

Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives



Sonda *CytoVision** DX (9.0)

*Reg. Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos y en otras jurisdicciones de todo el mundo.

Instrucciones de funcionamiento



CytoVision DX versión 9.0 es para uso diagnóstico in vitro.

Instrucciones de uso de la *CytoVision* * DX: Sonda

Este manual es válido para los sistemas de escaneado y capturar *CytoVision DX* y el software de aplicación *CytoVision DX* versión 9.0

Aviso sobre los derechos de autor

© 2024 Leica Biosystems Richmond, Inc. Todos los derechos reservados.

LEICA y el logotipo de Leica son marcas comerciales registradas de Leica Microsystems IR GmbH.

CytoVision es la marca comercial de Leica Biosystems Richmond, Inc. Todas las marcas comerciales de terceros son propiedad de sus respectivos propietarios.

*Reg. Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos y en otras jurisdicciones de todo el mundo.

La información contenida en este documento está sujeta a cambios sin previo aviso y no supone ningún compromiso por parte de Leica Biosystems Richmond, Inc.

Ninguna parte de este manual se puede copiar o distribuir, transmitir, transcribir, guardar en un sistema de recuperación ni traducir a ningún idioma humano o informático, de ninguna manera ni por ningún medio, ya sea electrónico, mecánico, magnético, manual o de otro tipo, ni revelar a terceros sin la autorización expresa de Leica Biosystems Richmond, Inc, 5205 Route 12, Richmond, IL 60071, EE.UU.

Los sistemas *CytoVision DX* los fabrica y distribuye:



Leica Biosystems Richmond, Inc.

5205 Route 12

Richmond, IL 60071

EE. UU.

Tel.: (800)-537-4669



Datos de contacto

Visite www.LeicaBiosystems.com para ver los datos de contacto del servicio técnico y comercial de Leica Biosystems más cercano.

Contenido

Precauciones y notas	6
Introducción.....	7
Recursos.....	7
Identificación de símbolos.....	8
Advertencias y precauciones	8
Especificaciones de muestras y portaobjetos.....	9
Descripción general de la sonda <i>CytoVision DX</i>.....	10
Escaneado de portaobjetos FISH	10
Captura y visualización FISH.....	11
Visualización y análisis de imágenes FISH.....	12
Imagen y tipos de datos FISH.....	12
Inicio de sesión de usuario e Inicio del software de aplicación	14
Escaneado de portaobjetos interfase	15
Procedimiento de inicio rápido.....	15
Plantillas de portaobjetos	15
Clasificadores.....	15
Opciones de captura automática.....	15
Cargar el portaobjetos y la bandeja	16
Escaneado de un lote de portaobjetos(Interfase)	17
Configuración manual de escaneado	19
Asignación de casos y plantillas.....	19
Flujos de trabajo de configuración manual de escaneado.....	20
Escaneado de código de barras	22
Asignar configuración del portaobjetos.....	22
Flujos de trabajo de escaneado de códigos de barras.....	23
Plantillas de portaobjetos (FISH)	24
Zona de escaneado	24
Preescaneado	24
Escaneado.....	25
Captura automática	26
Visualización y ajuste de la imagen	29
Revisión de las listas de interfase	30
Vista de notas (Interfase).....	31
Vista de portaobjetos (Interfase)	32
Clasificadores de escaneado.....	33
Captura automática.....	35
Captura automática	35

Captura de la sonda (imágenes de células)	37
Control del objetivo	37
Captura de la sonda: Descripción general del procedimiento:	38
Controles de captura	38
Lista de capturas	39
Captura y configuración de fluorocromos	40
Customize Capture	43
Modificación del umbral	45
Modificación del umbral automático	46
Volver a modificar el umbral de una imagen sin procesar	46
Captura de la sonda (Framelist)	47
Control del objetivo	48
Captura Framelist: Descripción general del procedimiento:	48
Opciones de configuración de captura	49
Añadir canales	49
Configuración de los canales	49
Trabajar con listas de captura	52
Capturar imágenes	52
Captura de acabado	53
Visualización de la imagen de la sonda	54
Visualización en la pantalla	54
Solución de problemas	57
Sistema de captura	57
Errores de conexión al microscopio	57
Microscopio Efecto de calidad de la luz	57
Sistema de escaneado GSL	57
Errores de conexión al GSL	57
Problemas de enfoque del escaneado 10x	58
Problemas de clasificación del escaneado 10x	58
Problemas de enfoque en la captura 63x	58
Problemas de captura del canal de la sonda	59
Compatibilidad de los portaobjetos/bandeja	59
Exportar registros diagnósticos	60
Apéndice: Recuento de puntos	61
Recuento de puntos	61
Ensayo de recuento de puntos	62
Edición de ensayos para la captura de puntos	63
Escaneado y captura de puntos	65
Plantilla de portaobjetos (configuración de escaneado)	65

Captura manual.....	67
Captura y monitor de clase	67
Detener la captura automática SPOT	68
Apéndice: Tejido FISH	69
Descripción general del tejido FISH	69
Exploración y captura FISH de tejidos.....	69
1) Escaneado y captura automáticos:.....	69
2) Escaneado automático y marcado manual de regiones:	70
3) Selección manual de la región para la captura automática:	70
Captura manual.....	70
Grabado de portaobjetos.....	71
Marcación FISH tisular (captura diferida)	72
Pantalla de visor de marcado	72
Apéndice: Captura M-FISH	75
Introducción a la técnica de M-FISH	75
Descripción general de la captura	76
Configuración de la captura	76
Lista de captura.....	76
Fluomap.....	77
Filtros y microscopía.....	78
Captura de imágenes M-FISH	79
Modificación manual del umbral	81
Nueva modificación del umbral.....	81
Reprocesamiento.....	82
Apéndice: Ejemplos de procedimientos paso a paso	83
Captura de la sonda estándar.....	83
Captura de sonda manual del fotograma de imagen	84
Captura manual de puntos.....	85
GSL: Recuento de puntos automático.....	86

Precauciones y notas

Si bien se ha hecho todo lo posible por garantizar la precisión de la información, algunos detalles de las ilustraciones pueden diferir según las variantes individuales del sistema.

Puede que no todas las categorías se apliquen a la configuración del usuario final.

Especificaciones y prestaciones

Para las especificaciones del producto y los componentes, consulte las **especificaciones de CytoVision DX**.

Instalación del hardware

CytoVision DX Todos los componentes del escaneado y del sistema de captura los suministra para la instalación Leica Biosystems o sus representantes autorizados.

Instalación del software de la aplicación

Las estaciones de trabajo PC suministradas por Leica Biosystems se suministrarán con software de aplicación preinstalado. Para obtener instrucciones específicas sobre la instalación de la aplicación en un PC independiente, consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Formación

Este manual y la **Guía del usuario de CytoVision DX** complementan la formación del operador y otras instrucciones avanzadas proporcionadas por Leica Biosystems o sus representantes autorizados.

Mantenimiento y solución de problemas

Para obtener información sobre la resolución de problemas de escaneado y captura, consulte el capítulo **Solución de problemas**.

Para obtener información sobre el mantenimiento general del sistema y la resolución de problemas, consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Reparación

Las reparaciones sólo pueden ser realizadas por un representante autorizado de Leica Biosystems. Después de cualquier reparación, pida al técnico que realice comprobaciones de funcionamiento para confirmar que el producto se encuentra en las condiciones de funcionamiento esperadas.

Ciberseguridad

Ten en cuenta que las estaciones de trabajo son susceptibles de sufrir malware, virus, corrupción de datos y violaciones de la privacidad. Para conocer las directrices de ciberseguridad del usuario final, consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Trabaje con su administrador de TI para proteger las estaciones de trabajo siguiendo las políticas de seguridad y contraseñas de su institución. Para obtener instrucciones específicas recomendaciones sobre la protección de sus estaciones de trabajo y servidores, consulte el **Especificaciones de CytoVision DX**; sección *Administración de red*.

Seguridad

La protección de seguridad puede verse afectada si este dispositivo se utiliza de un modo no especificado por el fabricante.

Para obtener información sobre la operación del sistema y la seguridad, consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Introducción

El sistema **CytoVision DX** es un sistema cualitativo automatizado de creación y visualización de portaobjetos digitales.

El sistema CytoVision DX está previsto para el diagnóstico in vitro como ayuda para que un técnico cualificado revise e interprete imágenes digitales de cromosomas metafásicos de sangre periférica y médula ósea.

- El sistema CytoVision DX ayuda a localizar núcleos en interfase y metafase en portaobjetos de vidrio de microscopio estándar que, de otro modo, serían apropiados para la visualización manual mediante microscopía de campo claro y fluorescente convencional.
- Es responsabilidad del técnico cualificado emplear los procedimientos y salvaguardas adecuados para garantizar la validez de la interpretación de las imágenes obtenidas con el sistema CytoVision DX.

Asegúrese de seguir las prácticas recomendadas de laboratorio adecuadas, así como las políticas y procedimientos exigidos por su institución para la preparación, procesamiento, almacenamiento y eliminación de portaobjetos.

Utilice este equipo únicamente para su fin y de la manera que se describe en este documento y en la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Recursos

Recursos	Descripción
CytoVision DX Guía del usuario 23MAN (9D03)	Proporciona información de referencia e instrucciones para la calibración por parte del usuario, el escaneado de portaobjetos, la captura de imágenes, la visualización de imágenes, la gestión de cajas y datos, la solución de problemas y el mantenimiento.
Instrucciones de uso del cariotipador CytoVision DX 23MAN (9D02)	Contiene instrucciones para el escaneado de portaobjetos metafásicos, la captura de imágenes, la visualización de imágenes, el análisis cromosómico (cariotipado) y la resolución de problemas de la aplicación.
Instrucciones de uso de la sonda CytoVision DX 23MAN (9D01)	(Este documento) Contiene instrucciones para el escaneado de portaobjetos fluorescentes (FISH), la captura de imágenes, la visualización de imágenes, el análisis cromosómico (cariotipado) y la resolución de problemas de la aplicación (este documento).
Especificaciones de CytoVision DX 23MAN (9D03)	Proporciona especificaciones detalladas de las opciones del producto CytoVision DX.

Identificación de símbolos

Símbolo	Explicación
	ADVERTENCIA, rayo láser: proteja los ojos y la piel de la exposición. radiación óptica, no mire nunca directamente al rayo láser.
	PRECAUCIÓN: Riesgo de sufrir un pellizco, mantenga los dedos alejados de las partes móviles.
	Marca de conformidad CE
	Fabricante

Advertencias y precauciones

El sistema de captura o escaneado que se suministra con el microscopio y los componentes de escaneado motorizados es un aparato de precisión que debe tratarse con cuidado y solo debe poner en funcionamiento el personal con la formación adecuada. Debe evitarse en todo momento que el sistema sufra golpes repentinos o bruscos.

Para más información, consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Especificaciones de muestras y portaobjetos

Función	Detalle
Tipos de muestras	La función de sonda de <i>CytoVision DX</i> se utiliza para la detección y obtención de imágenes de cromosomas metafásicos teñidos con fluorescencia, núcleos celulares interfásicos y tejidos. Las muestras de las preparaciones deben realizarse utilizando técnicas aceptadas de cultivo y preparación de células y presentarse en portaobjetos de microscopio de vidrio.
Tinción de muestras	El sistema está optimizado para la tinción DAPI de células en interfase. El rendimiento no está validado en todas las técnicas posibles de tinción y preparación de muestras y está directamente relacionado con la calidad y la intensidad de la tinción de la muestra y los restos de fondo en el portaobjetos del microscopio. Una intensidad de tinción atípica o un fondo elevado pueden reducir la eficacia de la localización y la captura automática de células y requerir una intervención adicional del usuario.
Especificaciones del portaobjetos	Tipo de portaobjetos: Portaobjetos de vidrio para microscopio con bordes (verticales) cuadrados. Tamaño del portaobjetos: Ángulo cuadrado de 90° dentro de la gama de 75,1 a 76,1 mm de longitud; 24,9 a 26,1 mm de anchura; 0,9 a 1,2 mm de grosor. • Los portaobjetos que superen estas dimensiones podrían no caber en la bandeja GSL y no son compatibles con la operación del sistema de escaneado. • Es posible que los portaobjetos más pequeños que estas dimensiones o con esquinas de 45° (recortadas) no quepan en la bandeja GSL estándar y deban utilizar la bandeja alternativa artículo 23GSL903XXX001 (biselada) debe especificarse con el pedido del sistema. No se recomienda el uso de portaobjetos que no sean de cristal, porque podrían no encajar bien en el inserto de la platina o moverse en la platina, lo que puede afectar al rendimiento del sistema y a la calidad de la imagen.
Cubreobjetos para portaobjetos.	Para la obtención de imágenes de fluorescencia es necesario utilizar y montar un cubreobjetos de vidrio. • Un grosor del cubreobjetos de 170um (+/- 5um) es óptimo para la precisión óptica con lentes objetivo de inmersión en aceite de gran aumento. • El cubreobjeto no debe sobresalir más allá del borde del portaobjeto de vidrio del microscopio. Todo el cubreobjetos y la etiqueta deben estar adheridos al portaobjetos de vidrio. • El montador de cubreobjetos no debe contener burbujas de aire y debe estar estabilizado antes de usarse. El cubreobjetos debe estar montado de tal modo que no impida que los objetivos del microscopio adopten las posiciones focales necesarias para la muestra.
Limitaciones de los portaobjetos	Los portaobjetos con tinción DAPI deben presentar una intensidad de tinción brillante y de alto contraste, visible para el usuario al observarlos a 10x a través de los oculares del microscopio, con antidesvanecimiento para reducir el fotoblanqueo. Una menor concentración o intensidad de la tinción DAPI en el portaobjetos puede provocar una disminución de la fiabilidad del enfoque 10x y del funcionamiento del escáner o fallos en este.

Descripción general de la sonda CytoVision DX

Las instrucciones de uso contenidas en este documento cubren el control de la aplicación y las operaciones específicas de los procedimientos de escaneado, captura, visualización y puntuación de portaobjetos FISH aplicables a los sistemas CytoVision DX configurados para el módulo de software con licencia de **sonda**.

Es necesario que el usuario esté familiarizado con el uso general de la aplicación, las funciones de la pantalla, los controles de la interfaz del hardware, la gestión de casos, las funciones de visualización de la pantalla y de la imagen y las aplicaciones asociadas que son comunes a todos los sistemas instalados con el software de aplicación CytoVision DX.

- Estas se detallan en la **Guía del usuario de CytoVision DX**:

Se proporcionan instrucciones de funcionamiento adicionales para las muestras y las instrucciones específicas del flujo de trabajo sobre el escaneado de portaobjetos metafásicos, la captura y los procedimientos de cariotipado.

- Estas se detallan en las **Instrucciones de funcionamiento de cariotipado de CytoVision DX**:

Todas las decisiones de interpretación de la imagen las toma el usuario. No existe ningún requisito cualitativo para la muestra, sin embargo, las herramientas de captura y visualización de imágenes están optimizadas para imágenes adquiridas utilizando un objetivo de microscopio de inmersión en aceite y gran aumento con material de muestra con tinción DAPI que muestra sondas de ADN en color utilizando conjuntos de filtros de fluorescencia de banda estrecha adaptados a la muestra.

Escaneado de portaobjetos FISH

El escaneado y la captura automática de portaobjetos FISH utiliza las funciones de búsqueda, clasificación, reubicación y captura del portaobjetos fluorescente del software de aplicación.

Antes de cualquier escaneado y captura automática automatizados;

- Para las, debe completarse una **calibración de escaneo fluorescente** para la intensidad de la cámara y las compensaciones de enfoque entre los objetivos de escaneo y captura.
- Los modos de *AutoCapture* (*captura automática*) de plantillas de portaobjetos utilizan la configuración de **captura** y fluorocromos Build List (*Crear lista*), *Save List* (*Guardar lista*) o *Customize Capture* (*Personalizar configuración*) de la pantalla **Capture** (*captura*). Deben establecerse y configurarse antes de cualquier escaneado y captura automáticos.

Para cada tipo de muestra hay un modo recomendado de *Buscador* de escaneado y *Captura automática* basado en los requisitos esperados de visualización del tipo de muestra.

Tipo de portaobjetos	Preescaneado (1.25x)	Modo de búsqueda (Fluorescente)	Modo de captura automática	Formato de imagen
Metafase FISH	N/D	Metafase	Sonda	Carpeta de la célula
Interfase FISH	N/D	Metafase	Sonda	Carpeta de la célula
FISH de Interfase	N/D	Interfase	ProbeAuto / Recuento de puntos	Framelist
Tejido-FISH	Detección de granos	Tejidos	ProbeAuto / Recuento de puntos	Framelist
M-FISH	N/D	Metafase	N/A (Manual solo)	Carpeta de la célula

- El modo de buscador de tejidos necesita el módulo con licencia de **Tissue FISH**.
- La captura *Spot Counting* (recuento de puntos) requiere el módulo con licencia de **Spot Counting** para realizar el procesamiento automatizado de señales de imágenes FISH de interfase durante la captura de imágenes.
- Las combinaciones alternativas de los modos de escaneado y captura no están restringidas para el funcionamiento del usuario, pero pueden no ser óptimas para los requisitos de captura o visualización posterior.

La plantilla de portaobjetos del sistema de escaneado GSL puede configurarse con múltiples áreas de escaneado superpuestas en el mismo portaobjetos. Cada área de escaneado puede configurarse para un modo de captura automática fluorescente diferente. si necesita imágenes tanto en formato de carpeta de células como de framelist para su visualización.

Captura y visualización FISH

Los sistemas *CytoVision DX* utilizan 2 formatos de imagen en los que se pueden guardar las imágenes FISH para su posterior visualización: **Carpeta de células** y **Marco de imagen** (*Framelist*).

Tipos de muestras	Captura automática	Captura manual	Opciones de captura
Metafase FISH	Sonda	Sonda (célula)	Modificación del umbral
FISH de Interfase	Sonda	Sonda (célula)	Configuración del umbral, una pila Z
FISH de Interfase	ProbeAuto	Sonda (marco)	pila Z
FISH de interfase	Recuento de puntos	Recuento de puntos*	Ensayo de puntos
MFISH (metafase)	N/A	MFISH* (Célula)	N/A
* requiere módulos de software con licencia adicionales			

Visualización y análisis de imágenes FISH

Image Type (Tipo de imagen)	Uso de análisis	Opciones de análisis	Opciones de visualización/salida
Imágenes de carpetas celulares (sonda estándar o captura M-FISH)			
Imagen sin procesar	Nueva modificación del umbral	n/a	Exportar
Sonda (metafase de FISH)	Pantalla, Crear metafase*	Pantalla de visualización de casos, anotación	Exportar e imprimir
Sonda (MFISH*)	Pantalla	Pantalla de visualización de casos, anotación	Exportar e imprimir
Sonda (interfase de FISH)	Pantalla	Pantalla de visualización de casos, anotación	Exportar e imprimir
Metafase (MFISH*)	Segmentación y creación de cariogramas*	Numerado y recuento de vista de casos Anotación, pantalla MFISH	Exportar e imprimir
* Requiere módulos de software adicionales con licencia (para las opciones de cariograma, véanse las instrucciones de uso del cariotipador).			
Imágenes de framelist (sonda automática o captura de recuento de puntos)			
Framelist	n/a	n/a	n/a
Las imágenes requieren el uso de un software de análisis de imágenes independiente compatible con el formato «framelist».			

Imagen y tipos de datos FISH

Existen 2 formatos de imagen utilizados por CytoVision DX para la captura.

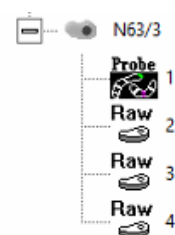
1. Imágenes de casos (carpeta de células) que se capturan utilizando las opciones estándar de la pantalla de captura.
2. Portaobjetos Framelist que se capturan utilizando los modos específicos de captura de sonda (marco de imagen).

Antes de proceder al escaneado o captura de portaobjetos FISH es importante que se utilice el modo de captura más apropiado para determinar las opciones de visualización y análisis que estarán disponibles.

Sonda (carpeta de la célula).

Un formato basado en células diseñado para muestras FISH en metafase o interfase, con visualización de imágenes e interacción mediante herramientas de pantalla de inicio estándar.

- Captura manual utilizando el modo *Sonda* de la pantalla de captura.
- Captura automática del sistema de escaneado utilizando el modo de captura de *sonda* en la plantilla del portaobjetos.
- Las imágenes en color y sin procesar se guardan en carpetas de células en el nivel de portaobjetos del navegador de casos.

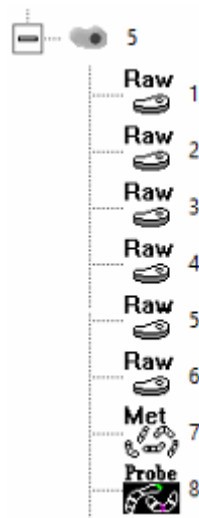


- Opciones del potenciador de la imagen, anotación, impresión y exportación de imágenes.
- Las imágenes pueden mostrarse en la vista de casos.
- La modificación del umbral (eliminación del fondo) crea objetos que pueden copiarse en pantallas flexibles y combinarse con objetos de imagen de otros modos o casos de captura estándar.
- Los cariotipos de sonda pueden crearse a partir de imágenes metafásicas FISH en un sistema con el módulo de software con licencia de cariotipo activado.

M-FISH.

Un formato basado en células diseñado para muestras FISH con etiquetado combinatorio (multicolor), con visualización de imágenes e interacción mediante herramientas de pantalla de inicio estándar.

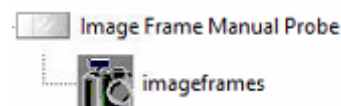
- Captura manual utilizando el modo *MFISH* de la pantalla de captura.
- No es posible la captura automática del sistema de escaneado.
- Las imágenes en color y sin procesar se guardan en carpetas de células en el nivel de portaobjetos del navegador de casos.
- Los *cariotipos* de M-FISH pueden crearse a partir de imágenes metafásicas en un sistema con el módulo de software con licencia de cariotipo activado.
- Opciones del potenciador de la imagen, anotación, impresión y exportación de imágenes.
- Las imágenes pueden mostrarse en la vista de casos.
- Los objetos pueden copiarse en pantallas flexibles y combinarse con objetos de imagen de otros modos o casos de la captura de la célula.



Sonda (Framelist).

Un formato de imagen completa diseñado para muestras FISH interfásicas o tisulares compatible con un software de análisis de imagen independiente para su visualización e interacción.

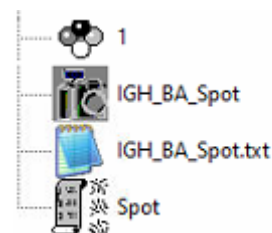
- Captura manual utilizando la pantalla de **captura de la sonda** Image Frame.
- Captura automática del sistema de escaneado utilizando el modo de captura de *ProbeAuto* en la plantilla del portaobjetos.
- Sin modificación del umbral. Todos los datos de las imágenes en color y sin procesar se combinan en una única *lista de marcos* a nivel de portaobjetos.
- Las capas de la pila Z se guardan como imágenes individuales junto con la proyección máxima.



Recuento de puntos.

Las opciones adicionales están disponibles en los sistemas con el módulo de **recuento de puntos**;

- Captura manual utilizando el modo de *recuento de puntos* de la pantalla de captura estándar (se guarda como Framelist).
- Captura automática del sistema de escaneado utilizando el modo de captura de *Recuento de puntos* en la plantilla de escaneado.
- Procesamiento automático de la señal mediante un ensayo de puntos configurable para los parámetros de captura y escaneado.

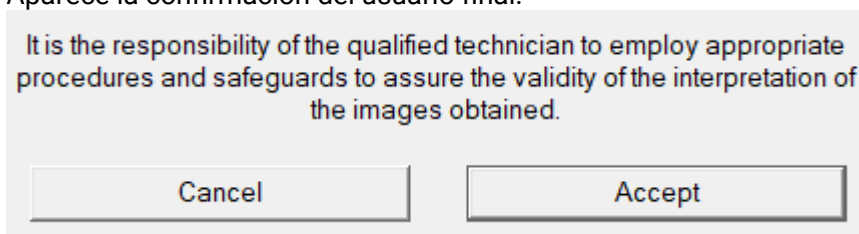


A la hora de seleccionar cuándo utilizar las opciones alternativas de captura de la sonda, deben tenerse en cuenta las diferencias clave entre cada tipo de captura y las capacidades de análisis subsiguientes.

