed Eosinofili (NEUT ed EOS), la percentuale di Reticolociti (Retics) e la eventuale presenza di Eritrociti Nucleati (nRBC). Infine, grazie ad un precipitatore a caldo è possibile dosare anche il Fibrinogeno.<sup>8, 9, 10, 13, 15, 16, 22, 29.</sup>

Alla luce di queste considerazioni iniziali di carattere tecnico-analitico, sia il principio di funzionamento che le numerose varianti presenti nelle risposte, rendono il QBC® Vet Autoread™ System uno strumento decisamente diverso ed originale rispetto agli altri strumenti per l'ematologia. Accanto ad un'analisi tradizionale delle caratteristiche che uno strumento ematologico deve comunque avere, tra cui buona precisione, accuratezza e linearità, è necessario sottolineare l'importanza che assumono di volta in volta le

varie segnalazioni emesse dallo strumento circa le peculiarità del test in corso o del campione in esame e che rendono l'analisi ematologica di un determinato campione estremamente specifica. Grazie alla collaborazione tra l'azienda IDEXX Italia ed il gruppo di lavoro sull'ematologia veterinaria presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa è stata intrapresa una sperimentazione al fine di valutare approfonditamente le caratteristiche e le potenzialità dello strumento QBC® Vet Autoread™ System. Ciò è stato impostato tenendo conto delle sperimentazioni e dei risultati ottenuti nelle indagini che ci hanno preceduto.<sup>13, 15, 21, 24, 29</sup>

## PRINCIPI DEL SISTEMA DI ANALISI QUANTITATIVA DEL "BUFFY COAT"

È importante caratterizzare in dettaglio i principi che sono stati sfruttati da questa strumentazione per l'esecuzione dell'emogramma, affinché si possano comprendere appieno i vantaggi ed i limiti di questa tecnica innovativa. Come già ricordato per "Buffy Coat" si intende lo strato, ottenuto per centrifugazione del campione ematico addizionato di anticoagulante, ove vanno a posizionarsi in condizioni normali i Leucociti ed i Trombociti (vedi Fig. 1). Esso è posto tra parte corpuscolata eritrocitaria (Ematocrito) e plasma. In alcune condizioni patologiche possono trovarsi in questo strato anche gli Eritrociti Nucleati ed i Reticolociti. Il sistema QBC®, sfruttando la separazione centrifuga di un campione di sangue reso incoagulabile in un particolare capillare da microematocrito, provvisto al suo interno di una sonda flottante capace di espandere lo strato del "Buffy Coat", rende molto evidente la stratificazione delle varie popolazioni cellulari.<sup>3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 22, 29</sup>

Il QBC® Vet Autoread™ System è un'attrezzatura composta da: capillari da Ematocrito monouso, una pipetta automatica per il loro preciso riempimento, una centrifuga, un blocco riscaldante a 56°C ed un dispositivo chiamato "Autoreader™" che effettua automaticamente la lettura dei capillari dopo la loro centrifugazione.<sup>13, 16, 29</sup>

Il capillare è costituito da un tubicino di vetro con un diametro pari a 1,683 mm, rivestito internamente con 9,9 mcg di arancio di acridina e 0,81 mg di ossalato di potassio. Il capillare viene riempito, tramite un'apposita pipetta, con 111 µl di sangue addizionato di K<sub>3</sub>-EDTA e sigillato ad una estremità con un piccolo coperchio di plastica; nella parte opposta del capillare viene inserita una sonda flottante avente un diametro di poco inferiore a quello interno del capillare stesso (1,596 mm). Il capillare così preparato viene fatto centrifugare per 5 minuti a 12.000 giri/min circa. Durante la centrifugazione, la presenza della sonda, che ha una densità intermedia tra quella del plasma e quella degli Eritrociti, permette l'espansione degli strati dei Leucociti e delle Piastrine nello spessore tra la sonda stessa e la parete del capillare (vedi Fig. 1). L'ossalato di potassio presente nel capillare determina un aumento dell'osmolarità plasmatica cui consegue una lieve riduzione volumetrica degli Eritrociti ed un aumento del loro peso specifico che consente una più marcata separazione tra l'Ematocrito e lo strato dei Leucociti. Il colorante arancio di acridina che riveste l'interno del capillare penetra nelle cellule conferen-

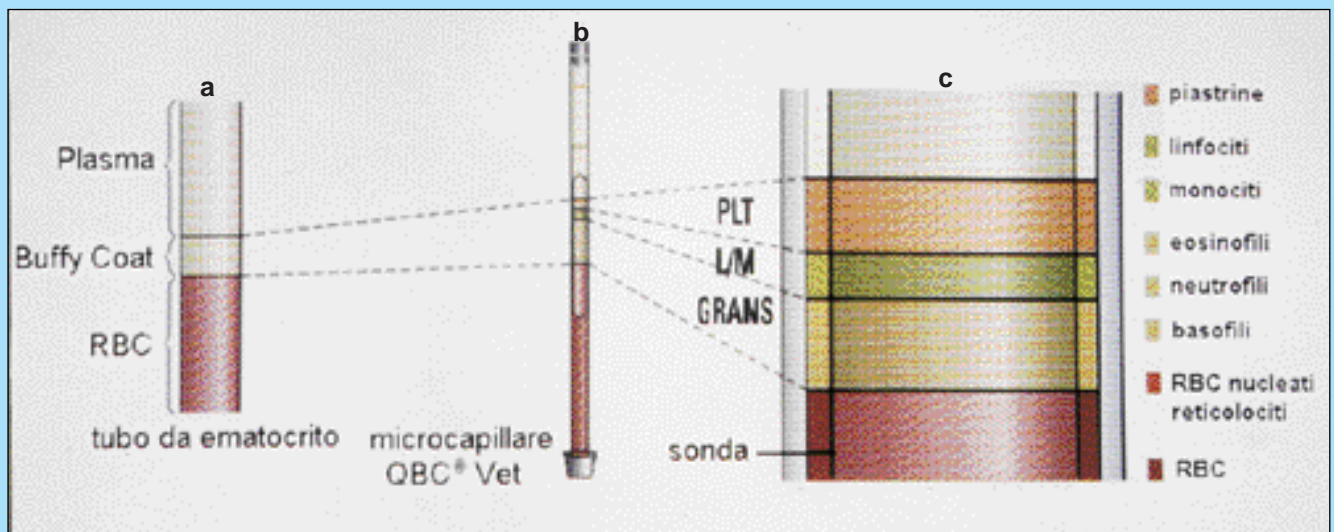


FIGURA 1 - a) a sinistra il tubo da ematocrito standard con la visualizzazione del "Buffy Coat"; b) al centro il microcapillare QBC® Vet con la sonda che espande il "Buffy Coat"; c) a destra lo strato del "Buffy Coat" ingrandito con la distribuzione ed il posizionamento delle varie cellule.

