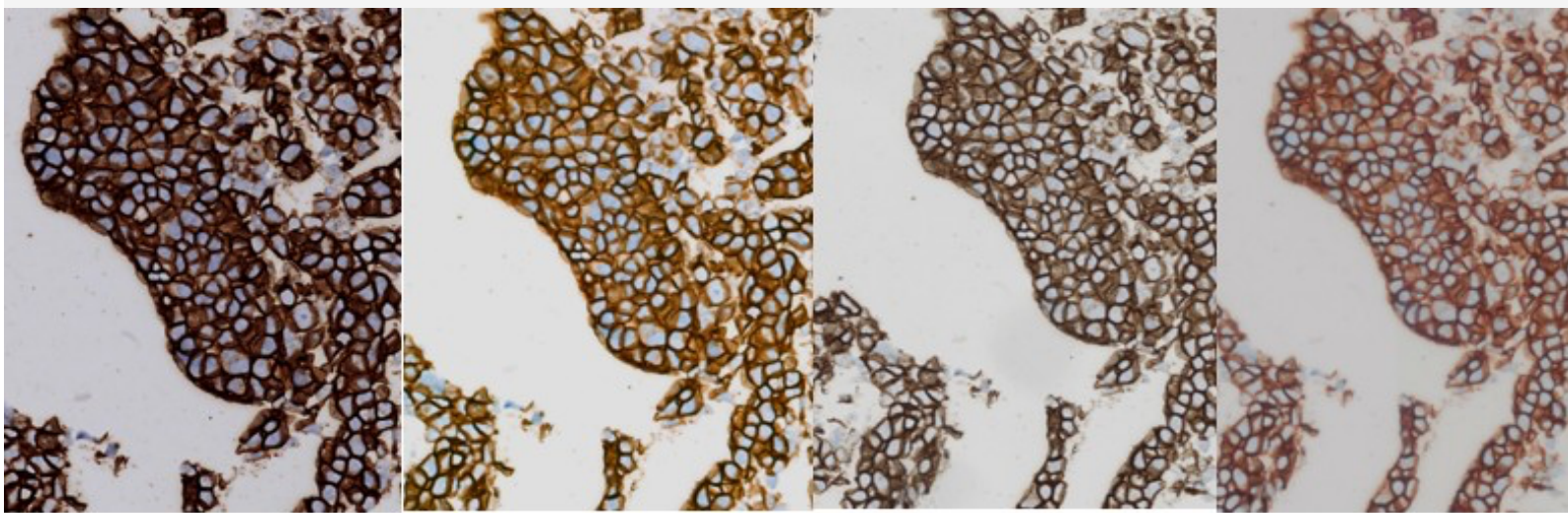


Vurdering af variation i billedkvalitet mellem 11 WSI-skannere sat i relation til mammacancerdiagnostik

Professionsbachelorprojekt, bioanalytikeruddannelsen, VIA University College



Udarbejdet af:

Ida Skov Sekkelund (292023)
Maja Isabella Hunt (292737)
Rikke Hansen (292684)

Vejledere:

Uddannelsesansvarlig bioanalytiker
Marianne Schou Martiny (marimart@rm.dk)

Lektor, cand. scient
Anne Sofie Landbo (asl@via.dk)

Antal tegn: 70.000

Dato for aflevering:
21. december 2022

Forord

Dette bachelorprojekt er udarbejdet i efteråret 2022 på Patologi, Aarhus Universitetshospital af bioanalytikerstuderende Ida Skov Sekkelund, Maja Hunt og Rikke Hansen. Projektet er skrevet til personer, der enten arbejder med eller har interesse for digital patologi.

Vi vil gerne takke forskningsbioanalytiker Kristina Lystlund Lauridsen for hendes store ekspertise og vejledning samt interesse i projektet. Kristina har, med sit store netværk inden for digital patologi, hjulpet os med at komme i kontakt med afdelinger og virksomheder, der var i besiddelse af skannere.

Derudover vil vi gerne sige tak til Oliver Benting fra Axlabs, Gizem Coban fra Leica Biosystems og Maria Kristensen fra Agilent, som har stillet deres skannere til rådighed og hjulpet os med at digitalisere vores objektglas.

Der skal også lyde stor tak til vores bachelorvejledere Marianne Schou Martiny (uddannelsesansvarlig bioanalytiker) og Anne Sofie Landbo (lektor ved VIA University College) for deres kompetente og ærlige vejledning. Det har været meget værdsat.

Abstract

Baggrund: Inden for det patologiske speciale er der fokus på digitalisering, hvilket blandt andet omfatter digitaliseringen af vævssnit ved brug af skannere. Globalt er der få patologi-afdelinger, der er fuldt digitaliserede i det histologiske rutinearbejde. Der er ingen nationale retningslinjer for, hvilke skannere der skal anvendes, og de enkelte afdelinger kan derfor have skannere fra forskellige producenter. Det er derfor relevant at undersøge, om der er variation i billedkvalitet ved anvendelse af forskellige skannere, og om eventuel variation i billedkvalitet kan få betydning for mammacancerpatienters diagnose, prognose og behandling.

Formål: Formålet med projektet er at undersøge, hvorvidt der er variation i billedkvaliteten, illustreret ved pixelværdier, når der anvendes skannere fra forskellige producenter og modeller fra samme producent.

Metode: I projektet blev der inkluderet 11 forskellige skannere. På hver skanner blev der digitaliseret 20 Cell Micro Arrays, hvoraf 10 var immunhistokemisk farvet for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) og 10 for Ki67. For HER2 blev der udvalgt cores kategoriseret som 2+ og 3+, og for Ki67 blev der udvalgt cores med proliferationsindekser på 15% og 100%. I Visiopharm Integrator System blev der defineret Region of Interest samt udarbejdet to digital billedanalyse protokoller (DIA) til identifikation og kvantificering af henholdsvis HER2 og Ki67. Ved brug af DIA-protokollerne blev der beregnet arealer af DAB i udvalgte cores. Disse arealer blev anvendt til at udarbejde søjle- og punktdiagrammer.

Resultater: Det fremgår, at der er variation mellem de inkluderede skannerne. Variationen er, i de fleste tilfælde, mindre mellem skannere fra samme producent og ligeledes inden for samme skannermodel end mellem skannere fra forskellige producenter. For HER2 gælder det at cores, kategoriseret som 2+, har en større procentvis afvigelse fra referenceskanneren end cores, der er kategoriseret som 3+. For Ki67 varierer det, om den procentvise afvigelse er størst for cores med et proliferationsindeks på 15% eller 100%. Der ses desuden en visuel variation i de digitale billedfiler.

Konklusion: Anvendelsen af forskellige skannere har betydning for billedkvaliteten, da der ses variation i billedkvaliteten mellem de 11 skannere. Variationen påvirker både detektionen af HER2 og Ki67. Tages der ikke højde for denne variation i billedkvalitet mellem skannere, kan det formodes at få en konsekvens for mammacancerdiagnostik.

Forkortelsesliste

WSI-skanner: Whole slide imaging skanner (omtales fremadrettet skanner)

DIPA: Digital patologi

DM: Digital mikroskopi

DIA: Digital billedanalyse

IHC: Immunhistokemi

HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

CMA: Cell Micro Array

ROI: Region of interest

Pixels: Picture elements

VIS: Visiopharm Integrator System

AI: Artificial intelligence

ML: Machine learning

DL: Deep learning

PAI: Patologi

AUH: Aarhus Universitetshospital

Indholdsfortegnelse

1 INTRODUKTION.....	7
1.1 BAGGRUND.....	7
1.2 FORMÅL.....	8
1.3 PROBLEMFOMULERING.....	8
1.4 MÅLFORMULERINGER.....	8
2 TEORI.....	9
2.1 MAMMACANCER.....	9
2.2 HER2.....	9
2.3 KI67.....	11
2.4 DIGITAL PATOLOGI.....	11
2.4.1 Skannere.....	11
2.4.2 Billeders opbygning.....	12
2.4.3 Artificial Intelligence og digital billedanalyse.....	13
3 METODE.....	15
3.1 VALG AF PRØVEMATERIALE.....	15
3.1.1 HER2 Cell Micro Arrays fra HistoCyte Laboratories.....	15
3.1.2 Ki67 Cell Micro Arrays fra ArrayScience.....	16
3.1.3 Anvendte Cell Micro Arrays til databehandling.....	17
3.2 SKANNERE OG DIGITALISERINGSKRITERIER.....	18
3.2.1 Valg af skannere.....	18
3.2.2 Digitaliseringskriterier.....	20
3.3 VISIOPHARM INTEGRATOR SYSTEM.....	20
3.3.1 Region Of Interest.....	20
3.3.2 Digitale billedanalyseprotokoller.....	21
3.4 OVERSIGT OVER FORSØGSDESIGN.....	24
3.4 DATABEHANDLING.....	24
4 RESULTATER.....	25
4.1 VISUEL VURDERING AF VARIATION I SKANNERNE.....	25
4.2 HER2 1.....	26
4.2.1 Søjlediagram.....	26
4.2.2 Procentvis afvigelse fra S360 1.....	27
4.3 HER2 5.....	28
4.3.1 Søjlediagram.....	28
4.3.2 Procentvis afvigelse fra S360 1.....	29

4.4 HER2 6	30
4.4.1 Søjlediagram	30
4.4.2 Procentvis afvigelse fra S360 1.....	31
4.5 Ki67 5	32
4.4.1 Søjlediagram	32
4.4.2 Procentvis afvigelse fra S360 1.....	33
4.6 Ki67 7	34
4.6.1 Søjlediagram	34
4.6.2 Procentvis afvigelse fra S360 1.....	35
4.7 Ki67 8	36
4.7.1 Søjlediagram	36
4.7.2 Procentvis afvigelse fra S360 1.....	37
4.8 DELKONKLUSION.....	38
5 DISKUSSION.....	39
5.1 DISKUSSION AF METODE.....	39
5.1.1 Valg af prøvemateriale.....	39
5.1.2 Valg af skannere.....	39
5.1.3 Digitaliseringskriterier	40
5.1.4 Region Of Interest	40
5.1.5 Digitale billedanalyseprotokoller.....	41
5.1.6 Databehandling.....	42
5.2 DISKUSSION AF RESULTATER.....	42
5.2.1 Vurdering af skannere fra samme producent.....	42
5.2.2 Vurdering af skannere på tværs af producenter	44
5.2.3 HER2	45
5.2.4 Ki67	46
5.2.5 Resultaternes betydning for mammacancerdiagnostik	46
5.3 ARBEJDSGANG OG KVALITETSSIKRING.....	47
6 KONKLUSION	48
7 PERSPEKTIVERING	48
8 REFERENCELISTE	49
9 BILAGSLISTE.....	53
10 FIGURLISTE	54
11 TABELLISTE	56

1 Introduktion

1.1 Baggrund

Internationalt er der fokus på digitalisering af sundhedsvæsenet for blandt andet at imødekomme en øget sygdomskompleksitet og et behov om effektivisering (1). Dette gør sig også gældende i Danmark, hvor der, inden for det patologiske speciale, særligt er interesse for digital patologi (DIPA) (2). DIPA er et bredt begreb, der blandt andet omfatter digitaliseringen af vævssnit ved brug af skannere, digital mikroskopi (DM) og digital billedanalyse (DIA) (3). En digitalisering af det patologiske speciale giver blandt andet mulighed for deling af digitale billedfiler på tværs af regioner og landegrænser, hvilket i sidste ende kan føre til hurtigere og mere specialiseret udredning af patienter (4). En anden fordel er, at DIA kan være medvirkende til at standardisere samt øge reproducerbarheden sammenlignet med konventionel vurdering, der bygger på den enkelte patologs semikvantitative vurdering (5). DIA kan derved medføre øget reliabilitet under forudsætning af, at kvaliteten af de digitaliserede vævssnit er tilfredsstillende og konsekvente. Digitaliseringen af vævssnit forventes at blive en bioanalytikerfaglig arbejdsopgave, og da kvalitetsbevidsthed er en af bioanalytikernes kernekompetencer (6), er det nærliggende, at skannerne og billedkvaliteten kvalitetssikres af bioanalytikere.

Globalt er der få patologifdelinger, der er fuldt digitaliserede i det histologiske rutinearbejde (7). Der er ingen nationale retningslinjer for, hvilke skannere der skal anvendes på de enkelte patologifdelinger, og af den grund står afdelingerne over for et valg om, hvilke skannere der skal anvendes i forbindelse med implementeringen af DIPA (8). Både nationalt og internationalt er størstedelen af arbejdet med DIPA stadig på forskningsbasis, hvilket fremgår af den videnskabelige litteratur. Der er blandt andet publiceret metodesammenligninger, hvor DM og DIA sammenholdes med konventionel manuel mikroskopering og vurdering (9)(10). Der er også enkelte studier, der sammenligner skannere. Et ældre studie fra 2006 undersøger skannere fra forskellige producenter med henblik på at specificere og vurdere skannernes tekniske funktioner (11). Der er dog mangel på studier, der undersøger, hvorvidt der er variation i billedkvalitet, når der anvendes skannere fra forskellige producenter, og om det har en betydning for den enkelte patient. Det er derfor vigtigt at klarlægge, om en variation i billedkvalitet kan være udslagsgivende for DIA-protokollers vurdering af immunhistokemiske (IHC) farvninger og dermed for diagnostik, prognose og behandling.

I dette projekt har vi valgt at undersøge, om der ses variation i billedkvaliteten af IHC-farvede, digitaliserede Cell Micro Arrays (CMA'er), når der anvendes forskellige skannere, og om det har en betydning for mammacancerdiagnostik. Mammacancer er en af de hyppigste kræftformer i Danmark (12) og dermed et højaktuelt organområde inden for det patologiske speciale. Desuden er det en

velundersøgt cancertype inden for DIPA (13). I projektet er der udvalgt to IHC-markører, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) og Ki67, som er relevante for mammacancerdiagnostik. Projektet forventes at bidrage med ny viden om skanneres billedkvalitet illustreret ved pixelværdier, samt om valget af skanner har betydning for DIA-protokollers aflæsning af IHC-farvninger.

1.2 Formål

Formålet med projektet er at undersøge, hvorvidt der er variation i billedkvaliteten, illustreret ved pixelværdier, når der anvendes skannere fra forskellige producenter og skannermodeller fra samme producent.

1.3 Problemformulering

Hvilken betydning har anvendelsen af forskellige skannere for billedkvaliteten og derved for den efterfølgende detektion af Ki67 og HER2, samt hvilken betydning kan det have for mammacancerdiagnostik?

1.4 Målformuleringer

For at besvare problemformuleringen vil vi:

- Digitalisere 20 CMA'er (10 HER2 og 10 Ki67) ved at anvende seks eksterne og fem interne skannere (Patologi, Aarhus Universitetshospital), hvoraf én er reference.
- Definere aflæsningsområdet og adskille de enkelte cores ved at definere en Region Of Interest (ROI).
- Beregne arealer for henholdsvis HER2 og Ki67 ved at udarbejde DIA-protokoller baseret på pixelværdier fra referenceskannerens digitaliserede billedfiler.
- Illustrere arealerne fra DIA-protokollerne ved at udarbejde søjlediagrammer.
- Beregne og illustrere den procentvise afvigelse fra referenceskanneren ved at udarbejde punktdiagrammer.
- Vurdere om der er visuel variation ved at sammenholde digitale billedfiler fra de inkluderede skannere.
- Vurdere betydningen af skannernes billedkvalitet i relation til mammacancerdiagnostik ved at inddrage resultaterne fra søjlediagrammerne, punktdiagrammerne samt den visuelle vurdering.

2 Teori

2.1 Mammacancer

I perioden 2016-2020 var incidensen af mammacancer i Danmark 4870 pr. år, hvilket svarer til ca. 23% af alle nye kræfttilfælde i samme periode. Mammacancer optræder hyppigst hos postmenopausale kvinder (14). Mammacancer inddeles overordnet i de histopatologiske subtyper duktale og lobulære karcinomer, hvor de duktale karcinomer udgør omkring 80%, mens de lobulære udgør omkring 10%. De sidste 10% fordeler sig på andre subtyper (15). Karcinomerne inddeles desuden i molekulære subtyper, der har betydning for patientens prognose og er vejledende i forhold til valg af behandling. Som et led i at fastlægge den molekulære subtype, udarbejdes der en IHC-profil, som blandt andet er baseret på markørerne HER2 og Ki67. På baggrund af IHC-profilen inddeles karcinomerne i fire subtyper. Disse er illustreret i tabel 1 (16).

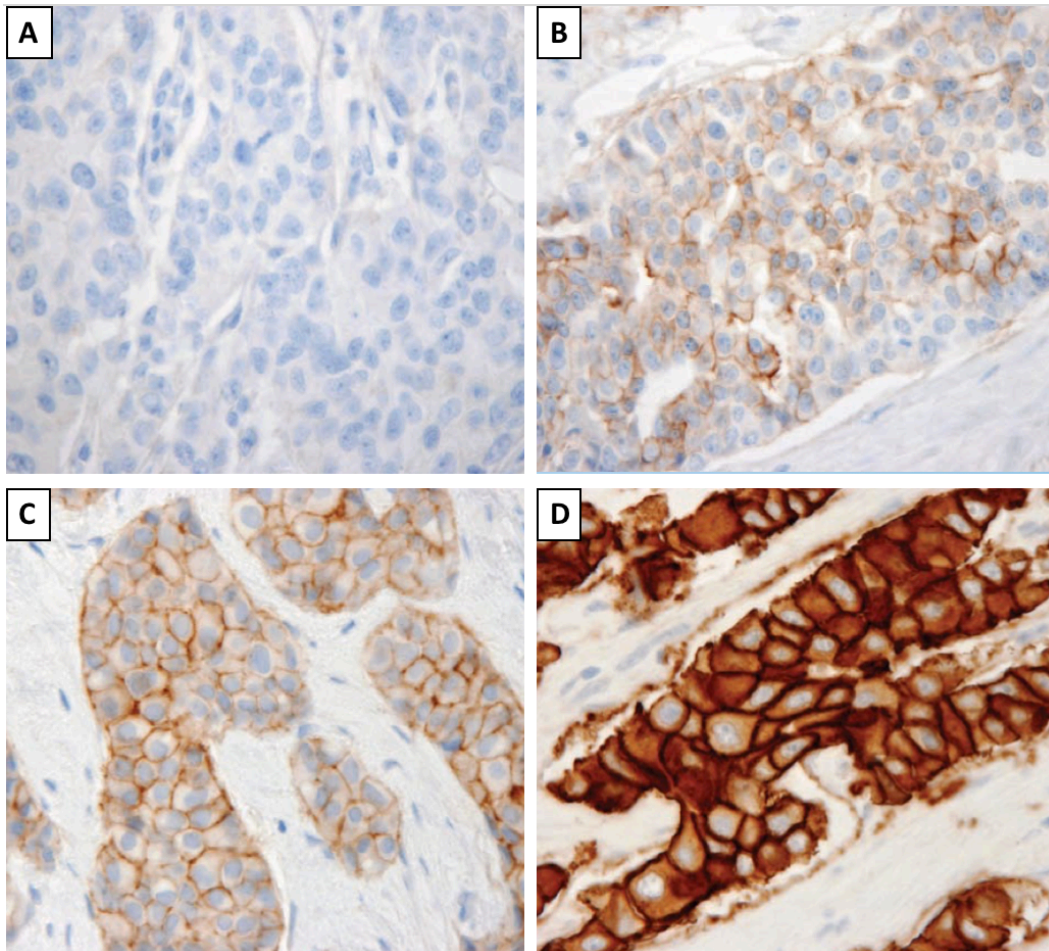
Molekylær subtype		Østrogen-receptor	Progesteron-receptor	HER2	Ki67 (proliferationsindeks)	Prognose
Luminal A		+	+	-	Lavt	Fremragende
Luminal B	HER2-negativ	+	+	-	Lavt til højt	Intermediær
	HER2-positiv	+	+	+	Lavt til højt	
HER2 enriched		-	-	+	Ofte højt	Dårlig
Basal-like		-	-	-	Ofte højt	Dårlig

Tabel 1: Immunhistokemisk profil for de molekulære subtyper af mammakarcinomer samt prognose (16).

2.2 HER2

HER2 (ERBB2-genet) er en prædiktiv markør, der anvendes til at afgøre, hvorvidt en mammacancerpatient er egnet til at modtage targeteret anti-HER2 behandling. HER2 er en tyrosinkinase-receptor lokaliseret i cellemembranen, der, ved binding af en vækstfaktor, stimulerer til kontrolleret celledeling. Omkring 15% af mammacancerpatienter har overekspression af HER2 i cellemembranen, hvilket resulterer i, at tumorcellerne deler sig ukontrolleret.