Los datos de marco de imagen (framelist de sonda y recuento de puntos) no tienen la opción de visualización o análisis mediante la aplicación *CytoVision DX* y necesitan un software de análisis de imágenes independiente compatible con el formato "framelist".

Inicio de sesión de usuario e Inicio del software de aplicación

1. Encienda el monitor de la estación de trabajo y el PC, cuando se le solicite Inicie sesión con un nombre de usuario que tenga los permisos de seguridad adecuados para la aplicación.
2. Encienda el GSL, el microscopio y los controladores de la lámpara fluorescente según sea necesario para su uso.
3. Haga doble clic en el icono del escritorio o seleccione el acceso directo desde **Windows Start (All programs) [Inicio de Windows - Todos los programas]>CytoVision DX >CytoVision DX.**
4. Aparece la confirmación del usuario final.



5. Pulse **Accept** (aceptar) para reconocer el uso y continuar con la aplicación (o **Cancel** [cancelar] para cerrar).

Escaneado de portaobjetos interfase

Procedimiento de inicio rápido

Estas instrucciones presuponen que, antes de iniciar una exploración completa con localización de interfase fluorescente y captura automática de imágenes;

1. El sistema se ha configurado y calibrado correctamente (incluida la **calibración de escaneo fluorescente**) siguiendo los procedimientos estándar de Leica Biosystems descritos en la **Guía del usuario de CytoVision DX**.
2. Se dispone de un **clasificador de células** adecuado.
3. Se ha completado una captura manual con la creación de una **lista de fluorocromos y opciones de postcaptura** para los modos de sonda.
4. Se ha creado una **plantilla de escaneo** con las zonas de escaneo, las reglas de escaneo y captura apropiadas.
5. Los portaobjetos se han colocado en el casete de bandejas GSL empezando por la bandeja 1, posición 1.

Plantillas de portaobjetos

Es necesario asignar cada portaobjetos a una plantilla de escaneo que contenga todas las configuraciones necesarias para permitir al sistema localizar las células, clasificarlas y ordenarlas en una secuencia de captura y, después, capturar automáticamente el número necesario de imágenes.

- Para más detalles, consulte la sección [Plantillas de portaobjetos](#).

Clasificadores

Los clasificadores por defecto suministrados con el software se basan en muestras de interfase fluorescentes representativas que se espera permitan un funcionamiento inicial sin modificaciones significativas.

- No se espera que estos clasificadores coincidan exactamente con las características de las muestras de los usuarios debido a la variación normal y prevista en la muestra y la preparación de los portaobjetos.
- Para cada uno de los tipos de muestra que se vayan a utilizar en el sistema, deberá revisarse el rendimiento del clasificador elegido para determinar si es necesaria una mayor optimización.
- Se pueden añadir imágenes adicionales de nuevas exploraciones a los clasificadores predeterminados, o se pueden crear nuevos clasificadores.
- Para más detalles, consulte la sección [Clasificadores > preparación y edición](#).

Opciones de captura automática

Cada uno de los modos de captura automática disponibles tras el hallazgo de células requiere una configuración de captura adecuada para permitir el uso con varias sondas (fluorocromos).

Para cada ensayo de sonda, la combinación de fluorocromos debe capturarse primero manualmente para crear, modificar y guardar las **listas de fluorocromos u opciones de postcaptura** necesarias en la plantilla de escaneo.

Deben configurarse durante la captura manual de portaobjetos FISH representativos para cada tipo de muestra o kit de sonda o ensayo de puntos que se vaya a utilizar posteriormente para el escaneo y la captura.

- Capture una imagen representativa utilizando la captura manual en el modo **Sonda**.

- Confirme los ajustes de filtro y color para cada nombre de fluorocromo y guarde la combinación de canales de sonda como una "Lista de fluorocromos" para su uso con *Sonda* y *Captura automática* de *ProbeAuto*.
- El modo Sonda también requiere *opciones de postcaptura* (*Personalizar* la plantilla de captura).
- El modo recuento de puntos requiere un ensayo vinculado a los nombres de fluorocromos predeterminados.
- Para más información, consulte la sección de captura de cada modo.

Cargar el portaobjetos y la bandeja

Abra la puerta y extraiga el casete de la bandeja del apilador GSL.

- El apilador tiene que estar en su posición más baja para que el mecanismo de bloqueo de la puerta se abra y pueda añadir o quitar bandejas del casete.
- El botón **Unlock door** (Desbloquear puerta) se encuentra en la ventana **Configuración del escaneado** (escanear lote de portaobjetos) o aparece al hacer clic en el botón **Load Slide** (Cargar portaobjetos) en la pantalla *Capture* (Captura). Esta opción baja el casete y desbloquea el mecanismo.



Coloque los portaobjetos limpios en la bandeja GSL con la etiqueta hacia atrás.

- El portaobjetos 1 de cada bandeja está a la izquierda. El portaobjetos debe estar libre de residuos de aceite y el cubreobjetos o la muestra hacia arriba.
- Asegúrese de que el portaobjetos está plano en el inserto y empujada hacia arriba (atrás) y hacia la izquierda contra los bordes de referencia antes de soltar el agarre de resorte para mantenerla en su sitio.
- Una vez liberado el muelle de sujeción, asegúrese de que sujeta la corredera firmemente sin que se mueva si toca ligeramente la corredera.
- Repita la operación con el resto de portaobjetos y bandejas.



En los sistemas GSL120, una vez cargada cada bandeja con portaobjetos, debe volver a encajarse en el casete de bandejas con la fijación del imán en el interior y el orificio sub-X hacia el exterior.

- La bandeja 1 es la posición más baja, la bandeja 24 la más alta.
- Asegúrese de que cada bandeja se inserta nivelada (horizontal) en su propia ranura, y que el borde orientado hacia fuera de cada bandeja está nivelado con sus vecinos.

Tras cerrar la puerta, antes de iniciar un nuevo escaneado o captura automática, el sistema volverá a escanear el casete en busca de bandejas.

- Al escanear códigos de barras se cargarán todas las bandejas detectadas y se comprobará si contienen portaobjetos con códigos de barras.
- Cuando se escanea manualmente, la posición de la bandeja coincide con las posiciones asignadas manualmente con un nombre de caja y plantilla en la pantalla Configuración de escaneado.



Durante el escaneado y la captura automática, el casete se levanta para bloquear la puerta, por razones de seguridad. Si se tiene que añadir o eliminar una bandeja, es necesario detener el escaneado o la captura en marcha.

* Se realiza una comprobación del uso de memoria cuando se selecciona *Configuración de escaneado* para determinar si se puede escanear un lote completo de portaobjetos. Si el uso de memoria de la aplicación supera un umbral configurado.

- Aparecerá un mensaje de advertencia y no se abrirá la ventana de configuración de escaneado.
- la aplicación debe reiniciarse antes de poder realizar cualquier actividad relacionada con el escaneado.

Escaneado de un lote de portaobjetos (Interfase)

1. Asegúrese de que el GSL y los componentes del microscopio están encendidos y de que hay suficiente aceite en el mecanismo de lubricación.
2. Inicie la aplicación *CytoVision DX* y desplácese a la pantalla de escaneado, permitiendo que la aplicación conecte e inicie el hardware.
3. Haga clic en el icono Scan batch of slides (Escanear lote de portaobjetos), abriendo la ventana de configuración manual de escaneado (para los portaobjetos con código de barras en los que sus códigos de barras se han vinculado a un nombre de caso y plantilla de portaobjetos, salte al paso **12** después de la colocación del portaobjetos en las bandejas y el casete).
4. Haga clic y destaque el portaobjetos 1 (posición de platina 1).
5. Seleccione la caja en la que se guardarán los datos de la imagen.
6. Seleccione la plantilla de portaobjetos que tenga las reglas de escaneado y captura automáticas correctas para este.
7. Haga clic en la etiqueta situada en el extremo esmerilado de la presentación de portaobjetos para dar un nombre al portaobjetos.

6. Coloque el portaobjetos de muestra que coincida con el caso seleccionado (y el nombre del portaobjetos) en la posición 1 de la bandeja. (Consulte el procedimiento de [Carga de portaobjetos y bandejas](#) para obtener más información).
7. Seleccione el icono de portaobjetos siguiente y asigne una plantilla de caso y escaneado. Añada el portaobjetos de muestra correspondiente en la bandeja y compruebe que está colocado correctamente.
8. Repita la operación para el resto de portaobjetos y posiciones que se utilizarán en la primera bandeja. Coloque la bandeja 1 en la primera posición (la más baja) del apilador/casete.
9. Repita este procedimiento para todos los portaobjetos y bandejas restantes y cargue el casete en la unidad apiladora.
10. Coloque el casete en el apilador GSL y cierre la puerta.
11. Seleccione el botón Scan (Escanear) para empezar el escaneado.
(Para portaobjetos con código de barras, seleccione el icono *Escanear portaobjetos con código de barras*).
12. El primer portaobjetos se escaneará con preescaneado y las opciones de escaneado se configuran en la plantilla.
- Escaneado (10x): véase [Plantillas de portaobjetos > Escaneado](#)
13. Para poder iniciar un escaneo 10x, el sistema debe completar un mapa de enfoque en varios puntos dentro del área de escaneo.
- Esto depende de la correcta **calibración del barrido fluorescente** y - de que el punto de enfoque inicial esté cerca de la muestra, establecido durante la **calibración espacial** (modificado por cualquier desplazamiento de enfoque guardado en la plantilla de portaobjetos).
14. Durante el escaneo 10x el sistema revisa las imágenes de la cámara en cada movimiento de la etapa (fotograma) y compara cualquier objeto detectado con el [clasificador](#) configurado en la plantilla de portaobjetos. Esto determina cuántas células clasificadas están disponibles para la captura.
15. Una vez completado el escaneo 10x, las células clasificadas se ordenan para determinar la clasificación de la captura configurado en la plantilla antes de pasar a la fase de captura automática.
16. A continuación, se añade aceite automáticamente y el objetivo de gran aumento se coloca en posición, realizando unos «movimientos con aceite» para esparcirlo uniformemente por la superficie del portaobjetos.
17. A continuación, se capturan imágenes (fotogramas) con gran aumento. Para cada imagen, el sistema realiza un enfoque automático para determinar la posición focal y, a continuación, captura utilizando los ajustes específicos de la plantilla antes de pasar a la siguiente célula.
18. Una vez que se haya capturado el número correcto de imágenes (según lo configurado en la plantilla de escaneado o el ensayo de puntos) la captura finalizará y *CytoVision DX* pasará al siguiente portaobjetos, repitiendo el escaneado, el aceitado y la captura automática hasta que se completen todos.
19. La aplicación **monitor de escaneado** registra la actividad y los tiempos de cada fase de preescaneado, escaneado y captura del lote de escaneado, y debe revisarse para detectar cualquier problema inesperado.

Para ver más flujos de trabajo paso a paso, consulte el [Apéndice](#) al final de este manual.

Configuración manual de escaneado

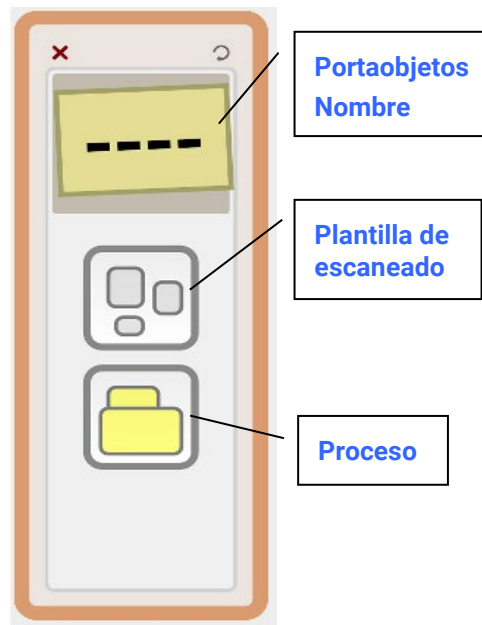


Si la configuración del escaneado y el portaobjetos son manuales, es importante comprobar que el proceso y las plantillas se corresponden correctamente con los portaobjetos actuales colocados físicamente en el sistema.

- Para reducir el riesgo de error se recomienda volver a comprobar los portaobjetos y las configuraciones, o utilizar una ficha técnica con las posiciones deseadas del caso y portaobjetos.
- El uso de [Escaneo de código de barras](#) en portaobjetos etiquetados en los sistemas GSL, optimiza la eficiencia del escaneado y reduce el riesgo de error en la configuración del escaneado.

Asignación de casos y plantillas

- En la pantalla Scan (Escaneado), seleccione el icono **Scan batch of slides** (Escanear lote de portaobjetos) de la barra de herramientas principal, se abrirá una ventana que mostrará todas las posibles posiciones del portaobjetos para el escaneado.
- Asigne un proceso y una plantilla para cada portaobjetos que se vaya a escanear. El nombre de portaobjetos es opcional, si no se introduce ninguno, el sistema utiliza el siguiente número posible para el proceso con un identificador de posición del portaobjetos al final, por ejemplo, Portaobjetos 1_1 (para el compartimento/la bandeja 1).
- Haga clic en el icono de la carpeta del proceso y aparecerá una lista de los procesos en la red. Seleccione de esta lista o escriba el nombre de un nuevo proceso para crearlo.
- Una vez que seleccionado un proceso, aparecerá en el lado derecho de la pantalla de configuración con un número de identificación. Este es el número que se visualiza en la pantalla del portaobjetos. Cada vez que se reinicia la aplicación CytoVision, la lista se reinicia.
- Si escanea varios portaobjetos del mismo caso, haga clic en el nombre del caso de esta lista para asignarlo rápidamente en lugar de buscar en el panel de carpetas de casos. Haga clic en el selector Plantilla de escaneado para seleccionar y asignar una plantilla al portaobjetos. Una vez creadas las plantillas, aparecerán también en la sección superior izquierda de la pantalla de configuración del escaneado para poder seleccionarlas rápidamente.
- Los nombres de los portaobjetos son opcionales. Si fuera necesario poner un nombre específico haga clic en la sección "nombre" y escriba la descripción correcta.
- Se pueden seleccionar varios portaobjetos mediante las teclas **Ctrl** o **Mayús**. de Windows con un clic del ratón.



Captura automática/diferida

Cuando se hayan asignado todos los procesos y plantillas para el lote del portaobjetos en el microscopio, aparecerá una flecha de selección debajo de cada portaobjetos.



Esta es la ventana **Deferred Auto-Capture** (Captura automática diferida) que permite anular la plantilla para separar los componentes de escaneado y captura automática.

- **Ninguna.** (de fábrica) Si está configurado, el sistema escaneará y capturará automáticamente el portaobjetos antes de pasar a la siguiente.
- Ajuste estándar para escaneo y captura GSL con engrase automático.
- **Escaneado.** Seleccione esta opción para realizar únicamente el escaneado de la plantilla. Después de cada escaneado, el sistema se desplazará al siguiente portaobjetos.
- Utilizar en un sistema GSL para revisar manualmente las miniaturas de escaneado antes de una captura automática "Diferida".
- **Captura.** Seleccione esta opción para realizar únicamente la captura automática. Se selecciona esta opción si hay células clasificadas (bandera verde) en la lista de portaobjetos. La opción Captura seguirá las reglas de captura de la plantilla para un número determinado de células y opciones de clasificación.

Nota: Las opciones Scan (Escaneado) o Capture (Captura) seleccionadas manualmente no son típicas del escaneo de muestras FISH para muestras interfásicas, pero son opcionales para el escaneado metafásico.

Una vez realizadas todas las asignaciones de portaobjetos, casos y plantillas y cargadas las bandejas en el GSL, pulse el botón **Scan (Escaneado)** situado en la parte inferior de la página *Scan Setup (Configuración del escáner)* para iniciar el proceso de escaneado. El sistema trabajará en cada una de las combinaciones de configuración de portaobjetos y plantillas.

Flujos de trabajo de configuración manual de escaneado

En la práctica, esto abarca 2 flujos de trabajo:

1. Escaneado y captura automáticos

Este es el procedimiento de rutina para los sistemas GSL que utilizan la selección de escaneo Metafase Fluorescente e Interphase Finder.

Los portaobjetos se configuran en *Configuración de escaneado*; **Ninguno** se confirma en las opciones de **Captura automática diferida**;

- El primer portaobjetos se escanea con pocos aumentos y se procesa con el clasificador seleccionado.
- Las células clasificadas se categorizan usando las reglas de clasificación de captura automática de la plantilla.
- El aceite se dispensa automáticamente en el portaobjetos y se inicia la captura automática de gran aumento. Las células se enfocan automáticamente y se capturan mediante el modo de captura configurado y los ajustes.
- Una vez capturado el número de células seleccionado, la platina se desplaza al siguiente portaobjetos o a la bandeja y comienza el escaneado y la captura automáticos de ese portaobjetos.
- El proceso se repite hasta que se completan todos los portaobjetos asignados del lote.

2. Escaneado con captura automática diferida (Metafase)

Este procedimiento es opcional para los sistemas GSL que utilizan escaneo de metafase fluorescente Finder en los que el usuario debe revisar, añadir o eliminar células clasificadas antes de iniciar la captura automática.

En la página de configuración del escaneado se seleccionan todos los portaobjetos y en **Deferred Auto-Capture** (Captura diferida automática), la opción **Scan only** (Solo escaneado).

- Todos los portaobjetos se escanean con pocos aumentos y se procesan con el clasificador seleccionado.
- Una vez se ha completado el escaneado, el sistema vuelve a la pantalla de escaneado y se detiene.

Ahora, el operador tiene la opción de iniciar inmediatamente el proceso de Captura automática o revisar primero cualquier lista de metafases para modificar las células clasificadas que se van a capturar antes de guardar y volver a la **pantalla Escaneado**.

- Seleccione el icono *Manually Scan Batch of Slides* (Escanear manualmente lote de portaobjetos) para abrir la ventana de configuración del escaneado.
- Seleccione el botón **Deferred** (Diferida) que ahora aparecerá en la parte inferior de la página. Todos los portaobjetos que solo se escanearon en el lote anterior (y tienen al menos 1 célula marcada en verde en su lista) tendrán su posición de bandeja y nombre de caso recargados en la pantalla con la visualización de captura "C" establecida.
- (Opcional) Elimine/borre cualquier portaobjeto que no desee capturar. Esto puede resultar útil después de una revisión manual de las listas de metafases y la identificación de que no hay nada de calidad aceptable para capturar en algunos portaobjetos.
- Seleccione el botón **Scan** (Escaneado) para iniciar el proceso de desplazamiento automático comparando las posiciones de enfoque 10X.
- Las células clasificadas se categorizan usando las reglas de clasificación de captura automática de la plantilla.

Mediante la *captura diferida*, el sistema realiza un nuevo mapa de enfoque en el portaobjetos y lo compara con las imágenes guardadas del escaneado original, aplicando un desplazamiento automático que ajusta cualquier pequeño movimiento del portaobjetos o de la bandeja introducido durante la carga y descarga de las bandejas.

- El aceite se dispensa automáticamente en el portaobjetos y se inicia la captura automática de gran aumento. Las células se enfocan automáticamente y se capturan mediante las reglas de captura personalizada de **Post Capture Options** (Opciones tras la captura).
- Una vez capturado el número de células seleccionado, la platina se desplaza al siguiente portaobjetos o bandeja y comienza el proceso de captura de ese portaobjetos.
- La captura automática se repite sin interacción adicional necesaria hasta que se completan todos los portaobjetos asignados del lote.

Escaneado de lotes mixtos

Todos los modos de exploración FISH y captura automática pueden ejecutarse en un lote mixto en el sistema GSL.

- «Escanear» solo los portaobjetos completará el componente de escaneado 10x
- Los portaobjetos que se dejen como "None" (Ninguno), completarán los componentes de búsqueda de célula y captura automática.

- Al final de la primera pasada, los portaobjetos de *captura diferida* pueden actualizarse en la pantalla de configuración del escaneado utilizando el botón **Deferred (Diferido)** para cargar los portaobjetos que aún tienen que completar el componente de captura.
- Haga clic de nuevo en **Scan (Escanear)** para iniciar la captura automática de los portaobjetos restantes.

NOTA: Si la configuración del escaneado y el portaobjetos son manuales, es importante comprobar que el proceso y las plantillas se corresponden correctamente con los portaobjetos físicos que se introducen en el casete del cargador de portaobjetos.

- Para reducir el riesgo de error se recomienda volver a comprobar los portaobjetos y las configuraciones, o realizar una referencia cruzada con una ficha técnica con las posiciones deseadas del caso y portaobjetos.
- El uso de Escaneo de código de barras en portaobjetos etiquetados en los sistemas GSL, optimiza la eficiencia del escaneado y reduce el riesgo de error en la configuración del escaneado.

Escaneado de código de barras



El escaneado de códigos de barras permite un uso óptimo de un sistema de escaneado GSL. La asignación de casos y plantillas se realiza antes de la digitalización mediante la función **Asignar códigos de barras de portaobjetos** o si hay una interfaz independiente del sistema de información de laboratorio (SIL).

- El gestor de códigos de barras se puede utilizar para ver y actualizar asignaciones de códigos de barras.
- Para más detalles e información adicional sobre la compatibilidad con códigos de barras y sus limitaciones, consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Asignar configuración del portaobjetos

Haga clic en el icono **Assign Slide Barcodes** (Asignar códigos de barras del portaobjetos) de la pantalla Escaneado para abrir la pantalla de configuración.



1. **Seleccionar plantilla.** Se mostrará en la pantalla una ventana con las plantillas de escaneado disponibles. Aquí pueden crearse otras nuevas, pero no es el flujo de trabajo habitual.
2. **Detalles del portaobjetos** (opcional). Una vez resaltada una plantilla, se puede vincular a una plantilla de datos del portaobjetos guardada si se necesita información específica del portaobjetos para registrarla antes de un escaneado; para ello, haga clic en el botón **Details** (Detalles).
3. **Seleccionar proceso.** Se mostrará la lista de procesos actuales (se pueden crear nuevos). Una vez que se selecciona un proceso válido, se activa **Manually Enter Barcode** (Introducir códigos de barras manualmente).
4. **Escanear códigos de barras del portaobjetos.** Para escanear el código de barras directamente del portaobjetos utilice un lector* de códigos de barras de mano (los datos del código de barras de línea pueden introducirse manualmente). Esto se mostrará en la pantalla con la información del proceso y la plantilla para su comprobación. Cualquier código de barras duplicado se mostrará resaltado en rojo. Haga clic en el botón **Manually Enter Barcode** (Introducir códigos de barras manualmente) si el lector de mano no se ha programado antes para abrir esta ventana automáticamente.

* Los sistemas de escaneado no incluyen un lector manual de códigos de barras. Se recomienda utilizar un lector que admita códigos de barras 2D completos, como Motorola (Symbol) DS6707 o equivalente.

Flujos de trabajo de escaneado de códigos de barras

El menú del texto **Barcode Scanning** (Escaneado de códigos de barras) que se encuentra en la parte superior de la barra de herramientas principal facilita el acceso a los 3 comandos de escaneado o captura.

Escaneado y captura

Esta opción funciona igual que hacer clic en el icono **Escanear portaobjetos con códigos de barras** de la barra de herramientas principal.

- Cada bandeja del casete se carga en secuencia, empezando por la bandeja 1, y cada una de las 5 posiciones de bandeja se lee en busca de portaobjetos etiquetados con códigos de barras.
- Al detectar un código de barras válido en la base de datos, el sistema procederá a escanear y capturar un portaobjetos cada vez según las reglas de la plantilla.

Solo escaneado

Esta opción inicia el portaobjetos del código de barras equivalente a Captura diferida automática. El GSL carga cada bandeja de manera consecutiva y lee los detalles del código de barras pero únicamente realiza el escaneado de menor aumento de la plantilla para cada portaobjetos.

