

Állatorvostudományi Egyetem
Kórélettani és Onkológiai Tanszék

Macskák és kutyák leukémiás megbetegedéseinek diagnózisa hematológiai automaták
segítségével

Készítette: Gidró Tímea

Témavezető: dr. Tóth Bálint
ÁTE, Kórélettani és Onkológiai Tanszék, klinikai állatorvos

Budapest, 2017

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS.....	3
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
LEUKAEMIÁK ISMERTETÉSE ÉS OSZTÁLYOZÁSA	4
<i>Leukaemia típusok.....</i>	4
Krónikus kislymphocytás leukaemia - CLL	4
Akut lymphoblastos leukaemia - ALL	5
Mastocytoma - MCT.....	5
<i>Leukaemiák osztályozása.....</i>	6
Lymphoid leukaemiák	6
Mastocytoma - MCT.....	7
HAEMATOLÓGIAI AUTOMATÁK MŰKÖDÉSI ELVE	7
<i>Impedancia elven működő automaták.....</i>	7
<i>Lézeres sejtszámláló automaták</i>	8
FLUORESCENCIA ÁLTAL AKTIVÁLT SEJTVÁLOGATÁS ÉS KENETELEMZÉS	8
<i>Fluoreszcencia által aktivált sejtválogatás és analízis - FACS.....</i>	8
<i>Kenetelemzés.....</i>	9
CÉLKITŰZÉSEK.....	9
ANYAG ÉS MÓDSZER	10
MINTAVÉTEL ÉS MINTA-ELŐKÉSZÍTÉS	10
HAEMATOLÓGIAI AUTOMATÁK RÉSZLETES BEMUTATÁSA	10
<i>Siemens Advia120</i>	10
<i>Sysmex XT2000-iv</i>	12
Sysmex XT2000iv manuális analízis	14
<i>Abacus Junior 5 Vet.....</i>	15
FACS	16
EREDMÉNYEK	17
STATISZTIKAI EREDMÉNYEK	17
<i>Advia120.....</i>	17
<i>Abacus Junior 5 Vet.....</i>	19
<i>Sysmex XT 2000iv.....</i>	21
FELHŐDIAGRAMOK ELEMZÉSE	24
<i>Advia120.....</i>	24
CLL	24
ALL.....	25
MCT.....	26
<i>Abacus Junior 5 Vet.....</i>	27
CLL.....	27
ALL.....	27
<i>Sysmex XT2000iv.....</i>	27
CLL.....	27
ALL.....	28
MCT.....	29
KÖVETKEZTETÉSEK	30
ÖSSZEFOGLALÁS.....	33
SUMMARY.....	34
IRODALOM.....	36
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	38

Rövidítések jegyzéke

ALL	akut lymphoblastos leukaemia
ACVP	American College of Veterinary Pathologists
CD	markerek
CLL	krónikus kislymphocytás leukaemia
FACS	Fluoreszcencia által aktivált sejtválogatás és analízis
FSC	Forward scattered light
HFR	High fluorescence regio
LRR	Lysis resistens regio
LUC	Large Unstained Cells
MCT	Mast Cell Tumor (mastocytoma)
MFI	Átlagos fluoreszcencia-intenzitás
SSC	Side scattered light
TNF- α	Tumor nekrotikus faktor- α
WHO	World Health Organization

Bevezetés

A daganatos elváltozások kisállatokban egyre gyakrabban fordulnak elő. Macskáknál és kutyaáknál is kiemelt jelentőségűek a különböző típusú leukaemiák, amiknek gyors felismerése a sikeres kezelés szempontjából kulcsfontosságú. Ugyanakkor ezen betegségek biztos diagnózisa gyakran nehézkes, haematológiában nem jártas állatorvos számára sokszor igen nagy kihívás. A beteg állatok vérmintáinak megfelelő vizsgáló laboratóriumba való eljuttatása és a haematológus szakember által végzett kenetelemzés általában hosszabb időt vesz igénybe, ami csökkenti a túlélési esélyeket.

Ezen problémafelvetés kapcsán vizsgáltuk három különböző haematológiai automata megbízhatóságát különböző leukaemia típusok és mastocytoma tekintetében. Tanulmányunk céljai közt szerepelt, hogy korrelációt keressünk a kenetelemzés során kapott eredmények és a berendezések által számolt értékek közt az egyes fehérvérsejt típusokat illetően.

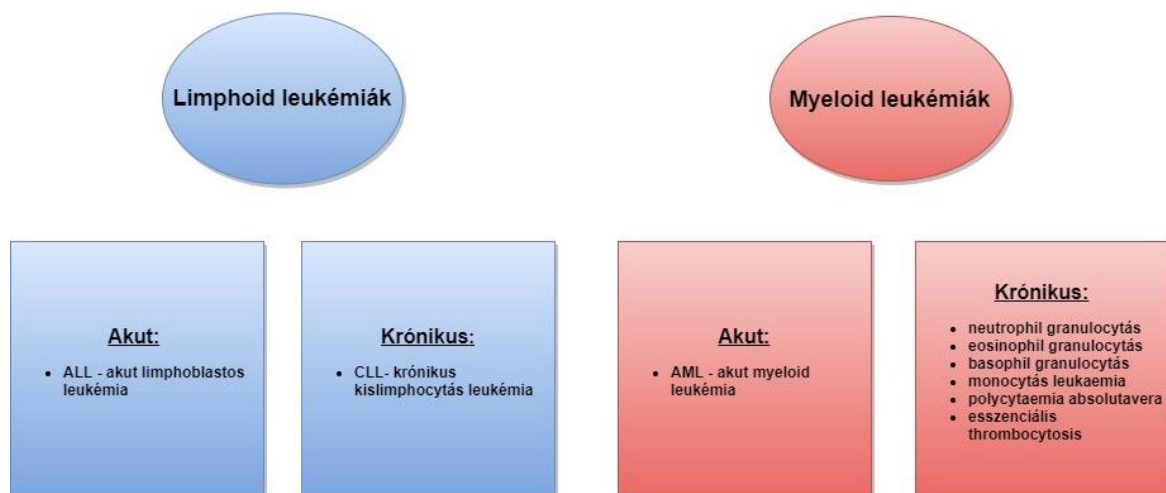
Különböző paramétereket vizsgálva igyekeztünk felmérni, hogy milyen mértékben alkalmazhatóak az automaták által készített felhődiagramok és a mért fehérvérsejt számok illetve százalékos arányok az előzetes kórhatározásban.

Irodalmi áttekintés

Leukaemiák ismertetése és osztályozása

A leukaemia a csontvelő által termelt vérsejteket érintő rosszindulatú neoplasticus elváltozás (Withrow et al., 2013a), aminek következtében a leukaemia típusától függően rendellenes vérsejtek jelennek meg a perifériás keringésben. Fontos kihangsúlyozni, hogy a leukaemia nem minden esetben jár a fehérvérsejtek számának növekedésével, és az elváltozást mutató vérsejtek felismerése is igen nehéz bizonyos típusoknál. Mivel a leukaemia alatt alapvetően a csontvelő vérsejtképző őssejtjeinek malignus transzformációját értjük, az okozott kórkép jellegét elsősorban az érintett őssejtvonalak típusa határozza meg, ezért a leukaemiák osztályozása is ennek alapján történik (Argyle et al., 2008a).

Megkülönböztetünk lymphoid és myeloid leukaemiákat, ezen kategóriákon belül pedig akut ill. krónikus típusokat. A pontos csoportosítást az 1. sz. ábra tartalmazza.



1. sz. ábra: Leukaemiák csoportosítása

Mivel a vizsgálatunk során főként lymphoid leukaemiás betegekkel dolgoztunk, ezért ezek a betegségek kerülnek részletes bemutatásra, ill. a myeloid elváltozások közül a szisztémás mastocytoma.

Leukaemia típusok

Krónikus kislymphocytás leukaemia - CLL

A krónikus leukaemiáknál a keringésben érett, differenciált kis lymphocyták jelennek meg nagy számban (Linnet et al., 2007). Kuttyáknál a CD34-, T-sejtes CLL a jellemző (Argyle et al., 2008a).

Főleg idősebb, 10 év körüli kutyákban jelenik meg az elváltozás (Withrow et al., 2013b). A betegség következtében az állat viselkedése, testsúlya általában változatlan marad, de a vérben extrém módon megnövekedik a fehérvérsejtek száma, 30 000 sejt/ μ l feletti, de akár a 100 000 sejt/ μ l értéket is meghaladhatja. Főleg B-sejtes CLL esetében monoklonális gammopathia is megjelenhet (Withrow et al., 2013b).

A CLL prognózisa sokkal kedvezőbb, mivel jobban reagál a kezelésekre, mint az ALL. Az átlagos túlélési idő is sokkal hosszabb, de kezelés nélkül is előfordulhat akár két éves túlélés is. Kezelés mellett átlagosan az esetek 70%-ban mérséklődik a lymphocytaszám és több évig megfelelő életszínvonalon élhet az állat (Withrow et al., 2013b).

Akut lymphoblastos leukaemia - ALL

Az akut leukaemiák közös tulajdonsága az éretlen, differenciálatlan sejtek (ALL esetén nagy lymphocyták) megjelenése a vérben és csontvelőben, amik infiltrálhatják a lépét, májat, a nyirokcsomókat és a központi idegrendszert is (Argyle et al., 2008a).

A nagy lymphocyták közepes vagy nagyobb méretű sejtek, amelyek basophil citoplazmával és szemcsés kromatin állománnyal rendelkeznek. Kutyákban nagyobb részt B-sejtes (B-lymphocytákból transzformálódott) forma fordul elő, a T-sejtes forma az összes ALL kb. 10%-a. Általában a B-sejt eredetű nagy lymphocyták CD21 sejtfelszíni markerrel rendelkeznek, a T-sejtesek pedig CD3 markerrel. Ha a sejt expresszál CD34 őssejt markert, akkor minden esetben akut leukaemiával állunk szemben. (Withrow et al., 2013b). Macskáknál a T-sejtes forma a gyakoribb (Argyle et al., 2008a).

Az ALL vezető klinikai tünetei a hepatosplenomegalia és lymphadenopathia. Az állat levert, jellemző a jelentős súlyvesztés és az anorexia. A betegség általában súlyos anaemiát, neutropeniát és thrombocytopeniát okoz, mivel a csontvelőt infiltráló nagy lymphocyták lehetetlenné teszik az élettani vérsejtképzést (Withrow et al., 2013b). Az ALL-ben szenvedő macskák 75%-a FeLV + (Argyle et al., 2008a).

A többi akut leukaemiához hasonlóan az ALL prognózisa is igen kedvezőtlen. Több kutatás alapján az átlagos túlélési idő kezelési protokolltól függetlenül kb. 120 nap, egy kifejezetten CD34+ eseteket vizsgáló tanulmány szerint 16 nap (Withrow et al., 2013b).

Mastocytoma - MCT

Mastocytomának nevezzük a hízósejtek neoplasticus proliferációját. Szisztémás formája a mastocytosis, ebben az esetben a csontvelőből, és a bőrön kívül található elváltozásokból is kimutathatóak transzformálódott hízósejtek (Swerdlow et al., 2008a). A rendellenes sejtek az

egészséges hízósejtekhez hasonlóan metakró máziás festődésű granulomokat tartalmaznak, amikben különféle bioaktív mediátorok (hisztamin, heparin, TNF- α , proteázok) találhatóak.

A betegség jellemzően középkorú (8-9 éves) kutyákban és négy évnél fiatalabb macskákban fordul elő.

Macskáknál vezető tünetek közé tartozik a hányás és a véres bélsár. Jellemző vérképi elváltozás az eosinophilia, és előfordulhat MCT sejteket tartalmazó, megvastagodott buffy coat (Argyle et al., 2008b). Piviani és társai kutatása szerint macskák esetében a mastocytæmia egyértelmű kórjelzője a MCT-nak, bár nagyon ritkán más daganatos elváltozásnál is előfordulhat kis számú mastocytæ a perifériás keringésben (Piviani et al., 2013). Bőrelváltozások áttétként macskáknál is megjelenhetnek, főleg a nyak-feji régióban. (Argyle et al., 2008b).

A prognózis nagyban függ a sejtek differenciáltságától, minél differenciálatlanabbak a MCT sejtek, annál rövidebb a várható túlélési idő (Withrow et al., 2013c).

Leukaemiák osztályozása

A fent ismertetett betegségek kategorizálása a WHO ajánlása szerint történik.

Lymphoid leukaemiák

Az akut leukaemiák vonatkozásában a WHO nem készített a hagyományos grade-rendszeren alapuló besorolást, mivel ezen betegségek esetében a sejtek morfológiája, a sejtfelszíni markerek, az immunfenotípus vizsgálata és a klinikai kép összességében szükséges a prognózis felállításához. (Swerdlow et al., 2008b).

A három fő kategória a WHO ajánlásban: akut myeloid leukaemiák, akut lymphoid leukaemiák és nem besorolt sejtvonalakból származó ill. prekursor lymphoid neoplasticus elváltozások. Az ajánlás szerint mindenképp akut leukaemiáról beszélünk, ha a vérben vagy a csontvelőben a nagy lymphocyták aránya meghaladja a 20%-t (Leach et al., 2013a).

A különböző sejtfelszíni markerek segítik az adott leukaemia besorolását, az ACVP ajánlása szerint B-lymphocyták vizsgálatához a CD79a, T-lymphocytáknál a CD3; akut leukaemiák esetén a CD34 sejtfelszíni marker vizsgálata ajánlott. (Withrow et al., 2013d). Ezt mindenképp szükséges kiegészíteni kenetelemzéssel és természetesen az állat élettani értékeinek, kezelésre adott reakcióinak vizsgálata is elengedhetetlenek a besoroláshoz.

Mastocytoma - MCT

Szisztémás MCT esetén a WHO major és minor feltételeket határoz meg a besoroláshoz. Ha a fő kritérium vagy három alkritérium teljesül, akkor a diagnózis egyértelműen szisztémás mastocytoma, kizárható minden más neoplasticus elváltozás. A fő kritérium a csontvelőben vagy más extracután szervben olyan multifokális mastocytoma infiltráció detektálása, ahol minimum 15 mastocytoma található egy csoportban.