do loro una particolare colorazione che ne permette il riconoscimento. Il colorante si lega infatti a nucleoproteine (principalmente DNA e RNA), lipoproteine e glicosamine. I complessi così formati, se esposti a luce blu-violetta, prodotta dallo strumento *Autoreader*<sup>TM</sup>, danno luogo a fluorescenza tendente al verde o al rosso, a seconda che al colorante si leghino rispettivamente DNA o RNA e lipoproteine. In questo modo, gli Eritrociti non assumono alcun colorante rimanendo di color rosso scuro, i Granulociti diventano fluorescenti giallo-arancio, i Mononucleati assumono un colore verde brillante e le Piastrine si colorano di un giallo pallido fluorescente. La camera ottica del sistema facente parte del dispositivo *Autoreader*<sup>TM</sup> esamina il capillare e misura la fluorescenza emessa dai vari strati cellulari. La lunghezza di uno strato di cellule nel capillare è usata per calcolarne il numero e le variazioni nell'intensità della fluorescenza sono usate per identificare le separazioni tra gli strati (vedi Fig. 1).<sup>10, 11, 13, 15, 16, 20, 22, 29, 30</sup>

I parametri che possono così essere ottenuti sono i seguenti (tra parentesi le unità di misura):

- **HCT** (%), l'Ematocrito misurato come percentuale del volume eritrocitario rispetto al volume totale del campione di sangue;
- **HGB** (g/dl), la quantità di Emoglobina, calcolata in base alla misura della profondità a cui la sonda scende nello strato eritrocitario e quindi in funzione della densità dei globuli rossi;
- **MCHC** (g/dl), la Concentrazione Emoglobinica Corpuscolare Media, calcolata in base all'Emoglobina e all'Ematocrito con il seguente calcolo:  $(HGB/HCT) \times 100$ ;
- **WBC** ( $\times 10^9/l$ ), il numero totale dei Leucociti, ottenuto dalla somma dello strato dei Granulociti e di quello dei Mononucleati;
- **GRANS** ( $\times 10^9/l$ ), il numero assoluto dei Granulociti polimorfonucleati totali, ricavato in base alla lunghezza della banda corrispondente;
- **% GRANS** (%), il valore percentuale di tutti i Granulociti polimorfonucleati;

- **EOS** ( $\times 10^9/l$ ), il numero assoluto di Eosinofili, (solo in taluni campioni ematici di cane possono essere riconosciuti in uno strato a sé stante e quindi essere conteggiati separatamente);
- **NEUT** ( $\times 10^9/l$ ), il numero assoluto di Granulociti Neutrofili, ottenuto per differenza quando vengono riconosciuti gli Eosinofili (i Basofili, se presenti, sono compresi in questa banda);
- **L/M** ( $\times 10^9/l$ ), il numero assoluto di Linfociti e Monociti, ricavato in base alla lunghezza della banda corrispondente;
- **% L/M** (%), il valore percentuale della popolazione linfo-monocitaria;
- **PLT** ( $\times 10^9/l$ ), il numero delle Piastrine, che corrisponde alla lunghezza dello strato a minor densità del Buffy Coat, posto sopra i leucociti;
- **Retics** (%), la stima semiquantitativa dei Reticolociti, espressa in termini di volume, cioè in percentuale del volume dell'ematocrito; queste cellule sono individuate al confine tra lo strato dell'Ematocrito e del Buffy Coat, con un intervallo di misura strumentale variabile tra lo 0,2% ed il 4,0%.<sup>9, 15, 16, 29</sup>

Il lettore *Autoreader*<sup>TM</sup> effettua la lettura automatica del capillare in un minuto e mezzo e può segnalare messaggi aggiuntivi. Queste informazioni possono essere emesse al momento dell'avvio dello strumento, nella misurazione dei dati da un capillare (ad es. per un riempimento non corretto o per una imperfetta pulitura dell'esterno del capillare) o sono riferibili ai campioni, quando particolari condizioni patologiche del campione interferiscono con la determinazione dei risultati (ad es. gravissime anemie o lipemia).<sup>13, 16, 29</sup>

Per verificare il corretto funzionamento del lettore *Autoreader*<sup>TM</sup> si esegue la taratura, usando un'apposita asticella metallica divisa in vari segmenti colorati in nero e arancio. Lo strumento effettua su questa asticella misure di scansione simili a quelle di un capillare di sangue e l'*Autoreader*<sup>TM</sup> verifica che i risultati ottenuti rientrino negli intervalli di riferimento normali.<sup>16</sup>



I risultati dell'emogramma appaiono sul display dello strumento e possono essere stampati su carta. I referti stampati riportano:

- la specie animale a cui appartiene il campione di sangue (selezionata dall'operatore prima di effettuare la lettura del capillare), la data e l'ora dell'analisi;
- l'elenco dei parametri esaminati con i relativi valori numerici e l'unità di misura corrispondente. I dati ottenuti, in condizioni normali, sono sempre preceduti dal segno "=" quando il valore in questione rientra nell'intervallo di riferimento ed eguaglia il valore stampato, oppure dal simbolo "~" quando compaiono elementi cellulari che vengono rilevati solo in alcuni casi (Reticolociti, Eosinofili, Neutrofili). Talora possono essere presenti dei segnali di allarme e cioè caratterizzati dal segno ">" quando il valore del parametro è maggiore di quello stampato, ovvero dal simbolo "#", a cui corrisponde il lampeggiamento del valore sul display, quando il valore cade al di fuori dei valori limite oppure quando particolari condizioni possono aver influenzato la lettura di quel parametro per cui diventa necessario verificare l'andamento del grafico e individuare la causa di tale segnalazione. Alcune volte può accadere che il risultato numerico non compaia e venga sostituito da lineette ("- -"), perché il valore non rientra nell'intervallo di misura dello strumento o lo strato risulta troppo poco definito per poter essere letto ovvero vi sono importanti alterazioni del campione o del capillare che non permettono la regolare lettura del risultato;

- un grafico a barre, che visualizza i risultati in "BASSO", "NORMALE" e "ALTO" e permette di avere un'indicazione rapida dei dati ottenuti;
- note tecniche, ovvero eventuali messaggi di errore nella lettura del capillare, con i relativi suggerimenti per poter ottenere una migliore lettura;
- un Grafico Profilo Buffy Coat riferito al campione esaminato, per verificare e comparare l'esattezza dei risultati ottenuti (vedi Fig. 2); si tratta di un istogramma costituito da due linee: una più spessa, che indica la fluorescenza, tendente al verde, dovuta alla colorazione del DNA ed una più sottile, che indica la fluorescenza, tendente al rosso, dovuta alla colorazione dell'RNA e delle lipoproteine. L'asse delle X rappresenta il numero delle cellule appartenenti alle varie categorie cellulari, invece sull'asse Y è riportata l'intensità della fluorescenza emessa dalle cellule. In pratica, sul grafico sono riportati i vari strati che si vengono a creare lungo tutta la sonda e la presenza di linee verticali indica il punto di passaggio di uno strato a quello successivo. In un campione normale, partendo da destra, il grafico rimane piatto vicino allo zero nello strato degli Eritrociti, dal momento che questi elementi non rivelano alcuna fluorescenza; il successivo strato dei Granulociti si riconosce come una deflessione verso l'alto in entrambe le linee (RNA e DNA); di seguito si trova lo strato dei Linfociti e dei Mononucleati che appare come una curva più stretta e più alta specialmente nella linea spessa relati-

