

AUTOMATISATION DE LA LECTURE EN IMMUNOFLUORESCENCE



COLLOQUE
2012

C. ANDRE et X. BOSSUYT

AUTOMATISATION DE LA LECTURE EN IMMUNOFLUORESCENCE

Les systèmes automatisés de lecture des images fluorescentes

Expérience du système NOVA View



Chantal ANDRE CHU Henri-Mondor

**Les systèmes automatisés pour
l'acquisition
et l'interprétation des tests
en immunofluorescence indirecte**



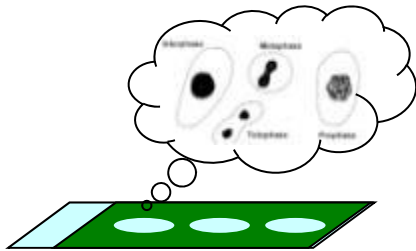
Intérêt d'automatiser la lecture d'images IFI en auto-immunité

- **IFI** technique de base pour rechercher de nombreux Autoacs
Obligatoire pour le dépistage et le titrage des ANA
(recommandations Internationales),
des ANCA ,
d'auto-anticorps au cours des hépatopathies (et autres)
- **Augmentation du nombre d'examens**
 - automates de préparation de lames
 - lecture : expertise nécessaire
- **Standardisation** nécessaire pour uniformiser les résultats :
seuil de positivité et aspects (ANA sur HEp2)



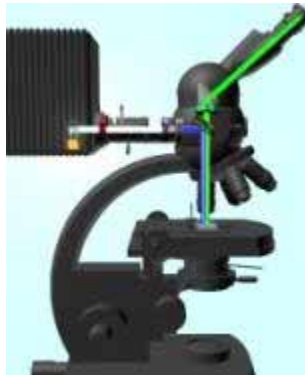
Variabilité intra- et inter-laboratoires (IFI)

Technique



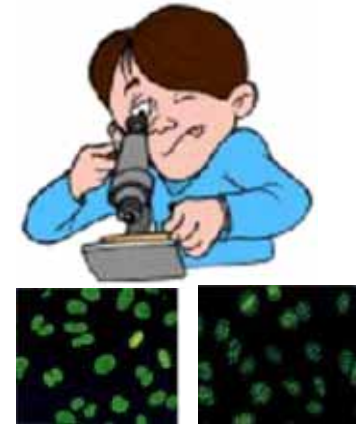
Substrat
Dilutions du sérum
Conjugués

Système de lecture



Microscope
Sensibilité
Grossissement
Lampes:
- à vapeur de mercure HBO
- LED

Lecteur



Interprétation :
seuil de positivité
aspects
Expérience



Standardisation nécessaire : rôle des lecteurs automatisés

Systèmes de lecture automatisée : ce qui est indispensable

Matériel + Logiciels

- Adapté aux techniques de routine d'IFI
- Acquisition automatisée de l'image
- Analyse de l'intensité et la structure du signal de fluorescence
 - Calibration de la fluorescence : UA
 - Définition des aspects : standardisation
- Mémorisation des images
- Présentation des résultats / modification de l'interprétation
- Archivage
- Partage avec laboratoire expert



Les systèmes proposés

AKLIDES System (Medipan)

NOVA View (Werfen, INOVA diagnostics)

ZENIT G Sight A (Menarini diagnostics)

EUROPattern (EUROIMMUN)

HELIOS (AESKU Diagnostics)

IMAGE NAVIGATOR (Immuno-Concepts)



Matériel et logiciels

- ✓ Microscope à fluorescence LED
- ✓ Porte platine motorisé
- ✓ Appareil photographique numérique (CCD , haute définition)
- ✓ Ordinateur
- ✓ Logiciels :
 - étapes de motorisation,
 - prise des images,
 - interprétation et rendu des résultats,
 - interactifs
 - archivage des images



Différences entre les systèmes proposés

- Nombre de lames lues
- Microscope inversé ou non
- Temps de lecture du puits (régions lues et images prises)
- Types de lames : fermé ou ouvert (2 types d'HEp2)
- Utilisation d'un marqueur de l' ADN double brin (DAPI)
- Tests
- Seuil de détection de la fluorescence
- Systèmes d'interprétation : les aspects reconnus automatiquement (nucléaires et cytoplasmiques)
- Système de validation par le biologiste
- Stockage et gestion des données
- Interconnexion possible avec le SIL



Évaluations des systèmes

- Publications limitées
- Nombreuses évaluations en cours
- Concernent :
 - Antinucléaires
 - ANCA
 - Anti-ADN natif sur *Crithidia luciliae*
 - Seulement prises d'images des IFI sur tissus

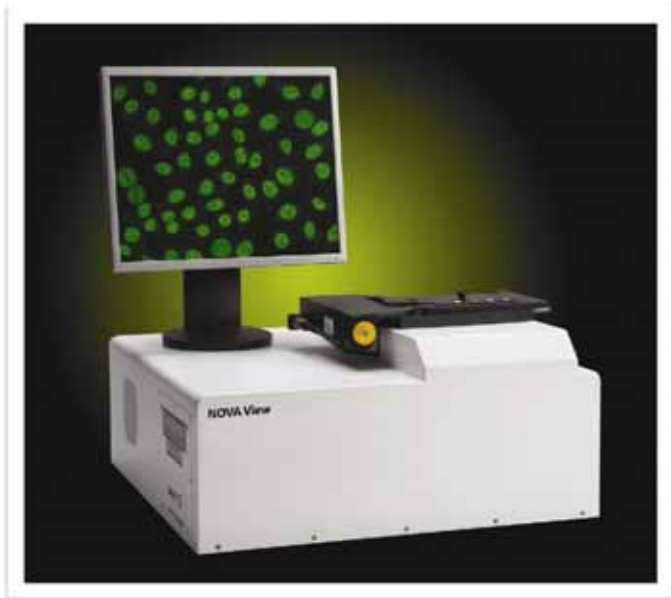


Evaluation du lecteur de lames de fluorescence NOVA View™

Anticorps antinucléaires sur HEp2 (ANA)



Systeme NOVA View™

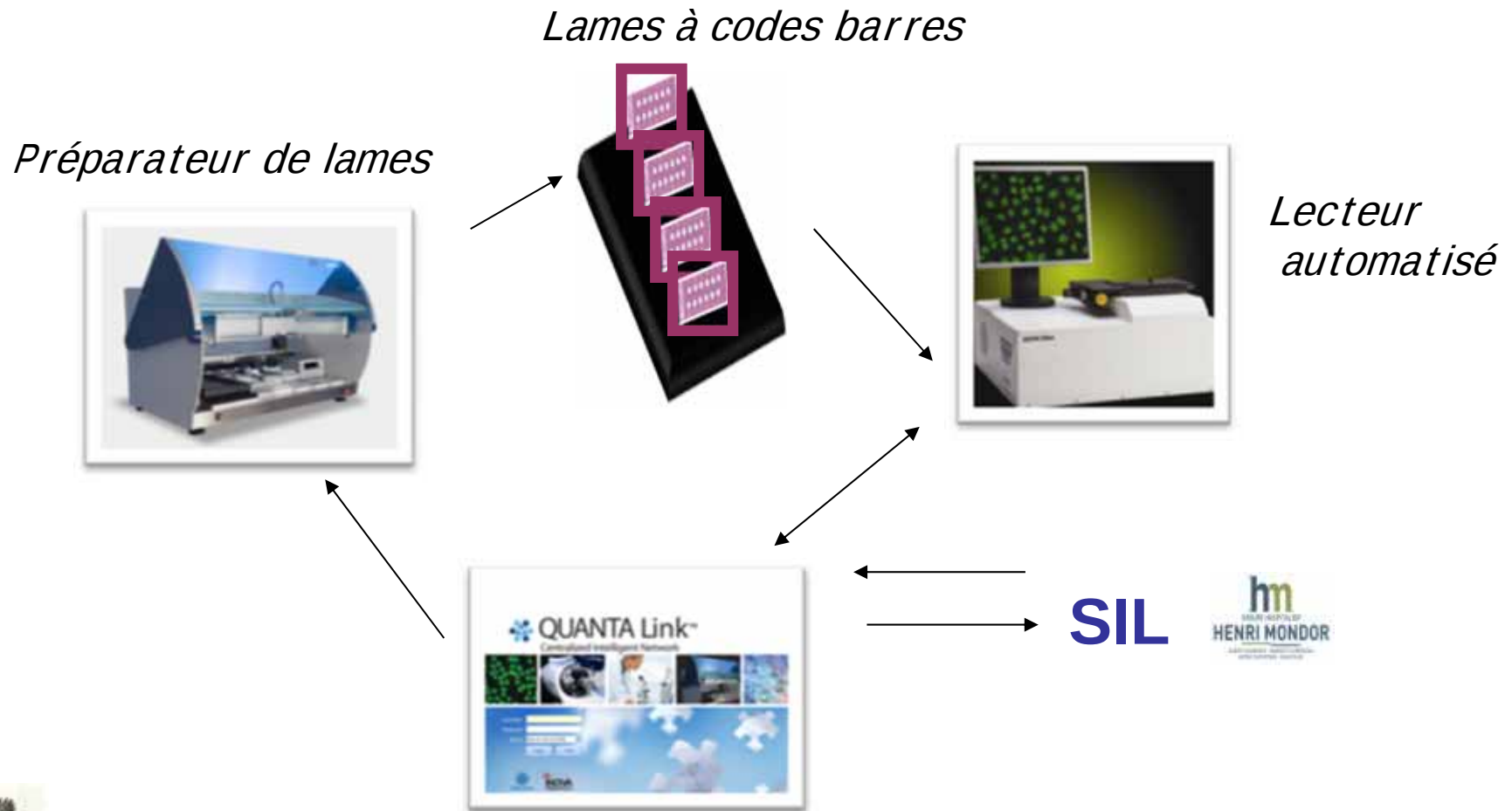


- ✓ Microscope Olympus (LED) avec plaque motorisée (4 lames, lecture 1min /puits)
- ✓ Appareil photo numérique CCD
- ✓ Ordinateur

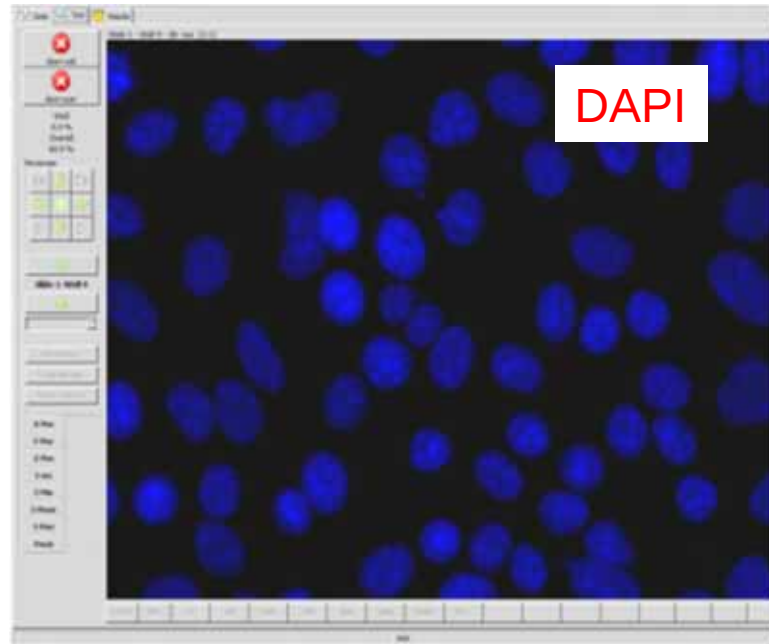
- ✓ Logiciel contrôle
 - la motorisation,
 - l'autofocus ,
 - la prise des images digitalisées,
 - l'interprétation des images,
 - le rapport des résultats,
 - l'archivage des images et données