- La opción *Scan Only* (Solo escaneado) está destinada para cuando la revisión manual de las listas de metafases comprueba las células clasificadas para capturar o para añadir/eliminar células de la categoría con marcado verde.
- *Scan Only* (solo escanado) no es compatible con el uso típico de muestras interfásicas.

Solo captura

Solo se utiliza inmediatamente después de realizar un **Solo escaneado** a los códigos de barras una vez que se han revisado o modificado las listas de células apropiadas del área de la región. El sistema volverá a escanear los portaobjetos con código de barras en el casete y seguirá las reglas de captura automática de la plantilla de escaneado.

El componente Captura funciona de la misma forma que **Captura diferida**: el sistema compara las posiciones del mapa de enfoque 10X con una memoria guardada de dichas posiciones en el mismo escaneado. Esto permite aplicar una compensación automática para cualquier desplazamiento menor del portaobjetos o la bandeja que se introduzca durante la carga y descarga de las bandejas.

La opción **Solo captura** de los códigos de barras funcionará como está diseñada si:

- no se ha realizado ningún otro escaneado en el sistema desde que se seleccionó la opción **Solo escaneado** de los códigos de barras.
- Los portaobjetos que se van a capturar no se han eliminado o reemplazado en las bandejas desde que se utilizó la opción **Scan Only (Solo escaneado)** de los códigos de barras. Se recomienda no desplazar las bandejas a posiciones diferentes del casete antes de utilizar la opción **Solo captura**.

Nota: Cuando se selecciona cualquiera de las opciones de escaneado de códigos de barras se realiza una comprobación del uso de memoria para determinar si se puede escanear un lote completo de portaobjetos.

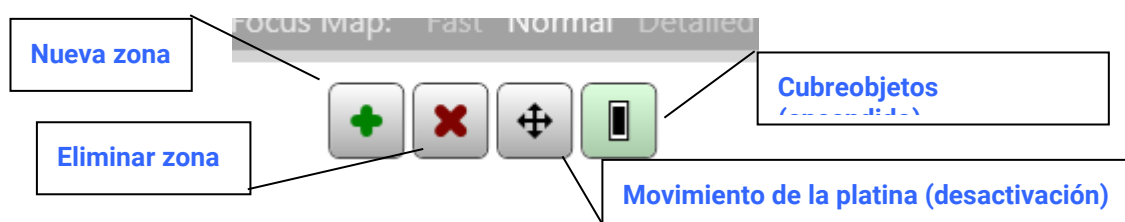
- Si el uso de memoria de la aplicación supera un umbral configurado, se mostrará un mensaje de advertencia y el escaneo no continuará.
- La aplicación debe reiniciarse antes de poder realizar cualquier actividad relacionada con el escaneado.

Plantillas de portaobjetos (FISH)

- Abra la ventana Scan Setup (Configuración de escaneado) y seleccione el icono Assign Scan (Asignar escaneado) (Slide Template [plantilla de portaobjetos]) para cualquiera de las posiciones de portaobjetos para ver la ventana **Choose a slide Template (Elegir una plantilla de portaobjetos)**.
- Si no hay plantillas, haga clic en el botón **Create New Slide Template** (Crear nueva plantilla del portaobjetos), de lo contrario, seleccione **New** (Nueva) para crear una nueva plantilla o **Edit** (Editar) para modificar una existente.

Debe utilizarse un nombre de plantilla que describa el tipo de escaneado que se va a realizar. Normalmente, esto hará referencia a la muestra, como "Sangre FL" o "DGO".

Zona de escaneado

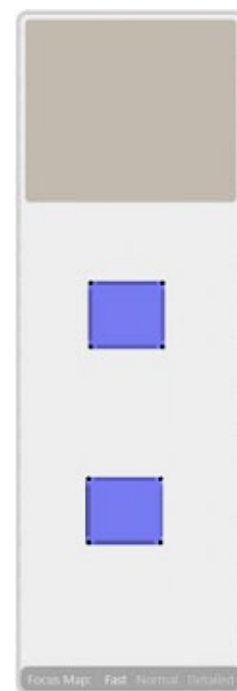


Haga clic en el símbolo más (+) de color verde para añadir una zona de escaneado nueva o adicional a la plantilla existente

- Las áreas múltiples son típicas para el escaneo FISH, ya sea para escanear la misma área del portaobjetos con los modos de búsqueda de metafase e interfase o para permitir áreas posicionales separadas de la muestra, cada una hibridada con un kit de sonda diferente.

Para portaobjetos FISH se debe comprobar:

- El ajuste del cubreobjetos está activado para todas las zonas, de lo contrario el sistema no calculará con precisión las posiciones de escaneado o de captura del enfoque automático.
- El área de exploración que se ajusta para que sea más pequeña que la colocación de la muestra, ya que así se reduce el riesgo de que fallen los puntos del mapa de enfoque si no hay material de muestra presente.
- Para el escaneo interfásico es habitual establecer solo un área de escaneo pequeña debido a que se espera una alta densidad de células clasificadas.
- Para reducir los tiempos del *mapa de enfoque* y el riesgo de fotoblanqueo en áreas más pequeñas se utilizarán 1 o 5 puntos de mapa de enfoque dependiendo del tamaño y de si *Focus Map: Es Normal* o *Focus Map: Se selecciona Fast* (rápido).



Una vez que se establece una zona de escaneado en la plantilla, podrá acceder a 3 paneles de escaneado y captura.

Preescaneado

El preescaneado utiliza la lente objetiva de 1,25x para identificar las características de los portaobjetos bajo la luz de campo claro.

- Las opciones estándar de preescaneo están desactivadas para los modos de escaneo fluorescente.

Escaneado

Esta sección contiene las opciones de búsqueda de células necesarias para permitir un escaneo de los tipos de muestras;

- Modo de escaneo:** Fluorescente para portaobjetos FISH (requiere la compatibilidad del microscopio y el filtro).
- Finder Application** (Aplicación de búsqueda) selecciona la búsqueda de metafases y la búsqueda de interfases
- Clasificador:** selecciona un clasificador apropiado para el tipo de muestra.
- Objetivo:** 10x por defecto.
- Stop Scanning after** (Detener escaneo después): detiene el barrido escaneado una vez que se alcanza un número mínimo definido de células buenas clasificadas (bandera verde). Si esta opción está deshabilitada, el escaneo continúa en toda la zona seleccionada.
Esto no es típico para el escaneo FISH y solo debe utilizarse con clasificadores que hayan sido optimizados para las muestras del usuario.

Scan (Escanear) > Configure (Configurar)

El panel Configure Finder Application (Configurar aplicación Finder) da acceso a varias opciones de configuración en función del tipo de muestra y de su uso.

- El botón Reset to Defaults (Restablecer valores predeterminados) muestra los ajustes iniciales de **Configuración**.
- Estos son valores típicos y puede ser necesario modificarlos en muestras reales.

Para el escaneo rutinario el ajuste típico sirve para:

- Modifica de los ajustes de área de interfase o metafásica **mínima y máxima**.
- Establecer un modo de muestreo (solo buscador de metafases).

Área de interfase mínima/máxima

Los objetos situados por debajo del área mínima o por encima del área máxima de píxeles no se procesarán durante el escaneo para su visualización o clasificación en la lista de portaobjetos.



- Para el escaneo interfásico, el área mínima predeterminada (40) suele ser inferior a la necesaria y puede aumentarse a entre 80 y 100 sin que cambien las células interfásicas utilizables.
- Reducir el área máxima (por defecto 500) reducirá la clasificación de grupos de celdas si estas no son útiles para la revisión.

Cargar solo clasificadas

- Utilice esta opción para guardar solo las imágenes de escaneo clasificadas en función del clasificador utilizado.
- *Upload Classified Only* (Cargar solo clasificadas) debe desmarcarse durante la configuración y las pruebas iniciales del clasificador.
- Después de la optimización del clasificador, se recomienda activar esta opción, especialmente si el escaneo de búsqueda entre fases produce muchos objetos de fondo sin clasificar que pueden ralentizar el escaneo, aumentar el tiempo de procesamiento e incrementar el tamaño de la *lista de escaneo guardada*.

Puntos focales (validación de células)

El panel Cell Validation (Validación de células) es una función de procesamiento de imágenes para el Mapa de Enfoque de escaneo.

- Se recomienda **desactivar** la Validación de células para las plantillas de escaneo FISH rutinarias.
- Para más detalles e información adicional sobre la opción de escaneo de portaobjetos metafásicos, consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.

Captura automática

Las opciones de AutoCapture (Captura automática) establecen las reglas para el número y el tipo de imágenes que se van a capturar después del escaneo, mediante opciones de clasificación para la calidad adecuada de las imágenes.

- La captura automática completa solo puede configurarse si se elige un clasificador en la plantilla de escaneo (el valor predeterminado "Todo" no es un clasificador y muestra todos los objetos escaneados como no clasificados en la lista de portaobjetos).
- La captura automática sigue inmediatamente después de un escaneo en los sistemas GSL que utilizan engrase automático, a menos que se utilice el flujo de trabajo de **captura automática diferida**.

A menos que todas las células sean necesarias (normalmente solo para portaobjetos de metafase si únicamente se ha llevado a cabo una revisión manual), desmarque la opción **Capture all cells** (Capturar todas las células) y seleccione las reglas que desee para el tipo de muestra.

Interphase AutoCapture

Para las muestras interfásicas, el número de imágenes a capturar se define en el panel de captura automática.

Debe establecerse un clasificador de interfase adecuado en el panel de exploración de la plantilla de portaobjetos para que las células clasificadas y marcadas en verde estén disponibles para la captura y la opción **Perform AutoCapture (Realizar captura automática)** sea seleccionable.

Existen tres **Modos de Captura** para la captura rutinaria de imágenes FISH en los sistemas de escaneo *CytoVision DX*: **Probe** (sonda), **ProbeAuto** y **Spot Counting** (recuento de puntos).

1. Debe estar familiarizado con los procedimientos manuales de captura de la sonda y los fluorocromos.
2. Captura automática requiere una *lista de fluorocromos* o ensayo de puntos que se haya creado y guardado previamente. Esto enlazará con los nombres de los fluorocromos, los ajustes de la pila Z y la configuración de filtros y colores.
3. Cada modo tiene un ajuste **Objetivo**: para seleccionar la lente de gran aumento utilizada para la captura automática, normalmente 63x para mejorar el campo de visión y los efectos de intensidad.
4. El estado **Autocamera setup (configuración de la cámara automática)** determinará cómo se capturan las imágenes a gran aumento durante la captura automática;
 - **Activo** (marcado): Para cada canal a capturar, el sistema realizará un ajuste de la cámara automática (exposición) basado en la intensidad de cualquier fluorescencia presente en el campo de visión.
 - **Inactivo** (sin marcar): Para cada canal que se va a capturar, el sistema utiliza los valores fijos de la cámara que se guardaron por última vez en la Lista de Fluorocromos de la pantalla de captura.

Existen otras opciones de visualización y selección en función del modo específico seleccionado.

Modo de captura de la sonda:

Este modo de captura creará imágenes para su análisis a través de la pantalla principal de inicio de la aplicación.

- **Capturar todas las células o Capturar hasta n células:** - el usuario puede definir cuántas células son necesarias para la captura y en función de un criterio de clasificación y ordenación.
- **Lista de fluorocromos:** - Enlaza con una lista de captura de sonda creada y guardada previamente.
- **Opciones tras la captura.** - utiliza las plantillas Personalizar captura para que el usuario defina cómo desea que se capturen las imágenes. Estas plantillas deben haber sido preconfiguradas en la ventana Customize (*Personalizar*) de la pantalla de captura.

Modo de captura de ProbeAuto:

Este modo de captura creará imágenes *framelist*.

Capture up to frames ordered on

Objective:

Capture Mode:

Autocamera Setup ☒ Setup on counterstain ☒ Setup on probe ☒ Setup using Average ☐ Frames

Save Z-Stacks ☒

Fluorochrome list:

Post capture options:

Las opciones de postcaptura no se utilizan. Están disponibles las siguientes opciones adicionales:

- **Configuración de la contratinción:** Mejora el cálculo de exposición de **Autocamera Setup** (configuración de la cámara automática) en canales fluorocromáticos al trabajar solo en las áreas que contienen señal DAPI (máscara de contratinción) y verse menos afectado por restos fluorescentes fuera de la célula.
- **Configuración de la sonda:** Mejora el cálculo de la exposición de **la configuración de la cámara automática** en canales fluorocromáticos utilizando un cálculo basado en el tamaño para que se vea menos afectado por los restos fluorescentes brillantes dentro de la célula.
- **Configuración mediante promedio:** Captura los *n* primeros fotogramas utilizando el cálculo automático estándar de la exposición para obtener un valor medio de integración de fluorocromos para todos los fotogramas restantes.
- **Guardar una pila Z:** Guarda cada imagen de la pila de fluorocromos junto con la proyección máxima.

Modo de captura de recuento de puntos:

Este modo de captura creará imágenes en formato *framelist*.

Objective:

Capture Mode:

Autocamera Setup ☒ Setup on counterstain ☒ Setup on probe ☒ Setup using Average ☐ Frames

Save Z-Stacks ☒

DGO

Fluorochrome list:

Los ajustes son los mismos que para **ProbeAuto** con los cambios adicionales;

- **Seleccionar ensayo de puntos:** abre el panel Assay Selector (selector de ensayo) para elegir un ensayo apropiado que contenga los nombres de los fluorocromos utilizados para construir la lista de captura, los ajustes de pila Z y los parámetros de parada de captura automática.
- **Lista de fluorocromos** no se puede seleccionar. La lista de captura y la configuración de los fluorocromos se establecen en el ensayo de puntos y se vinculan a los fluorocromos de la "Build List» (lista creada).

Nota: Si hay algún nombre de lista en la **lista de Fluorocromos** o en los paneles de **opciones de postcaptura** esto significa que el área de escaneo ha sido previamente configurada para el modo sonda o sonda automática donde estos son requeridos.

Se recomienda crear una nueva área para las operaciones de recuento puntual para mantener estas áreas en blanco.

Visualización y ajuste de la imagen

La imagen en vivo de la parte derecha de la pantalla cuenta con los controles de platina y enfoque, que podrá utilizar para comprobar la posición de la zona de escaneado y confirmar la configuración de la cámara que se utiliza con el enfoque automático de 10X (Escaneado).

Es aconsejable cargar un portaobjetos típico al usar la plantilla por primera vez para comprobar que los valores de la cámara calibrada y la posición de enfoque son aceptables.



Nota: Los ajustes de la cámara utilizados durante el escaneo se determinan durante el mapa de enfoque de el escaneo y no debería ser necesario ajustar rutinariamente la visualización de la imagen en directo en la plantilla.

- La Intensidad de la imagen en vivo y la posición de enfoque se determinan a partir de la calibración del sistema, que se espera que muestre una imagen visible cerca del plano focal de la muestra sin ajustes significativos para los portaobjetos de rutina.
- Si la imagen es bastante oscura, brillante o está muy lejos del enfoque, esto puede indicar que la calibración no es correcta y puede ser necesario repetirla.

Si los botones **Auto Camera** (Cámara automática) o **Record Z** (Registro Z) aparecen en color **rojo**, esto indicará que utilizan la configuración de los sistemas calibrados; esto es normal y esperado para el escaneo rutinario.



Si los botones **Auto Camera** (cámara automática) o **Record Z** (Registro Z) aparecen en **verde**, esto indica que han sido modificados previamente en la plantilla y que ahora están utilizando valores guardados solo para esta plantilla.



Al cambiar los valores de la cámara automática se omitirán los valores de **calibración de escaneado de la cámara (fluorescente)** y se utilizarán los ajustes de la plantilla sólo para las rutinas del mapa de enfoque de escaneado.

- Esto ha sido diseñado para utilizarse cuando se espera que los valores de la muestra a usar con esta plantilla sean distintos de los de la calibración estándar, como muestras fluorescentes con tinción DAPI difuminada o débil.
- No se espera que las muestras de campo claro requieran valores específicos de la cámara para la plantilla.

El cambio del Registro Z (Posición de enfoque) solo debe realizarse si la plantilla se va a utilizar en un portaobjetos o tipo de muestra específico en el que el plano de enfoque de la muestra es superior o inferior al tipo de portaobjetos de rutina, por ejemplo, debido a una diferencia física en el portaobjetos o cubreobjetos, el material o el grosor de la preparación.

- La posición de enfoque solo afectará al mapeo de enfoque de escaneo y al escaneo, no tiene efecto en la rutina de enfoque de captura automática de gran aumento.

Después de cualquier actualización de la **calibración de escaneado de fluorescencia**, todas las plantillas de escaneado que hayan modificado los valores de la cámara o del enfoque aparecerán con un símbolo de advertencia en la pantalla de configuración del lote de escaneado, indicando que pueden estar utilizando ajustes que ya no son apropiados para el sistema y que deben comprobarse o «reiniciarse».

Slide Templates

11-14_4-14

4-11

11q23

Revisión de las listas de interfase

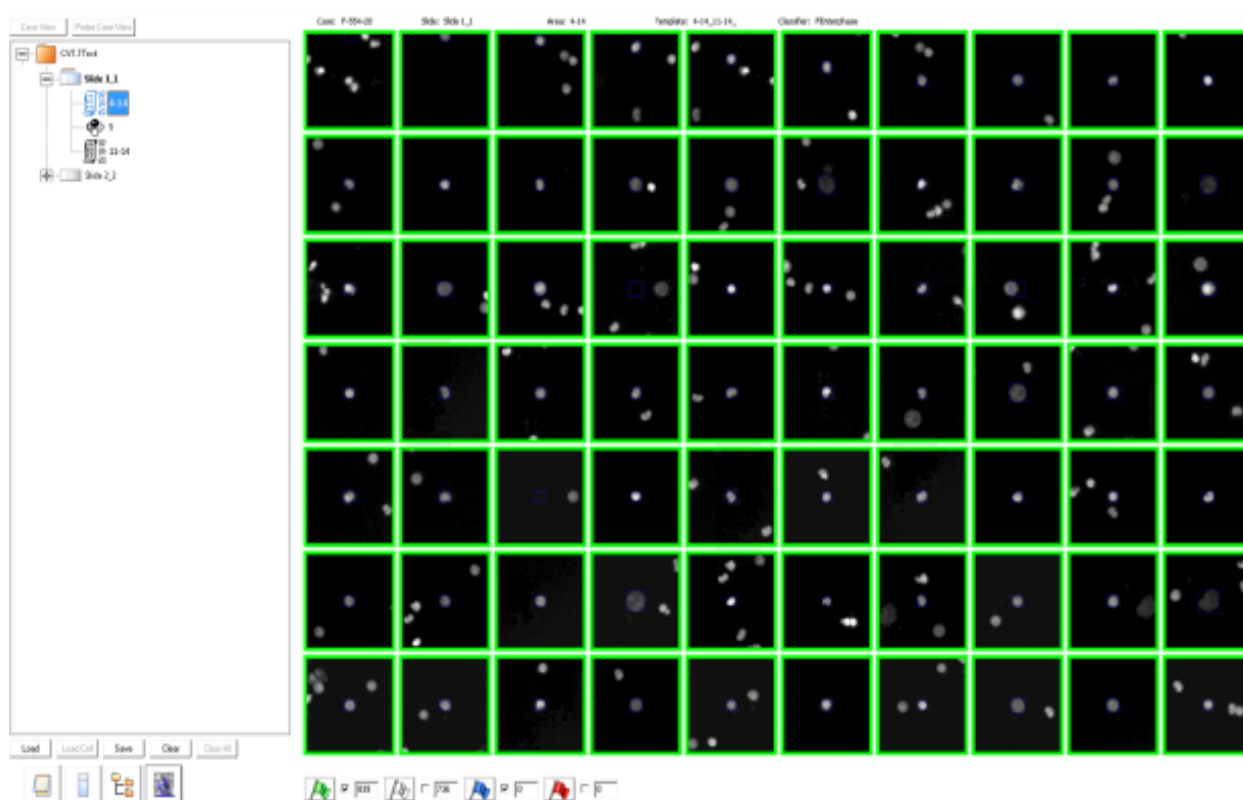


Las imágenes escaneadas se guardan en una lista de portaobjetos que se muestra en el navegador, en la carpeta de la célula.

Las listas de portaobjetos solo pueden cargarse y visualizarse en la pantalla de revisión y se utilizan en

- Creación o edición de clasificadores de escaneado.
- Consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX** para obtener información general sobre la visualización y el control de la pantalla Review (revisión).

En el caso del escaneado fluorescente, normalmente esto solo se utiliza para revisar la precisión de los clasificadores de células.





Vista de notas (Interfase)

Haga clic en el icono **Notes** (notas) para sustituir la vista del navegador por una tabla de datos con información y medidas de cada miniatura de la ventana principal.

Id	Height	Area	CMP	Circ	Perimeter	HWRatio	R
1	15	100	829	687	49	933	1
3	20	165	863	745	65	850	2
6	16	114	829	688	52	1000	3
7	19	183	879	772	68	1000	4
8	15	105	819	671	48	933	5

La mayoría de las columnas de la tabla contienen medidas calculadas del procesamiento de la imagen al que se someten las imágenes en miniatura.

- Cada columna puede utilizarse para clasificar/ordenar la visualización de miniaturas de imágenes en pantalla y vincularse a la plantilla de portaobjetos como orden de clasificación para la captura automática en el modo de sonda estándar.
- Las mediciones no tienen correlación directa con la calidad de las células y sólo son relevantes para el entrenamiento del clasificador.

Las columnas más importantes para el uso de interfase son:

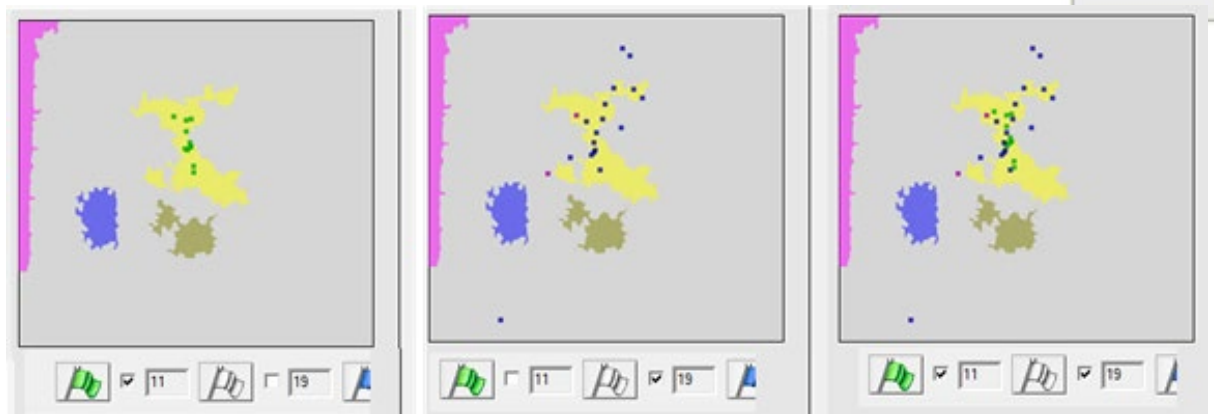
- **Cell ID** (Identificador de célula). Cada célula se numera en el orden en que se encuentra durante el escaneado. Esto se convierte en un número de identificación único de la célula y no se puede eliminar ni cambiar, independientemente de cualquier clasificación utilizada. Este número se incluye como parte del nombre de la célula para cualquier célula creada a partir de una captura automática de modo de **sonda**.
- **EF**. Muestra la posición única de England Finder para cada célula tal como se utiliza para las opciones de captura automática y las funciones de conversión de coordenadas. Se incluye como parte del nombre de la célula para cualquier imagen creada a partir de una captura automática de **sonda** y se guarda como metadatos en una lista de marcos de **ProbeAuto** y se muestra en la pantalla Frame View (Vista de marcos).
- **Área** Área de la célula en píxeles. Útil para determinar si se requiere un ajuste de área Mín o Máx en la plantilla de escaneado.
- **Círc.** Circularidad, una opción de clasificación para la captura automática de **la sonda** interfásica.