A négy minor feltétel a következő:

- a csontvelőből vagy más extracután szervből származó mintában az éretlen vagy atipikus morfológiájú mastocyták aránya nagyobb, mint 25%
- az aktivációs pont mutációjának kimutatása a KIT gén 816-os kodonján (vérből, csontvelőből vagy extracután szervből származó mintából)
- CD 117, CD2 és/vagy CD25 sejtfelszíni markerek kimutatása (egyéb normál markerek mellett) a mastocytoma sejteken (vérből, csontvelőből vagy extracután szervből vett mintából)
- a szérumból mért triptáz szint tartósan meghaladja 20 ng/mL értéket (Swerdlow et al., 2008a).

Haematológiai automaták működési elve

A haematológiai automatákat működési elvük alapján két nagy csoportba soroljuk: az impedancia elvén működő, ill. a lézeres sejtszámláláson alapuló automaták csoportjába. Az utóbbi három további alcsoportra osztható a felhasznált festési eljárás szerint: megkülönböztetünk myeloperoxidáz, fluorescens és immunológiai festési eljárásokon alapuló berendezéseket, ill. ide tartoznak a rádiófrekvenciát felhasználó automaták is.

Az automaták a fehérvérsejtek differenciálása tekintetében is csoportosíthatóak. Vannak 1 part-os automaták, melyek csak a fehérvérsejt-számot adják meg, és a fehérvérsejteket három (lymphocytoma, monocytoma, granulocytoma), öt (lymphocytoma, monocytoma, neutrophil, basophil és eosinophil granulocytoma) részre szeparáló gépek, ill. 5+1 automaták, melyek nem besorolt sejteket is el tudnak különíteni.

Impedancia elven működő automaták

Ezen berendezések az ún. Coulter-elv alapján működnek. Ennek lényege, hogy a mintát olyan oldattal hígítják, amely a sejteknél jobb vezető. Az elektródok között, szűk kapillárison áthaladó sejtek ellenállás-növekedést okoznak, amiből elektromos impulzus keletkezik. Ennek

nagyságából a sejtek méretére, számából a sejtés alkotók mennyiségére lehet következtetni (Góth, 2011).

Fehérvérsejtek esetében a sejt méret nem elegendő önmagában az osztályozáshoz, ehhez különböző lizáló oldatokat, reagenseket használnak. Az általunk vizsgált gépek közül az Abacus Junior 5 Vet tartozik ebbe a csoportba.

Lézeres sejt számláló automaták

Ezek a gépek a vér sejtés elemeit egyenként világítják meg fókuszált fénynyalábbal, és a sejt által elnyelt, a sejten áthaladó, ill. a sejten megtört különböző törésmutatójú sugarak detektálásából következtetnek a sejt minőségi tulajdonságaira és térfogatára.

A fény szóródását abszorpciós, magas és alacsony törésmutatójú detektorok érzékelik. A különböző festési eljárások segítségével többlet információ is nyerhető a sejtről, pl. a DNS és RNS tartalomra vonatkozóan. Ezeket a jeleket fluoreszcens detektorok fogják fel. A jeleket digitálisan alakítják értelmezhető számadatokká, felhődiagramokká (Damjanovich et al., 2007).

A Siemens Advia120 automata myeloperoxidáz, a Sysmex XT2000iv pedig fluoreszcens festéssel működik.

Fluoreszcencia által aktivált sejt válogatás és kenetelemzés

Fluoreszcencia által aktivált sejt válogatás és analízis - FACS

A sejtek immunfenotipizálására és a sejt felszíni markerek detektálására használjuk a FACS-t, ami az áramlási citometria egyik változata. Lényege, hogy a szuszpenzióban lévő, fluoreszcens festéssel megfestett sejtek túlnyomás hatására egy áramlási cellába kerülnek, aminek a végén lévő nyíláson keresztül egyenként lépnek át egy másik térbe (magba). Itt köpenyfoliadék védi őket a fallal és egymással való érintkezéstől. A két folyadékrendszer egymással ellentétes irányban mozog, és a nyomásviszonyoknak köszönhetően egymással nem keveredik, vagyis az áramlás lamináris. A magba való átlépés után világítja meg a sejteket a lézersugár (Damjanovich et al., 2007).

A fény vagy a sejt felszínén törik meg, és halad keskeny szögben előre (forward scattered light – FSC), vagy a belső sejtalkotókon fog megtörni, és 90°-os szögben oldalra halad (side scattered light – SSC). Ezeknek a sugaraknak adszorpciós detektorokkal való felfogása és digitális jellé alakítása információt ad a sejtek fizikai tulajdonságairól és lehetővé teszi differenciálásukat (például fehérvérsejtek kiválogatását). Az egyes sejt felszíni markerek

meghatározásához szükség van fluoreszcens festésre. A fluoreszcens fény érzékelésére fluoreszcens detektorokat használnak. Az átlagos fluoreszcencia-intenzitás (MFI) segítségével nem csak egy adott antigén vagy marker jelenlétét, hanem expressziójának mértékét is meg lehet határozni egy sejtpopulációban (Leach et al., 2013b).

Kenetelemzés

A kenetelemzés bármely neoplasticus elváltozás esetén elengedhetetlen a pontos diagnózis felállításához. Minden vérmintát K-EDTA-s csőbe vettünk és kikenés és fixálás után Diff-Quick módszerrel festettünk meg.

Célkitűzések

Vizsgálatunkban a fent ismertetett betegségekben szenvedő kutyák és macskák véréből elemeztük három különböző haematológiai automatával (Abacus Junior 5 Vet, Siemens Advia120, Sysmex XT-2000iv). A gépek által készített felhődiagramokat és sejtszám adatokat vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a kenetelemzés eredményével, amit kiegészítettünk az áramlási citometriával végzett immunfenotipizálással.

Célunk volt annak megállapítása, hogy az automaták által mért konkrét fehérvérsejt számok és százalékos arányok mennyire korrelálnak a szakképzett haematológus által végzett kenetelemzés során kapott adatokkal.

Az eredmények összehasonlításának segítségével kívántuk meghatározni, hogy a különböző berendezések mennyire megbízhatóak az ALL-es, CLL-es és mastocytamiás betegek vérvizsgálatakor. Elemeztük, hogy mely sejtcsoportokban és milyen mértékben változnak a sejtszámok a fenti megbetegedéseknél.

Ez a három, kutyákban és macskákban gyakran előforduló daganattípus a vérben rendellenes sejtek megjelenésével jár, ezért különös figyelmet fordítottunk arra, hogy a berendezések képesek-e differenciálni ezeket a sejteket a fiziológiás fehérvérsejtektől, ill. melyik frakcióba sorolják be tévesen a mérések során.

Elemeztük továbbá a berendezések által készített felhődiagramokat és vizsgáltuk, hogy megállapíthatóak-e a klinikumban felhasználható általános következtetések, ill. létrehozhatóak-e a diagnózisban alkalmazható sztenderdek a felhődiagramok alapján.

Anyag és Módszer

Mintavétel és minta-előkészítés

Minden vérmintát K-EDTA-s csőbe vettünk. A mintát zsírtalanított tárgylemezen megfelelő eljárással kikentük (pár csepp vért az egyik tárgylemezre helyezve és a másik tárgylemezzel eltolva szélesztettük). A kikenés után a keneteket Diff-Quick módszerrel festettük meg. A festés menete a következő:

1. alkoholos fixáló oldattal fixálás majd szárítás
2. eosinos festés a piros oldattal
3. festék csapvízzel való leöblítése
4. hematoxilines festés a kék oldattal
5. festék csapvízzel való leöblítése
6. szárítás

A keneteket igyekeztünk rögtön a vérvétel után (de legkésőbb 24 órán belül) elkészíteni, mivel a vörösvérsejtek száma lízisek miatt 24 óra után jelentősen csökken (Rebar et al., 2001). Az Advia120 automata felhasználásával végzett kutatás szerint a vérvétel után 4°C-on tárolt vérmintában 24 óra után kezd nagyobb mértékben csökkenni a lymphocyták száma (Furlanello et al., 2006). Hasonló eredményre jutottak Bauer és társai is, akik szerint 22°C-on 24 óráig, 4°C-on közel 72 óráig stabil maradt a fehérvérsejt szám, kizárólag a monocyták esetében volt kis mértékű változás (Bauer et al., 2012).

A mintákat szakképzett és tapasztalt hematológus szakember (dr. Vajdovich Péter) elemezte kenetenként 250 db fehérvérsejt megszámolásával.

Haematológiai automaták részletes bemutatása

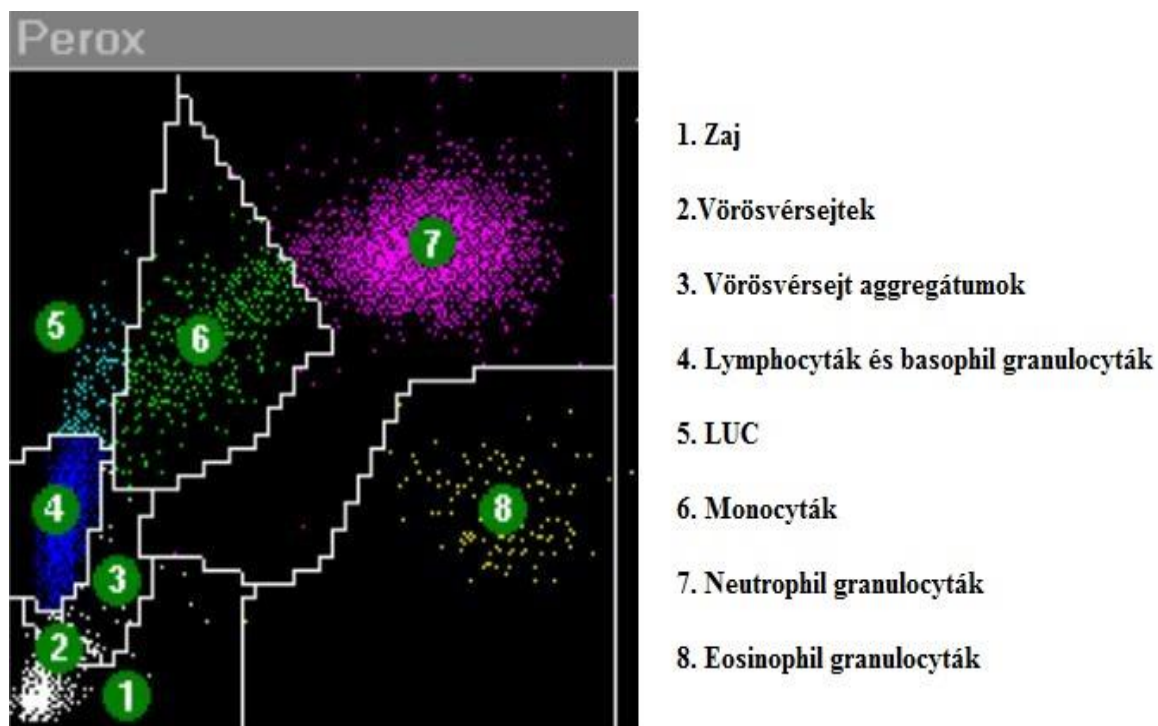
Siemens Advia120

Ez a berendezés egy myeloperoxidáz festéssel működő, lézeres, 5+1-part-os automata. A fehérvérsejtek számát és százalékos megoszlását két különböző csatornán határozza meg. A „Perox” csatornán a peroxidáz aktivitás (festődés) és sejtméret alapján differenciálja a sejteket, így négy féle fehérvérsejtet (monocyta, lymphocyta, neutrophil és eosinophil granulocyta) ill. az úgynevezett LUC (Large Unstained Cells) sejteket tudja elkülöníteni. A berendezés ezeknek a sejteknek a számát és a százalékos megoszlását is megadja.

A LUC sejtek nem tekinthetők különálló egységes csoportnak, mert ide kerülnek az átlagosnál nagyobb méretű lymphocyták, a kisebb peroxidáz aktivitással rendelkező monocyták és általában a neoplasticus elváltozást mutató sejtek (pl.: nagy lymphocyták) is.

A LUC sejteknek és a lymphocytáknak a legkisebb a peroxidáz aktivitásuk, az eosinophil granulocytáknak pedig a legnagyobb, ezért a vízszintes tengelyen ez a két sejtcsoport helyezkedik el a széli részeken.

A Perox csatornán készített felhődiagramon a sejtek eloszlását a 2. sz. ábra szemlélteti. Y tengelyen a sejt méret, X tengelyen pedig a myeloperoxidáz aktivitás mértéke látható.



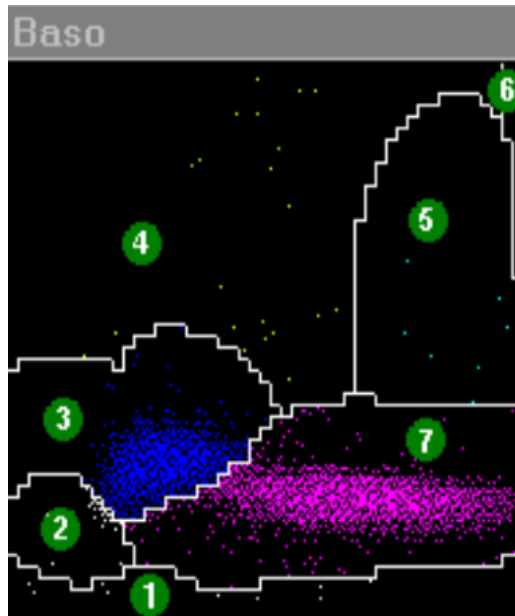
2. sz. ábra: sejtek megoszlása az Advia120 Perox csatornájának felhődiagramján (kép forrása: ADVIA Operator's Guide, é. n.)

Az automata a BASO csatornán az összes fehérvérsejt szám mellett meghatározza a basophil granulocyták számát és százalékos arányát, ill. a blast sejtmagok, a mononuclearis és polymorphonuclearis fehérvérsejtek százalékos arányát. Előbbi csoportba a monocyták és lymphocyták, utóbbiba a neutrophil és eosinophil granulocyták tartoznak.

Ezen a csatornán az automata egy lízáló oldat segítségével válogatja szét a sejteket, aminek hatására a basophil granulocyták, valamint a lízisrezisztens sejtek (pl: nagy lymphocyták, mastocyták) kivételével az összes sejt denudálódik. A Baso csatornán készített felhődiagram a 3. sz. ábrán látható.

Az Y-tengely a sejt térfogatát, az X-tengely pedig a lobularitását mutatja. A basophil granulocyták mellett a nagy lymphocyták, és a mastocyták maradnak épek, ezek a sejtek találhatóak a felhődiagram felső régiójában. Az X-tengelyen való megoszlást a denudált

sejtmag alakja határozza meg, ezért a diagramon balról jobbra haladva helyezkednek el a monocyták és lymphocyták, majd őket követik a neutrophil és eosinophil granulocyták (ADVIA Operator's Guide, é. n.).