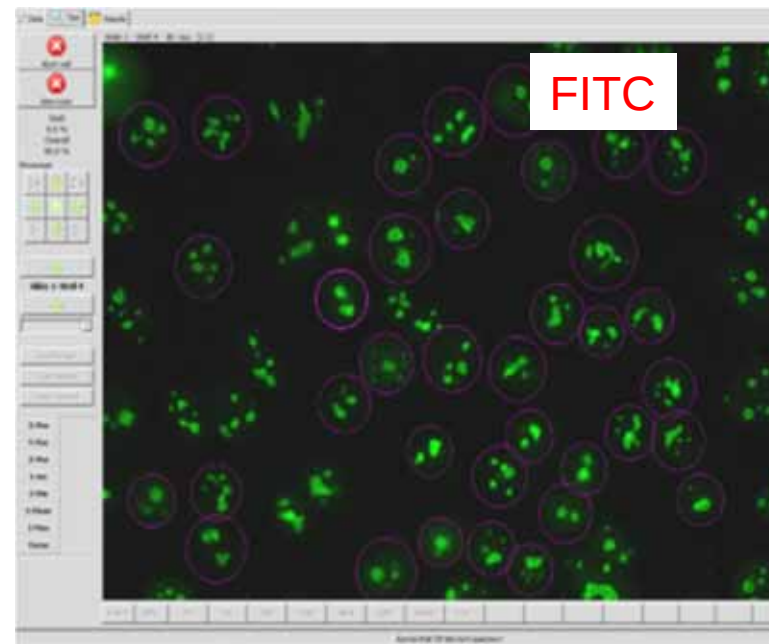
Connexion de la chaîne d'automatisation de l'IFI au système informatique du laboratoire



Reconnaissance automatique des cellules



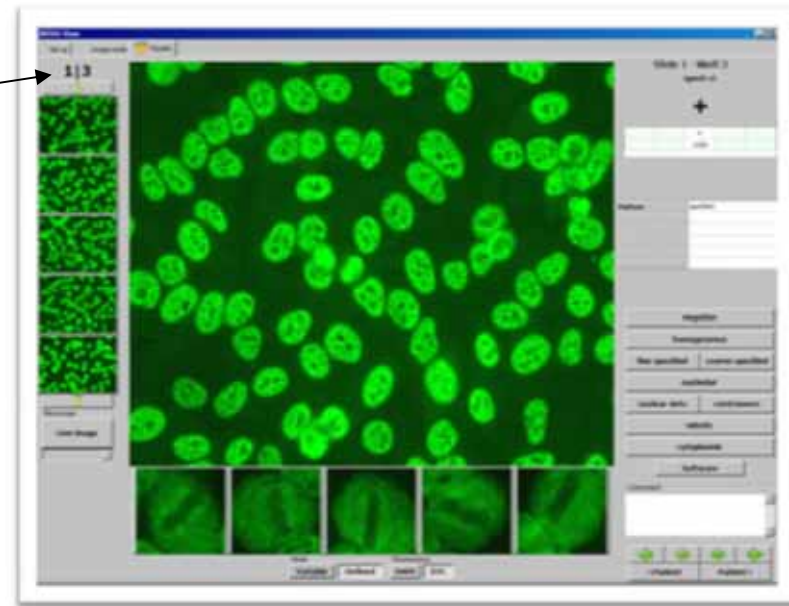
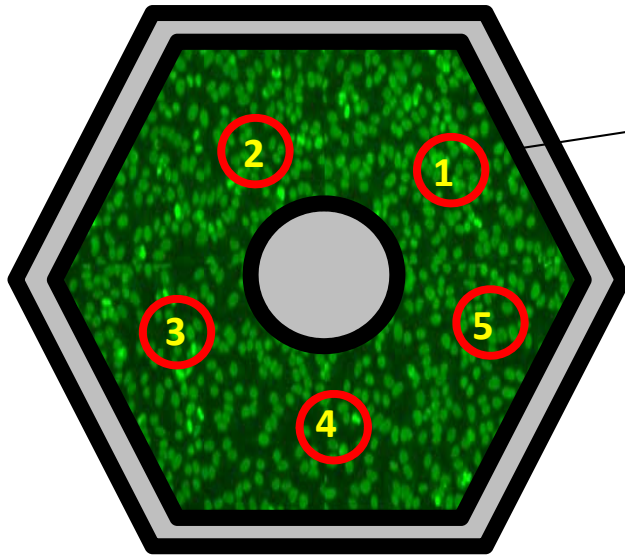
- ❖ Recherche des noyaux colorés en bleu par le DAPI (à 455nm)
- ❖ Mise au point sur l'image DAPI



- ❖ Passage à 490nm pour exciter le FITC.
- ❖ Détermination de l'intensité de fluorescence nucléaire
- ❖ Détermination de l'aspect



Création des images numérisées

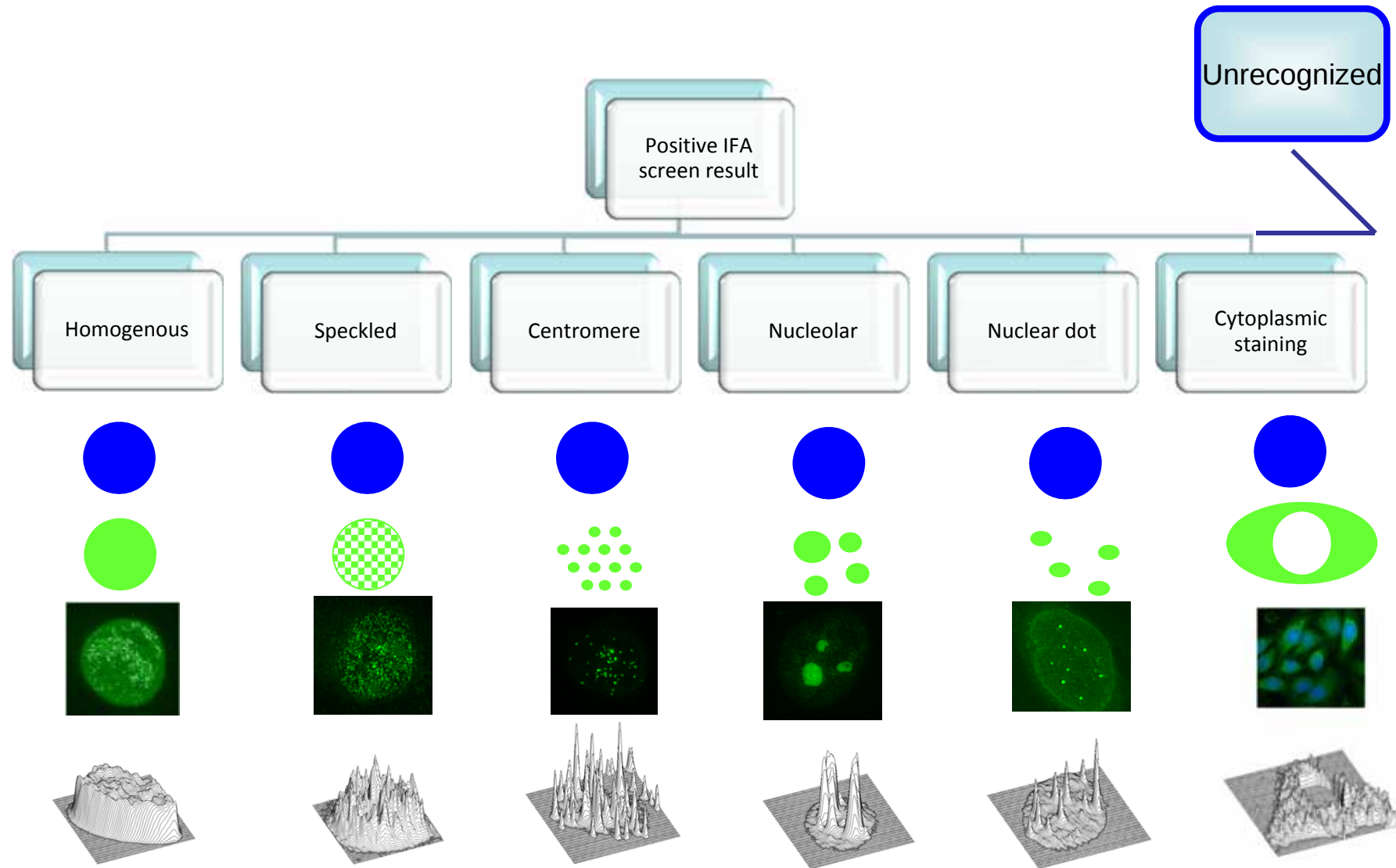


- 5 régions scannées
(procédures DAPI/ FITC)
- Une image de chaque région est
sélectionnée pour l'interprétation

- 5 images disponibles (positifs)
pour la confirmation et
l'archivage



Interprétation des aspects



D'après Edward BASS

Interprétation

Images à obj x40

Détails des métaphases

Identification

Interprétation

Intensité du signal

Aspect automatique

cytoplasme

Modification et ajout de commentaires

Mode

Variable

Defined

Fluorescence

DAPI

FITC



Buts du protocole d'étude d'ANA sur HEp2

Evaluer la performance du système sur 360 sérums par comparaison à la lecture visuelle par 2 biologistes expérimentés

Sur 3 séries de sérums, pour :

- **la discrimination négatif/positif** (seuil à 120 LIU)
- **l'intensité de fluorescence** (LIU / -, + à ++++)
- **l'aspect de la fluorescence**

Sur les HEp2 INOVA du système (NOVA View, Archivé, microscope) comparés à la lecture microscope sur lames du site HEp2 Kallestad

Cellules	HEp2 INOVA	HEp2 Kallestad
Technique	automate QUANTA-Lyser	automate PhD
Dilution sérum	1/80	1/80
Conjugué	FITC IgG avec DAPI	FITC IgG, IgA, IgM
Lecture	-automate NOVA View -microscope LED	microscope LED ou HB0 50



Résultats sérums INOVA : Etape 1

Sur 80 (40 - et 40 +) : 76 interprétables (5 % non interprétés mais négatifs lors de archivage)

