



Tapasztalataink a HELIOS® immunfluoreszcens automatával

Vietorisz Ildikó

Dél-pesti Centrumkórház – Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet
Központi Laboratórium

- Az autoantitestek kimutatása napjainkban is leggyakrabban indirekt immunfluoreszcenciával történik
- ANA meghatározás „gold standard” módszere – IIF Hep-2 lemezen
- Autoimmun vizsgálatok száma folyamatosan nő
- Immunfluoreszcens automaták kifejlesztése
 - lemez előkészítés
 - lemez előkészítés + fényképezés és kiértékelés
- Laboratóriumunkban 2022. július: AESKU HELIOS® immunfluoreszcens automata legújabb változata
- Általunk használt tesztek – Hep-2/ANA
 - ANCA (etanol, formalin)
 - LKS (rat/wrapped)
 - EMA

HELIOS

Teljesen automatizált integrált rendszer

automatizált lemez előkészítő és leolvasó rendszer
autoimmun és fertőzés szerológiai IIF tesztekhez

Négyféle szoftver modul közül választhatunk

1. előkészítés+ képrögzítés

2. előkészítés (HELMED IFA)

3. képrögzítés

4. eredmény konfirmálás/ validálás

pozitív/ negatív minősítés

mintázat felismerés, végpont titer ajánlás

betegminták áttekintése



További két modul van a konfigurálásra és informatikai beállításokra

HELIOS

- egyedülállóan, állandó hőmérsékletet és páratartalmat biztosít a külső párasító egysége (HTC)
- vonalkódos minta és lemez azonosítás
- párhuzamosan akár négyféle tesztet is el tud végezni
- más gyártók lemezeit is elő tudja készíteni
- beépített LED mikroszkóp és digitális kamera segítségével felvételeket készít a mintákról és előminősítést ad (Hep-2, ANCA), amit laboratóriumi diplomásnak minden esetben jóvá kell hagynia
- digitalizált eredményeket archiválja



HELIOS

Online illesztés esetén a munkalista átkérése, minták betétele után egy interaktív betöltő felület segít a reagensek behelyezésében, amely után minden további lépés automatikusan zajlik.

Az előkészítési folyamat a monitoron nyomon követhető

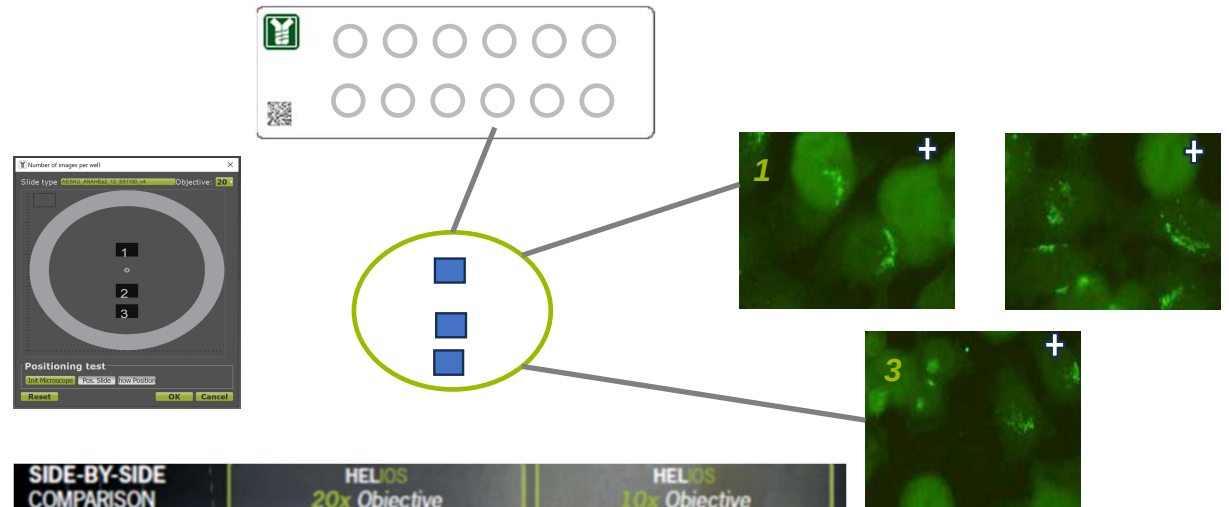
A lemezeket nem kell lefedni a leolvasáshoz-*mounting mediummal befedi*

