



**SEMMELWEIS
UNIVERSITY**



3DHISTECH

Digitalizált immunhisztokémiai reakciók automatikus kiértékelése a Pannoramic™ Platform-mal

**Micsik Tamás , Kiszler Gábor, Szabó Dániel , Krecsák
László, Krenács Tibor, Molnár Béla**

I számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

3DHistech Kft., Budapest



SEMMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH

A célzott terápia korát élve a terápia tervezéséhez prediktív adatot szolgáltat a rutin patológiai feldolgozás, amit a digitális patológia eszköztárával pontosabbá tehetünk.

A 3DHistech NuclearQuant és MembraneQuant applikációi ehhez nyújtanak segítséget. A programok élesben is használhatóak, de lényegében szabadon programozhatóak.

Háttér, előzmények



SEMELWEIS
UNIVERSITY

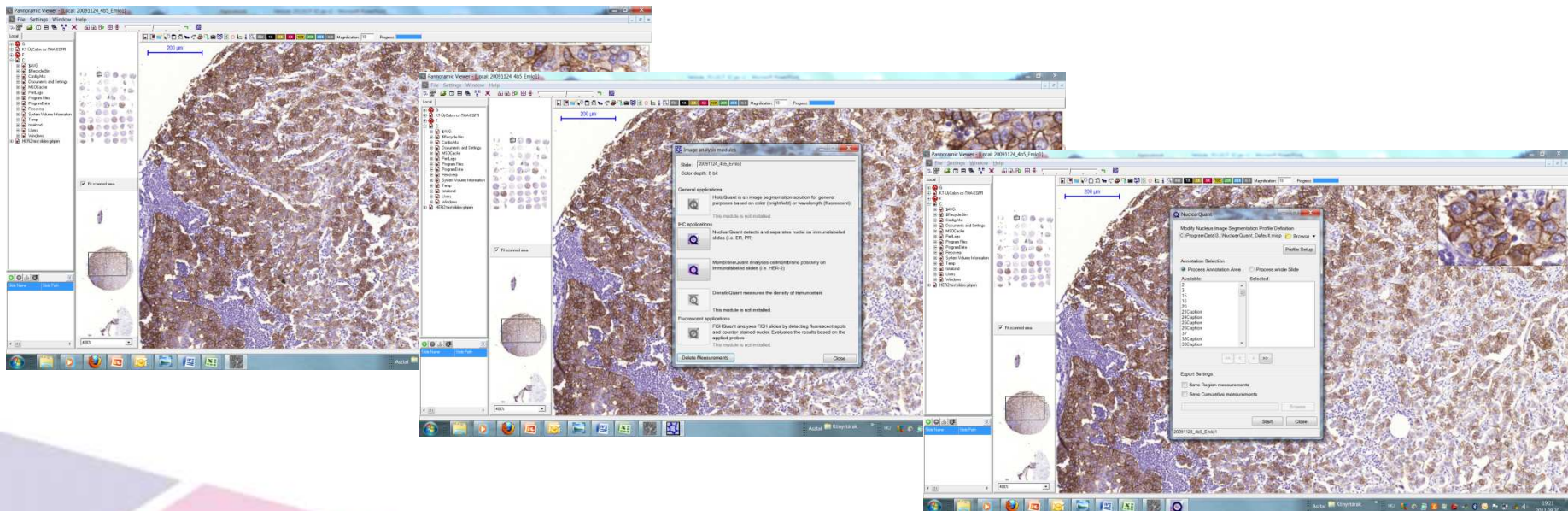


Tesztelt 3DHISTECH termékek

- ❖ *Pannoramic™ Scan*
- ❖ *Pannoramic™ Viewer*
- ❖ *NuclearQuant*
- ❖ *MembraneQuant*



Scan/150
Racks 6x50
BF+Fluor



Módszerek



Cél

- ❖ A szoftver effektívitasának kipróbálása ösztrogén és progeszteron receptor pozitivitás immunhisztokémiai meghatározásra emlőrákos esetekben
- ❖ Az algoritmus valós környezetben való kipróbálása
- ❖ Az automatizált és hagyományos semi-kvantitatív kiértékelés eredményének összehasonlítása

Módszerek

- 16 rutin ER (clone 6F11) és PgR (clone 1A6).IHC-festett metszeten
- Bond-max, Leica Microsystem's ER és PgR IHC
- score-olás: Allred score
- Kalibrációt KÖVETŐEN ekvivalencia vizsgálat



SEMELWEIS
UNIVERSITY

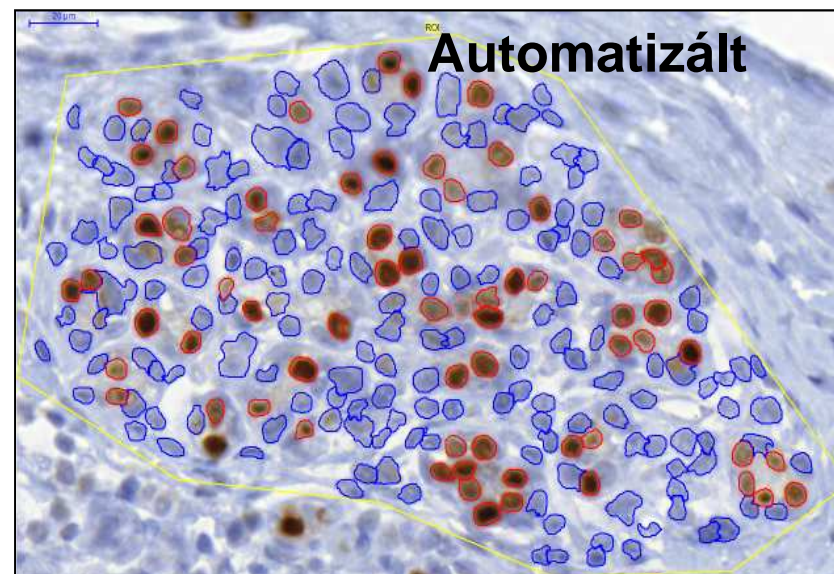
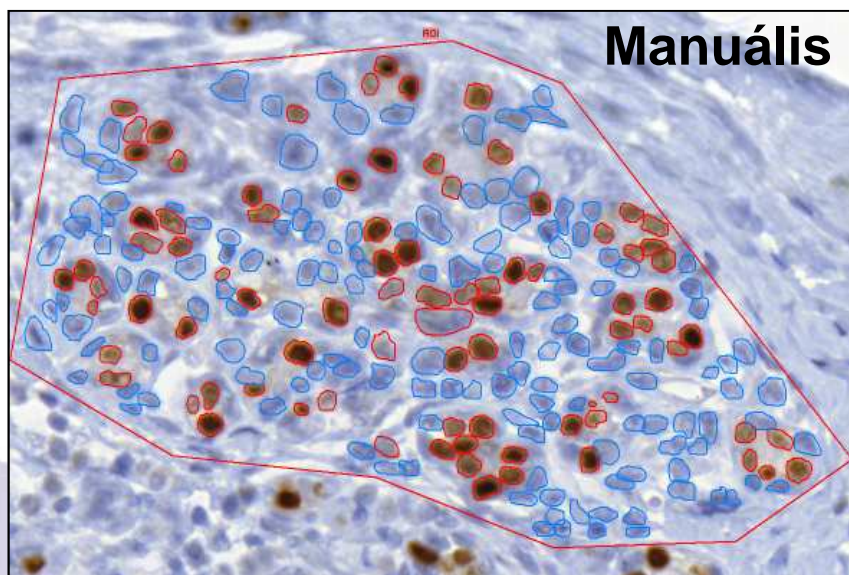


3DHISTECH

A detekció kalibrálása az Allred-score értékeihez

- 38 annotáció (átlag 195 sejt, intervallum 73-489 sejt)
- A sejtek manuális kijelölése
- Iteratív teszt-futásokkal a jó *.misp file definiálása

Eredmény: 87%-os effektivitású sejtdetekció



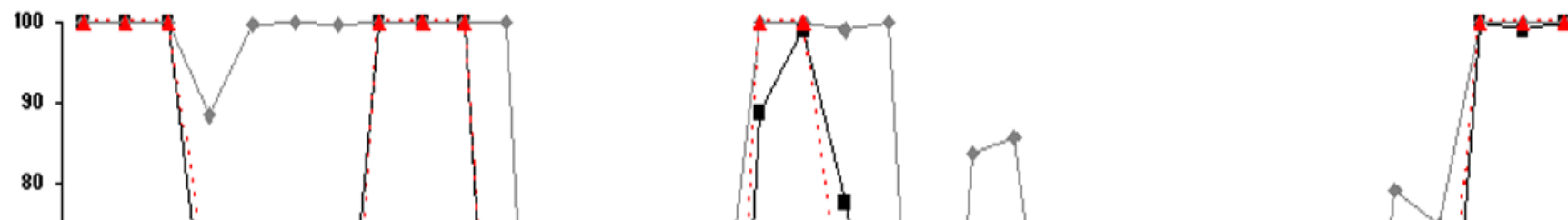
NuclearQuant kalibráció



SEMMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH



Patológus vs kalibrált *NuclearQuant* algoritmus

Szinte tökéletes egyezés

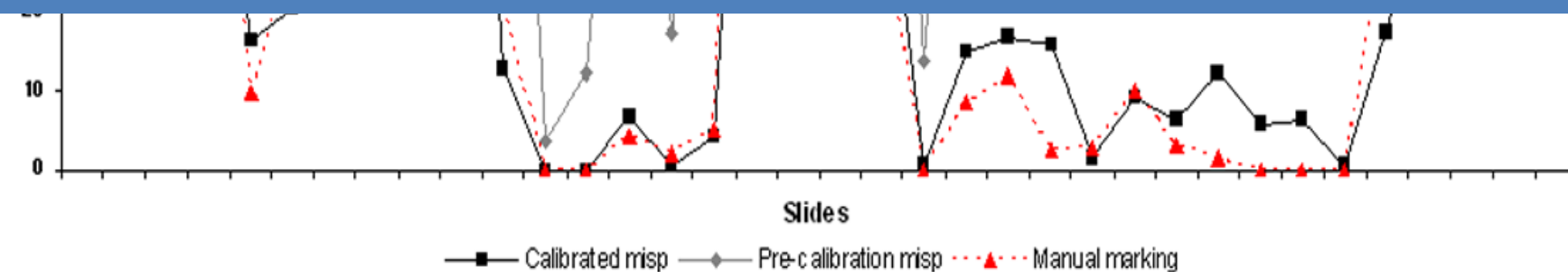
Cohen-féle kappa=0.859

Szinte tökéletes egyezés

Négyzetesen súlyozott kappa=0.986

Szignifikáns korreláció

Spearman-féle rho=0.953.