1. Zaj
2. Blast sejtmagok
3. Mononucleáris fehérvérsejtek
4. Basophil granulocyták
5. Valószínűsíthetően basophil granulocyták
6. Szaturációs zóna
7. Polymorphonuclearis fehérvérsejtek

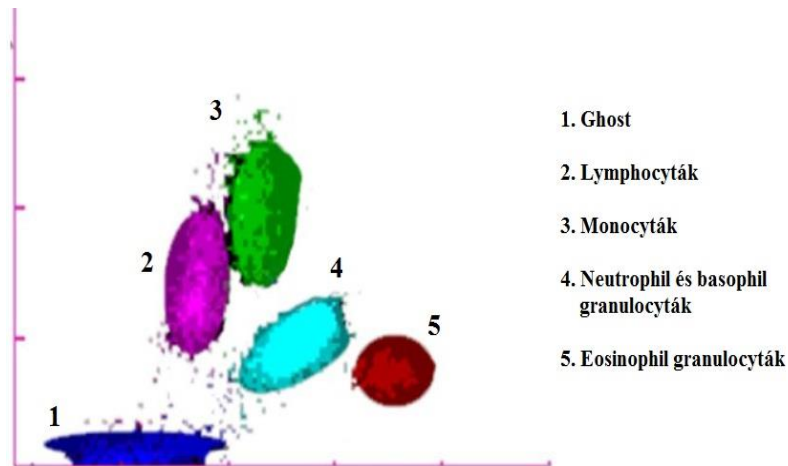
3. sz. ábra: sejtek megoszlása a Baso csatorna felhődiagramján (kép forrása: ADVIA Operator's Guide, é. n.)

Sysmex XT2000-iv

Ez az automata egy lézeres, fluoreszcens festési eljárást alkalmazó berendezés. 5+1 part-os fehérvérsejt differenciálásra képes és állatfajonként különböző mérési profilokkal rendelkezik. Az Advia120-hoz hasonlóan képes megadni a fehérvérsejtek számát és a populációk százalékos arányait. A három automata közül ez az egyetlen, ahol szoftveresen lehetőség van a felhődiagramok utólagos manuális analízisére.

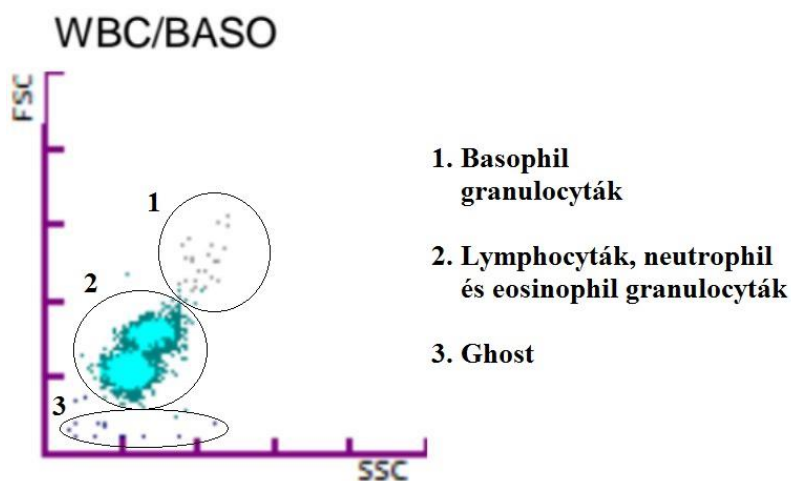
Ez a berendezés is két csatornán méri a fehérvérsejteket. A Diff csatornán négy féle fehérvérsejt populációt és egy ún. „other cell” (atipikus belső szerkezetű vagy festődésű sejtek) csoportot képes elkülöníteni, amelyeket különböző színekkel ábrázol, ezt mutatja be a 4. sz. ábra. Ezen a csatornán a fluoreszcens festődés és a belső szerkezet (granuláltság, mag lebonyezettsége) alapján helyezi el a sejtpopulációkat a felhődiagramon. Előbbit az Y-tengelyen, utóbbit az X-tengelyen mutatja. Amennyiben nem képes kielégítően differenciálni a különböző sejtpopulációkat, úgy egységes szürke csoportként jeleníti meg a sejthalmazt, és nem ad részletes eredményt sem. Ebben az esetben az egyes populációk differenciálására ún. „research” eredményeket tudunk használni, melyeket fix gate-ek alapján számolja az automata.

Mivel élettani körülmények között a monocyták festődnek a legintenzívebben, ezért alaphelyzetben ez a csoport kerül a diagram legfelső részére. Bizonyos esetekben megjelenhetnek a monocytáknál is jobban festődő sejtek, ezek kerülnek az „other cell” frakcióba (reaktív lymphocyták, nagy lymphocyták).



4. sz. ábra: Sysmex XT2000-iv Diff csatorna felhődiagramja

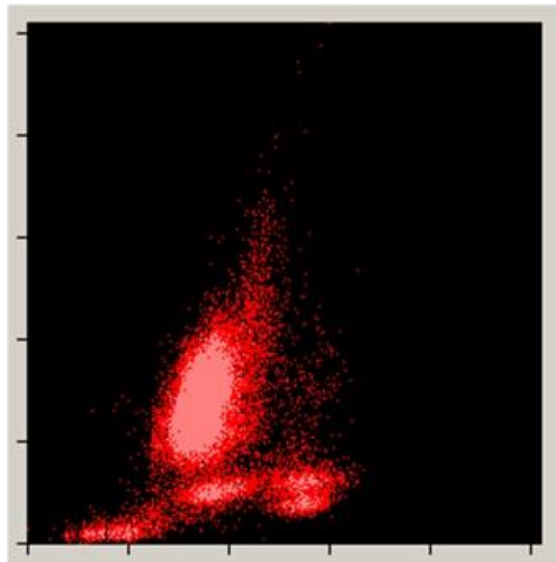
A Baso csatornán az Advia120 automatához hasonlóan lízáló oldattal történik a sejtszeparálás, aminek hatására ennél a berendezésnél is a basophil granulocyták, és egyéb lízisrezisztens sejtek (nagy lymphocytá, mastocytá) őrzik meg citoplazmájukat, így ezek nagyobb méretűek maradnak az analízis során. A felhődiagramon az X-tengelyen itt is a belső szerkezet alapján csoportosít a gép, az Y-tengelyen pedig a sejt térfogat szerint, így a lízis rezisztens sejtek kerülnek a felső régióba. A többi granulocytá és a lymphocyták nagyjából hasonló méretük miatt egy többé-kevésbé egységes populációt képeznek a diagramon (Sysmex Operator's Manual, é.n.). A Baso csatornán készült felhődiagramot az 5. sz. ábra mutatja be.



5. sz. ábra. Sejtek élettani megoszlása a Sysmex XT2000-iv Baso csatornáján

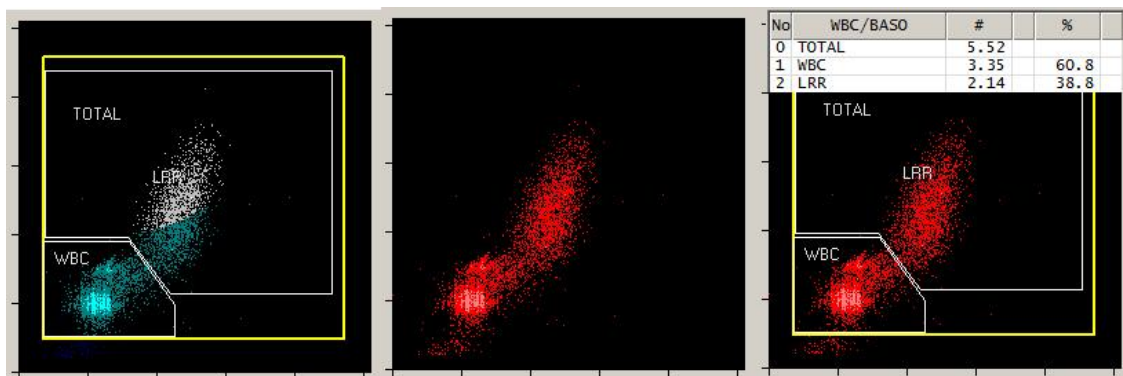
Sysmex XT2000iv manuális analízis

Mind a Diff, mind a Baso csatornán van lehetőség utólag manuálisan megváltoztatni az egyes populációk határvonalait, ha nem értünk egyet a gép által készített csoportosítással. Ez alapján újra számoltathatjuk az automatával az egyes populációkba tartozó sejteket. Az utólagos analízis segítségével bizonyos esetekben pontosabban meghatározhatjuk a különleges kategóriákba tartozó sejtek (pl.: daganatos sejtek) számát.



6. sz. ábra: DIFF csatorna hamis színes ábrája (CLL-beteg mintája)

A reanalízis, és a populációk újra felosztása részben a manuális módban kapott hamis színes felhődiagram (6. sz. ábra) alapján történhet, részben pedig számszerű támpontok segítségével. Ezek a támpontok a korábban meghatározott különleges régiók, mint a „high fluorescence regio” (HFR), melynek határértékeit a Diff csatornán állíthatjuk be (mi az Y-tengelyen 140 egységnél határoztuk meg). A Baso csatornán számunkra diagnosztikai szempontból fontos elkülönülő terület a lízisrezisztens régió (LRR) (Gelain et al., 2010). Az LRR alsó értékhatárát az Y-tengely 80. egységénél húztuk meg



7. sz. ábra: Mastocytosis macska Baso csatornán készült felhődiagramján végzett reanalízis

Az általunk kiválasztott új határokkal kiszámoltattuk az automatával a sejtpopulációk százalékos megoszlását (7. sz. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy sok esetben nem lehetett egyértelműen minden sejtfrakciót megfelelően elkülöníteni a többszörös átfedések miatt, ezért csak a feltételezhetően daganatsejtek százalékos arányát igyekeztünk meghatározni a HFR, és LRR alapján.

Hasonló tapasztalatokról számoltak be Gelain és társai 2010-es vizsgálatukban, ahol azt találták, hogy az ALL-es és CLL-es eseteknél is szignifikánsan magasabb volt a LRR értéke az egyéb vizsgált csoportokéhoz képest. Az ALL-es megbetegedéseknél pedig a HFR-be sorolt sejtek száma is szignifikánsan nagyobb volt (Gelain et al., 2010).

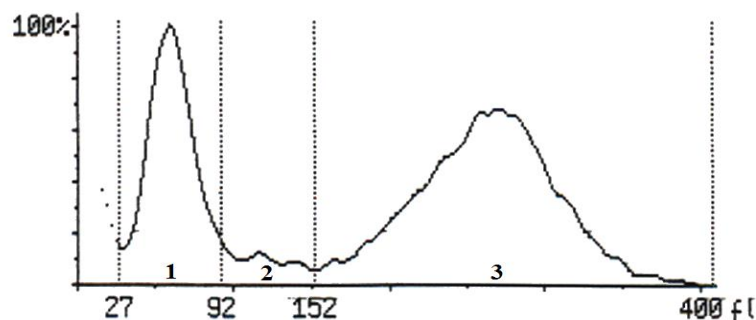
Abacus Junior 5 Vet

Az Abacus volt a három vizsgált automata közül az egyetlen impedancia elven működő berendezés. Alkalmasság az összes fehérvérsejt szám vizsgálatára, ill. meg tudja adni a lymphocyták, monocyták és a három granulocytatípus számát és százalékos összetételét.

A gép Diatro Diff Vet 5 és Diatro Lyse Vet reagensek segítségével méretváltozást indukál a sejteknél: a lymphocyták citoplazmája kisebb lesz, a neutrophil granulocytáké nagyobb, a monocyták mérete pedig ugyanakkora marad. Így pontosabban képes méret alapján csoportosítani a sejtpopulációkat. A basophil granulocyták elkülönítésére a korábban említett módszert alkalmazza ez az automata is (Abacus User's Manual, é. n.).

A gép által készített hisztogramot a 8. sz. ábra mutatja be. A görbe első szegmense a két kapu között a lymphocyták, a második szegmens a monocyták, a harmadik a neutrophilok méret alapján történő megoszlását mutatja.

Az automata kizárólag a sejt méret alapján osztályoz, az X-tengelyen adva meg a sejtek térfogatát femtoliterben, az Y-tengelyen pedig az adott mérettartományban előforduló sejtszámot ábrázolja (Abacus User's Manual, é. n.).



8. sz. ábra: Fehérvérsejtek megoszlása az Abacus Junior 5 Vet hisztogramján

FACS

FACS analízis elvégzéséhez először szeparálnunk kellett a fehérvérsejteket. Ehhez üvegsőbe 1 ml Ficoll oldatra (Histopaque-1077, Sigma, St Louis, MO, USA) rárétegeztünk 1 ml EDTA-s vért, majd 10 percen keresztül centrifugáltuk, 1000 rpm fordulatszámmal. Ezt követően elkülönítettük a „buffy coat” réteget, majd 2 ml PBS oldat (foszfát-pufferelt fiziológias sóoldat) hozzáadása után ismét 5 percen keresztül 1000 rpm-en centrifugáltuk. Ezután eltávolítottuk a felülúszót és 2 ml PBS oldattal pótoltuk, majd ismét centrifugáltuk (ezt a tisztítási ciklust még kétszer ismételtük). A mosási fázis végén már csak 1 ml PBS oldatot adtunk a csapadékhoz, majd Abacus Junior Vet 5 hematológiai automatával ellenőriztük a sejt, illetve lymphocyta számot.

A kapott eredmény alapján FACS csövenként 600 000 lymphocyta sejtet tartalmazó folyadékot mértünk ki a további vizsgálathoz. Ezekhez hozzáadtuk a direkt jelölt monoklonális ellenanyagokat: CD3, CD34, CD45 (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és a CD21 (AbD serotec, USA), illetve a hozzájuk tartozó megfelelő izotípus kontrollokat (mIgG1, rIgG2b AbD Serotec, USA).

Az antitestekkel 30 percig 37°C-os vízfürdőben rázatva jelöltük a sejteket, a jelölést 1 ml hideg PBS-sel állítottuk le. A FACS mérés megkezdése előtt 0,8 µl 7-Amino-aktinomicin D (7-AAD, Sigma-Aldrich, USA) festéket adtunk minden mintához. Áramlási citométer segítségével (FACScan flow cytometer, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) mértük az ellenanyagok expressziójának intenzitását. A kiértékeléskor elkülönítettünk két csoportot, aszerint, hogy a sejtek expresszálják az adott ellenanyagot (pozitív) vagy nem (negatív).