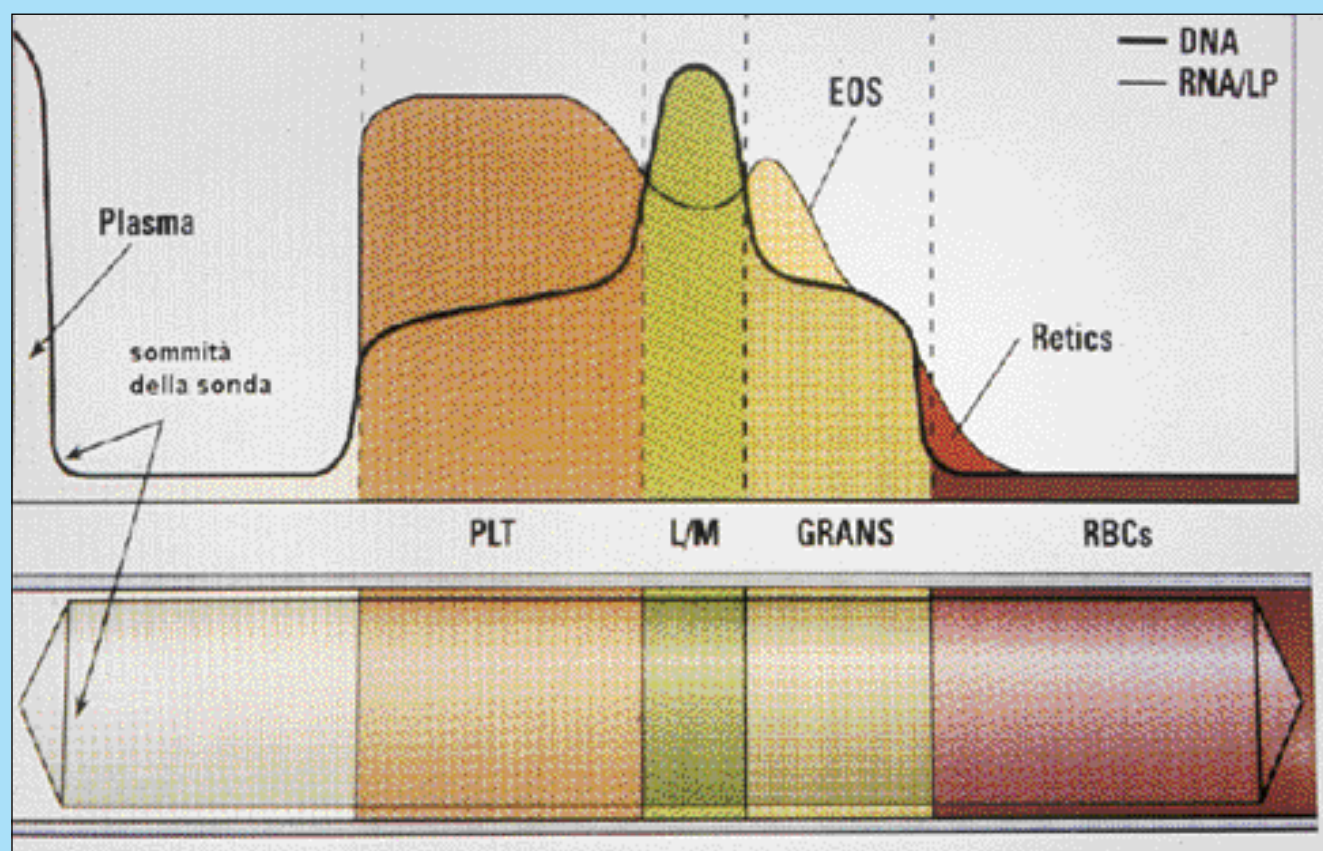


FIGURA 2 - Nella parte superiore è riportato il grafico "Profilo Buffy Coat" costituito da due linee, una più spessa relativa alla colorazione del DNA ed una più sottile relativa alla colorazione dell'RNA e delle lipoproteine; il grafico permette di visualizzare le varie popolazioni cellulari presenti nel campione. Nella parte inferiore è riportata la porzione del microcapillare QBC® Vet che include la sonda, da cui deriva il grafico "Profilo Buffy Coat".

va al DNA per una fluorescenza più spiccata ed infatti questi elementi cellulari hanno un rapporto nucleo/citoplasma più elevato rispetto ai granulociti; l'ultimo strato del "Buffy Coat" si riferisce alle Piastrine, in cui sono evidenziabili entrambe le linee, ma quella sottile, di pertinenza dell'RNA è più alta; l'ultimo settore del grafico a sinistra indica la parte superiore della sonda che si trova nel plasma, dove si rileva l'assenza di fluorescenza,

- nei campioni in cui sono state rilevate delle alterazioni, se richiesti dall'operatore, possono essere stampati dei suggerimenti diagnostici allo scopo di fornire un'indicazione interpretativa.<sup>13, 15, 16, 29</sup>

Recentemente al QBC® Vet Autoread™ System è stato aggiunto un nuovo dispositivo a se stante per la determinazione del Fibrinogeno. Si tratta di un blocco riscaldante, munito di un termostato, che raggiunge e mantiene la temperatura di 56°C e sfrutta il principio della denaturazione a caldo di questa proteina. Una volta che il capillare è stato centrifugato e letto dall'Autoreader™, viene inserito in un apposito alloggiamento del blocco riscaldante e viene lasciato in sito per 5 minuti. Quindi viene fatto centrifugare una seconda volta, in modo che il Fibrinogeno denaturato e precipitato col calore si localizzi tra lo strato dell'Ematocrito e quello del Buffy Coat. Il software più recente è in grado di effettuare automaticamente anche la lettura di questo parametro, per cui il capillare viene nuovamente inserito nel lettore che fornisce la misurazione del Fibrinogeno in mg/dl.<sup>2, 4, 6, 16, 23, 25</sup>

## VALUTAZIONE E VALIDAZIONE DELLO STRUMENTO QBC® Vet Autoread™ System

### MATERIALI E METODI

Al fine di valutare lo strumento QBC® Vet Autoread™ System (IDEXX Laboratories Italia S.r.l., Milano) sono stati analizzati 180 campioni di sangue con K<sub>2</sub> EDTA, di cui 100 di cane, 40 di cavallo e 40 di gatto. Lo strumento impiegato era dotato della versione di software 4.0 e del precipitatore del Fibrinogeno. Una parte dei campioni analizzati apparteneva ad animali sani (47 di cane, 25 di gatto e 35 di cavallo), nei rimanenti (53 di cane, 15 di gatto e 5 di cavallo) erano invece presenti varie alterazioni ematologiche tra cui anemia rigenerativa e non rigenerativa, leucocitosi neutrofila, eosinofila o linfomonocitaria, leucopenia, trombocitosi e trombocitopenia. Dopo uno studio preliminare sugli effetti della conservazione del campione, è stata intrapresa la valutazione dello strumento esaminando la linearità (capacità di misurare un parametro in una serie di campioni sottoposti a diluizioni seriali progressive), la precisione (capacità di riprodurre in modo costante nel tempo un determinato risultato) e l'accuratezza (capacità di misurare correttamente il vero valore di un parametro nel campione).<sup>5, 19, 21, 24</sup>

### Effetti della conservazione del campione

Dal momento che i tempi tra il prelievo e l'analisi

**BiEsseA® s.r.l.**  
LABORATORIO DI ANALISI VETERINARIE



### Comitato Scientifico:

**Prof. M. Castagnaro, Dr. G. Romanelli, D.ssa C. Noli, Dr. E. Minetti**

*Istopatologia generale, Neuroistopatologia, Istopatologia su prelievi bioptici (renali, epatici, gastrointestinali, prostatici), Istopatologia tossicologica, Dermatopatologia, Biopsie uterine delle cavalle fattrici, Citologia, Endocrinologia, Sierologia malattie infettive e parassitarie (E.L.I.S.A., Immunofluorescenza etc.), Batteriologia e Micologia, Ematologia e Biochimica Clinica, Profili a costo ridotto, Piani eradicazione ed assistenza zootecnica di laboratorio.*