Bestemmelse af HER2-status ud fra IHC-farvning bygger på en semikvantitativ vurdering, hvor patologen vurderer mængden af tumorceller med membranreaktion. Vurderingen tager udgangspunkt i både intensiteten og kompletheden af membranreaktionerne, og baseret på dette inddeles HER2-status i enten 0, 1+, 2+ eller 3+ (se figur 2) (10).



Figur 2: Eksempler på de fire kategorier (17) til aflæsning af HER2-status på invasive makkarcinomer ud fra gældende retningslinjer.

A. 0: Ingen reaktion eller svag inkomplet membranreaktion i $\leq 10\%$ af tumorcellerne.

B. 1+: Svag til moderat inkomplet membranfarvning i $> 10\%$ af tumorcellerne.

C. 2+: Svag til moderat komplet membranfarvning i $> 10\%$ af tumorcellerne, eller komplet og kraftig membranfarvning i $\leq 10\%$ af tumorcellerne.

D. 3+: Kraftig komplet membranfarvning i $> 10\%$ af tumorcellerne (15).

Hvis HER2-status vurderes til 0 eller 1+, kategoriseres dette som negativ for HER2. Aflæses HER2-status til 3+, betyder det, at patienten har overekspression af HER2. Dette kategoriseres som HER2-positiv, og patienten kan dermed modtage targeteret anti-HER2-behandling (15). Targeteret behandling ved HER2-positivitet virker ved brug af antistoffer, der blokerer HER2-receptorerne i cellemembranen. Dette resulterer i, at kræftcellernes ukontrollerede deling hæmmes (18). Vurderes

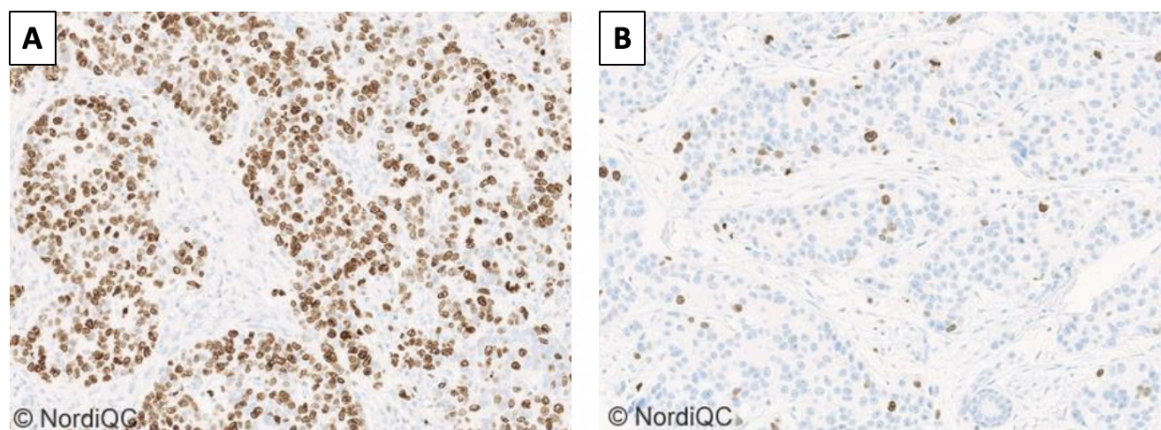
HER2-status til 2+, udføres der In Situ Hybridisering (ISH) på IHC-farvningen for at fastlægge genstatus og dermed be- eller afkræfte ERBB2-genamplifikation hos patienten (15).

2.3 Ki67

Ki67 (MKI67-genet) er et kerneprotein, der udtrykkes i celler, der er i deling. Ki67 udtrykkes derved i alle faser af cellecyklus bortset fra G0-fasen, og niveauet af Ki67 øges gradvist frem mod selve celledelingen. Farveintensiteten vil derved variere, alt efter hvilken fase af cellecyklus, som cellen befinder sig i (19). Derfor vurderes positivitet blot ud fra tilstedeværelsen af kernereaktion (15).

I forbindelse med invasiv mammacancer kan proliferationsmarkøren Ki67 anvendes til at fortælle, hvor aggressiv tumoren er, og Ki67 har derved betydning for patientens prognose (19).

Proliferationsindekset vurderes semikvantitativt som antal positive tumorceller i procent. Jo flere Ki67-positive celler desto højere proliferationsindeks (se figur 3). Der findes ikke en standardiseret cut-off værdi mellem højt og lavt proliferationsindeks, men grænsen for værdierne sættes mellem 10-20% Ki67-positive tumorceller (15).



Figur 3: Eksempler på højt og lavt Ki67-proliferationsindeks ved invasive mammakarcinomer.

A: >80% af tumorcellerne er Ki67-positive. Der ses ingen baggrundsfarvning.

B: 5-10% af tumorcellerne er Ki67-positive. Der ses ingen baggrundsfarvning (20).

2.4 Digital patologi

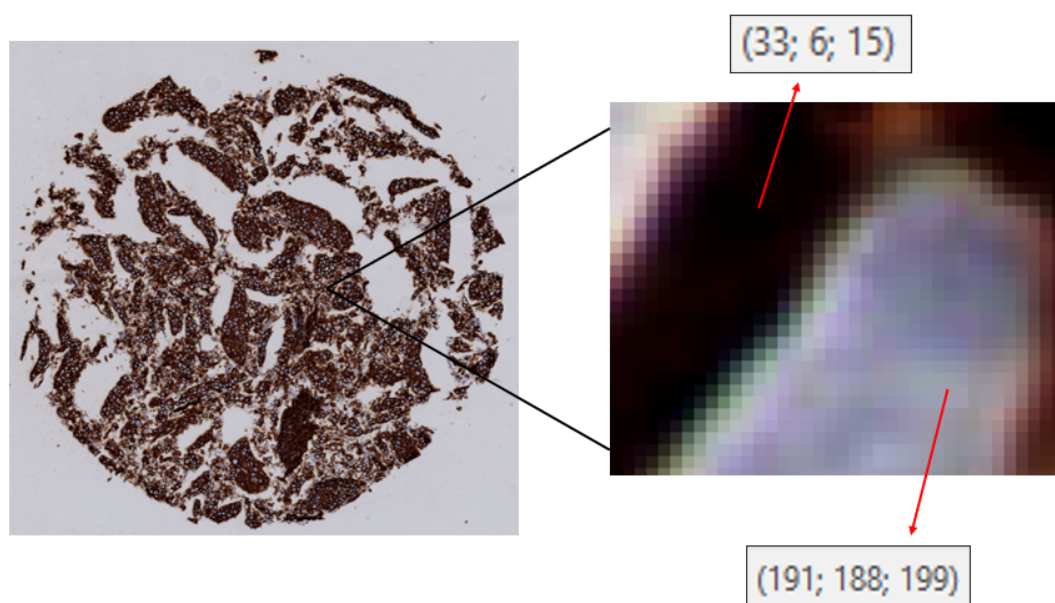
2.4.1 Skannere

DIPA indebærer blandt andet omdannelsen af fysiske vævssnit til digitale billedfiler ved anvendelse af en skanner. En skanner er grundlæggende opbygget af objektiver, en lyskilde, et eller flere kameraer og en robotarm til at transportere objektglassene. Disse elementer kan variere og have

forskellige egenskaber alt efter type af skanner samt producent. Til skanneren er der tilkoblet en computer og en high resolution computerskærm, hvorfra skanneren betjenes. Først identificerer skanneren vævet ved at tage et oversigtsbilledet af vævssnittet. Herefter udvælges skanningsområde samt fokuspunkter enten automatisk, semiautomatisk eller manuelt. Herudover kan der vælges forskellige indstillinger såsom forstørrelse, fokuserings- og skanningsmetoder, der kan variere alt efter formål. Kameraet tager små billeder af det udvalgte område af vævssnittet. Der skannes med et lille overlap mellem billederne, så disse til sidst kan sammensættes til én stor digital billedfil (11).

2.4.2 Billeders opbygning

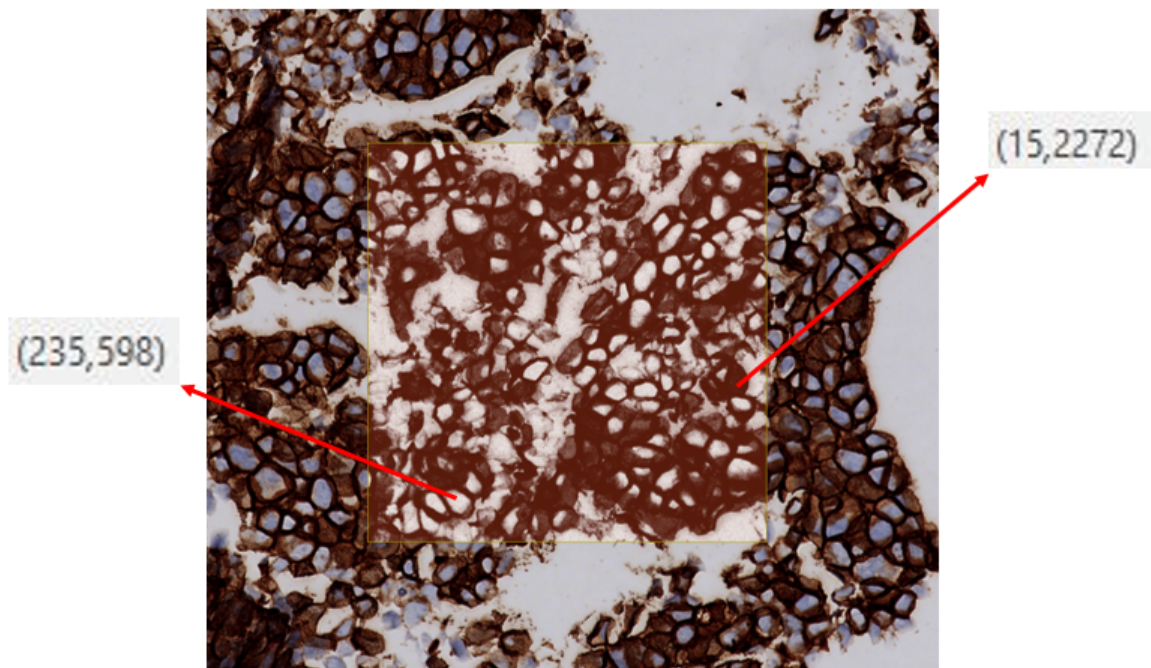
Et digitalt billede er opbygget af Picture Elements (pixels), hvor hver pixel er karakteriseret ved en X,Y-position og en farværdi. Farværdien er baseret på RGB-farverummet, der er en kombination af værdier for rød (R), grøn (G) og blå (B). Farværdierne spænder fra 0-255, hvor mørke pixels har lave værdier, og lyse pixels har høje værdier (21). Dette illustreres i figur 4.



Figur 4: Core fra en Cell Micro Array farvet for HER2 (3+) vist i den kommercielt tilgængelige software Visiopharm Integrator System (22). Farværdierne sammensat af rød (R), grøn (G), blå (B) er oplyst for to forskellige områder. Her ses det, at en mørk pixel har lave farværdier, mens en lys pixel har høje farværdier (21).

I projektet arbejdes der i den kommercielle software, Visiopharm Integrator System (VIS), hvor firmaet har konstrueret farværdier, også kaldet features, der er optimale til anvendelse af IHC-farvninger. Disse features er konstrueret i et andet farverum, som giver én farværdi i stedet for

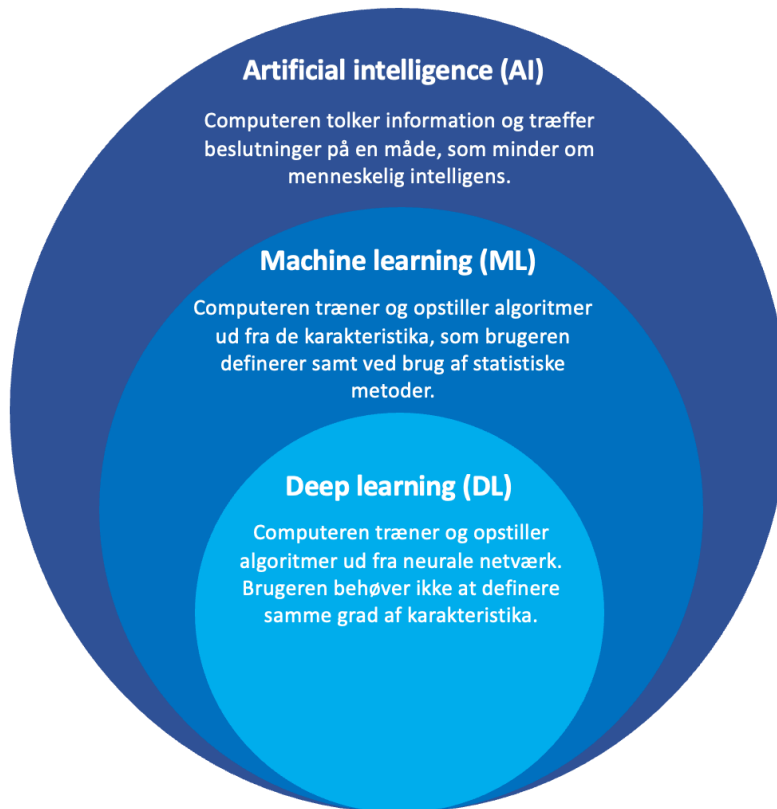
tre. Farveværdien ligger dog i den samme range, som spænder fra 0-255 (22). Et eksempel på dette er illustreret i figur 5.



Figur 5: Core fra en Cell Micro Array farvet for HER2 (3+) vist i den kommercielt tilgængelige software Visiopharm Integrator System. På billedet er der anvendt den konstruerede HDAB-DAB-feature, der resulterer i én farveværdi. Det ses, at en mørk pixel har en lav farveværdi, mens en lys pixel har en høj farveværdi (22).

2.4.3 Artificial Intelligence og digital billedanalyse

Pixelværdierne i et billede kan anvendes i udarbejdelsen af DIA-protokoller. Arbejdet med DIA-protokoller tager ofte udgangspunkt i Artificial Intelligence (AI), som er en metode, hvor computerteknologi forsøger at efterligne menneskelig intelligens. Der findes forskellige måder at anvende AI på; enten ved brug af Machine Learning (ML) eller Deep Learning (DL). Figur 6 illustrerer de forskellige niveauer af AI (3).



Figur 6: Illustration af underkategorier til Artificial Intelligence (AI); Machine Learning (ML) og Deep Learning (DL) (3).

ML og DL kan anvendes forskelligt alt efter formålet med DIA-protokollen. Ved ML udvælger brugeren først de karakteristika, som skal defineres i billedet. Ved IHC-farvede vævssnit kan disse karakteristika eksempelvis være 3,3'-diaminobenzidin (DAB) og Aluminium-Hæmatein (hæmatoxylin). Herefter vælges den bedst egnede metode til at segmentere, dvs. opdele, de udvalgte strukturer i billedet. En metode til segmentering er Threshold, hvor brugeren definerer nedre og øvre cut-off-værdier for pixelværdierne. Herved fås pixelværdiintervaller, som opdeler billedets karakteristika i klasser. Ved DL er det ikke nødvendigt at definere karakteristika i samme omfang som ved ML, da softwaren opstiller en algoritme til at segmentere billedets elementer ved brug af såkaldte neurale netværk. Via de neurale netværk kan en DL-protokol adskille komplicerede og varierende strukturer i billedet sammenlignet med ML, som er mest egnet til at segmentere simple og klart definerede karakteristika (3).

3 Metode

3.1 Valg af prøvemateriale

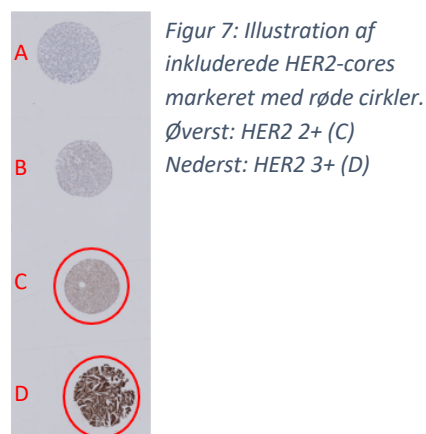
Til projektet blev der udvalgt 20 formalin-fikseret paraffinindstøbte (FFPE) CMA'er, hvoraf 10 var IHC-farvet for HER2 og 10 for Ki67. En CMA er et standardiseret kontrolmateriale baseret på dyrkede celler, der er specifikt designet til at udtrykke forskellige niveauer af en biomarkør (23). De inkluderede CMA'er havde været anvendt i et tidligere projektsamarbejde mellem Patologi (PAI), Aarhus Universitetshospital (AUH) og Visiopharm (se bilag 1). CMA'erne blev udvalgt på baggrund af varierende farveintensiteter i IHC-farvningen. Alle patologinumre på objektglassene blev blindet, og objektglassene blev navngivet HER2 1-10 og Ki67 1-10.

3.1.1 HER2 Cell Micro Arrays fra HistoCyte Laboratories

De 10 inkluderede HER2-CMA'er (HistoCyte Laboratories, Newcastle, United Kingdom) indeholdt hver fire cores, der repræsenterede HER2-kategorierne. CMA'erne bestod af tumorceller fra henholdsvis mamma og ventrikel adenokarcinomer (se tabel 2) (24). For at reducere mængden af data blev der, i det videre arbejde, kun inkluderet to ud af fire HER2-cores. Der blev udvalgt cores med høj ekspression og cores med ekspression i et område, der kan have diagnostisk betydning. For HER2 blev der taget udgangspunkt i cores i HER2-kategorierne 2+ og 3+ (se figur 7).

Core	HER2-score	Adenokarcinom
A	0	Mamma
B	1+	Mamma
C	2+	Ventrikel
D	3+	Mamma

Tabel 2: Cores der udgør én HER2 Cell Micro Array (HistoCyte Laboratories, Newcastle, United Kingdom) med tilhørende HER2-score samt vævstype (24).

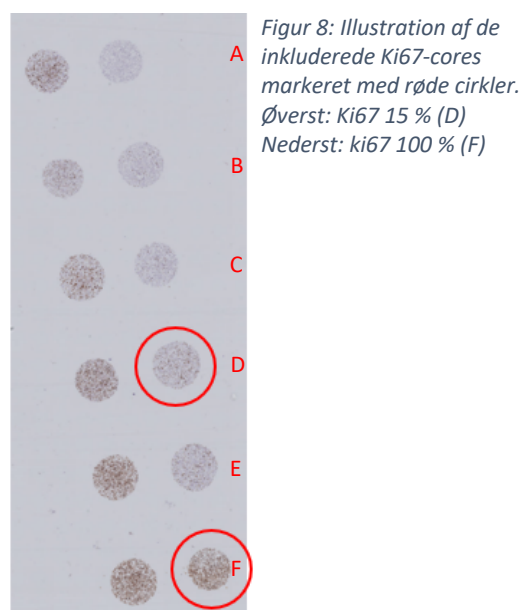


3.1.2 Ki67 Cell Micro Arrays fra ArrayScience

De 10 inkluderede Ki67-CMA'er (ArrayScience, Sausalito, California) indeholdt 12 cores fra to forskellige cellelinjer. Der blev taget udgangspunkt i den ene cellelinje med seks cores, som også blev brugt i projektsamarbejdet mellem PAI, AUH og Visiopharm. Disse cores bestod af celler fra udvalgte tumorer, der repræsenterede forskellige Ki67-proliferationsindekser (kilde: bilag 2). Dette er illustreret i tabel 3. For at reducere mængden af data blev der, i det videre arbejde, kun inkluderet to ud af seks Ki67-cores fra hver CMA. Der blev udvalgt cores med høj ekspresion og cores med ekspresion i et område, der kan have diagnostisk betydning. For Ki67-cores blev der taget udgangspunkt i cores med en proliferationsindeks på 15% og 100% (se figur 8).

