

Kvantitatív immunhisztokémia a patológiában

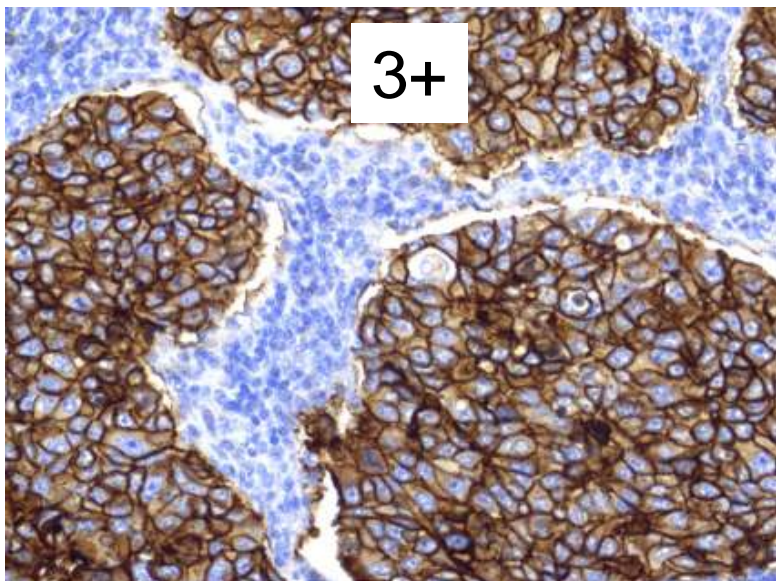
Krenács Tibor

Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és
Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

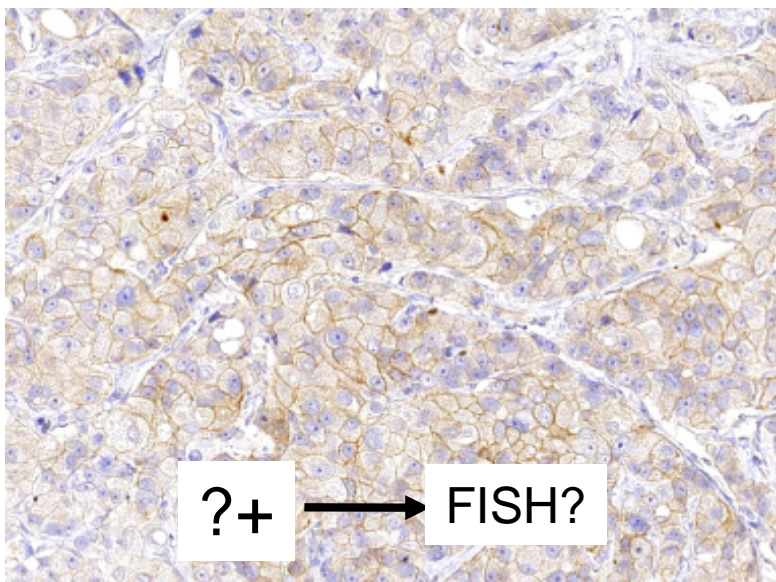
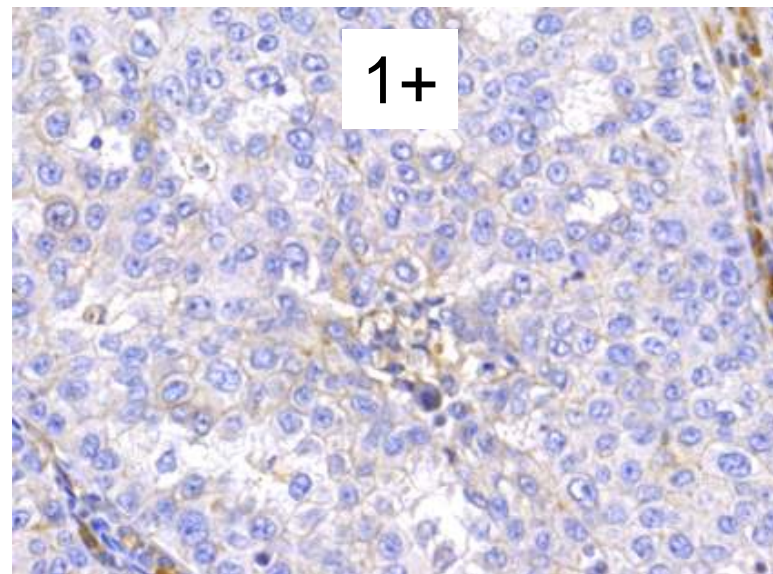


MPT Kongresszus
Siófok, 2013. szeptember 26-28.

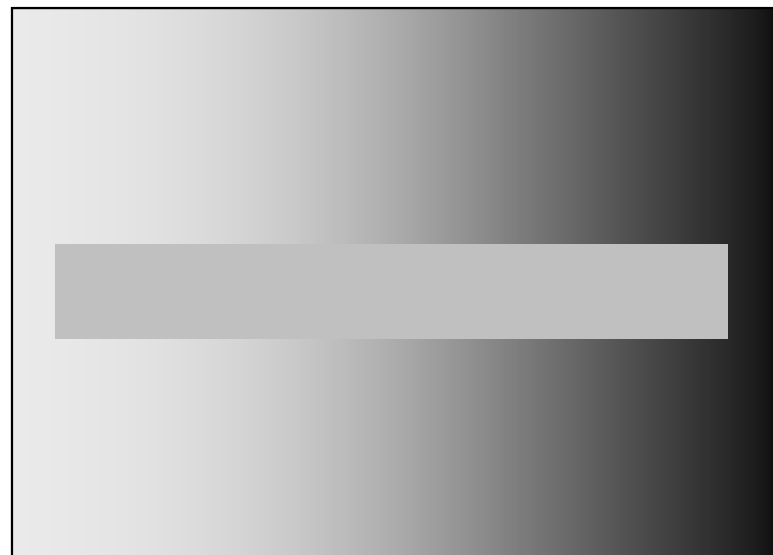
„Kvantitatív” Patológia – Célzott terápia



HER2
IHC



Szubjektívitás

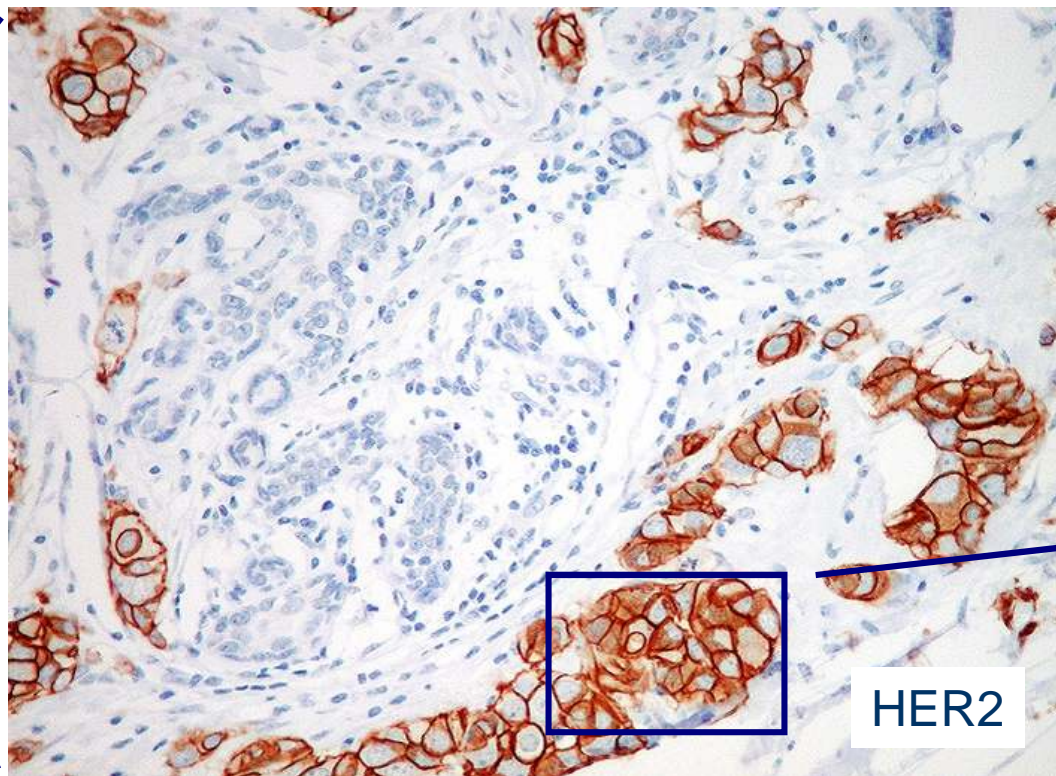
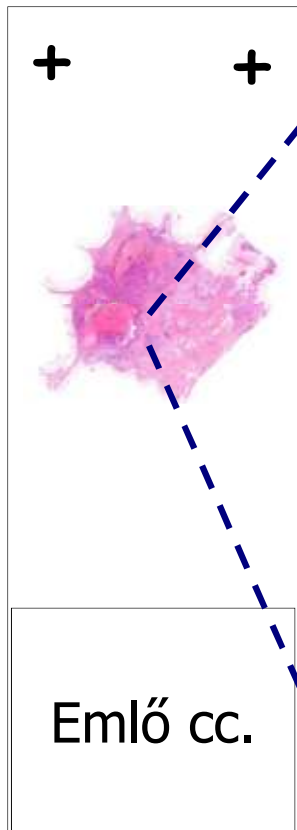