NuclearQuant kalibráció



SEMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH

Objektum detekció:



Detection Scoring

Nuclei Settings

Radius - μm

min Nuclei Area μm^2

min Circularity

Smooth

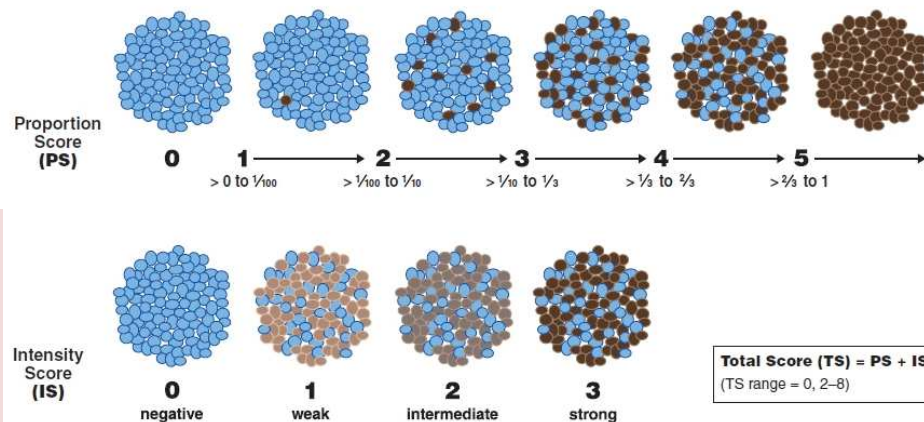
Separation

Image Settings

min Contrast

min Intensity

Score beállítások:



Detection Scoring

0 None of below

+1 Average Intensity <

+2 Average Intensity <

+3 Average Intensity <

NuclearQuant a gyakorlatban



SEMMELWEIS
UNIVERSITY

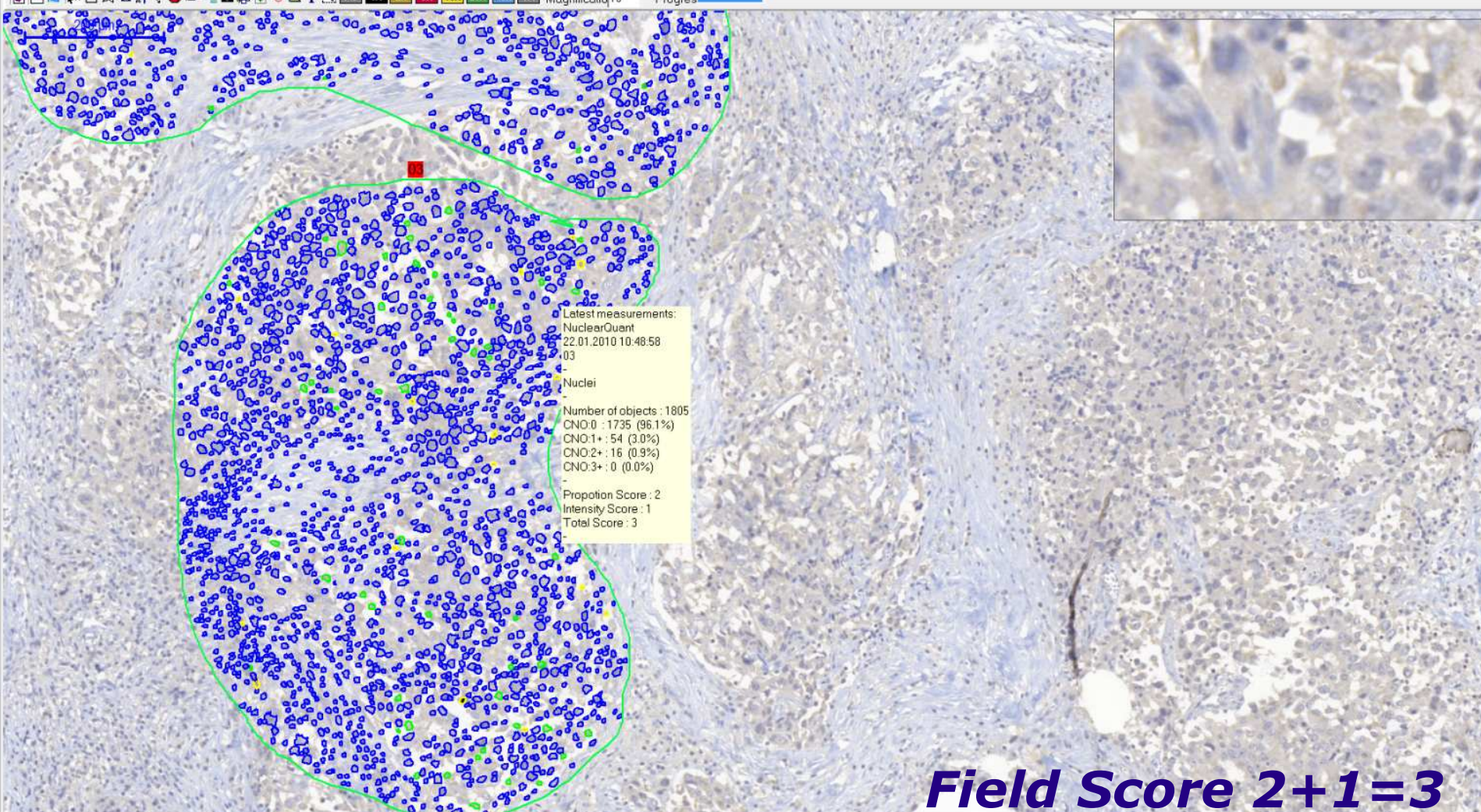


3DHISTECH

Local: B2007_03381_ESJ

File Edit View Help

Fit 1X 2X 5X 10X 20X 40X 1:1 Magnification: 10 Progress



Field Score 2+1=3



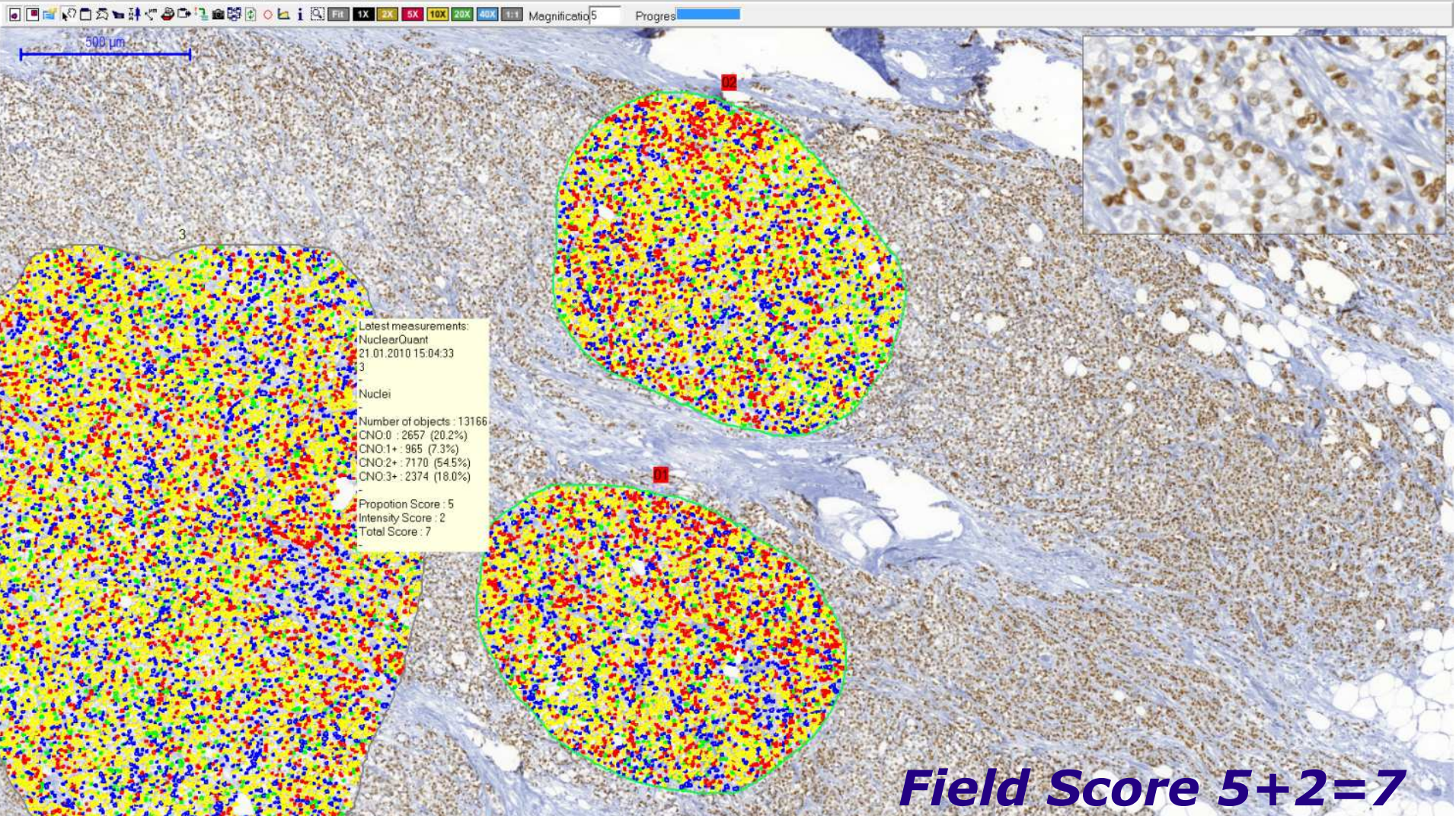
SEMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH

Local: B2007_02224_PR]

View Help





SEMMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH

Patológus vs kalibrált NuclearQuant

Krecsák et al. *Diagnostic Pathology* 2011, **6**:6
<http://www.diagnosticpathology.org/content/6/1/6>



DIAGNOSTIC PATHOLOGY

RESEARCH

Open Access

Technical note on the validation of a semi-automated image analysis software application for estrogen and progesterone receptor detection in breast cancer

László Krecsák¹, Tamás Micsik^{2*}, Gábor Kiszler³, Tibor Krenács², Dániel Szabó³, Viktor Jónás³, Gergely Császár⁴, László Czuni⁴, Péter Gurzó³, Levente Ficsor³, Béla Molnár^{3,5}



Cél

❖ Az automatizált és manuális membránpozitivitás kiértékelés eredményének összehasonlítása TMA-kon

- 31469 2mm-es core-ból fel

- 107 nőbeteg, 26-86 éves

- 126 primer IDC (2-4 core), 61 metastasis, 16 DCIS

- Összesen 207 tumor-minta core

- Veriana Pathway IFF 2 (neu) (4F clone)

- 2 Patológus ma iérték

- Majd core-onként 1-6 annotációt küldtünk

- Anél az eredeti kiértékelés ne gyezett ott a

- Well-characterised (Diagnosed)

(Diagnosed)