Eredmények

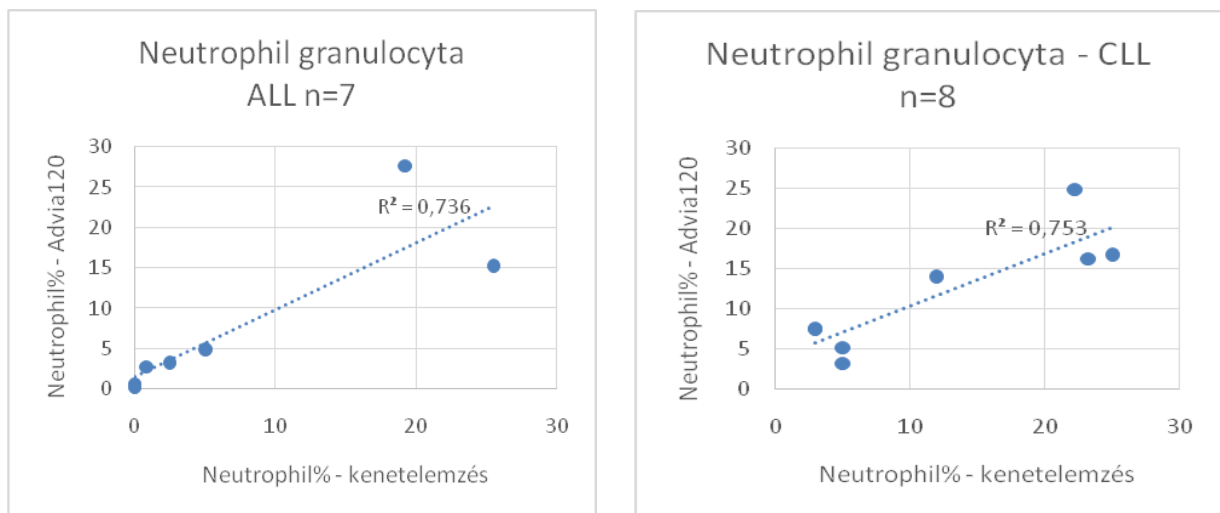
Összesen 15 kutya és 2 macska vérmintáját vizsgáltuk. A kutyák átlag életkora 9 év volt (5-12 év), a macskák 5 évesek voltak. A klinikai tünetek, a kenetelemzés és a FACS alapján állapítottuk meg a pontos diagnózist. Nyolc kutya szenvedett CLL-ben, ezek közül hét T-sejtes, egy pedig B-sejtes leukaemiás volt. Három kutya betegedett meg intermedier típusú CLL-ben, amelyeknél a nagy lymphocyták száma is megemelkedett. Kettő közülük T-sejtes, egy pedig csak CD34+ volt. Négy kutya ALL-ben szenvedett (három B-sejtes, egy csak CD34+) és két macska pedig szisztémás mastocytomás volt.

Statistikai eredmények

A mérések és a kenetelemzés adatait a Pearson féle korrelációs analízissel hasonlítottuk össze. Szignifikánsnak tekintettük az eredményt, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

Advia120

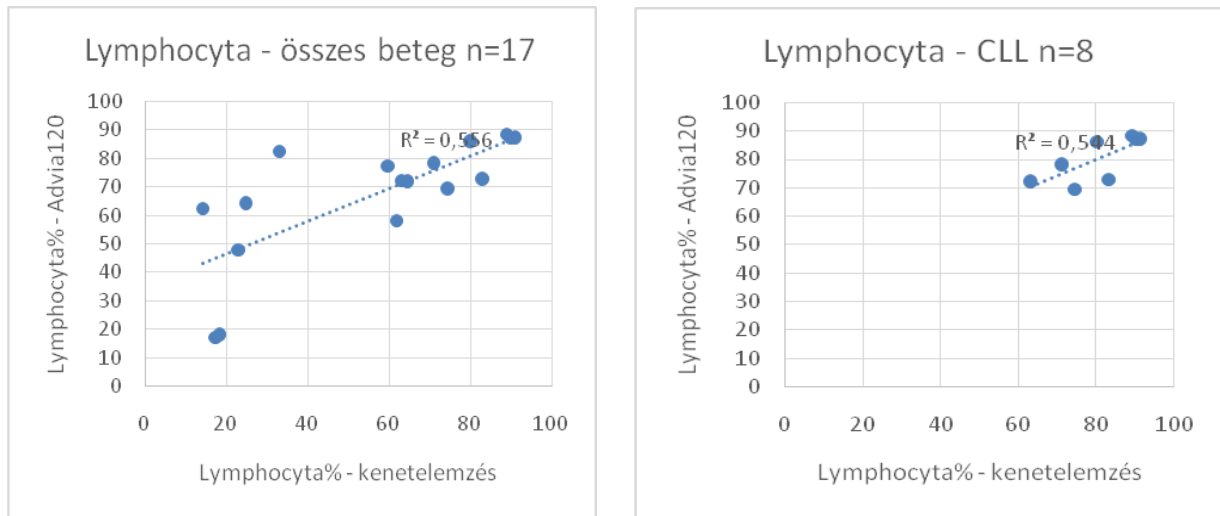
Az automata által mért és a kenetelemzés során számolt neutrophil granulocytá százalékok összehasonlítása az összes vizsgált betegre vonatkoztatva, valamint az ALL és CLL betegeket külön vizsgálva is szignifikáns korrelációt mutatott ($p_{\text{akut}}=0,01$; $p_{\text{krónikus}}=0,005$), ami a 9. sz. ábrán látható.



9. sz. ábra: Neutrophyl granulocyták korrelációs analízise az ALL-es és a CLL-es megbetegedéseknél – Advia120

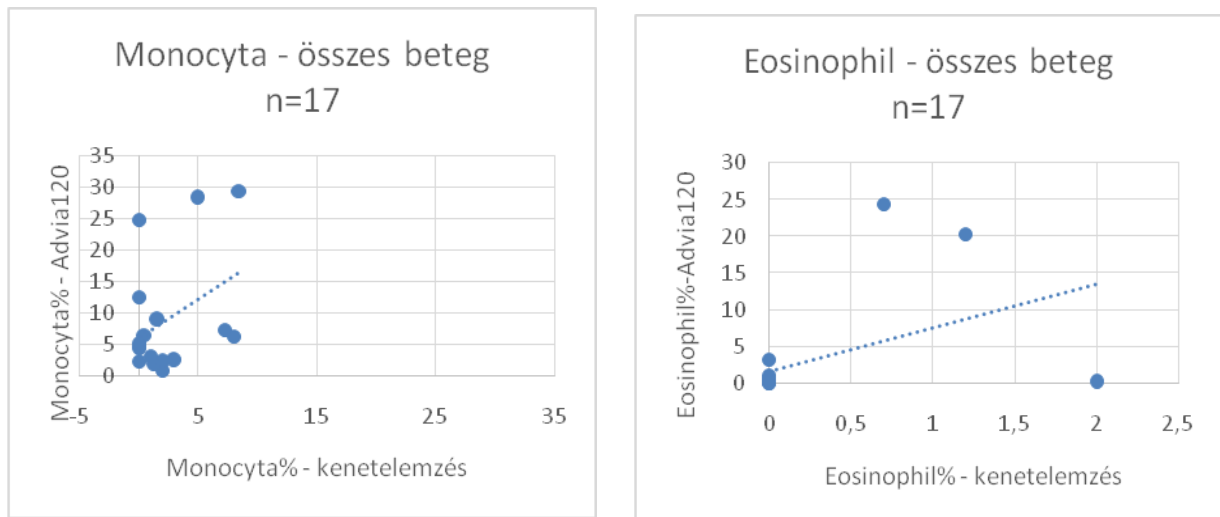
A lymphocytá százalékos eredmények összehasonlítása során az összes beteget figyelembe véve szoros korrelációt találtunk ($p=0,009$). Az akut és krónikus lymphoid leukaemiás betegeket külön vizsgálva az ALL-es betegeknél nem látható szignifikáns korreláció ($p=0,4$) a

berendezés által mért és a kenetelemzés eredményei között, míg a krónikus leukaemiás betegeknél korreláció figyelhető meg ($p=0,03$). A kapott eredményeket a 10. sz. ábra szemlélteti.



10. sz. ábra: Lymphocyták korrelációs analízise az összes esetenél és a CLL-es megbetegedéseknél – Advia120

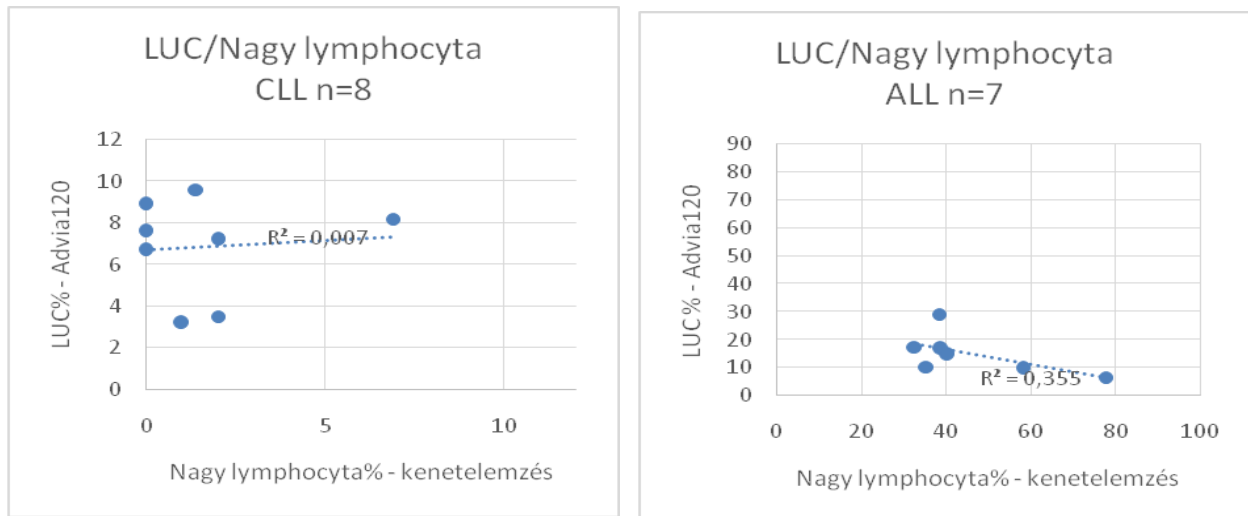
Monocyták és eosinophil granulocyták esetében egyik betegcsoportban sem találtunk szignifikáns kapcsolatot ($p_{\text{mono}}=0,18$; $p_{\text{eo}}=0,06$) az automata által mért százalékos és kenetelemzés során számolt eredmények között (11. sz. ábra).



11. sz. ábra: Monocyták és eosinophil granulocyták korrelációs analízise az összes esetenél – Advia120

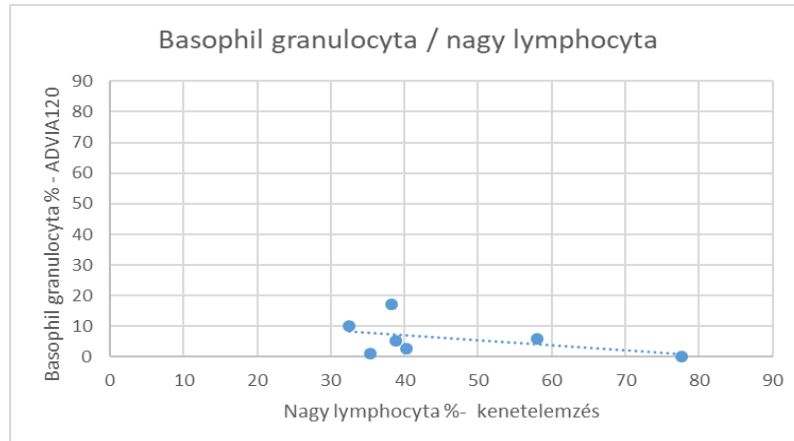
Ez a berendezés egy 5+1 part-os hematológiai automata, vagyis képes a feltételezhető daganatsejtek elkülönítésére, külön paraméterként megjelenítve azokat. A LUC populáció Advia által mért értékeit hasonlítottuk össze a kenetekben számolt nagy lymphocyták, és mastocytémiás betegek esetében a vérkenetben látható hízósejtek százalékos értékeivel,

aminek korrelációs analízise a 12. sz. ábrán látható. A LUC érték egyik esetben sem mutatott szignifikáns korrelációt a kenetben számolt értékekkel ($p_{\text{összes}}=0,27$, $p_{\text{akut}}=0,15$; $p_{\text{krónikus}}=0,83$).



12. sz. ábra: LUC populáció korrelációs analízise a CLL-es és az ALL-es megbetegedéseknél – Advia120

Az akut leukaemiás betegek egy részénél emelkedett basophil granulocytá százalékokat találtunk (7,5-15%), a kenetekben nem találtunk basophil granulocytákat. Összehasonlítottuk a kenetben látott nagy lymphocyták mennyiségével is, de nem találtunk szignifikáns kapcsolatot ($p=0,314$), ezt a 13. sz. ábra szemlélteti.