Morfológia – struktúrába rendezett expressziós profil

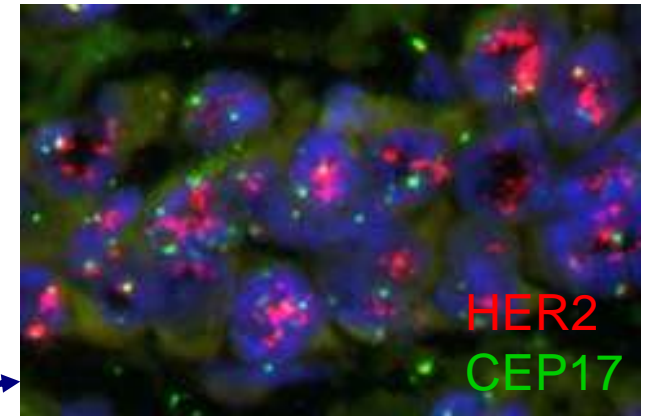
Klasszikus patológia: Mintázat „pattern” felismerés (H&E)

Molekuláris morfológia + *in situ* molekuláris információ

Immunhisztokémia



FISH



In situ vs in vitro

In situ diagnosztikus teszt

Analitika

Pre-analitika

Target-feltárás

Rögzítés?

- módja
- időtartama
- **szövet előkészítés**

- hatékonyság
- eszköz
- mód



Automatizálás I.

Automatizálás II.
(Standard kit-ek)

Automatizálás III.
✓ Digitális mikroszkópia
✓ Képanalízis

Poszt-analitika

Inkubációs
Körülmények

Standardizálás
Minőségbiztosítás

Digitális mikroszkópia

A teljes metszet dinamikus reprezentációja



- Folytonos nagyítás-kicsinyítés
- Mindig fókuszált kép
- Adatbázis integráció
- Megosztás az *net*-en
- **Pontos mérések**

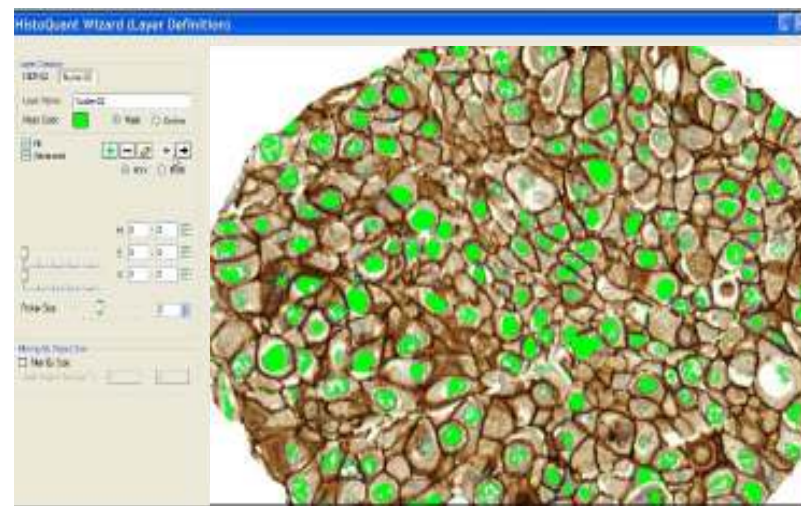
Pixel: szín - intenzitás - méret
Kép szegmentálás



A számítógép multifunkcionalitása

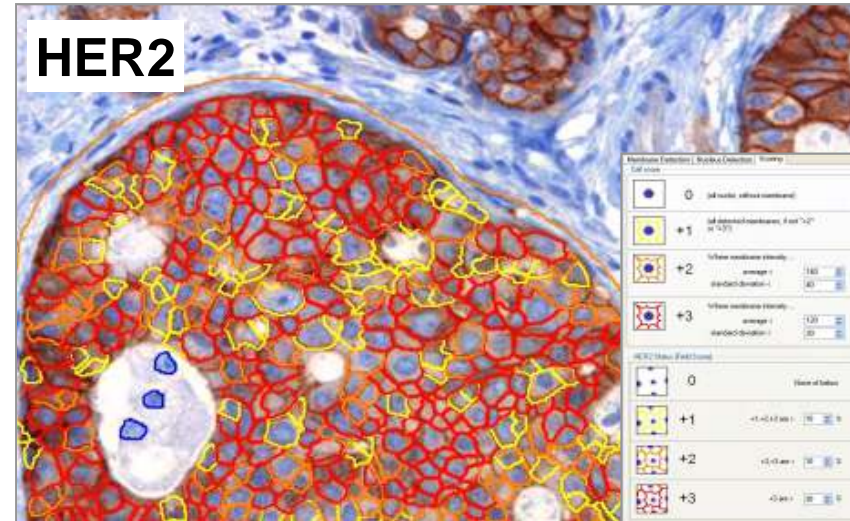
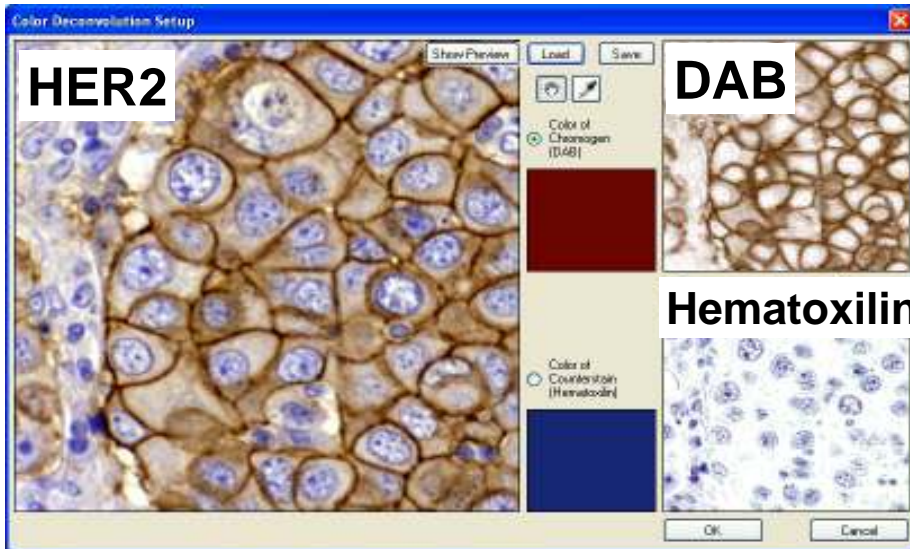
+

Hagyományos mikroszkópia

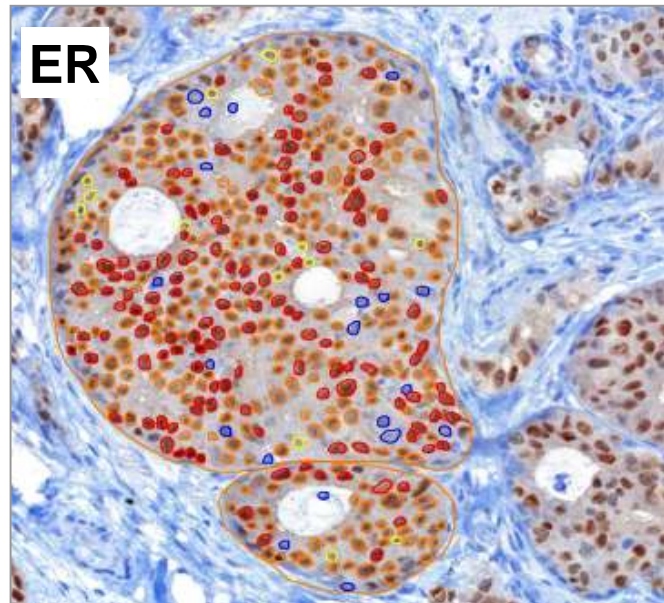


Terület - Sejtszám - Reakció intenzitás
Jelleg-felismerés: membrán folytonosság...