In situ Gene/Chrom. kópiaszám
Protein expresszió

ISH/FISH

IHC

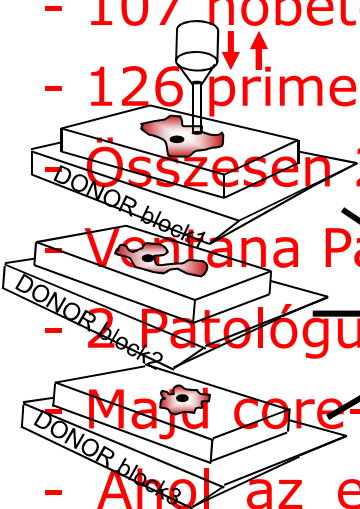
LŐNYÖK

HIGH THROUGHPUT

Megtakarítás

- Idő
- Szövet
- Reagens
- Munkaerő

• Standardizált IHC körülmények



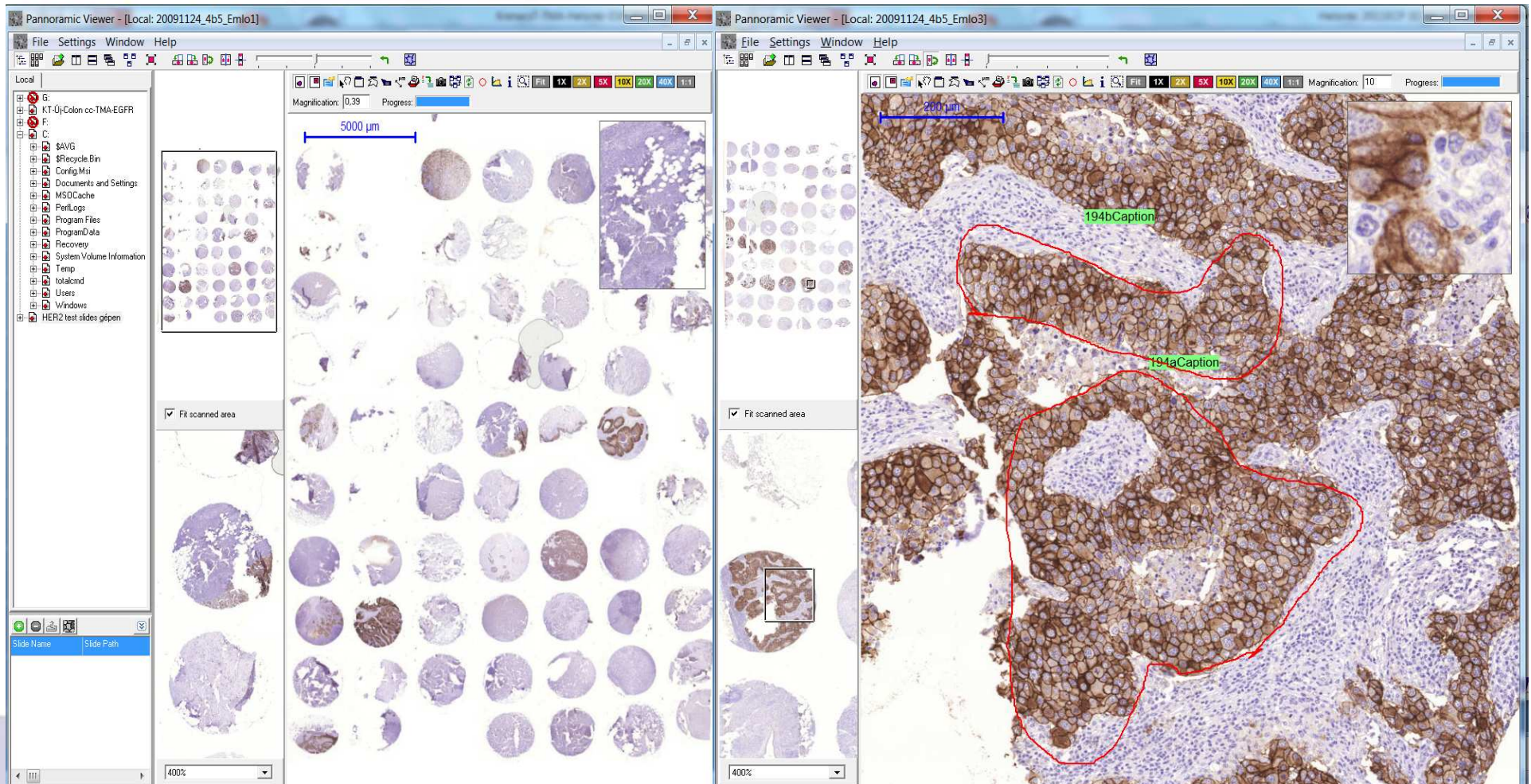
MembraneQuant validáció



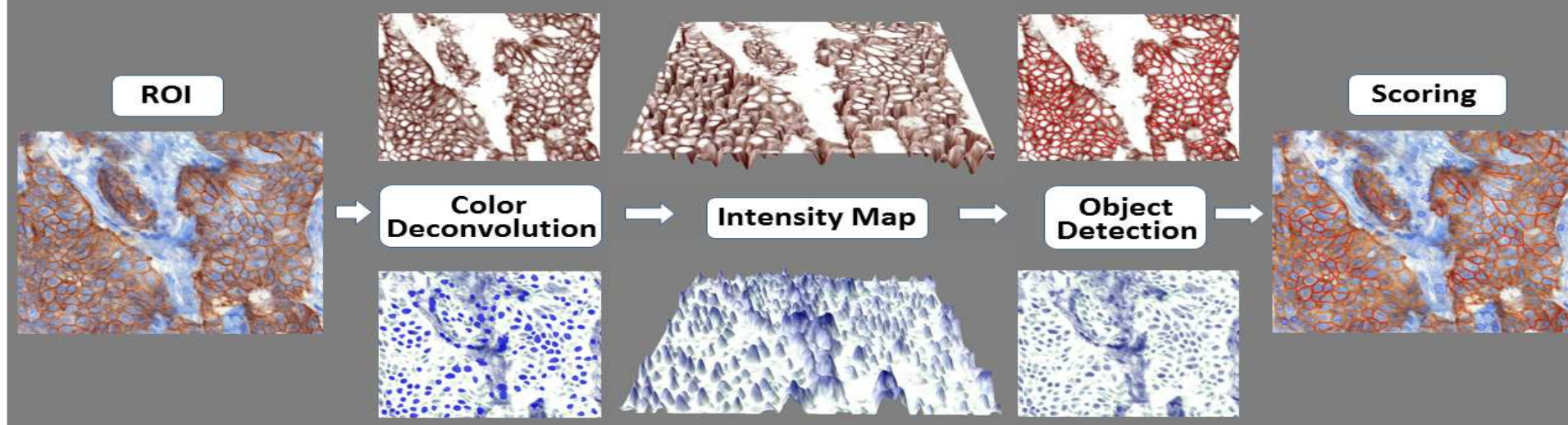
SEMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH



MembraneQuant validáció



❖ **DAB csatorna**

barna

sejtmembrán

❖ **Háttérfestés**

kék

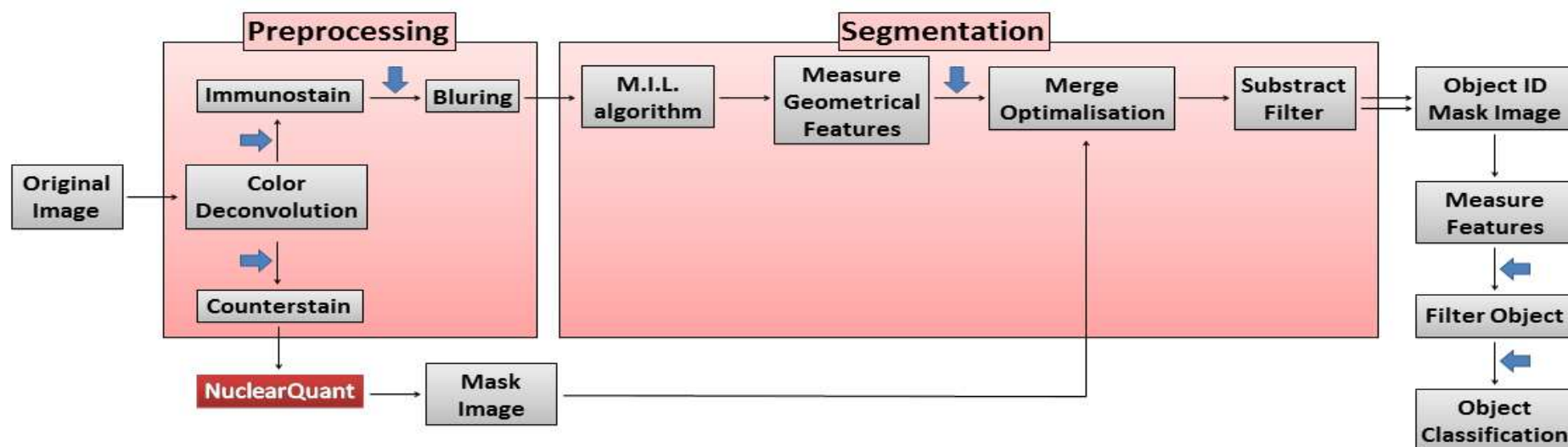
sejtmag

❖ A digitális képek élességét a szegmentációhoz kissé elmostuk

❖ A membránok mint lokális intenzitás maximumok/minimumok kerültek detektálásra az összekötött, majd a későbbiekben összeolvasztott pixel-görbéken

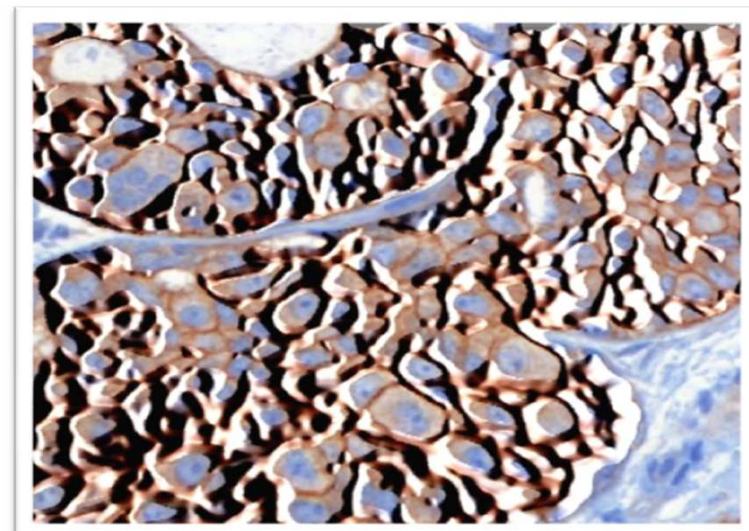
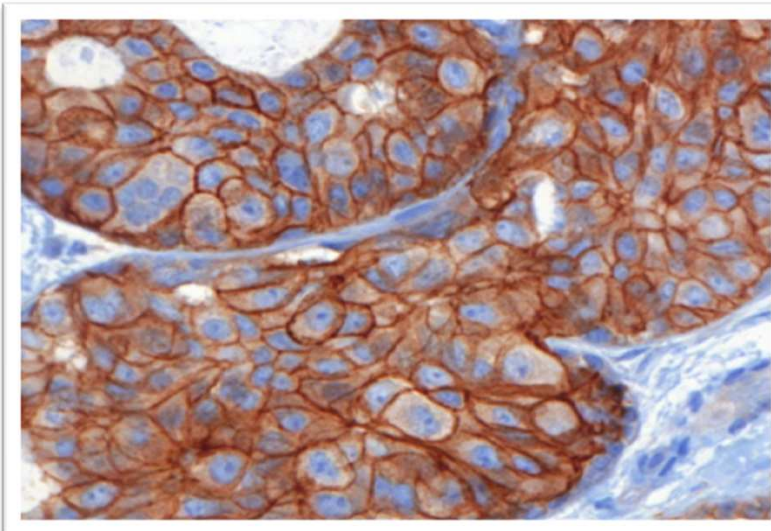
❖ Intenzitás-alapú topografikus térkép