Discrimination négatif/positif

	NOVA View vs Archivé	Archivé vs œil INOVA	Archivé vs œil Kallestad
Concordance +/-	0.987	1.00	1.00
Coefficient Kappa	0.974	1.00	1.00

Aspects quantitatifs (entre LIU et grades)

	NOVA View vs Archivé	Archivé vs œil INOVA	Archivé vs œil Kallestad
Coefficient de corrélation de Spearman (rs)	0.900	0.925	0.918

Corrélation sur aspects (n = 40, 13 M, 12 H, 5 CEN, 5 Nu, 5 M à GNM dont 5 c-mito)

	NOVA View vs cible INOVA (attendu)	Archivé vs œil INOVA	Archivés vs œil Kallestad
Corrects	28 (70 %)	40 (100 %)	40 (100 %)
Non reconnus	12 (30 %)	0	0



Résultats sérums du site sélectionnés :

Etape 2

Sur les 80 (40 - et 40 +) : 77 interprétables (3,8 % non interprétés mais négatifs lors de archivage)

Discrimination négatif/positif

	NOVA View vs site	Archivé vs site	Archivé vs œil INOVA
Concordance +/-	0.961	0.974	0.961
Coefficient Kappa	0.922	0.948	0.922

Aspects quantitatifs (entre LIU et grades)

	NOVA View vs site	Archivé vs site	Archivé vs œil INOVA
Coefficient de corrélation de Spearman (rs)	0.830	0.918	0.943

Corrélation sur aspects (n= 40: 13 H, 13 M, 5 CEN, 4 Nu, 4 M à GNM, 1 nég mais c mito)

	NOVA View vs œil INOVA	Archivé vs œil INOVA	Archivé vs œil site
Corrects	24 (60%)	38 (95%)	37
Non reconnus	14 (35 %)	0	
Différents/ site	2 nég (1 cen fe et 1 H)	2 nég (1 cen fe et 1 H)	3



Résultats sérums du site « routine »:

Etape 3

Sur 200 sérums, 194 interprétables (6 non lus [3 %] par automate : 5 nég et 1 Nu)

Discrimination négatif/positif

	NOVA View vs Archivé	NOVA View vs œil INOVA	Archivé vs œil INOVA	Archivé vs œil site
Concordance +/-	0.927	0.845	0.902	0.778

Aspects quantitatifs (entre LIU et grades)

	NOVA View vs site	Archivé vs œil INOVA	Archivé vs œil site
Coefficient de corrélation de Spearman (rs)	0.561	0.870	0.693



Résultats sérums du site « routine »

Corrélation sur aspects positifs du site : n = 88
entre NOVA View automate vs site (techniques différentes)

	NOVA View vs œil site	H	M	Nu	Cen	M à GNM	Autres
Corrects	23 (26%)	14	7	0	2	0	0
Non reconnus	24 (27%) 21/24 rétablis à archivage	8	7	5	1	3	0
Discordants	7 (8%)	0	3	1	0	0	3
Interprétés négatifs	34 (38%)	16	12	4	0	0	2

14 H1+, 1H2+, 1 H3+, 7 M 1+, 5 M2+, 4 Nu, 2 autres



CONCLUSION

- ✓ Très bonne discrimination des positifs/négatifs
 - ✓ Bonne concordance sur intensités de fluorescence
 - ✓ !! validation nécessite toujours l'interprétation par un biologiste expérimenté (*Intérêt des images d'excellente qualité*)
 - ✓ Amélioration de la reproductibilité entre laboratoires utilisant le même système
 - ✓ Intérêt de s'intégrer dans le SIL
-
- ✓ Mais variabilité inter-laboratoires perdurera (systèmes fermés, techniques différentes)
 - ✓ A évaluer pour les performances cliniques
 - ✓ Développements complémentaires nécessaires



Remerciements

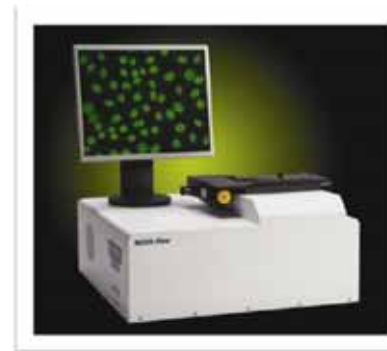
**Secteur d'autoimmunité
Service Immunologie Biologique
Henri-mondor**

Sophie Hüe
Djaouida BENGOUFA
Mylène ROGIER
Catherine DEHOULLE



**Instrumentation Laboratory
INOVA Diagnostics, Inc.
Werfen group**

Sylvia CASAS
Carol BUCHNER



Automated Fluorescence Microscopy of Antinuclear Antibodies by G-Sight (Menarini)

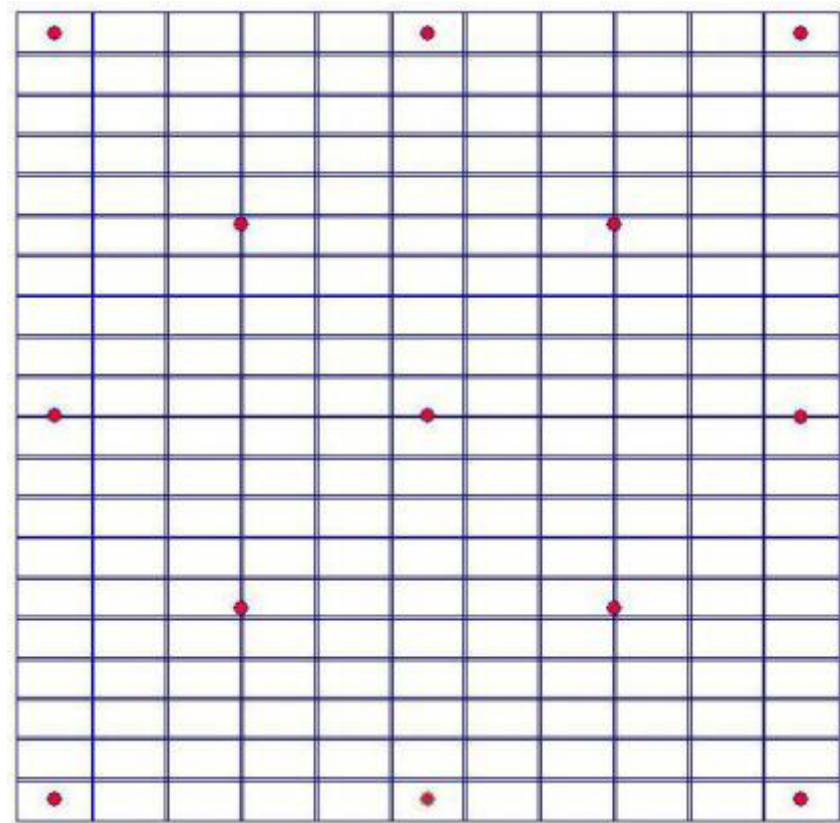
Xavier Bossuyt
UZ Leuven

Automated fluorescence microscopy is increasingly used for image acquisition, quantitative analysis, and pattern recognition of anti-nuclear antibody (ANA) testing.

G-Sight - Menarini

focussing

- Focussing on coating
- Focussing on well on 13 or 5 different points
- Calculation of the best focus on complete well
- Three different modes :
 - Full scan
 - Medium scan
 - Small scan



Positive/negative discrimination

- Exposure time is inversely proportional to intensity of fluorescence
- Probability value is given to samples

Throughput

- Medium scan: 2 min / well – 30 wells / hour
- Number of slides: 8 / session

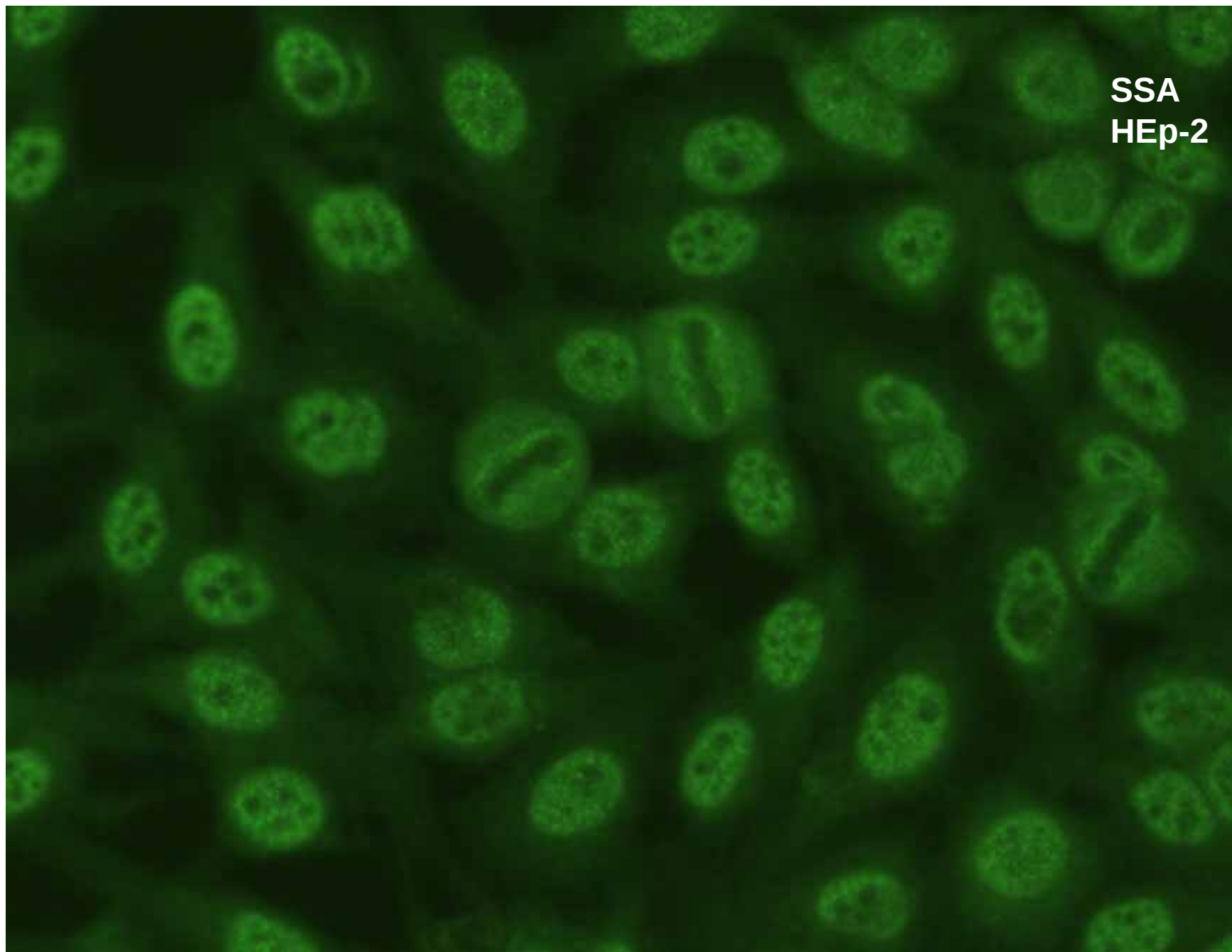
Substrates

- ANA (HEp-2 and HEp-2000)
- ANCA
- dsDNA
- Liver - kidney – stomach
- Primate oesophagus, pancreas, adrenal glands