Digitális mikroszkópia – „QUANT” programok



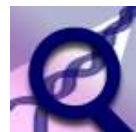
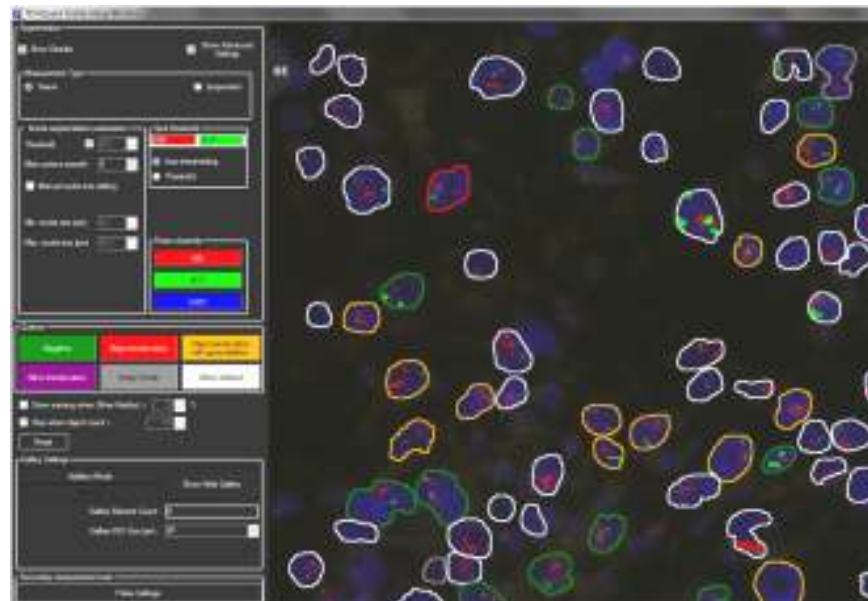
Membrane



Nuclear

IVD

FDA

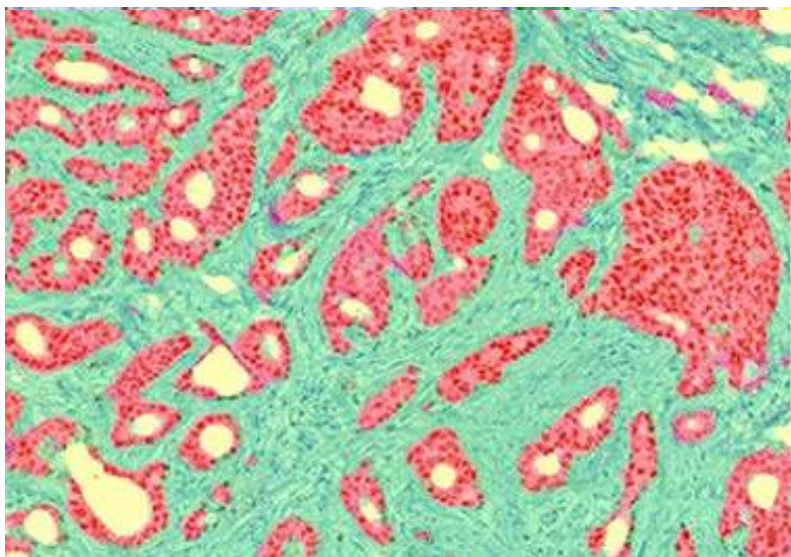


FISH

DCB színekezelés: 1 byte 8bit

Digitális mikroszkópia – integrált adatkezelés

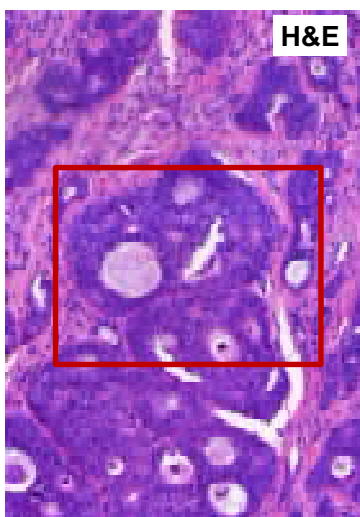
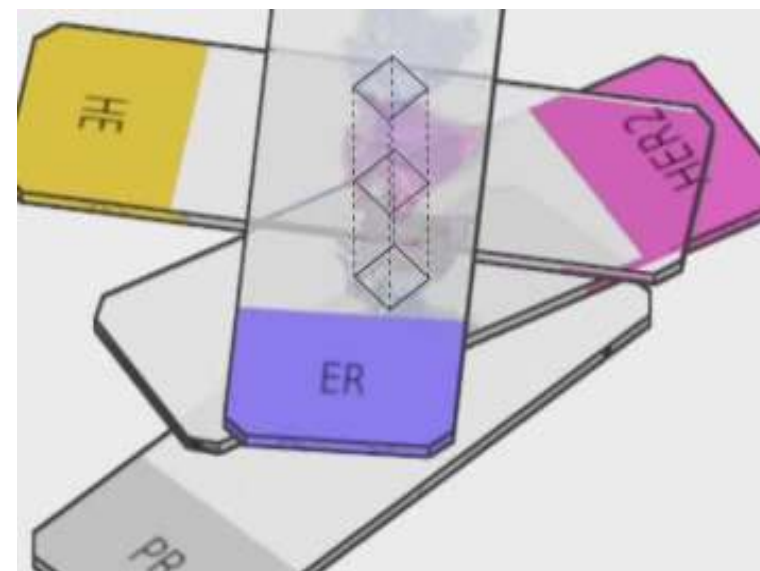
PatternQuant



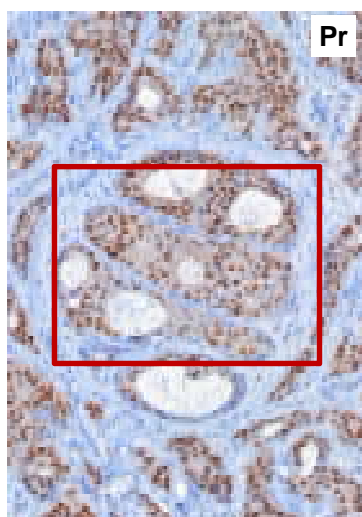
TumorBoard

Emlőrák panel:

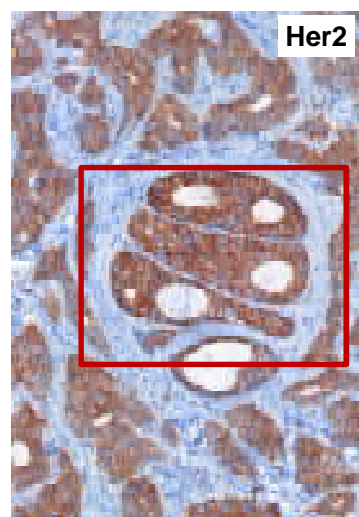
- Összeforgatás
- ROI kijelölés
- ROI klónozás
- Automatizált képanalízis



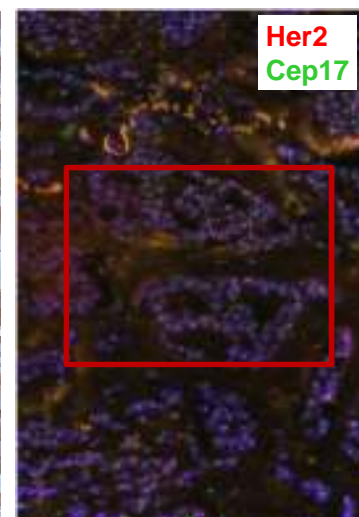
H&E



Pr



Her2

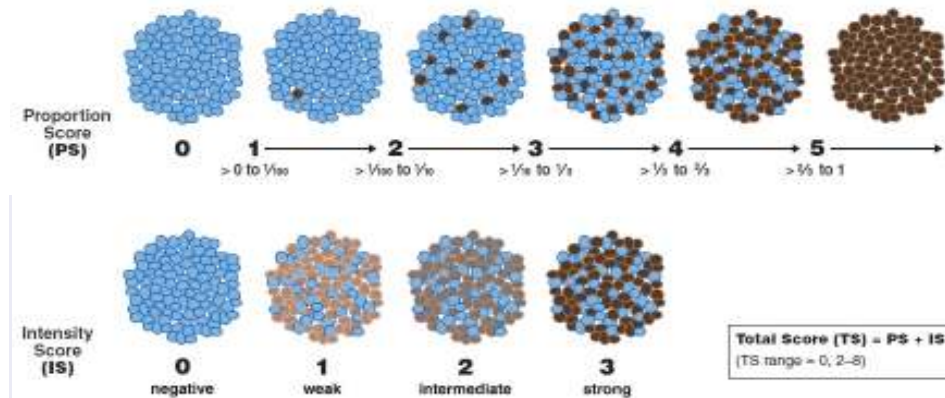


Her2
Cep17

NuclearQuant validálás

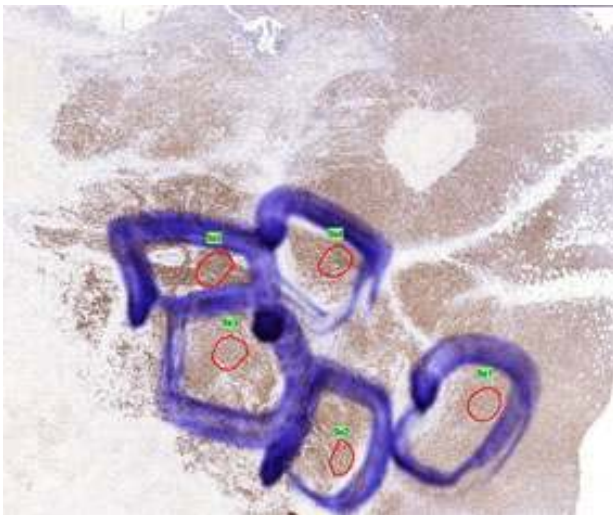
(Micsik Tamás)

Allred score:



Objektum detektálás:

- színdekonvolúció
- intenzitás topográfia



Kalibráció

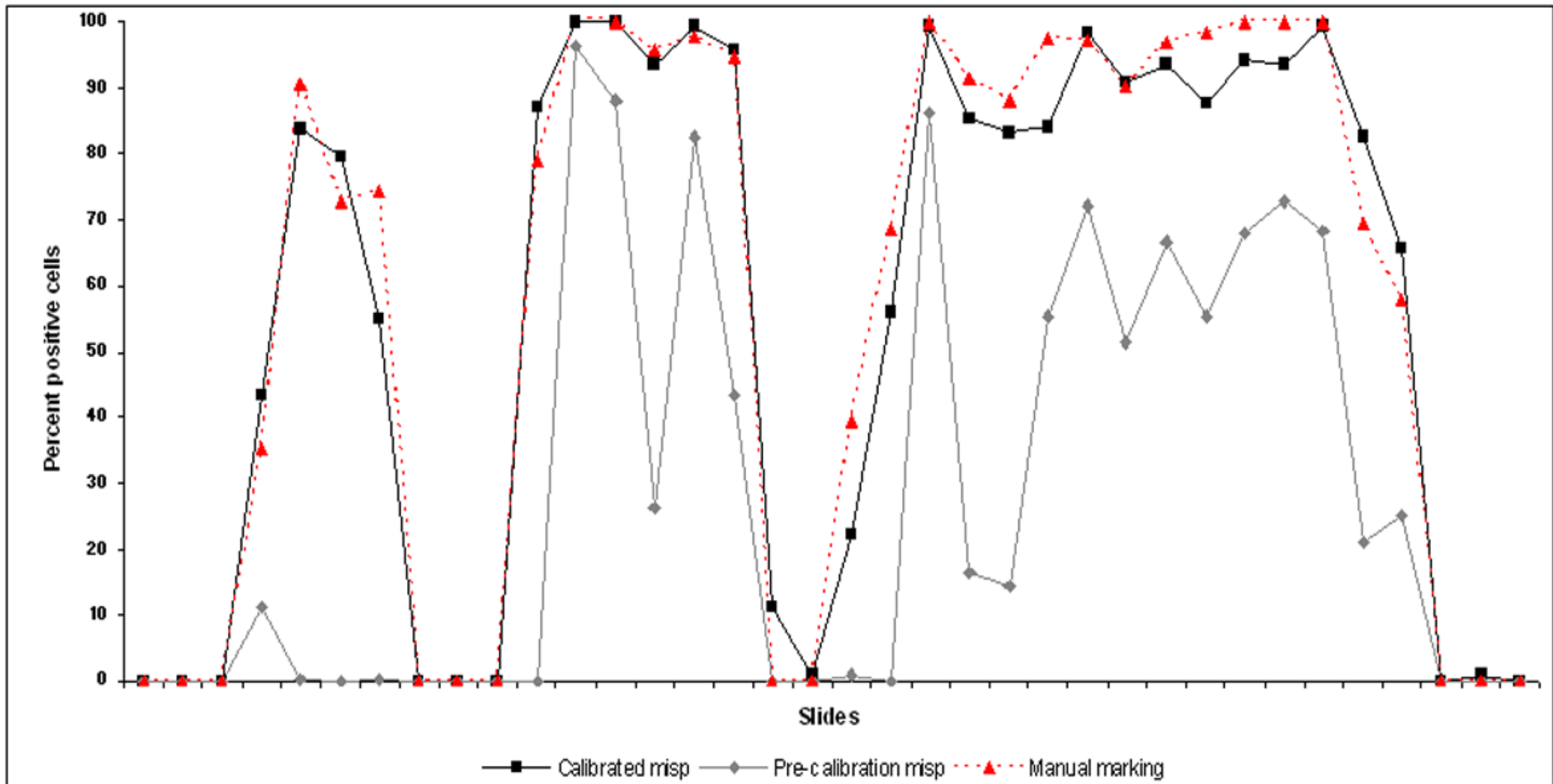
- 38 annotáció (195 sejt; 73-489)
- A sejtek manuális kijelölése
- Interaktív teszt-futásokkal a jó *.misp file definiálása

Mérés

- 186 emlőrák; 3 patológus
- 3-5 ROI/eset
- Korrelációk (kappa)

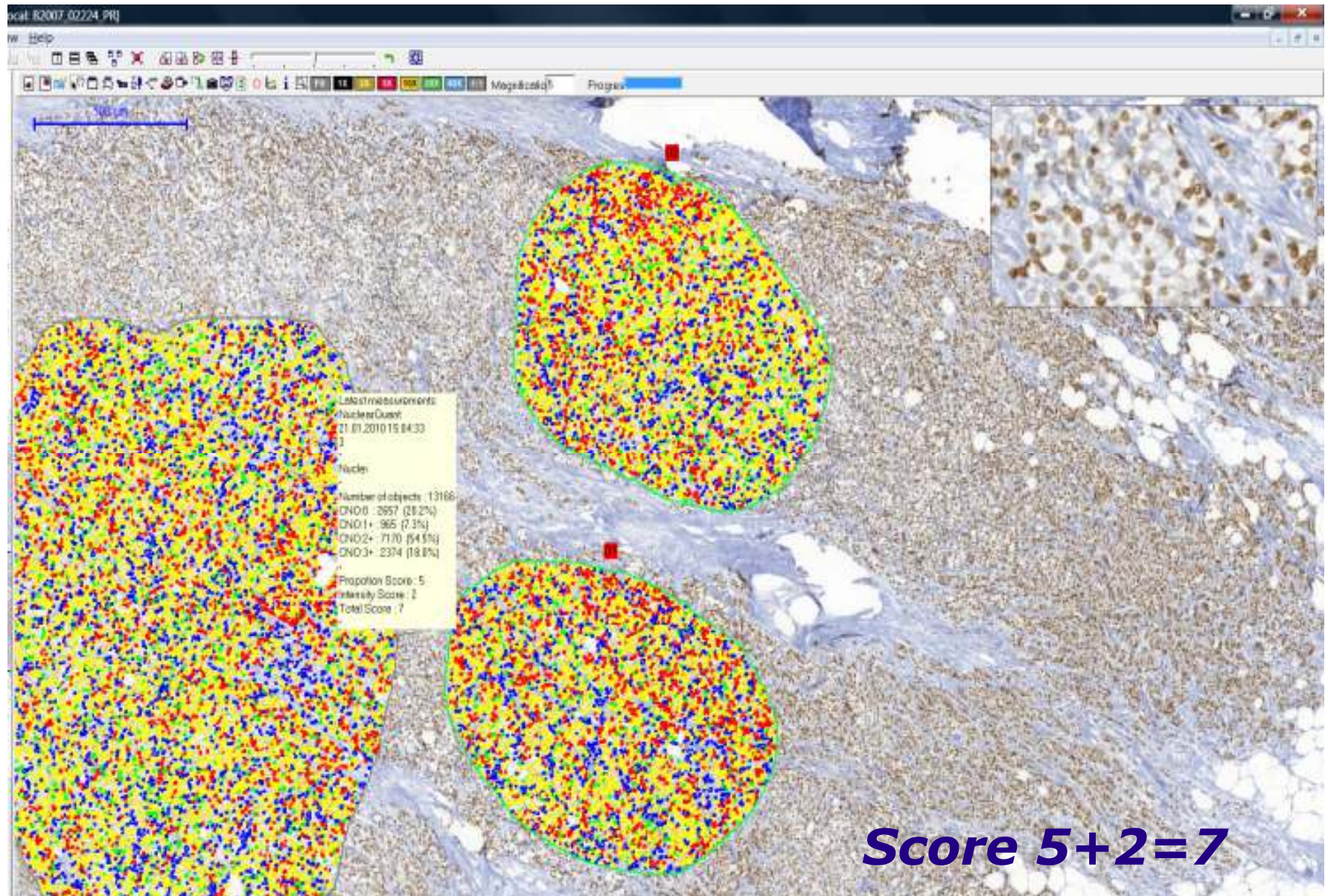
Detection	Scoring	
	0	None of below
	+1	Average Intensity < 225
	+2	Average Intensity < 215
	+3	Average Intensity < 160