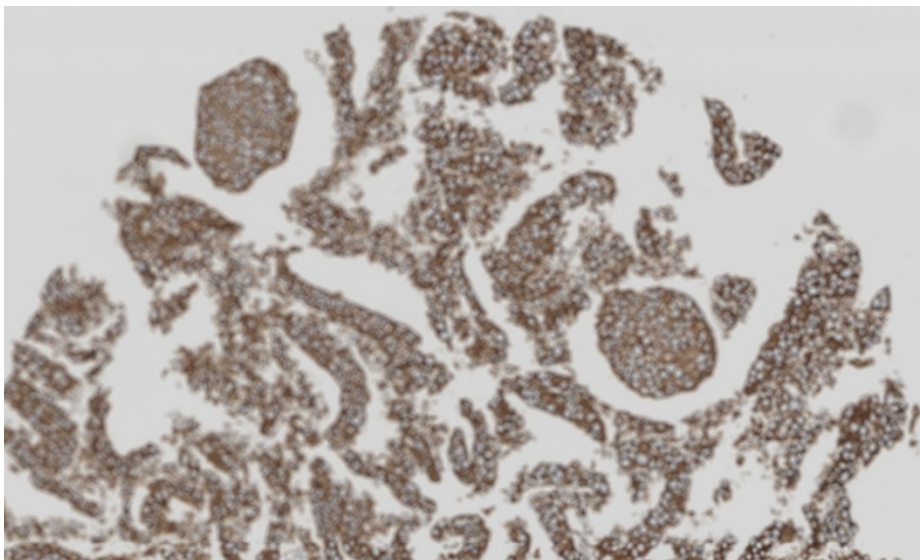
Core	Ki67-proliferationsindeks i %
A	0%
B	5%
C	10%
D	15%
E	30%
F	100%

Tabel 3: Cores der udgør én Ki67 Cell Micro Array (ArrayScience, Sausalito, California) med tilhørende proliferationsindekser (kilde: bilag 2).



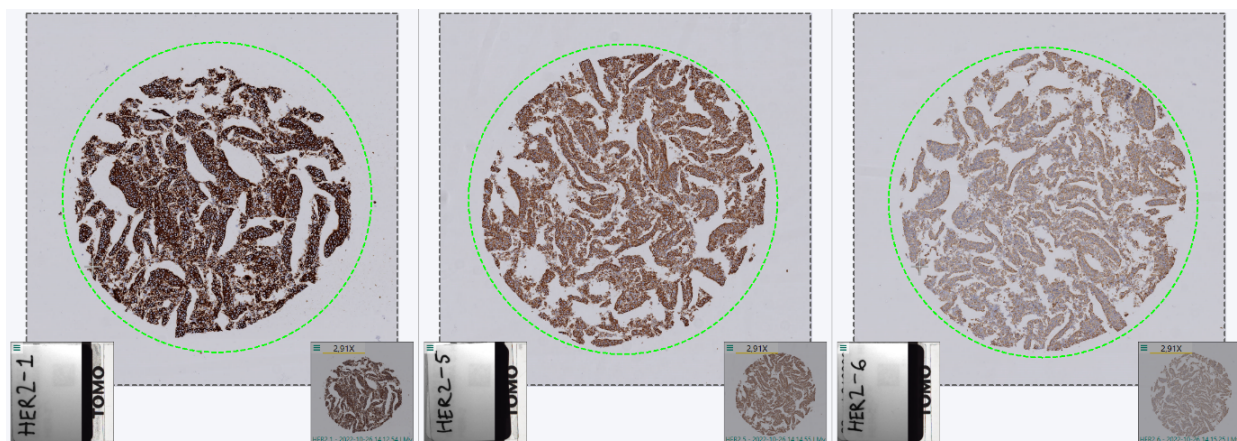
3.1.3 Anvendte Cell Micro Arrays til databehandling

Efter digitalisering blev alle billedfilerne kontrolleret. Hvis det relevante væv var ude af fokus, blev disse kategoriseret som uegnede, og CMA'erne blev ekskluderet (se figur 9).

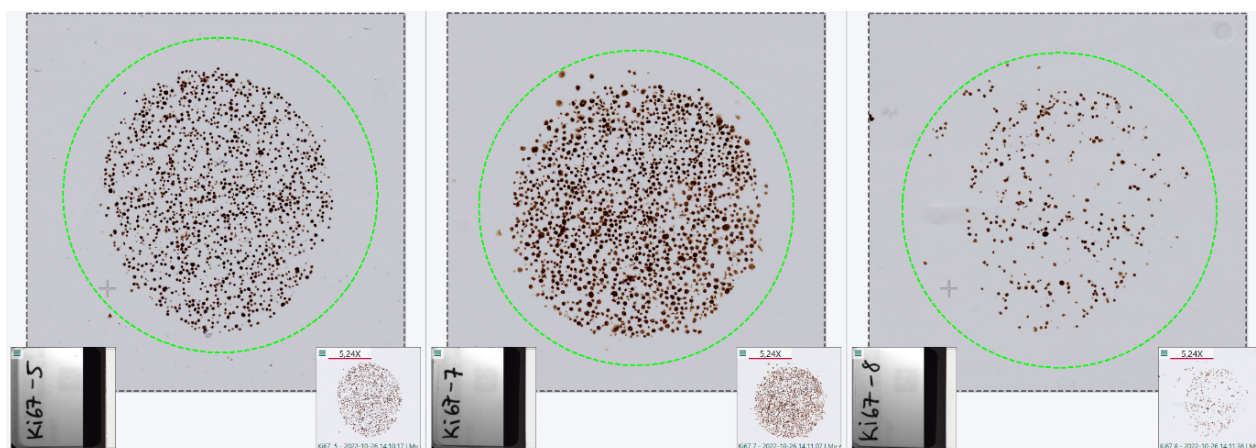


Figur 9: Udsnit af en uegnet CMA (HER2 4, 3+).

Ud fra de resterende CMA'er blev der udvalgt henholdsvis tre HER2 CMA'er og tre Ki67 CMA'er. Disse CMA'er var repræsentative for datasættet, idet de visuelt repræsenterede svage, intermediære og kraftige IHC-farveintensiteter samt cellerige og cellefattige cores (se figur 10 og 11).



Figur 10: De tre udvalgte HER2-cores (3+).
HER2 1 (venstre): Kraftig IHC-farveintensitet.
HER2 5 (midten): Intermediær IHC-farveintensitet.
HER2 6 (højre): Svag IHC-farveintensitet.



Figur 11: De tre udvalgte Ki67 cores (100%).

Ki67 5 (venstre): Kraftig IHC-farveintensitet.

Ki67 7 (midten): Cellerig.

Ki67 8 (højre): Cellefattig.

3.2 Skannere og digitaliseringskriterier

3.2.1 Valg af skannere

På baggrund af projektets formål blev der inkluderet så mange forskellige skannere som muligt.

Der blev inkluderet forskellige skannermodeller fra samme producent og skannere fra forskellige producenter. I tabel 4 ses en oversigt over de inkluderede skannere.

Skanner	Producent	Kaldenavn	Placering
Interne skannere			
NanoZoomer S360 1 (reference) og 2	Hamamatsu	S360 1 og S360 2	PAI, AUH
NanoZoomer S60	Hamamatsu	S60	PAI, AUH
NanoZoomer 2.0-HT 1 og 2	Hamamatsu	HT 1 og HT 2	PAI, AUH
Eksterne skannere			
NanoZoomer S210	Hamamatsu	S210	PAI, Regionshospitalet Viborg
SLIDEVIEW VS200	Olympus	VS200	Institut for Retsmedicin, Aarhus Universitet

Aperio GT450 DX	Leica	GT450	Leica Biosystems, Amsterdam, Holland
PANNORAMIC 1000	3DHistech	P1000	PAI, Herlev Hospital
PANNORAMIC 250 FLASH III DX	3DHistech	P250	Axlab, Vedbæk
IntelliSite Ultra Fast Scanner	Phillips	UFS	Agilent Technologies, Glostrup

Tabel 4: Oversigt over inkluderede interne og eksterne skannere.

I tabel 5 ses en oversigt over, hvilke lyskilder og kameraer, der anvendes i de inkluderede skannere.

Kaldenavn	Lyskilde	Kamera
S360 1 og S360 2	LED (25)	Color CMOS Sensor Type 1/2.3 (se bilag 3)
S60	LED (26)	Color CMOS Sensor Type 2/3 (se bilag 3)
HT 1 og HT 2	Halogen (27)	3-chip TDI-kamera (27)
S210	LED (28)	Color CMOS Sensor Type 1/2.3 (28)
VS200	True color LED (29)	Integrated 2/3 inch CMOS- camera (29)
GT450	Hvid LED (30)	4k Trilineært kamera (30)
P1000	Xenon Flash Illumination (31)	12-MP CMOS-kamera (31)
P250	Xenon Flash Illumination (31)	12-MP CMOS-kamera (31)
UFS	Hvid LED (32)	CCD kamera (32)

Tabel 5: Udvalgte egenskaber for de inkluderede skannere.

3.2.2 Digitaliseringskriterier

I forbindelse med digitaliseringen af CMA'erne på de inkluderede skannere blev der opstillet digitiseringskriterier. Disse kriterier var gældende både ved intern og ekstern skanning.

Digitaliseringskriterierne samt skema med basal information vedrørende de enkelte skannere ses i bilag 4.

3.3 Visiopharm Integrator System

Softwaren VIS blev både anvendt til at definere ROI og til udarbejdelse af DIA-protokoller.

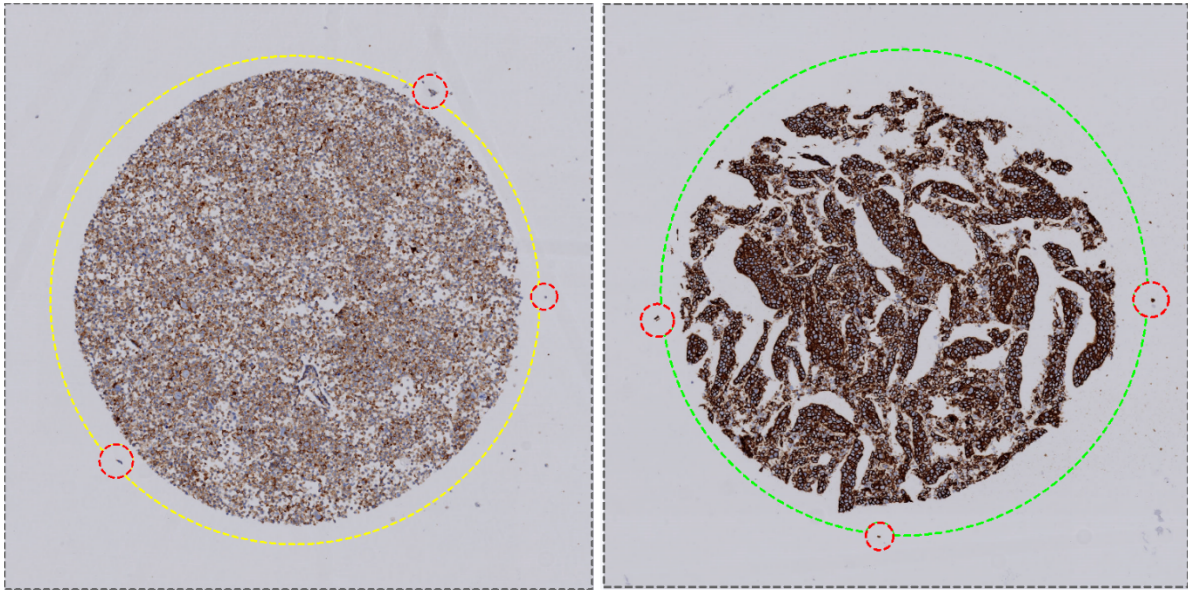
3.3.1 Region Of Interest

I VIS blev der for hver core defineret en ROI. ROI blev anvendt til at definere aflæsningsområdet samt til at adskille de enkelte cores til den senere kvantificering. For at sikre ensartethed i størrelsen af ROI på alle inkluderede cores, blev der fastsat en diameter på henholdsvis 1800 μm for HER2-cores og 1000 μm for Ki67-cores. HER2-cores kategoriseret som 2+ og Ki67-cores med et proliferationsindeks på 15% blev tildelt en gul ROI. HER2-cores kategoriseret som 3+ og Ki67-cores med et proliferationsindeks på 100% blev tildelt en grøn ROI (se tabel 6). Ved at adskille cores ved hjælp af ROI i forskellige farver, var det muligt at kvantificere de gule og grønne ROI separat.

ICH-markør	Ekspression	Farve på ROI
HER2	2+	Gul
	3+	Grøn
KI67	15%	Gul
	100%	Grøn

Tabel 6: Oversigt over gule og grønne Region Of Interest for henholdsvis HER2- og Ki67-cores med forskellige ekspressioner.

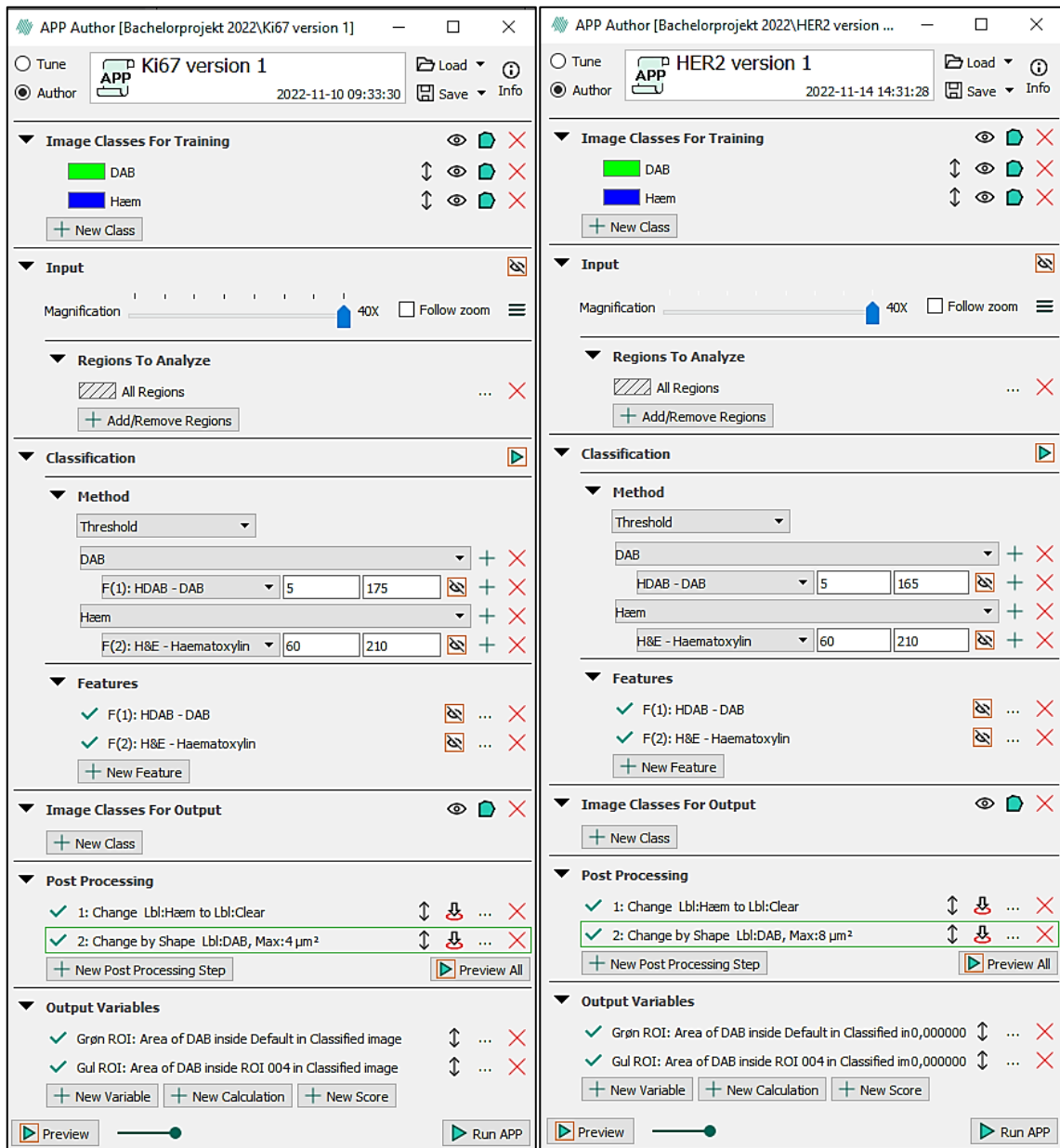
Der blev foretaget en visuel vurdering af placeringen af ROI for at sikre, at ROI var placeret ens på identiske cores. Dette blev gjort ved at identificere pejlemærker på de identiske cores og placere ROI herefter. To personer identificerede og korrigerede placeringen af ROI. Den ene var ansvarlig for alle HER2-cores og den anden for alle Ki67-cores. Figur 12 illustrerer et eksempel på pejlemærker placeret ved gul og grøn ROI.



Figur 12: Eksempel på pejlemærker og Region Of Interest (ROI) på HER2-cores.
Venstre: Gul ROI, HER2-kategori: 2+.
Højre: Grøn ROI, HER2-kategori: 3+.
Røde cirkler: Pejlemærker.

3.3.2 Digitale billedanalyseprotokoller

Der blev udarbejdet to DIA-protokoller til detektion og kvantificering af henholdsvis HER2 og Ki67. Protokollerne blev udarbejdet på baggrund af digitale billedfiler fra referenceskanneren (S360 1). Indstillingerne for de to DIA-protokoller er illustreret i figur 13.



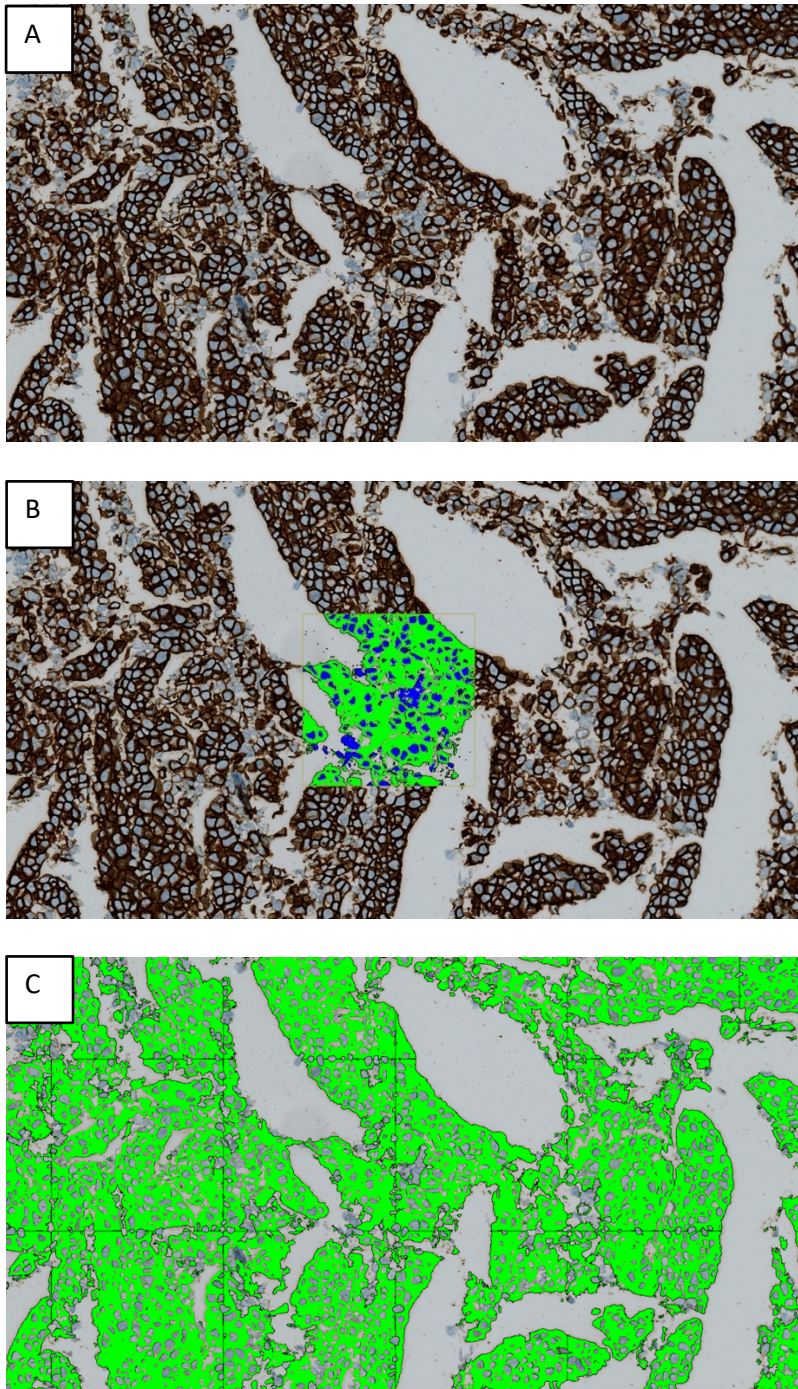
Figur 13: Indstillinger for de to digitale billedanalyseprotokoller (DIA-protokoller).

Venstre: Indstillinger for Ki67 DIA-protokol.

Højre: Indstillinger for HER2 DIA-protokol.