Color dekonvolúció



- ❖ DAB csatorna barna sejtmembrán
- ❖ Háttérfestés kék sejtmag
- ❖ A digitális képek élességét a szegmentációhoz kissé elmostuk
- ❖ A membránok mint lokális intenzitás maximumok/minimumok kerültek detektálásra az összekötött, majd a későbbiekben összeolvasztott pixel-görbéken
- ❖ Intenzitás-alapú topografikus térkép

Color dekonvolúció



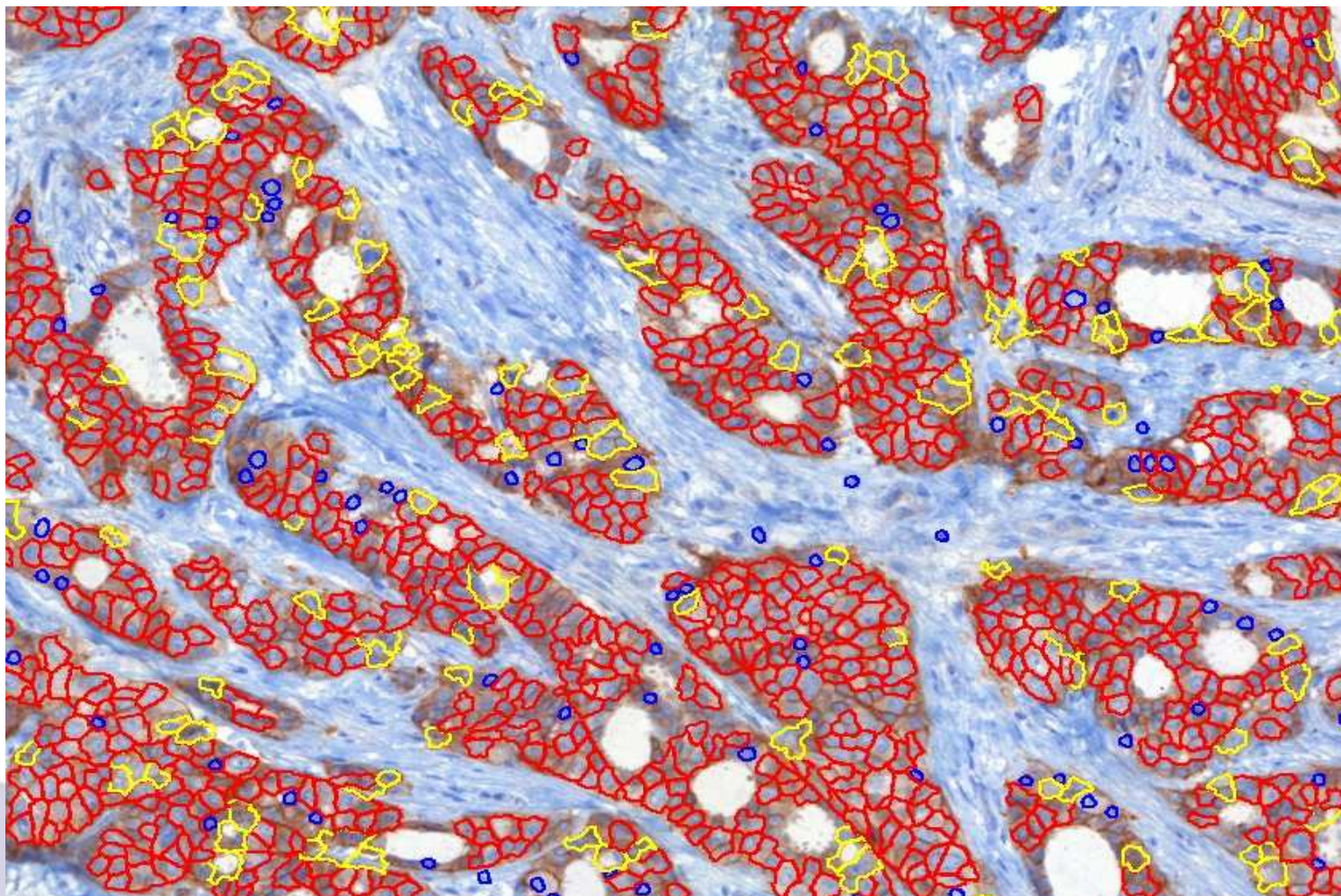
- ❖ DAB csatorna barna
- ❖ Háttérfestés kék
- ❖ A digitális képek élességét a szegmentációhoz kissé elmostuk
- ❖ A membránok mint lokális intenzitás maximumok/minimumok kerültek detektálásra az összekötött, majd a későbbiekben összeolvasztott pixel-görbéken
- ❖ **Intenzitás-alapú topografikus térkép** *Color dekonvolúció*







SEMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH



	0
	+1
	+2
	+3

Score-olás



SEMMELWEIS
UNIVERSITY



Pannoramic Viewer - [Local: 20091124_4b5_Eml01]

File Settings Window Help

Local

- G:
- KT-Új-Colon cc-TMA-EGFR
- F:
- C:
- \$AVG
- \$Recycle Bin
- Contig.Msi
- Documents and Settings
- MSDCache
- PerfLogs
- Program Files
- ProgramData
- Recovery
- System Volume Information
- Temp
- totalcmd
- Users
- Windows
- HER2 test slides gépen

200 µm

NuclearQuant

Modify Nucleus Image Segmentation Profile Definition
C:\ProgramData\3...NuclearQuant_Default.misp Browse

Profile Setup

Annotation Selection

Process Annotation Area Process whole Slide

Available:	Selected:
21Caption	2
24Caption	3
25Caption	15
26Caption	16
37	20
38Caption	
39Caption	
40Caption	
42Caption	
50Caption	
53Caption	
56Caption	

Export Settings

Save Region measurements
 Save Cumulative measurements Save to single CSV

Browse

Start Close

20091124_4b5_Eml01

Tallózás a mappák között

- BD-RE-meghajtó (E)
- Cserélhető lemez (F)
- Hálózat
- Vezérlőpult
- Lomtár
- 9040_2010
- boncképek
- ezh

Új mappa létrehozása OK Mégse

Slide Name Slide Path

400%

MembraneQuant modul



SEMMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH

100 μ m

17Caption

Latest measurements:
MembraneQuant
09.02.2010 19:16:11
17Caption
-
Membranes
Number of objects : 423
CNO:0 : 422 (99.8%)
CNO:1+ : 1 (0.2%)
CNO:2+ : 0 (0.0%)
CNO:3+ : 0 (0.0%)
-
HER2 Status (Field Score) : 0