NuclearQuant - kalibráció



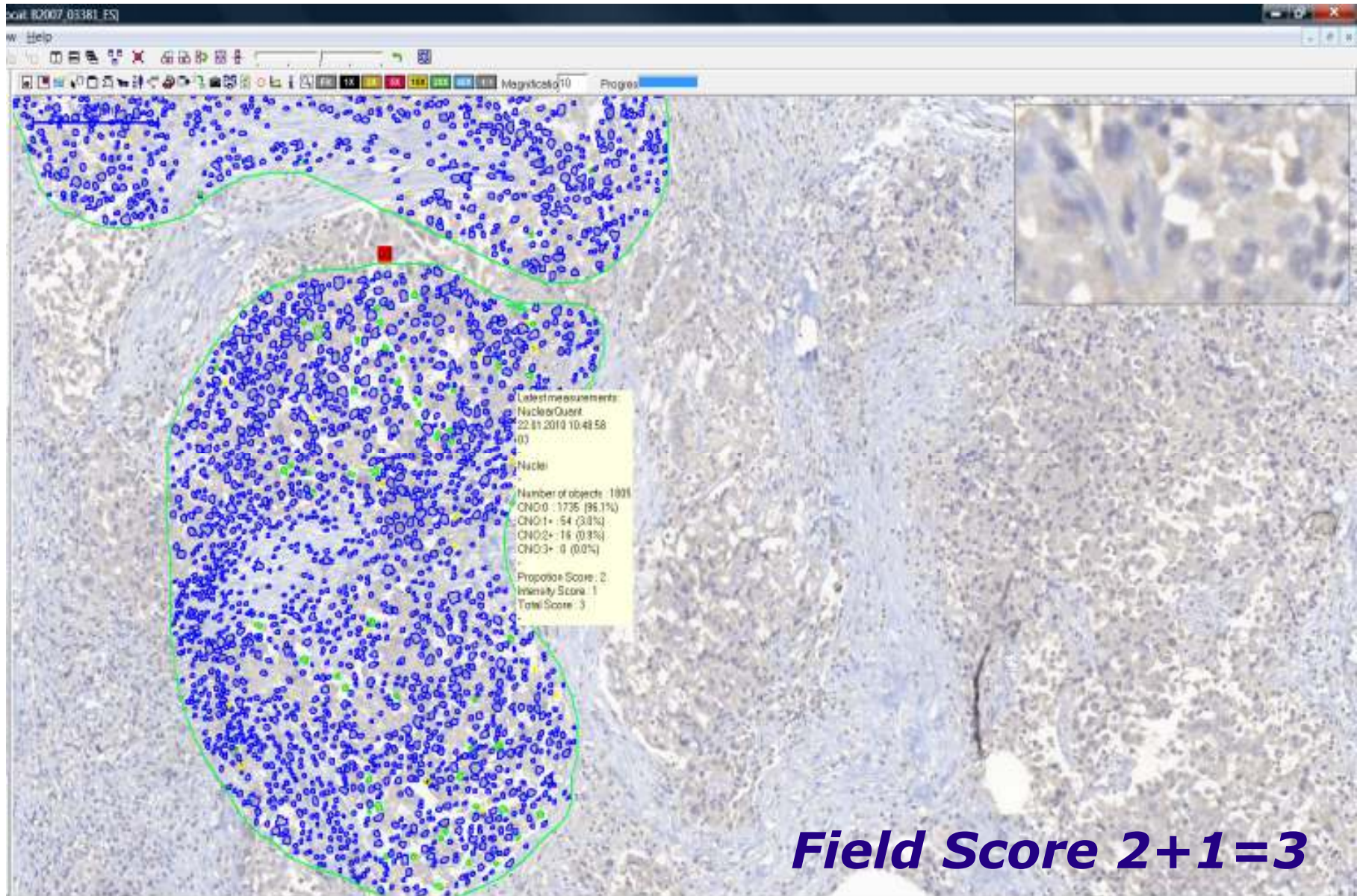
NuclearQuant

ER



NuclearQuant

ER



NuclearQuant - Validálás

Krečsák 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

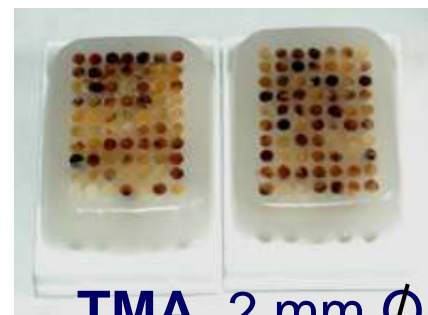
László Krečsák¹, Tamás Micsik^{2*}, Gábor Kiszler³, Tibor Krenács², Dániel Szabó³, Viktor Jónás³, Gergely Császár⁴, László Czuni⁴, Péter Gurzó³, Levente Ficsor³, Béla Molnár^{3,5}

MembraneQuant validáció

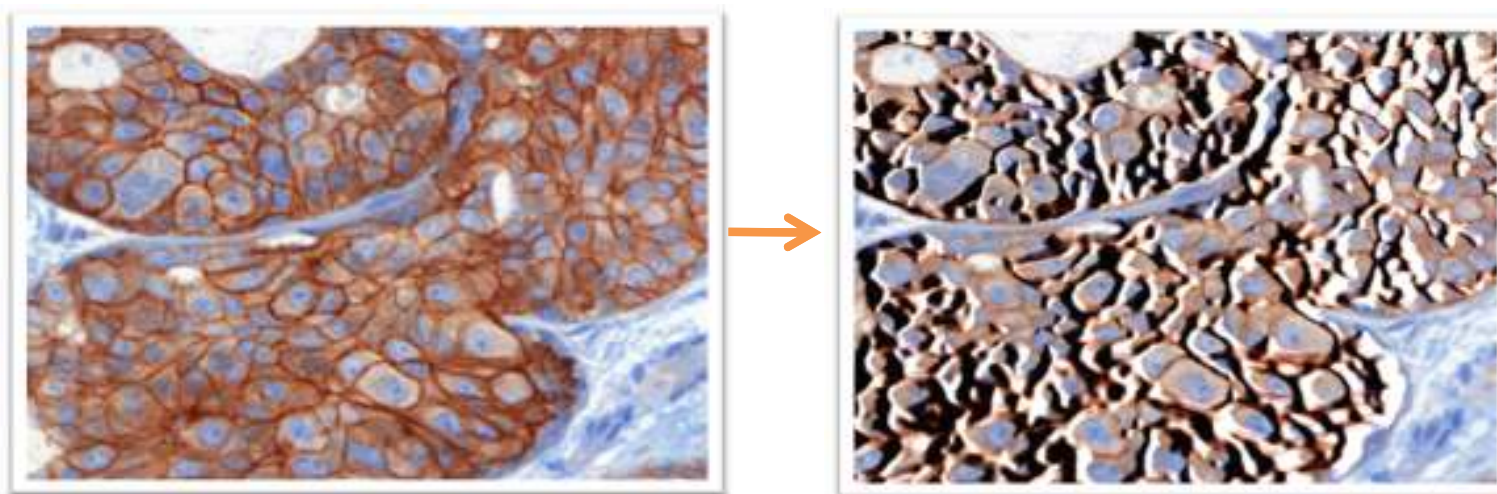
Cél: Az automatizált és manuális kiértékelés összevetése

Kalibráció: 12 metszeten kalibrálva; 171 core/310 annotáció; 379 sejt/ROI (49-2414)

- 107 nő, (26-86 év) 207 TMA minta
- 126 primer IDC, 4 ILC, 61 metastasis, 16 DCIS
- Ventana Pathway **HER-2/neu (4B5 clone)**
- 2 Patológus empirikusan core-onként 1-6
- Ugyanez MembránQuant-al