**TELEFONATE PER INFORMAZIONI  
E PREVENTIVI**

**Tel. 02/29.40.46.36 r.a. • Fax 02/29.40.46.44**  
**Via Amedeo d'Aosta, 7 - 20129 MILANO**

ematologica possono essere piuttosto variabili (ad esempio per la distanza che separa una scuderia, il domicilio dello studio o del paziente dal laboratorio), due campioni di sangue di cane e di cavallo, mantenuti a temperatura ambiente, sono stati esaminati per quattro volte consecutive, subito dopo il prelievo, dopo 1 ora, dopo 2 ore e dopo 3 ore dal prelievo. Per ogni parametro ematico determinato dallo strumento, è stato calcolato il Coefficiente di Variazione ( $CV = ds / M \times 100$ , dove ds ed M sono rispettivamente la deviazione standard e la media) di tutti i risultati ottenuti, in modo da valutarne la ripetibilità.<sup>11, 13, 16</sup>

### Linearità, precisione ed accuratezza

Per valutare la linearità, è stato raccolto un campione di 5 ml di sangue con EDTA da un cane. Il sangue è stato fatto centrifugare a circa 2.500 rpm per 10 minuti, in modo da separare la parte corpuscolata dal plasma. Sono state quindi effettuate diluizioni scalari di 50 mcl della parte corpuscolata nel proprio plasma a partire da 0 fino a 500 mcl. I campioni così ottenuti sono stati letti dallo strumento ed i risultati ottenuti per i vari parametri sono stati confrontati con il titolo delle diluizioni, tramite il Coefficiente di Regressione R.<sup>10, 11, 13, 20, 22, 27, 28, 29</sup>

La precisione dello strumento, è stata misurata calcolando il CV per ogni parametro tra più letture di uno stesso campione. Sono state effettuate due prove diver-

se, la prima (CV1) che tiene conto della preparazione e della centrifugazione del campione (un campione di sangue canino è stato centrifugato ed analizzato per 10 volte consecutive) e la seconda (CV2) che riguarda solo la lettura da parte dell'Autoreader™ (ripetizione della lettura di uno stesso capillare per 10 volte di seguito).<sup>10, 11, 13, 20, 22, 27, 28, 29</sup>

Per ottenere una stima dell'accuratezza, sono stati confrontati i dati forniti dal QBC® Vet Autoread™ System su campioni di sangue di cane, gatto e cavallo, con quelli ottenuti da altre strumentazioni e metodiche, abitualmente determinate dal nostro laboratorio, mediante il coefficiente di regressione R. Perciò, per ogni campione delle tre specie, sono stati eseguiti anche:

- l'emogramma, con il contaglobuli automatico a impedanza elettrica "hemat 8, SEAC, Calenzano, Fi" (comprendente numero degli Eritrociti, dei Leucociti e delle Piastrine, Emoglobina, Ematocrito, MCV, MCH, MCHC, ampiezza di distribuzione degli Eritrociti, volume piastrinico medio, piastrinocrito ed ampiezza di distribuzione delle Piastrine);
- il microematocrito (mHct), con la centrifugazione degli appositi capillari "Micro haematocrit tubes, BRAND, Mi" nella microcentrifuga "haematocrit centrifugette 4203, ALC, Mi";
- uno striscio di sangue per le osservazioni delle varie componenti cellulari, la stima piastrinica e la conta differenziale leucocitaria, opportunamente colorato "Diff Quick®, DADE, Dudingem, CH";



## Il vostro laboratorio di biologia veterinaria

**Consulenza diretta  
per tutte le analisi veterinarie effettuate.**

### Consulenti scientifici:

Stefano Bo, Alessandro Bonioli, Paolo Buracco, Lorenzo Domenia

### ✓ TEST IFA/SIEROLOGIA

Cimurro, FIP, FIV, FELV, Neospora, Parvovirus, Panleucopenia  
Leishmaniosi, Toxoplasmosi, Ehrlichiosi, Borreliosi

### ✓ ISTOLOGIA, CITOLOGIA

### ✓ EMATOLOGIA, BIOCHIMICA, MICOLOGIA

### ✓ ENDOCRINOLOGIA

Test FeLV-Ag Midollo, Cryptococchi, FIV WB



ELLEVITI s.a.s. Laboratorio Veterinario Torinese - Lungo Dora Firenze 151 - 10153 Torino (I)  
Direttore responsabile: Dr. Manuela Piraino - Tel. +39 11 235497 - Fax +39 11 235694  
Aut. reg. Piemonte 117 - 13941 - Iscriz. CCCIAA Torino 483560/1998 - P. IVA 07086170011

- il conteggio dei Reticolociti, per i campioni anemici (cane e gatto rispettivamente con valore HCT inferiore a 30% ed a 25%), con il colorante Nuovo Blu di Metilene "New Methylen Blue N, FLUKA, Mi";
- il Fibrinogeno è stato determinato sia con il refrattometro "LEICA, Buffalo, NY, USA" che con il coagulometro elettromeccanico "Clot 2, SEAC, Calenzano, Fi". Il metodo refrattometrico si basa sul medesimo principio di precipitazione a caldo utilizzato dal sistema QBC® Vet Autoread™, ma la lettura del risultato è visiva da parte dell'operatore. Il metodo coagulometrico, impiega un campione di plasma citrato diluito 1:10 con una soluzione tampone (Tris/EACA 90000210, SEAC, Calenzano, Fi) al quale si aggiunge un eccesso di trombina (Fibrinogen reagent 90000210, SEAC, Calenzano, Fi), in modo che il tempo di coagulazione dipenda esclusivamente dalla concentrazione di Fibrinogeno presente nel campione in esame.

## RISULTATI

### Effetti della conservazione del campione

La Tabella 1 contiene i risultati del CV riferiti alla ripetibilità nelle prove di conservazione dei campioni. I valori evidenziano che le alterazioni subite nel tempo dai vari

parametri sono modeste. Seppure i dati relativi al sangue di cavallo risultino essere tutti inferiori a quelli del cane, in entrambe le specie le misurazioni relative al comparto leucocitario risultano essere quelle che subiscono la variazione più evidente.<sup>16, 29</sup>

### Linearità, precisione ed accuratezza

Le prove di linearità (vedi Tab. 2) sono risultate soddisfacenti poiché il valore minimo di R è risultato pari a 0,93, valore quest'ultimo riferito ai Reticolociti che, come già ricordato, vengono conteggiati in modo approssimativo. Per gli altri parametri i valori di R sono tutti addirittura superiori allo 0,95. Per il campione più diluito costituito totalmente da plasma l'Hct è risultato pari a 5,4 e l'Hgb pari a 0,9. Questi valori erano preceduti dal segnale "#" e gli altri parametri non sono stati determinati (comparsa delle linee "—" sul display); per il campione più concentrato, ovvero costituito prevalentemente dalla parte corpuscolata, l'Hct è risultato pari a 68,1. Questi valori dell'Hct devono essere considerati i limiti della linearità dello strumento.<sup>13, 29</sup>

I risultati dei CV raccolti nella Tabella 3, relativi alla precisione, sia della preparazione e della centrifugazione del campione (CV1) che della lettura dell'Autoreader™ (CV2), sono da considerarsi adeguati: i valori di CV riferiti a HCT, MCHC, WBC e GRANS % sono inferiori a 3,00 come accade negli strumenti a impedenza elettrica,

**Tabella 1**  
Prove di ripetibilità in caso di conservazione del campione valutata mediante Coefficiente di Variazione (CV), calcolata per ogni parametro, sui risultati ottenuti subito dopo il prelievo, dopo 1 ora, dopo 2 ore e dopo 3 ore dal prelievo

	HCT	HGB	MCHC	WBC	GRANS %	L/M %	PLT	Retics
CV cane	2,86	3,87	2,03	5,37	2,81	11,7	9,16	31,77
CV cavallo	1,95	2,16	0,50	2,02	2,95	4,38	4,08	N.D.