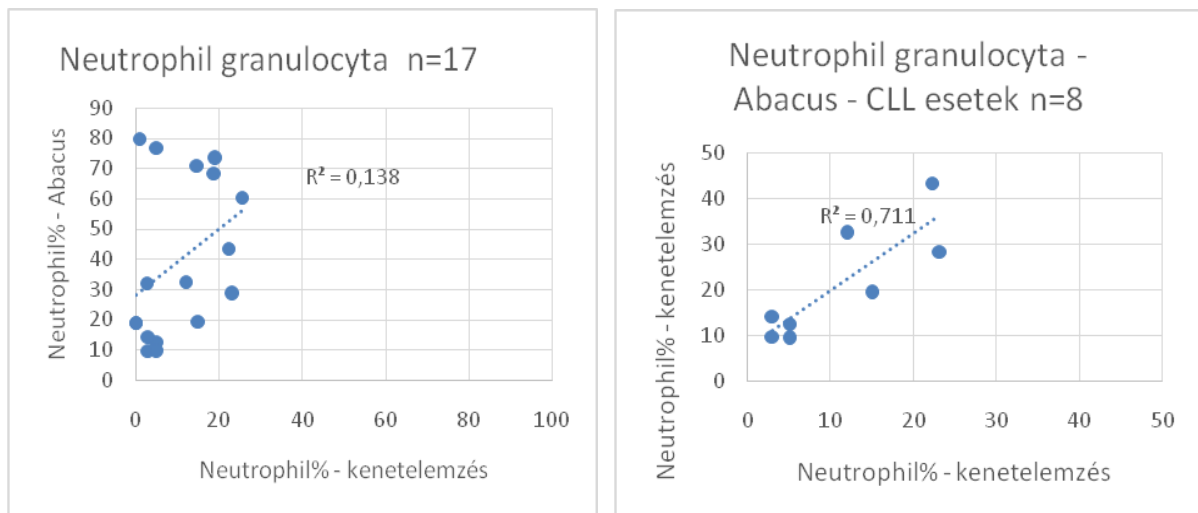


13.sz. ábra: Basophil granulocytá és nagy lymphocytá populáció korrelációs analízise – Advia120

Abacus Junior 5 Vet

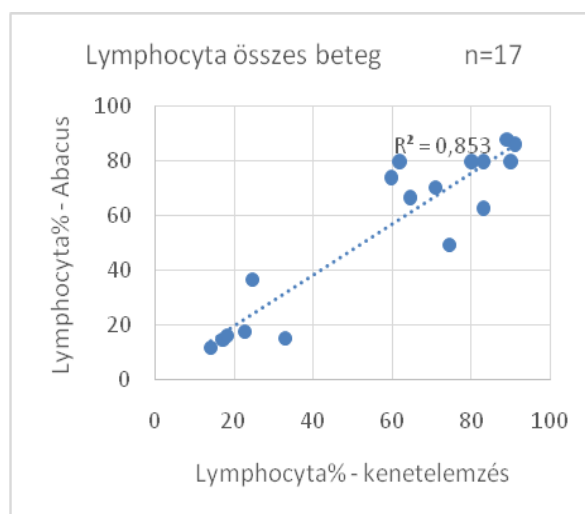
A neutrophil granulocytá százalékok összehasonlításánál az összes leukaemiás beteget figyelembe véve nem találtunk szignifikáns összefüggést a mért értékek és a kenetelemzés során kapott eredmények között. Az akut leukaemiás eseteket vizsgálva szintén nem találtunk egyértelmű korrelációt. Krónikus kis lymphocytás leukaemiás betegekre szűkítve a

vizsgálatot szignifikáns volt a korreláció ($p=0,0084$). A kapott eredményeket a 14. ábrán látható diagramok mutatják be.



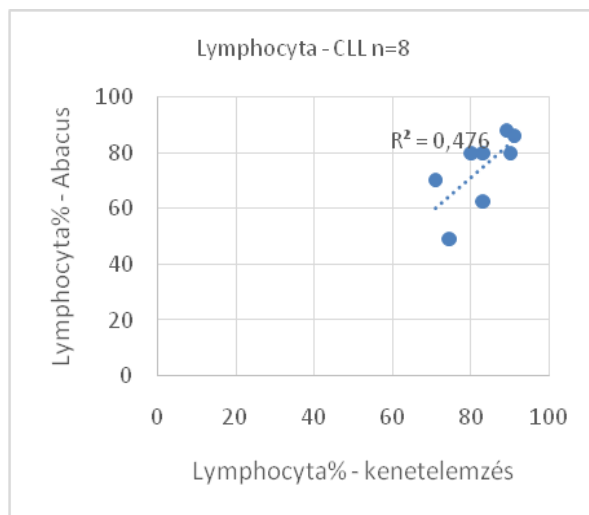
14. sz. ábra: Neutrophil granulocyták korrelációs analízise az összes esetenél és a CLL-es megbetegedéseknél – Abacus Junior 5 Vet

A lymphocytá populációt vizsgálva az összes leukaemiás beteg esetében, és az akut esetekre szűkítve is szignifikáns kapcsolatot találtunk ($p_{\text{összes}}=0,0001$; $p_{\text{akut}}=0,002$) az automata által mért és a kenetelemzés során kapott százalékos értékek között (15. sz. ábra).



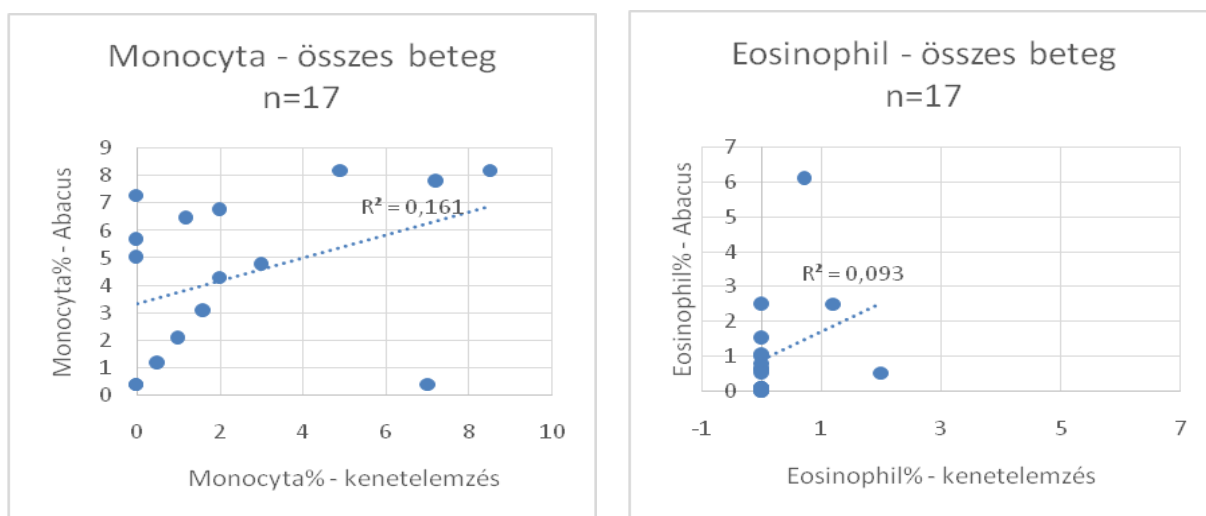
15. sz. ábra: Lymphocyták korrelációs analízise az összes esetenél – Abacus Junior 5 Vet

A CLL-ben szenvedő betegek esetében a várakozásokkal ellentétben nem találtunk szignifikáns korrelációt, bár a tendencia így is látható a 16. sz. ábrán.



16. sz. ábra: Lymphocyták korrelációs analízise a CLL-es megbetegedéseknél – Abacus Junior 5 Vet

A monocyta és az eosinophil granulocyta populációkat vizsgálva nem találtunk a berendezés és a kenetelemzés eredményei között szignifikáns korrelációt ($p_{\text{mono}}=0,18$; $p_{\text{eo}}=0,23$). Ezen sejtek analízisét a 17. sz. ábra mutatja be. Basophil granulocytát a kenetekben nem detektáltunk.

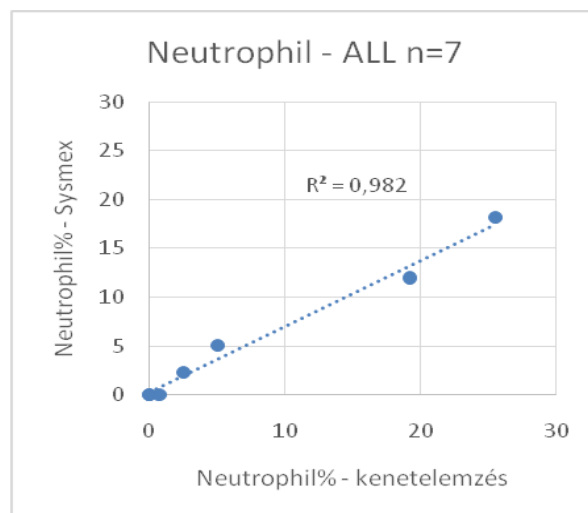
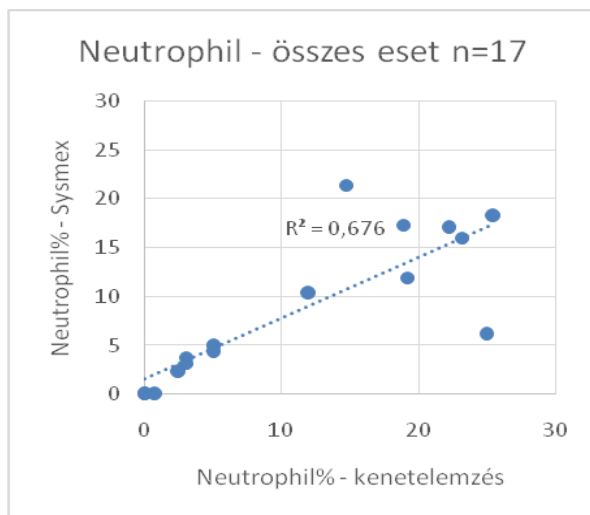


17. sz. ábra: Monocyták és eosinophil granulocyták korrelációs analízise az összes esetben – Abacus Junior 5 Vet

Az Abacus 5 part-os hematológiai automata nem képes elkülöníteni a nem élettani fehérvérsejt alakokat, így a lehetséges daganatsejteket nem tudja külön populációként kezelni, ezért erre vonatkozó összehasonlítást nem tudtuk végezni.

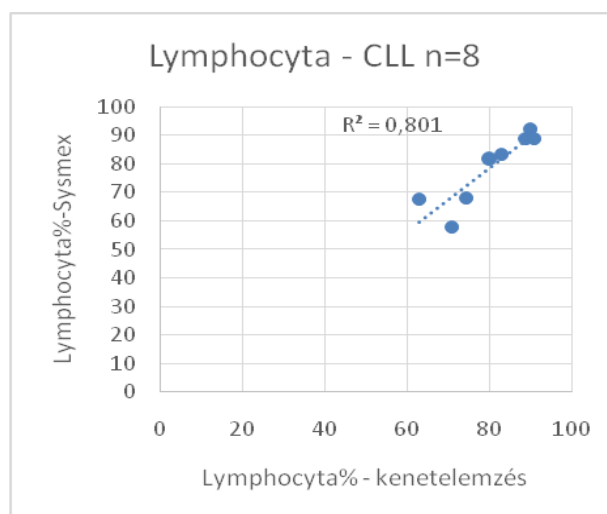
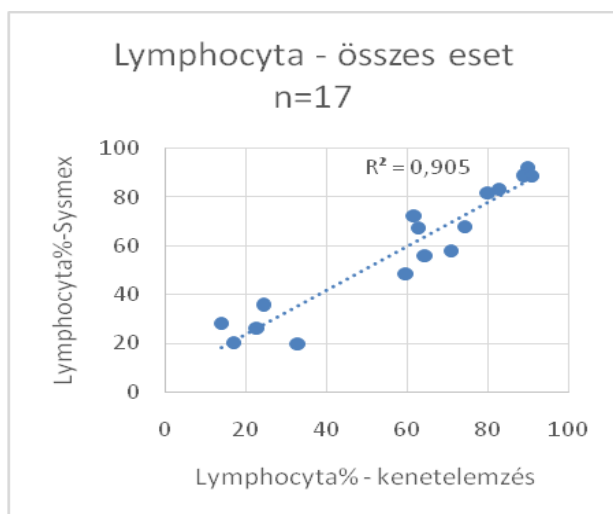
Sysmex XT 2000iv

Az automata által mért neutrophil granulocyta populációk százalékos eredményei minden csoport esetében szignifikáns korrelációt mutattak a kenetelemzés eredményeivel összehasonlítva ($p_{\text{összes}}=0,001$; $p_{\text{CLL}}=0,0014$; $p_{\text{ALL}}=0,03$), ami a 18. sz. ábrán látható.



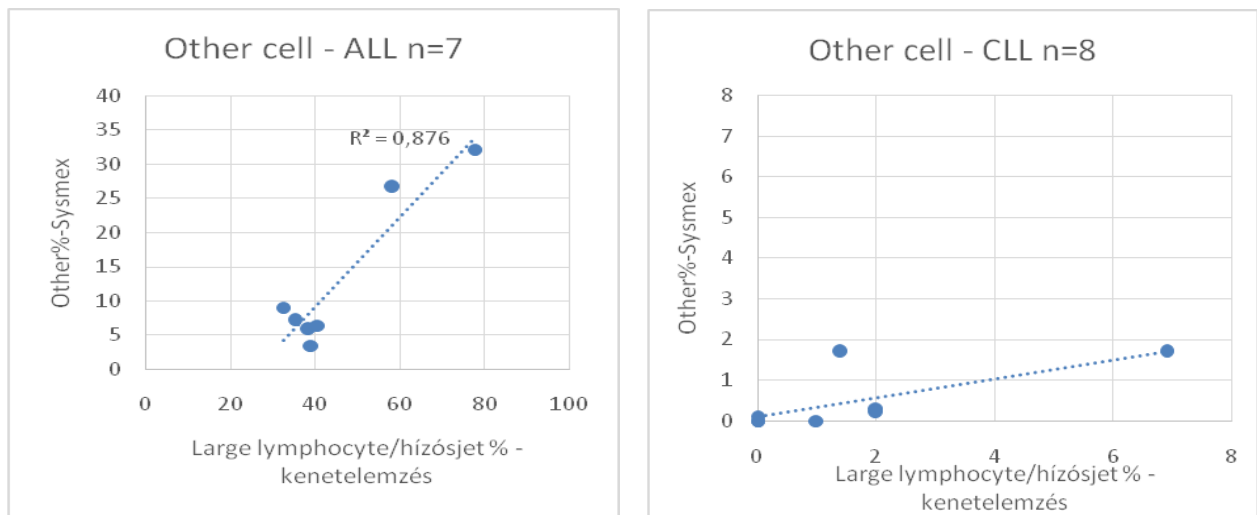
18. sz. ábra: Neutrophil granulocyták korrelációs analízise az összes esetbenél és a ALL-es megbetegedéseknél – Sysmex Xt 2000iv

A kenetelemzéssel összehasonlítva az automata által mért kis lymphocyták százalékos aránya minden populáció esetén szignifikáns korrelációt mutatott ($p_{\text{összes}} < 0,0001$; $p_{\text{CLL}} = 0,018$; $p_{\text{ALL}} = 0,0026$), az analízist a 19. sz. ábra szemlélteti.