Først blev der defineret to klasser, som fik hver sin label; DAB og Hæm. Threshold blev valgt som segmenteringsmetode, og der blev valgt de to features HDAB – DAB og H&E – Haematoxylin, som er konstrueret til IHC-farvninger med DAB og kernefarvningen Aluminium-Hæmatein (hæmatoxylin). Der blev fastsat passende pixelværdiintervaller for HDAB-DAB og H&E – Haematoxylin. Herefter blev der udført post processing. Da formålet var at identificere DAB, blev Hæm ændret til Clear. Desuden blev DAB-objekter med arealer under henholdsvis $8 \mu\text{m}^2$ og $4 \mu\text{m}^2$ ændret til Clear for at sikre, at det udelukkende var celler, der blev detekteret. Efterfølgende blev der defineret to variable; grøn ROI og

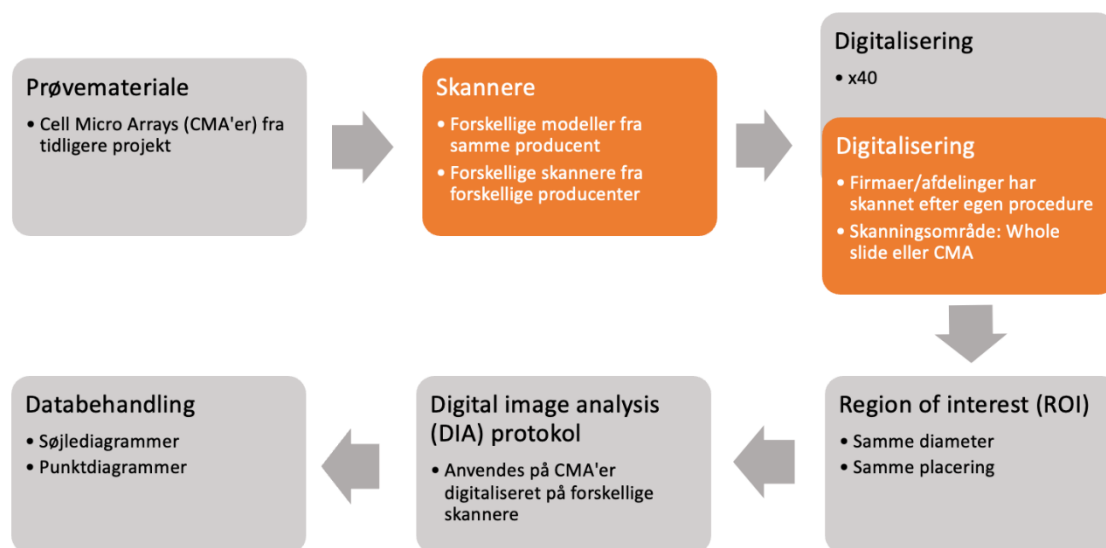
gul ROI. For hver variabel blev der beregnet et areal af DAB inden for enten den grønne eller gule ROI for henholdsvis Ki67 og HER2. Dette muliggjorde, at arealerne for de enkelte cores fra forskellige skannere kunne sammenlignes. Figur 14 illustrerer en HER2-core før, under og efter udarbejdelsen af DIA-protokollen.



Figur 14: Eksempel på en HER2-core før, under og efter udarbejdelsen af en digital billedanalyseprotokol (DIA-protokol).
A. HER2-core før DIA-protokol.
B. HER2-core under udarbejdelse af DIA-protokollen. Grøn repræsenterer DAB, mens blå repræsenterer H&E.
C. HER2-core med den færdige DIA-protokol. Grøn repræsenterer DAB.

3.4 Oversigt over forsøgsdesign

I figur 15 ses en oversigt over forsøgsdesignet samt de konstante og variable, som projektet er bygget op omkring.



Figur 15: Oversigt over forsøgsdesign.

Grå kasser: Illustrerer konstante i projektet.

Orange kasser: Illustrerer variable i projektet.

3.4 Databehandling

Arealet af DAB (μm^2) for alle HER2- og Ki67-cores fra de forskellige skannere blev illustreret ved brug af søjlediagrammer. Desuden blev der udarbejdet punktdiagrammer til at illustrere den procentvise afvigelse fra referenceskanneren (S360 1).

4 Resultater

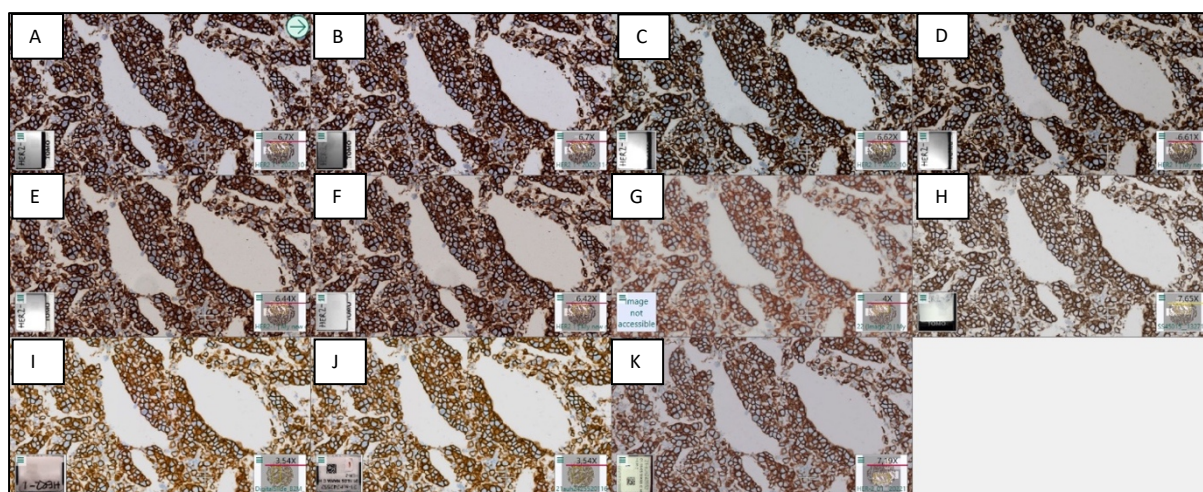
Resultatafsnittet indledes med en visuel vurdering af variation i skannerne. Herefter gennemgås søjlediagrammer og punktdiagrammer for hver af de 6 inkluderede CMA'er. De inkluderede HER2-CMA'er er HER2 1 (kraftig IHC-farveintensitet), HER2 5 (intermediær IHC-farveintensitet) og HER2 6 (svag IHC-farveintensitet) (se figur 10). De inkluderede Ki67-CMA'er er Ki67 5 (kraftig IHC-farveintensitet), Ki67 7 (cellerig) og Ki67 8 (cellefattig) (se figur 11).

I afsnittet anvendes kaldenavne for de enkelte skannere. Disse står beskrevet i tabel 4.

Rådata samt databehandling tilknyttet resultatafsnittet ses i bilag 5-12.

4.1 Visuel vurdering af variation i skannerne

Figur 16 illustrerer det visuelle udtryk af en udvalgt HER2-core (HER2 1, 3+) digitaliseret på de 11 inkluderede skannere. I den følgende vurdering tages der udgangspunkt i det visuelle udtryk af DAB.



Figur 16: Visualisering af alle HER2 1 (3+) cores digitaliseret på de 11 inkluderede skannere.

A: Hamamatsu NanoZoomer S360 1

B: Hamamatsu NanoZoomer S360 2

C: Hamamatsu NanoZoomer 2.0 HT 1

D: Hamamatsu NanoZoomer 2.0 HT 2

E: Hamamatsu NanoZoomer S210

F: Hamamatsu NanoZoomer S60

G: Olympus VS200

H: Leica Aperio GT450DX

I: 3DHistech PANNORAMIC P250

J: 3DHistech PANNORAMIC P1000

K: Philips Ultra Fast Scanner

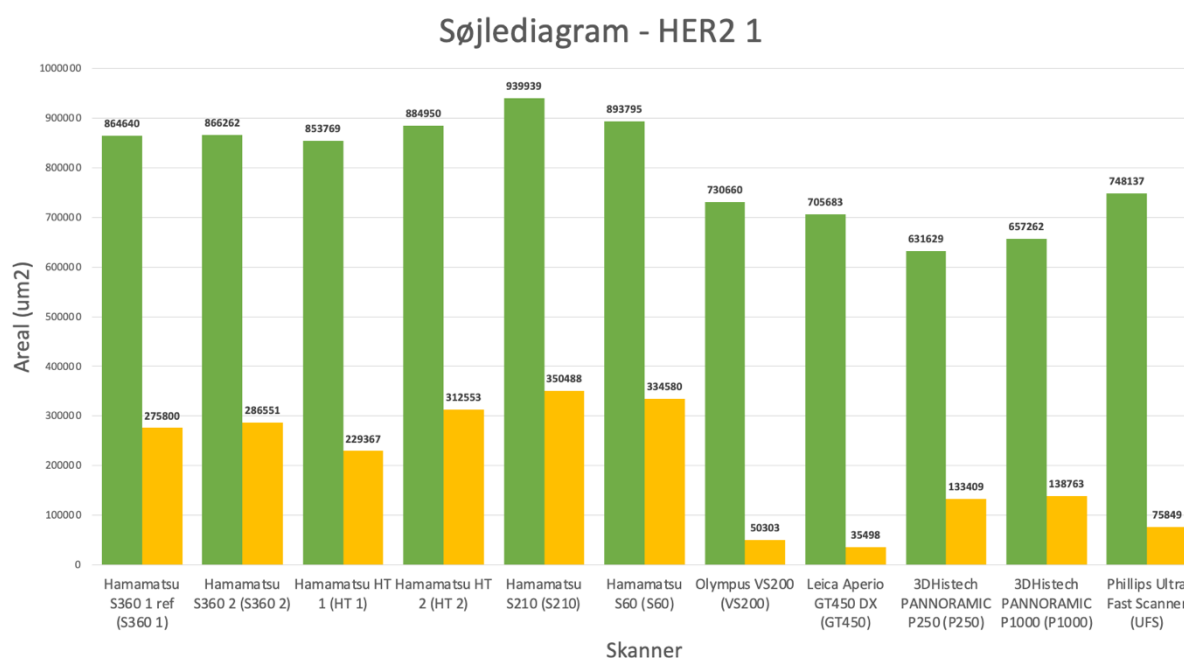
Det fremgår af figur 16, at der er visuel variation mellem de 11 inkluderede skannere. Det ses, at DAB i de digitale billedfiler fra Hamamatsu (A, B, C, D, E og F) er mørkere end i billedfilerne fra de øvrige producenter (G, H, I, J og K). Sammenlignet med S360 1 (A) har DAB ved S210 (E), S60 (F), VS200 (G) og UFS (K) en rødlig tone. Dette gælder specielt VS200 (G), som derudover har et mælkevidt og let sløret udtryk. GT450 (H) gengiver en svagere og mere grålig farveintensitet af DAB

sammenlignet med S360 1 (A). Ved både P250 og P1000 (I og J) ses et mere gyldent og gulligt udtryk af DAB sammenlignet med S360 1.

4.2 HER2 1

4.2.1 Søjlediagram

Søjlediagrammet i figur 17 illustrerer arealerne af DAB for HER2 1-cores på de 11 inkluderede skannere. Ud af de tre udvalgte HER2-CMA'er havde HER2 1 den kraftigste IHC-farveintensitet.



Figur 17: Areal af DAB (μm^2) for HER2 1-cores digitaliseret på hver skanner illustreret i et søjlediagram.

Grønne søjler: Grøn Region Of Interest (ROI) (3+).

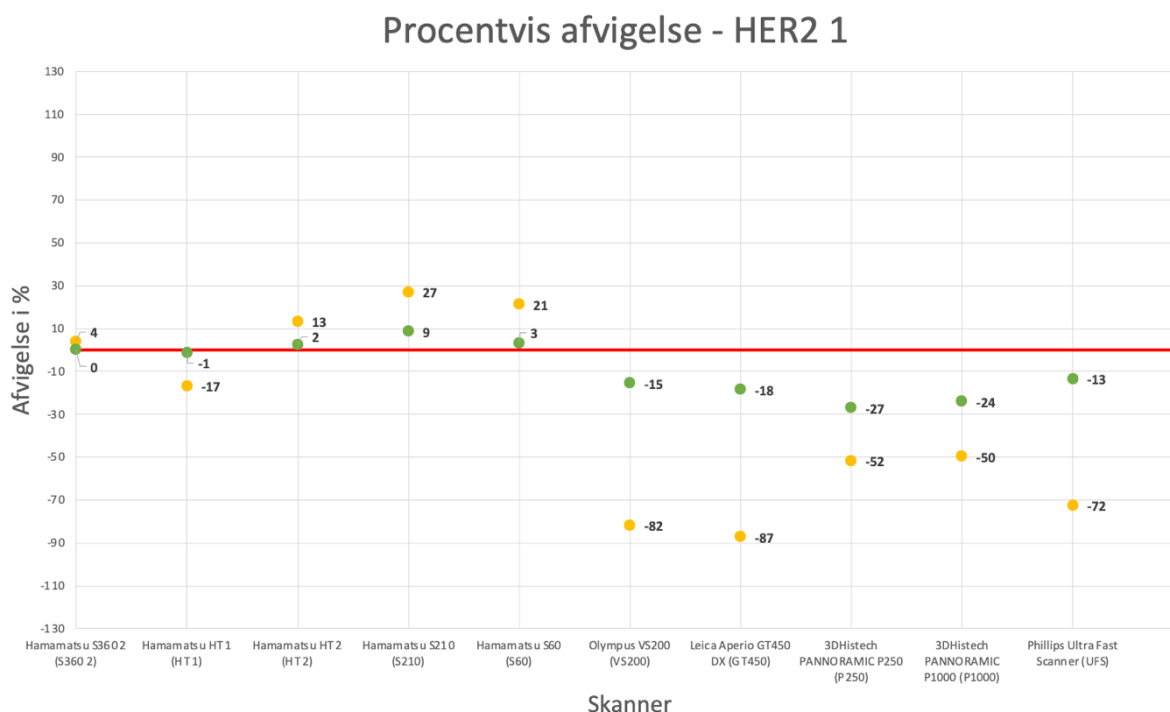
Gule søjler: Gul ROI (2+).

Det fremgår af figur 17, at arealerne for DAB for cores, som er digitaliseret på skannere fra Hamamatsu, generelt er højere end arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra en af de øvrige producenter. Der ses mindre variation i arealerne for de cores, der er digitaliseret på samme skannermodel i forhold til de øvrige skannere. Denne variation er dog mindst mellem S360 1 og S360 2.

Det største areal for grøn ROI er $939939 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for grøn ROI er $631629 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på P250. For gul ROI er det højeste areal $350488 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for gul ROI er $35498 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på GT450.

4.2.2 Procentvis afvigelse fra S360 1

Figur 18 illustrerer den procentvise afvigelse fra S360 1 for HER2 1-cores fra de 11 inkluderede skannere.



Figur 18: Punktdiagram over den procentvise afvigelse fra S360 1 (referenceskanner) for HER2 1-cores.

Rød linje: Reference.

Grønne punkter: Grøn Region of Interest (ROI) (3+).

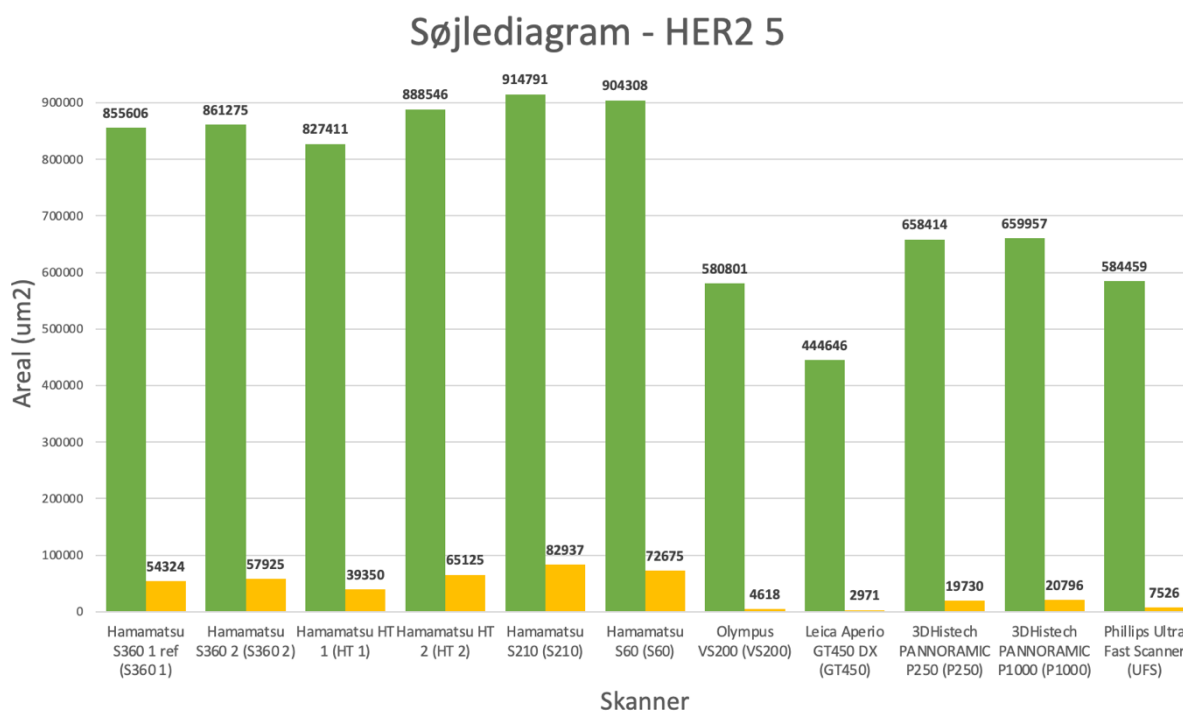
Gule punkter: Gul ROI (2+).

Det fremgår af figur 18, at den procentvise afvigelse fra S360 1 generelt er mindre for skannerne fra Hamamatsu end for skannerne fra andre producenter. Eksempelvis ses det, at S360 2 afviger 4% for gul ROI, og at der ingen procentvis afvigelse er for grøn ROI. Modsat afviger GT450 -87% for gul ROI og -18% for grøn ROI. Udover denne procentvise afvigelse fra S360 1 ses der desuden en større procentvis forskel mellem gule og grønne ROI for GT450, VS200 og UFS. Endvidere illustrerer punktdiagrammet, at gule ROI, der er kategoriseret som 2+, har en større procentvis afvigelse fra S360 1 end grønne ROI, der er kategoriseret som 3+.

4.3 HER2 5

4.3.1 Søjlediagram

Søjlediagrammet i figur 19 illustrerer arealerne af DAB for HER2 5-cores på de 11 inkluderede skannere. HER2 5 CMA'en havde en intermedier IHC-farveintensitet.



Figur 19: Areal af DAB (μm^2) for HER2 5-cores digitaliseret på hver skanner illustreret i et søjlediagram.

Grønne søjler: Grøn Region Of Interest (ROI) (3+).

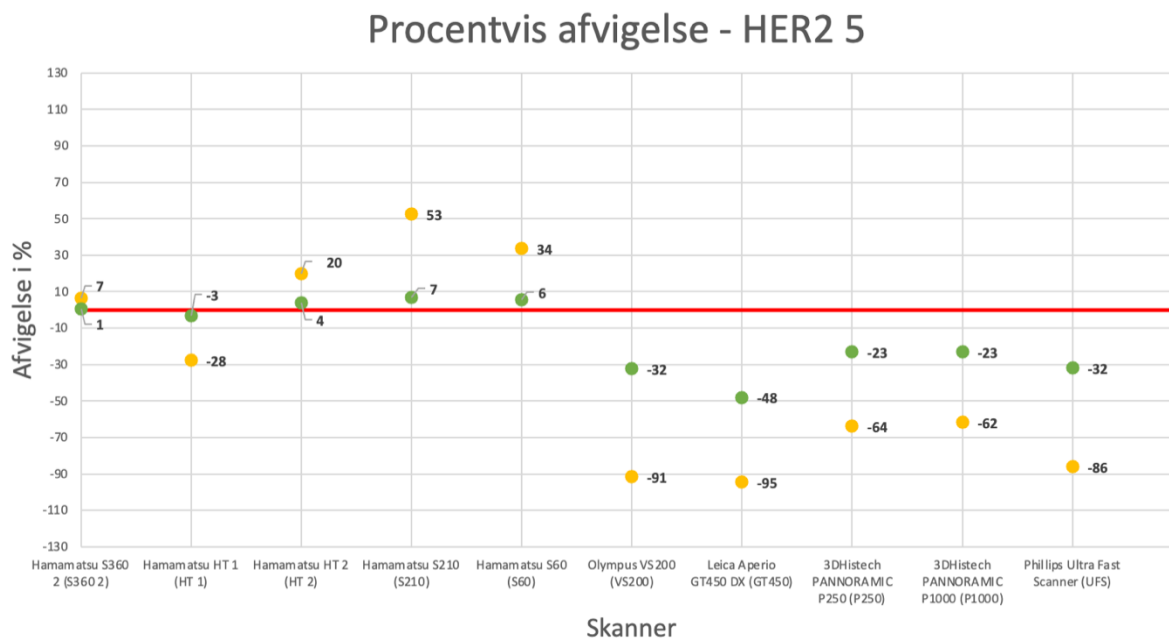
Gule søjler: Gul ROI (2+).