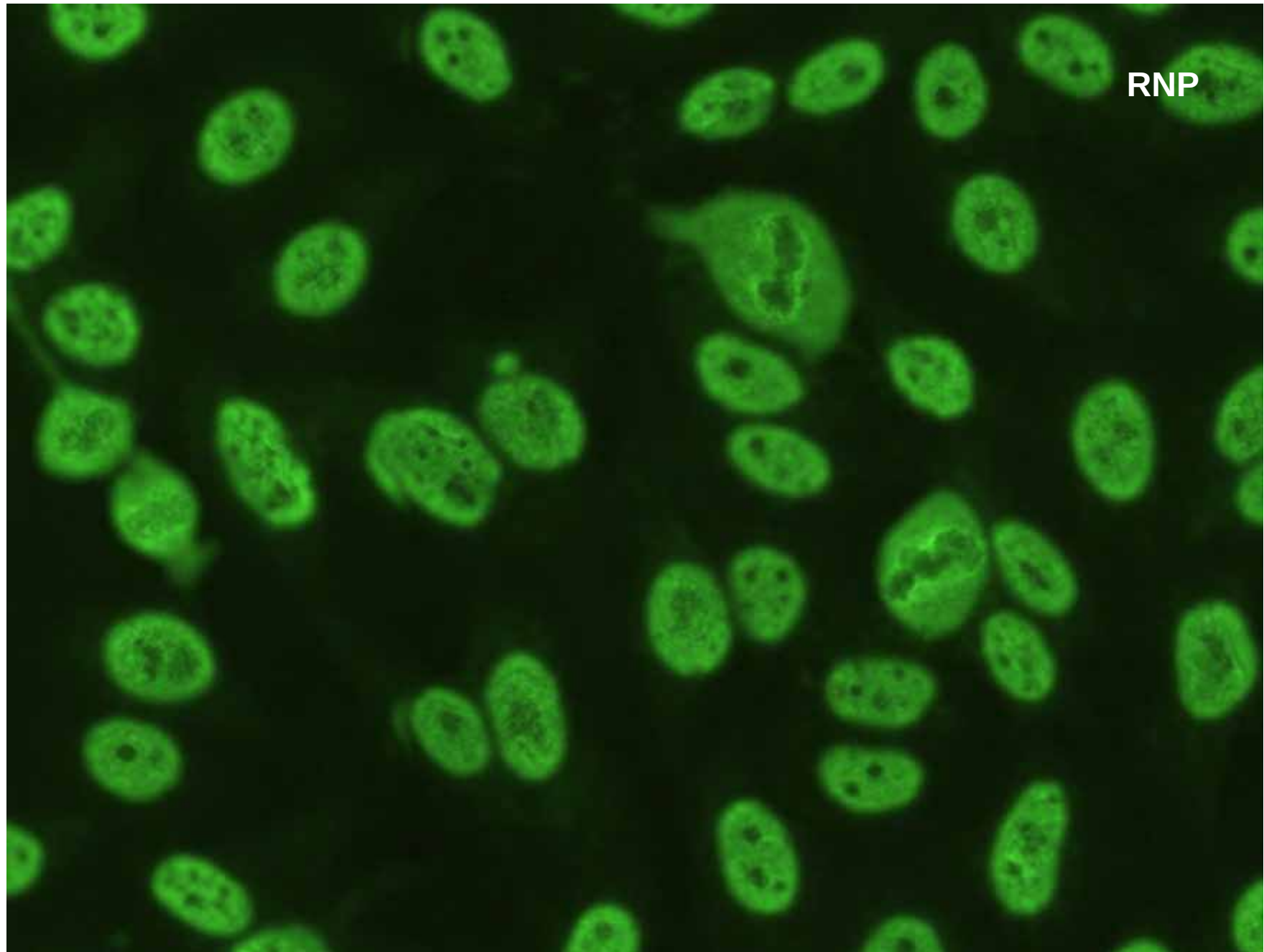
Pattern recognition: ANA

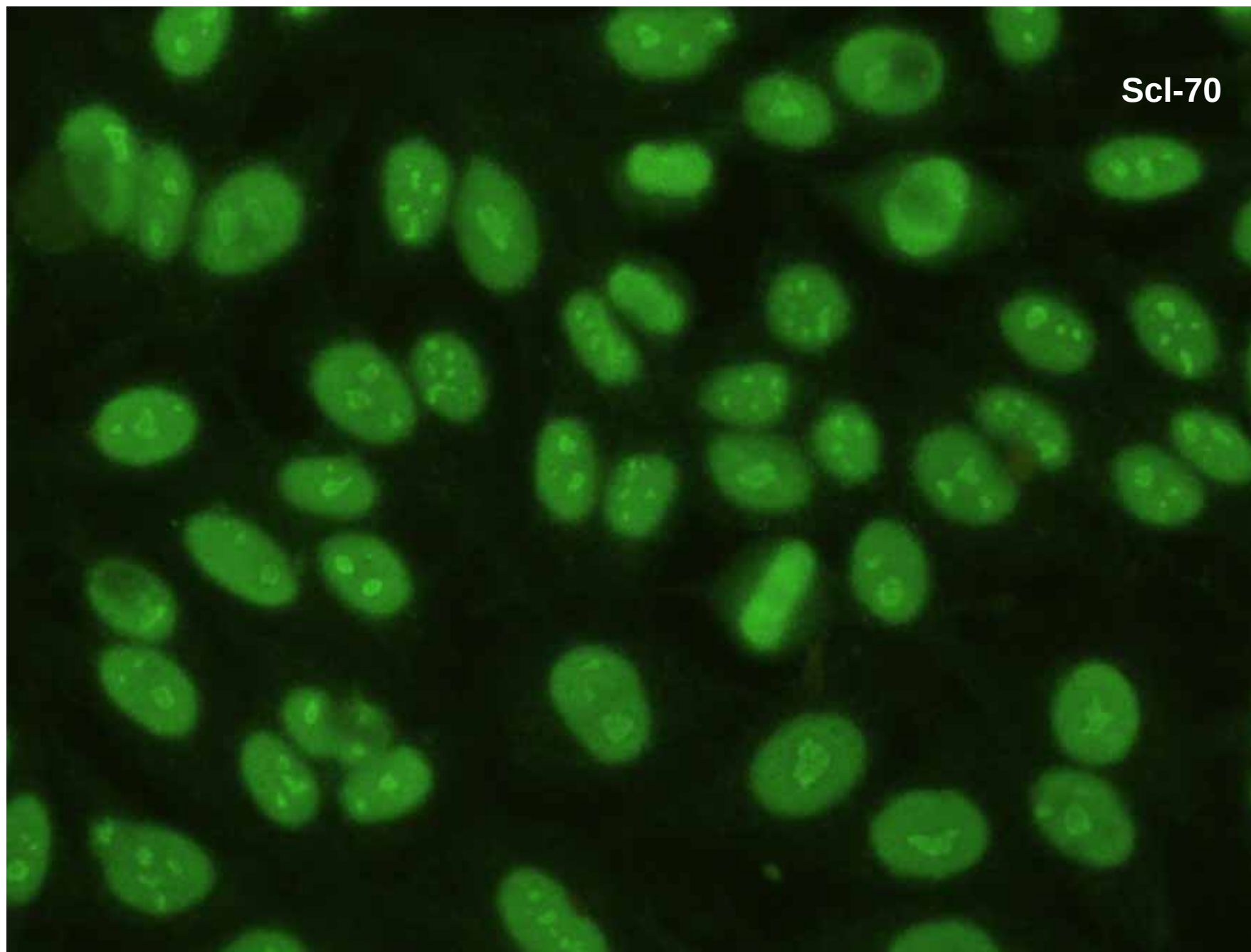
- five patterns:
 - Homogeneous
 - Speckled
 - Centromere
 - Nucleolar
 - Mitochondrial
- Based on statistical, morphological and geometric features