19. sz. ábra: Lymphocyták korrelációs analízise az összes esetbenél és a CLL-es megbetegedéseknél – Sysmex Xt 2000iv

Ezen berendezés mérései esetében is láhattuk, hogy a monocytá és eosinophil populációk mért százalékos eredményei nem mutattak szignifikáns korrelációt a kenetelemzés eredményeivel ($p_{\text{mono}} = 0,63$; $p_{\text{eo}} = 0,11$). Az automata által mért basophil százalékok közül csak kettő mutatott jelentős kiugrást: 2 mastocytémiás macska vérében 21,7%; és 25,3%. Basophil granulocyták nem voltak detektálhatók a kenetekben, ellenben mastocyták százalékos megjelenése a kenetben 38,6%, illetve 35,6% volt.

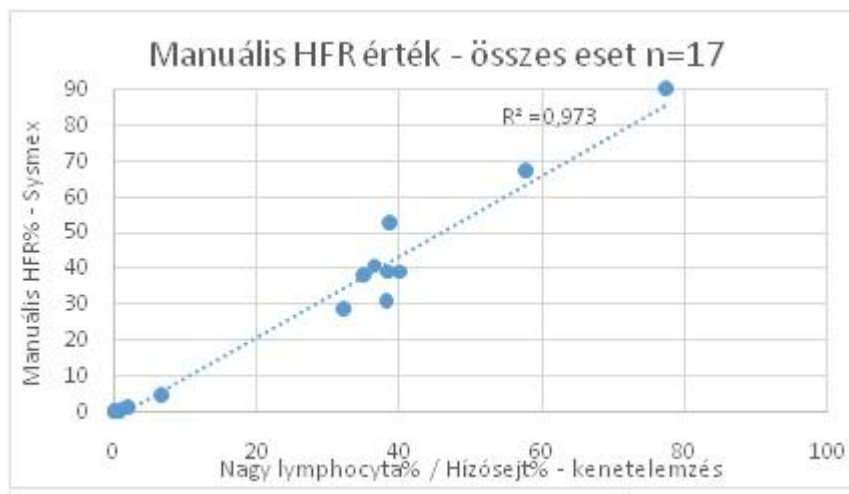


20. sz. ábra: Egyéb sejtek korrelációs analízise az ALL-es és a CLL-es megbetegedéseknél – Sysmex Xt 2000iv

A Sysmex XT2000iv automata a lehetséges daganatsejteket „other cell” csoportba sorolja. Ezen populáció mért százalékos eredményeit vizsgáltuk összehasonlítva a vérkenetekben látható nagy lymphocyták, vagy hízósejtek százalékos eredményeivel. A vizsgálatok során minden leukaemia csoportban szignifikáns korrelációt ($p_{\text{összes}}=0,001$; $p_{\text{ALL}}=0,0011$; $p_{\text{CLL}}=0,049$) találtunk az automata által mért, és a kenetben számolt értékek között (20. sz. ábra).

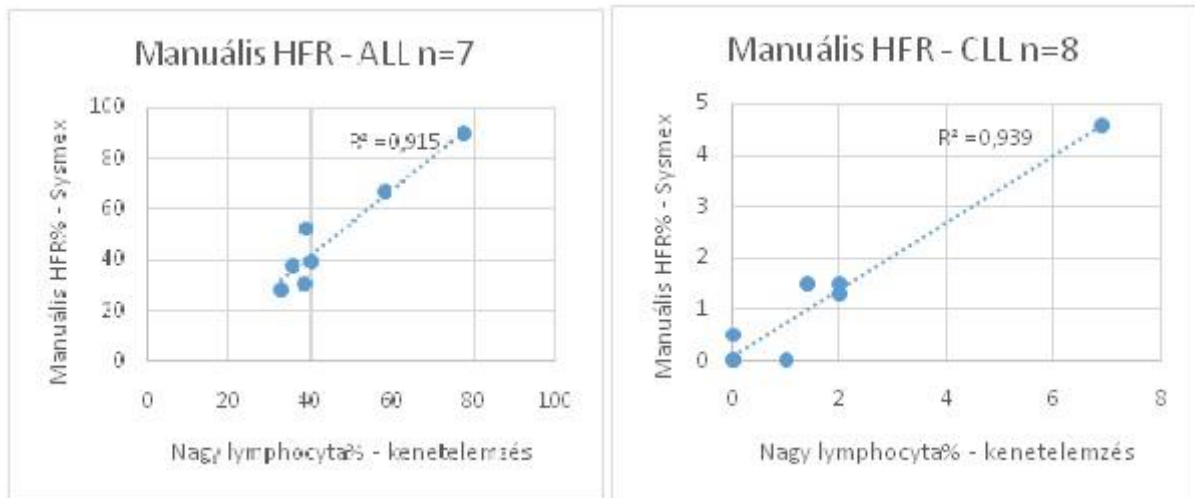
A Sysmex XT2000iv manuális analízis eredményei

Mivel a Sysmex szoftvere lehetőséget ad a felhődiagramok reanalízisére, ezeket elvégeztük és meghatároztuk a lehetséges daganatsejt frakció méretét, és az itt kapott százalékos értékeket hasonlítottuk össze a kenetekben számolt nagy lymphocytákkal, vagy a hízósejtekkel (21. sz. ábra).



21. sz. ábra: manuálisan beállított HFR érték korrelációs analízise – Sysmex Xt 2000iv

Az összes eset eredményeit figyelembe véve, valamint az ALL-es és CLL-es betegeket külön vizsgálva minden esetben szoros korrelációt figyeltünk meg ($p_{\text{összes}}=0,0001$; $p_{\text{ALL}}=0,0074$; $p_{\text{CLL}}=0,00024$), ezt a 22. sz. ábra szemlélteti.



22. sz. ábra: manuálisan beállított HFR érték korrelációs analízise ALL-es és CLL-es megbetegedéseknél – Sysmex Xt 2000iv

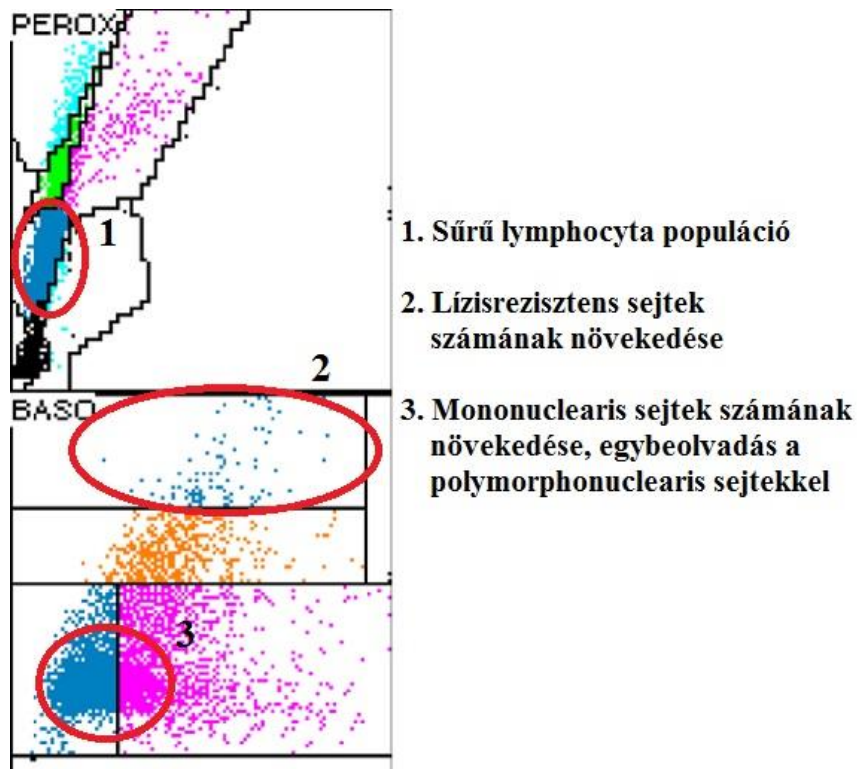
A két mastocytémiás beteg adatait statisztikailag nem vizsgáltuk, ott csak tendencia látható. A manuális kapuzással 39,6%, illetve 41,2% lízisrezisztens sejtet találtunk, míg a hozzájuk tartozó kenetekben 38,6% és 36,5% volt a mastocyták aránya.

Felhődiagramok elemzése

Advia120

CLL

A Perox és Baso csatornán készített felhődiagramokban, ill. a fehérvérsejt számban jellegzetes elváltozások láthatók. A Perox csatornán mért adatok szerint megnövekedett a lymphocyták száma, CLL esetén a keringésben differenciált lymphocyták jelennek meg nagy számban (30 000 lymphocyt/ μ l feletti értékben), ez magyarázza a diagramon látottakat (23. sz. ábra).

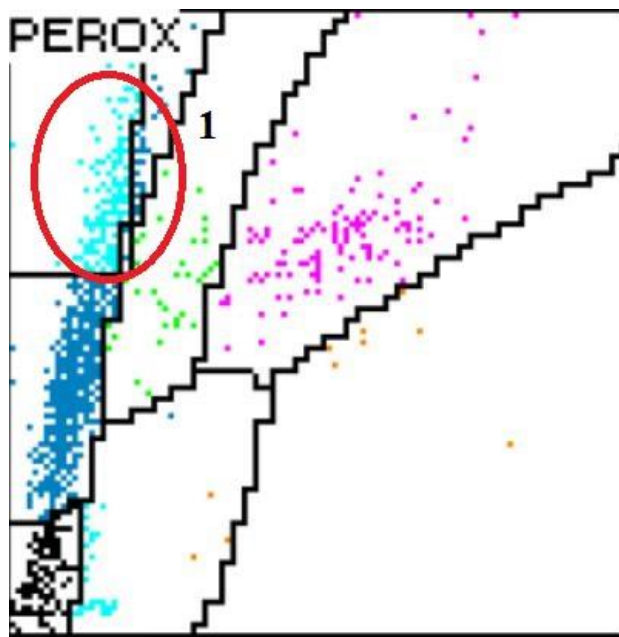


23. sz. ábra: Advia120 automata CLL-es beteg kutya mintájából készített felhődiagramja

A Baso csatornán a mononuclearis és polymorphonuclearis sejtek nem különültek el egymástól, hanem egybefüggő masszát alkottak, egymáshoz viszonyított arányuk jelentősen megváltozott. Ezt szintén az emelkedett lymphocytaszám magyarázza. Emellett a basophil granulocyták régiójába tartozó, lízisálló sejtek száma is megnövekedett, ami a daganatsejtek megjelenésére utal.

ALL

A Perox csatornán a LUC csoportban jelentős növekedés látható, ideális esetben ebbe a halmazba kellett volna kerülnie az összes nagy lymphocytának, de a LUC érték a teljes nagy lymphocyta szám töredéke volt. A 24. sz. ábrán látható felhődiagram alapján így is feltételezhető volt az ALL-es megbetegedés a LUC régióban látható magas sejtsűrűség és a Baso csatornán mérhető mononuclearis sejtek megnövekedett száma miatt. Emellett itt is magas basophil granulocyta sejtszámot mért az automata, mivel a nagy lymphocyták ellenállnak a lízáló oldatoknak, így a basophil granulocytákkal egy csoportba sorolja őket.

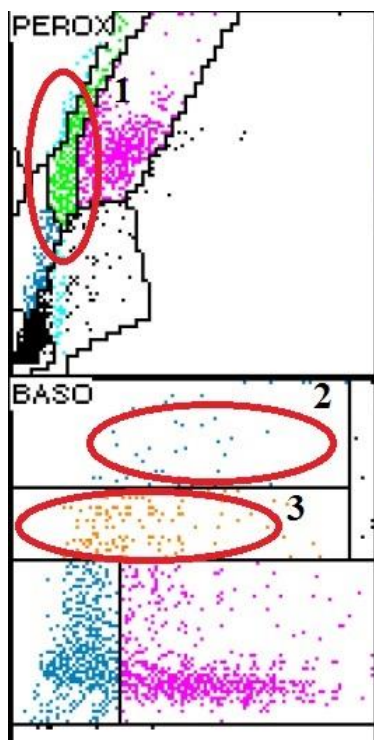


1. Megnövekedett LUC szám

24. sz. ábra: Advia120 automata ALL-es kutya vérmintájából készített felhődiagramja

MCT

A hízósejtek az Advia120 automata a monocyta régiójába kerültek, ennek a sejtsopornak a növekedése jól látható a 25. sz. ábra Perox csatornán készített felhődiagramján. LUC halmazban alig láthatóak sejtek. A Baso csatornán a LRR-ba sorolt sejtek és basophil granulocyták száma erősen megnőtt ezen betegeknél (25. sz. ábra).



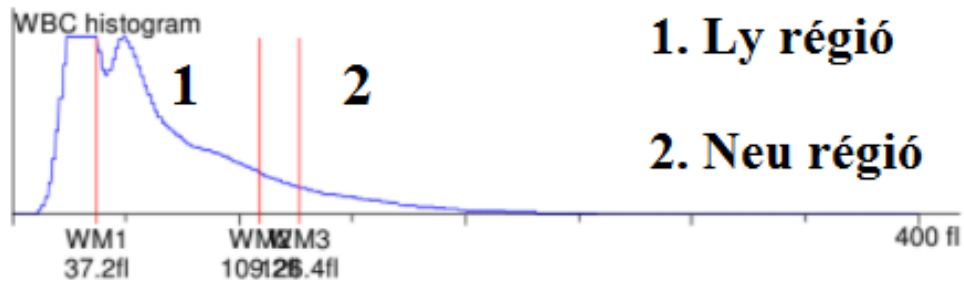
- 1. Monocyták számának növekedése**
- 2. Egyéb lízisrezisztens sejtek számának növekedése**
- 3. Basophil granulocyták számának növekedése**

25. sz. ábra: Advia Perox és Baso csatornán készített felhődiagramja MCT-ás megbetegedésnél

Abacus Junior 5 Vet

CLL

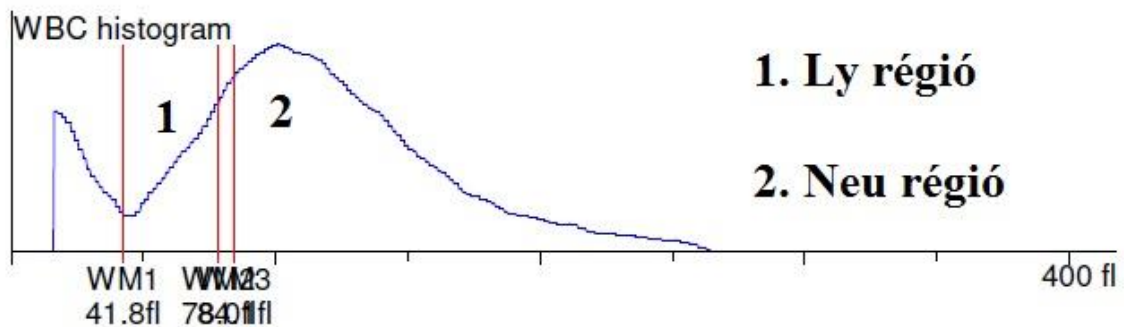
A CLL-es eseteknél magas lymphocytaszámot és igen alacsony neutrophil granulocytaszámot kaptunk, amit a 26. sz. ábra hisztogramja prezentál.