A lemez előkészítés végén automatikusan átlép a fényképezésbe, ha az első modulból indultunk

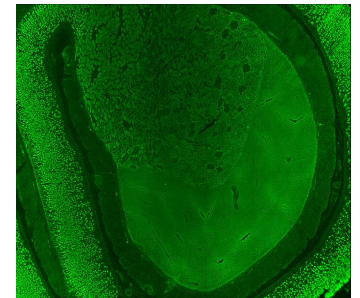
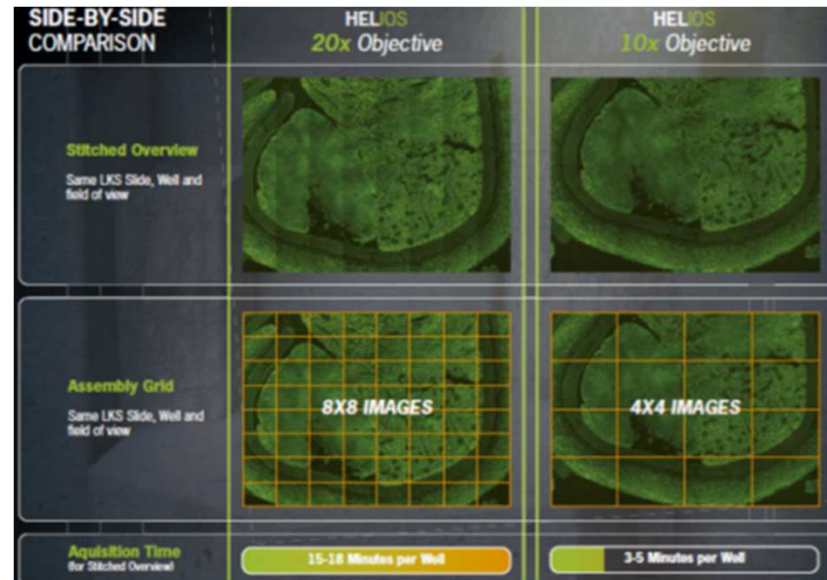
Egyedül lehet hagyni éjszakára működés közben



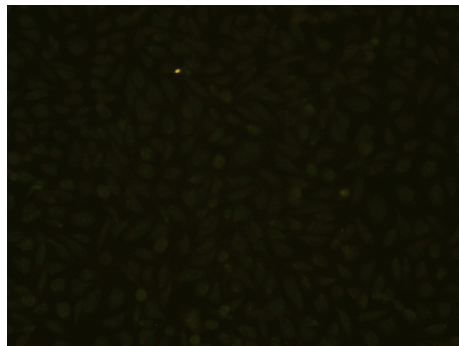
- A sejtekről 3 fényképet készít, amelyeket egyenként minősít(+,-), mintázatot, ill. a végpont titert is megbecsüli



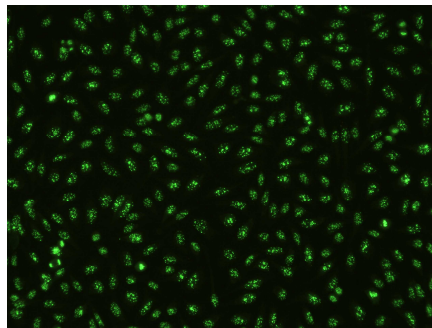
- Míg a szöveteket csak lefényképezi, 8x8 fotóból rakja össze a kompletten képet
- Az alapértelmezett képrögzítési beállításokon lehet változtatni, – képek száma, helyzete