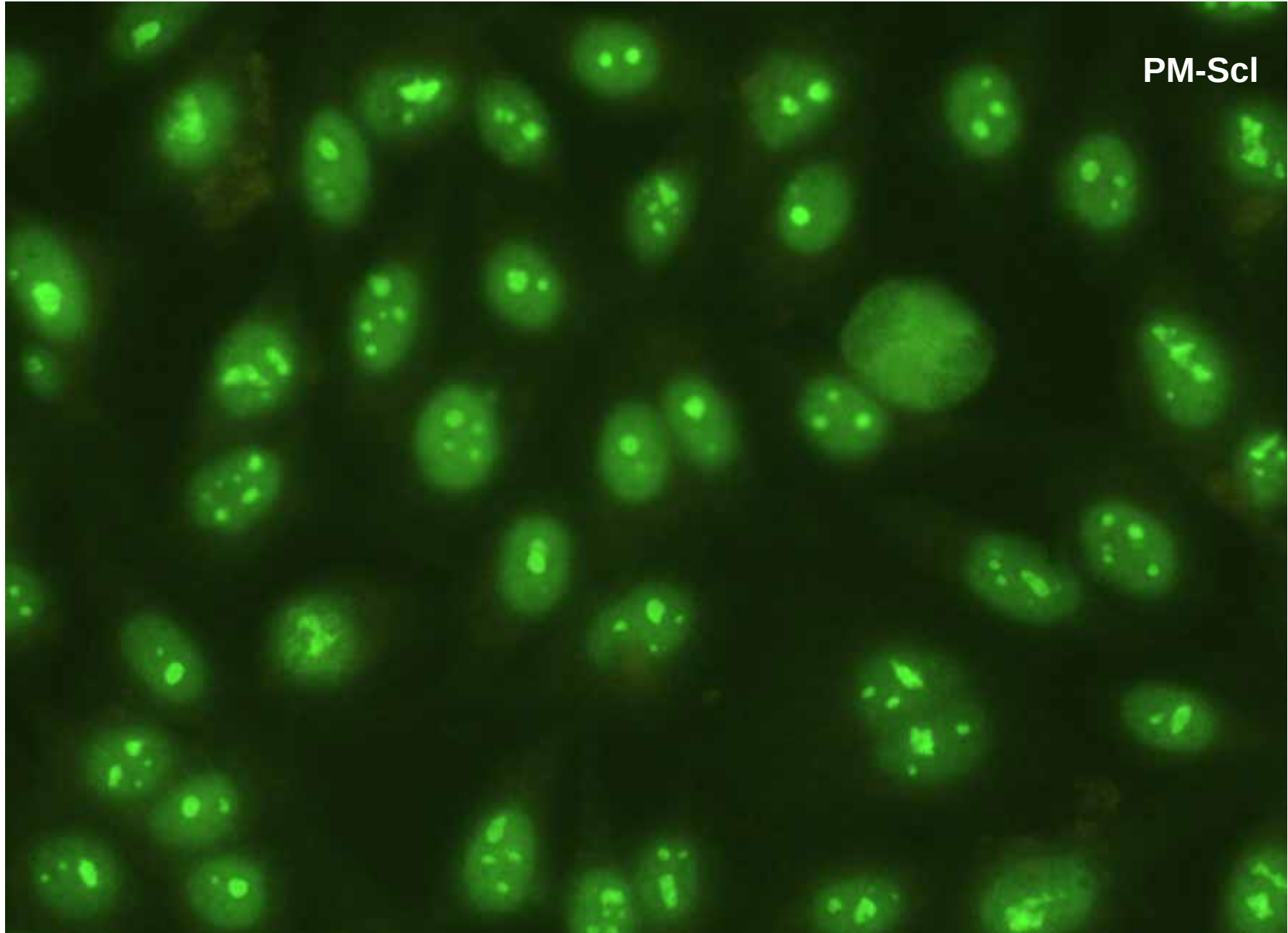
IMAGE ACQUISITION

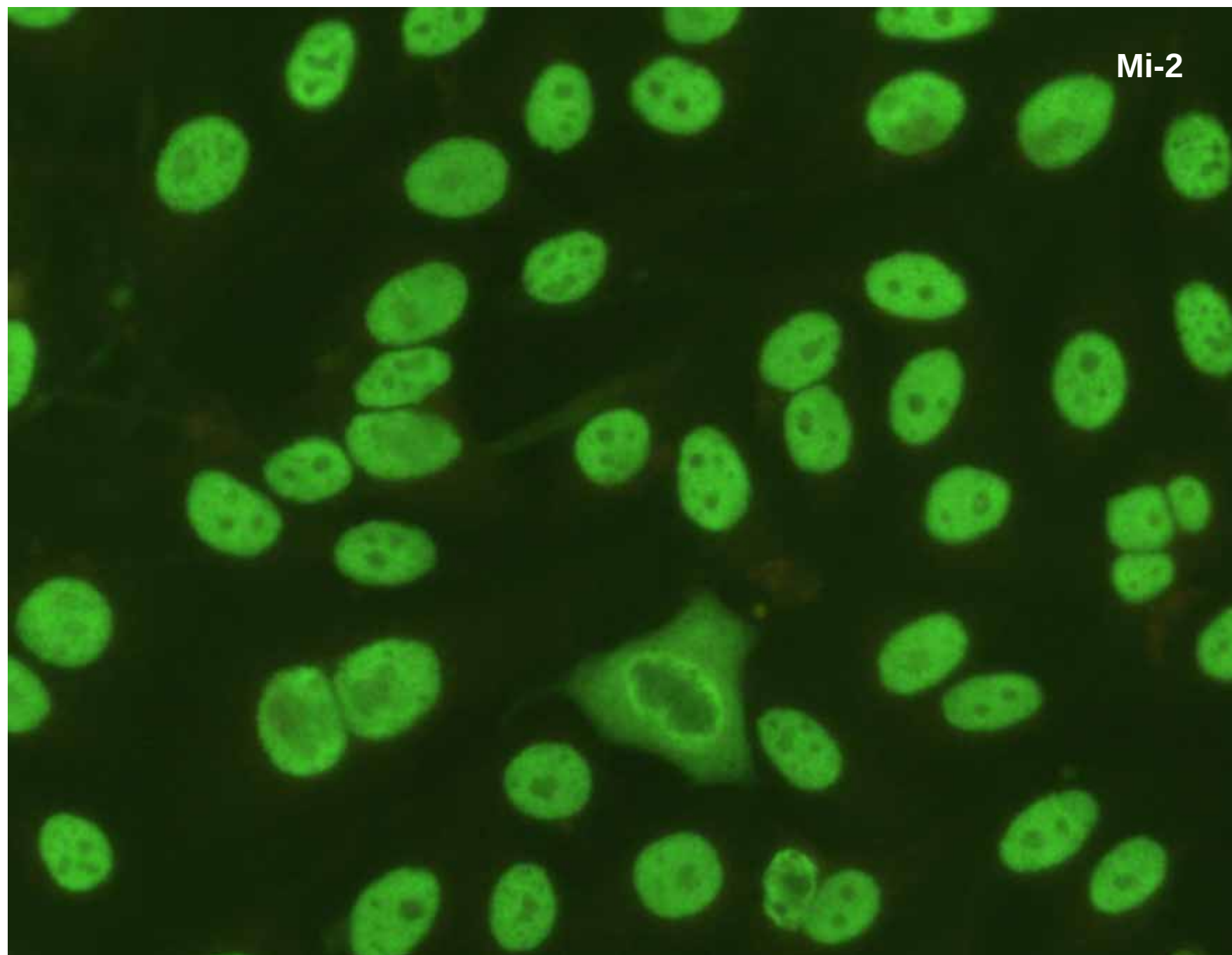


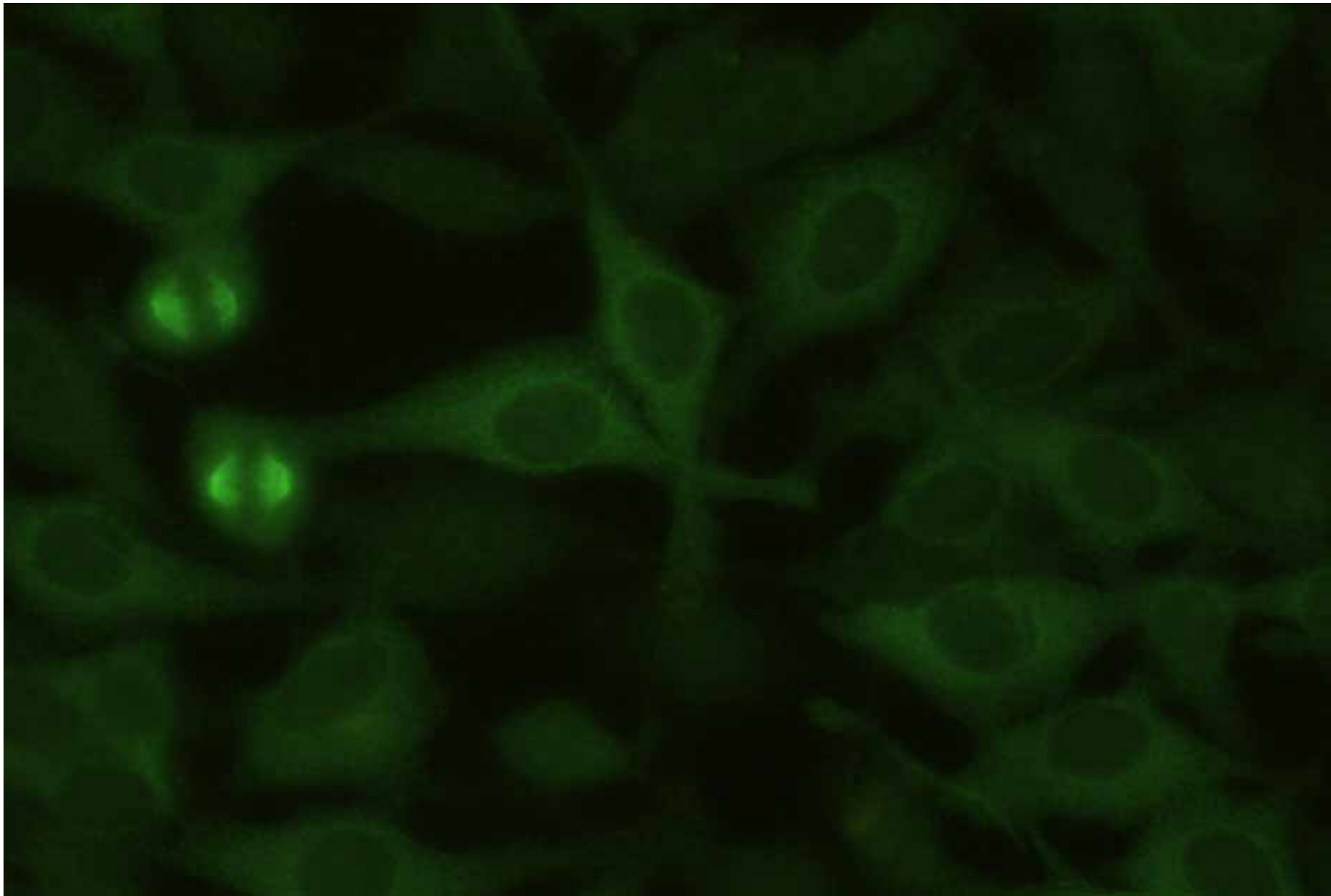
SSA
HEp-2

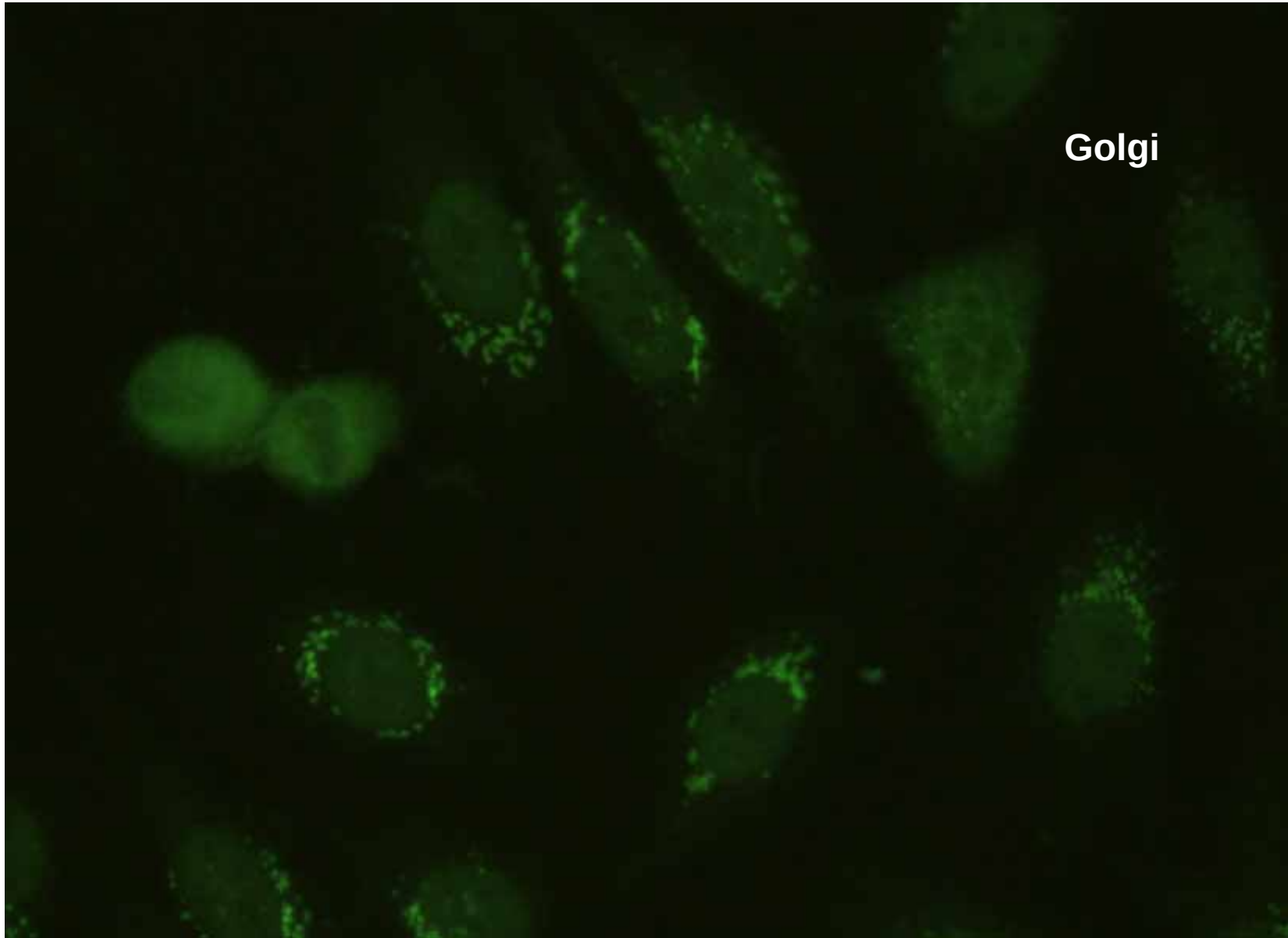




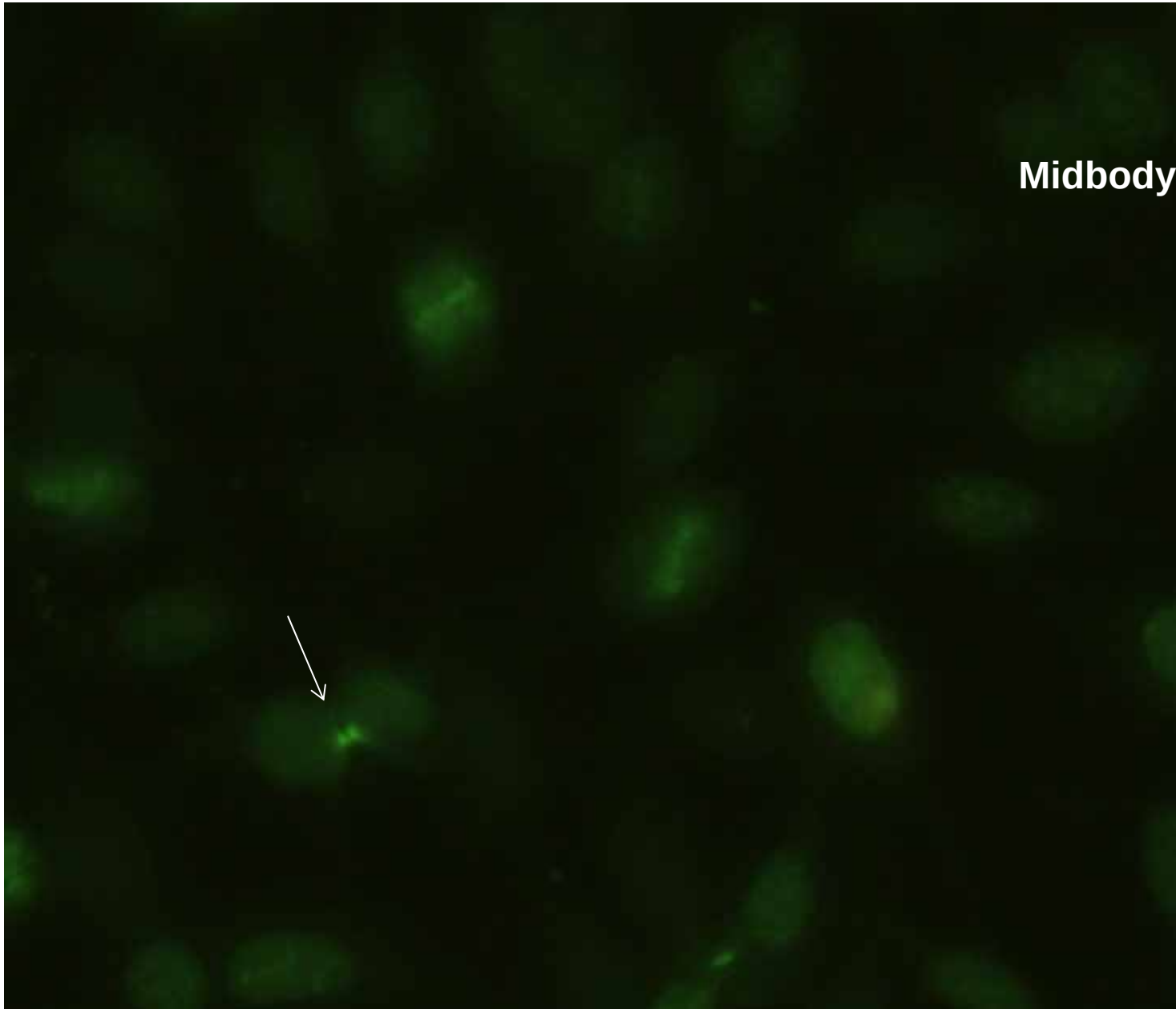


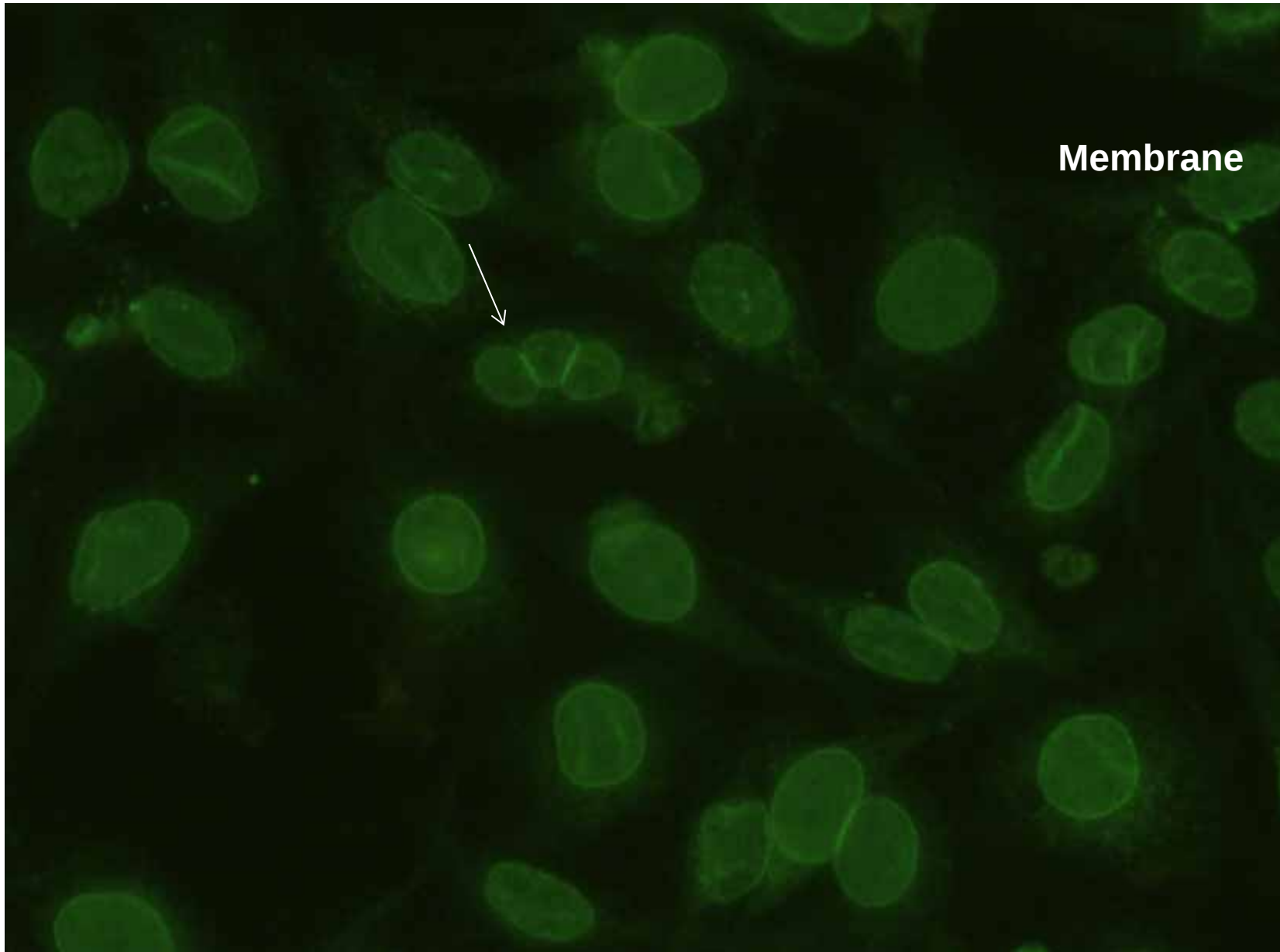


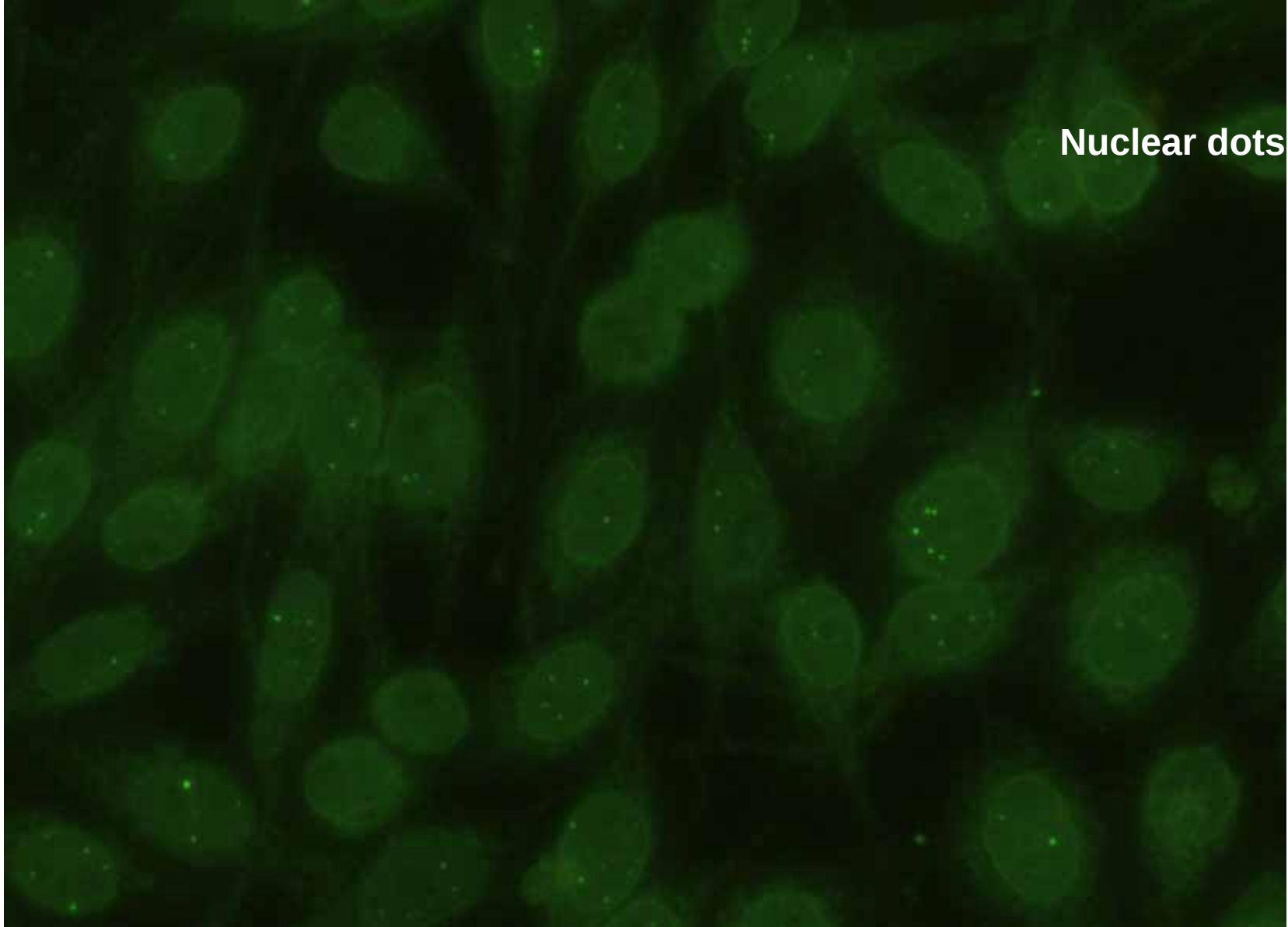




Golgi







Nuclear dots

CONSECUTIVE PATIENTS

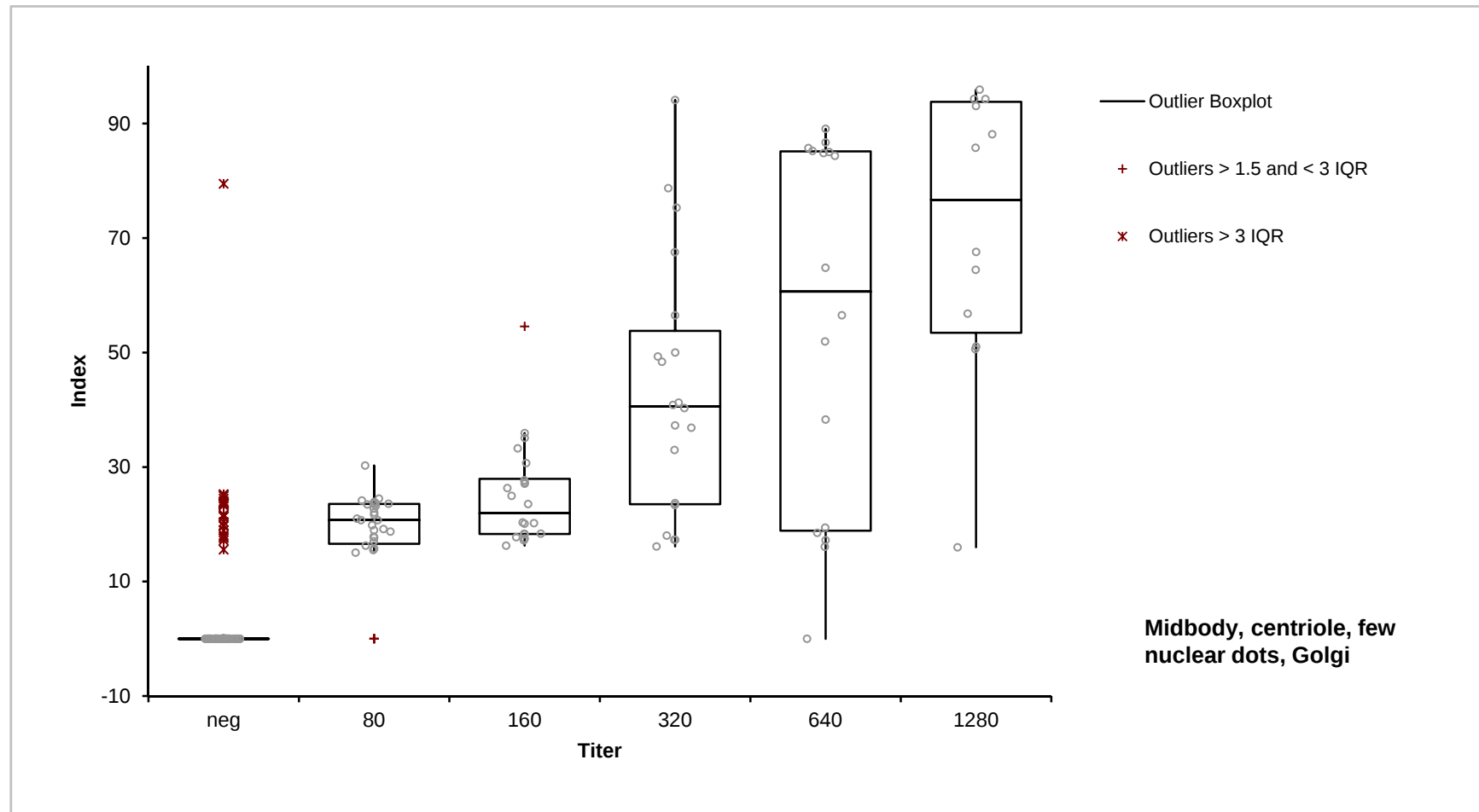
Consecutive samples (n=268)

Good agreement (pos/neg) between

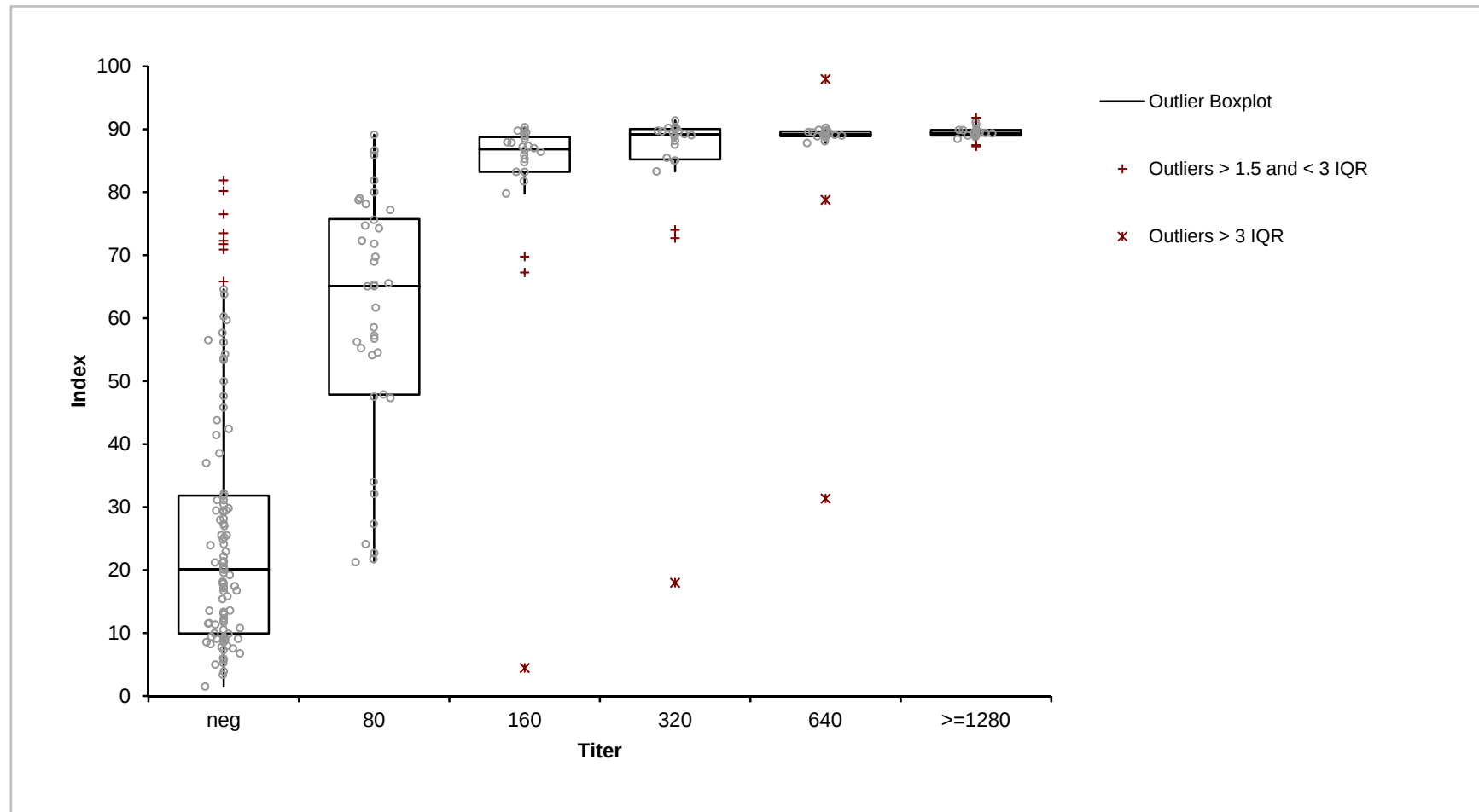
- Manual – automated (0.88)
- HEp-2 – HEp-2000 (0.91)