Vista de portaobjetos (Interfase)

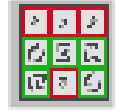
Al hacer clic en el icono **Slide (portaobjetos)** se sustituye la vista Navegador o Notas por un gráfico de portaobjetos que muestra el área de escaneado y la indicación de las células que se han identificado durante un escaneado.

Al ocultar o mostrar las diferentes banderas de miniaturas para el escaneado, las posiciones de las células se mostrarán como una superposición en el gráfico de portaobjetos.



Clasificadores de escaneado

El Software de Aplicación incluye clasificadores por defecto *FIMetaphase* y *FLInterphase* para muestras de fluorescencia.



Los clasificadores se asignan a una plantilla de escaneado para escaneados rutinarios, creando una lista de captura de las células marcadas en color verde.

- El sistema también permite en todo momento la aplicación de diferentes clasificadores en la pantalla Review (Revisión), independientemente del clasificador que se utilizara para el escaneado del original.
- Haga clic en Apply Classifier (Aplicar clasificador) de la barra de herramientas principal. Se muestra una lista de los clasificadores del usuario.
- Seleccione el clasificador que desee y haga clic en OK (Aceptar), las miniaturas de la pantalla Review (Revisión) se volverán a procesar con los nuevos parámetros del clasificador con la selección de marca de color verde automática de las células más adaptada a las imágenes que se utilizan en la preparación de clasificadores.
- De esta manera se puede volver a clasificar una lista de escaneado en cualquier momento sin necesidad de volver a escanear el portaobjetos. Esto resulta especialmente útil durante la preparación inicial en el sistema y la evaluación de un nuevo clasificador.

Normalmente no es necesario actualizar o preparar nuevos clasificadores para el escaneado FISH, aunque esto es opcional para probar o acomodar el rango esperado de variación de muestras encontrado durante la preparación de portaobjetos entre diferentes sitios de usuarios finales.

- Se recomienda añadir (**anexar**) al clasificador existente imágenes adicionales procedentes de escaneados realizados después de las instalaciones del sistema para optimizar aún más los clasificadores, o crear nuevos clasificadores utilizando únicamente datos de escaneado de muestra del usuario.
- Para las muestras de metafase FISH, esto acomodará el rango esperado encontrado de la variación de la muestra durante la preparación del portaobjetos de la en los distintos sitios de los usuarios finales.

Directrices para la formación y edición de clasificadores

Cuando «prepare» un clasificador a partir de una lista de portaobjetos (escaneado), todas las células que se encuentren en ese momento en las clases Verde o Blanco se colocarán en el clasificador seleccionado.



- asegúrese de que solo las células que desea y ha revisado están presentes en las banderas verde o blanca (añadir cero células como verdes o blancas está bien).
- Las células con bandera azul y roja de una lista de escaneo no se añaden a un clasificador, pero puede mover las células a azul o rojo durante la edición posterior del clasificador para evitar que se utilicen sus datos.
- Las células azules no son utilizadas por el procesamiento de la imagen, por lo que puede poner cualquier célula ahí y moverlas entre verde o blanco como parte de la prueba para ver los efectos.
- Una vez colocada una célula en la clase roja, se borrará si se guarda el clasificador (a menos que tenga el icono de una cámara, lo que indica que fue capturada automáticamente antes de ser añadida al clasificador).

Los ejemplos de células buenas (verdes) y malas (blancas) son necesarios para la precisión, cuando edite un clasificador compruebe que

- La bandera verde no contiene imágenes con agrupaciones de células o restos amplios o intensos.
- La bandera blanca contiene imágenes de «no células» (restos, marcas, intensidad de tinción atípica, cúmulos, artefactos, etc.).
- La clase blanca no contiene células «buenas».

Errores comunes en la preparación de clasificadores.

1. Durante la preparación del clasificador, todas las imágenes de bandera blanca no se pasaron primero a la clase de bandera azul (en espera) antes de la selección de células verdes y blancas específicas.
 - El clasificador tiene demasiadas células de bandera blanca, más del doble que de verde
 - El clasificador tiene metafases en la clase de bandera blanca.
2. Durante la preparación del clasificador sólo se tuvieron en cuenta las células buenas y no se añadieron células blancas
 - El clasificador solo tiene células de bandera verde, o más del doble de blancas.
3. Las células seleccionadas como «buenas» para la preparación no comprobaron los objetos no cromosómicos dentro del desplazamiento de la «caja de captura». Todo lo que se encuentre dentro del límite estará añadiendo sus mediciones a los datos de la célula y puede diluir los valores cromosómicos reales de los datos de la preparación.
 - La bandera verde contiene células de variación metafásica extrema.
 - La bandera verde contiene imágenes con núcleos grandes/oscuras dentro de la caja de captura.

Nota: Los clasificadores de metafase son más sensibles a estos problemas que los clasificadores de interfase.

Preparación (adición) de clasificadores

Para actualizar o crear un clasificador nuevo, utilice portaobjetos escaneados con células típicas par el tipo de muestra.



- Realice un escaneado con el clasificador **Everything** (Todo)
- Vaya a la pantalla **Review** (Revisión) y abra el proceso, que cargará la lista de metafases
- Elija **Select All** (Seleccionar todas) células y márkelas como **Nonspecific** (Sin especificar) (**marca de color azul**), de esta manera no añadirá células inadecuadas al clasificador por error.
- Seleccione 5-15 miniaturas de la calidad deseada (células «buenas») y **márquelas en color verde**. No añada más que estos de un portaobjetos, ya que puede sesgar artificialmente el clasificador.
- Seleccione un número de imágenes equivalente para utilizarlas como ejemplo de células "malas" en el clasificador y **márquelas con el color blanco (Unclassified [Sin clasificar])**. Deben ser miniaturas que no contengan restos grandes/intensos ni células buenas.
- Confirme que solo las células que ha elegido se encuentran en cada una de las clases de marcado verde o blanco.
- Haga clic en **Train** (preparar) (icono **Table** [tabla]);
 - Para crear un nuevo clasificador seleccione **New** (Nuevo) e introduzca un nombre para el clasificador en el campo **Current selection** (Selección actual).
 - Para **actualizar** un clasificador actual seleccione **Existing (existente)** y **Append (Anexo)** para pasar las nuevas células a un clasificador actual (no **sobrescriba** a menos que desee reemplazar completamente los datos del clasificador antiguo mientras conserva su nombre).

- Haga clic en **OK** (Aceptar). Se crea el clasificador y la vista vuelve a la lista de miniaturas para la lista de escaneado cargada.
- Repita hasta que haya 100-200 células de color verde y blanco para la operación de clasificación rutinaria para cada tipo distinto de tipo de muestra.

Edición de clasificadores



Un clasificador es realmente una lista de escaneado para varios casos, contiene todas las imágenes marcadas en color verde y blanco que se utilizaron para crearlo y actualizarlo. Es posible revisar y modificar el contenido del clasificador para asegurarse de que se ha usado el número y la calidad correctos de imágenes.

- Haga clic en el icono **Edit** (Editar)
- Seleccione el clasificador deseado y se activarán los botones **Delete** (Eliminar) y **OK** (Aceptar).
- (Al seleccionar la opción **Delete** (Eliminar) aparecerá un mensaje de confirmación, esta opción eliminará permanentemente el clasificador y todos sus datos).
- Seleccione **OK** para cargar las miniaturas de la imagen del clasificador (si tiene una lista de portaobjetos activa abierta se le pedirá que la guarde para ver las imágenes del clasificador).
- Revise o modifique las imágenes en miniatura según sea necesario
- Seleccione **Save** (Guardar) para cerrar la visualización en miniatura y guardar cualquier cambio

El clasificador puede ser modificado de la misma manera que cualquier *Lista de escaneado*, las células pueden ser reclasificadas para cualquiera de las 4 clases de color,

- Solo se utilizan las categorías de bandera Verde y Blanca para los parámetros del clasificador.
- La clase bandera azul estará disponible para futuras ediciones, pero no se utilizarán en el funcionamiento del clasificador.
- Las células marcadas en rojo (excepto las que se hayan registrado como autocapturadas) se borrarán permanentemente al guardarlas.

Ordenación Más cercana para la captura automática

La ordenación de células en un clasificador permite utilizar la opción de ordenación *Nearest Neighbour* (Vecino más próximo) de la plantilla de portaobjetos.

- Para su uso con muestras en metafase, consulte el **manual de instrucciones del cariotipador CytoVision DX**.

Captura automática

Para obtener información sobre la configuración de la cámara y la captura, consulte la sección [Captura FISH \(Manual\)](#)

Captura automática



La captura automática se inicia tras el escaneado 10x y la clasificación de células.

- Las células clasificadas (bandera verde) se mapean en el área de exploración y luego se utilizan para calcular qué células capturar (modo **Sonda**) o para seleccionar las áreas (fotogramas) que contienen las células para su captura (modos **ProbeAuto** y **SpotCounting** [recuento de puntos]).

- La aplicación cambia automáticamente a la pantalla de captura, se reubica en la primera célula o fotograma e inicia el proceso de captura, mostrando un panel de progreso de la captura automática.
- Una vez capturado el número correcto de células, el sistema pasará al siguiente portaobjetos.
- Se puede utilizar un botón de **pausa** en el panel de progreso de la captura automática para permitir la interacción manual con los ajustes de la cámara o del filtro (normalmente no es necesario).
- Si está en pausa, se puede utilizar el botón **Next** (Siguiente) (portaobjetos) si no es necesario seguir capturando en la diapositiva actual, o el botón **Stop** (lote) para omitir todas los portaobjetos restantes.

Opciones de captura automática

El modo de captura automática de **la sonda** está vinculado a las opciones de una Plantilla personalizada (**Opciones de captura posterior**). Las reglas de captura habituales son:

- Configuración automática de la cámara
- Umbral automático
- Umbral cero
- Extender contraste
- Guardar imagen sin procesar



Captura diferida manual

Cualquier portaobjetos que tenga una *Lista de Escaneado* puede ser capturada automáticamente iniciando una captura diferida manual;

- Abra la ventana de configuración del escaneado y asigne el nombre del proceso para el portaobjetos.
- Haga clic en la flecha de selección de la captura diferida.
- La sección **Capture** (Captura) mostrará qué portaobjetos en el proceso tiene una lista de escaneado que puede seleccionarse para la captura automática.
 - Seleccione la lista correcta del portaobjetos en el GSL.
- (Opcional) haga clic en **Set Offset** (Ajustar compensación) para cargar la bandeja y ajustar una compensación manual para las células con aumentos pequeños que se van a mostrar. Una vez ajustado, cierre la ventana.
- Haga clic en **Scan** (Escaneado) para iniciar el proceso de captura como se indica anteriormente.

NOTA: Tenga en cuenta que los portaobjetos que se han eliminado de la platina después del escaneado necesitarán un **ajuste de compensación**, ya que es muy poco probable que el portaobjetos esté en la misma posición de la bandeja que cuando se escaneó.

- La «captura diferida manual» no es un procedimiento pensado para varios portaobjetos a la vez ni para ningún uso rutinario del flujo de trabajo de muestras fluorescentes.

Captura de la sonda (imágenes de células)



La pantalla de captura manual estándar contiene herramientas para interactuar con el hardware de la cámara y el microscopio motorizado para ver y capturar una imagen de sonda en una carpeta de la célula en el navegador.

En un sistema GSL es necesario utilizar el flujo de trabajo de captura estándar manual para confirmar la respuesta del hardware, configurar los ajustes de software óptimos para la calidad de imagen y crear y guardar las "Opciones de postcaptura" (plantillas de personalización de captura) que se utilizan en la captura automática.

La pantalla de captura tomará por defecto el último modo de captura seleccionado en el arranque; para comprobar o cambiar esta opción utilice el botón **Capture Mode** (Modo de captura).

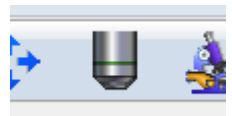


- **Sonda:** para la configuración, comprobación y captura manual de imágenes de portaobjetos teñidos de fluorescencia en metafase, interfase o material celular con uno o más canales de sonda de ADN.
- **Recuento de puntos:** para la captura de imágenes de metafase teñida de fluorescencia, interfase o material celular con uno o más canales de sonda de ADN. Las imágenes se guardan como una lista de marcos con procesamiento de imágenes automatizado mediante un ensayo de puntos.
- **M-FISH:** para la captura manual de células metafásicas en portaobjetos teñidos con fluorescencia con múltiples canales de sondas de ADN en una combinación específica de cromosomas para el análisis del cariotipado.

Los sistemas *CytoVision DX* utilizan una cámara monocroma para capturar las imágenes. Para crear la visualización de la imagen de la sonda en color, es necesario capturar los fluorocromos individuales del portaobjetos, pseudocolorearlos y superponerlos, produciendo una imagen compuesta multicanal en color.

- Cada canal fluorocromático separado necesita tener valores preestablecidos para el color y el filtro del microscopio que se establece y guarda a través del panel de *selección de fluorocromos*.

Control del objetivo



En la captura manual, la aplicación utiliza la posición de la lente del objetivo del microscopio del panel "Objetivos" para actualizar el aumento.

Cuando la aplicación se inicia, pasará por defecto a la lente configurada en la posición 1. En los microscopios motorizados, se trata del objetivo de 10 aumentos

- Si se utiliza el panel táctil LCD del microscopio para cambiar las lentes de los objetivos, el software no identificará que el aumento ha cambiado y seguirá utilizando el valor de la posición 1.
- Para cualquier trabajo de captura manual, también/solo debe cambiar el objetivo utilizando el panel Objectives (*Objetivos*) antes de la captura. Para que no se malinterprete este valor.
- Aparecerá un mensaje de advertencia en pantalla si al iniciar el procedimiento de captura se sigue ajustando un aumento de objetivo inesperado.

Captura de la sonda: Descripción general del procedimiento:

- **Nueva célula.** Crea una celda vacía en el **Navegador** lista para su captura
- **En vivo.** Muestra la imagen de la cámara en la ventana visualización principal.
 - se desplaza automáticamente al filtro del microscopio para el fluorocromo seleccionado
 - activa el obturador de fluorescencia para iluminar el portaobjetos
- **Captura.** Adquiere la imagen en vivo y la envía para [Modificar el opcional umbral opcional](#).

1. Elija el caso y el portaobjetos en el navegador y haga clic en **New Cell** (Nueva célula).
2. Cree o cargue una **Lista de Fluorocromos** preguardada apropiada para la muestra.
3. Localice un área de muestra en el portaobjetos del microscopio y haga clic en **Live** (En vivo)
4. Ajuste la configuración de la cámara (Auto setup), compruebe la visualización de la imagen y **captúrela**.
5. (Opcional) **Threshold (Umbral)** para eliminar el fondo oscuro alrededor de los objetos de la imagen.
6. Pulse **Live** (en vivo) para el siguiente canal fluorocromo del portaobjetos.
7. Ajuste la configuración de la cámara (Auto setup [configuración automática]), compruebe la visualización de la imagen y **captúrela**.
8. Repita la operación para los canales de fluorocromo restantes.
9. Haga clic en **New Cell** (**Nueva célula**) para la siguiente imagen.

No...

- ... mueva la lente del objetivo a mano sin utilizar el panel **Objectives (Objetivos)** para confirmar el aumento correcto de la lente de captura.
- ... ajuste manualmente la exposición, deje que el sistema lo calcule con **Auto Setup** (Configuración automática).
- ... mueva la platina o enfoque antes de completar todos los canales de la *Lista de Fluorocromos*.

Controles de captura

La imagen en vivo se mostrará en la ventana visualización principal de la pantalla de captura. Debajo de esta imagen se encuentran los controles de captura

- Cuando se selecciona el modo de captura con sonda, se abre el panel de selección de **fluorocromos** para seleccionar o crear listas de captura.
- Para cada fluorocromo, el panel **Capture Setup (configuración de captura)** permite acceder a los controles de la cámara, el filtro y la lámpara fluorescente.

Nueva célula + En vivo

El botón **New Cell (Nueva célula)** crea una nueva carpeta en el maletín donde se guardará la imagen. Una vez localizada una imagen, el botón **Live** (en vivo) muestra la vista de la cámara en la ventana principal utilizando los ajustes configurados de filtro de microscopio y lámpara fluorescente/obturador.

- Si es necesario, desplace la platina del microscopio para colocar la muestra en el centro de la ventana principal y garantizar el centrado de la imagen.

Configuración automática de la cámara

La captura rutinaria debe realizarse utilizando la **configuración automática** de la cámara para optimizar la exposición de la cámara y el rango de contraste mostrado en la imagen.

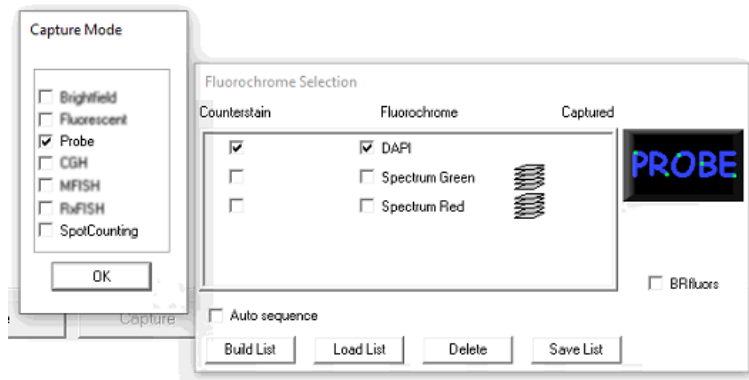
- Los valores finales de la imagen se basarán en la intensidad de fluorescencia, determinada por la calidad de la muestra, el tipo de filtro y la fuente de luz fluorescente.
- Cualquier lavado de color rojo y azul que se vea en la imagen indica saturación de color. Para la captura FISH la recomendación es tener un poco de saturación roja en el material de la muestra (contratinción o señales) con el fondo oscuro o con solo una pequeña cantidad de saturación azul. para mejorar el contraste.
- La cantidad de saturación de rojo/azul en la imagen en vivo se modifica utilizando el panel **Autosettings (Autoajustes)** en Configuración de captura.

Para la activación manual, pulse la casilla de verificación situada junto a la barra de contraste o use la función “Personalizar” de la **configuración automática de la cámara**, que inicia los ajustes de la cámara al pulsar el botón **En vivo**.

- Cualquier valor de las **Configuraciones automáticas** se aplicará inmediatamente.
- La **configuración automática** fallará si la luz de fluorescencia está apagada o ajustada a una intensidad muy baja.
- La **configuración automática** puede fallar si la señal de fluorescencia de la muestra tiene baja intensidad o contraste.

Lista de capturas

El modo de captura de sonda abrirá un panel de **selección de fluorocromos** utilizado en la configuración y captura.

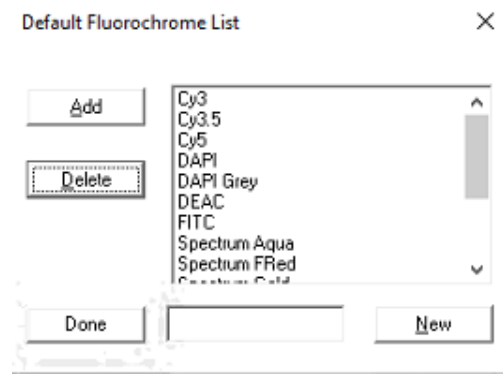


Aquí puede crear una lista de los fluorocromos del portaobjetos y seleccionar la contratinción (*por ejemplo*, DAPI) que requiere la aplicación durante el proceso de captura y para el trabajo de análisis posterior.

Para añadir nuevos fluorocromos a la lista de captura seleccione el comando **Build List** (crear una lista). Aparecerá un menú con una lista de fluorocromos disponibles y preprogramados.

Haga clic en los que desee para su Lista de Captura y seleccione **Add (Añadir)** para cada uno de ellos.

- Construya la lista en el orden en que desea capturar la célula, con la contratinción en primer lugar.
- Marque la casilla correspondiente a la **contratinción** correcta.
- Para cada nombre de fluorocromo compruebe y modifique los ajustes según sea necesario a través del panel *Capture and Fluorochrome Setup* (configuración de captura y fluorocromo).
- Utilice **Save List (Guardar lista)** para crear una *Lista de fluorocromos* que pueda vincularse a una plantilla de exploración para los modos de captura **Probe (Sonda)** y **ProbeAuto**.



Nota: Si desea conservar los valores de configuración ajustados, deberá **guardar la lista** después de realizar los ajustes.

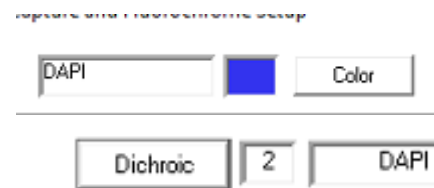
Captura y configuración de fluorocromos



La configuración de captura abre una ventana de control de la cámara y del hardware.

Haga clic en la casilla *Advanced* (Avanzado) para acceder a las posiciones del filtro dicróico y a los controles avanzados de la cámara para modificar la configuración.

- **Color:** Establece el color de superposición para el fluorocromo utilizado en la captura.
- **Dicróico:** Configura el filtro del microscopio utilizado durante la captura del fluorocromo.



Ambos deben configurarse y guardarse utilizando la opción *Save as Default* (Guardar como predeterminado) antes de cualquier operación de captura manual o automática para cada fluorocromo que se vaya a utilizar en una lista de captura o ensayo de puntos.

Portaobjetos de la cámara

La ganancia, el desplazamiento y la exposición se ajustan automáticamente mediante la **configuración automática** o pueden visualizarse y modificarse manualmente mediante las 3 barras deslizantes.



El ajuste manual de los controles deslizantes (a través de la ventana **Capture Setup** [Configuración de la captura]) no es necesario, a menos que falle **Auto Setup** (Configuración automática) o la imagen contenga muchos objetos de fondo que puedan alejar el contraste de las células o las señales.

Brillo (ganancia de la cámara).

- En caso de que sea necesaria más (o menos) saturación de color rojo en una única imagen, se puede ajustar manualmente el control deslizante de brillo.

- Cualquier color rojo en la imagen en vivo se mostrará como blanco en la imagen capturada antes de la aplicación del pseudocolor.
- La saturación en rojo de las señales de la sonda puede dar lugar a una presentación de color mejorada y más "intensa", lo que resulta útil para la presentación visual de la señal.
- Una saturación excesiva provocará la pérdida de cualquier información relativa o cuantitativa que sea útil para un análisis posterior (como el bandeo DAPI en cromosomas metafásicos).

Negro (desplazamiento de la cámara).

- En caso de que sea necesaria más (o menos) saturación de color azul en una única imagen, se puede ajustar manualmente el control deslizante del negro.
- Cualquier color azul en la imagen en vivo se mostrará como negro sólido en la imagen capturada.
- La saturación azul en el fondo oscuro de la imagen mejorará el contraste final de la imagen, pero no debe extenderse a toda la imagen.

Exposición (integración de la cámara).

- No se recomienda el ajuste manual de la barra deslizante de exposición para la captura rutinaria, debe utilizarse siempre la **configuración automática** para lograr la mejor exposición.
- Para las muestras fluorescentes la exposición máxima depende de la intensidad pero siempre debe ser 0,005 como mínimo (5ms).

Auto-settings (Configuraciones automáticas)

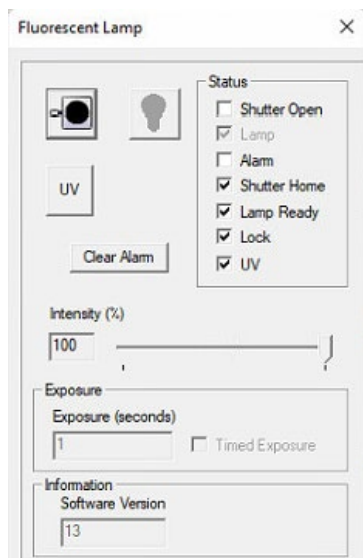
Auto-settings (Configuraciones automáticas) modifica los resultados de la **configuración automática** de la cámara para exagerar la cantidad de saturación de color azul o rojo en la imagen en vivo definitiva. Los canales fluorocromáticos individuales pueden ajustarse por separado según sea necesario.