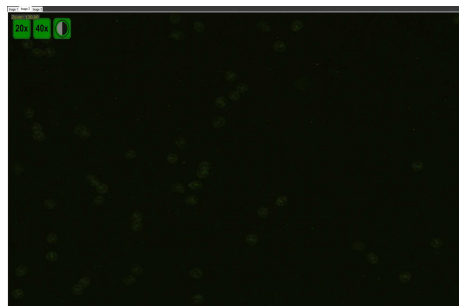
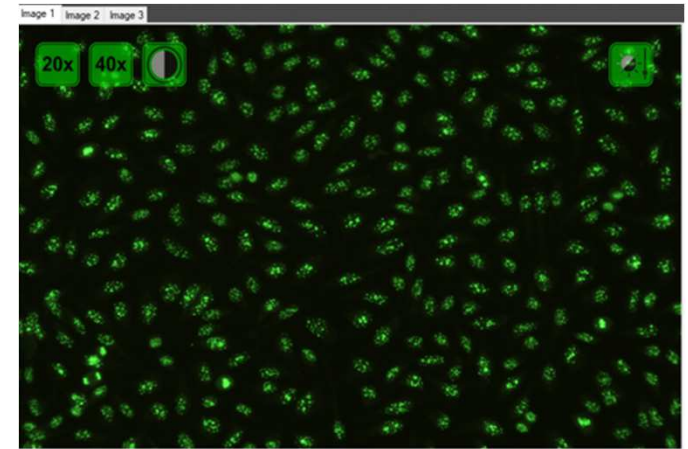
- A legújabb software verzióval (4.1R1) a fényképek minősége jobb lett és a fényképezés ideje is lerövidült
- Új funkció: fényerősség korrigálása



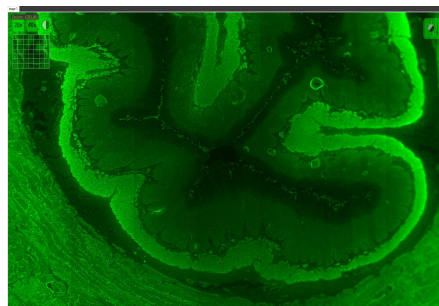
ANA negatív minta



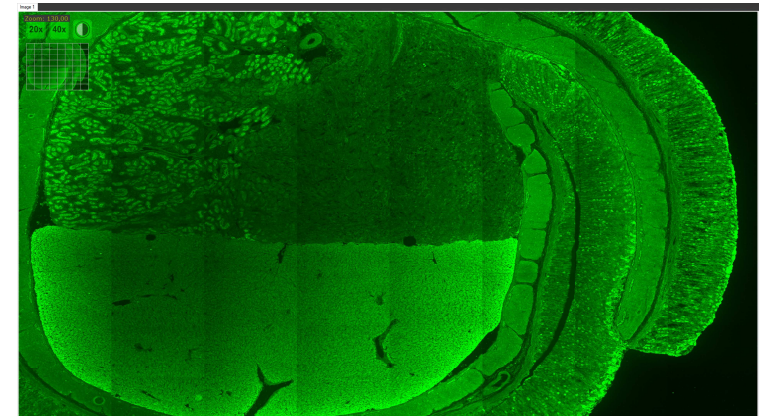
Hep-2: centromer



ANCA negatív minta



EMA pozitív minta



LKS: LC pozitív minta

Mintázat ajánlás

ANA

Pos / Neg
Homogenous
Nucleolar
Speckled
Centromere
Nuclear dots
Membrane
Cytoplasmic

ANCA

Pos/Neg
P.ANCA
C.ANCA
X.ANCA

File Languages Options User Help

RESULT CONFIRMATION

Load worklist

Equivalent to: 130.00 Sorting order: Standard sorting User: superuser Logout

Worklists

2023-12-04_08-45-30_2

Slides

1 2 3 4 5 6

Date: 2023/12/04 Time: 12:03 Pattern: AC1_Homogeneous Remark:

Image 1 Image 2 Image 3 Image exemplary

20x 40x

Sample ID: ARSKSA1XHU Dilution ratio: 1/640 Test name: AESKU_Helios_ANAHep2_12W_51100_v4 Slide ID: 07980839

Estimated Pattern: Homogenous 88%, Speckled 11%

Classification: + positive - negative

Slide: 1 Well: 3

Unclassified: AC-0, Borderline, Positive Undefined, Mixed Pattern, AC1_Homogeneous, Nuclear Speckled, AC2_Dense Fine Speckled (DFS70), AC3_Centromere, AC4_Fine speckled, AC5_Coarse/large speckled, Nuclear dots, AC6_Multiple nuclear dots

Interphase: Uniform diffuse staining of the nucleoplasm, whose intensity can vary depending on concentration of antibodies in the serum. In some cases, a more intense staining of the inner edge of the nucleus (nuclear rim) can be seen.

Nucleoli: Nucleolar staining is variable, positive/negative. Some samples may show a peripheral nucleolar staining.

Mitosis: In all phases, a homogeneous or peripheral chromatin staining can be seen.