Det fremgår af figur 19, at arealerne af DAB for cores, som er digitaliseret på skannerne fra Hamamatsu, generelt er højere end arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra øvrige producenter. Der ses mindre variation i arealerne mellem skannere fra samme producent sammenlignet med variationen mellem skannere fra forskellige producenter. Dette gælder både for skannerne fra Hamamatsu og 3DHistech. Desuden er der en mindre variation i arealerne for de cores, der er digitaliseret på samme skannermodel i forhold til de øvrige skannere. Variationen er dog mindst mellem S360 1 og S360 2.

Den største forskel i arealer ses mellem S210 og GT450. Det største areal for grøn ROI er $914791 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for grøn ROI er $444646 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på GT450. For gul ROI er det højeste areal $82937 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for gul ROI er $2971 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på GT450.

4.3.2 Procentvis afvigelse fra S360 1

Figur 20 illustrerer den procentvise afvigelse fra S360 1 for HER2 5-cores fra de 11 inkluderede skannere.



Figur 20: Punktdiagram over den procentvise afvigelse fra S360 1 (referenceskanner) for HER2 5-cores.

Rød linje: Reference.

Grønne punkter: Grøn Region Of Interest (ROI) (3+).

Gule punkter: Gul ROI (2+).

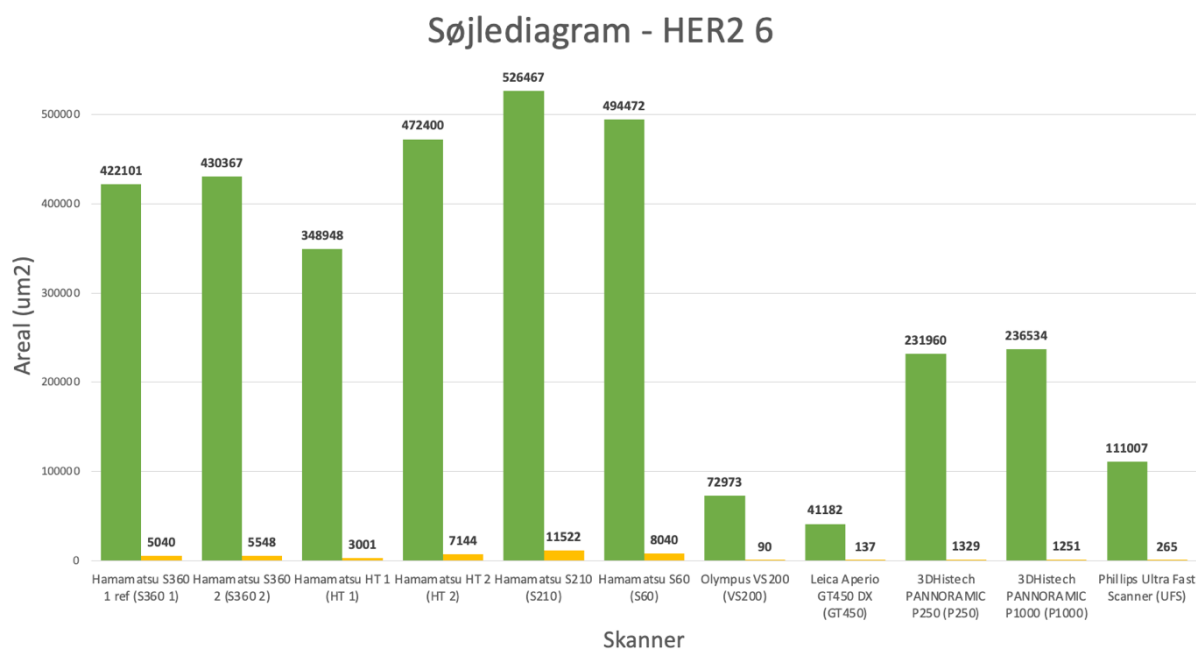
Det fremgår af figur 20, at den procentvise afvigelse fra S360 1 generelt er mindre for skannerne fra Hamamatsu end for skannerne fra andre producenter. Eksempelvis ses det, at S360 2 afviger 7% for gul ROI og 1% for grøn ROI, hvorimod GT450 afviger -95% for gul ROI og -48% for grøn ROI.

Derudover er der generelt en større procentvis forskel mellem grøn og gul ROI ved skannerne fra andre producenter end Hamamatsu. Dette gælder dog ikke for S210, hvor der ses en større procentvis forskel mellem gul og grøn ROI sammenlignet med de øvrige skannere fra Hamamatsu. Endeligt illustrerer punktdiagrammet, at de gule ROI, der er kategoriseret som 2+, har en større procentvis afvigelse fra S360 1, end de grønne ROI, der er kategoriseret som 3+.

4.4 HER2 6

4.4.1 Søjlediagram

Søjlediagrammet i figur 21 illustrerer arealerne af DAB for HER2 6 for hver af de 11 inkluderede skannere. Ud af de tre udvalgte HER2-CMA'er havde HER2 6 den svageste IHC-farveintensitet.



Figur 21: Areal af DAB (μm^2) for HER2 6-cores digitaliseret på hver skanner illustreret i et søjlediagram.

Grønne søjler: Grøn Region Of Interest (ROI) (3+).

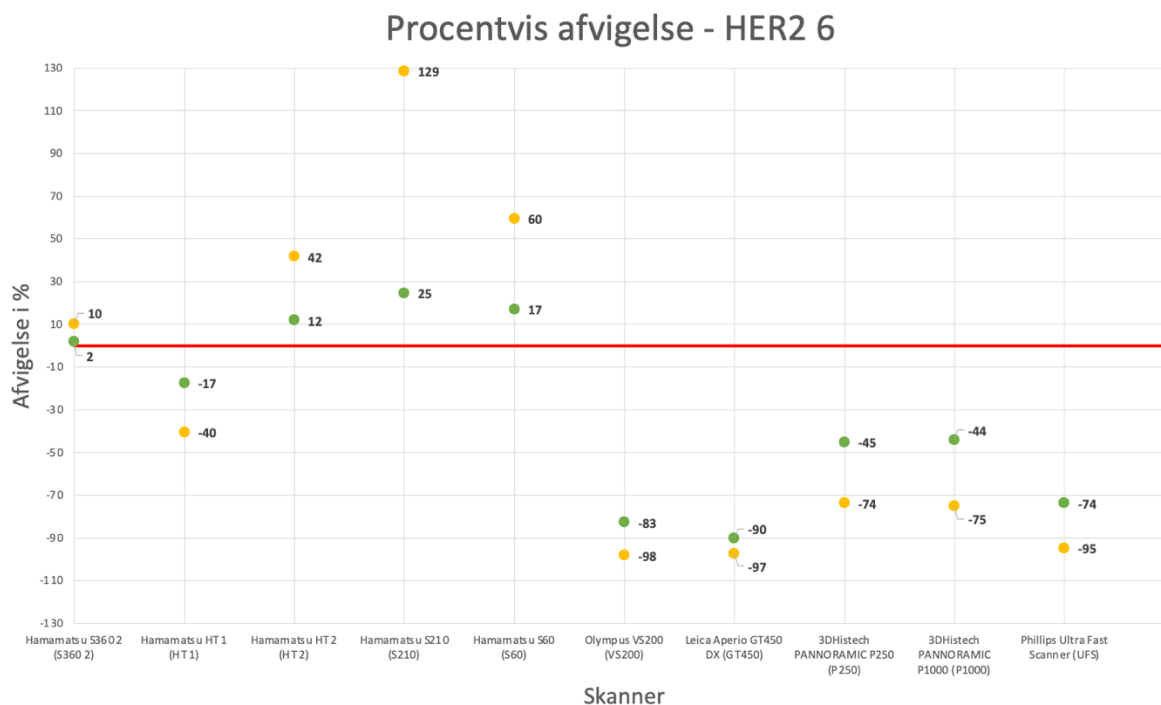
Gule søjler: Gul ROI (2+).

I figur 21 ses en udtalt variation i arealerne af DAB mellem alle skannere. Denne variation ses både mellem skannerne fra Hamamatsu og fra de øvrige producenter. Variationen er dog mindre mellem P250 og P1000 samt S360 1 og S360 2. Det fremgår, at arealerne for cores, som er digitaliseret på skannerne fra Hamamatsu, er markant højere end arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra øvrige producenter.

Der ses en stor forskel mellem de højeste og laveste arealer for både grøn og gul ROI fra de inkluderede skannere. Det største areal for grøn ROI er $526467 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for grøn ROI er $41182 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på GT450. For gul ROI er det højeste areal $11522 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for gul ROI er $90 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på VS200.

4.4.2 Procentvis afvigelse fra S360 1

Figur 22 illustrerer den procentvise afvigelse fra S360 1 for HER2 6-cores fra de 11 inkluderede skannere.



Figur 22: Punktdiagram over den procentvise afvigelse fra S360 1 (referenceskanner) for HER2 6-cores.

Rød linje: Reference.

Grønne punkter: Grøn Region Of Interest (ROI) (3+).

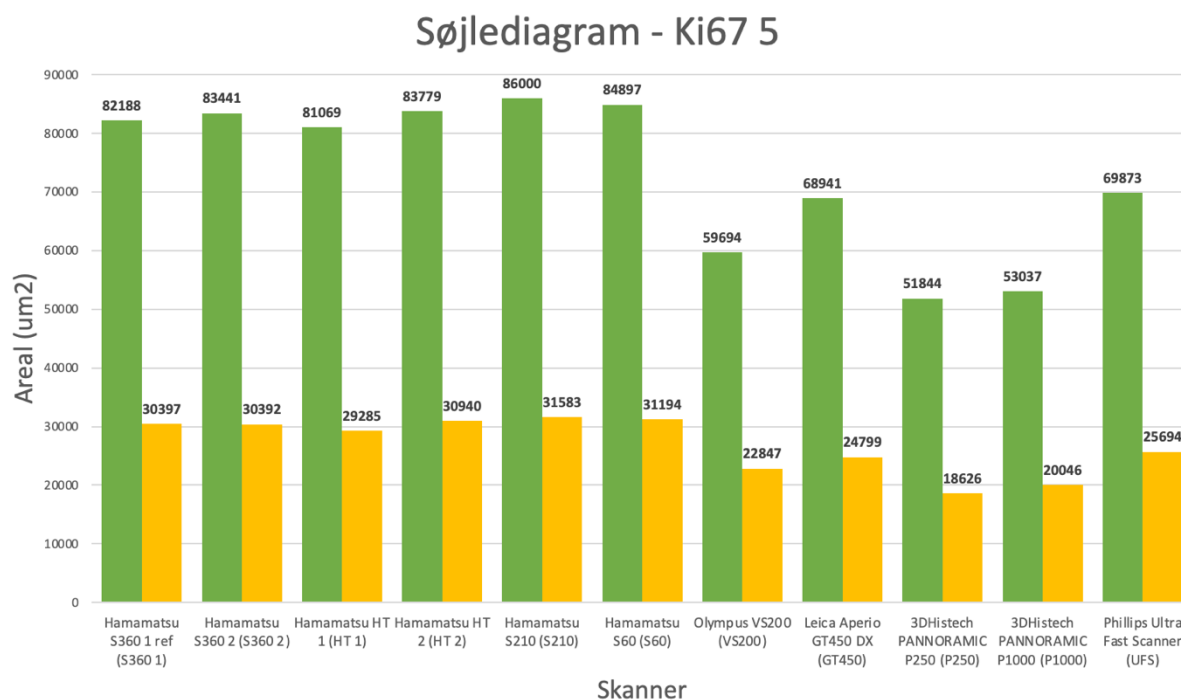
Gule punkter: Gul ROI (2+).

Det fremgår af figur 22, at der generelt er en høj procentvis afvigelse fra S360 1. Dette er især tydeligt for S210, hvor gul ROI har en procentvis afvigelse på 129%. Med undtagelse af gul ROI for S210 er den procentvise afvigelse fra S360 1 mindre for skannerne fra Hamamatsu end for skannerne fra andre producenter. Eksempelvis ses det, at S360 2 afviger 10% for gul ROI og 2% for grøn ROI, hvorimod GT450 afviger -97% for gul ROI og -90% for grøn ROI. Endeligt illustrerer punktdiagrammet, at de gule ROI, der er kategoriseret som 2+, har en større procentvis afvigelse fra S360 1, end de grønne ROI, der er kategoriseret som 3+. Dog er den procentvise forskel mellem grøn og gul ROI mindre udtalt for S360 2, VS200 og GT450.

4.5 Ki67 5

4.4.1 Søjlediagram

Søjlediagrammet i figur 23 illustrerer arealerne af DAB for Ki67 5 for hver af de 11 inkluderede skannere. Ud af de tre udvalgte Ki67-CMA'er havde Ki67 5 den kraftigste IHC-farveintensitet.



Figur 23: Areal af DAB (μm^2) for Ki67 5-cores digitaliseret på hver skanner illustreret i et søjlediagram.

Grønne søjler: Grøn Region Of Interest (ROI) (100%).

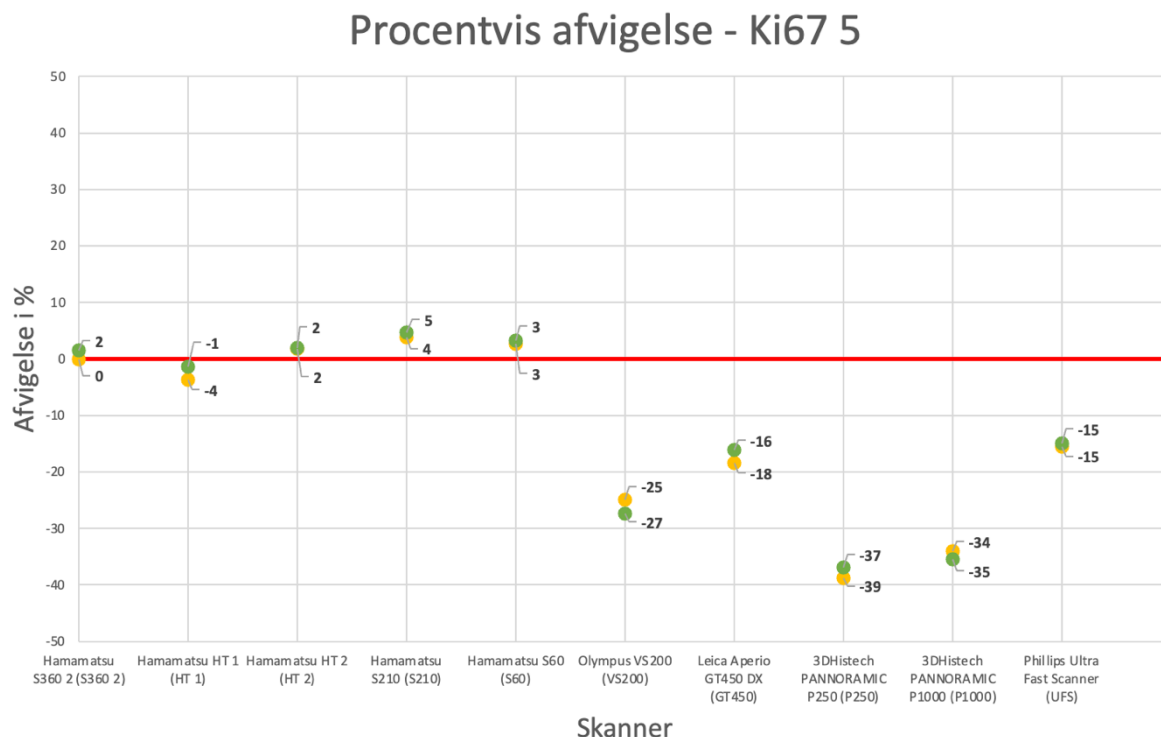
Gule søjler: Gul ROI (15%).

Det fremgår af figur 23, at arealerne af DAB for cores, som er digitaliseret på skannere fra Hamamatsu, generelt er højere end arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra en af de øvrige producenter. Der ses mindre variation i arealerne for de cores, der er digitaliseret på samme skannermodel i forhold til de øvrige skannere. Denne variation er dog mindst mellem S360 1 og S360 2. Desuden er der generelt mindre variation i arealerne inden for samme skannerproducent end inden for forskellige producenter. Dette gælder både for skannere fra Hamamatsu og 3DHistech.

Det største areal for grøn ROI er $86000 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for grøn ROI er $51844 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på P250. For gul ROI er det højeste areal $31583 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for gul ROI er $18626 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på P250.

4.4.2 Procentvis afvigelse fra S360 1

Figur 24 illustrerer den procentvise afvigelse fra S360 1 for Ki67 5-cores fra de 11 inkluderede skannere.



Figur 24: Punktdiagram over den procentvise afvigelse fra S360 1 (referenceskanner) for Ki67 5-cores.

Rød linje: Reference.

Grønne punkter: Grøn Region Of Interest (ROI) (100%).

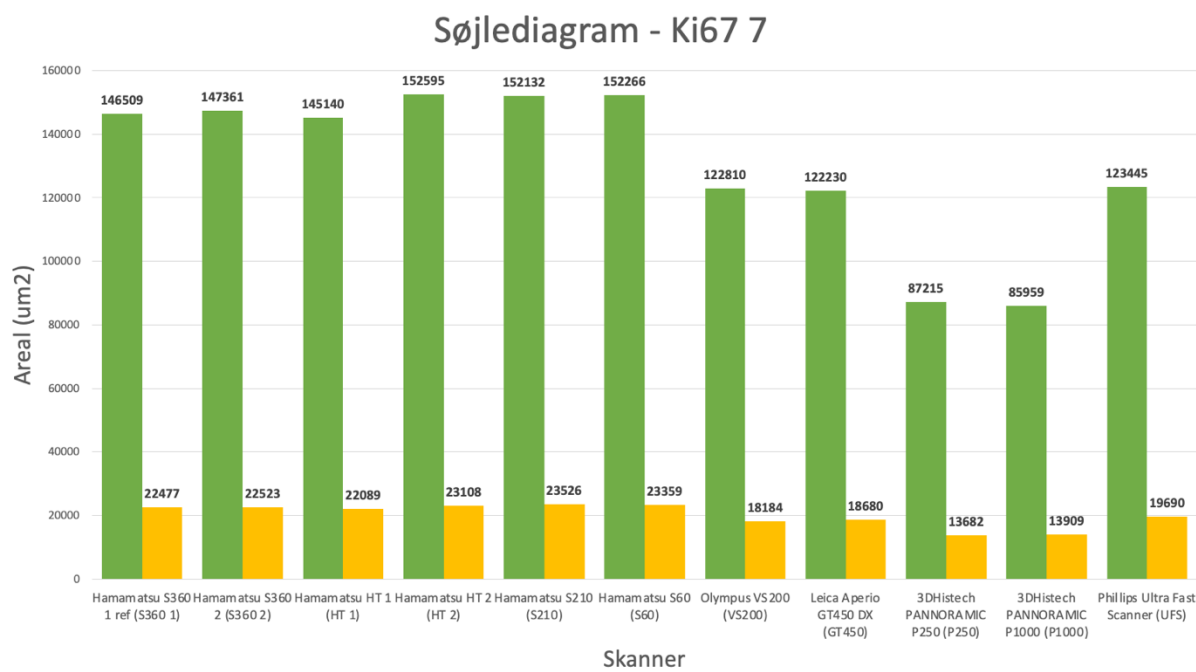
Gule punkter: Gul ROI (15%).

Det fremgår af figur 24, at den procentvise afvigelse fra S360 1 generelt er mindre for skannerne fra Hamamatsu end for skannerne fra andre producenter. For S360 2 ses der eksempelvis ingen procentvis afvigelse for gul ROI og 2% afvigelse for grøn ROI. Derimod afviger P250 -39% for gul ROI og -37% for grøn ROI. Punktdiagrammet illustrerer en minimal procentvis forskel mellem gule og grønne ROI for de 11 inkluderede skannere. Desuden varierer det, om den procentvise afvigelse fra S360 1 er størst for gul eller grøn ROI.