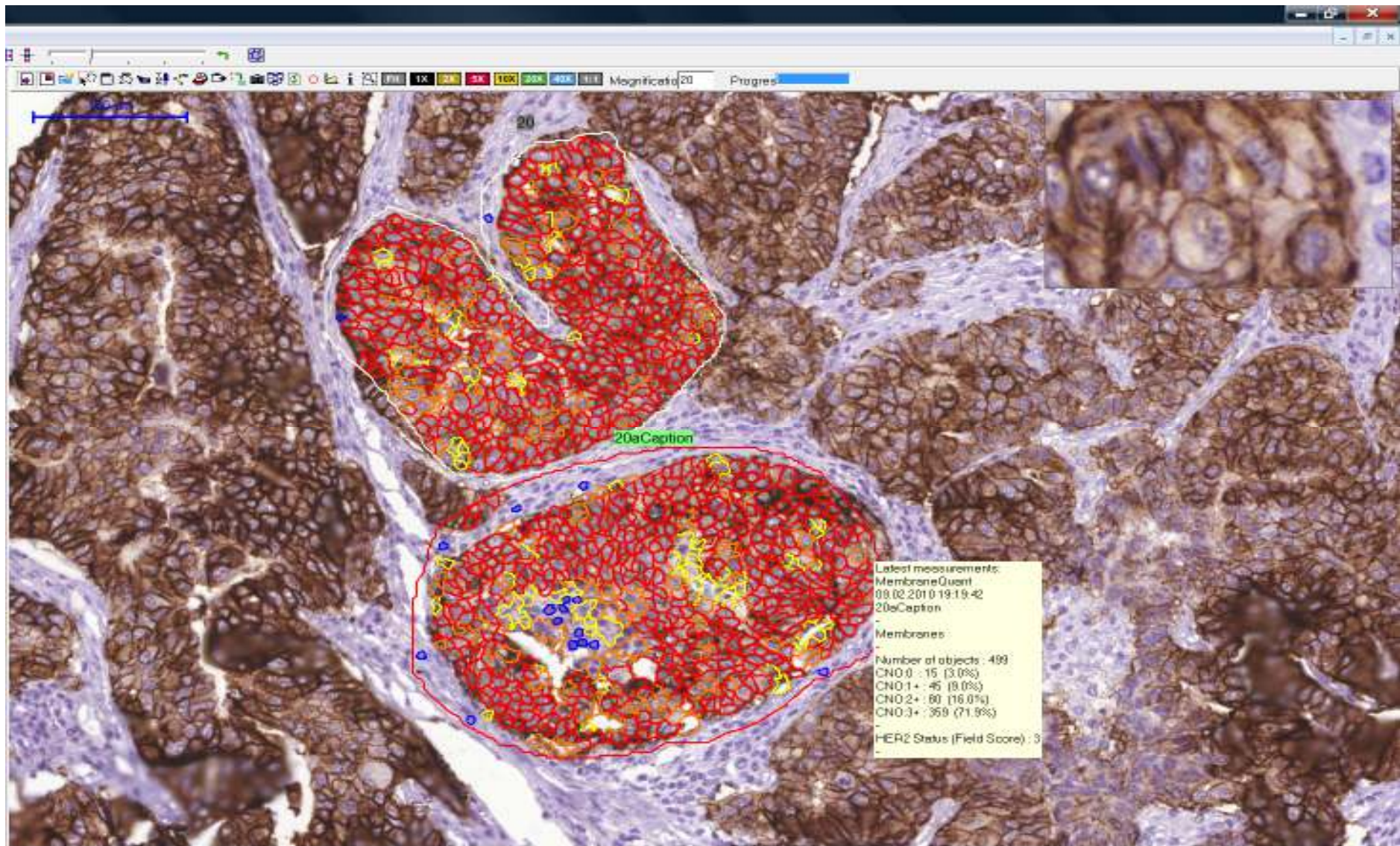


TMA 2 mm \emptyset



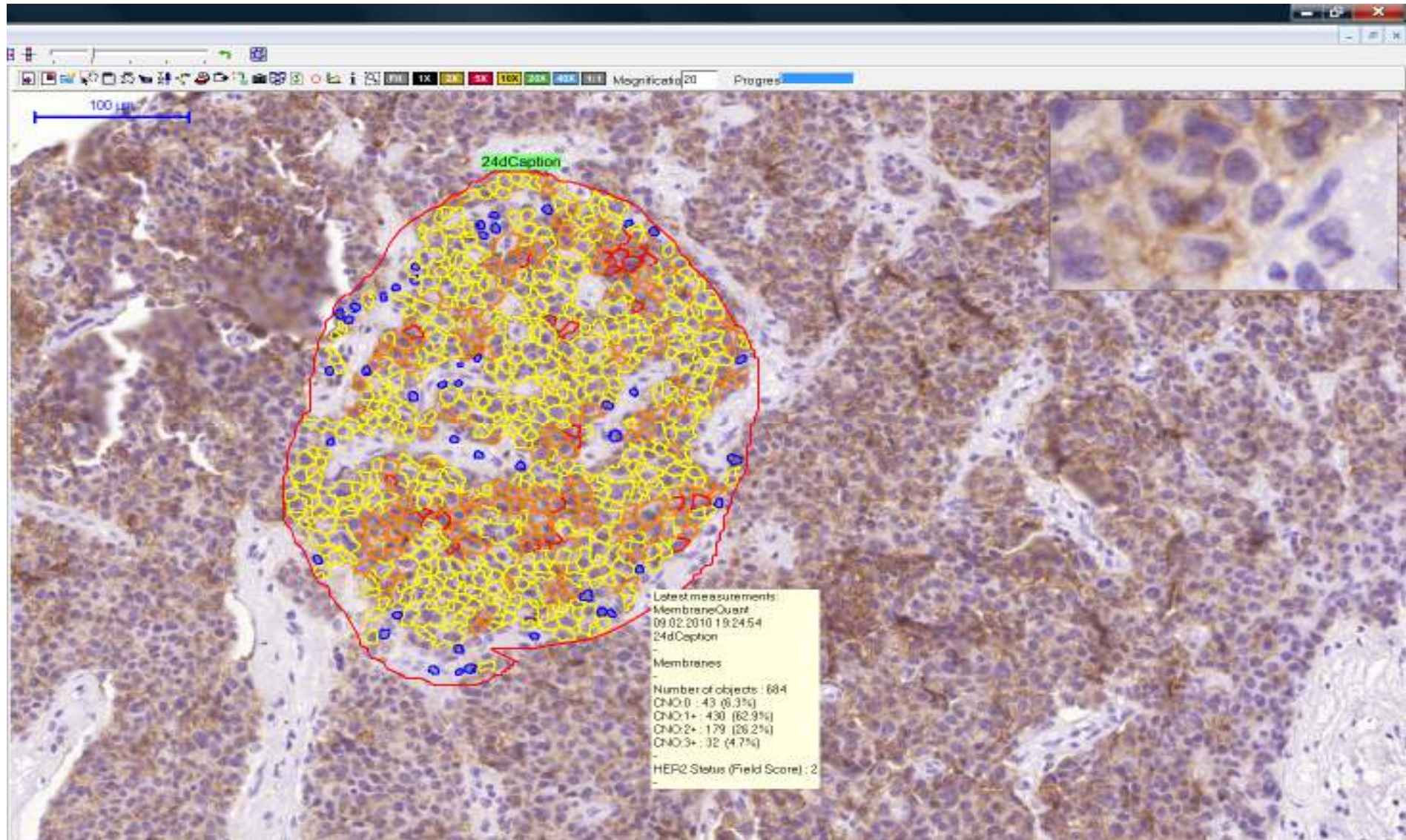
Szín dekonvolúció – intenzitás topográfia

MembraneQuant validáció



HER2 Score = 3+

MembraneQuant validáció



HER2 Score = 2+

MembraneQuant validáció

HER2 értékelés összehasonlítása empirikus vs automatizált (0-1 vs 2-3)

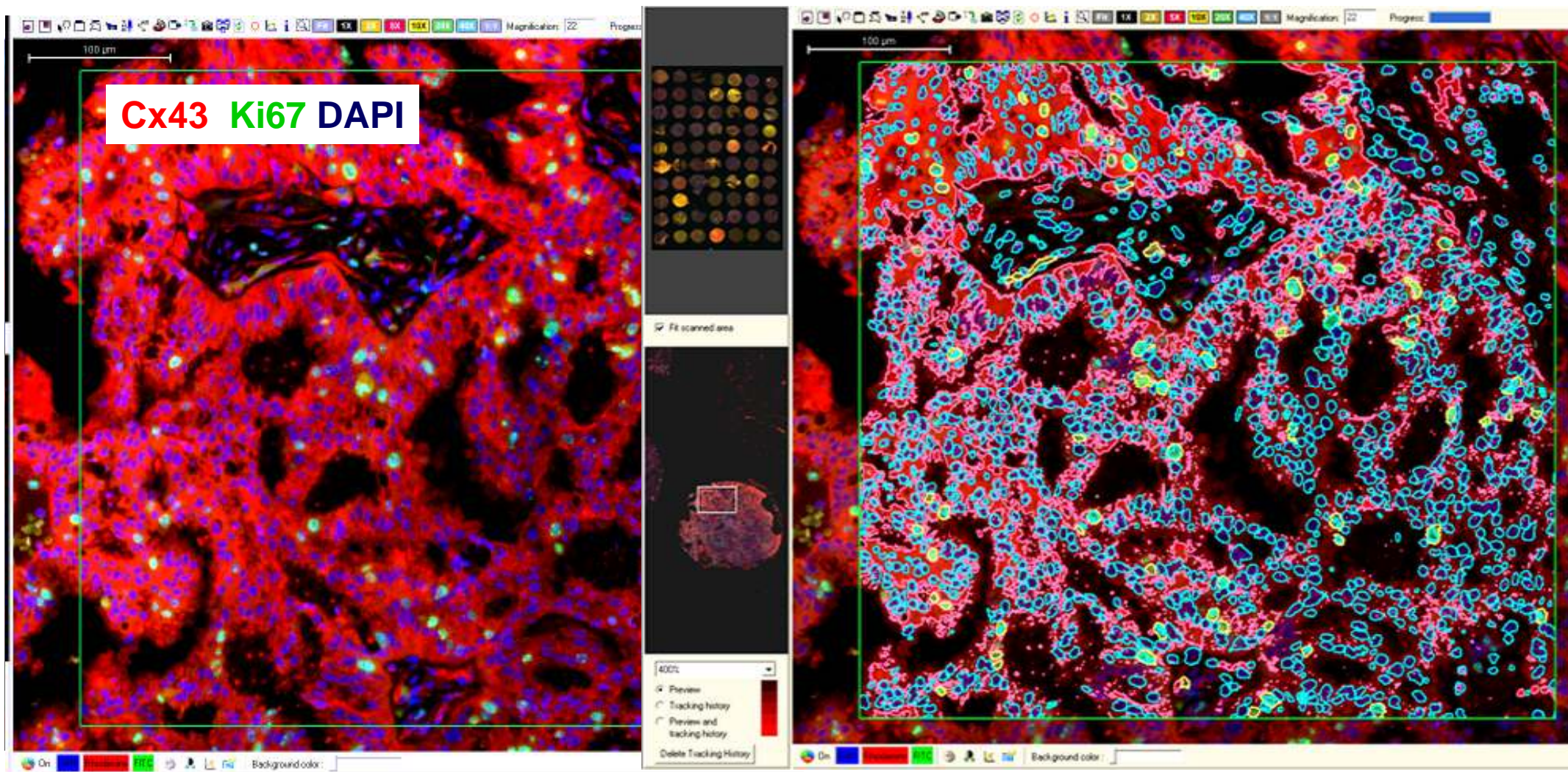
Variables	Cohen's κ	Quadratic weighted κ	Spearman's rho
Pathologist1 vs Pathologist2	0.940	0.981	0.973
Pathologist1 vs. Consensus	0.741	0.918	0.877
Pathologist2 vs. Consensus	0.717	0.909	0.856
MembraneQuant vs. Pathologist1	0.635	0.901	0.854
MembraneQuant vs. Pathologist2	0.629	0.896	0.833
MembraneQuant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