Classification process Worklist: 2023-12-04_08-45-30_202007201_ANF_12_04 Wells still to be classified: 0 / 72 Error Report: confirmed

ANA/Hep-2 esetében az osztályozást segítő könyvtára kibővült, ICAP szerinti elnevezéseket alkalmazza és %-s javaslatot is ad a mintázatra

Mintázat ajánlás

File Languages Options User Help

RESULT CONFIRMATION Load worklist Equivalent to: 130,00 Sorting order: Standard sorting User: superuser Logout

Worklists
2023-11-28_07-41-40_2
Slides

1 2 3 4

Date: 2023/11/28 Time: 10:34 Pattern: AC21_Cytoplasmic reticular Mitochondrial (AMA) Remark:

Image 1 Image 2 Image 3 Image exemplary

20x 40x

Sample ID
ARSKA1XBV
Dilution ratio
1/640
Test name
AESKU_Helios_ANAHEP2_12W_51100_v4
Slide ID
07970001

Estimated Pattern
Cytoplasmic 88%, Nucleolar 11%

Classification: + positive - negative

Slide: 1 Well: 5

ANAEHP2
AESKU

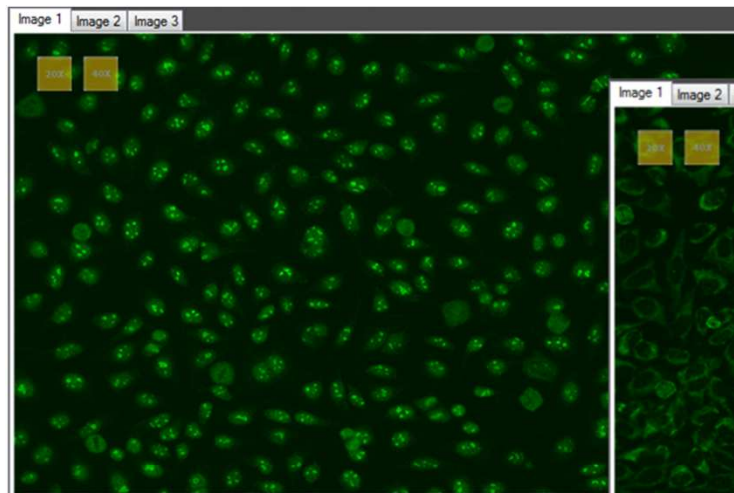
1 2 3 4 5 6
12 11 10 9 8 7

Nuclear membrane
AC11_Smooth nuclear membrane/envelope
AC12_Punctated nuclear membrane/envelope
AC13_Pleomorphic PCNA
AC14_Pleomorphic CENP-F (MSA3)
Cytoplasmic
AC15_Cytoplasmic linear (F-Actin)
AC16_Cytoplasmic filamentous-microtubules
AC17_Cytoplasmic segmental (Vinculin)
AC18_Cytoplasmic discrete dots (GW bodies)
AC19_Cytoplasmic dense fine speckled (Ribo)
AC20_Cytoplasmic fine speckled (Jo-1)
AC21_Cytoplasmic reticular Mitochondrial (A)

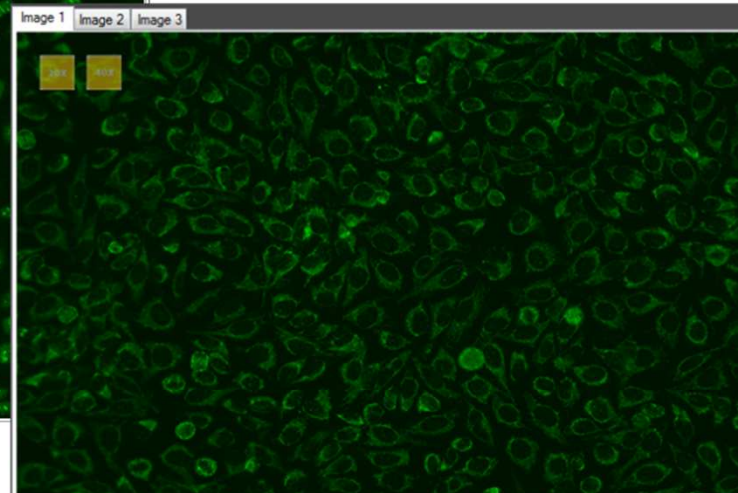
Interphase
No staining of the nucleus.
Nucleoli
Negative
Mitosis
Negative
Cytoplasm
Fluorescence of large irregular granules organized as a network of filaments extending around the nucleus and throughout the cytoplasm.