NOTE: N.D. = Non Determinabile nel cavallo

**Tabella 2**  
Linearità valutata mediante Coefficiente di Regressione R

	HCT	HGB	MCHC	WBC	GRANS	L/M	PLT	Retics
R	0,99	0,99	0,95	0,99	1,00	0,96	0,99	0,93

**Tabella 3**  
Precisione calcolata mediante Coefficiente di Variazione; CV 1: precisione della preparazione e centrifugazione del campione, CV 2: precisione della lettura dell'Autoreader™

	HCT	HGB	MCHC	WBC	GRANS %	L/M %	PLT	Retics	Fibrinogeno
CV 1	2,68	3,19	1,24	2,62	2,89	5,14	6,81	20,76	2,36
CV 2	0,83	1,22	0,44	2,89	0,74	1,70	2,53	8,55	2,57



mentre i risultati CV di HGB, L/M% e PLT sono superiori a 3,00, ma ugualmente accettabili poiché il principio del QBC® Vet Autoread™ System non è sovrapponibile a quello degli altri contaglobuli. Infatti il valore minimo dell'errore accettabile per gli altri metodi analitici è del 10%. Decisamente più elevati risultano i dati relativi al CV dei Reticolociti.<sup>13, 29</sup>

I coefficienti R relativi all'accuratezza, riportati nelle Tabelle 4 e 5, sono da considerarsi adeguati se uguali o superiori a 0,7. Più precisamente la Tabella 4 comprende tutti i dati relativi all'emogramma, ad eccezione delle frazioni leucocitarie, mentre nella Tabella 5 sono raccolti i valori di R riferiti alle varie componenti leucocitarie che lo strumento è in grado di distinguere. Complessivamente i risultati ottenuti sono quindi da considerarsi soddisfacenti, considerando anche il fatto che sono stati compresi tutti i campioni, anche quelli per i quali il QBC® Vet Autoread™ System ha emesso valori preceduti dal segno "#". È possibile infatti osservare come i coefficienti della Tabella 4 siano piuttosto elevati, in buona parte anche superiori allo 0,9. Il valore di R più basso, pari a 0,59, è quello relativo alle PLT del gatto.<sup>13, 29</sup>

Osservando la Tabella 5 si può constatare che tutti i valori di R possono essere considerati accettabili; i coefficienti riguardanti la popolazione linfomonocitaria del cane e del gatto sono i più bassi.<sup>13, 29</sup>

## Determinazione del Fibrinogeno

Una valutazione a parte riguarda la comparazione delle determinazioni del Fibrinogeno con i diversi metodi, nelle varie specie animali (vedi Tab. 6). Si deve infatti considerare che la metodica refrattometrica è un metodo semiquantitativo con lettura soggetta ad apprezzamento personale dell'operatore, quella del sistema QBC® si basa sullo stesso principio della precipitazione a caldo, ma si avvale di un lettore automatizzato. Differente è la tecnica impiegata dal coagulometro, che è considerata metodo di riferimento. I coefficienti R comunque variano da 0,60 a 0,90 e sono quindi da ritenersi assolutamente adeguati.<sup>2, 4, 6, 25</sup>

## CONCLUSIONI

Il QBC® Vet Autoread™ System fornisce una serie di valori relativi all'emogramma con un buon grado di precisione unito ad una buona linearità. Rimane però da segnalare, per quanto riguarda la precisione, che i CV dei Reticolociti sono risultati: 20,76 il CV1, relativo alla preparazione e centrifugazione del campione, e 8,55 il CV2, relativo alla lettura dell'Autoreader™; in realtà il sistema QBC® per la determinazione di questi elementi cellulari è di tipo semiquantitativo, variando da 0,2% al 4,0%, ovvero li segnala soltanto se presenti, pertanto è da considerarsi già un risultato positivo il semplice fatto che essi siano stati rilevati ad ogni lettura dello stesso campione. Dall'osservazione dello striscio di sangue colorato con Nuovo Blu di Metilene, infatti, è risultato che sia il primo che il secondo campione analizzati presentavano Reticolociti.

**Tabella 4**  
Accuratezza dell'emogramma mediante Coefficiente di Regressione R nel cane, gatto e cavallo

	CANE	GATTO	CAVALLO
HCT QBC® – HCT h8	0,96	0,96	0,94
HCT QBC® - mHCT	0,96	0,91	0,94
HGB QBC® - HGB h8	0,95	0,95	0,85
WBC QBC® – WBC h8	0,85	0,76	0,76
PLT QBC® – PLT h8	0,69	0,59*	0,75
Retics QBC® – Retics NBM	0,74	N.T.	N.D.

NOTE: QBC® = lettura QBC®; h8 = lettura con hemat 8 SEAC; NBM = Nuovo Blue di Metilene; N.T. = Non Testato; N.D. = Non Determinabile; \*sono stati utilizzati solo 20 campioni in quanto non presentavano aggregazione piastrinica.

**Tabella 5**  
Accuratezza nella determinazione delle popolazioni leucocitarie valutata mediante Coefficiente di Regressione R nel cane, gatto e cavallo

	CANE	GATTO	CAVALLO
WBC QBC® – WBC h8	0,85	0,76	0,76
GRANS QBC® – GRANS cdl	0,77	0,83	0,90
L/M QBC® – L/M cdl	0,56	0,60	0,80
EOS QBC® – EOS cdl	0,81	N.D.	N.D.
NEUT QBC® – NEUT cdl	0,79	N.D.	N.D.

NOTE: QBC® = lettura QBC®; h8 = lettura con hemat 8 SEAC; cdl = conta differenziale leucocitaria; N.D.=Non Determinabile.

**Tabella 6**  
Accuratezza nella determinazione del Fibrinogeno mediante Coefficiente di Regressione R nel cane, gatto e cavallo

	CANE	GATTO	CAVALLO
Fibrin. QBC® – Fibrin. R	0,68	0,75	0,82
Fibrin. QBC® – Fibrin. C	0,76	0,84	0,90
Fibrin. R – Fibrin. C	0,79	0,62	0,74

NOTE: Fibrin. = Fibrinogeno; QBC® = lettura QBC®; R = lettura con refrattometro; C = lettura con coagulometro.