4.6 Ki67 7

4.6.1 Søjlediagram

Søjlediagrammet i figur 25 illustrerer arealerne af DAB for Ki67 6 for hver af de 11 inkluderede skannere. Ud af de tre udvalgte Ki67 CMA'er var Ki67 7 den mest cellerige.



Figur 25: Areal af DAB (um²) for Ki67 7-cores digitaliseret på hver skanner illustreret i et søjlediagram.

Grønne søjler: Grøn Region Of Interest (ROI) (100%).

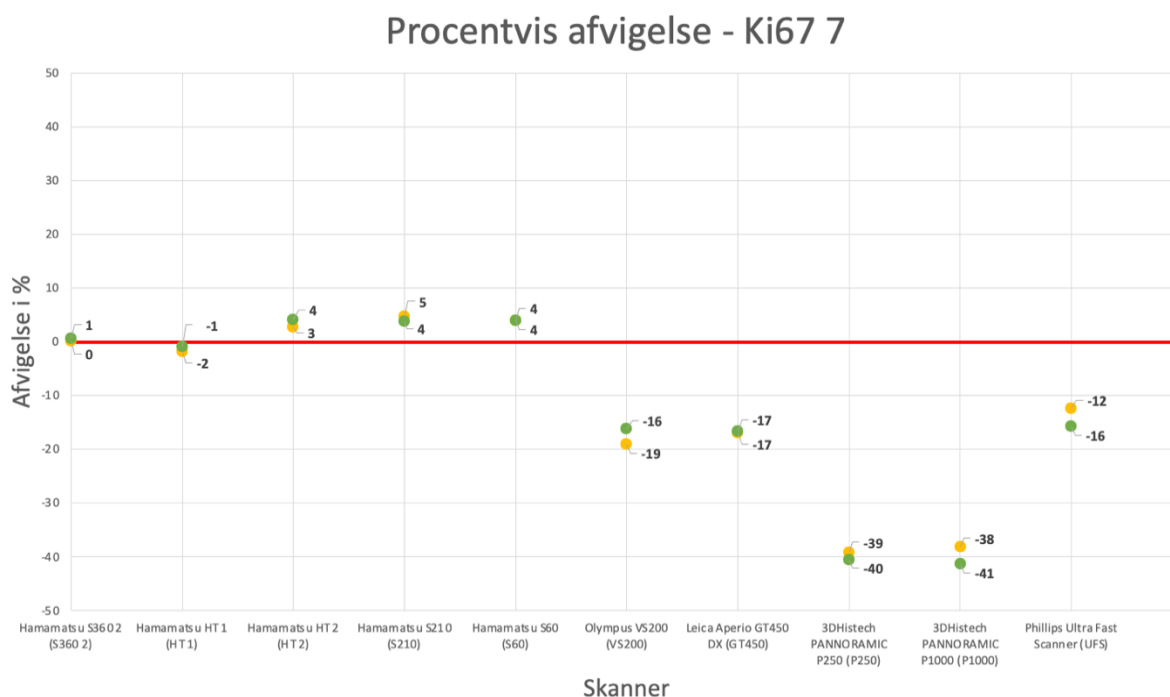
Gule søjler: Gul ROI (15%).

Det fremgår af figur 25, at arealerne af DAB for cores, som er digitaliseret på skannere fra Hamamatsu, generelt er højere end arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra en af de øvrige producenter. Det største areal for grøn ROI er 152595 µm², hvilket er målt på HT 2. Det laveste areal for grøn ROI er 85959 µm², hvilket er målt på P1000. For gul ROI er det højeste areal 23526 µm², hvilket er målt på S210. Det laveste areal for gul ROI er 13682 µm², hvilket er målt på P250.

Søjlediagrammet illustrerer, at der er minimal variation mellem P250 og P1000. Yderligere fremgår det, at der er minimal variation mellem S360 1, S360 2 og HT 1 samt mellem HT 2, S210 og S60. Fælles for disse er, at det er forskellige modeller fra samme producent. Der ses også minimal variation mellem VS200, GT450 og UFS, som til gengæld er forskellige skannermodeller fra forskellige producenter. Denne tendens ses for både gule og grønne ROI.

4.6.2 Procentvis afvigelse fra S360 1

Figur 26 illustrerer den procentvise afvigelse fra S360 1 for Ki67 7-cores fra de 11 inkluderede skannere.



Figur 26: Punktdiagram over den procentvise afvigelse fra S360 1 (referenceskanner) for Ki67 7-cores.

Rød linje: Reference.

Grønne punkter: Grøn Region Of Interest (ROI) (100%).

Gule punkter: Gul ROI (15%).

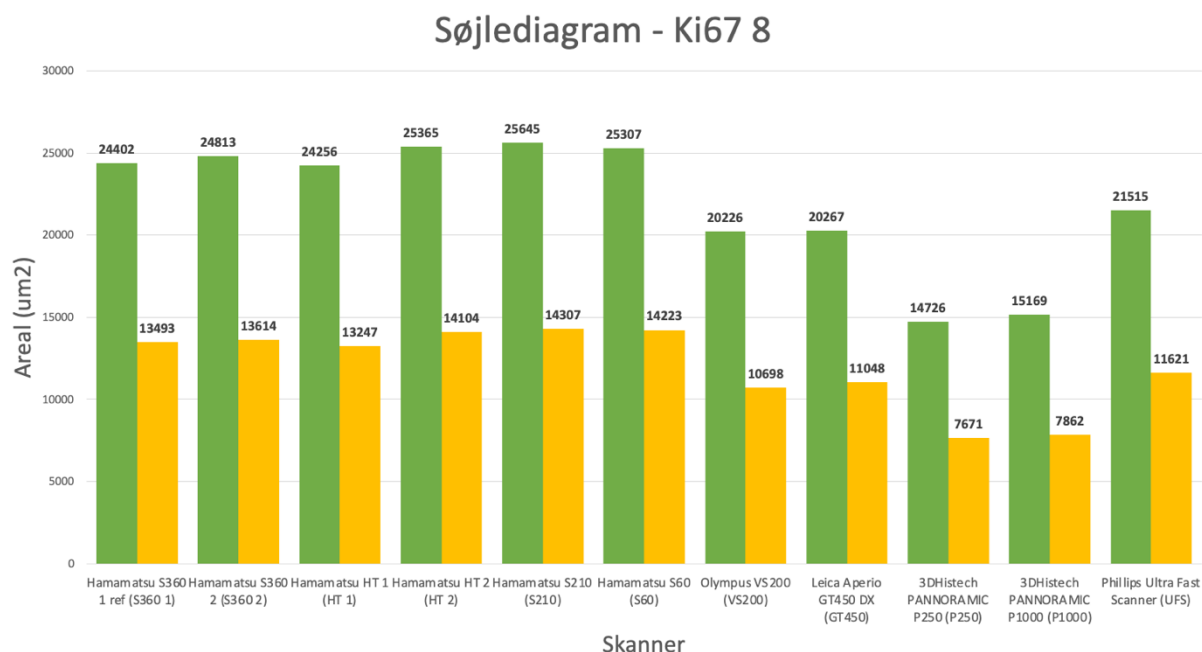
Det fremgår af figur 26, at den procentvise afvigelse fra S360 1 generelt er mindre for skannerne fra Hamamatsu end for skannerne fra andre producenter. For S360 2 ses der eksempelvis ingen procentvis afvigelse for gul ROI og kun 1% afvigelse for grøn ROI. Derimod afviger P1000 -38% for gul ROI og -41% for grøn ROI. Punktdiagrammet illustrerer en minimal procentvis forskel mellem gule og grønne ROI for de 11 inkluderede skannere. Desuden varierer det, om den procentvise afvigelse fra S360 1 er størst for gul eller grøn ROI.

Desuden viser punktdiagrammet, at skannerne fra 3DHistech har en markant større procentvis afvigelse fra S360 1. Dog er den procentvise forskel mellem disse to skannere minimal. Dette gælder både for gul og grøn ROI.

4.7 Ki67 8

4.7.1 Søjlediagram

Søjlediagrammet i figur 27 illustrerer arealerne af DAB for Ki67 8 for hver af de 11 inkluderede skannere. Ud af de tre udvalgte Ki67 CMA'er var Ki67 8 den mest cellefattige.



Figur 27: Areal af DAB (μm^2) for Ki67 8-cores digitaliseret på hver skanner illustreret i et søjlediagram.

Grønne søjler: Grøn Region Of Interest (ROI) (100%).

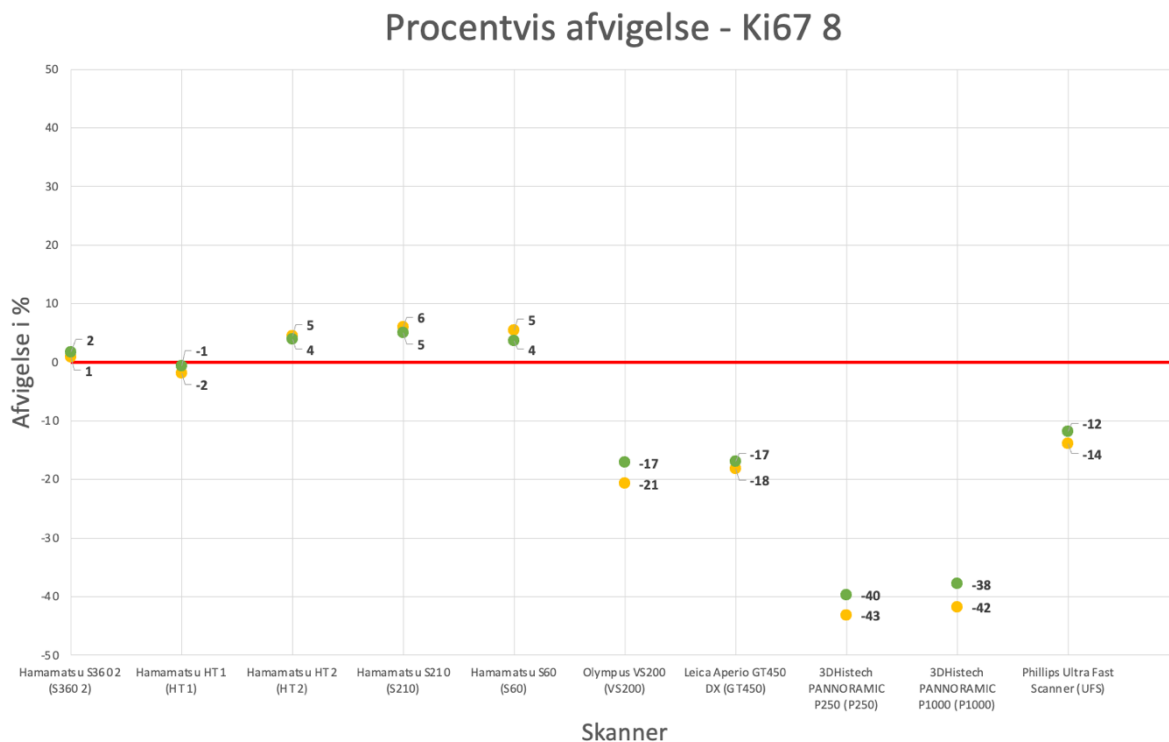
Gule søjler: Gul ROI (15%).

Det fremgår af figur 27, at arealerne af DAB for cores, som er digitaliseret på skannere fra Hamamatsu, generelt er højere end arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra en af de øvrige producenter. Det største areal for grøn ROI er $25645 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for grøn ROI er $14726 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på P250. For gul ROI er det højeste areal $14307 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på S210. Det laveste areal for gul ROI er $7671 \mu\text{m}^2$, hvilket er målt på P250.

Søjlediagrammet illustrerer, at der er minimal variation mellem P250 og P1000. Yderligere fremgår det, at der er minimal variation mellem S360 1, S360 2 og HT 1 samt mellem HT 2, S210 og S60. Fælles for disse er, at det er forskellige modeller fra samme producent. Der ses også minimal variation mellem VS200, GT450 og UFS, som til gengæld er forskellige skannermodeller fra forskellige producenter. Denne tendens ses for både gule og grønne ROI.

4.7.2 Procentvis afvigelse fra S360 1

Figur 28 illustrerer den procentvise afvigelse fra S360 1 for Ki67 8-cores fra de 11 inkluderede skannere.



Figur 28: Punktdiagram over den procentvise afvigelse fra S360 1 (referenceskanner) for Ki67 8-cores.

Rød linje: Reference.

Grønne punkter: Grøn Region Of Interest (ROI) (100%).

Gule punkter: Gul ROI (15%).

Det fremgår af figur 28, at den procentvise afvigelse fra S360 1 generelt er mindre for skannerne fra Hamamatsu end for skannerne fra andre producenter. Eksempelvis ses det, at S360 2 afviger 1% for gul ROI og 2% for grøn ROI, hvorimod P250 afviger -43% for gul ROI og -40% for grøn ROI.

Punktdiagrammet illustrerer en minimal procentvis forskel mellem gule og grønne ROI for de 11 inkluderede skannere. Det ses desuden, at den procentvise afvigelse fra S360 1 er mindst ved grønne ROI for alle skannere undtagen S360 2.

4.8 Delkonklusion

Baseret på resultaterne kan det konkluderes, at der generelt er samme tendens i variationen mellem skannerne for henholdsvis HER2 og Ki67. Det fremgår af søjlediagrammerne, at arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra Hamamatsu, er højere end arealerne for cores, som er digitaliseret på skannere fra en af de øvrige producenter. Det fremgår af punktdiagrammerne, at den procentvise afvigelse fra S360 1 er mindre for skannerne fra Hamamatsu end for skannerne fra andre producenter. Der ses en tendens til, at der er mindre variation mellem skannere fra samme producent og ligeledes inden for samme skannermodel. Dette gælder dog ikke for HER2 6, som var den af de tre udvalgte HER2-CMA'er, der havde den svageste IHC-farveintensitet.

For HER2 gælder det både for gul og grøn ROI, at jo svagere IHC-farvning desto større procentvis afvigelse fra S360 1. Det er gennemgående, at gule ROI, der er kategoriseret som 2+, har en større procentvis afvigelse fra S360 1 end grønne ROI, der er kategoriseret som 3+. For Ki67 varierer det, om den procentvise afvigelse er størst for grønne eller gule ROI. Desuden er der mindre procentvis forskel mellem gul og grøn ROI for hver skanner for Ki67, end der er for HER2.

For Ki67 7 (cellerig) og Ki67 8 (cellefattig) ses en tendens til minimal variation mellem specifikke skannere for både gul og grøn ROI. Det gælder, at der er minimal variation mellem P250 og P1000, Det samme gælder for S360 1, S360 2 og HT 1 samt for HT 2, S210 og S60. Fælles for disse er, at det er forskellige modeller fra samme producent. Der ses også minimal variation mellem VS200, GT450 og UFS, som til gengæld er forskellige skannermodeller fra forskellige producenter. Denne tendens gælder ikke i lige så høj grad for Ki67 5 (kraftig IHC-farveintensitet).

Der er en visuel variation i de digitale billedfiler fra de 11 inkluderede skannere. Den visuelle variation stemmer overens med den variation, der ses i søjle- og punktdiagrammerne. Variationen gør sig gældende for alle digitaliserede cores i projektet. Dette ses blandt andet ved, at de mørke billeder har større arealer af DAB. Derudover stemmer variationen overens med den procentvise afvigelse, der ses i punktdiagrammerne. Dette ses blandt andet ved, at billederne fra Hamamatsu er mere ens i forhold til billederne fra andre producenter.

5 Diskussion

5.1 Diskussion af metode

5.1.1 Valg af prøvemateriale

I begyndelsen af projektet blev der inkluderet 20 CMA'er (10 HER2 og 10 Ki67), der i løbet af processen blev reduceret til 6 (3 HER2 og 3 Ki67). Flere CMA'er blev kategoriseret som uegnede på grund af manglende fokus på vævet og blev derfor ekskluderet. Ved intern digitalisering var det muligt at omskane, hvis CMA'erne var ude af fokus. Dette var mere omfattende ved ekstern digitalisering. Da det kun var få af CMA'erne fra en enkelt skanner, der var ude af fokus, kunne disse ekskluderes uden at det påvirkede antallet af skannere, der indgik i projektet. Til databehandlingen blev der ekskluderet flere CMA'er for at reducere datamængden. I princippet kunne projektet have taget udgangspunkt i én CMA, da det ikke var mængden af prøvemateriale, der var betydelig i projektet men antallet af forskellige skannere. På den anden side var det sårbart kun at inkludere én CMA, da der ville være risiko for at skulle ekskludere skannere på grund af uegnet materiale. Desuden ville der være risiko for mangel på data ved beskadigelse af objektglasset. Ved at inkludere flere CMA'er i projektet blev denne risiko minimeret, og derudover gav det mulighed for at udvælge repræsentative CMA'er til databehandlingen.

5.1.2 Valg af skannere

I projektet var der fokus på at vælge skannere fra forskellige producenter og skannermodeller for at opnå så repræsentative resultater som muligt. På baggrund af projektets omfang var det ikke muligt at inkludere samtlige skannere på markedet, hvorfor der kun kan konkluderes på variationen mellem de inkluderede skannere.

Der blev inkluderet et overtal af skannere fra Hamamatsu i projektet (se tabel 4). PAI, AUH er indehaver af skannere fra Hamamatsu, hvilket gav mulighed for at inddrage disse i projektet. På den ene side begrænsede det idéen om at inddrage så mange forskellige producenter som muligt, mens det på den anden side understøttede valget om at inddrage flere modeller fra samme producent. Herved opstod en mulighed for at undersøge variation inden for samme model samt forskellige modeller fra samme producent.

I projektet blev der udvalgt en referenceskanner. Denne skanner dannede udgangspunkt for udarbejdelsen af DIA-protokollerne og gjorde det muligt at sammenholde resultaterne fra DIA-protokollerne fra de forskellige skannere. Den udvalgte referenceskanner var S360 1 og var dén af de to S360 skannere, der senest havde fået service og kalibrering (se bilag 4.2 og 4.3). S360 blev

udvalgt, da denne skannermodel benyttes på de patologi-afdelinger i Danmark, hvor DIPA allerede er implementeret i rutinearbejdet (33). På den ene side kan det diskuteres, om dette var et tilstrækkeligt grundlag at udvælge en referenceskanner ud fra. På den anden side var formålet med projektet ikke at fastslå, hvor god eller dårlig skannernes billedkvalitet var, men derimod at konkludere, om der var variation i billedkvaliteten, når der blev digitaliseret på forskellige skannere. Af den grund kunne hvilken som helst af de inkluderede skannerne være anvendt som reference, uden at det ville have betydning for projektets resultater. Det vigtige var, at det var den samme skanner, der konsekvent blev anvendt som reference. Referenceskanneren må dog ikke forveksles med en guldstandard. Guldstandard ville være manuel mikroskopi (5), men da formålet med projektet var at sammenligne billedkvaliteten fra forskellige skannere, var det hverken muligt eller relevant for projektet at anvende denne.

5.1.3 Digitaliseringskriterier

Der var få krav til digitaliseringerne (se bilag 4.1). For at kunne sammenligne de digitale billedfiler var et af disse krav, at digitaliseringerne skulle foregå ved 40x. Digitaliseringskriterierne blev derudover udarbejdet med en bevidsthed om, at alle skannere har forskellige egenskaber. Derfor blev de eksterne samarbejdspartnere bedt om at digitalisere CMA'erne som vanligt. Hvis noget afveg, skulle de informere om dette, så der kunne tages højde for det i resultatarbejdet. Der skulle skannes som vanligt, så projektet afspejlede virkeligheden mest muligt, og det faktum at der er forskel på, hvordan skannerne indstilles og anvendes på forskellige afdelinger og i forskellige virksomheder. Modsat var det u hensigtsmæssigt at have få krav, da flere digitale billedfiler viste sig at være uegnede. Der var derved færre CMA'er at tage udgangspunkt i under databehandlingen, og det var uvist, om de uegnede CMA'er kunne have givet mere repræsentative resultater. I kriterierne blev det ikke specificeret, at de ansvarlige for de eksterne digitaliseringer skulle kvalitetssikre de digitale billedfiler. Ekskluderinger, på baggrund af uegnede CMA'er, kunne muligvis være undgået ved at konkretisere kriterierne.