Classification process Worklist: 2023-11-28_07-41-40_202007201_ana.12 Wells still to be classified: 0 / 48 Error Report: confirmed

Estimated End Point Titer



Proben ID
Sample ID #3
Verdünnungsverhältnis
1/80
Testname
AESKU_Helios_ANAHEp2_12w_51_100_v1
OT ID
00203039
Estimated Endpoint Titer
1/1280



Proben ID
Sample ID #2
Verdünnungsverhältnis
1/80
Testname
AESKU_Helios_ANAHEp2_12w_51_100_v1
OT ID
00203039
Estimated Endpoint Titer
1/320

Értékelés

- Minden minta fényképét végig kell nézni, ha szükséges, a minősítést felülbírálni

RESULT CONFIRMATION

File Languages Options User Help

Load workload Equivalent to: 130.00 Sorting order: Standard sorting User: Ildiko Logout

Worklists
2023-11-17_07-52-19_2
Slides
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Date: 2023/11/17 Time: 11:17 Pattern: AC3_Centromere Remark:

Image 1 Image 2 Image 3 Image exemplary

20x 40x

Sample ID
AB5MUA2KS0
Dilution ratio
1/160
Test name
AESKU_Helios_ANAHEP2_12W_51100_v4
Slide ID
07969899

Classification: + positive - negative

Slide: 3
Well: 10

ANAEHP2
AESKU

1 2 3 4 5 6
12 11 10 9 8 7

Unclassified
AC-0
Borderline
Positive Undefined
Mixed Pattern
AC1_Homogeneous
Nuclear Speckled
AC2_Dense Fine Speckled (DFS70)
AC3_Centromere
AC4_Fine speckled
AC5_Coarse/large speckled
Nuclear dots
AC6_Multiple nuclear dots

Interphase
23-46 speckles distributed throughout the entire nucleus.
Nucleoli
Negative
Mitosis
A "block" of closely associated speckles is found in the condensed nuclear chromatin of the metaphase, anaphase and telophase cells.
Cytoplasm
Negative

Estimated Pattern
Speckled

Classification process Worklist: 2023-11-17_07-52-19_202007201_ana_12 Wells still to be classified: 1 / 48 Error Report: confirmed

Értékelés

- Az osztályozás megerősítésekor lehetőség van megjegyzés, vegyes mintázatok, további elvégzendő tesztek (ELISA, blot, hígítások) beírására

File Languages Options User Help

RESULT CONFIRMATION Load worklist Equivalent to: 130.00 Sorting order: Standard sorting User: lidiko Logout

Worklists 2023-12-01_08-30-08_2 Slides

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

2023-12-01_08-30-08_20200

Date: 2023/12/07 Time: 15:56 Pattern Remark: AC1_Homogeneous

Image 1 Image 2 Image 3

20x 40x

Additional pattern: AC4_Fine speckled

Mitosis: ☐ negative ☐ positive

Choose follow up steps-Enter your comment

☐ IFA

☐ ELISA

☐ RIA

☐ Blot

☐ Others

1/40 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280 1/2560 1/5120 1/10240 1/20480

Dot Blot Line Blot Western Blot

Confirm with "enter" or "OK"

OK

Sample ID ARSKSA1XDC Dilution ratio 1/160 Test name AESKU_Helios_ANAHep2_12W_51100_v4 Slide ID 07980772

Estimated Pattern Homogenous 66%, Speckled 33%

Classification: + positive - negative

Slide: 3 Well: 6

Unclassified AC-0 Borderline Positive Undefined Mixed Pattern Nuclear Speckled AC1_Homogeneous AC2_Dense Fine Speckled (DFS70) AC3_Centromere AC4_Fine speckled AC5_Coarse/large speckled Nuclear dots AC6_Multiple nuclear dots

Interphase Uniform diffuse staining of the nucleoplasm, whose intensity can vary depending on concentration of antibodies in the serum. In some cases, a more intense staining of the inner edge of the nucleus (nuclear rim) can be seen.

Nucleoli Nucleolar staining is variable, positive/negative. Some samples may show a peripheral nucleolar staining.

Mitosis In all phases, a homogeneous or peripheral chromatin staining can be seen.