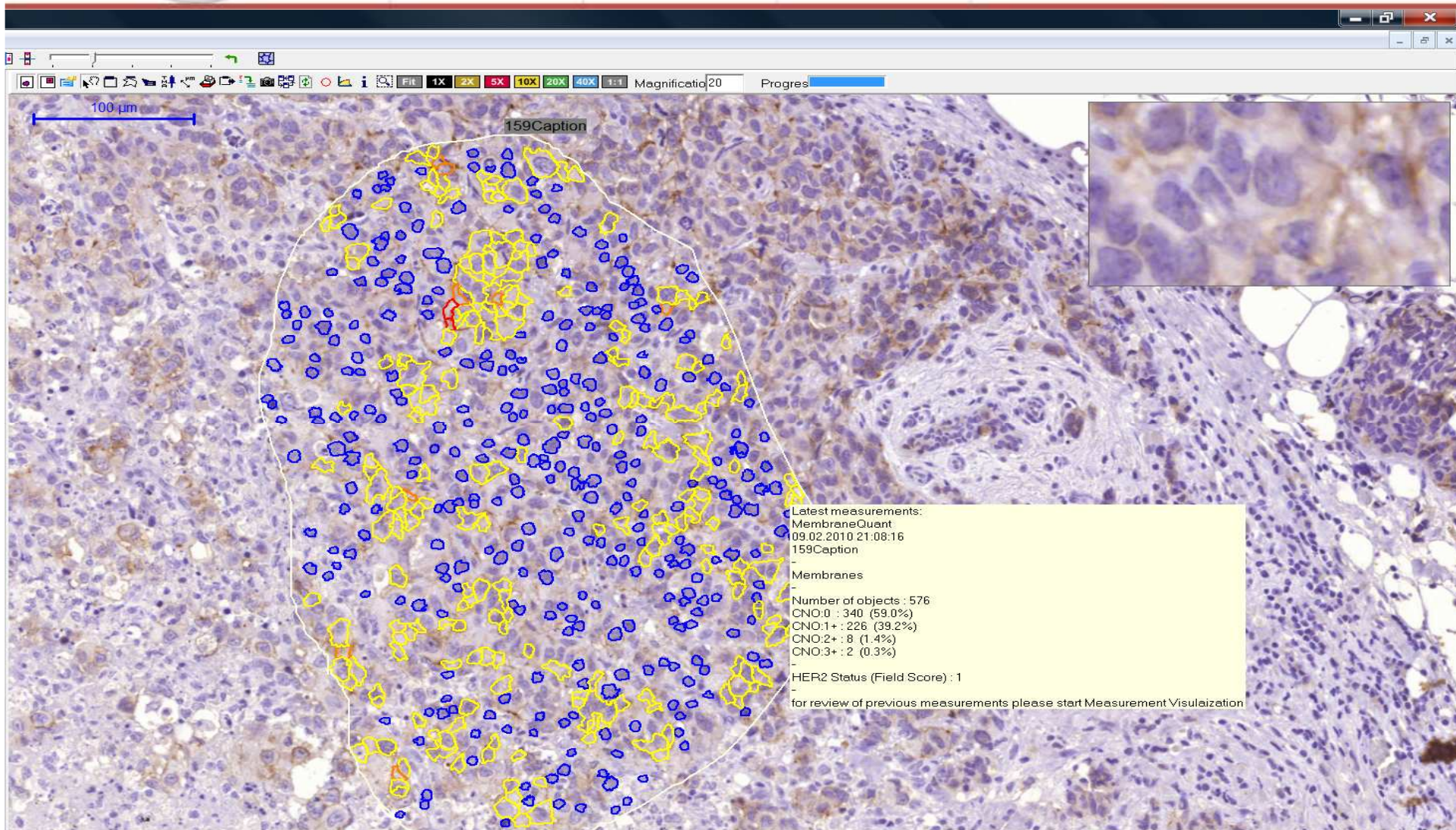
HER2 Score = 0



SEMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH



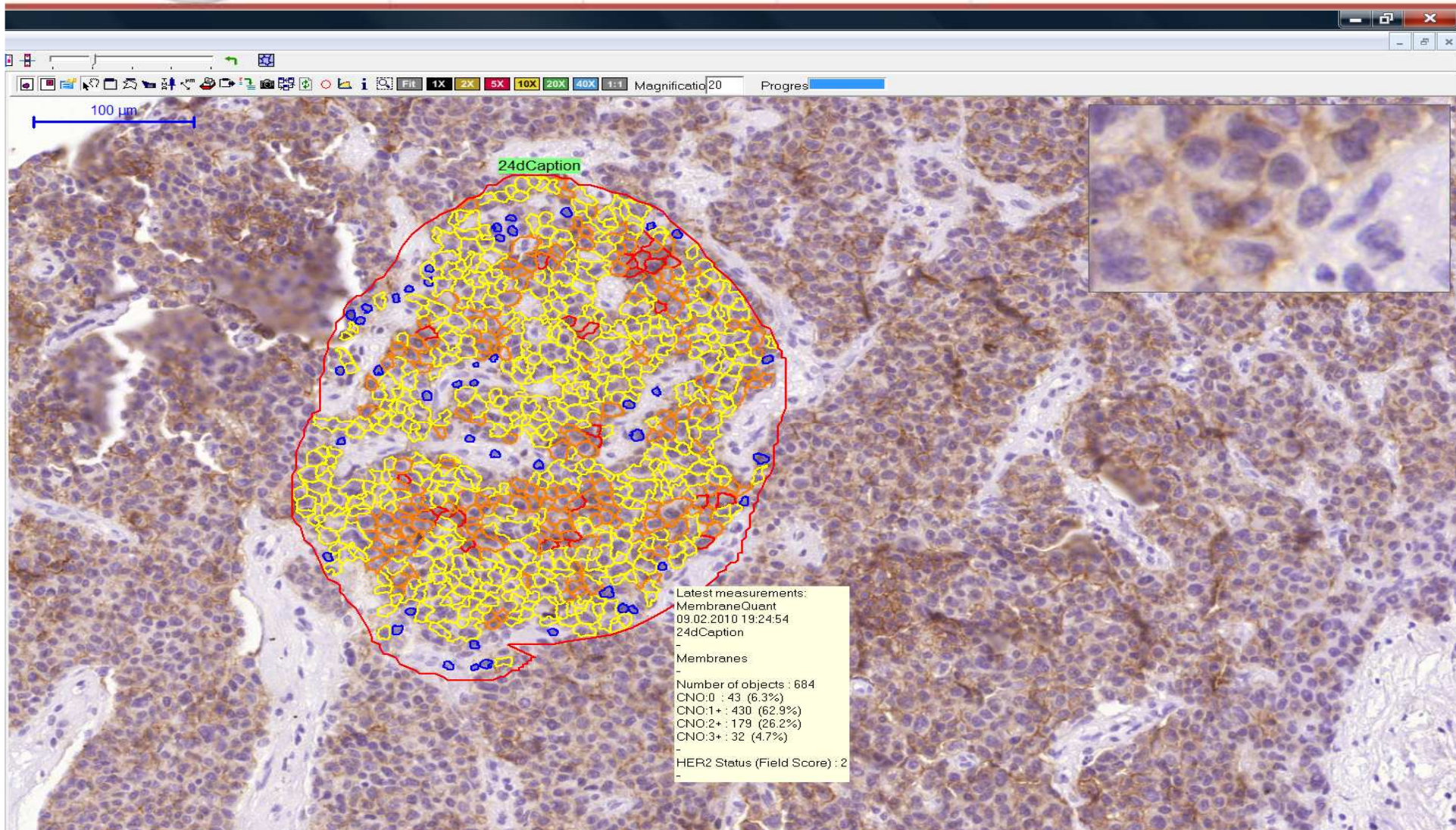
HER2 Score = 1+



SEMMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH



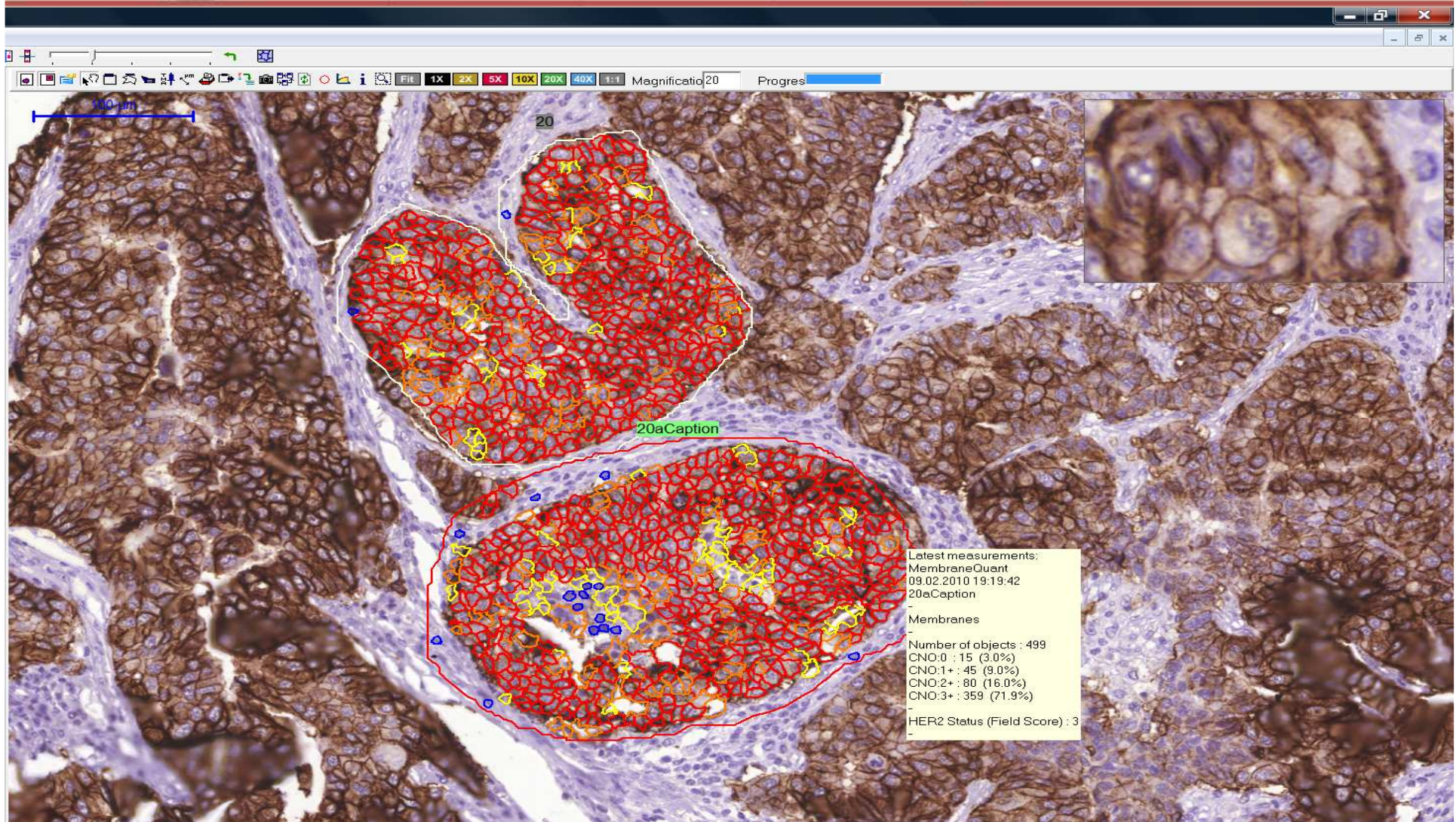
HER2 Score = 2+



SEMMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH



HER2 Score = 3+



- 12 metszeten elvégzett kalibrációt követően
- 171 core-t vizsgáltunk, 310-nél több annotáción
- átlagos sejtszám 379 (49-2414)

Variables	Cohen's κ	Quadratic weighted κ	Spearman's rho
Pathologist1 vs Pathologist2	0.940	0.981	0.973
Pathologist1 vs. Consensus	0.741	0.918	0.877
Pathologist2 vs. Consensus	0.717	0.909	0.856
MembraneQuant vs. Pathologist1	0.635	0.901	0.854
MembraneQuant vs. Pathologist2	0.629	0.896	0.833
MembraneQuant vs. Consensus	0.857	0.964	0.921

MembraneQuant ekvivalencia vizsgálat



MembraneQuant automatikus kiértékelésének eredménye

- Ha a DCIS eseteket kivesszük

Variables	Cohen's κ	Quadratic weighted κ	Spearman's rho
Pathologist1 vs Pathologist2	0.923	0.978	0.966
Pathologist1 vs. Consensus	0.735	0.931	0.890
Pathologist2 vs. Consensus	0.704	0.920	0.864
MembraneQuant vs. Pathologist1	0.635	0.906	0.864
MembraneQuant vs. Pathologist2	0.629	0.901	0.840
MembraneQuant vs. Consensus	0.868	0.970	0.937