Para mejorar la visualización de la intensidad de las imágenes FISH se sugieren los siguientes valores;

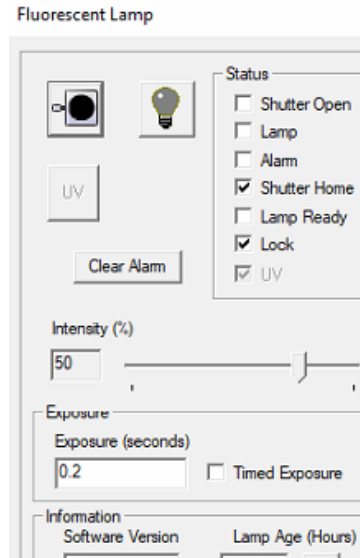
- Ajuste el valor máximo (rojo) a **(+) 3- 5**, para aumentar la intensidad de la señal.
- Ajuste el valor Mín (azul) a **(+) 0,5**, oscureciendo el ruido de fondo.

Configuración de la lámpara fluorescente

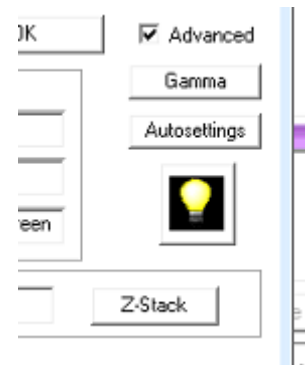
El panel de control de la lámpara fluorescente Xylis/X-Cite puede abrirse haciendo clic en el icono de la lámpara en el panel de configuración de captura (el conmutador "Avanzado" debe estar activo para verlo).



Xylis LED



XCite PC120



El panel de lámpara fluorescente puede utilizarse para comprobar el funcionamiento de la lámpara durante un procedimiento de captura manual.

- El botón Obturador de este panel funciona como una palanca para abrir y cerrar el obturador.
- Los controles de exposición muestran la intensidad de la lámpara y los tiempos de exposición.
 - se suele utilizar al 100 % de intensidad para los trabajos rutinarios de exploración y captura de FISH
- Las casillas de *estado* muestran en qué estado se encuentran las distintas partes de la lámpara.

Los sistemas que utilizan una unidad XCite PC 120 también disponen de control de lámparas;

- El botón de la lámpara activa y desactiva la lámpara.
- El icono es amarillo cuando la lámpara está encendida y lista para su uso.
- Cuando el icono está en gris, la lámpara está apagada y en "espera" (se mostrará como "bombilla" en el panel LCD de la parte frontal del controlador de la lámpara). Se activará automáticamente durante una exploración, pero deberá encenderse manualmente para utilizarlo en la pantalla de captura.

Si está ejecutando un lote desatendido de escaneo de portaobjetos FISH y captura automática, puede configurar la aplicación para que apague la lámpara X-Cite automáticamente al final del lote;

- Vaya a la pantalla **Scan (Escaneado)** y seleccione el menú Utilities (funciones).
- La información mostrará la configuración actual del sistema: "Dejar la lámpara fluorescente encendida después del lote" o "Apagar la lámpara fluorescente después del lote"
- Si hace clic en el texto, cambiará a la configuración alternativa (que se mostrará a continuación).

Pila Z

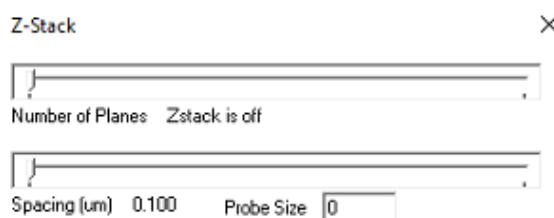
Pila Z se utiliza para capturar señales de sonda en diferentes planos focales.

Durante la captura, el punto de enfoque de la contratinción (DAPI) se utiliza como centro del rango focal para cada captura de fluorocromos, y el motor de enfoque mueve la distancia de separación entre cada pila.

- La imagen final se guarda con las pilas fusionadas como una sola capa **Proyección máxima**.
- No es posible revisar las imágenes individuales de la pila después de la captura. Si esto es necesario, las imágenes FISH deben ser capturadas en una Framelist utilizando Spot Counting (Recuento de puntos) o *Image Frame Probe Capture* (captura de la sonda de marco de imagen) manual para su visualización utilizando un software de análisis de imagen independiente compatible con el formato "framelist".

Para configurar un fluorocromo para la captura de pila Z, haga clic en **Z-Stack** (pila Z) en el cuadro de diálogo *Capture and Fluorochrome Setup* (Captura y configuración de fluorocromos).

- Se abrirá el cuadro de diálogo Z-Stack (pila Z).
- Elija el **Número de planos** y la **separación** entre ellos. La separación se indica en micrómetros con incrementos de 0,1 μm .
- Para eliminar la pila Z, ajuste el **número de planos** a 0 (pila Z estará desactivado).
- Haga clic en **Aceptar** para finalizar.



Nota: Para la captura manual de Spot Counting (recuento de puntos), los ajustes de la pila Z se crean a partir de los ajustes del ensayo de puntos configurados por separado.

Customize Capture



Una vez comprendido el proceso de captura básica posible utilizar las opciones **Customize** (Personalizar) para modificar cuánto debe interactuar el usuario.

Opciones de captura rutinarias de la sonda:

Ajustes recomendados;

- **Configuración automática de la cámara:** inicia la **configuración automática** de la cámara cuando se selecciona el botón Live (en vivo).
- **Umbral automático:** omite el umbral manual (eliminación del fondo) y utiliza los ajustes de **umbral cero** o **predecible**.
- Esta opción debe estar activada para las plantillas guardadas utilizadas en la captura automática de **la sonda** GSL y utilizadas junto con **Guardar imagen sin procesar**.
- **Umbral cero:** No elimina el fondo de la imagen alrededor de los datos de la imagen en vivo, creando una imagen de bloque único. Esto se aplica automáticamente si se utiliza **Auto-Threshold** (umbral automático) y es óptimo para la captura rápida de FISH interfásico.
- **Corte de fondo de la sonda:** mejora la visualización de las señales FISH interfásicas contra el fondo.
- **Extender contraste:** normaliza la imagen después de modificar el umbral para mejorar la visualización. Debe utilizarse siempre en las imágenes en las que se utilice la función

Thresholding (modificación del umbral), para evitar que los bordes de los objetos restantes aparezcan intensos de una forma artificial.

- **Guardar imagen sin procesar:** crea un archivo de imagen independiente para cada canal fluorescente capturado.

La imagen sin procesar no tiene eliminación de fondo ni mejoras y se puede «Volver a capturar» utilizando el icono Umbral de la barra de herramientas principal.

- Esta modificación del umbral puede ser útil para imágenes de metafase o interfase en las que desee separar objetos individuales para una mejora específica de la imagen o para copiarlos en una pantalla flexible, o para realizar un cariotipo de sonda.

- Se recomienda guardar la imagen sin procesar para la captura de **la sonda**, especialmente si se utiliza **el umbral automático**.

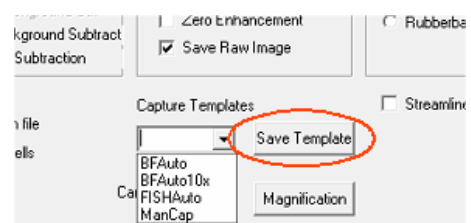
- El acceso a los datos de imagen sin procesar también puede ser un requisito del laboratorio local.

Configuraciones opcionales;

- **Secuencia automática:** Tras la captura de la imagen de la contratinción (DAPI), la captura procede sin necesidad de pulsar "Live» (en vivo) o "Capture" (captura) para los canales de sonda restantes.
- **Predecir umbral:** Calcula un umbral apropiado para eliminar el fondo alrededor de los objetos de la imagen. Esto se aplica automáticamente si se utiliza **Auto-Threshold** (umbral automático) y es óptimo para cromosomas metafásicos en los que se requiere un cariotipado con sonda.
- **Imágenes de registro automático:** Captura las imágenes de la sonda con un desplazamiento X/Y ajustable en comparación con la imagen DAPI (contratinción), para compensar cualquier desplazamiento óptico o de filtro.
- No se espera que se utilice a menos que haya un problema óptico con un cubo de filtros o con la alineación de la trayectoria de la luz del microscopio.
- **Desplazamiento de enfoque automático:** cuando está activado, los movimientos de enfoque que realice con la barra deslizante de enfoque durante una captura manual se registran en relación con la contratinción y se aplican automáticamente a las capturas posteriores. Los desplazamientos se guardan en la lista de fluorocromos
Nota: No se utiliza en la captura automática de Spot Counting (recuento de puntos) como parte de una plantilla de escaneado.

Los mejores ajustes dependerán del tipo de muestra de la preparación. Utilice el botón **Save Template** (Guardar plantilla) para asignar nombres rutinarios a los ajustes;

- En los sistema de escaneado GSL se utilizan como **Opciones tras la captura** durante la captura automática de la sonda.



Aumento

Los ajustes de **Ampliación** son necesarios para crear un factor de escala de imagen preciso durante la captura.

- **Objetivo de captura** utiliza la posición del objetivo del microscopio (para la captura se espera que sea 63x).
- El valor **C-Mount** debe ajustarse para el conector C-mount de la cámara (1x por defecto).

En combinación, estos 2 valores calculan un escalado de objeto y una resolución de visualización, utilizados para calcular los tamaños de objeto utilizados en el cariotipo metafásico FISH, y los tamaños de señal de *framelist*.



La captura manual utiliza la posición de la lente del objetivo del microscopio que se establece en el panel "**Objetivos**" para actualizar el aumento.

- Esto se establece en la aplicación **Microscope Calibration** (Calibración del Microscopio), en el módulo "Objetivos".
- Los microscopios con revólver portaobjetivos motorizado deben estar configurados para todas las posiciones físicas disponibles para el microscopio. (De serie en los sistemas GSL).

Los valores incorrectos provocarán errores en la clasificación del cariograma o en la visualización del tamaño de la señal;

Si se intenta la captura manual utilizando un objetivo de captura de bajo aumento, aparecerá un mensaje de advertencia al pulsar el botón **Live** (en vivo)- seleccione "Continuar" y cambie al objetivo correcto utilizando los controles del software antes de pulsar **Capture** (**Capturar**).

Estos errores pueden producirse al mover la lente del microscopio **objetivo** manualmente (o mediante el panel táctil LCD) sin utilizar el control del de la aplicación para volver a ajustar el aumento correcto.

- Cuando la aplicación se inicia, pasará por defecto a la lente configurada en la posición 1.
- Si se utiliza el panel táctil LCD del microscopio para cambiar las lentes de los objetivos, el software no identificará que el aumento ha cambiado y seguirá utilizando el valor de la posición 1.
- Para cualquier trabajo de captura manual, también/solo debe cambiar el objetivo utilizando el panel Objectives (**Objetivos**) antes de la captura. Para que no se malinterprete este valor.

Nota: La posición correcta del objetivo se ajustará automáticamente como parte de la Captura Automática GSL y la escala del objeto se calcula utilizando el componente "Escala de Imagen" de la **Calibración Espacial** para la lente objetivo seleccionada.

Modificación del umbral

El umbral es opcional para la captura de sonda (y está desactivado en la captura puntual y M-FISH).

- Se puede volver a modificar el umbral de las imágenes sin procesar después de la captura para actualizar la imagen de la sonda.
- Si la opción **Umbral automático** no está activa en la configuración **Customize** (Personalizar), la ventana Umbral aparecerá cuando se vaya a utilizar la opción **Captura**.

El umbral de las imágenes de la sonda es similar al umbral de las metafases de campo claro. La diferencia es que al modificar el umbral de las sondas, a cualquier área no cubierta por la máscara azul se le aplicará el color elegido para ese fluorocromo.

Unos valores de umbral poco precisos pueden dar lugar a señales irregulares de gran tamaño. El ruido de fondo y los residuos también pueden dificultar la modificación del umbral, por lo que existen herramientas adicionales para esto en la captura de sonda.

- **La máscara de contratinción** elimina todas las partes de la imagen que no contienen contratinción. Es una buena herramienta si hay mucho ruido de fondo.
- **La región de interés** permite definir una o más áreas para el umbral. Es una buena herramienta para aislar pequeñas señales de artefactos o residuos.

Nota: No se espera que las mejoras de captura se utilicen en la captura manual de imágenes de sonda, a menos que se trate de imágenes de metafase en las que el bandeado DAPI sea útil para la interpretación de imágenes o el cariotipado.

- Para más detalles sobre las opciones estándar de modificación del umbral manual, consulte el manual de **instrucciones de funcionamiento del cariotipador** y revise la ayuda de la aplicación.

Modificación del umbral automático

Si la opción **Auto-Threshold (umbral automático)** no está activa en la configuración Customize (Personalizar), la ventana Threshold (umbral) aparecerá cuando la imagen en vivo se capture. Esta es la operación esperada en un sistema de escaneado GSL.

- El sistema utiliza el valor del **Umbral de Predicción** o **Umbral cero** para eliminar el fondo. Esto suele funcionar para imágenes de fluorescencia con poco fondo de portaobjetos.
- Las mejoras se aplican utilizando los ajustes de la Plantilla de Captura guardada o puede desactivar las mejoras de la captura utilizando la opción **Zero Enhancements (Cero Mejoras)** en Customize Capture (Personalizar Captura).
- La imagen metafásica se guardará y se mostrará en el navegador.
- Si es necesario, se puede utilizar una imagen sin procesar guardada para volver a modificar el umbral manualmente.

Volver a modificar el umbral de una imagen sin procesar



Las imágenes en bruto pueden volver a procesarse para actualizar la imagen de la sonda si el umbral original no era óptimo.

Esto puede ser útil si se utilizó **el Umbral Cero** en la captura original para crear posteriormente objetos para la mejora, el cariotipado o la copia en una pantalla flexible.

- Cargue la imagen sin procesar a la ventana principal de la pantalla Capture (Captura).
- Haga clic en el icono **Threshold (Umbral)** del centro de la barra de herramientas principal.
- Modifique manualmente el umbral de la imagen. Cuando acabe, la imagen desaparecerá de la ventana principal.

Captura de la sonda (Framelist)

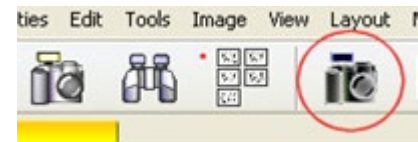


Image Frame Probe Capture (captura de la sonda de marco de la imagen) es una opción de captura de imagen FISH única diseñada para el uso de captura manual con filtro dicróico motorizado y control de enfoque del microscopio.

Se trata de un procedimiento interactivo sin ajustes ni archivos de configuración que utiliza un sistema de escaneado como parte de la captura automática.

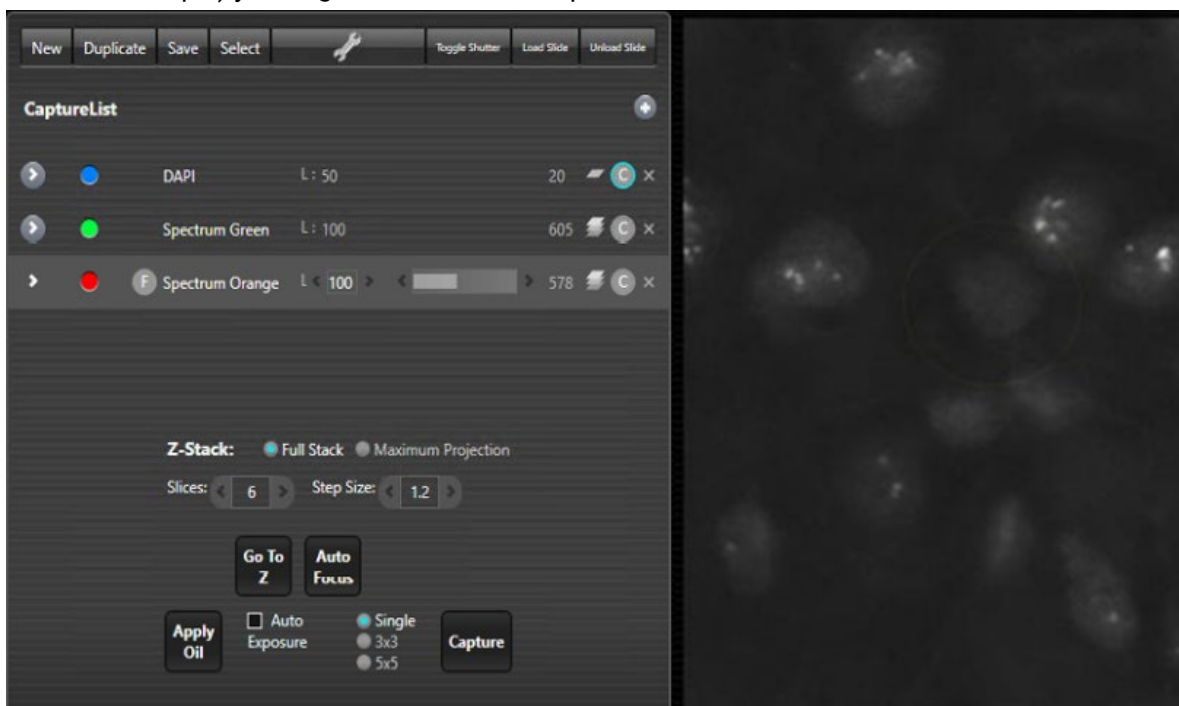
La captura manual *Framelist* puede utilizarse para capturar rápidamente un área localizada manualmente de un portaobjetos para obtener un pequeño número de imágenes *framelist*.

Abra un caso y haga clic en el icono Manual Probe Capture (Captura manual de la sonda) en la barra de herramientas principal de la pantalla Aplicación (Análisis).



El diseño de la pantalla **de Captura de Sonda** consiste en una ventana de Imagen en Directo a la derecha.

- La imagen siempre es "En vivo" utilizando la exposición de la cámara del nombre del fluorocromo seleccionado en la lista.
- Los controles de la izquierda permiten interactuar con el microscopio (obturador y enfoque) y configurar una lista de captura.



Una vez que utilice Probe Capture (captura de la sonda), verá los portaobjetos de su caso en la parte superior de la pantalla.

- Puede añadir portaobjetos utilizando el botón New Slide (Nuevo portaobjetos) situado en la parte superior derecha de la ventana.
- Añada canales, configure los ajustes de filtro, color y pila Z, y guarde las listas de captura.
- Captura imágenes con ajuste manual o automático de la exposición de la cámara.

- Captura un solo fotograma o rejillas rectangulares mayores de 9 o 25 fotogramas (movimiento escénico GSL).
- Varias imágenes capturadas se asocian a una sola diapositiva.

Control del objetivo

Cuando la aplicación se inicia, pasará por defecto a la lente configurada en la posición 1. En los microscopios motorizados, se trata del objetivo de 10 aumentos.

- Si se utiliza el panel táctil LCD del microscopio para cambiar las lentes de los objetivos, el software no identificará que el aumento ha cambiado y seguirá utilizando el valor de la posición 1.
- Para cualquier trabajo de captura manual solamente se debe cambiar la lente del objetivo a través de la interfaz del software antes de la captura. Esto evitará que este valor se malinterprete.

La captura manual de Framelist tiene un conjunto de controles de hardware diferente al de la pantalla de captura estándar, como se describe a continuación.

- El teclado se utiliza para cambiar entre las lentes de los objetivos del microscopio mediante las teclas de función (F).
- Para ver (u ocultar) todos los atajos y ajustes de tamaño de paso disponibles, pulse «**F10**».

Captura Framelist: Descripción general del procedimiento:

- **Constructor de imagen en vivo** Imagen de la cámara «siempre encendida» en la ventana de visualización principal.
- los canales, los ajustes y las opciones de captura pueden revisarse o modificarse antes de la captura.
 - **Captura.** Inicia una captura automática unicelular completa de todos los canales utilizando cada uno de sus ajustes de lista de captura. Adquiere las imágenes en vivo y las guarda en la lista de portaobjetos del **Navegador**.
1. Elija el caso y el portaobjetos en el navegador y haga clic en **Probe Capture** (Captura de la sonda).
 2. Cree o **Selecione** una **Lista de capturar** preguardada apropiada para la muestra.
 3. Haga clic en el canal de contratinción en la lista de captura (activando el filtro/obturador fluorescente).
 4. Localice un área de muestra en la platina del microscopio y sitúela y enfóquela en la ventana de visualización.
 5. Haga clic en **Capture** (Captura) para iniciar el proceso de captura.
- si "Exposición automática" está activada, la configuración automática de la cámara se realiza para cada canal.
- si "Exposición automática" está desactivada, los canales se capturan utilizando los valores de exposición fijos de la lista de captura.
 6. Para cada canal se visualiza un estado que muestra cualquier operación de exposición y de pila Z.
 7. Debajo del panel de captura aparece una miniatura de la imagen en color.
 8. Repita el proceso para el resto de las imágenes.

Evite

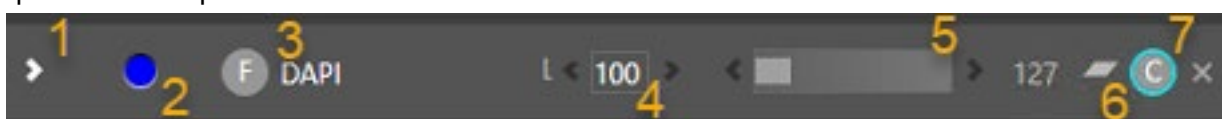
- ... desplazarse manualmente entre los objetivos de bajo y alto aumento. Utilice los controles del teclado (F1 - F7) para cambiar los objetivos y confirmar el aumento correcto de la lente de captura
- ... mover la platina o enfocar manualmente durante la captura.

Opciones de configuración de captura

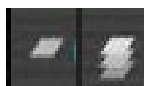
Es necesario añadir al menos un canal en la pantalla para poder acceder a los controles de captura.

Añadir canales

El botón "+" añade un canal a su lista de captura actual, la colección de canales fluorocromáticos que se van a capturar en ese momento.



1. Seleccionar canal (>)
2. Configurar el color del canal
3. Configurar filtro de canal (F)
4. Intensidad de la lámpara fluorescente (L : Xylis/XCite)
5. Exposición de la cámara (ajuste manual)
6. Indicador de pila Z
7. Indicador de contratinción (C)



Configuración de los canales

(2) Color de la pantalla del canal

Cada canal capturado tiene un color de visualización, que se muestra hacia la izquierda de la línea del canal. Es el color que se utilizará para el canal cuando se vea la imagen completa.



El color puede cambiarse haciendo clic en el círculo de color, lo que abre un panel de cuadrícula de **Colores básicos** y la posibilidad de definir cualquier color de visualización que se desee.

(3) Filtros del microscopio

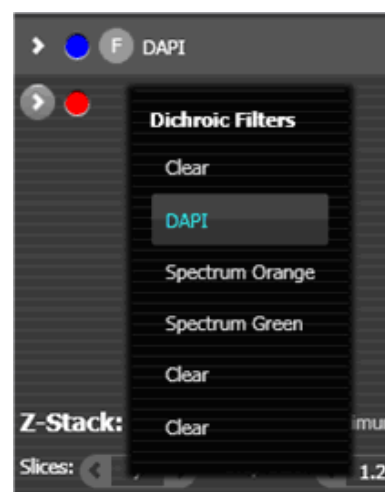
Una vez seleccionado un Canal, aparece un botón de filtro, representado con una "F", justo antes del nombre de este. Al hacer clic en este botón se mostrarán los filtros configurados para su microscopio.



Solo se puede utilizar un filtro o combinación configurada para cada canal fluorocromático; una vez seleccionado un filtro éste desaparece de la siguiente lista de selección.

Nota: El nombre del canal se toma de las ruedas de filtros configuradas en el sistema.

- Si utiliza dos filtros, por ejemplo, un filtro dicroico y un filtro de excitación, se presentarán ambas opciones.
- Si los filtros disponibles parecen incorrectos, compruebe la configuración en la aplicación **Calibración del Microscopio**.