Classification process Worklist: 2023-12-01_08-30-08_202007201_ANF_12_01 Wells still to be classified: 1/36 Error Report: confirmed

Értékelés:

Vegyes mintázat: homogén (a-dsDNA) + finom szemcsézett (a-ssA)

File Languages Options User Help

RESULT CONFIRMATION Load worklist Equivalent to: 130.00 Sorting order: Standard sorting User: superuser Logout

Worklists
2023-12-04_08-45-30_2

Slides
1 2 3 4 5 6

Date: 2023/12/04 Pattern: AC1_Homogeneous
Time: 12:03 Remark:

Image 1 Image 2 Image 3 Image exemplary

20x 40x

Sample ID
AR5K5A1XHU
Dilution ratio
1/640
Test name
AESKU_Helios_ANAHEp2_12W_51100_v4
Slide ID
07980839

Classification: + positive - negative

Slide: 1
Well: 3

ANAEp2
AESKU

Estimated Pattern
Homogenous 88%, Speckled 11%

Unclassified
AC-0
Borderline
Positive Undefined
Mixed Pattern
AC1_Homogeneous
Nuclear Speckled
AC2_Dense Fine Speckled (DFS70)
AC3_Centromere
AC4_Fine speckled
AC5_Coarse/large speckled
Nuclear dots
AC6_Multiple nuclear dots

Interphase
Uniform diffuse staining of the nucleoplasm, whose intensity can vary depending on concentration of antibodies in the serum. In some cases, a more intense staining of the inner edge of the nucleus (nuclear rim) can be seen.

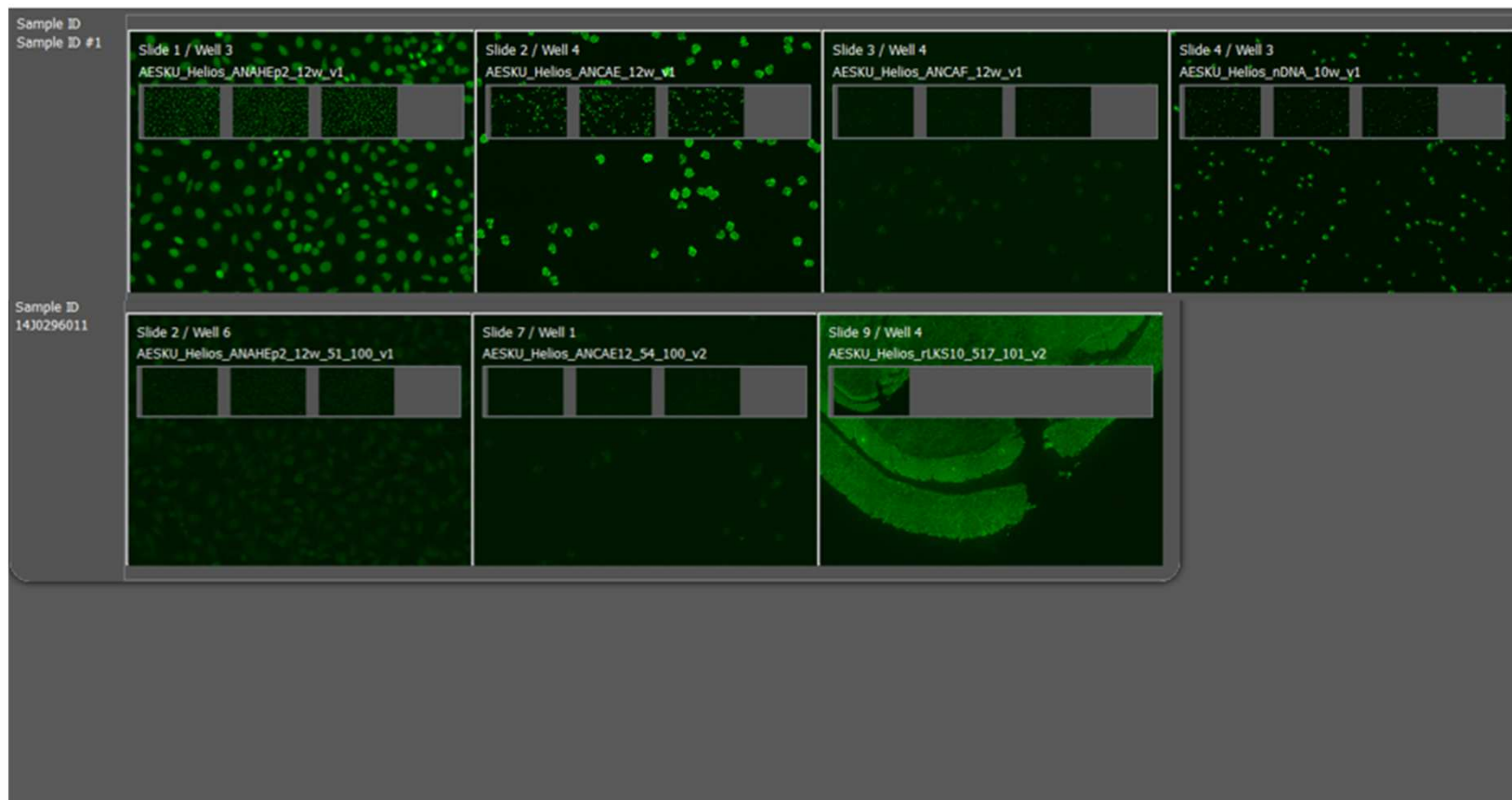
Nucleoli
Nucleolar staining is variable, positive/negative. Some samples may show a peripheral nucleolar staining.