26. sz. ábra: Abacus automata hisztogramja CLL-es megbetegedésnél

ALL

A gép az ALL-es megbetegedések esetében nem tudta elkülöníteni a nagy lymphocytákat a neutrophil granulocytáktól, mivel az egész hisztogramon egy átfedő monopopuláció látható (27. sz. ábra).

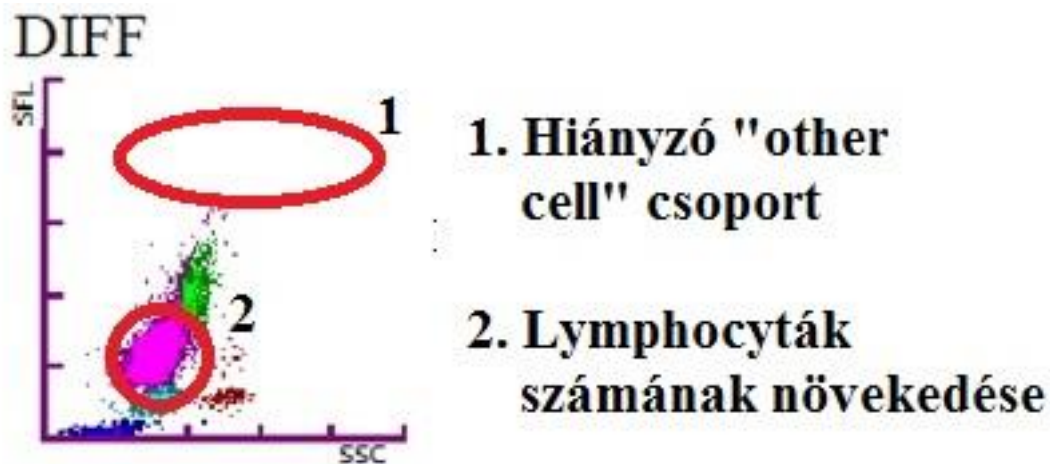


27. sz. ábra: Abacus automata hisztogramja ALL-es megbetegedésnél

Sysmex XT2000iv

CLL

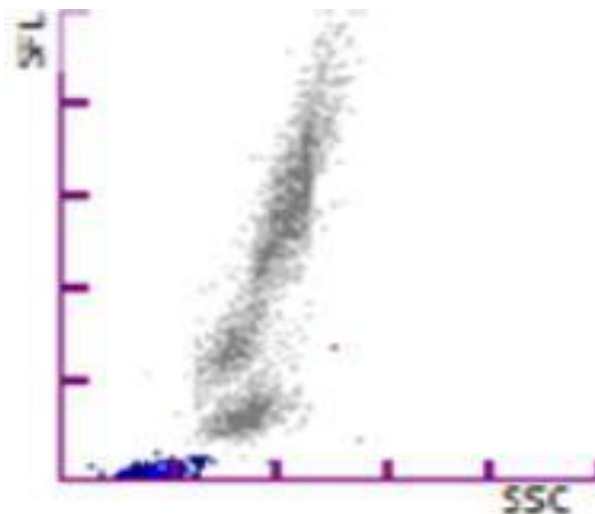
Ennél az automatánál elsősorban a magas lymphocytaszám és a Baso csatornán készített felhődiagram lízisrezisztens régiójában található sejtek esetleges emelkedett száma utal CLL-re (28. sz. ábra).



28. sz. ábra: CLL-es kutya Baso csatornán készített felhődiagramja

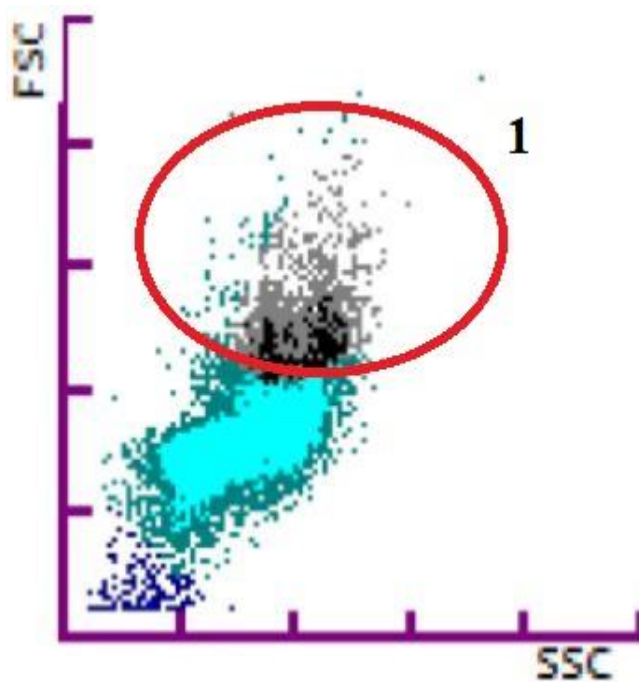
ALL

Az ALL-es megbetegedéseknél a gép részben a monocyta régióban, részben annál magasabban jelenítette meg a nagy lymphocytákat. A Diff csatornán készített felhődiagramokon a gép nem tudta elkülöníteni a populációkat, ezért egységes szürke felhőként jelenítette meg őket, ami a 29. sz. ábrán látható.



29. sz. ábra Egységes szürke populációként jelzett sejtcsoport a Sysmex gép ALL-es kutya véréből készült felhődiagramján

A Baso csatornán pedig a LRR-ba sorolt sejtek nagy száma utal az ALL-re. A CLL-es megbetegedéseknél jelentősen nagyobb számban kerültek sejtek a lízisrezisztens régióba (30. sz. ábra).



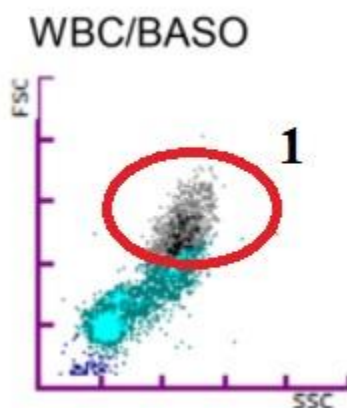
1. Megnövekedett sejtszám a LRR-ban

30. sz. ábra: ALL-es kutya felhődiagramja a Sysmex Baso csatornáján

Gelain és társai 2010-es vizsgálatában az ALL-es és CLL-es eseteknél is szignifikánsan magasabb volt a LRR értéke az egyéb vizsgált csoportokéhoz képest. Az ALL-es megbetegedéseknél pedig a HFR-ba sorolt sejtek száma is szignifikánsan nagyobb volt (Gelain et al., 2010).

MCT

Az automata a Baso csatornán a basophil granulocyták régiójába jelenítette meg a MCT sejteket, így egyes esetekben 21%-os volt a basophil granulocyták aránya (macskáknál az élettani arány kevesebb, mint 1%, így ez a kiugróan magas érték felhívja a figyelmet esetleges daganatsejt jelenlétére). Mastocytomára a nagy méretű lízisrezisztens sejtcsoport jobbratolódása miatt lehet gyanakodni (31. sz. ábra).



1. Megnövekedett sejtszám a LRR-ban

31. sz. ábra: MCT-ás macska felhődiagramja a Sysmex Baso csatornáján

Következtetések

A különböző hemopoiitikus daganatsejtek detektálása és azonosítása komoly nehézségeket okoznak a hematológiai automatáknak, mert sok esetben élettani sejtekhez hasonló méretűek lehetnek, vagy nukleinsav tartalmuk hasonló valamely más sejttípushoz, így azokkal átfedésbe kerülve pontatlan mérést okoznak.

A kapott eredmények alapján látható, hogy az impedanciás elven működő Abacus hematológiai automata a neutrophil granulocytákat csak krónikus kis lymphocytás leukaemiás esetekben tudta megbízhatóan elkülöníteni. Az akut leukaemiás betegek mért neutrophil százalékos értékei sokkal magasabbak lettek a kenetelemzés eredményeinél. Ez azzal magyarázható, hogy az impedanciás automata a sejteket kizárólag méretük alapján differenciálja. Az akut lymphoblastos leukaemiában megjelenő nagy lymphocytákat nem tudja elkülöníteni, hanem nagy valószínűséggel, méretükből adódóan tévesen a neutrophil granulocytá populációhoz számolja azokat. Ez jól látható ezen betegek fehérvérsejt hisztogramjain is (27. sz. ábra). A hisztogram alapján gyanítható, hogy nem élettani vércépről van szó, mert a görbe egyetlen monopopulációként jeleníti meg a fehérvérsejteket, és valójában nem tudja differenciálni azokat, csak az előre beállított méret alapú gate-ek alapján választja szét őket. A kis lymphocyták elkülönítése megbízhatónak bizonyult az összes vizsgált csoportban. Az akut lymphoblastos leukaemiás csoportban ez szignifikáns volt, míg a krónikus kis lymphocytás leukaemiás betegek esetén bár nem volt szignifikáns a kapcsolat, de a tendencia a diagramon jól látható. A szignifikancia hiányát két kiugró mért érték okozza: (Abacus: 49,4% kenet: 74,4%; Abacus 62,8% kenet 80%). Feltételezhetjük, hogy nagyobb elemszámnál ezek az értékek kevésbé befolyásolnák az eredményt, és jobban láthatóvá válna a szoros kapcsolat. A monocyták vizsgálata során nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az automata által mért és a kenetben számolt értékek között, ez szintén az automata mérési módszeréből adódhat. Tévesen ebbe a populációba számolhat egyéb sejteket; pl nagy lymphocytákat. Mivel az Abacus impedanciás automata nem képes a lehetséges daganatsejtek meghatározására, vagy jelzésére, így ezzel kapcsolatos vizsgálatokat nem végeztünk.

A fentiek alapján az impedanciás elven működő gépek leukaemiás betegségben szenvedő állatoknál kevésbé pontosan tudják differenciálni a sejteket, és a lehetséges daganatsejteket sem tudják elkülöníteni. A hisztogramok megfelelő elemzése azonban segítséget jelenthet, mert a görbék alapján valószínűsíthető, hogy a kapott eredmény mennyire lehet valós, a kenettel megegyező.

A 5+1 part-os Siemens Advia120 hematológiai automata a neutrophil granulocytá populációt minden vizsgált leukaemia csoportban megbízhatóan tudta meghatározni, a kenetelemzéssel összehasonlítva. Ez a működési elvéből fakadó jelenség, hiszen a felhődiagramon is jól látható, hogy a neutrophil populáció elhelyezkedése távol esik a lehetséges daganatsejtekétől, így ezek nem zavarják a megbízható mérésüket.

Kis lymphocyták mért százalékos értékei az összes leukaemiás beteget egy csoportként vizsgálva jól korreláltak a kenetelemzés eredményeivel, de az akut lymphoblastos leukaemiás betegek csoportjában nem volt szignifikáns a kapcsolat. A kis lymphocyták a LUC régió alatt helyeződnek a felhődiagramon, mivel myeloperoxidáz aktivitásuk nincs, és méretük a többi fehérvérsejthez képest kicsi. Akut leukaemiás esetekben a vérkeringésben nagy számban jelennek meg neoplastikus nagy lymphocyták, melyek a felhődiagramon a LUC régióban jelennének meg, azonban, ha a méretük nem kellően nagy, a normál kis lymphocytá populációtól nem tud kellően elkülönülni, így a differenciálás nem lesz megfelelő. Sok nagy lymphocytá kis lymphocytaként regisztrálódik, ezzel csökkenhet a LUC százalékos érték, és emelkedhet a kis lymphocyták százalékos aránya. Ezt támaszthatja alá az is, hogy az összes ALL-s beteg esetében a lymphocytá százalékos értéke minden esetben magasabb volt, mint amit a kenetelemzésnél tapasztaltunk.

Az eosinophil granulocytá százalékos eredmények nem mutattak korrelációt a kenetelemzéshez képest. Az összes leukaemiás beteget egy csoportként vizsgálva látszik, hogy a százalékos mért értékek a két kiugró mastocytémiás beteg kivételével hasonló értékeket adott a kenetelemzéssel összehasonlítva, de nem szignifikáns a korreláció. Az ALL-es és a CLL-es betegek eredményei sem mutatnak szoros korrelációt, ez annak tudható be, hogy a minták 82%-ban nem volt látható eosinophil granulocytá a kenetelemzéskor (n=14). A kenetekben 250 fehérvérsejtet differenciáltunk, míg az Advia120 egyetlen mérés során is több ezer sejtet számol le és azonosít, így ez akár statisztikai eltérés is lehet.

Összehasonlítottuk az Advia120 által mért LUC százalékos eredményeket a kenetelemzés daganatsejt százalékaival, de nem találtunk korrelációt semelyik csoportban. Ezt hasonlóan tudjuk magyarázni, mint korábban a kis lymphocyták esetében.

Az akut leukaemiás betegek egy részében emelkedett basophil granulocytá százalékos mértünk. Korábbi vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a nagy lymphocyták lízis rezisztens sejt-ként viselkednek (Bauer et al., 2012), így emelhetik a basophil granulocytá százalékos értékét. Vizsgálatainkban a basophil granulocyták száma nem mutatott korrelációt a kenetben megjelent nagy lymphocyták mennyiségével. Feltételezhetjük, hogy a mintában lévő sejtek

membránjai károsodhattak a mintatárolás során, vagy az eltérés az alacsony elemszámból is fakadhat.

A fenti eredményekből látható, hogy az Advia120 lézeres automata kétségtelenül pontosabban tudja differenciálni a fehérvérsejt frakciókat, mint az impedanciás automata, de leukaemia esetén kevésbé megbízható. A felhődiagram megjelenése sokat segíthet a diagnózis felállításában, azonban a LUC százalékos érték nem mutatott szoros kapcsolatot a kenetben látott daganatsejt százalékokkal, így nem tudunk közvetlenül következtetni az eredményekből a keringő daganatsejtek, nagy lymphocyták mennyiségére, csak a jelenlétüket tudjuk feltételezni.