(4) Intensidad de la lámpara

Los sistemas con lámpara fluorescente Xylis o X-Cite presentarán un ajuste de intensidad para modificar la intensidad de la lámpara utilizada para cada canal durante la captura.

- Para la captura rutinaria de canales de sonda, lo normal sería un 100 %.
- Si la contratinción es muy brillante, el uso de una intensidad más baja puede permitir una mejor visualización del contraste.
- Una intensidad más baja también puede reducir el fotoblanqueo rápido si la contratinción o el antidifuminado del portaobjetos no es estable.

(5) Exposición de la cámara

Cada canal tiene su propio valor de exposición (en milisegundos) que se muestra a la derecha del nombre del canal y que controla la cantidad de integración de la cámara utilizada.

- Cuando se selecciona un canal, aparece una barra deslizante de exposición que puede ajustarse arrastrando con el botón izquierdo del ratón dentro de la barra o haciendo clic en las flechas situadas a ambos lados.



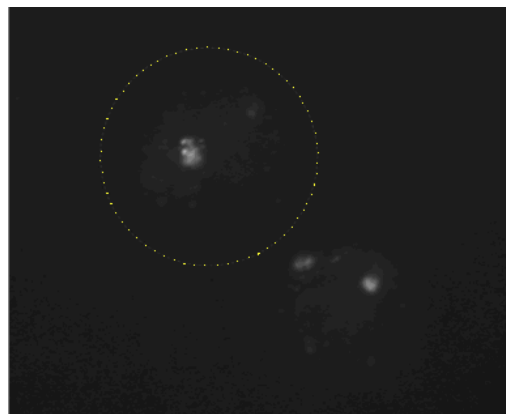
Si el obturador fluorescente está abierto, la imagen en directo se muestra en la pantalla y se pueden ver directamente los efectos del ajuste de la exposición.

También puede hacer clic en la imagen en directo directamente con el ratón. Esto establece un "círculo objetivo" en la imagen, y la autoexposición de la cámara se calcula solo en este área.

- Se muestra como un círculo de puntos en la imagen.

Esto le permite orientar la configuración automática, utilizando un área de la imagen que incluya material interesante y evitando áreas que puedan incluir artefactos brillantes que interfieran con los cálculos de exposición.

- Vuelva a **hacer clic con el botón izquierdo del ratón** sobre la imagen en un área diferente para aplicar un círculo de configuración automática distinto.
- **Haga clic con el botón derecho del ratón** en la imagen para cancelar una configuración automática o para anular la selección de un círculo de destino.

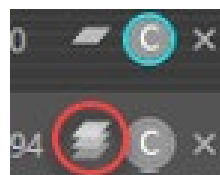


(6) Captura de pila Z

La pila Z es la captura de múltiples imágenes del mismo canal en diferentes planos focales para identificar diferencias de señal tridimensionales.

Al hacer clic en el gráfico de pila situado a la derecha del ajuste Exposición, se alternará entre una sola imagen (pila Z desactivada) y una pila múltiple de imágenes (pila Z activada).

- No es habitual capturar una pila para la imagen de contratinción.



Una vez activada la pila Z para un canal, se mostrarán opciones adicionales encima del botón Capture (Capturar) para ajustar el número de **Cortes** en la pila y el espaciado, el **tamaño del paso**, entre cada pila.



Puede elegir entre guardar la **Pila Completa** o solo la **Proyección Máxima**:

- **La proyección máxima** capturará una pila de imágenes para crear solo una imagen compuesta: la Imagen de *proyección máxima*.
- Las imágenes individuales de la pila no se guardan en el marco de imagen final.
- **Full Stack** (pila completa) capturará y almacenará las capturas individuales en la pila junto con la *proyección máxima* fusionada.

(7) Contratinción

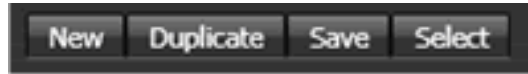
Debe seleccionarse un canal de la lista como contratinción antes de iniciar la captura.

- Este sería normalmente el canal DAPI.
- El canal de contratinción es un punto de referencia y centro de enfoque para la captura de la pila Z (a menos que el enfoque se reajuste manualmente en uno de los canales de la sonda antes de la captura).

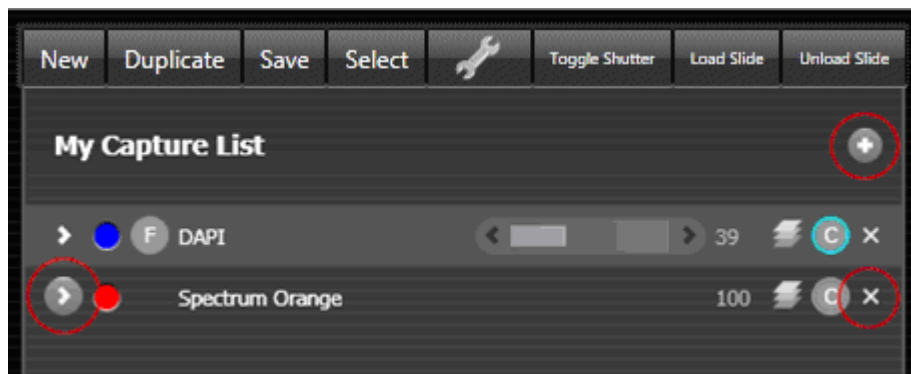


Trabajar con listas de captura

Una colección de canales es una lista de captura. Los controles de las listas de captura aparecen en la parte superior del panel de captura: Nuevo, Duplicar, Guardar y Seleccionar.



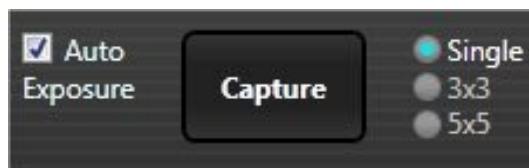
- **New (nuevo)** proporcionará una nueva lista de captura que contiene un solo Canal. Esto reemplazará cualquier canal que se muestre en ese momento.
- **Duplicate (duplicar)** hace una copia de una lista actual.
- **Save (guardar)** almacenará la lista de captura mostrada actualmente en la ventana Select (**Seleccionar**).
- Las listas de captura guardadas previamente pueden recuperarse utilizando **Select (Seleccionar)**.



- Para seleccionar un canal diferente, pulse el botón ">" situado a la izquierda del nombre del canal. Al seleccionar un canal, la imagen en vivo cambiará para reflejar los ajustes del canal actual.
- Los canales pueden eliminarse con el botón "x", que aparece al final de cada línea de canal, y añadirse con el botón +.

Capturar imágenes

Una vez que se ha creado la lista de captura y cada canal tiene configurados los filtros, el color, la contratinción y la pila Z adecuados, se puede capturar una imagen basándose en un cálculo de exposición de la cámara.



- Si **la exposición automática** está activada, al seleccionar el botón **Capturar** se ajustará automáticamente la exposición de la cámara para cada canal utilizando una configuración automática basada en la intensidad de la imagen.
 - Si ha colocado un círculo objetivo para la configuración automática, cada canal utilizará solo esa zona de la imagen para calcular los valores óptimos de exposición.
 - Si no ha colocado un círculo de destino, la configuración automática se basará en toda la imagen.
- Si **la exposición automática** está desactivada, al seleccionar el botón **Capture (Capturar)** se capturará cada canal fluorocromático de la lista de captura en secuencia utilizando los valores de exposición que se encuentran actualmente en la lista de captura.
 - Debe confirmar los valores de exposición de la cámara que desea utilizar antes de pulsar **Capture (Capturar)**.

Una vez iniciado, el proceso de captura es continuo para todos los canales.

- No hay pausa entre los desplazamientos por los canales de fluorocromos.
- La visualización de la imagen en vivo no se actualiza durante la captura.

Tras la captura, cada imagen se muestra debajo de los controles de captura.



- Si mantiene el ratón sobre una imagen en miniatura, aparecerá una versión ampliada de la misma.
- La pequeña cruz de la esquina superior derecha puede utilizarse para borrar la imagen si es necesario.

Nota: Solo pueden borrarse de este modo las imágenes de la lista de marcos capturadas manualmente en esta pantalla. Las imágenes capturadas por los modos de captura **ProbeAuto** o **Spot Counting** (recuento de puntos) del sistema de escaneado no se pueden borrar.

Captura de acabado

Cuando haya finalizado la captura, salga de la pantalla utilizando la cruz "cerrar ventana" situada en la parte superior derecha de la pantalla, lo que le llevará de nuevo a la pantalla de inicio de las funciones de gestión de casos.

Visualización de la imagen de la sonda

CytoVision DX incluye varias herramientas de visualización y salida de imágenes basadas para sonda estándar y célula M-FISH, que pueden ser cargadas en la pantalla de inicio para la visualización de imágenes y color general, ajuste de contraste, cariotipado o anotación, exportación o impresión.

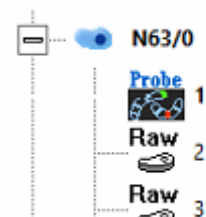
Los datos del marco de imagen no pueden visualizarse en la aplicación CytoVision DX.

- es importante utilizar el modo de captura más adecuado para sus necesidades de visualización.
- para más información, consulte las [Tabla de captura y análisis](#).

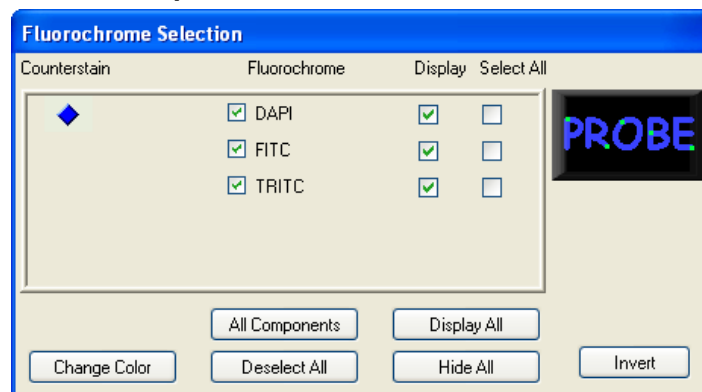
Visualización en la pantalla

Toda la visualización y carga de imágenes se realiza a través de la **pantalla de inicio**.

- Cargue una imagen haciendo doble clic en el icono "Sonda" del navegador y, a continuación, en la ventana principal de visualización.



Cuando se carga una imagen de sonda en la ventana principal de análisis, aparece en la parte inferior de la pantalla el cuadro **del panel de selección de fluorocromos**.



Este cuadro le muestra qué fluorocromos se utilizaron cuando se capturó la imagen y le permite elegir qué componentes de la imagen fusionada de la sonda desea mostrar;

- Cada imagen de la sonda contiene una superposición de 2 o más canales de *fluorocromos*.
- Cada canal puede contener objetos separados que deben seleccionarse individualmente antes de realizar cualquier ajuste.
- Active varias casillas "Fluorocromo" para permitir la selección de más de un canal a la vez.
- Algunas funciones de análisis, como **Registrar** o **Cambiar color** solo requieren que se seleccione un componente.

También hay una casilla de verificación **Display (Mostrar)** a la derecha del *fluorocromo*.

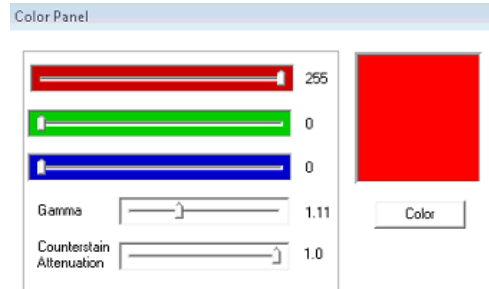
- Cuando se encienda, se mostrarán todos los objetos de ese canal.
- Cuando se encienda, se mostrarán todos los objetos de ese canal.

Las combinaciones de las opciones "Fluorochrome" (Fluorocromo) o "Display" (Pantalla) son útiles para decidir qué objetos están disponibles para su selección para mejoras, cambios de color, registros de imagen y la creación de pantallas compuestas.

Cambiar color

Funciona de forma similar al ajuste Color de la Configuración de captura, actualizando el color de los componentes en la imagen única guardada. Esto puede ser útil para mejorar la presentación visual de las señales superpuestas y ayudar en la impresión.

- Haga clic en el botón de comando **Change Color (Cambiar color)** para abrir el panel de color, la imagen de contratinción se seleccionará automáticamente.
- Ajuste los tres controles deslizantes para modificar el color.
- Alternativamente, pulse el botón **Color** para seleccionar desde la carta de colores.
- haga clic en un fluorocromo diferente para cambiar el color.
- Los comandos **Gamma** y **Counterstain Attenuation (Atenuación de la contratinción)** funcionan igual que en la ventana Configuración de la captura, pero sus efectos se muestran instantáneamente en la imagen de la sonda.
El ajuste gamma actúa globalmente sobre la imagen para mejorar la visualización; sin embargo, la señal de fondo o inespecífica también se verá incrementada. Para mejorar solo la visualización de la señal, seleccione los objetos de interés y utilice la opción **Contrast (Contraste)**.



Haga clic en OK para cerrar el panel Cambiar color.

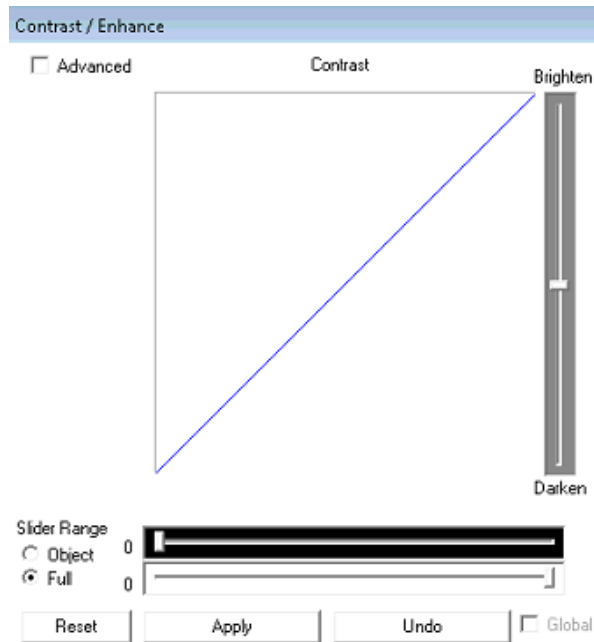


Contraste

Se puede modificar el brillo y el contraste de la imagen utilizando la herramienta de contraste.

- **Contraste** debe utilizarse en modo **Global** o "**Completo** " por defecto.
- Asegúrese de que la opción **Preview enhancements (Previsualizar mejoras)** en Customize (*Personalizar*) está marcada.
- Confirme que ha seleccionado el fluorocromo correcto en el *panel de selección de fluorocromos* y haga clic en la señal o señales que desea aclarar (aparecerá un cuadro de selección a su alrededor).





1. Para **aclarar** una señal, mueva hacia arriba el control deslizante situado a la derecha del histograma.
2. Para **oscurecer** una señal, arrastre el control deslizante hacia abajo.
3. Los controles deslizantes de "corte" de color situados bajo el histograma pueden utilizarse para realizar cambios extremos de intensidad.

Mejorar (afinar)



La herramienta Enhance/sharpen (Mejorar/nitidez) está debajo de la ventana de contraste.



La nitidez normalmente solo se utiliza en el canal de contratinción para realzar los detalles de los bordes o del fondo, o si se trabaja en una metafase teñida con DAPI, para realzar las bandas.

No existen herramientas de análisis específicas para la visualización de imágenes de la sonda. Las imágenes de sonda tienen acceso a opciones similares a las de otros formatos de imagen celular.

- Las imágenes de la sonda se cargarán en **la vista de casos** estándar para su visualización en la pantalla Organize (Organizar) y el uso de los comentarios Ctrl-B o Ctrl-K en la pantalla Analyze (**Analizar**). Consulte la **Guía del usuario de CytoVision DX**.
- A las Imágenes de sonda se les puede aplicar un umbral para crear objetos de uso flexible en pantalla y para crear un par de metafase FISH y cariotipo como parte de un flujo de trabajo de análisis de cariotipado. Consulte las **Instrucciones de uso del cariotipador CytoVision DX**.

Solución de problemas

La información y las comprobaciones enumeradas en esta sección están pensadas para que los usuarios familiarizados con las aplicaciones y el hardware del sistema las realicen como parte de la solución de problemas de soporte de primer nivel.

- La **Guía del usuario de CytoVision DX** contiene comprobaciones y acciones generales que también deben llevarse a cabo y confirmarse como parte de cualquier contacto con Leica Biosystems para obtener más ayuda.

Sistema de captura

Errores de conexión al microscopio

- Controlador del microscopio apagado - reinicie el controlador.
- Cable USB del microscopio desconectado - compruebe el cable.
- El puerto USB del microscopio ha cambiado (cambio de puerto USB o efecto de Windows) - confirme el puerto en el Administrador de dispositivos y el cambio en la **calibración del microscopio** (requiere acceso de administrador local).

Microscopio Efecto de calidad de la luz

Deben realizarse comprobaciones rutinarias en el microscopio óptico para confirmar que no hay cambios en la configuración necesaria para lograr una captura de imagen óptima. En caso de problemas con la calidad de la imagen durante la captura, también deben comprobarse estos aspectos:

- Confirme que el fototubo del microscopio (divisor de luz) dirige el 100 % de la luz a la cámara
- Compruebe que la guía de luz fluorescente esté correctamente instalada y que no esté dañada/doblada, deteriorada o haya superado su vida útil prevista.
- Compruebe y limpie las lentes del objetivo. El aceite viejo y endurecido en la lente de captura reducirá la intensidad de la luz, la iluminación (uniformidad) y el contraste de la imagen.
- Compruebe que la lente del condensador se desplace fuera de la trayectoria de la luz durante el escaneado y la captura para evitar cualquier reflejo de la luz (esto se hace automáticamente en los microscopios configurados con un condensador motorizado).
- Inspeccione visualmente los filtros fluorescentes en el revólver del microscopio para detectar cualquier signo de daño causado por la luz o el entorno (sombras, aspecto moteado, irregularidades de color).

Sistema de escaneado GSL

Para el escaneado GSL deben seguirse las comprobaciones y el procedimiento **adicionales**.

Errores de conexión al GSL

- La unidad base GSL está apagada: apague y encienda la GSL, compruebe la conexión de la fuente de alimentación externa.
- Cable de red desconectado: compruebe el cable entre el GSL y el PC.

- Configuración del adaptador de red: confirme que no haya habido cambios recientes en el administrador de TI/redes.

Problemas de enfoque del escaneado 10x

- ¿Está el portaobjetos limpio y sin aceite? Los portaobjetos no deben tener aceite de inmersión para que se puedan centrar de manera precisa.
- ¿Se atraviesa el plano de enfoque de la imagen durante el enfoque automático?
- El punto de inicio del autoenfoco no está cerca del plano focal de la célula (el mapa de enfoque 10x no pasa por el plano focal de la muestra): Emisión de portaobjetos en bandeja, Desplazamiento del enfoque de la plantilla, datos del compartimento de calibración espacial (golpe de platina).
- El mapa de enfoque 10x pasa por el plano focal pero no da puntos de enfoque nítidos: Contraste ([efecto de calidad de la luz](#), baja intensidad de la contratinción).
- Un desplazamiento de enfoque mal ajustado en la plantilla de escaneado provocará fallos en el mapa de enfoque en 10x
- Comprobación de las plantillas de escaneado en cuanto al desplazamiento del enfoque, el ajuste del cubreobjetos y el ajuste de validación del enfoque
- ¿El enfoque es variable en función de la posición de la bandeja/platina?
- Luz insuficiente durante el mapa de enfoque 10x (efecto de la calidad de la luz, desplazamiento de la cámara de la plantilla de portaobjetos).
- Luz excesiva durante el mapa de enfoque 10x (cambio de hardware, desplazamiento de la cámara de la plantilla de portaobjetos, intensidad de la contratinción).
- Si la imagen en directo es demasiado oscura o clara, compruebe el divisor de luz y la plantilla de portaobjetos para ver si hay algún desplazamiento de la cámara y repita la **calibración del escáner de fluorescencia**.

Problemas de clasificación del escaneado 10x

- ¿Qué aspecto tienen las imágenes en directo durante el escaneo, están bien enfocadas y tienen buen contraste?
- ¿Ocurre esto en varias plantillas de portaobjetos? Ejecute una nueva plantilla para comprobarlo.
- Compruebe el microscopio para el [efecto de la calidad de la luz](#), los problemas.
- Compruebe en el portaobjetos de la muestra la concentración e intensidad de la tinción con DAPI y el antidifuminado.
- Comprobar si los clasificadores están mal entrenados.

Problemas de enfoque en la captura 63x

- El punto de inicio del enfoque automático no está cerca del plano focal de la célula. Compruebe si la lente de captura está bloqueada (mecanismo de empuje y giro del muelle en el extremo).
- ¿El problema se repite en varios portaobjetos? Si es variable, compruebe [la compatibilidad de los portaobjetos/bandejas](#).
- ¿Qué aspecto tienen las miniaturas de escaneado 10x de la lista de metafases en la pantalla de revisión, están enfocadas?
- Para problemas de enfoque de captura automática repetibles, realice una nueva **Calibración del Desplazamiento de la fluorescente**.

- Confirme que la opción de cubreobjetos de la plantilla de escaneado está ajustada correctamente
- Una cantidad insuficiente de aceite, burbujas de aire u otros problemas relacionados con el aceite hacen que el enfoque no sea óptimo. Confirme que haya aceite en el depósito de la jeringa y que el tubo y la punta dispensadora del lubricador estén firmemente sujetos y desbloqueados

Problemas de captura del canal de la sonda

- Se ha utilizado un filtro incorrecto para la captura. Compruebe la configuración de la lista de captura (nombre y posición del filtro dicróico) en las listas guardadas y en la lista de construcción predeterminada.
- Señales de la sonda no enfocadas. Compruebe el tamaño del paso de la pila Z y el número de capas, compruebe el ajuste del filtro en el revólver del microscopio.

Compatibilidad de los portaobjetos/bandeja

Colocación de portaobjetos en el soporte de la platina.

Los portaobjetos deben estar nivelados en el soporte con la superficie de la muestra o cubreobjetos hacia arriba.

- Asegúrese de que no existen en la inserción elementos que impidan que se coloque el portaobjetos nivelado y que la sujeción de este tenga contacto firme con el portaobjetos para evitar que se mueva.

Consistencia de sujeción del portaobjetos.

Compruebe si los clips de resorte sujetan el portaobjetos con suficiente firmeza.

- Si el portaobjetos está flojo (se tambalea), compruebe el apriete de las empuñaduras de muelle.
- ¿Los portaobjetos son cuadrados o con esquinas recortadas? Si la esquina está recortada, ¿la bandeja tiene el diseño "biselado" correcto?

Consistencia de sujeción de la bandeja.

Compruebe si la bandeja GSL se sujeta firmemente en la platina cuando está cargada.

- Si hay alguna holgura, compruebe el ajuste del brazo de empuje de plástico en la parte delantera/izquierda de la plataforma GSL (ajuste del tornillo).

Montaje del cubreobjetos

Un recubrimiento grueso o doble impedirán alcanzar el plano de enfoque.

- Confirme que una metafase puede ser enfocada y capturada manualmente en la pantalla normal de Captura.

Preparación y tinción de la muestra

La densidad celular de la muestra, la intensidad de la contratinción y el efecto antidifuminado tendrán un efecto directo sobre la fiabilidad del enfoque del sistema, la velocidad y el rendimiento del escaneado y la captura automática.

- No se aconseja diluir la contratinción. La baja intensidad aumenta la exposición de la cámara y reduce el contraste, lo que provoca un aumento de los fallos de enfoque y tiempos de exploración y captura más largos.
- La eficacia antidescoloramiento disminuye con la edad, la temperatura de almacenamiento y la exposición a la luz, provocando una neblina roja sobre el portaobjetos y un aumento de la decoloración tanto de las sondas como del DAPI. DAPI/antidescoloramiento debe conservarse a 2-8 °C el mayor tiempo posible y puede aplicarse a los portaobjetos cuando aún están fríos.