Mitosis
In all phases, a homogeneous or peripheral chromatin staining can be seen.

Classification process: Worklist: 2023-12-04_08-45-30_202007201_ANF_12_04 Wells still to be classified: 0/72 Error Report: confirmed

Értékelés:

Értékelő felületen: páciens azonosító alapján visszaneézhetőek a korábbi IIF tesztek képei is az eredmény archiválásból adódóan - *Overview by sample* - opció



- Manuális mikroszkópos leolvasással összehasonlítottuk a HELIOS ajánlásait ANCA és Hep2 lemezek esetében
Pozitív/ negatív megítélése, mintázat becslés
- Eredmény: software 4.0R1
 - Hep2 lemezek: 94%, ANCA lemezek: 97% volt a megegyezés a negatívnak ajánlott minták esetében → negatív prediktív értéke jó
 - mintázat becslés - ANA: kb. 68-70%
a szoftver frissítés óta jobb lett

Mintázat	HELIOS	Manuális
Homogén	16	23
Granuláris	21	16
Nukleoláris	4	4
Centromer	3	5
Citoplazma	16	13
Citoplazma (AMA szerű)	0	5
Osztodási orsó	0	2
Negatív	112	105

Értékelési tapasztalataink

- Ha úgy ítéljük meg, manuális mikroszkópozással is ellenőrizni kell (az új pozitív mintákat mindig - Hep-2 mintázatok)
- A negatív minták, ha szerintünk is az, kiadható mikroszkopózás nélkül
- EMA minták nagyrésze kiadható csak a HELIOS fotóit átnézve
- LKS lemezeknél több esetben is meg kellett nézni mikroszkópban,
-erősebb fluoreszcencia/fals – infektológiai betegek
- Segítséget jelent, hogy már értékelés közben a LIS-ből meg tudom nézni beteg előzményeit, anamnéziséit, ambuláns lapjait, stb.

Összefoglalás

- Az automata használata meggyorsítja a napi rutin munka folyamatokat, nagyobb hatékonyságot, megbízhatóságot, pontosságot biztosít.
 - ki lehet venni a csöveket az előkészítés alatt a minták kipipettázása után, így eközben más vizsgálatokat is el tudunk végezni
 - éjszaka magára hagyható a HELIOS (reggel hipos mosás kell!)
 - segíti a laboratóriumi dolgozók munkáját, pl. a vonalkódos minta azonosítás kiküszöböli az esetleges minta cserét (betegbiztonság növelése), a lemez előkészítés alatt tudunk a másfajta autoimmun vizsgálatokat csinálni (ELISA, blot)
 - lemez feldolgozás folyamata alatt korábban elkészült mintákat kiértékelhetünk

Összefoglalás

- HELIOS IFA képes helyesen megkülönböztetni a pozitív/negatív ANA és ANCA mintákat
- Jelentősen csökkenthető a mikroszkópozással eltöltött idő, annak ellenére, hogy a manuális mikroszkópos kiértékelést nem lehet teljesen elhagyni
- A digitalizált eredményeket tárolja, visszakereshetőek a betegek korábbi mintái (elvégzett IIF tesztek) egyedi azonosító alapján (TAJ), ha az automata online illesztése megtörtént (manuális beírás)

Köszönöm a figyelmet!