	Manual	HEp-2000	HEp-2
Negative	141	126	147
Homogeneous + chromosomes	57	50	41
Homogeneous + cytoplasmic speckled	2	2	5
Homogeneous + few nuclear dots	1	2	1
Homogeneous + nucleolar	2	1	
Homogeneous + SSA transfected	1	2	
Fine speckled	19	27	34
Fine speckled + SSA transfected cells	1	8	
Fine speckled + membrane	1	1	
Fine speckled + cytoplasmic speckled		2	1
Fine speckled + cytoplasmic dots			1
Fine speckled + few nuclear dots	3	1	5
Fine speckled + homogeneous	1	2	3
Fine speckled + nucleolar		3	1
Fine speckled + nucleolar + cytoplasmic speckled			1
SSA transfected cells	4		
Coarse speckled		1	1
Matrix speckled		1	
Nucleolar	11	13	2
Nucleolar + Golgi	1		
Nucleolar + cytoplasmic speckled	1		
Nucleolar + midbody	1		
Centromeres	6	7	6
Centromeres + cytoplasmic speckled	1		1
Cytoplasmic fine speckled	8	8	8
Cytoplasmic fine speckled + spindle		1	
Cytoplasmic fine speckled + few nuclear dots	1		1
cytoplasmic fibrillar	1		
Few nuclear dots	1	2	3
Few nuclear dots + membrane		1	1
Few nuclear dots + cytoplasmic speckled	1		
Centrioles	1	1	1
Golgi	1	1	1
Membrane		1	
Spindle - poles			1
Midbody		1	1
pleiomorf / no pattern		3	1
	268	268	268