5.1.4 Region Of Interest

I VIS er det muligt at udarbejde ROI-protokoller, hvor resultatet er et areal. Hvis der er variation i billedet, kan der være forskel på de objekter, der inkluderes i ROI, hvorfor arealerne vil variere. Når der efterfølgende anvendes DIA-protokoller, vil resultatet blive en arealfraktion. Denne arealfraktion afhænger både af arealet af ROI og arealet af det detekterede fra DIA-protokollen. Det var ikke hensigtsmæssigt i dette projekt, og derfor blev der ikke udarbejdet en ROI-protokol. I projektet blev

ROI udelukkende anvendt til at adskille cores samt til at definere aflæsningsområdet. Der blev defineret én diameter for ROI for alle HER2-cores og én diameter for alle Ki67-cores. ROI blev derefter placeret manuelt ud fra pejlemærker. Ved anvendelse af DIA-protokoller blev resultatet derfor blot et areal af DAB-positive objekter inden for ROI. Dette gjorde det muligt at beregne variation i billedkvalitet udelukkende på baggrund af arealet af DAB.

Den manuelle placering af ROI ud fra pejlemærker kunne give anledning til variation, da placeringen ud fra en visuel vurdering vil være forbundet med en lille usikkerhed. I et forsøg på at minimere denne usikkerhed var det de samme personer, der placerede ROI for henholdsvis HER2- og Ki67-cores. Da HER2- og Ki67-cores ikke skulle sammenlignes med hinanden, var den interindividuelle variation ikke betydelig i dette projekt. Det havde derimod været relevant at undersøge den intraindividuelle variation for at vurdere den enkelte persons evne til at placere ROI ensartet. Dette kunne undersøges ved, at den enkelte person placerede ROI på samme core gentagende gange, hvorefter arealerne fra DIA-protokollerne kunne sammenholdes. Hvis der ikke var variation i arealerne, kunne det skyldes, at ROI rent faktisk blev placeret identisk. Det kunne også skyldes, at den intraindividuelle variation i placeringen af ROI var ubetydelig, da DIA-protokollen ikke havde detekteret færre eller flere DAB-positive objekter.

5.1.5 Digitale billedanalyseprotokoller

I udarbejdelsen af DIA-protokollerne blev der taget udgangspunkt i ML, hvor der blev anvendt Threshold som segmenteringsmetode. Denne metode tager udgangspunkt i pixelværdier, hvilket var det kvalitetsparameter, som variationen i billedkvalitet blev vurderet på baggrund af. DIA-protokollerne skulle være så simple som muligt for at udelukke andre årsager til variation end variation i pixelværdierne. Der blev derfor udarbejdet én DIA-protokol til HER2-cores og én til Ki67-cores for at sikre, at indstillingerne blev fastsat efter den enkelte markør. Indstillingerne i protokollerne viste sig at blive identiske bortset fra en forskel i DAB-pixelværdiintervallet samt i post-processing-trinnet "change by shape", hvor størrelsen på frasorterede objekter varierede. I princippet kunne der derfor være blevet udarbejdet én DIA-protokol, da formålet med protokollerne blot var at identificere, hvorvidt der var forskel i arealerne. Protokollen blev dermed ikke udarbejdet til diagnostisk brug. En diagnostisk protokol kan ikke udelukkende tage udgangspunkt i pixelværdier, da der blandt andet skal tages hensyn til specifikke kriterier for den enkelte IHC-farvning. Hertil ville det være relevant at anvende DL, som, ved brug af neurale netværk, til en vis grad kan trænes til at kompensere for biologisk variation samt dag-til-dag variation.

Begge DIA-protokoller blev udarbejdet på baggrund af de digitale billedfiler fra referenceskanneren (S360 1) for at sikre ensartethed. Pixelværdiintervallerne blev fastsat ud fra de udvalgte cores, så det sikredes, at protokollerne kunne identificere DAB i både høje og lave intensiteter. DIA-protokollerne kunne have taget udgangspunkt i hvilken som helst skanner, så længe de udelukkende blev udarbejdet på baggrund af billedfiler fra den udvalgte skanner. Det betød ikke, at DIA-protokollerne, baseret på referenceskanneren, havde det rigtige pixelværdiinterval. Det vigtige var, at pixelværdiintervallerne i DIA-protokollerne var konstante for at kunne påvise variation imellem skannerne.

5.1.6 Databehandling

I projektet var der fokus på at inddrage så mange forskellige skannere som muligt for at undersøge variation mellem skannere. For at undersøge denne variation blev alle objektglas digitaliseret én gang på hver af de inkluderede skannere. Dette gav udfordringer i forhold til at konkludere på, hvorvidt projektets resultater var statistisk signifikante. For at kunne udtale sig om statistisk signifikans havde det været nødvendigt at digitalisere objektglassene gentagende gange på samme skanner. På den måde kunne den tilfældige variation identificeres for den enkelte skanner. Ud fra de gentagende målinger ville det være muligt at konkludere på, hvorvidt variation i skannerne var systematisk eller tilfældig (34). I projektet var der inkluderet to S360 skannere og to HT'ere. Ved at sammenligne målingerne inden for samme skannermodel kunne den tilfældige variation dog usikkert udledes for henholdsvis S360 og HT. Denne tilfældige variation ville dog ikke være overførbart til de andre skannere, hvorfor det ikke var relevant for projektet. Optimalt set skulle den tilfældige variation på hver skanner identificeres for at kunne vurdere, om variationen mellem skannerne var statistisk signifikant.

5.2 Diskussion af resultater

5.2.1 Vurdering af skannere fra samme producent

Projektet inkluderede seks skannere fra Hamamatsu samt to skannere fra 3DHitech. Resultaterne viste, at der var mindst variation mellem skannere fra samme producent. Over halvdelen af de inkluderede skannere var fra Hamamatsu, og der var generelt stor overensstemmelse i resultaterne mellem disse. Dette gjaldt dog ikke for HER2 6. På grund af denne overvægt samt ensartethed kunne resultaterne fra disse skannere fremstå som de mest korrekte. Dette understreges også af, at referenceskanneren (S360 1) i projektet var fra Hamamatsu, og at de procentvise afvigelser i punktdiagrammerne derved tog udgangspunkt i denne. I den forbindelse kom de resterende

skannerne fra Hamamatsu til at fremstå overlegne i forhold til skannerne fra andre producenter. Selvom resultaterne fra skannerne fra Hamamatsu virker overlegne, er det ikke muligt at udtale sig om, hvorvidt de rent faktisk er de mest korrekte. Var der blevet valgt en referenceskanner fra en af de øvrige producenter, havde det modsat afspejlet sig i større procentvise afvigelser for skannerne fra Hamamatsu. På den måde ville skannerne fra de øvrige producenter se mere korrekte ud. For at imødekomme denne problematik kunne der i projektet være foretaget en visuel vurdering af, hvilken skanners digitale billedfiler der var mest sammenlignelige med manuel mikroskopi (guldstandard) og have valgt referenceskanner på baggrund af dette.

Ud af de seks skannere fra Hamamatsu indgik der to S360 og to HT. I søjlediagrammerne sås en tendens til, at der var mindre variation mellem de to S360, end der var mellem de to HT. S360 er en ny model i forhold til HT, og desuden var begge S360 serviceret og kalibreret inden for de sidste seks måneder (se bilag 4.2 og 4.3). De to HT'ere var også kalibreret inden for de sidste seks måneder, men der var, modsat begge S360, ikke udført service i tre år (se bilag 4.6 og 4.7). Det kan derved diskuteres, om resultaterne er et udtryk for HT-modellens reelle ydeevne, eller om det skyldes manglende servicering, samt at de er af ældre dato. Desuden sås det, at de målte arealer af DAB fra HT 2 konsekvent var højere end arealerne af DAB fra HT 1. Det anbefales, at skannerne står tændt minimum en halv timen forinden igangsættelse af digitaliseringens (25). Digitaliseringen på HT 2 overholdt disse retningslinjer, hvorimod HT 1 blev tændt under en halv time før skanningen. Dette kan muligvis være årsagen til variationen mellem HT 1 og HT 2. Modsat blev S210 også tændt under en halv time før digitalisering, og denne målte generelt højere arealer end de resterende skannere fra Hamamatsu. Det er derved svært at udtale sig om, hvorvidt det har betydning, hvor lang tid skanneren står tændt inden brug.

Resultaterne viste, at de digitale billedfiler fra P250 og P1000 fra 3DHistech havde en tendens til mindre arealer af DAB samt højere procentvise afvigelser fra S360 1 sammenlignet med de øvrige skannere. Disse mindre arealer skyldes, at DIA-protokollen ikke har detekteret lige så meget DAB. Udarbejdelsen af DIA-protokollerne har taget udgangspunkt i S360 1, og derfor er pixelværdiintervallerne fastsat på baggrund af de digitale billedfiler for denne skanner. Årsagen til, at DIA-protokollen ikke har detekteret mere DAB, kan være fordi, at DAB-farveværdien i de digitale billedfiler fra P1000 og P250 falder udenfor de fastsatte pixelværdiintervaller. På den ene side kan det diskuteres, om et bredere pixelværdiinterval kunne have sikret en mere ensartet detektion af DAB på tværs af skannerne. På den anden side er der risiko for, at et bredere pixelværdiinterval ville nedsætte specificiteten for de enkelte skannere, fordi objekter, der ikke er DAB-positive, ville blive medtaget. Sat i relation til mammacancerdiagnostik kan begge scenarier være problematiske, hvis arealet af DAB påvirker HER2-scoren og Ki67-proliferationsindekset i en sådan grad, at det får klinisk

betydning. Eksempelvis hvis det endelige areal af DAB ligger tæt på grænseværdien for, om et snit, IHC-farvet for HER2, kategoriseres som +1 eller +2. Hvis dette er tilfældet, kan det betyde, at det er nødvendigt at anvende DIA-protokoller, der er specifikke for den enkelte skanner. Da dette projekt undersøger variation mellem skannere, var der behov for at holde så mange elementer som muligt konstante. Det var derfor vigtigt, at der konsekvent blev anvendt samme DIA-protokol til henholdsvis HER2 og Ki67, for at kunne vurdere variation mellem skannerne.

Desuden ses det også visuelt, at DAB-udtrykket i S360 1 er forskellig fra DAB-udtrykket i P1000 og P250 (se figur 16). I de digitale billedfiler fra P250 og P1000 fremstår DAB gylden, mens DAB ved S360 er mere mørkebrun. Det kan diskuteres, om denne visuelle forskel kan stamme fra forskelle i skannernes egenskaber. I tabel 5 ses det, at alle tre skannere bruger et CMOS-kamera. Til gengæld ses der en forskel i lyskilden. P1000 og P250 har en Xenon Flash Illumination lyskilde, hvorimod S360 1 har en LED lyskilde. Xenon Flash Illumination emitterer 20.000 gange mere lys end LED (35). En årsag til denne visuelle variation kan derfor muligvis tilskrives forskellen i lyskilder.

5.2.2 Vurdering af skannere på tværs af producenter

I projektet indgik der skannere fra fem forskellige producenter (se tabel 4). Det fremgår af resultaterne, at den procentvise afvigelse fra S360 1 generelt er større for skannerne fra Leica (GT450), Olympus (VS200) og Philips (UFS) end for Hamamatsu. Det ses, at VS200, GT450 og UFS overordnet følger samme tendens på trods af, at de er fra forskellige producenter.

Da de digitale billedfiler fra VS200 første gang blev gennemgået, sås der et mælkehvidt slør på alle billederne. Ifølge brugeren af skanneren levede dette udtryk ikke op til skannerens normale ydeevne, og billederne ville normalvis ikke være blevet godkendt. Billederne og de tilhørende resultater blev dog medtaget i projektet for at påpege vigtigheden i at kvalitetssikre skanneren og de digitale billedfiler. Desuden gav det mulighed for at illustrere, hvordan det visuelle udtryk og arealerne fra DIA-protokollerne kan se ud, når der er en fejl. Arealerne fra DIA-protokollerne for VS200 var generelt lavere end arealerne af DAB for S360 1. På trods af at VS200 havde en fejl, er det interessant, at flere af de andre skannere havde en større procentvis afvigelse fra S360 1.

De digitaliserede billedfiler fra GT450 har et lyst visuelt udtryk sammenlignet med S360 1 (se figur 16), og desuden ses der lavere arealer af DAB for denne skanner i forhold til arealerne for S360 1. De procentvise afvigelser for GT450 fra S360 1 er meget lig dem for VS200, hvor der, som beskrevet, var opstået en fejl. I den forbindelse er det relevant at diskutere, hvorvidt projektets resultater er et reelt udtryk for GT450's ydeevne. For at vurdere dette kunne det have været relevant at foretage

gentagne digitaliseringer af CMA'erne på GT450. Dog foregik digitaliseringen på GT450 eksternt hos Leica Biosystems i Amsterdam, Holland, hvorfor dette ikke var en mulighed inden for projektets tidsramme. I en dansk videnskabelig artikel af Smith et. al. fra 2022, hvis formål er at belyse oplevelserne under implementeringen af DIPA i Danmark, beskrives det, at Region Sjælland anvender GT450 fra Leica (7). Region Sjælland må derfor have vurderet, at skanneren leverer digitale billedfiler af tilfredsstillende kvalitet. Dette tyder på, at projektets resultater ikke er et reelt udtryk for GT450's ydeevne. I den forbindelse kan det dog også diskuteres, hvorvidt GT450's procentvise afvigelse fra S360 1 skyldes, at skannerne fra Hamamatsu generelt producerer mørke billeder, hvilket afspejler sig i højere arealer.

Tendensen til lyse billedfiler og lavere arealer af DAB gælder også de billedfiler, der er digitaliseret på UFS. I en videnskabelig artikel af Patel et. al. fra 2021, der sammenligner egenskaber i 43 skannere, beskrives det, at UFS er en af de eneste skannere, der er godkendt af USA's fødevarer- og lægemiddelmyndighed, U.S Food and Drug Administration (FDA) (36). Dette må betyde, at UFS opfylder de nødvendige kvalitetsparametre på trods af den afvigelse fra S360 1, der ses i projektet. På den ene side bør det derfor overvejes, om arealerne fra S360 1, og de øvrige skannere fra Hamamatsu, generelt er for høje. På den anden side er S360 1 In Vitro Diagnostic Regulation (IVD-R) godkendt i Europa (EU) (37), hvilket betyder, at skannere fra Hamamatsu ligeledes lever op til specifikke kvalitetsmæssige krav. Dette kan tyde på, at skannerkvalitet forstås forskelligt i EU og USA, hvilket er vigtigt at overveje ved deling af digitale billedfiler på tværs af landegrænser.

5.2.3 HER2

For HER2 gjaldt det, at jo svagere membranfarvning desto større procentvis afvigelse fra S360 1. Gule ROI, der var kategoriseret som 2+, havde en større procentvis afvigelse fra S360 1 end grønne ROI, der var kategoriseret som 3+. HER2 inddeles i kategorier på baggrund af både intensitet og kompleksitet af membranreaktionen. Intensiteten af DAB er dermed svagere ved en 2+ end ved 3+, hvilket kan gøre det sværere for DIA-protokollen at detektere DAB i disse cores. Den procentvise forskel mellem grøn og gul ROI er, i de fleste tilfælde, større for skannere fra andre producenter end for skannere fra Hamamatsu. De digitale billedfiler fra skannere fra øvrige producenter fremstår lysere end billederne fra skannere fra Hamamatsu, og DIA-protokollen havde derfor endnu sværere ved at detektere DAB i HER2-cores, der er kategoriseret som 2+. Der ses dog ikke en lige så stor procentvis forskel mellem gul og grøn ROI ved HER2 6 som ved HER2 1 og HER2 5. HER2 6 er den af de tre udvalgte HER2-CMA'er, der har den svageste IHC-farveintensitet, og begge HER2 6-cores er så svage, at DIA-protokollen havde svært ved at detektere DAB. Det er især vigtigt, at DIA-protokollen

kan detektere DAB i de cores, der er kategoriseret som 2+, da disse har diagnostisk betydning. Hvis arealet af detekteret DAB varierer, alt efter hvilken skanner der har digitaliseret billedfilerne, kan det muligvis have en betydning for mammacancerpatienters prognose, diagnose og behandling.

5.2.4 Ki67

Modsat HER2 varierede det for Ki67, om den procentvise afvigelse var størst for grøn eller gul ROI. Desuden var der mindre procentvis forskel mellem gul og grøn ROI for hver skanner for Ki67, end der var for HER2. Dette kan skyldes, at DIA-protokollens evne til at detektere DAB har været ens, uanset om coren har et proliferationsindeks på 15% eller 100%. IHC-farvningen for Ki67 vurderes ud fra tilstedeværelsen af kernereaktion eller ej. Derfor er der ikke nødvendigvis forskel i intensiteten af DAB imellem cores med et proliferationsindeks på henholdsvis 15% og 100%. Der er blot forskel i antal Ki67-positive celler. Af samme årsag afveg Ki67-CMA'erne ikke nær så meget fra S360 1 som HER2-CMA'erne gjorde. Der var dog stadig variation i den procentvise afvigelse fra S360 1 for gul ROI (15%) mellem skannerne. Gul ROI repræsenterer de cores, der ligger lige omkring grænseværdien på 10-20% positive tumorceller. Anvendelsen af forskellige skannere kan derved have en diagnostisk betydning, hvis mammacancerpatienter fejlagtigt bliver vurderet til eksempelvis et lavt proliferationsindeks i stedet for højt.

Derudover sås der, for Ki67 7 (cellerig) og Ki67 8 (cellefattig), en tendens til minimal variation mellem specifikke skannere for både gul og grøn ROI. Det tyder derved på, at det ikke har betydning for resultaterne, om en core er cellerig eller cellefattig.

5.2.5 Resultaternes betydning for mammacancerdiagnostik

På baggrund af projektets resultater er det ikke muligt at konkludere på, hvorvidt den variation, der ses mellem de inkluderede skannere, har en diagnostisk betydning for mammacancerpatienter. Resultaterne fra projektets DIA-protokoller opgives i arealer, hvilket ikke gør sig gældende for de diagnostiske DIA-protokoller. Derfor er resultaterne fra projektet ikke direkte overførbare til klinisk praksis. Det ses dog tydeligt, at de inkluderede skannere ikke gengiver den brune DAB-farveudfældning ens, hvilket har den konsekvens, at DIA-protokollerne detekterer DAB forskelligt. Derved vil den variation, der ses i arealerne af DAB blandt de inkluderede skannere, formentligt også afspejle sig i praksis. Det formodes dermed, at variationen kan påvirke mammacancerdiagnostikken.

5.3 Arbejdsgang og kvalitetssikring

I Danmark er der endnu ingen nationale retningslinjer for, hvilke skannere der skal anvendes. Det er forventeligt, at den enkelte afdeling vil indkøbe forskellige skannere til forskellige formål (8). På den måde udnyttes enkelte skanners potentiale udnyttes til at opnå digitale billedfiler af den bedst mulige kvalitet. Hvis den skanner, der normalt anvendes til et specifikt formål, er ude af drift, eller hvis skanneren af andre årsager ikke kan anvendes, kan afdelingen være nødsaget til at anvende en anden skanner. Dette kan være problematisk, hvis der er variation i billedkvaliteten mellem de skannere, der anvendes. Konsekvensen afhænger af, om variationen er så signifikant, at den får betydning for patologens vurdering eller DIA-protokollens aflæsning af den digitale billedfil og derved for patienten. På den ene side er der risiko for, at patologens vurdering kan blive påvirket, hvis udtrykket i de digitale billedfiler pludseligt afviger fra det udtryk, der normalt ses. På den anden side vil en erfaren patolog muligvis kunne korrigere for den visuelle forskel, der ses i billedfilerne fra forskellige skannere. DIA-protokoller kan ikke tage højde for variation i samme grad som en patolog, og det er derfor altafgørende, at de digitale billedfiler bliver kvalitetssikret forud for analysering og vurdering. Flere videnskabelige artikler, herunder den danske artikel af Smith et. Al. (7), påpeger vigtigheden af at optimere de præanalytiske parametre såsom IHC-farvningen. En god præanalyse kan optimere kvaliteten af det enkelte digitale billede, men det ændrer ikke på variationen i billedfilerne på tværs af forskellige skannere. Det er derfor essentielt at kvalitetssikre skannerne blandt andet i form af kalibrering. For at kunne mindske variationen i billedkvalitet mellem skannere er det vigtigt at anvende identiske kalibreringsobjektglas uanset skanner. Dette understøttes af en videnskabelig artikel af Bautista et. Al. fra 2014, hvori det beskrives, at kalibrering med samme standardiserede kalibreringsobjektglas kan reducere farvevariation mellem forskellige skannere signifikant (38).