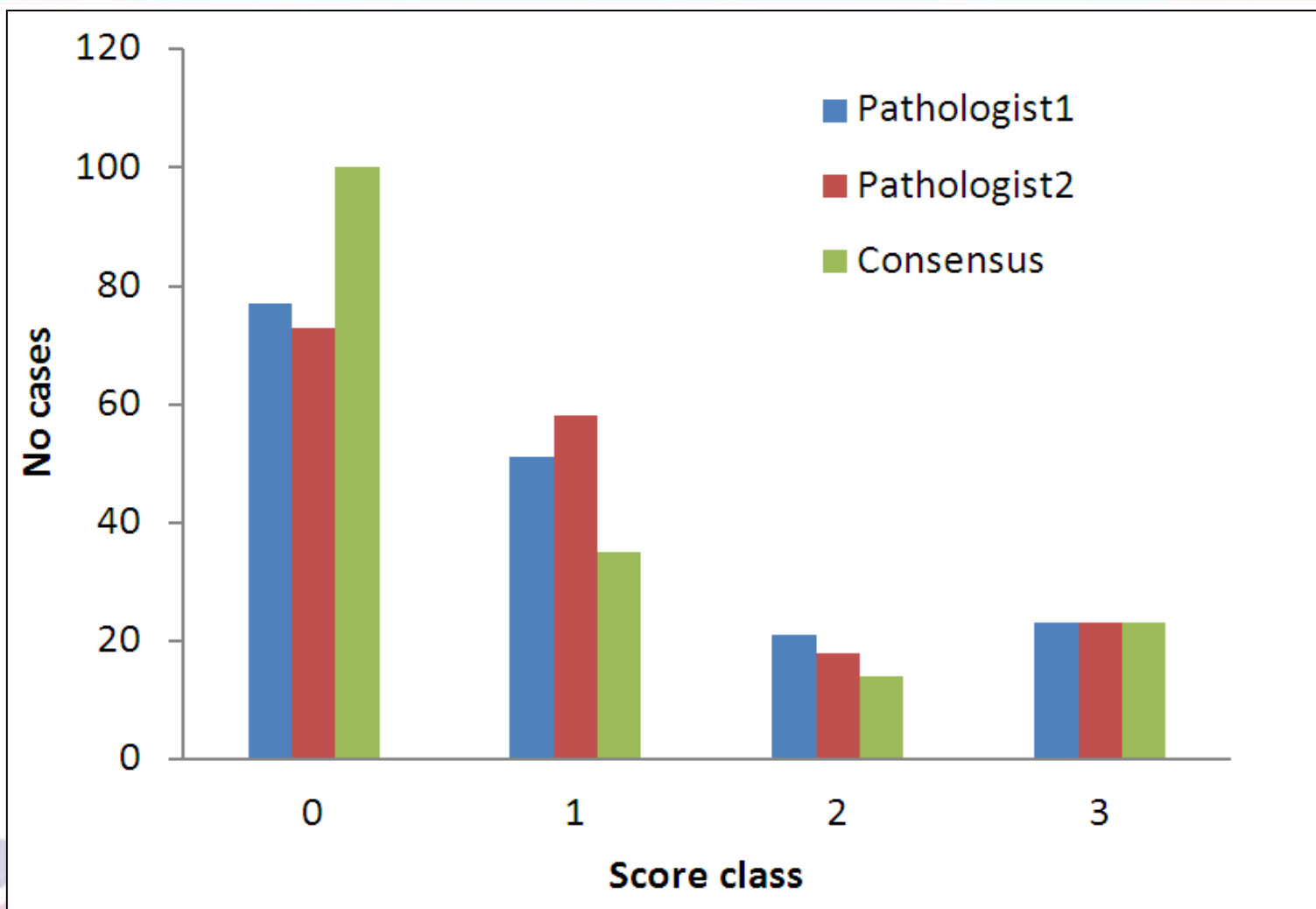
MembraneQuant ekvivalencia vizsgálat



**SEMELWEIS
UNIVERSITY**



3DHISTECH



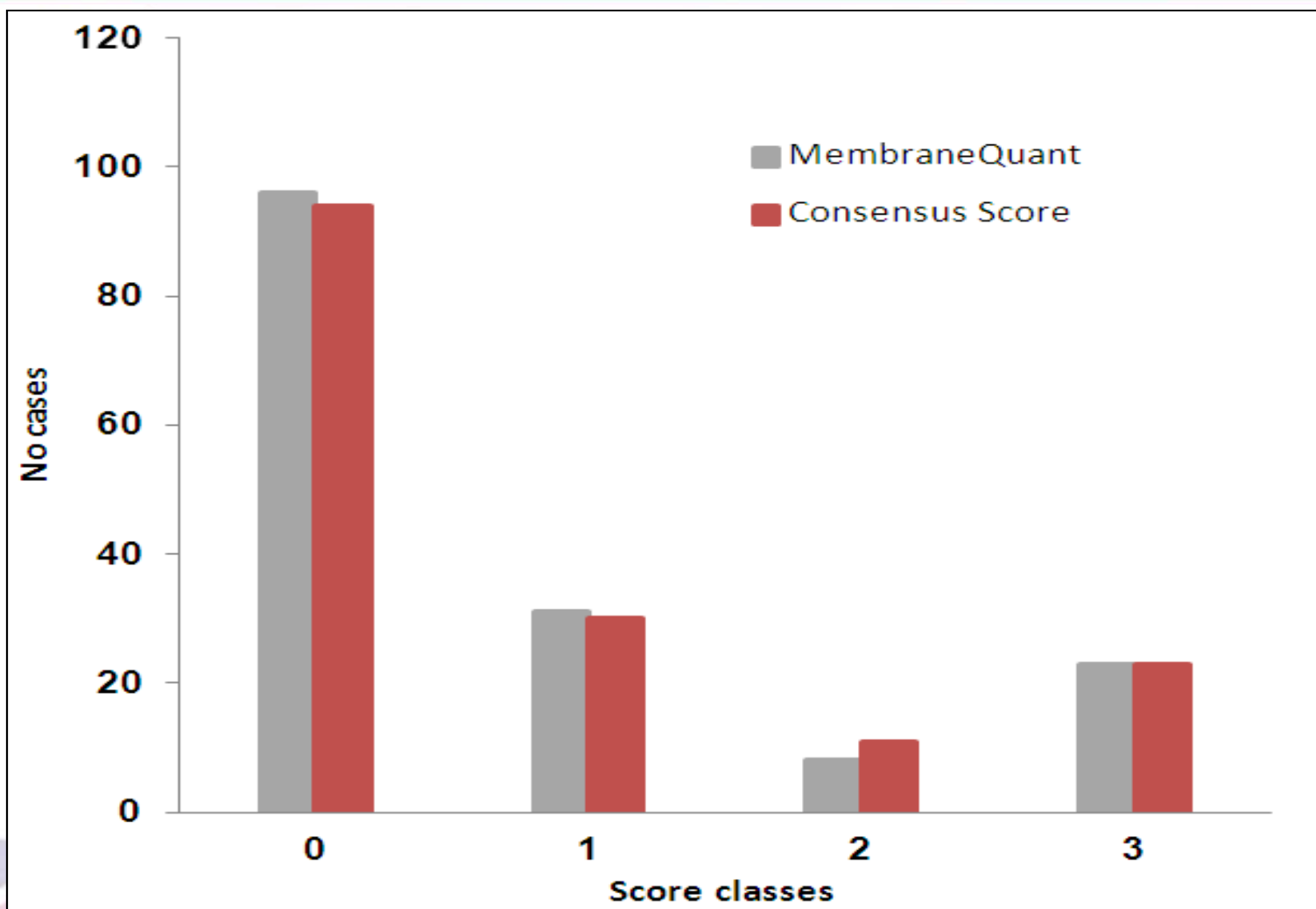
Esetek megoszlása



**SEMELWEIS
UNIVERSITY**



3DHISTECH



Esetek megoszlása



Multicentrikus, multinacionális, randomizált Klinikai vizsgálat

❖ Magyarországi és USA-beli helyszínen

❖ Validálandó eszközök:

❖ *Pannoramic*TM szkennerek

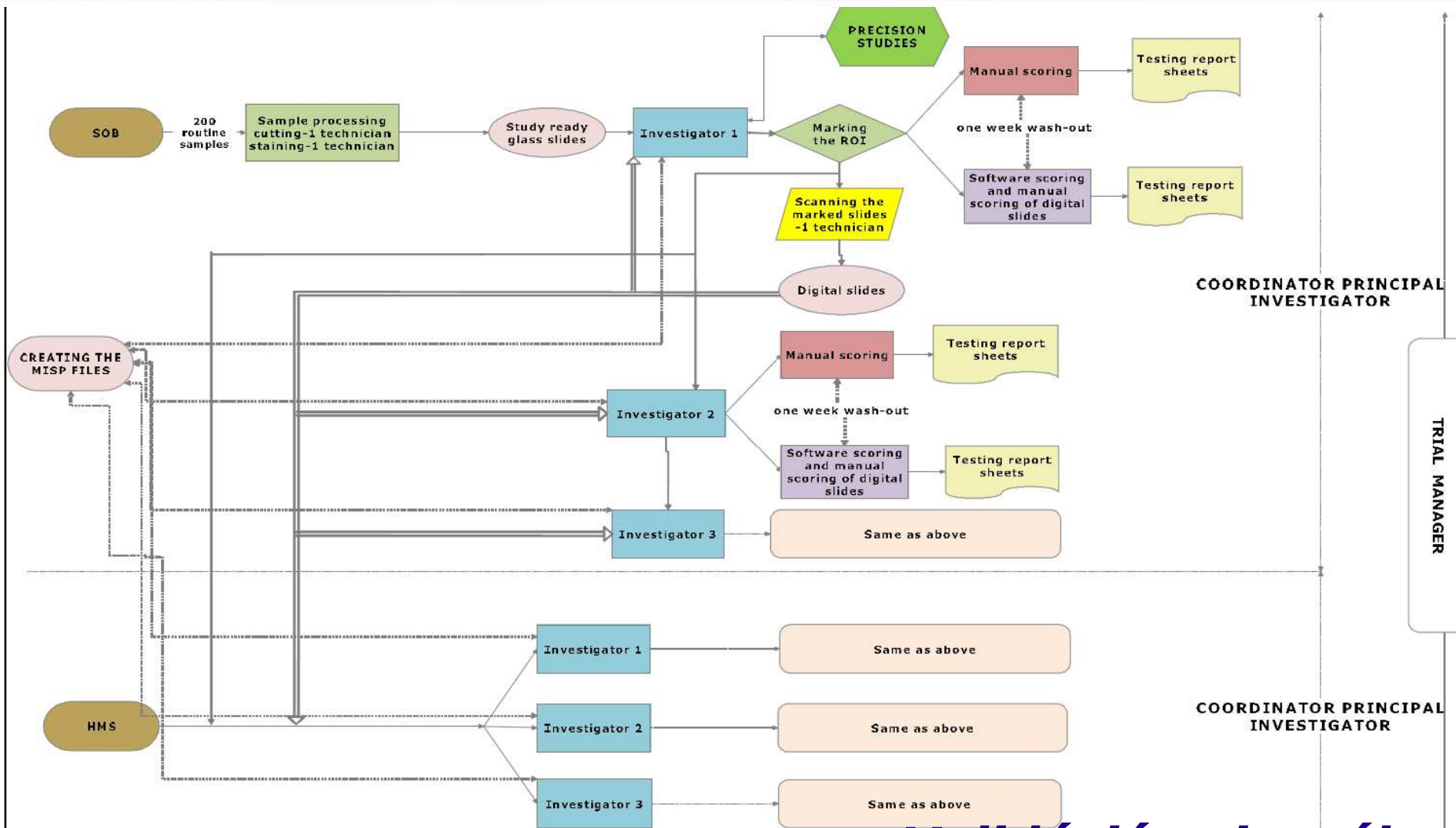
❖ Pannoramic Viewer

❖ *NuclearQuant*

❖ *MembraneQuant*

- CE megjelölés és FDA 510(k) bejegyzés

Validációs vizsgálat

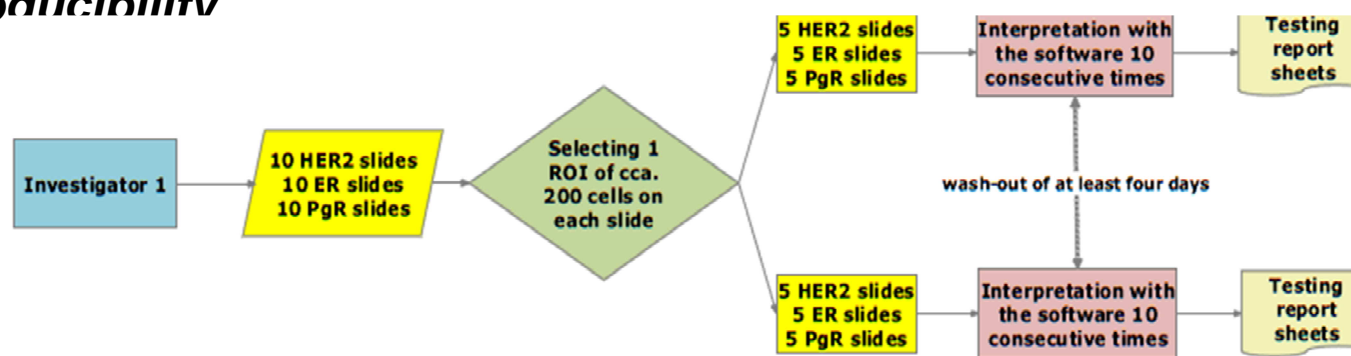


Validációs vizsgálat

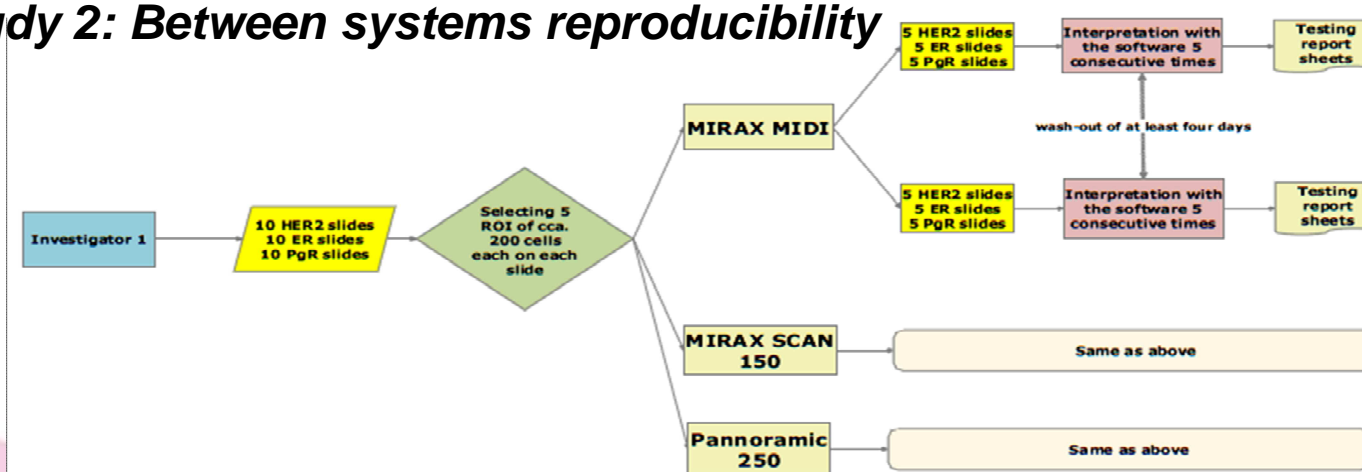


XIV.1. Accuracy testing (Comparison to Manual Method)

XIV.2. Precision Study 1: Within-system within-run, and within-system between-runs reproducibility



XIV.3. Precision Study 2: Between systems reproducibility



Precizió és pontosság tesztelése



**SEMELWEIS
UNIVERSITY**



Membranes_Cumulative Mamma szumTMA 4B5 - Microsoft Excel

Kezdőlap Beszűrés Lap elrendezése Képletek Adatok Korrekktúra Nézet

Beillesztés Kivágás Másolás Formátummásoló Vágólap

Calibri 11

Stílusok: Normál, Jó, Rossz, Semleges

Cellák: Beszűrés, Törés, Formátum

Szerkesztés: AutoSzum, Kitérés, Törés, Rendezés és szűrés, Keresés és kijelölés

	A	B	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	
1	Slide Path	Annotator	Slide Path	Annotator	FA	MA	NO	rMA	fNO	LO_Hscore	LO_rNO	LO_rMAPo	LO_CNO:0	LO_CNO:1	LO_CNO:2	LO_CNO:3	LO_CMA:0	LO_CMA:1	LO_CMA:2	LO_CMA:3	LO_FieldScore		
326	C:\Users\u 159aCapti	C:\Users\u 159aCapti	1,40E-01	1,35E-02	271	9,65E+00	1,93E+03	39,1144	37,2694	58,8594	170	96	5	0	5564,39	7574,52	386,394	0	0	0	1		
327	C:\Users\u 160Captio	C:\Users\u 160Captio	1,68E-01	2,14E-02	655	1,28E+01	3,91E+03	0	0	0	655	0	0	0	21384	0	0	0	0	0	0	0	
328	C:\Users\u 160aCapti	C:\Users\u 160aCapti	1,13E-01	1,28E-02	397	1,13E+01	3,51E+03	0	0	0	397	0	0	0	12795	0	0	0	0	0	0	0	
329	C:\Users\u 161Captio	C:\Users\u 161Captio	1,38E-01	7,61E-03	225	5,51E+00	1,63E+03	0	0	0	225	0	0	0	7609,34	0	0	0	0	0	0	0	
330	C:\Users\u 162Captio	C:\Users\u 162Captio	7,91E-02	1,10E-02	282	1,39E+01	3,57E+03	0	0	0	282	0	0	0	10965,1	0	0	0	0	0	0	0	
331	C:\Users\u 162aCapti	C:\Users\u 162aCapti	1,54E-01	1,54E-02	443	1,00E+01	2,87E+03	0	0	0	443	0	0	0	15441,3	0	0	0	0	0	0	0	
332	C:\Users\u 163aCapti	C:\Users\u 163aCapti	2,66E-01	1,31E-01	1181	4,92E+01	4,44E+03	139,627	87,6376	96,0735	146	544	368	123	5145,02	67658,9	46501,7	11727,1	0	0	0	2	
333	C:\Users\u 164aCapti	C:\Users\u 164aCapti	1,05E-01	5,98E-02	468	5,69E+01	4,45E+03	155,983	97,8632	99,5064	10	237	170	51	295,363	27364,6	25553,3	6620	0	0	0	2	
334	C:\Users\u 164bCapti	C:\Users\u 164bCapti	1,55E-01	7,65E-02	634	4,94E+01	4,09E+03	170,505	97,1609	99,1489	18	254	259	103	651,216	25490,8	38817,1	11553,6	0	0	0	2	
335	C:\Users\u 164cCapti	C:\Users\u 164cCapti	1,91E-01	9,13E-02	855	4,77E+01	4,17E+03	106,433	79,7661	93,7427	173	469	198	15	5715,53	59271	25473,5	881,279	0	0	0	2	
336	C:\Users\u 165Captio	C:\Users\u 165Captio	2,43E-01	1,76E-02	251	7,23E+00	1,03E+03	83,2669	79,6813	90,1197	51	192	7	1	1738,77	15364,5	437,153	57,8942	0	0	0	1	
337	C:\Users\u 167aCapti	C:\Users\u 167aCapti	1,41E-01	1,19E-02	390	8,43E+00	2,77E+03	0	0	0	390	0	0	0	11875,7	0	0	0	0	0	0	0	
338	C:\Users\u 168aCapti	C:\Users\u 168aCapti	1,10E-01	1,82E-02	461	1,64E+01	4,17E+03	0,8677	0,8677	1,3454	457	4	0	0	17923,9	244,442	0	0	0	0	0	0	
339	C:\Users\u 168bCapti	C:\Users\u 168bCapti	9,76E-02	1,33E-02	329	1,36E+01	3,37E+03	0,6079	0,6079	0,8881	327	2	0	0	13199,5	118,275	0	0	0	0	0	0	
340	C:\Users\u 169aCapti	C:\Users\u 169aCapti	1,22E-01	6,33E-02	726	5,17E+01	5,93E+03	227,824	99,0358	99,6444	7	131	241	347	225,036	10270,2	21602,6	31177,9	0	0	0	3	
341	C:\Users\u 169bCapti	C:\Users\u 169bCapti	1,17E-01	8,42E-02	937	7,19E+01	8,01E+03	223,693	99,4664	99,8178	5	159	382	391	153,304	12443,7	35936,4	35620,1	0	0	0	3	
342	C:\Users\u 170Captio	C:\Users\u 170Captio	2,27E-01	1,44E-02	423	6,36E+00	1,86E+03	0	0	0	423	0	0	0	14447	0	0	0	0	0	0	0	
343	C:\Users\u 171Captio	C:\Users\u 171Captio	1,28E-01	3,40E-03	103	2,66E+00	8,08E+02	0	0	0	103	0	0	0	3398,35	0	0	0	0	0	0	0	
344	C:\Users\u 171aCapti	C:\Users\u 171aCapti	2,00E-01	3,65E-03	115	1,82E+00	5,74E+02	0	0	0	115	0	0	0	3649,23	0	0	0	0	0	0	0	
345	C:\Users\u 172Captio	C:\Users\u 172Captio	2,08E-01	6,20E-03	184	2,98E+00	8,85E+02	0	0	0	184	0	0	0	6199,98	0	0	0	0	0	0	0	
346	C:\Users\u 176aCapti	C:\Users\u 176aCapti	1,81E-01	1,03E-01	1221	5,66E+01	6,73E+03	238,575	92,3833	95,4322	93	128	215	785	4690,03	11934,9	21132,4	64918	0	0	0	3	
347	C:\Users\u 177aCapti	C:\Users\u 177aCapti	1,57E-01	9,61E-02	1242	6,12E+01	7,91E+03	254,187	96,2158	98,5593	47	130	168	897	1384,49	11704,2	13319,2	69690,9	0	0	0	3	
348	C:\Users\u 178aCapti	C:\Users\u 178aCapti	2,14E-01	1,48E-01	1823	6,94E+01	8,53E+03	229,018	99,1772	99,7341	15	450	349	1009	394,557	39248,2	29873,3	78866,7	0	0	0	3	
349	C:\Users\u 179aCapti	C:\Users\u 179aCapti	1,63E-01	2,14E-03	76	1,31E+00	4,66E+02	0	0	0	76	0	0	0	2136,84	0	0	0	0	0	0	0	
350	C:\Users\u 179bCapti	C:\Users\u 179bCapti	1,63E-01	2,98E-03	99	1,83E+00	6,07E+02	3,0303	3,0303	4,6127	96	3	0	0	2840,44	137,357	0	0	0	0	0	0	
351	C:\Users\u 180_Area	C:\Users\u 180_Area	1,76E-01	8,65E-04	24	4,91E-01	1,36E+02	4,1667	4,1667	13,2438	23	1	0	0	750,355	114,545	0	0	0	0	0	0	
352	C:\Users\u 182Captio	C:\Users\u 182Captio	2,70E-01	9,50E-03	272	3,52E+00	1,01E+03	1,1029	0,3676	0,6844	271	0	0	1	9436,38	0	0	65,0297	0	0	0	0	
353	C:\Users\u 182aCapti	C:\Users\u 182aCapti	2,58E-01	8,68E-03	251	3,36E+00	9,71E+02	0	0	0	251	0	0	0	8680,62	0	0	0	0	0	0	0	
354	C:\Users\u 183Captio	C:\Users\u 183Captio	2,97E-01	7,32E-03	214	2,47E+00	7,21E+02	0	0	0	214	0	0	0	7323,65	0	0	0	0	0	0	0	