A Sysmex XT2000iv készülék a neutrophil granulocytákat és a kis lymphocytákat minden leukaemiás csoportban megbízhatóan elkülönítette, és a kapott eredmények szoros korrelációt is mutattak a kenetelemzéssel összehasonlítva. Ez várható volt, hiszen mind a neutrophil granulocyták, mind a lymphocyták a mérési módszerből fakadóan a felhődiagramon jól elkülönülve jelennek meg, távol a lehetséges daganatsejtek megjelenési helyétől.

A monocyták mért százalékos eredményei egyik leukaemiás csoportba sem mutattak szoros kapcsolatot a kenetelemzés eredményeivel. Ez volt a várt eredmény, hiszen korábban több kutatás is bizonyította, hogy a daganatsejtek nagyobb nukleinsav tartalma miatt a populáció elhelyezkedése egybeeshet a monocyták normál megjelenési tartományával.

Az eosinophil granulocyták százalékos eredményei sem mutattak szignifikáns korrelációt, ennek magyarázata hasonló lehet mint az Advia120 esetében.

Vizsgáltuk a Sysmex által százalékban kifejezett „other cell” és a kenetben számolt daganatsejt százalékok korrelációját mely mind az ALL, mind a CLL csoport esetében szignifikáns volt. Az „other” csoportot a szoftver a magas fluorescens jelintenzitású tartományban keresi, ahol vagy reaktív sejtek, vagy neoplasticus sejtek jelennek meg, így a kapott korrelációt vártuk.

Akut leukaemiás betegeknél nagy százalékában mértünk jelentősen emelkedett monocyta értéket (átlag: 44.44%; kenetben átl: 1,3%), de a kapcsolat a kenetben megjelenő daganatsejtek mennyiségével nem volt szignifikáns. A tendencia alapján továbbra is azt gondoljuk, hogy emelkedett mért monocyta százalék esetén feltételezhető neoplasticus háttér, mert a daganatsejtek a nagyobb nukleinsav tartalmuk miatt a monocyta populáció magasságában, vagy afelett jelenhetnek meg.

A Sysmex XT2000iv szoftvere lehetőséget ad a felhődiagrammok manuális újra értelmezésére. Sok esetben nem voltak egymástól egyértelműen elkülöníthetők a különböző

sejtpopulációk a felhődiagramokon a fluorescens jelintenzitásuk alapján, ezért részletes differenciálást nem végeztünk, de minden beteg esetében manuálisan meghatároztuk a lehetséges daganat frakciót a HF és LR régiók alapján és az így kapott eredményeket hasonlítottuk össze a kenetelemzés során talált daganatsejtek százalékos értékeivel. Ez az összehasonlítás minden betegcsoport esetében szoros korrelációt mutatott. Leglátványosabban a két mastocytomiás beteg eredményein volt látható, habár szignifikancia az alacsony elemszám miatt nem számolható, de a tendencia jól látható így is. Az eredmény azért mutat ilyen jó egyezést, mert a hízósejtek a Baso csatornán lízis rezisztens sejtként jelennek meg, illetve a bennük lévő granulomok miatti nagyobb X-tengely értékek miatt jobbra tolódnak a felhődiagramon, jól elkülönülve a többi lízáló fehérvérsejttől. A Diff csatornán nem volt egyértelműen elkülöníthető a mastocytoma populáció, mert a magasabb nukleinsav tartalomtól fakadóan a monocytákkal került átfedésbe.

Ez az eredmény rávilágít arra, hogy egy szoftveres elemzésnek is lehet létjogosultsága a kenetelemzés mellett, de fontos megjegyezni, hogy nem helyettesítheti azt.

Összefoglalás

Vizsgálatunkban három (egy impedancia elven működő és két lézeres) hematológiai automata által készített mérési eredményt hasonlítottunk össze egymással és a kenetelemzés eredményével. A vérmintákat K-EDTA-as vérvételi csövekbe vettük, és 24 órán belül megvizsgáltuk az Abacus Junior 5 Vet, Siemens Advia120, és Sysmex Xt-2000iv berendezésekkel. Emellett elvégeztük a kenetelemzést és az immunfenotipizálást (FACS módszerrel). A kenetelemzés során minden mintában 250 db sejtet számoltunk. 15 kutya és 2 macska vérmintáját vizsgáltuk, melyek közül 11 kutya szenvedett CLL-ben, 4 kutya ALL-ben és 2 macska pedig szisztémás mastocytomában.

Az impedancia elven működő Abacus Junior 5 Vet minden esetben pontosan számolta a neutrophil granulocytákat. Az összes daganattípust együtt vizsgálva szignifikáns korreláció mutatkozott az automata által mért sejtszámok és a kenetelemzés eredménye közt. A CLL-es eseteket külön vizsgálva (valószínűleg az alacsony mintaszám miatt) nem találtunk szignifikáns összefüggést, de a várt tendencia így is látható volt.

Az Advia120 esetében már jól látszottak a lézeres sejtszámlálás előnyei az impedanciás automatához képest, a neutrophil granulocyták mellett a lymphocyták számát is pontosan mérte (itt is szignifikáns korrelációt tapasztaltunk). A LUC és basophil granulocytoma sejtek számának emelkedése nem mutatott szignifikáns korrelációt a daganatos sejtek számával, de

ennek ellenére ezen sejtek számának emelkedése alapján feltételezhető a neoplasticus elváltozás.

A Sysmex XT2000iv szolgáltatotta a legpontosabb adatokat. Minden vizsgált daganatos megbetegedésnél szignifikáns korreláció volt az other cell csoport és a daganatos sejtek száma közt. Az utólagos manuális analízis során ugyanilyen összefüggést találtunk a HFR/LRR-be sorolt sejtek és a daganatos sejtek száma között. A LRR-be sorolt sejtek magas száma miatt a felhődiagram alapján az MCT-ra is lehetett következtetni, mivel ez volt az egyetlen automata, ahol a feltételezhető mastocytaszám is szignifikáns korrelációt mutatott a kenetelemzés eredményével.

Következtetések: a haematológiai automaták használata számos hasznos kiegészítő információt nyújt a fenti daganatos megbetegedések vizsgálatakor, mind a számértékek, mind a felhődiagramok tekintetében. A legpontosabb méréseket a Sysmex XT2000iv automata végezte, aminek adatai alapján a szisztémás mastocytomában szenvedő betegeket is azonosítani tudtuk. Megállapítottuk, hogy az automaták segítségével könnyebben detektálhatók a fenti elváltozások, de nem helyettesíthetik a tapasztalt haematológus által végzett szakszerű kenetelemzést.

Summary

We've compared three hematology devices (one impedance and two laser types), to find differences in blood analyses of patients with haemopoietic malignancies, compared to the manual smear analysis. Blood samples from the tested individuals were collected in K3-EDTA tubes, and measured by Abacus Junior 5 Vet, Siemens Advia120, and Sysmex Xt-2000iv hematology analyzers within 24 hours after sampling, blood smear analysis and immunophenotyping were also performed, the latter by FACS analysis. The smears were examined by counting 250 cells of all samples.

The Abacus Junior 5 Vet, which operates on the principle of impedance, measured neutrophil granulocytes correctly in all cases. A significant correlation can be shown in the measurement of the number of the cells between the analyzer and the smear analysis in case of all tumour types. During the separated analysis of CLL cases (possibly due to the low number of samples), no significant correlation was found, but the expected tendency was still visible. Upon working with Advia120, the advantages of laser cell-countings were definitely visible, over against the impedance analyzing, because it measured correctly not only neutrophil granulocytes, but lymphocytes as well (a significant correlation was shown there as well). The

increase in the number of LUC and basophil granulocyte cells did not show significant correlation with the number of the tumour cells, nevertheless, these informations were proven useful in the identification of the tumour. Neoplastic mutation is assumable due to the increase in number of the cells mentioned above, but we could not find any connection between the number of cancerous cells and the rate of their rising. The Sysmex XT2000iv provided the most accurate datas. During all examination of tumour related diseases, there was a significant correlation between the tumour cells and the other cell groups. The same connection was experienced upon manual analyzis between the number of HFR/LRR-type cells and the number of tumour cells. The increased number of LRR-type cells in the cloud diagramm could lead us to suspect MCT, because it was the only analyzer, in which the number of mastocytoma cells had a significant correlation with the result of the smear analyzis.

In conclusion: using haematoly analyzers can provide numerous useful additional informations in cases of tumours mentioned above, both in cell counts and in the scatterdiagramm analysis. The Sysmex XT2000iv measured the most accurately, which's data could be used to identify systematic mastocytoma in patients. We may state that analyzers makes the detection of the mutations above easier, but they cannot replace the smear analizys of an experienced haematologist.

Irodalom

- Abacus Junior Vet Hematology Analyzer User's Manual p. 5-3 URL:
http://www.diatron.com/upload/producttab/92/VUM011_AJV_UM_2.76.pdf Megtekintve: 2017.10.19.
- ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems Operator's Guide p. 6-11. URL:
<https://photos.medwrench.com/equipmentManuals/2029-4080.pdf> Megtekintve: 2017.10.19.
- Argyle, D. J., Brearley, M. J., Turek, M. M., 2008a: Decision making in small animal oncology. Iowa, Wiley-Blackwell. p. 184-197.
- Argyle, D. J., Brearley, M. J., Turek, M. M., 2008b: Decision making in small animal oncology. Iowa, Wiley-Blackwell. p. 147-158.
- Bauer, N., Nakagawa, J., Dunker, C., Failing, K., Moritz, A., 2012. Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV™ compared to the ADVIA® 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc 24, p. 74–89.
- Damjanovich, S., Fidy, J., Szöllösi J., (Eds.) 2007: Orvosi biofizika. Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. p. 445-458.
- Furlanello, T., Tasca, S., Caldin, M., Carli, E., Patron, C., Tranquillo, M., Lubas, G., Solano-Gallego, L., 2006. Artifactual changes in canine blood following storage, detected using the ADVIA120 hematology analyzer. Vet. Clin. Pathol. 35, p. 42–46.
- Gelain, M.E., Rossi, G., Giori, L., Comazzi, S., Paltrinieri, S., 2010. Identification of neoplastic cells in blood using the Sysmex XT-2000iV: a preliminary step in the diagnosis of canine leukemia. Vet. Clin. Pathol. 39, p. 169–179.
- Góth, L., 2011: .A klinikai kémia és klinikai enzimológia története és fejlődése. Debreceni Egyetem. p.56. URL:
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0019_1A_A_klinikai_kemia_es_klinikai_enzimologia_tortene_te_es_fejlolese/ch07s04.html Megtekintve: 2017.08.26.
- Leach, M., Drummond, M., Doig, A., 2013a: Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis. Chichester, Wiley-Blackwell. p. 44.
- Leach, M., Drummond, M., Doig, A., 2013b: Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis. Chichester, Wiley-Blackwell. p. 3-9.
- Linnet, M.S., Schubauer-Berigan, M.K., Weisenburger, D.D., Richardson, D.B., Landgren, O., Blair, A., Silver, S., Field, R.W., Caldwell, G., Hatch, M., Dore, G.M., 2007. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. Br. J. Haematol. 139, p. 672–686.
- Piviani, M., Walton, R.M., Patel, R.T., 2013. Significance of mastocytemia in cats. Vet. Clin. Pathol. 42, p. 4–10.
- Rebar, A., H., MacWilliams, P., S., Feldman, B., F., Metzger, F., L., Pollock, R., V., H., Roche, J., 2001: A guide to hematology in dogs and cats. Jackson, Teton NewMedia. p. 11.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. W. (Eds.) 2008a: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th. ed. Geneva, WHO Press. p 56.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. W. (Eds.) 2008b: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th. ed. Geneva, WHO Press. p 164.
- Sysmex Operator's Manual automated hematology analyzer XT 2000 iv p. 5-12 CD
- Withrow, J.S., Vail, D. M., Page, R. L. 2013a: Small Animal Clinical Oncology. 5th ed. St. Louis, Elsevier Inc. p. 53.
- Withrow, J.S., Vail, D. M., Page, R. L. 2013b: Small Animal Clinical Oncology. 5th ed. St. Louis, Elsevier Inc. p. 627-631.

Withrow, J.S., Vail, D. M., Page, R. L. 2013c: Small Animal Clinical Oncology. 5th ed. St. Louis, Elsevier Inc. p. 335-346.

Withrow, J.S., Vail, D. M., Page, R. L. 2013d: Small Animal Clinical Oncology. 5th ed. St. Louis, Elsevier Inc. p. 660.

Köszönetnyilvánítás

A TDK dolgozatom elkészítése során az elvárhatónál messzemenően nagyobb segítséget nyújtott témavezetőm, dr. Tóth Bálint. Köszönettel tartozom dr. Vajdovich Péter tanszékvezető úrnak (PhD, ÁTE Kóréletani és Onkológiai Tanszék) a kenetelemzések elkészítéséért és TDK dolgozatom bírálatában végzett munkájáért. Köszönet illeti továbbá az Állatorvosi Hematológiai és Onkológiai Központ dolgozóit a vizsgálatok során nyújtott segítségükért.

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Gidró Tímea

Elérhetőség (e-mail cím): timea.gidro@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Macskák és kutyák leukémiás megbetegedéseinek diagnózisa hematológiai automaták segítségével

A mű megjelenési adatai: TDK dolgozat

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

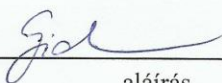
Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2017 . év október hó 19 nap


aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

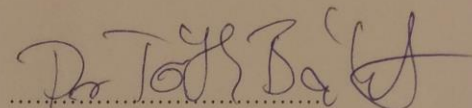
A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott dr. Tóth Bálint igazolom, hogy Gidró Tímea „Macskák és kutyák leukémiás megbetegedéseinek diagnózisa hematológiai automaták segítségével” című TDK-dolgozatát ismerem, azt beadásra alkalmasnak tartom.

Budapest, 2017. október 18.



dr. Tóth Bálint

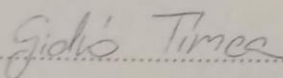
Állatorvostudományi Egyetem

Kóréletteni és Onkológiai Tanszék

NYILATKOZAT

Alulírott Gidró Tímea nyilatkozom, hogy szakdolgozatom, melynek címe „Macskák és kutyák leukémiás megbetegedéseinek diagnózisa hematológiai automaták segítségével” tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2017 évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2017.11.21.

.....

Gidró Tímea