**Jó korreláció a standard empirikus értékeléssel.
Nagy esetszámmal a validálás folyamatban van.**

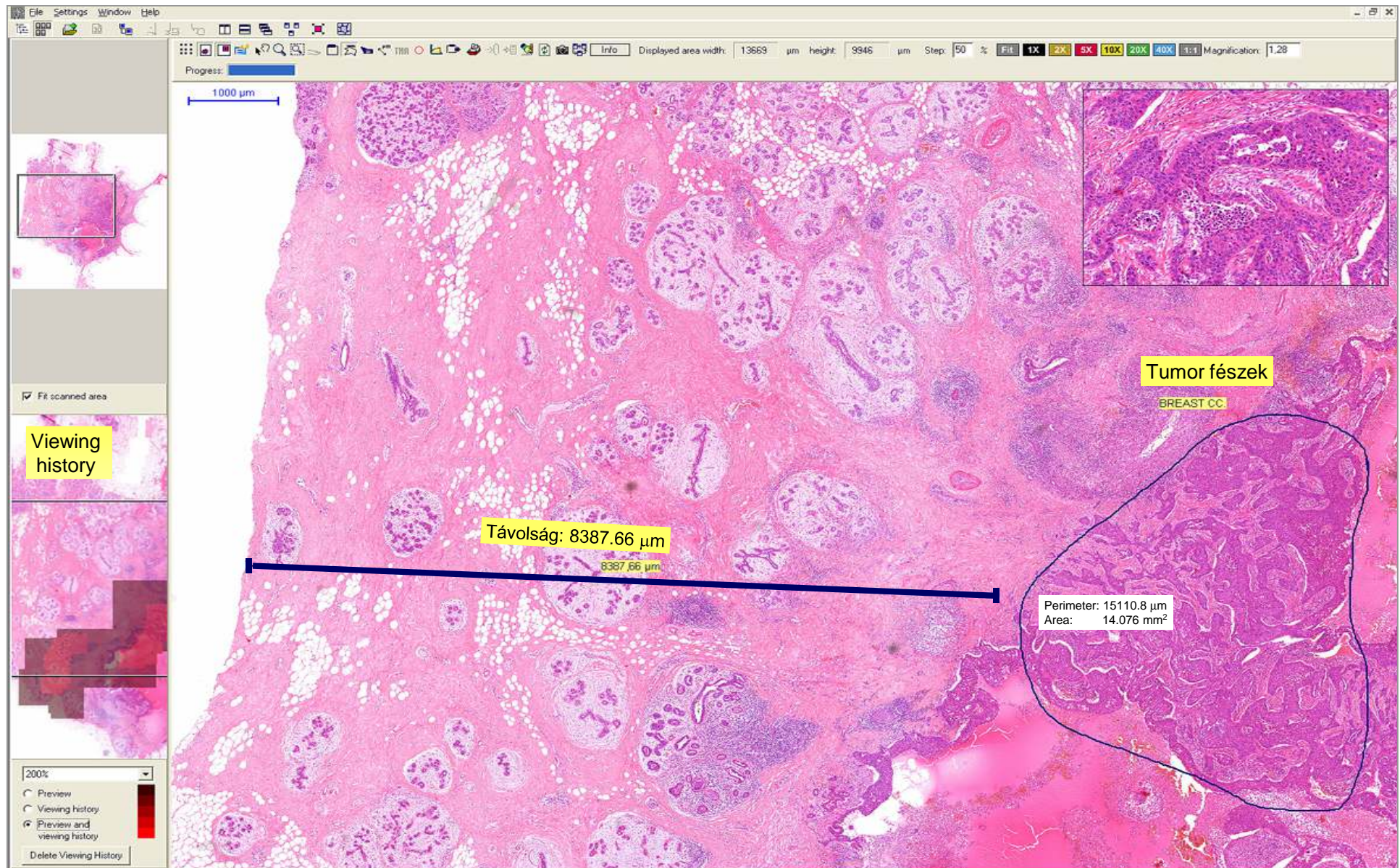
HISTQUANT

Egy vagy több jel automatizált mennyiségi meghatározása

Átlag denzitás: egyedi sejtek, ill. normál vs daganatos sejtcsoportok



Digitális metszet – Diagnosztikai pontosság



Diagnosztikus riport

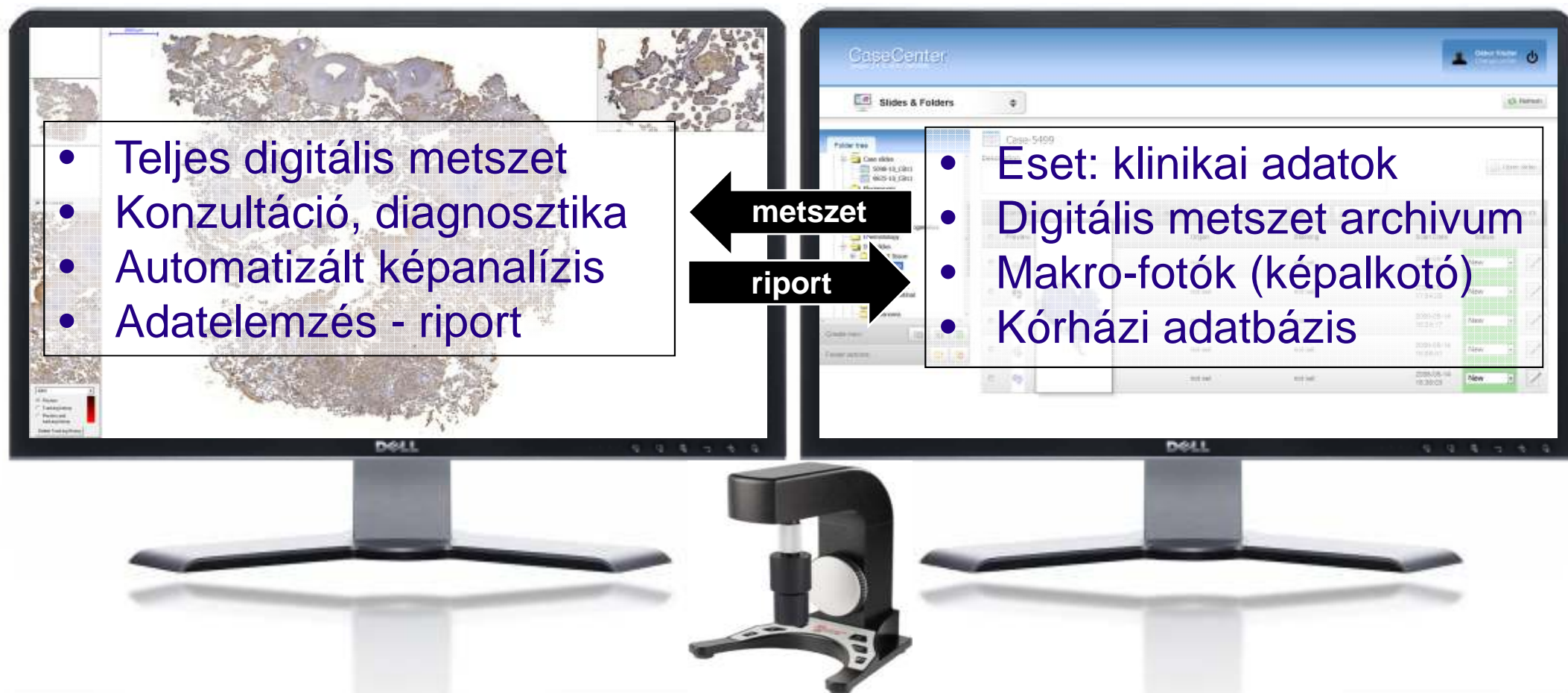


- Betegadatok, digitális metszet, mérési adatok
- Reprezentatív kép beillesztése a riportba

Surgical report				3DHISTECH	
3DHISTECH LTD. Konkoly Thege 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:	10301-07_HIE_11	Staining:	HIE	Comment:	
		Test Name	Assisted score		
		ER	0		
		HER2	0		
			0		
Slide ID:	10301-07_ER_1	Staining:	ER	Comment:	8
Slide ID:	10301-07_HER2_1	Staining:	HER2	Comment:	3
Slide ID:	10301-07_KI-67_1	Staining:	KI-67	Comment:	5
Slide ID:	10301-07_PR_1	Staining:	PR	Comment:	8
Diagnosis:					
	Inv. Her2 pos. Carc.				
2010.06.29 15:47:30				Dr. Imre Horváth	