- Guarde los portaobjetos en la oscuridad a 2-8 °C y espere 30 minutos a temperatura ambiente antes de escanearlos. Los portaobjetos antiguos deben teñirse de nuevo con una nueva tinción de contraste y antidescoloramiento, según sea necesario.
- La baja densidad celular aumenta los tiempos de exploración y captura y el número de imágenes capturadas necesarias para la puntuación de la señal. Siempre que sea posible, ajuste la densidad celular durante la preparación del portaobjetos para obtener un mínimo de 5 células puntuadas por fotograma de captura (10-20 es lo óptimo).

Exportar registros diagnósticos

CytoVision DX genera un grupo de datos circular sobre la configuración del sistema, la calibración, los procesos y datos de los eventos del hardware durante el funcionamiento rutinario. En caso de funcionamiento inesperado, errores de escaneado o captura, o errores de la aplicación, estos archivos de registro ofrecen información útil para que el servicio técnico de Leica diagnostique el fallo.

- Los registros contienen de 7 a 10 días de información de diagnóstico detallada y se debe realizar una exportación dentro de este plazo para cualquier problema que pueda escalar más a Leica Biosystems.
- Los archivos de registro se guardan con la función **Export Logs** (Exportar registros) de la barra de herramientas del menú **Case** (Caso). Esto comprimirá todos los archivos en un .zip y los guardará en una ubicación elegida por el usuario.
- Estos datos pueden guardarse en un lápiz de memoria o compartirse con el personal de servicio y asistencia en caso necesario.

Apéndice: Recuento de puntos

Recuento de puntos

Spot Counting (recuento de puntos) utiliza los ajustes de un **ensayo de puntos** creado antes de la captura para crear datos de imagen *Framelist*.

Las *framelists* de puntos se capturan como parte del flujo de trabajo totalmente automatizado de escaneado y captura automática de GSL utilizando el modo de captura SpotCounting en una plantilla de portaobjetos de escaneado.

- Las *framelists* de puntos también se pueden capturar manualmente una lista de recuento puntual en la pantalla de captura utilizando el modo de captura "Recuento de puntos", similar a la captura de sonda estándar y basada en los mismos nombres de fluorocromos de "Crear una lista".

El recuento de puntos presenta algunas diferencias con los datos de imagen de la *framelist ProbeAuto*:

- Los ensayos de puntos pueden crearse y editarse a través del panel Assay Selector (selector de ensayo) para diferentes canales de fluorocromos y configuraciones de pila Z.
- Se puede utilizar un **clasificador de células** para determinar el tipo de material celular que se procesa como "Informativo" en la imagen durante la captura.
- El sistema de escaneado **AutoCapture** (captura automática) puede ajustarse a un número máximo de células informativas o a un número máximo de fotogramas capturados.
- Los datos de imagen capturados se procesan utilizando los parámetros *del ensayo* para obtener información sobre la intensidad y el tamaño de la señal de la sonda, incluidos los ajustes para la forma de la célula de contratinción y los límites de parada de GSL.
- Los datos originales de la célula y del tratamiento de la señal se guardan de forma permanente en la *framelist*.

Nota: Las *framelists* de puntos contienen varios archivos con un gran tamaño total de casos, por lo que debe asegurarse de que hay suficiente espacio libre en el servidor de datos que aloja la base de casos.

- Un portaobjetos con 40 fotogramas (imágenes capturadas) tendrá un tamaño aproximado de 500 Mb, basado en 5 pilas por canal en una muestra de 2 sondas.
- Alrededor del 80 % de estos datos serán las capturas individuales de la pila Z.
- Los datos del marco de imagen no pueden visualizarse en la aplicación *CytoVision DX*. La revisión de imágenes requiere un software de análisis de imágenes independiente compatible con el formato *Framelist*.

El flujo de trabajo de Spot consta de dos pasos principales.

1. **Selección de ensayos:** Se puede seleccionar o crear un ensayo cuando se selecciona Spot Counting (Recuento de puntos) como modo de captura de plantilla de portaobjetos de escaneo o, para la captura manual, cuando se selecciona en la lista **Modo de Captura** de la pantalla de Captura estándar.
2. **Capturar:** Las imágenes de la zona del portaobjetos seleccionada se capturan utilizando los procedimientos estándar de captura de sonda. Los datos de imagen se procesan en tiempo real para determinar los límites celulares y las señales de las sondas.

Antes de capturar células para el recuento de puntos automático.

- Debe estar familiarizado con los procedimientos de [captura de sonda](#) y los fluorocromos, ya que los ensayos de recuento de puntos utilizan los nombres y ajustes de fluorocromos predeterminados ([Build List](#)).
- Es necesario crear y configurar ensayos para los fluorocromos que se van a utilizar como lista de captura, con opciones ajustables de pila Z, tipo de sonda y clasificador de células.
- Los sistemas de escaneo deben tener una **calibración de escaneo fluorescente** que funcione para la intensidad típica de la contratinción de la muestra y las compensaciones de enfoque que se utilizarán durante la captura. Los usuarios deben estar familiarizados con los procedimientos de calibración del escáner para mantener el sistema correctamente y compensar cualquier variación en la intensidad de la contratinción visible.
- Los sistemas de escaneo requieren una [plantilla de portaobjetos](#) con un área de escaneo adecuada, un clasificador de escaneo y un ensayo puntual asignados para el portaobjetos.

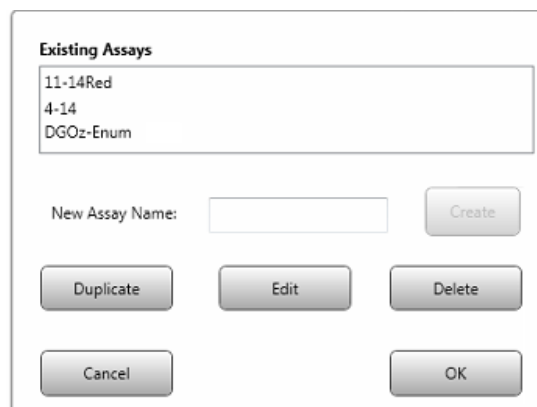
Ensayo de recuento de puntos

Un contenido de ensayo de puntos;

1. La lista de captura de fluorocromos para la contratinción y las sondas en el portaobjetos.
2. La configuración por defecto de la pila Z para cada canal de sonda.
3. El número máximo de fotogramas o células a capturar automáticamente en los sistemas de escaneo: **la parada de captura tras los recuentos**.
4. Opciones para seleccionar un clasificador de células de contratinción para determinar qué células se clasifican como informativas durante el procesamiento de imágenes.

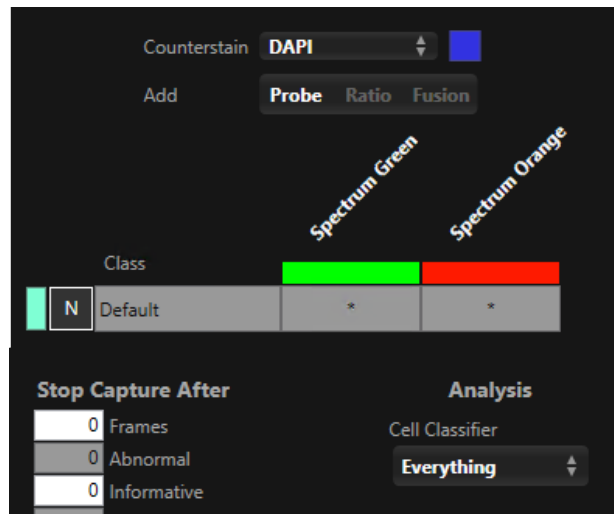
Para utilizar las funciones de escaneo y captura automática del sistema GSL, debe crearse un ensayo antes de la captura y configurarse mediante la ventana **Spot Assay Selector (selector de ensayo de puntos)**.

El **selector de ensayo de puntos** se mostrará en la pantalla de captura estándar (modo Spot Counting) o como parte de una f de escaneo cuando *SpotCounting* esté configurado para captura automática.



- **Crear un nuevo ensayo:** Introduzca un nuevo nombre de ensayo y seleccione **Create (Crear)**. Se abre el cuadro de diálogo **Configuración de puntos**.
- **Copia de un ensayo existente:** Resalte un ensayo existente en la lista. Haga clic en el botón **Duplicate** (duplicar).

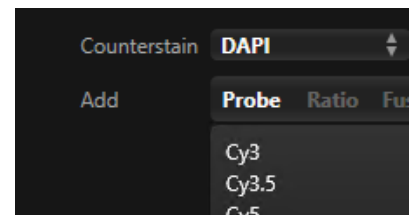
- **Editar de un ensayo existente:** Resalte un ensayo existente en la lista. Haga clic en el icono **Edit** (Editar). Se abre el cuadro de diálogo **Spot Configuration (Configuración de puntos)**.
- **Borrado de un ensayo existente:** Resalte un ensayo existente en la lista. Haga clic en el botón **Delete** (Borrar).



Edición de ensayos para la captura de puntos

Selección de fluorocromos

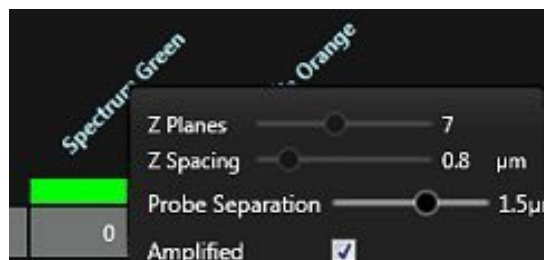
Seleccione **Contratinción**, un menú desplegable de nombres de fluorocromos del sistema y, a continuación, haga clic en el botón **(Add) Probe** (Añadir) Sonda y seleccione del mismo modo hasta que tenga el número y los nombres de fluorocromos correctos para el kit de sondas utilizado en el portaobjetos de la muestra.



La lista de nombres se toma de **crear lista** de la sonda, que debe configurarse para mostrar el color y los valores predeterminados de filtro en la [pantalla de Captura](#) estándar.

Para cada sonda, haga clic en el nombre para configurarla:

- Los **planos Z** y el **espaciado Z** (μm) para la captura de pila Z. Los números variarán en función de las características de la muestra, pero para las preparaciones interfásicas, un valor inicial típico es una distancia de enfoque total de aproximadamente 5 micras, por ejemplo, 7 planos a $0,8 \mu\text{m}$ o 5 planos a $1,2 \mu\text{m}$ (intervalo de $4,8 \mu\text{m}$).
- Si el fluorocromo es para una prueba de amplificación, active la casilla **Amplified** (**Amplificado**).

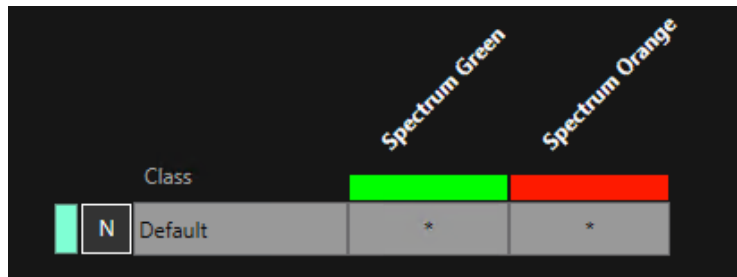


- **La separación de la sonda** es un ajuste opcional, pero puede dejarse en la configuración predeterminada, ya que no tiene relevancia directa para el funcionamiento de la captura CytoVision DX.

Tabla de clases

Una vez configurada la lista de captura, se crea una tabla de **clases** que muestra un nombre de clase "Predeterminado" que se utiliza para procesar las células informativas durante la captura de imágenes.

- Esto no es editable para la operación de captura CytoVision DX



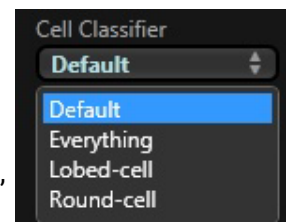
Clasificador celular

Un ensayo nuevo no dispone de un conjunto clasificador (**Todo**):

- Todos los objetos de los fotogramas capturados que contengan señales de sonda superpuestas al material de contratinción se clasificarán como "informativos" para la visualización de recuento de puntos y monitor de clase de GSL durante la captura.

El uso de un clasificador de células (DAPI) permitirá filtrar las células "informativas" basándose en las formas del objeto de contratinción (célula), que pueden seleccionarse en la lista del menú desplegable.

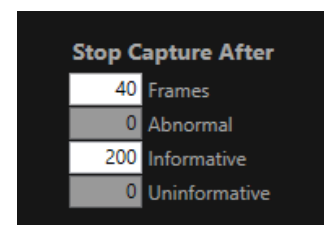
- **Por defecto:** Un clasificador entrenado en una muestra de células mixtas elimina el material DAPI pequeño o de forma inusual y los grupos de células grandes.
- **Célula lobulada:** Un clasificador entrenado en tipos de muestras de células multilobuladas que elimina los simples restos de fondo, los grandes grupos no segmentados y las células de forma mayoritariamente circular.
- **Célula redonda:** Un clasificador entrenado en tipos de muestras de células circulares que elimina los restos simples de fondo, los grupos grandes no segmentados y las células que suelen tener forma lobulada.



Detener captura posteriormente (conteos de puntos de la captura automática)

Los sistemas de exploración GSL continuarán hasta que se hayan capturado automáticamente todos los fotogramas dentro del área de exploración o si se alcanza uno de los recuentos de parada establecidos en el ensayo.

- **Fotogramas:** Establece el número máximo de fotogramas a capturar.
El valor utilizado puede establecerse como
 - un «a prueba de fallos» en objetos «Informativos» insuficientes se identifican en la rutina de captura automática, destinado a evitar tiempos de exploración excesivos en portaobjetos de hibridación poco poblados o fallidos
 - para exploraciones en las que se requiere un número fijo de capturas con fines de normalización o comparación, como pruebas de densidad celular o de calidad de la sonda



- **Informativo:** Analiza el total de todos los objetos que pasan la selección *del Clasificador de Células*.
- Se espera que este sea el criterio de parada rutinario cuando se necesite un número total fijo de células para cumplir las expectativas de revisión o análisis posteriores.

Si se establecen ambos recuentos de parada en el ensayo, la captura se detendrá cuando se alcance el primero de estos recuentos; un valor de cero para cualquiera de las opciones significa que no afectará a la captura automática.

- Los recuentos de paradas no tienen efecto en la [captura manual](#).

Avanzado

El botón **Avanzado** mostrará el cuadro de diálogo Configuración de parámetros de ensayo adicionales.

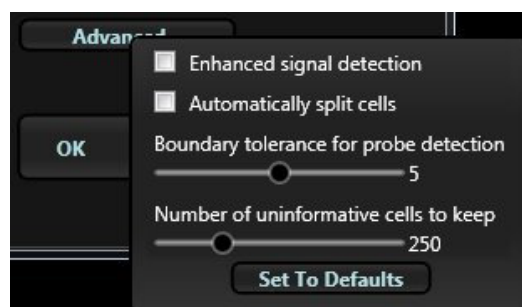
- **Tolerancia límite para la detección de sondas y Número de células no informativas a conservar** no se utilizan para la operación de captura CytoVision DX
- La **Detección de Señal Mejorada** y la **División Automática de células** pueden ser utilizadas y resultarán en un mayor número de objetos clasificados durante el procesamiento de la imagen - esto puede detener la auto-captura antes basándose en el recuento de paradas **Informativas**.

Detección de señales mejorada:

Si está activada, modifica algunas de las comparaciones relativas de tamaño e intensidad durante el procesamiento de la imagen, haciendo más probable que las señales de intensidad pequeña o débil se clasifiquen como señales informativas.

Dividir células automáticamente:

Si se activa, esto puede separar grupos de objetos de contramancha en dos o más objetos **Informativos** separados.



En la ventana Spot Counting Assay Selector (Selector de ensayo de recuento de puntos), el ensayo se guarda en la lista por defecto del sistema cuando se utiliza **OK** para cerrar el panel.

Escaneado y captura de puntos

Plantilla de portaobjetos (configuración de escaneado)

La creación de plantillas de portaobjetos y las opciones de escaneado son las mismas que para el escaneado interfásico rutinario.

- Consulte [Plantillas de portaobjetos \(FISH\)](#) para más detalles.

Para las muestras FISH, las reglas de captura se definen en el panel *AutoCapture* (captura automática) de la plantilla de portaobjetos seleccionando "SpotCounting" en la lista **Capture Mode (modo de captura)**:

- **Objetivo:** selecciona el objetivo utilizado para la captura automática, el 63x es óptimo para FISH (el 100x no se recomienda debido a un campo de visión más pequeño y una intensidad luminosa reducida).

AutoCapture

☒ Perform AutoCapture

Objective: 63X

Capture Mode: SpotCounting

Autocamera Setup ☒ Setup on counterstain ☒ Setup on probe ☒ Setup using Average ☐ 0 Frames

Save Z-Stacks ☒

No SPOT assay selected

Select Spot assay

- El estado de configuración de la **cámara automática** determinará cómo se capturan las imágenes a gran aumento durante la captura automática;
 - **Activado:** (Recomendado) Para cada canal que se vaya a capturar, el sistema realizará un ajuste de la exposición automática basado en la intensidad de cualquier fluorescencia presente en la imagen.
 - **Desactivada:** Para cada canal que se va a capturar, el sistema utiliza valores fijos de la cámara a partir de los fluorocromos de **Build List** (crear una lista) ("Save as Default» (Guardar como predeterminado) en el panel de configuración de captura o con la función independiente **Fluorochrome Camera Calibration** ([calibración de la cámara de fluoro cromado] - no recomendada para uso rutinario).
- **Configuración de la contratinción:** Mejora el cálculo de exposición de **Autocamera Setup** (configuración de la cámara automática) en canales fluorocromáticos al trabajar solo en las áreas que contienen señal Counterstain (máscara de DAPI) y verse menos afectado por restos fluorescentes fuera de la célula.
- **Configuración de la sonda:** Mejora el cálculo de la exposición de **Autocamera Setup** (configuración de la cámara automática) utilizando un cálculo basado en el tamaño de los canales fluorocromáticos para que se vean menos afectados por los restos fluorescentes brillantes.
- **Configuración mediante promedio:** Captura los n primeros fotogramas utilizando el cálculo automático estándar de la exposición para obtener un valor medio de integración de fluorocromos para todos los fotogramas restantes (no se recomienda para un uso rutinario).
- **Guardar una pila Z:** Guarda cada imagen de la pila de fluorocromos junto con la capa de proyección máxima (fusionada).
- **Select Spot assay** (seleccionar el punto de selección) abre el panel Assay Selector (selector de ensayo) para elegir un ensayo de punto apropiado que se utilizará como lista de captura y para el procesamiento de imágenes durante la autocaptura.
- **Lista de fluorocromos** no se puede seleccionar. La lista de captura y la configuración de los fluorocromos se establecen en el ensayo de puntos y se vinculan a los fluorocromos de la **Build List** (crear una lista) por defecto.
- **Opciones de postcaptura:** no se puede seleccionar. El recuento de puntos crea datos de imagen Framelist que no utilizan funciones de modificación del umbral o de personalización de la captura.

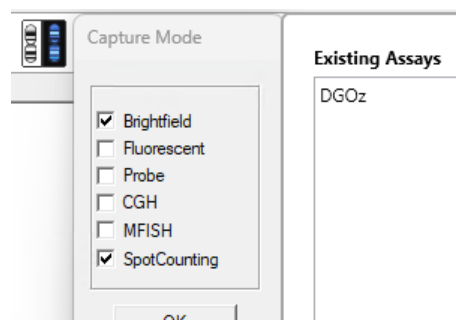
Nota: Si hay algún nombre de lista en la **lista de Fluorocromos** o en los paneles de **opciones de postcaptura** esto significa que el área de escaneo ha sido previamente configurada para el modo sonda o sonda automática donde estos son requeridos.

- Se recomienda crear una nueva área para el recuento puntual para mantener estas áreas en blanco.

Captura manual

La captura manual de recuento de puntos utiliza la pantalla estándar de captura.

1. Haga clic en Capture Mode (modo de captura) y seleccione Spot Counting (recuento de puntos) para abrir el cuadro de diálogo Assay Selector (selector de ensayo).
2. Seleccione o cree un ensayo de puntos.
3. Cuando se selecciona un ensayo, la lista de captura se creará automáticamente a partir de los fluorocromos de *Build List* (crear una lista) estándar definidos en el ensayo.
4. Confirme que el panel de selección de fluorocromos muestra los fluorocromos correctos. Los ajustes de la pila Z se heredarán del ensayo, pero pueden modificarse antes de la captura.
5. Confirme que el panel *Personalizar* captura está configurado para la opción Save Stacks (Guardar pilas) para guardar las capas de la pila Z como imágenes separadas en la lista de marcos final.

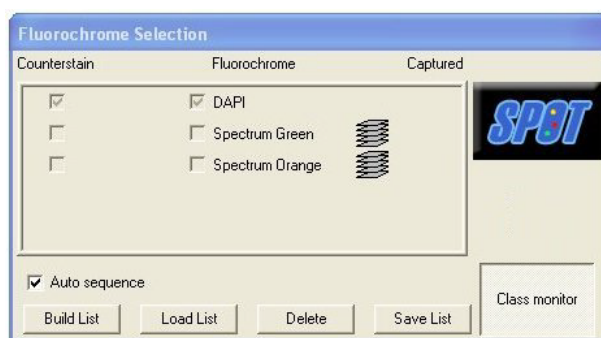


Capture las células como lo haría para una [captura de sonda](#) estándar.

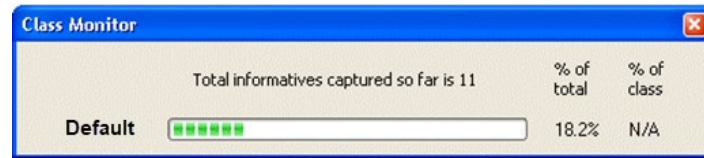
- Desactive **Auto Sequence (Secuencia automática)** y **Auto Camera Setup (Configuración automática de la cámara)** y realice una o dos capturas para obtener la configuración correcta de la cámara.
 - El alternador de **configuración automática** situado debajo de la imagen puede seguir utilizándose para determinar automáticamente los mejores ajustes para el portaobjetos.
 - Cuando los ajustes de la cámara sean correctos, active **Auto Sequence** (secuencia automática). Esto será más rápido que utilizar la **configuración automática de la cámara** para cada fotograma.
- Las imágenes serán procesadas por el ensayo a medida que sean capturadas. No hay modificación del umbral, los datos brutos se utilizan para crear una Framelist para el procesamiento de imágenes.
- No hay modificación del umbral, los datos brutos se utilizan para crear una Framelist para el procesamiento de imágenes. Esto completará el procesamiento de las células de la Lista de marcos.

Captura y monitor de clase

Cuando se inicia la Spot Capture automática o manual, aparece el panel Spot **Fluorochrome Selection** (selección del fluorocromo de puntos) que muestra los nombres de los fluorocromos definidos en el ensayo.



Haga clic en el icono **Class Monitor (Monitor de clase)** para mostrar el cuadro de diálogo del monitor de clase.



El número total de celdas informativas procesadas hasta el momento se muestra en la parte superior del cuadro de diálogo.

- La barra muestra el número de *informativos* como porcentaje del recuento de paradas de ensayo.

Detener la captura automática SPOT

La captura automática de *CytoVision DX* GSL está diseñada para funcionar sin necesidad de ajustes o de interacción.

La captura automática se detendrá cuando se cumpla una de las siguientes condiciones:

- Se ha alcanzado el número de paradas tras los **fotogramas**.
- Se ha alcanzado el número de células **informativas** tras la parada.
- La captura ha finalizado para todos los fotogramas del área de exploración.
- El botón **Stop** se pulsa manualmente.

A menos que se pulse el botón **Stop**, el GSL pasará a la siguiente diapositiva del lote y realizará el escaneado o la captura automática en ese portaobjetos según sea necesario.

Consulte los [procedimientos paso a paso de ejemplo](#) para ejecutar un portaobjetos de recuento puntual para la [captura manual](#) o el [escaneado completo y la captura automática](#).