HEp-2



HEp-2000



Pattern recognition

Visual inspection	Correct assignment by G-Sight HEp-2	Correct assignment by G-sight HEp-2000
Homogeneous (n=42)	68%	92%
Speckled (n=34)	71%	56%
Centromere (n=6)	83%	42%

Pattern recognition

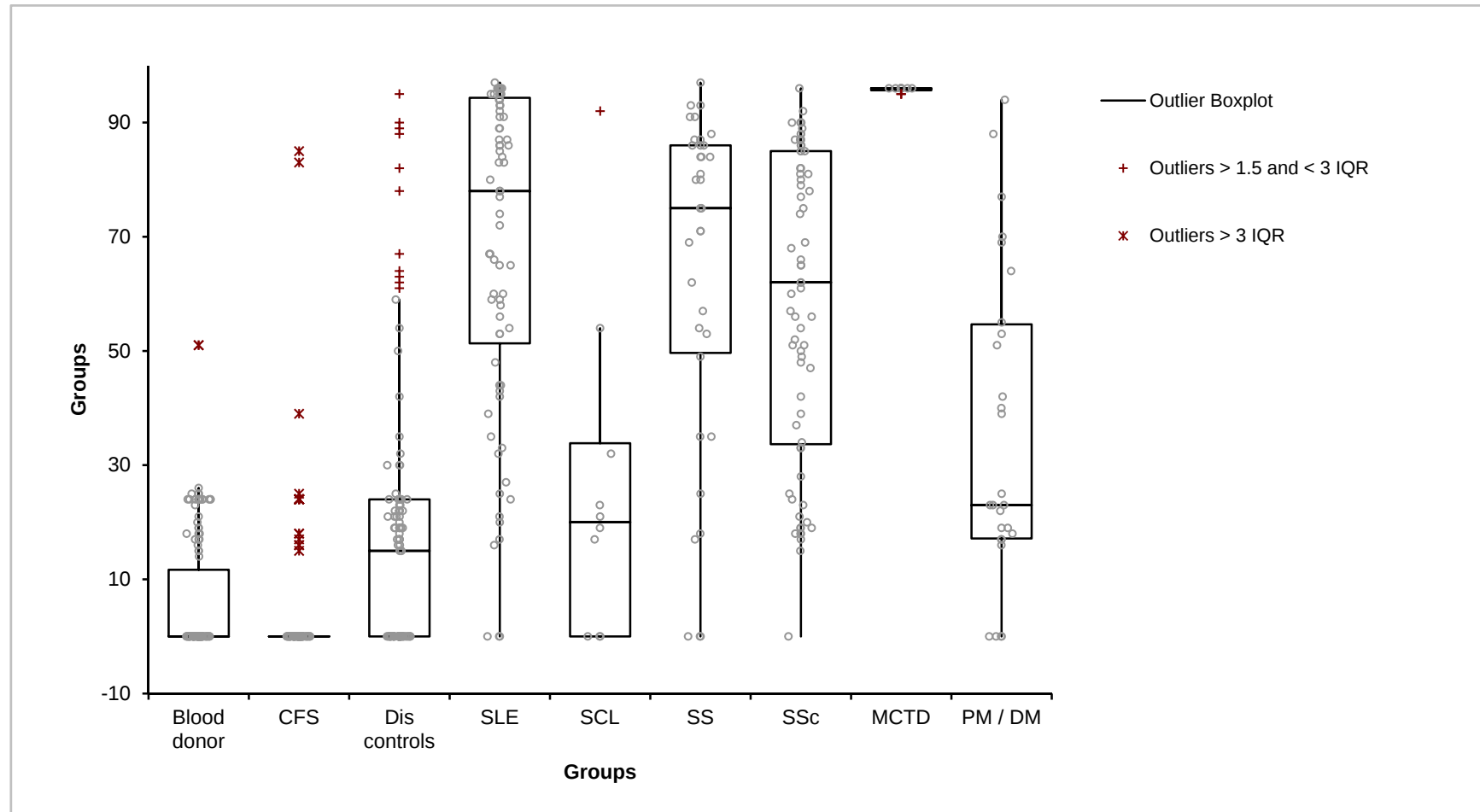
Visual inspection	Correct assignment by G-Sight HEp-2	Correct assignment by G-sight HEp-2000
Homogeneous (n=42)	68%	92%
Speckled (n=34)	71%	56%
Centromere (n=6)	83%	42%

G-Sight	Visual inspection confirmed correct assignment (HEp-2)	Visual inspection confirmed correct assignment (HEp-2000)
Homogeneous (n=45)	78%	78%
Speckled (n=40)	65%	78%
Nucleolar (n=11)	26%	18%
Centromere (n=5)	100%	100%

WELL-DEFINED PATIENTS

Disease	HEp2000 [median (95% CI)]	HEp2 [median (95% CI)]
Blood donors (143)	37 (29-46)	0 (0-0)
Chronic fatigue syndrome (134)	20.5 (17-25)	0 (0-0)
Diseased controls (133)	53 (37-72)	15 (0-19)
Systemic lupus erythematosus (77)	89 (89-90)	78 (65-87)
Subacute cutaneous lupus (10)	85 (18-90)	20 (0-54)
Sjögren's syndrome (35)	89 (88-90)	75 (57-84)
Systemic sclerosis (69)	89 (89-89)	62 (51-77)
Mixed connective tissue disease (13)	89 (87-90)	96 (95-96)
Polymyositis/dermatomyositis (27)	85 (74-89)	23 (18-53)

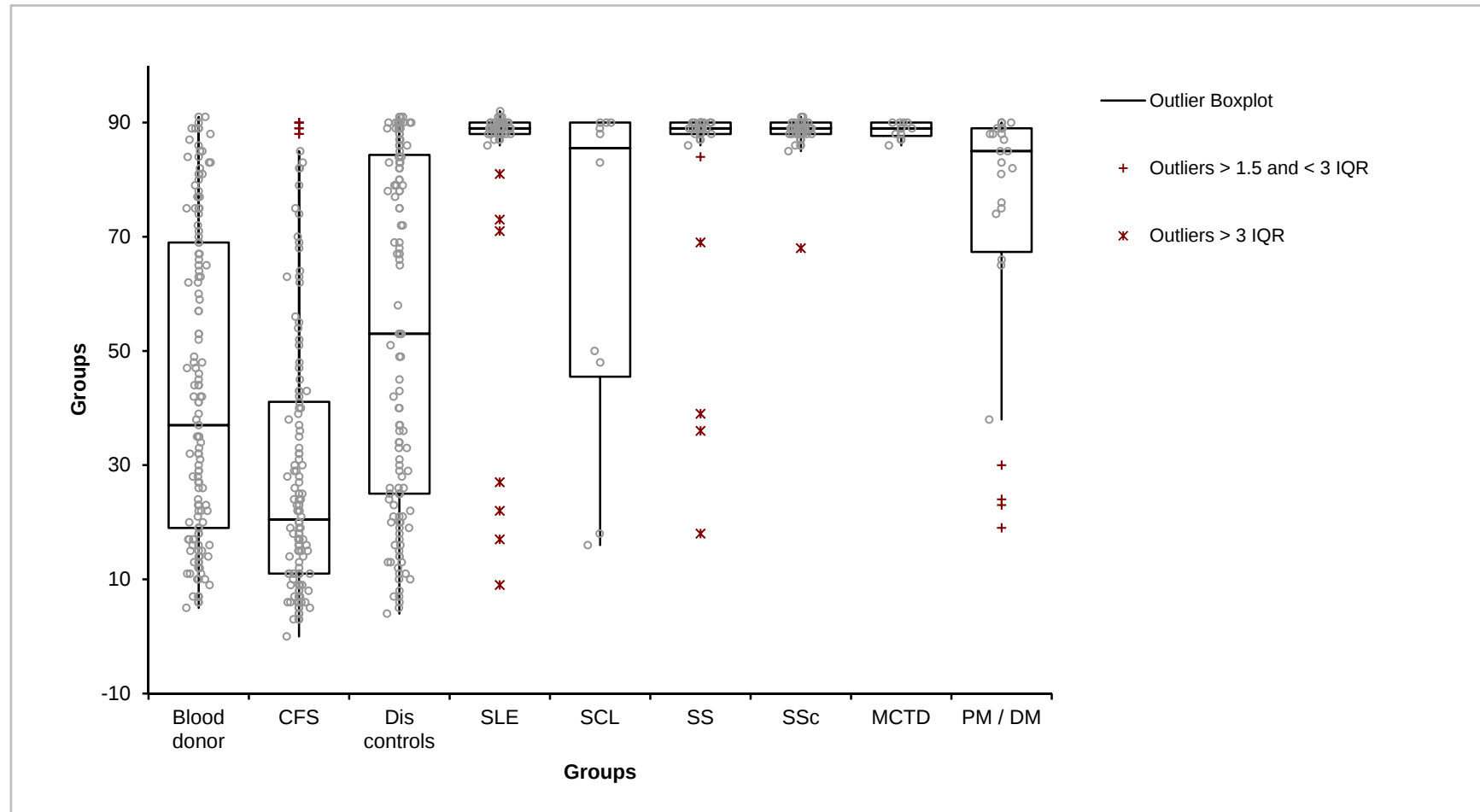
HEp2



	CONTROLS	SLE	SCL	SS	SSc	MCTD	PM / DM
<=10	0,70	0,04	0,30	0,09	0,01	0,00	0,15
11<=30	0,25	0,09	0,40	0,09	0,20	0,00	0,41
31<=50	0,02	0,12	0,10	0,09	0,14	0,00	0,11
51 <=85	0,03	0,32	0,10	0,43	0,42	0,00	0,26
>85	0,01	0,43	0,10	0,31	0,22	1,00	0,07

LR	SLE	SCL	SS	SSc	MCTD	PM / DM
<=10	0,06	0,43	0,12	0,02	0,00	0,21
11<=30	0,37	1,61	0,34	0,82	0,00	1,64
31<=50	6,85	5,86	5,02	8,49	0,00	6,51
51 <=85	12,10	3,73	15,97	15,67	0,00	9,66
>85	43,93	10,25	32,21	22,28	102,50	7,59

HEp2000



Conclusions

- High quality image acquisition
- Significant correlation between intensity and antibody titer. Fluorescence intensity provides clinically useful information
- Allows for harmonization of lab results
- Accuracy of pattern recognition is limited
- Low throughput

Acknowledgements

- Sarah Cooreman
- Heidi De Baere
- Dr Godelieve Mariën