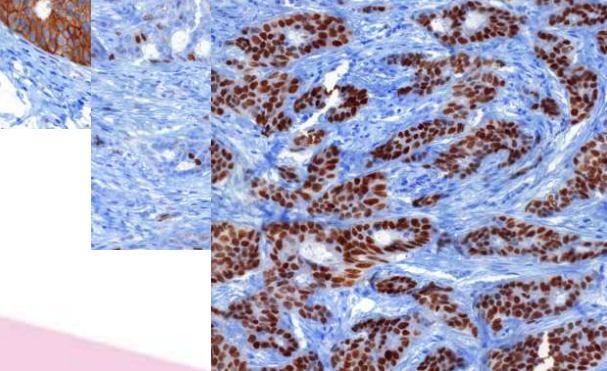
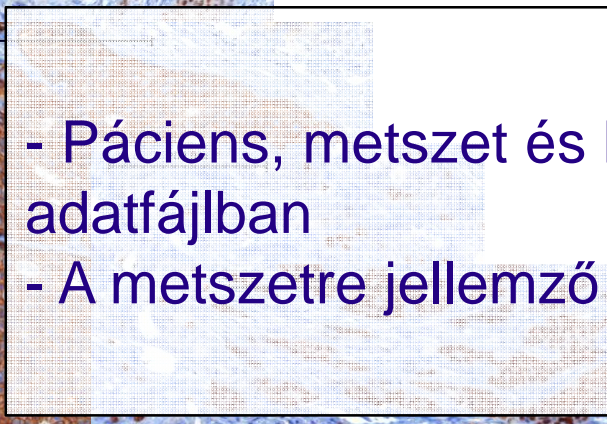
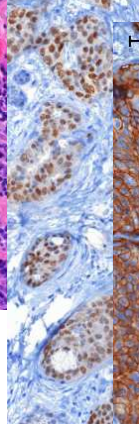
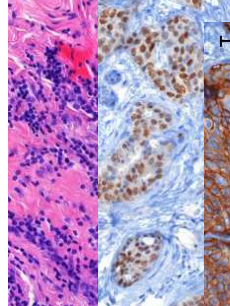
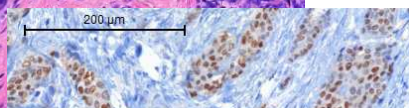
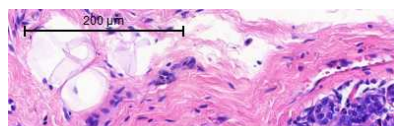
Adat extrakció, processzálás, mögöttes tartalom...



SEMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH



- Páciens, metszet és kiértékelés adatai egy adatfájlban
- A metszetre jellemző képek inkorporálása

Surgical report



3DHISTECH LTD.
Könczlye Thöge Str. 29-33.
H-1121 Budapest Hungary

Patient name:	Anna Kovács	Date of Birth:	10.11.1948
Sex:	female	Race:	eur.
Patient ID:	122425	Case number:	425111
Requester:	Dr. Tibor Tóth		

Block ID:	1231232	Procedure:	biopsy	Final Score	Her2 pos.
-----------	---------	------------	--------	-------------	-----------

Slide ID	Staining	Comment
10301-07_KI-67_I	KI-67	
10301-07_PR_I	PR	

Slide ID	Staining	Comment	Score
10301-07_KI-67_I	KI-67		8
10301-07_PR_I	PR		3

Slide ID	Staining	Comment	Score
10301-07_KI-67_I	KI-67		5

Slide ID	Staining	Comment	Score
10301-07_KI-67_I	KI-67		5

Slide ID	Staining	Comment	Score
10301-07_PR_I	PR		8

Diagnosis:

Inv. Her2 pos. Carc.

2010.06.29 15:47:30

Dr. Imre Horváth

...Jegyzőkönyv...

data-exportation facilities for further statistical analysis (excel or CVS-files).

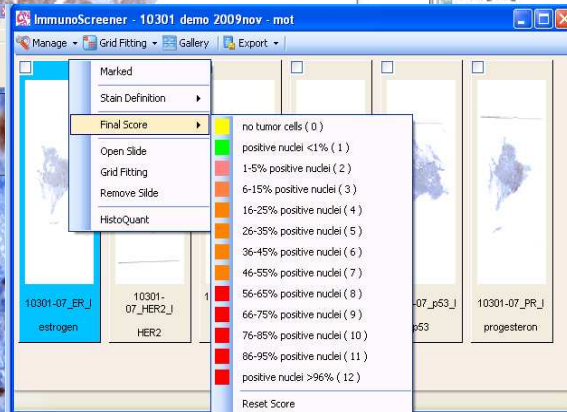
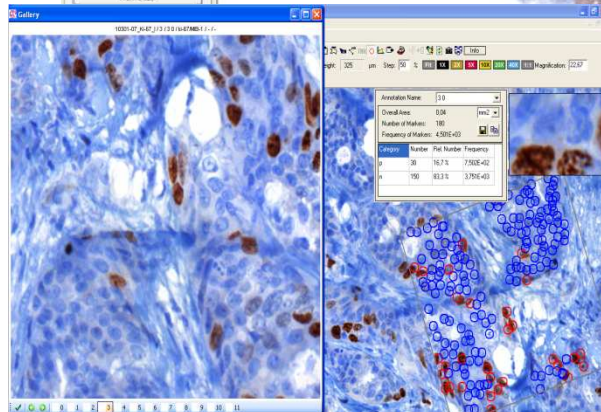
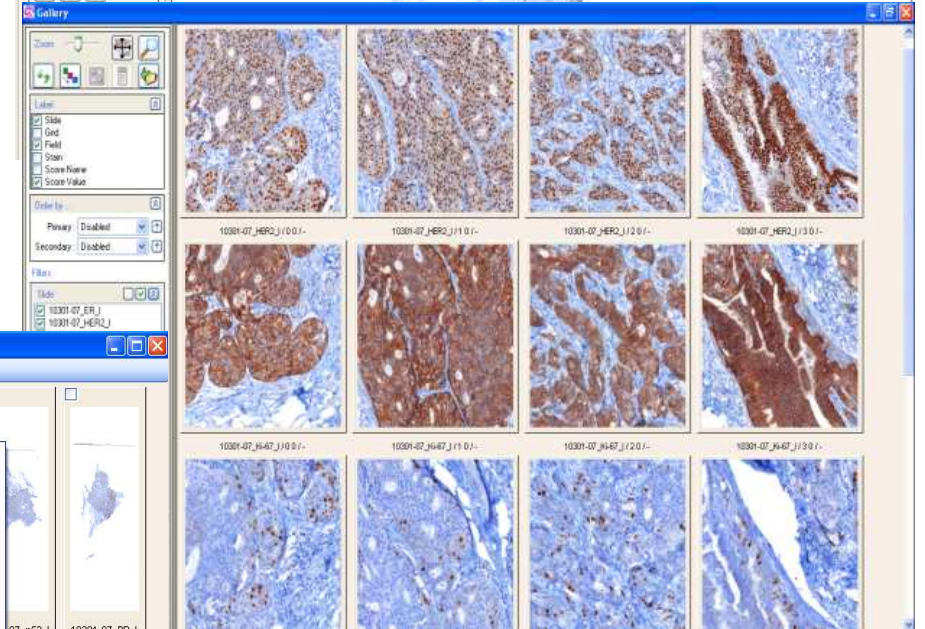
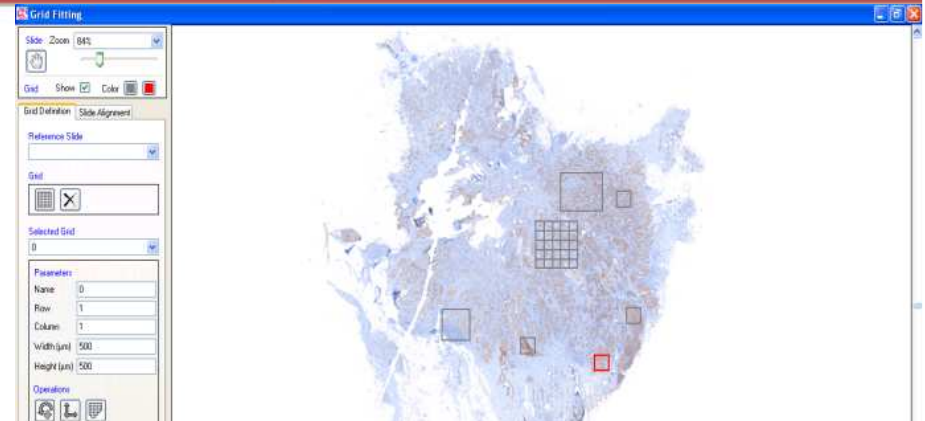
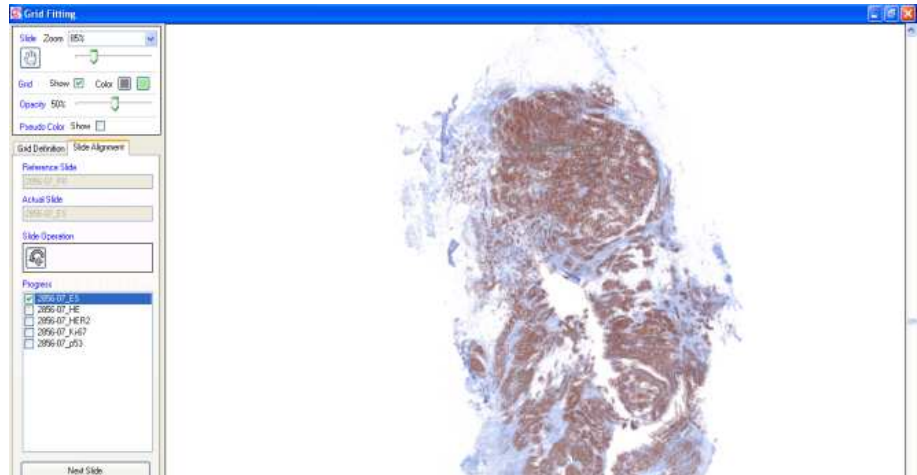


**SEMMELWEIS
UNIVERSITY**



3DHISTECH

- ❖ DensitoQuant
- ❖ HistoQuant
- ❖ Immunoscreener



Egyéb lehetőségek...



- **Sikeresen validáltuk a NuclearQuant és MembraneQuant applikációkat az IHC reakciók magi- és membránpozitivitás kiértékelésére emlőrák esetében.**
- **Validációnk során a gyárilag, a szakmai protokolloknak megfelelően beállított küszöbértékeket használtuk, de a program szabadon hangolható bármilyen algoritmusra és a kapott adatokat exportálva, standardizálva, statisztikailag további módszerekkel is feldolgozhatjuk.**
- **A NuclearQuant és MembraneQuant applikációk olyan archiváló, dokumentáló és standarizáló eszközökként használhatóak, melyek tökéletesíthetik az immunhisztokémiai kiértékelés és így a prediktív patológia eszköztárát.**

Konklúzió



SEMELWEIS
UNIVERSITY



3DHISTECH

**Köszönöm a
figyelmet!**

**.misp*

metszetek

metszetek

metszetek

metszetek

PÉLDA a hatásosság standardizálására