Per quanto riguarda l'accuratezza, studiata mediante il coefficiente R, benché si ripresenti il problema che lo strumento rileva i Reticolociti con una sensibilità diversa dal metodo di riferimento, nel cane è risultata pari a 0,74, quindi la correlazione tra i due metodi è da considerarsi comunque interessante. Il valore dei Reticolociti espresso da questo strumento (% dell'HCT) non permette di impiegare questo risultato per il calcolo dell'Indice di Produzione Reticolocitaria (RPI). Ci proponiamo con un successivo studio analitico dei casi patologici di anemia di approfondire questo importante parametro eri-



trocitario rigenerativo. Al momento, il valore dei Reticolociti del 4,0%, viene proposto come indice di rigenerazione anche in presenza di un ridotto HCT, mentre valori attestati intorno a 0,2-0,4%, indirizzano verso un'anemia scarsamente rigenerativa.<sup>13, 15, 29</sup>

Per quanto concerne l'accuratezza degli altri dati dell'emogramma, tenendo ben presenti le differenze metodologiche e le peculiarità del sistema analizzato rispetto allo strumento ad impedenza elettrica, questa è risultata ottima per i parametri eritrocitari (HCT e HGB), buona per il numero dei Leucociti (WBC) e dei Granulociti (GRAN) ed ancora buona nella ripartizione di eosinofili (EOS) e neutrofili (NEUT) nel cane (vedi Tabb. 4 e 5). Risulta appena sufficiente invece per la ripartizione leucocitaria di Linfociti e Monociti (L/M), eccetto che nel cavallo e per la conta piastrinica (PLT) ad eccezione che nel gatto.

Nella Tabella 4 infatti il valore di R per le PLT del gatto è di 0,59, ove sono stati considerati solo 20 campioni che non presentavano aggregazione piastrinica nello striscio ematico. Infatti, nella specie felina, la determinazione del numero di questi elementi cellulari risulta particolarmente difficoltosa in seguito all'accentuarsi di questo fenomeno. Se fossero stati considerati nel calcolo anche questi campioni con PLT aggregate il valore di R si sarebbe ulteriormente ridotto, divenendo 0,38. È comunque importante rilevare che in numerosi casi la stima delle PLT effettuata sullo striscio di sangue periferico ha rivelato la presenza di aggregati piastrinici anche di piccole dimensioni. Quindi il numero di PLT rilevato dal sistema QBC® risulta generalmente superiore a quello dello strumento a impedenza elettrica ma riteniamo anche più rispondente ad una stima piastrinica adeguata, come osservato dallo striscio.<sup>10, 11, 13, 26, 28, 29</sup>

Dall'osservazione della Tabella 5 emerge che sono risultati inferiori al valore minimo accettabile gli R relativi alla quota di L/M sia del cane che del gatto. Il valore decisamente più elevato riscontrato nei campioni di cavallo può dipendere sia dal fatto che sono stati esaminati prevalentemente soggetti sani e sia perché in questa specie i linfociti sono più numerosi e di volume decisamente inferiore a quello dei polimorfonucleati. Abbiamo inoltre potuto constatare, soprattutto nel cane, specie per la quale la casistica è più elevata, e nei casi di leucocitosi che, pur essendo rilevata l'alterazione, i valori numerici sono spesso differenti da quelli emessi dal contaglobuli a impedenza elettrica. In questi casi il parametro WBC e quelli relativi alla conta differenziale leucocitaria erano contrassegnati con il simbolo "#"; e quando il numero di WBC superava  $90 \times 10^9/l$ , il valore del QBC® Vet Autoread™ System era addirittura sostituito dalle linee "—" <sup>13, 26, 28, 29</sup>

A questo proposito occorre ricordare che il QBC® Vet Autoread™ System, oltre che emettere valori numerici sufficientemente accurati e precisi, può fornire informazioni, attraverso i messaggi e soprattutto con i grafici, che contribuiscono a rendere l'emogramma significativo da un punto di vista clinico e diagnostico. Da una prima osservazione dei dati relativi ai campioni patologici analizzati, è possibile ricavare alcune considerazioni preliminari, che vengono riportate solo a titolo esemplificativo e che necessitano di essere approfondite con

studi statistici significativi: i casi di anemia di vario grado (39 nel cane e 8 nel gatto) sono stati rilevati da entrambi gli strumenti e, in alcuni casi di anemia grave ipocromica i valori di HGB e MCHC sono stati preceduti dal segno "#"; i casi di leucocitosi (39 nel cane e 15 nel gatto), solo in pochissimi casi (2 nel cane e 4 nel gatto) non sono stati rilevati dal QBC® Vet Autoread™ System; in questi casi ed in altri 14 (leucocitosi grave, presenza di linfociti reattivi, lipemia o ittero), il valore WBC era preceduto dal segno "#", in 3 casi in cui la leucocitosi era molto grave, con valori superiori a 90.000/l il QBC® Vet Autoread™ System non leggeva il valore ma emetteva il segno "—" sia per i WBC che per le PLT; i casi di trombocitopenia (16 nel cane e 25 nel gatto) sono stati spesso rilevati da uno solo dei due strumenti ma, come riportato in precedenza, il fenomeno dell'aggregazione piastrinica si interpone nella determinazione di questo parametro. Nei casi in cui sono presenti alterazioni ematologiche quindi, più che focalizzare l'attenzione sui valori numerici emessi dallo strumento, è importante considerare i segnali che, in questi casi, precedono gli stessi. Quando i valori numerici sono preceduti dal segno "#", questi vanno riconsiderati ed allora si impone l'accurata osservazione di uno striscio di sangue periferico che peraltro dovrebbe essere sempre effettuato a completamento di qualsiasi emogramma. Se, come ad esempio nei casi di anemia grave o di intensa leucocitosi, i valori numerici sono preceduti dal segno "—", le alterazioni del campione sono tali da non consentire una corretta analisi; perciò, dopo aver ripetuto il test ed eventualmente il prelievo, è necessario ricorrere ad indagini ematologiche tradizionali tramite contaglobuli.<sup>13, 15, 16, 29</sup>

La determinazione del Fibrinogeno, analisi aggiuntiva fattibile con il QBC® Vet Autoread™ System è risultata sufficientemente accurata e comparabile con il metodo di riferimento costituito dalla prova coagulometrica nelle tre specie considerate (vedi Tab. 6). Analoghi risultati, ma lievemente più bassi sono apprezzabili nel confronto tra le due metodiche con la precipitazione a caldo, soprattutto derivanti dalla loro determinazione (visiva quella refrattometrica ed automatizzata quella del QBC® Vet Autoread™ System). Questo parametro costituisce un importante complemento dell'emogramma dal momento che l'ipo- o l'iperfibrinogenemia, sono un utile ausilio diagnostico nel documentare un processo infiammatorio.