Det kan desuden give udfordringer i arbejdsgangen, hvis der, ved nedbrud af en skanner, skiftes til en med andre funktioner. Der er blandt andet forskel på, om skannerne har mulighed for kontinuert loading. Kontinuert loading muliggør, at der løbende kan påsættes og aftages racks på skanneren, hvilket er fordelagtigt, da det vil effektivisere arbejdsflowet. Hvis afdelingen er nødsaget til at anvende en anden skanner uden kontinuert loading, kan dette påvirke arbejdsflowet og muligvis forsinke svartiderne. Ved implementering af DIPA på en afdeling er det derfor vigtigt at overveje, hvilken betydning anvendelsen af forskellige skannere med forskellige funktioner kan have for arbejdsgangen.

6 Konklusion

På baggrund af projektet kan det konkluderes, at anvendelse af forskellige skannere har en betydning for billedkvaliteten og for den efterfølgende detektion af Ki67 og HER2. Resultaterne viste, at der er variation i billedkvaliteten mellem de 11 inkluderede skannere, og at variationen gælder både for HER2 og Ki67. Variationen betyder, at skannerne ikke gengiver DAB-farveudfældningen ens. Af den grund detekterer DIA-protokollerne DAB forskelligt, hvorved der fås varierende resultater for identiske cores afhængigt af skanner. Tages der ikke højde for variation i billedkvalitet mellem skannere, kan det formentlig få en konsekvens for mammacancerdiagnostik. Projektets resultater er dog ikke direkte overførbare til klinisk praksis, og derfor kan det kun formodes, at den variation, der ses i projektet, kan påvirke mammacancerdiagnostikken.

7 Perspektivering

I projektet sås der en større procentvis afvigelse fra S360 1 mellem skannerne for HER2-cores, kategoriseret som 2+, end HER2-cores kategoriseret som 3+. Dette er problematisk, da det muligvis kan få betydning for mammacancerpatienters behandlingsmuligheder. I nuværende klinisk praksis skelnes der mellem HER2-positiv (2+ og 3+) og HER2-negativ (0 og 1+), da det blot er patienter kategoriseret som HER2-positive, der kan tilbydes targeteret behandling (15). I en videnskabelig artikel af Modi et. Al. fra 2022 beskrives det dog, at det, inden længe, kan blive relevant at skelne mellem HER2-low (1+) og HER2-negativ (0) som følge af en ny antistofbehandling (39). Dette er yderst aktuelt, da en stor procentdel af mammacancerpatienter er HER2-negative (0 og 1+) (15). Dette vil stille endnu større krav til patologernes semikvantitative vurdering af HER2, og af samme grund vil det stille større krav til skanneres billedkvalitet. Membranfarvningerne for HER2-low og HER2-negativ er så svage og i så få tumorceller, at selv en lille variation i udtrykket af DAB mellem skannere kan få en betydning for vurderingen af HER2 og dermed for mammacancerpatienters behandlingsmuligheder. Da projektets resultater viste, at der var større variation i billedkvaliteten for cores kategoriseret som 2+, ville det derfor være relevant yderligere at undersøge DIA-protokollernes evne til at detektere DAB i cores kategoriseret som 0 og 1+, når der anvendes forskellige skannere.

8 Referenceliste

1. Topol E. The Topol Review: Preparing the healthcare workforce to deliver the digital future [Internet]. NHS Health Education in England. 2019 [henvist 13. oktober 2022]. Tilgængelig hos: <https://topol.hee.nhs.uk/wp-content/uploads/HEE-Topol-Review-2019.pdf>
2. Sundheds- og ældreministeriet, Finansministeriet, Danske Regioner, Kommunernes Landsforening. Strategi for digital sundhed 2018-2022 [Internet]. Sundhedsdatastyrelsen. 2018 [henvist 31. maj 2022]. Tilgængelig hos: https://sundhedsdatastyrelsen.dk/-/media/sds/filer/strategi-og-projekter/strategi-digital-sundhed/strategi-for-digital-sundhed-2018_2022.pdf
3. Bera K, Schalper KA, Rimm DL, Velcheti V, Madabhushi A. Artificial intelligence in digital pathology - new tools for diagnosis and precision oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. november 2019;16(11):703–15.
4. Griffin J, Treanor D. Digital pathology in clinical use: where are we now and what is holding us back? *Histopathology*. januar 2017;70(1):134–45.
5. Aeffner F, Wilson K, Martin NT, Black JC, Hendriks CLL, Bolon B, m.fl. The Gold Standard Paradox in Digital Image Analysis: Manual Versus Automated Scoring as Ground Truth. *Arch Pathol Lab Med*. september 2017;141(9):1267–75.
6. Danske Bioanalytikere. Bioanalytiker i beta [Internet]. dbio. 2019 [henvist 14. oktober 2022]. Tilgængelig hos: <https://dbio.dk/udgivelser/bioanalytiker-beta>
7. Smith J, Johnsen S, Zeuthen MC, Thomsen LK, Marcussen N, Hansen S, m.fl. On the Road to Digital Pathology in Denmark-National Survey and Interviews. *J Digit Imaging*. 24. maj 2022;
8. Kindberg E. Supporting digital full-scale primary diagnostics in pathology [Internet]. Sectra Medical. 2014 [henvist 29. november 2022]. Tilgængelig hos: <https://medical.sectra.com/resources/supporting-digital-full-scale-primary-diagnostics-pathology/>
9. Snead DRJ, Tsang YW, Meskiri A, Kimani PK, Crossman R, Rajpoot NM, m.fl. Validation of digital pathology imaging for primary histopathological diagnosis. *Histopathology*. juni 2016;68(7):1063–72.

10. Henrik Holten-Rossing, Maj-Lis Møller Talman, Martin Kristensson, Ben Vainer. Optimizing HER2 assessment in breast cancer: application of automated image analysis. Springer. 7 2015;9.
11. Rojo MG, García GB, Mateos CP, García JG, Vicente MC. Critical comparison of 31 commercially available digital slide systems in pathology. *Int J Surg Pathol*. oktober 2006;14(4):285–305.
12. Sundhedsstyrelsen. Statusrapport kræftscreening [Internet]. Sundhedsstyrelsen. 2022 [henvist 14. oktober 2022]. Tilgængelig hos: https://www.sst.dk/-/media/Udgivelser/2022/Screening/statusrapport_kraeftscreening-webtilgaengelig.ashx
13. Saco A, Ramírez J, Rakislova N, Mira A, Ordi J. Validation of Whole-Slide Imaging for Histopathological Diagnosis: Current State. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol*. 2016;83(2–3):89–98.
14. NORDCAN. Fact sheet brystcancer Danmark [Internet]. NORDCAN. 2022 [henvist 18. oktober 2022]. Tilgængelig hos: <https://gco.iarc.fr/media/nordcan/factsheets/92/dk/countries/208/bryst-180-danmark-208.pdf>
15. Danske Multidisciplinære Cancer Grupper, Regionernes Kliniske Kvalitetsudviklingsprogram. DBCG - Patologiprocedurer og molekylærpatologiske analyser ved brystkræft [Internet]. 2022 [henvist 19. oktober 2022]. Tilgængelig hos: https://www.dmcg.dk/siteassets/kliniske-retningslinjer---skabeloner-og-vejledninger/kliniske-retningslinjer-opdelt-pa-dmcg/dbcg/dbcg_patologiprocedure-v1.3_admgodk040422.pdf
16. Marcussen N. *Patologi*. 3. udgave. Lasse Romer, redaktør. Kbh.: Roskilde; 2019.
17. Roche Diagnostics. Interpretation Guide for VENTANA anti-HER2/neu (4B5) [Internet]. 2011 [henvist 20. oktober 2022]. Tilgængelig hos: http://www.hsl-ad.com/newsletters/HER2_4B5_Interpretation_Guide.pdf
18. Vanneman M, Dranoff G. Combining Immunotherapy and Targeted Therapies in Cancer Treatment. *Nat Rev Cancer*. 22. marts 2012;12(4):237–51.
19. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. Ki67 [Internet]. NordiQC. 2009 [henvist 20. oktober 2022]. Tilgængelig hos:

<https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=1>

20. NordiQC - Immunohistochemical Quality Control. Ki67: Assessment Run B22 2016 [Internet]. NordiQC. 2016 [henvist 20. oktober 2022]. Tilgængelig hos: https://www.nordiqc.org/downloads/assessments/84_1.pdf
21. Grunkin M, Raundahl J, T. Foged N. Chapter 8: Practical Considerations of Image Analysis and Quantification of Signal Transduction IHC Staining. I: Signal Transduction Immunohistochemistry - Methods and Protocols [Internet]. Humana Press; 2011 [henvist 4. september 2022]. s. 143–54. Tilgængelig hos: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-61779-024-9>
22. Visiopharm. Visiopharm Integrator System. Hørsholm, Denmark;
23. HistoCyte Laboratories. About - HistoCyte Laboratories [Internet]. HistoCyte Laboratories. [henvist 10. november 2022]. Tilgængelig hos: <http://www.histocyte.com/about.html>
24. HistoCyte Laboratories. HER2 Analyte Control [Internet]. [henvist 8. november 2022]. Tilgængelig hos: http://www.histocyte.com/images/pdf/HCL0026_HCL0027_HCL0028_PI_V005.pdf
25. Hamamatsu Photonics. NanoZoomer S360 C13220-serien instruktionsmanual. 2021.
26. Hamamatsu Photonics. NanoZoomer S60 C13210-serien instruktionsmanual. 2017.
27. Hamamatsu. NanoZoomer series. Hamamatsu; 2014.
28. Hamamatsu Photonics. NanoZoomer S210 C13239 series instruction manual. 2017.
29. Olympus. VS200 | Research Slide Scanner | Olympus LS [Internet]. Olympus Lifescience. [henvist 17. november 2022]. Tilgængelig hos: [https://www.olympus-lifescience.com/en/solutions-based-systems/vs200/?campaignid=1862163731&adgroupid=112625246565&keyword=vs200%20slide%20scanner&gclid=Cj0KQCQiA1NebBhDDARIsAANiDD2HRvvlwqc-000UKCF2YmuebrS3TkPRCQ8gMd00DO9F5r5unkLY-0aAppcEALw_wcB#!cms\[focus\]=cmsContent6311](https://www.olympus-lifescience.com/en/solutions-based-systems/vs200/?campaignid=1862163731&adgroupid=112625246565&keyword=vs200%20slide%20scanner&gclid=Cj0KQCQiA1NebBhDDARIsAANiDD2HRvvlwqc-000UKCF2YmuebrS3TkPRCQ8gMd00DO9F5r5unkLY-0aAppcEALw_wcB#!cms[focus]=cmsContent6311)
30. Leica Biosystems. Aperio GT 450 DX User's Guide [Internet]. Leica Biosystems. 2022. Tilgængelig hos: https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media_product-

- download/2022-05/Aperio_GT_450_DX_User_Guide_English_MAN-0475_Rev_B.pdf
31. 3DHistech. PANNORAMIC Slide Scanners - Key characteristics [Internet]. 3DHistech. 2019 [henvist 17. november 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.3dhistech.com/wp-content/uploads/2020/04/br-sc-102019.pdf>
 32. FDA. 510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY: Philips Intellisite Pathology Solution [Internet]. FDA. [henvist 16. december 2022]. Tilgængelig hos: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K172174.pdf
 33. Detlefsen S, Hansen S, Waldstrøm M, Marcussen N, Korsgaard N, Green TM. Digital patologi [Internet]. Ugeskriftet.dk. 2022 [henvist 13. oktober 2022]. Tilgængelig hos: <https://ugeskriftet.dk/videnskab/digital-patologi>
 34. Bendsen T. Noter i statistik [Internet]. <http://statnoter.dk>. Thomas Bendsen; 2017 [henvist 30. november 2022]. Tilgængelig hos: <https://statnoter.dk/index.php?sectionID=7>
 35. Phoxene. Application Note 05: XENON FLASH VS LED [Internet]. Phoxene. 2018 [henvist 9. december 2022]. Tilgængelig hos: <https://www.phoxene.com/wp-content/uploads/2018/09/05-Traffic-Enforcement-XENON-FLASH-VS-LED.pdf>
 36. Patel A, Balis UGJ, Cheng J, Li Z, Lujan G, McClintock DS, m.fl. Contemporary Whole Slide Imaging Devices and Their Applications within the Modern Pathology Department: A Selected Hardware Review. *J Pathol Inform.* 2021;12:50.
 37. Hamamatsu Photonics includes a newly IVDR compliant slide scanner system part of the NanoZoomer® family [Internet]. [henvist 8. december 2022]. Tilgængelig hos: https://www.hamamatsu.com/eu/en/news/featured-products_and_technologies/2022/hamamatsu-photonics-includes-a-newly-ivdr-compliant-slide-scanner.html
 38. Bautista PA, Hashimoto N, Yagi Y. Color standardization in whole slide imaging using a color calibration slide. *J Pathol Inform.* 2014;5(1):4.
 39. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, m.fl. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 7. juli 2022;387(1):9–20.

9 Bilagsliste

BILAG 1 – PROJEKTBEKRIVELSE TIL PROJEKT MELLEEM PATOLOGI, AUH OG VISIOPHARM

BILAG 2 – MAIL FRA HENRIK HØEG, COMPUTER VISION OG AI ENGINEER, VISIOPHARM

BILAG 3 – MAIL FRA JOHNNIE B. ANDERSEN, SCANNER DELIVERY TEAM LEADER, VISIOPHARM

BILAG 4 – DIGITALISERINGSKRITERIER OG INFORMATIONER OM DE ENKELTE SKANNERE

Bilag 4.1 – Skabelon

Bilag 4.2 – NanoZoomer S360 1 fra Hamamatsu (referenceskanner)

Bilag 4.3 – Nanozommer S360 2 fra Hamamatsu

Bilag 4.4 – NanoZoomer S210 fra Hamamatsu

Bilag 4.5 – NanoZoomer S60 fra Hamamatsu

Bilag 4.6 – NanoZoomer 2.0-HT 1 fra Hamamatsu

Bilag 4.7 – NanoZoomer 2.0-HT 2 fra Hamamatsu

Bilag 4.8 – VS200 fra Olympus

Bilag 4.9 – Aperio GT450 DX fra Leica

Bilag 4.10 – PANNORAMIC 250 fra 3DHistech

Bilag 4.11 – PANNORAMIC 1000 fra 3DHistech

Bilag 4.12 – IntelliSite Ultra Fast Scanner fra Philips

BILAG 5 – HER2 RÅDATA

BILAG 6 – HER2 1 DATABEHANDLING

BILAG 7 – HER2 5 DATABEHANDLING

BILAG 8 – HER2 6 DATABEHANDLING

BILAG 9 – KI67 RÅDATA

BILAG 10 – KI56 5 DATABEHANDLING

BILAG 11 – KI67 7 DATABEHANDLING

BILAG 12 – KI67 8 DATABEHANDLING

10 Figurliste

FIGUR 1 (FORSIDE): ILLUSTRATION AF UDVALGT HER2-CORE DIGITALISERET PÅ FIRE FORSKELLIGE SKANNERE	2
FIGUR 2: EKSEMPLER PÅ DE FIRE KATEGORIER TIL AFLÆSNING AF HER2-STATUS PÅ INVASIVE MAMMAKARCINOMER UD FRA GÆLDENDE RETNINGSLINJER	10
FIGUR 3: EKSEMPLER PÅ HØJT OG LAVT KI67-PROLIFERATIONSINDEKS VED INVASIVE MAMMAKARCINOMER	11
FIGUR 4: CORE FRA EN CELL MICRO ARRAY FARVET FOR HER2 (3+) VIST I DEN KOMMERCIELT TILGÆNGELIGE SOFTWARE VISIOPHARM INTEGRATOR SYSTEM.....	12
FIGUR 5: CORE FRA EN CELL MICRO ARRAY FARVET FOR HER2 (3+) VIST I DEN KOMMERCIELT TILGÆNGELIGE SOFTWARE VISIOPHARM INTEGRATOR SYSTEM.....	13
FIGUR 6: ILLUSTRATION AF UNDERKATEGORIER TIL ARTIFICIAL INTELLIGENCE; MACHINE LEARNING OG DEEP LEARNING.....	14
FIGUR 7: ILLUSTRATION AF INKLUDEREDE HER2-CORES MARKERET MED RØDE CIRKLER	15
FIGUR 8: ILLUSTRATION AF DE INKLUDEREDE KI67-CORES MARKERET MED RØDE CIRKLER	16
FIGUR 9: UDSNIT AF EN UEGNET CMA (HER2 4, 3+).	17
FIGUR 10: DE TRE UDVALGTE HER2-CORES (3+)	17
FIGUR 11: DE TRE UDVALGTE KI67 CORES (100%)	18
FIGUR 12: EKSEMPEL PÅ PEJLEMÆRKER OG REGION OF INTEREST PÅ HER2-CORES	21
FIGUR 13: INDSTILLINGER FOR DE TO DIGITALE BILLEDANALYSEPROTOKOLLER.....	22
FIGUR 14: EKSEMPEL PÅ EN HER2-CORE FØR, UNDER OG EFTER UDARBEJDELSEN AF EN DIGITAL BILLEDANALYSEPROTOKOL	23
FIGUR 15: OVERSIGT OVER FORSØGSDESIGN	24
FIGUR 16: VISUALISERING AF ALLE HER2 1 (3+) CORES DIGITALISERET PÅ DE 11 INKLUDEREDE SKANNERE	25

FIGUR 17: AREAL AF DAB (μM^2) FOR HER2 1-CORES DIGITALISERET PÅ HVER SKANNER ILLUSTRERET I ET SØJLEDIAGRAM	26
FIGUR 18: PUNKTDIAGRAM OVER DEN PROCENTVISE AFVIGELSE FRA S360 1 (REFERENCESKANNER) FOR HER2 1-CORES.....	27
FIGUR 19: AREAL AF DAB (μM^2) FOR HER2 5-CORES DIGITALISERET PÅ HVER SKANNER ILLUSTRERET I ET SØJLEDIAGRAM	28
FIGUR 20: PUNKTDIAGRAM OVER DEN PROCENTVISE AFVIGELSE FRA S360 1 (REFERENCESKANNER) FOR HER2 5-CORES.....	29
FIGUR 21: AREAL AF DAB (μM^2) FOR HER2 6-CORES DIGITALISERET PÅ HVER SKANNER ILLUSTRERET I ET SØJLEDIAGRAM	30
FIGUR 22: PUNKTDIAGRAM OVER DEN PROCENTVISE AFVIGELSE FRA S360 1 (REFERENCESKANNER) FOR HER2 6-CORES.....	31
FIGUR 23: AREAL AF DAB (μM^2) FOR KI67 5-CORES DIGITALISERET PÅ HVER SKANNER ILLUSTRERET I ET SØJLEDIAGRAM	32
FIGUR 24: PUNKTDIAGRAM OVER DEN PROCENTVISE AFVIGELSE FRA S360 1 (REFERENCESKANNER) FOR KI67 5-CORES	33
FIGUR 25: AREAL AF DAB (μM^2) FOR KI67 7-CORES DIGITALISERET PÅ HVER SKANNER ILLUSTRERET I ET SØJLEDIAGRAM	34
FIGUR 26: PUNKTDIAGRAM OVER DEN PROCENTVISE AFVIGELSE FRA S360 1 (REFERENCESKANNER) FOR KI67 7-CORES	35
FIGUR 27: AREAL AF DAB (μM^2) FOR KI67 8-CORES DIGITALISERET PÅ HVER SKANNER ILLUSTRERET I ET SØJLEDIAGRAM.	36
FIGUR 28: PUNKTDIAGRAM OVER DEN PROCENTVISE AFVIGELSE FRA S360 1 (REFERENCESKANNER) FOR KI67 8-CORES	37

11 Tabelliste

TABEL 1: IMMUNHISTOKEMISK PROFIL FOR DE MOLEKYLÆRE SUBTYPER AF MAMMAKARCINOMER SAMT PROGNOSE	9
TABEL 2: CORES DER UDGØR ÉN HER2 CELL MICRO ARRAY (HISTOCYTE LABORATORIES, NEWCASTLE, UNITED KINGDOM) MED TILHØRENDE HER2-SCORE SAMT VÆVSTYPE	15
TABEL 3: CORES DER UDGØR ÉN KI67 CELL MICRO ARRAY (ARRAYSCIENCE, SAUSALITO, CALIFORNIA) MED TILHØRENDE PROLIFERATIONSINDEKSER.....	16
TABEL 4: OVERSIGT OVER INKLUDEREDE INTERNE OG EKSTERNE SKANNERE.....	19
TABEL 5: UDVALGTE EGENSKABER FOR DE INKLUDEREDE SKANNERE.	19
TABEL 6: OVERSIGT OVER GULE OG GRØNNE REGION OF INTEREST FOR HENHOLDSVIS HER2- OG KI67-CORES MED FORSKELLIGE EKSPRESSIONER.	20