Digitális diagnosztikus munkaállomás

Eset-menedzser rendszer

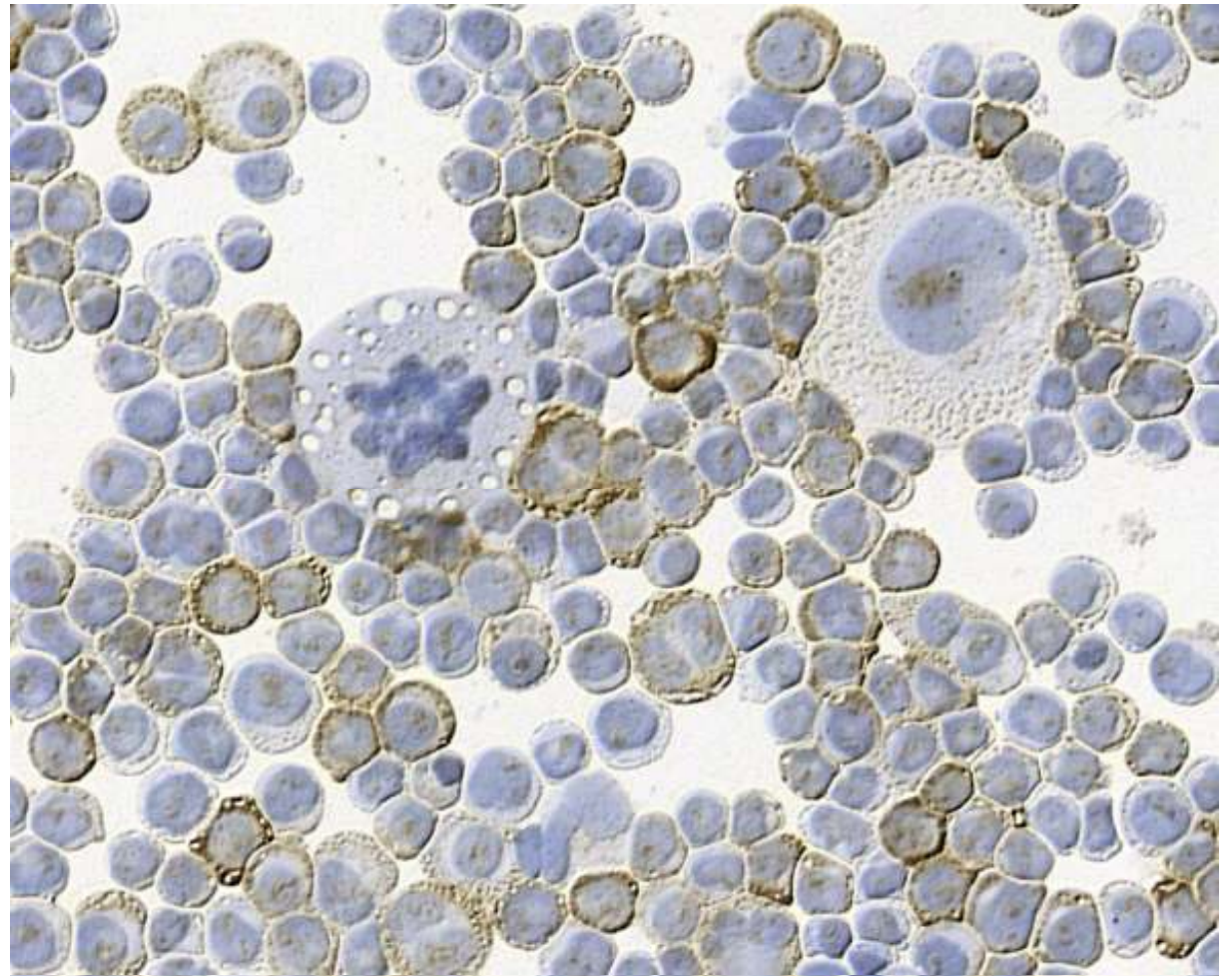


Kvantitatív Patológia

- Elérhető, de sok **tanulást/validálás** igényel
- Digitális mikroszkópia – **Adatbázisba integrálható**
- Permanens jelek és mérések – **Minőségbiztosítás**
- **Egységes kórházi adatbázishoz** csatlakoztatható (szórás Mo-n)
- Alapvető követelmény: **Pre-Analitika, Analitika standardizálása!**
Infrastuktúra
- A digitális képanalízis: fontos eszköz, de
a PATOLÓGUS dönt!
- A **digitális mikroszkópia** a patológia nagy lehetősége...
(konzultációk, telepatológia, munkaerő optimalizálás...)

Köszönet!

- Micsik Tamás
- Kiszler Gábor
- Csizmadia Annamária
- Parsch Edit



TMA – microenvironment in FL

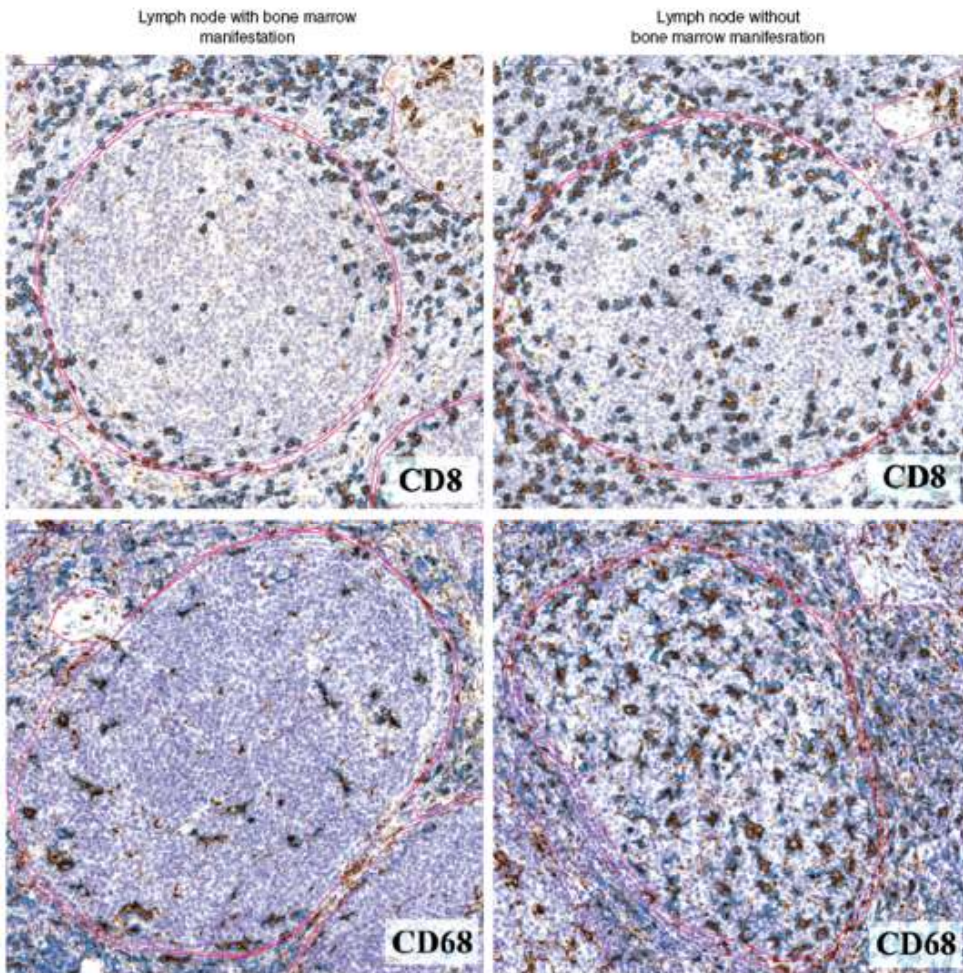


Figure 3. Representative image analysis of lymph node follicular compartments stained with an anti-CD8 antibody and an anti-CD68 antibody in follicular lymphoma (FL) cases with and without bone marrow manifestation. The follicular areas of the lymph node are marked with red boundaries. The antibody-positive cells are shown in blue ($\times 20$ magnification).

Histopathology 2012 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04187.x

Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular lymphoma

Hajnalka Rajnai,¹ Csaba Bödör,^{1,2} Zsófia Balogh,¹ Éva Gagyí,¹ Judit Csomor,¹ Tibor Krenács,¹ Erika Tóth³ & András Matolcsy¹

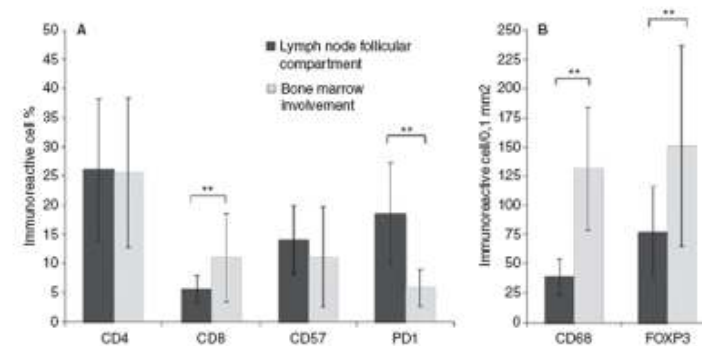


Figure 2. Comparison of proportion or frequency of reactive cells in lymph nodes and bone marrow in follicular lymphoma (FL) (n = 20). The CD4, CD8, CD57 and PD1 values are presented as percentages of area positive for the antibody (A), whereas the forkhead box protein 3 (FoxP3) and CD68 values are shown as numbers of positive cells per 0.1 mm² (B). Results are expressed as means \pm standard deviation. **statistically significant $P < 0.05$.