Si sottolinea inoltre l'importanza dello studio del Grafico Profilo Buffy Coat che, unitamente agli altri eventuali messaggi e segnali, svolge una funzione sia di controllo dei dati numerici emessi, che di approfondimento delle caratteristiche del campione in esame. Infatti il grafico subisce notevoli modifiche a seconda del campione in esame. A titolo esemplificativo, si possono evidenziare le principali alterazioni che si rilevano rispetto alla norma: la presenza di Reticolociti può essere visualizzata come un innalzamento della linea sottile nello strato degli Eritrociti, prima della linea verticale di separazione dai Granulociti; in modo simile, gli nRBC si rilevano come un innalzamento di entrambe le linee nel punto di passaggio tra Eritrociti e Granulociti con cui spesso vanno a confondersi e da cui segue il segnale # che precede il valore WBC (vedi Fig. 3); gli

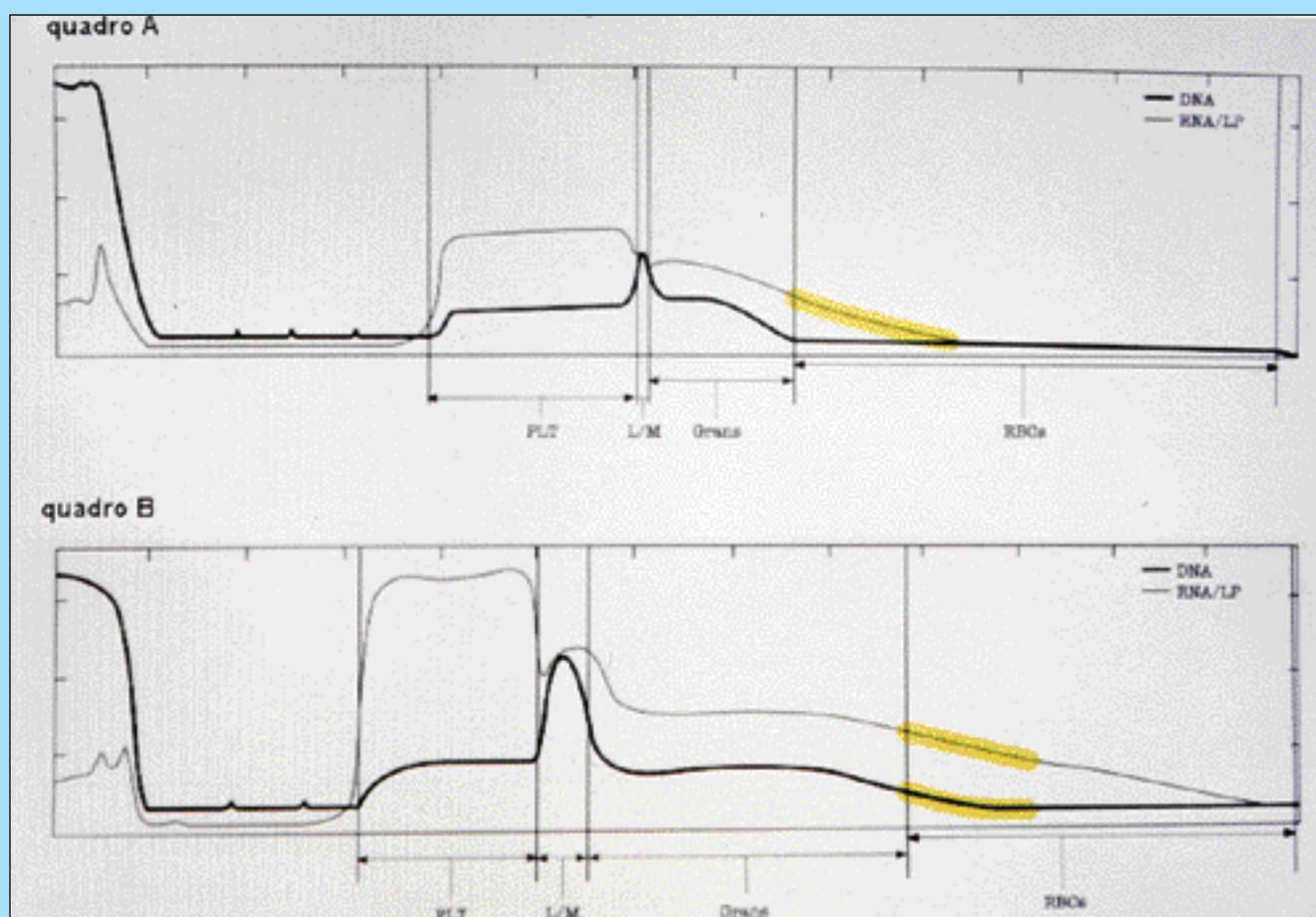


FIGURA 3 - Quadro A) la parte evidenziata in giallo della linea più sottile del grafico "Profilo Buffy Coat" segnala la presenza di Reticoloci; quadro B) le parti evidenziate in giallo, in entrambe le linee del grafico "Profilo Buffy Coat", segnalano la presenza sia di Reticoloci (linea più sottile) che di nRBC (linea più spessa).

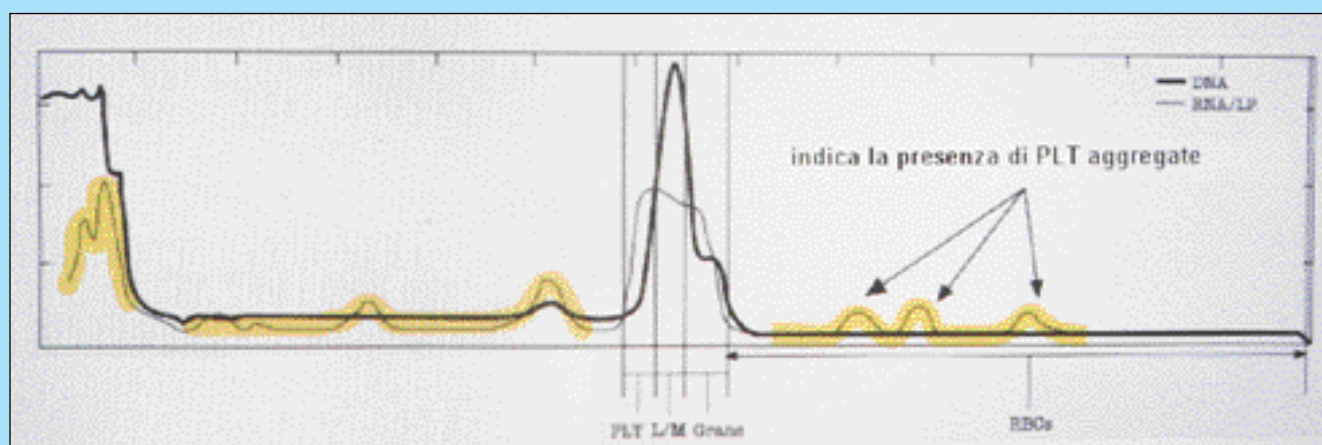


FIGURA 4 - La parte evidenziata in giallo della linea più sottile del "Profilo Buffy Coat" segnala la presenza di PLT aggregate.

Eosinofili, se individuati, vanno a formare un ulteriore piccolo nella linea sottile dello strato dei Granulociti; talvolta la presenza di Piastrine aggregate si rileva dalla presenza di un rialzo anomalo nella parte superiore della sonda; la comparsa di coaguli può creare la formazione di piccole prominente, in entrambe le linee, lungo tutto il grafico (vedi Fig. 4).<sup>13, 15, 16, 29</sup>

Infine, le note ematologiche ed i relativi suggerimenti diagnostici che seguono il grafico devono essere destinati ad esclusivo uso del medico veterinario, che ha la preparazione necessaria alla loro giusta interpretazione. Questi suggerimenti rispondono ad una consolidata ed accettata proposta diagnostica orientata al problema ematologico identificato dalle analisi. Ma, come è noto, questi referti

devono essere collegati ad una visita clinica ed eventualmente ad altri accertamenti di laboratorio. Deve essere pertanto raccomandato al veterinario di non fornire al proprietario i referti con i suggerimenti diagnostici, se non dopo un'adeguata spiegazione, poiché risultano essere fonte di una esagerata preoccupazione da parte del padrone dell'animale. Tale inconveniente è stato osservato nella ns. pratica quotidiana di consulenza professionale per problemi di pertinenza ematologica. Di fatto, l'emissione di questo tipo di risposte, senza adeguati chiarimenti, può indurre il proprietario attento o ansioso a rivolgersi ad altre strutture qualificate per avere un'eventuale conferma del problema prospettato dal referto.<sup>15</sup>

Meritano anche alcune brevi considerazioni le modalità d'uso dello strumento e la sua manutenzione. L'esecuzione degli emogrammi con il *QBC® Vet Autoread™ System* è molto semplice e può essere svolta da operatori diversi dal momento che non occorrono particolari esperienze di laboratorio; questo aspetto può rivelarsi importante per il suo impiego in strutture in cui si effettuino turni oppure in caso di emergenze.

Inoltre questo strumento può essere attivato in qualsiasi momento, senza particolari precauzioni, poiché la sua calibrazione viene facilmente svolta con la lettura dell'apposito bastoncino; questo significa che non è importante la quantità di analisi svolte né la loro distribuzione nel tempo.<sup>13, 15, 16, 29</sup>

Si conclude che lo strumento *QBC® Vet Autoread™ System* ha quindi il merito di rendere l'ematologia alla portata di qualsiasi struttura o figura professionale veterinaria di base, grazie alla sua rapida e semplice manualità e può sicuramente costituire un affidabile ausilio nello svolgere un'opera di screening generale dello stato di salute del paziente.<sup>13, 15, 16, 29</sup>

## Bibliografia

- Bessis M.C. (1941) Une méthode permettant l'isolement des différents éléments figures du sang - Sang, 14, 262-264.
- Blaisdell F.S., Dodds J.W. (1977) Evaluation of two microhematocrit methods for quantitating plasma fibrinogen - JAVMA, 171, 340-342.
- Brown S.A., Barsanti J.A. (1988) Quantitative buffy coat analysis for hematologic measurements of canine, feline, and equine blood samples and for detection of microfilariaemia in dogs - Am J Vet Res, 49, 321-324.
- Burmester H.B.C., Aulton K., Horsfield G.I. (1970) Evaluation of a rapid method for the determination of plasma fibrinogen - J Clin Pathol, 23, 43-46.
- Caldini M., Pasquinelli F. (1992) Il controllo di qualità, in: Diagnostiche e tecniche di laboratorio, Pasquinelli F., Rosini edit., Firenze, vol. I, 321-340.
- Ellis B.C., Stransky A. (1961) A quick and accurate method for the determination of fibrinogen in plasma - J Lab Clin Med, 58, 477-488.
- Fisher A., Lechner J., Kraft W., Hirschberger J. (1989) The test of a centrifugal hematology system for use in clinical practice - Tierarztl Prax, 17, 227-230.
- Fukase T., Hanashima Y., Fukase A., Nakamura Y., Akihama S. (1993) Haematological examination of dogs by the QBC V centrifugal haematology system using a microhematocrit method with quantitative buffy coat analysis - Jour Vet Med - Japan, 46, 449-455.
- Fukase T., Hanashima Y., Fukase A., Nakamura Y., Akihama S. (1993) Haematological examination of dogs by the QBC V centrifugal haematology system using a microhematocrit method with quantitative buffy coat analysis: correlation with other haematological methods - Jour Vet Med - Japan, 46, 625-628.
- Gavazza A., Lubas G., Pasquini A., Preziuso S. (1999) Determinazione dell'emogramma mediante il sistema "Quantitative Buffy Coat" nel cane e nel gatto. Risultati preliminari - Atti 38° Cong Naz SCIVAC, Montecatini, 18-21 marzo 1999, 335.
- Guelfi J. F., Julie P. (1989) Profilé hématologique par analyse quantitative du "Buffy Coat" (QBC) chez le chien, le chat et le cheval - Prat Med Chir Anim Comp, 24, 485-491.
- Greppi G., Cavallone E., Mantelli F., Sommariva M. (1989) Ematologia a colori in ambulatorio - Scienze Veterinarie, 3, 3-6.
- Hofmann-Lemann R., Wegmann D., Winkler G.C., Lutz H. (1998) Evaluation of the QBC-Vet Autoread Haematology System for domestic and pet animal species - Comp Haem Intl, 8, 108-116.
- Holst H., Edqvist L.E. (1991) Kvantifiering av buffy coat; att veterinärmedicinskt diagnostiskt hjälpmedel - Svensk Veterinartidning, 43, 269-273.
- IDEXX Laboratories, Inc. (1997) Seminar by the sea - Portland, Maine USA, 24-28 Oct, 1997.
- IDEXX Laboratories, Inc. (1997) - QBC® "Vet Autoread™" Hematology System - Manuale per l'Operatore - Idexx srl Italia
- Jackson J.F. (1961) Supravital blood studies, using acridine orange fluorescence - Blood, 17, 643-649.
- Jain N.C. (1993) Essentials of Veterinary Hematology - Lea & Febiger, Philadelphia, 4.
- Knoll J.S., Rowell S. L. (1996) Clinical Hematology. In: Clinic Analysis, Quality Control, Reference Values, and System Selection - Vet Clin North Am, Small Anim Pract, Update on Clinical Pathology, 26, 981-1002.
- Levine R.A., Hart A.H., Wardlaw S.C. (1986) Quantitative buffy coat analysis of blood collected from dogs, cats, and horses - JAVMA, 189, 670-673.
- Lubas G. (1997) Appunti di ematologia clinica comparata - ediz. SEU, Pisa, 3a ed., pp. 52-62.
- Meister D., Tshudi P., Hermann M., Lutz H. (1990) Experiences with the QBC-V hematology system at the veterinary hospitals of Zurich and Bern - Schweiz Arch Tierheilkd, 132, 261-266.
- Millar H.R., Simpson J.G., Stalker A.L. (1971) An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation - J Clin Pathol, 24, 827-830.
- Pasquini A., Gavazza A., Lubas G., Gugliucci B. (1998) Guida alla scelta di uno strumento per l'ematologia veterinaria: proposta di un piano di controllo di qualità e di un programma di validazione - Veterinaria, 12, 21-29.
- Ratnoff O.D., Menzie C. (1951) A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma - J Lab Clin Med, 37, 316-320.
- Sallitt R.L., Ho T.T., Rodriguez R.R. (1985) Evaluation of Leukocyte Differential Counts on the QBC Centrifugal Hematology Analyzer According to NCCLS Standard H 20-T - Blood Cells, 11, 281-294.
- Tremblay J.A., Rife H.M. (1989) Quantitative buffy coat analysis: A one-year system review - Vet Med, 84, 549-551.
- Wardlaw S.C., Levine R.A. (1983) Quantitative buffy coat analysis. A new laboratory tool functioning as a screening complete blood cell count - JAMA, 249, 617-620.
- Wegmann D., Hofmann-Lehmann R., Lutz H. (1997) Kurzevaluation des QBC-Vet Autoread-System - Tierarztl Prax, 25, 185-191.
- Tvedten H., Weiss D. (1999) The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques, in: Willard M. D., Tvedten H., Turnwald G. H., Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods - 3rd edit, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 21-22.
- Wintrobe M.M. (1933) Macroscopic examination of the blood - Am J Med Sci, 185, 58-71.