Apéndice: Tejido FISH

Descripción general del tejido FISH

La funcionalidad Tissue FISH (tejido FISH) ha sido diseñada para permitir la obtención de imágenes de portaobjetos Tissue FISH utilizando el hardware de escaneo o captura del sistema y, a continuación, la revisión o el análisis de las imágenes.

- Las opciones de escaneado permiten la selección manual o automatizada de las áreas de escaneado para su captura.
- Los datos de la lista de marcos se capturan con el modo de captura automática *ProbeAuto* o utilizando la aplicación de [captura manual de la sonda](#).

El uso previsto de captura de Framelist es con sondas de ADN FISH, la aplicación no tiene ninguna funcionalidad pensada para trabajar con portaobjetos de muestras de IHC de tejidos o inmunofluorescentes.

- La capacidad del módulo con licencia *Tissue FISH* controla el acceso a opciones adicionales de plantillas de portaobjetos en los sistemas de escaneado GSL, no es una configuración de captura o análisis.
- Todas las funciones de captura son características estándar de la capacidad de licencia del software Probe.
- No existen herramientas específicas de visualización, morfología o análisis de FISH tisular.

Exploración y captura FISH de tejidos

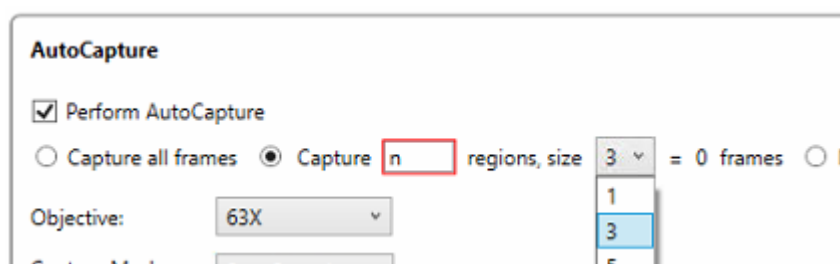
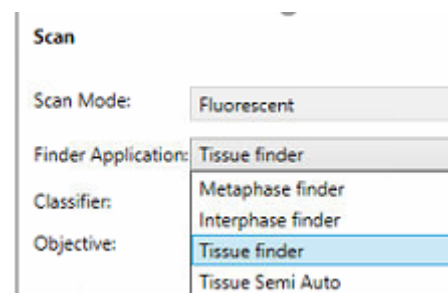
Existen 3 flujos de trabajo de configuración de la exploración FISH de tejidos disponibles a través de los ajustes de la pantalla de plantilla de portaobjetos y que se describen a continuación.

1. Escaneado automático y autocaptura (modo buscador de tejidos, autocaptura)
2. Escaneado automático y marcado manual de la región (modo buscador de tejidos, captura diferida)
3. Selección manual de la región (tejido semiautomático, sin escaneado, captura automática)

1) Escaneado y captura automáticos:

Utiliza la aplicación de **búsqueda de tejidos** como parte de una plantilla de portaobjetos.

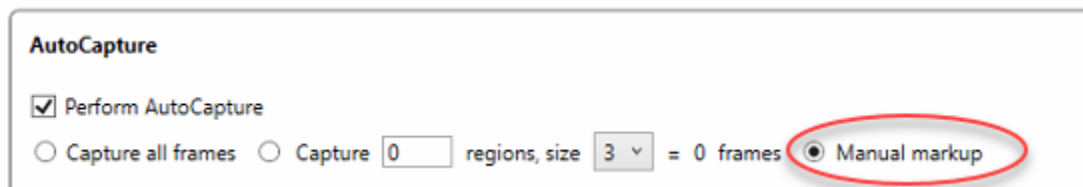
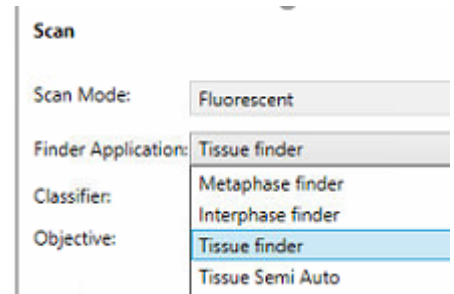
- Preescaneado de campo claro 1,25x opcional para detectar el grabado de la zona de portaobjetos.
- Mapa de enfoque 10x y escaneo detectando fotogramas de tejido teñidos con DAPI.
- Captura automática de la lista de fotogramas de todos los fotogramas o de varias regiones de la cuadrícula dentro del área de escaneado/grabado.



2) Escaneado automático y marcado manual de regiones:

Utiliza la aplicación de **búsqueda de tejidos** como parte de una plantilla de portaobjetos, con una captura automática diferida basada en las zonas seleccionadas.

- Preescaneado de campo claro 1,25x opcional para detectar el grabado de la zona de portaobjetos.
- Mapa de enfoque 10x y escaneo detectando fotogramas de tejido teñidos con DAPI.
- Marcado manual de fotogramas o regiones seleccionadas mediante la aplicación [Tissue FISH Markup \(marcación FISH tisular\)](#).
- Captura automática de la lista de fotogramas de todos los fotogramas o de varias regiones de la cuadrícula dentro del área de escaneo/grabado.



El marcado manual sólo puede utilizarse en una plantilla de escaneado con una única área de escaneado; si intenta crear varias áreas de escaneado, se generará un mensaje de advertencia y no podrá guardar la plantilla hasta que se eliminen las áreas adicionales.

3) Selección manual de la región para la captura automática:

Utiliza la aplicación de **búsqueda semiautomática** de tejidos como parte de una plantilla de portaobjetos con un procedimiento individual de marcado de regiones (preescaneado de campo claro opcional para detectar el grabado del área del portaobjetos) para evaluar y fijar regiones para la captura automática de una *lista de marcos* con sonda de gran aumento.

- Este flujo de trabajo requiere conectar una palanca tipo joystick USB al sistema.
- No se realiza ningún escaneado, se trata de un flujo de trabajo interactivo que requiere la visualización del portaobjetos con el microscopio o con imágenes en directo para establecer las zonas para la captura automática posterior.

Captura manual

Cualquier sistema *CytoVision DX* con configuración de Sonda puede utilizar la aplicación de [captura de Sonda Manual](#) para crear una Framelist.

- Las imágenes de captura manual de la sonda pueden capturarse individualmente. Los sistemas de escaneado pueden utilizar las opciones de fotogramas automáticos de 3x3 y 5x5.

Grabado de portaobjetos

El escaneado de portaobjetos FISH de tejidos está diseñado para funcionar de forma óptima en portaobjetos que han sido marcados con un rotulador de punta de diamante/grabador de portaobjetos, lo que permite determinar automáticamente el área de escaneado mediante un preescaneado de campo claro antes de cualquier operación de escaneado y captura.

- Para una detección fiable de la zona, el grabado del portaobjetos debe ser claro e ininterrumpido, alejado de los bordes del portaobjetos o del cubreobjetos y de cualquier desbordamiento del montante del portaobjetos.
- Si se configura el preescaneado en la plantilla de portaobjetos y no se detecta un área grabada, el escaneado no seguirá adelante.
- Si el portaobjetos tiene varias zonas grabadas dentro del área de escaneado, el preescaneado las detectará y las incluirá en los pasos automatizados de escaneado y captura.
- También está disponible la opción de preescaneado mediante escaneado semiautomático para ayudar a identificar manualmente las regiones y para la visualización de la vista general de los portaobjetos.



Nota: El rotulador no suele dar una línea de contraste clara y oscura y no se recomienda para una detección fiable o consistente.

El escaneado previo para portaobjetos grabados utiliza el objetivo de 1,25 aumentos con luz de campo claro, por lo que se requiere una **calibración de escaneado de campo claro** antes de poder utilizarlo correctamente.

Marcación FISH tisular (captura diferida)

Marcación FISH tisular es una opción de selección manual de regiones para su uso con el modo de escaneo Tissue Finder.

- Los portaobjetos se escanean a 10x utilizando una plantilla configurada con la opción de captura automática Manual markup (marcación manual).
- Las imágenes escaneadas están disponibles en un visor de marcación FISH tisular que muestra una visión general suturada del tejido fluorescente que permite al usuario crear regiones de captura.
- La captura diferida se inicia utilizando el modo estándar de captura automática de la sonda una vez que todos los portaobjetos han establecido las regiones de captura automática.

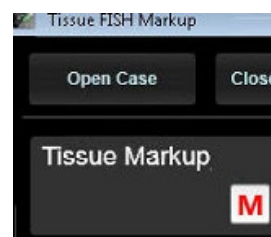


La aplicación de visualización de **Tissue FISH Markup** (marcación FISH tisular) se utiliza para seleccionar regiones de captura automática para portaobjetos escaneados utilizando la opción Manual markup (marcación manual) de la captura automática de búsqueda de tejidos.

- El visor de marcado puede abrirse directamente en un sistema de escaneo desde la pantalla de configuración Scan Batch of Slides (Escanear lote de portaobjetos), cuando se carga un portaobjetos que contiene datos de marcado como parte de un flujo de trabajo de captura diferida.
- Haga clic en la «M» roja situada bajo la pantalla de portaobjetos para ir a la pantalla de visualización de portaobjetos.

Otra posibilidad es abrir el visor de marcado mediante una aplicación independiente que puede ejecutarse en cualquier sistema CytoVision DX conectado en red.

1. Abra la aplicación desde **Start (Inicio) > All Programs (Todos los programas) > CytoVision DX> Tissue FISH Markup (marcación FISH tisular)**.
2. El botón Open Case (Abrir caso) aparece sobre un fondo negro.
3. Seleccione Open Case (Abrir caso) para mostrar una ventana de selección de casos.
4. Busque y abra un caso que se sepa que contiene escaneados utilizando la opción de marcado manual.
5. Cualquier portaobjetos Tissue FISH Markup con datos de escaneo 10x se actualizará automáticamente en la pantalla - una «M» roja indica que no se han establecido regiones de captura automática.
6. Haga clic en la «M» para abrir la pantalla del visor de marcas FISH de tejidos.



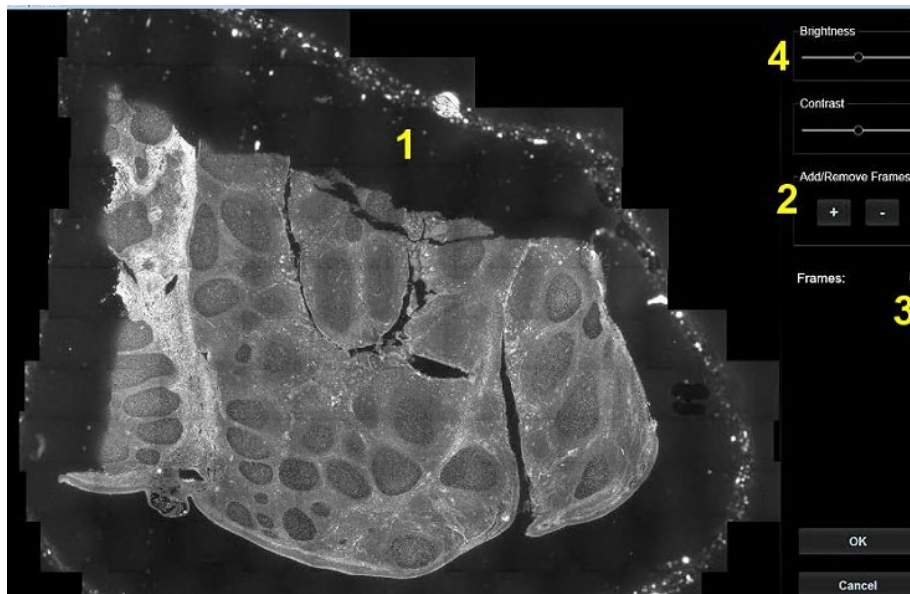
Si se está escaneando un caso o se abre en otro sistema o en el visor de marcado, aparecerá un símbolo de candado. El monitor de escaneo debe utilizarse para confirmar que se ha completado el escaneo de un caso en un lote de escaneo activo antes de intentar el procedimiento de marcado.

Pantalla de visor de marcado

La pantalla Tissue FISH Markup Viewer (visor de marcación FISH tisular) muestra una visión general del escáner Tissue Finder 10x con herramientas para añadir o eliminar regiones de captura automática.

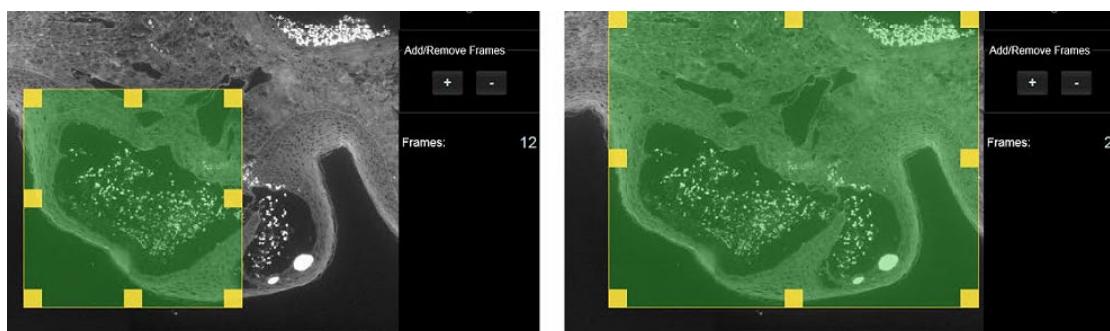
1. **Pantalla de escaneo** de las imágenes de escaneo fluorescente 10x unidas.
 - Amplíe o reduzca la imagen con la rueda de desplazamiento del ratón.
 - Desplácese por la imagen ampliada arrastrando con uno de los botones del ratón.

2. **Añadir o eliminar** regiones de captura automática.
 - Seleccione el signo « + » y haga clic en la imagen para soltar una región.
 - Seleccione el « - » y haga clic en una región existente para eliminarla.
3. **Pantalla de fotogramas**
 - Una vez añadida una región, se muestra un número de fotograma que indica cuántas capturas se esperan para la captura automática.
 - Si cambia el tamaño de la región en la visualización de la imagen, este número aumentará o disminuirá a medida que el sistema recalcula las posiciones de captura automática.
4. **Controles deslizantes de mejora de la imagen.**
 - Brillo y contraste ajusta la pantalla de visión general del escáner 10x si es necesario para mejorar la identificación visual de las zonas a capturar.



Ejemplo de flujo de trabajo

- Utilice la rueda del ratón para ampliar hasta el nivel de detalle necesario para determinar las regiones de captura.
- Seleccione el « + » que aparecerá resaltado en azul.
- Haga clic con el botón izquierdo del ratón sobre la imagen para soltar un cuadro de región, este aparece sombreado en verde.
- Arrastre con el botón izquierdo del ratón sobre el recuadro para reposicionarlo, arrastre con el botón izquierdo sobre los bordes del recuadro para redimensionarlo;
 - El sistema calcula el número de fotogramas completos y parciales del objetivo de captura de gran aumento necesarios para incluir toda el área de la región
 - El redimensionamiento modificará la visualización de los fotogramas a medida que el sistema recalcula.

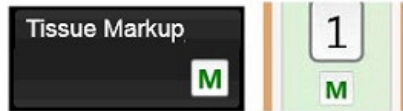


Es posible añadir varias regiones de la misma manera

- Las regiones cercanas o solapadas no permitirán capturar el mismo fotograma dos veces, el número de fotogramas solo aumentará cuando sea necesario capturar nuevos fotogramas completos.
- Para eliminar regiones, seleccione el « - » y después pulse sobre la región que desea eliminar.

Haga clic en OK para cerrar la ventana del visor y volver a la pantalla Markup Case Open (Abrir caso de marcado) o a la pantalla Scan Batch of Slides (Escanear lote de portaobjetos).

- Los portaobjetos actualizados con regiones de captura aparecerán ahora con una «M» verde.



Una vez iniciada el escaneado diferido, se procederá a la captura automática. Se espera que la sonda automática se utilice para generar imágenes Framelist.

Apéndice: Captura M-FISH

La información que figura a continuación requiere que el sistema *CytoVision DX* esté habilitado para los módulos con licencia Probe (sonda) y MFISH para permitir los ajustes de configuración adicionales necesarios para la captura de imágenes M-FISH.

- Las imágenes capturadas deben analizarse en un sistema que también tenga activado el módulo con licencia cariotipo.
- Para el análisis de imágenes M-FISH y los procedimientos de cariotipado, consulte las **instrucciones de uso del cariotipo *CytoVision DX***.

Introducción a la técnica de M-FISH

M-FISH es una abreviatura aceptada de **Multi-color** o **hibridación in situ de fluorescencia Multiplex** y se utiliza para definir el cariotipo de 24 colores de preparaciones de cromosomas (también conocido como *cariotipo espectral* o *SKY*).

Se trata de una técnica FISH combinatoria en la que la mezcla de sondas contiene un conjunto de pinturas de ADN de biblioteca para cada cromosoma en una metafase. Cada conjunto de sondas cromosómicas está marcado con una combinación única de fluorocromos que, cuando se observan bajo luz fluorescente basada en filtros y se procesan mediante un sistema de imágenes, producen un «color» distinto.

Puede utilizarse para clasificar los cromosomas en un cariotipo e identificar material cromosómico reordenado.

- No se puede utilizar M-FISH de cromosoma completo para identificar reordenamientos cromosómicos internos como inversiones, deleciones o duplicaciones.
- Los cromosomas derivados no proporcionan directamente información sobre los brazos p o q.

M-FISH es una técnica experimental compleja de dominar, que requiere una buena experiencia en FISH de laboratorio y un uso eficiente de los componentes del microscopio.

- Los filtros adecuados para la obtención de imágenes fluorescentes y las lentes objetivo equivalentes a Plan-Fluor o Plan Apo son tan necesarios como el software del sistema de obtención de imágenes

Los kits de sondas M-FISH disponibles en el mercado utilizan una contratinción de DAPI con 5 etiquetas fluorocromáticas adicionales, lo que permite 31 combinaciones posibles (25-1), aunque normalmente solo se utilizan 24.

- Los kits de sondas M-FISH suelen utilizar fluorocromos similares, pero no necesariamente los mismos, y los filtros utilizados para un conjunto pueden no ser ideales para otro.
- Puede ser necesario obtener filtros adicionales o versiones modificadas de los utilizados en el trabajo FISH rutinario para reducir el riesgo de cualquier purga de luz procedente de las otras etiquetas del portaobjetos.
- Los filtros M-FISH deben ser normalmente de banda estrecha o con máximos de excitación o emisión diseñados para trabajar con los demás fluorocromos de la muestra y no solo para el más eficiente para un fluorocromo en concreto.

Descripción general de la captura

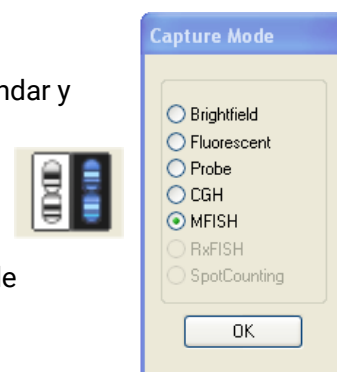
La captura M-FISH se basa en la [captura de sonda](#) estándar sin opción de modificación del umbral: existe un procesamiento automático en segundo plano de los datos sin procesar.

- Es esencial familiarizarse con los controles de pantalla y el flujo de trabajo de captura antes de intentar la configuración del M-FISH y las operaciones de captura.
- M-FISH es una técnica de captura manual y no puede utilizarse como parte de un flujo de trabajo automatizado de exploración y captura automática en un sistema de escaneo CytoVision.
- La captura manual en un sistema de escaneo CytoVision DX se puede realizar utilizando la función de reubicación metafásica. Consulte las **Instrucciones de uso del cariotipo CytoVision DX**.

Configuración de la captura

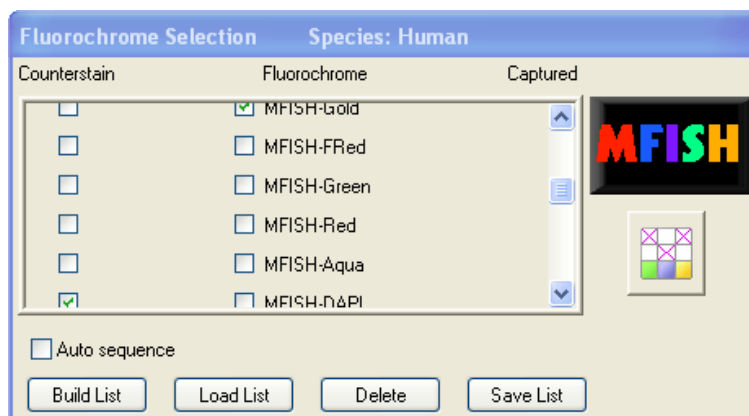
Haga clic en el icono del **modo de captura** en la pantalla de captura estándar y seleccione M-FISH.

- Se abre el panel de selección de fluorocromos.
- Si ha creado y guardado previamente una lista de captura M-FISH, cárguela; de lo contrario, cree una nueva lista utilizando las opciones estándar de la lista de construcción de sondas.



Lista de captura

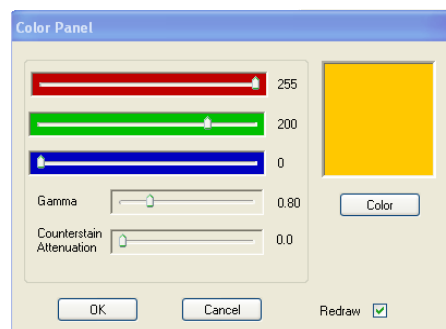
La lista de Captura en el panel de **Selección de Fluorocromos** debe crearse en el orden de captura, con la contratinción como último canal.



Se recomienda utilizar nombres de fluorocromos M-FISH creados especialmente con ajustes de color específicos para mejorar la superposición de colores que se verá en Analysis (análisis).

Los colores exactos de la sonda pueden modificarse, pero la configuración de color recomendada para los fluorocromos es:

Color Fluo	ROJO:	Verde	Azul
DAPI	63	63	63
Aqua/DEAC	0	145	255
FITC/Green	0	220	0
Gold/Cy3	255	200	0
Rojo	255	0	0
FRed/Cy5	0	0	255
Cy5.5	0	145	255
Aqua/DEAC y Cy5.5 no suele utilizarse juntos			



Fluomap

Una vez que la nueva lista de captura está lista, es necesario configurar el Fluomap. Se trata de las combinaciones únicas de fluorocromos que se encuentran en el kit de sondas que se está utilizando y que deben ajustarse para crear las clasificaciones M-FISH necesarias para la identificación cromosómica y el cariotipado.



- Haga clic en las casillas correspondientes bajo cada clase de cromosoma para establecer las combinaciones de sondas. Las cruces aparecerán.
- El FluoMap debe ajustarse al kit de sonda específico con el que esté trabajando.
- Los ejemplos que se muestran a continuación son sólo de referencia y muestran combinaciones de sondas M-FISH anteriores que pueden haber estado en uso en algún momento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
MF-Gold																								
MF-Cy5																								
MF-Cy5.5																								
MF-Green																								
MF-Red																								

Cambio M-FISH (Discontinuado)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Cy3 / Gold																								
Cy5 / FRed																								
DEAC / Aqua																								
Red																								
FITC / Green																								

SpectraVysion (Abbott/Vysis - Discontinuado)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
MFISH-Orange					X				X			X		X	X			X		X	X		X	X
MFISH-Cy5	X					X	X	X	X							X	X	X	X	X	X			
MFISH-Green				X		X				X	X					X	X	X			X	X	X	X
MFISH-Red			X					X			X		X		X				X		X	X		X
MFISH-DEAC		X					X			X			X	X		X			X	X	X	X	X	X
	Red	Green	Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Olive	Teal	Purple	Light Green	Light Blue	Light Yellow	Light Cyan	Light Magenta	Light Brown	Light Green	Light Blue	Light Yellow	Light Cyan	Light Magenta	Light Brown

24XCyte Variation-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
MFISH-Orange					X				X			X		X	X			X		X	X		X	X
MFISH-Cy5	X					X	X	X	X							X	X	X	X	X	X			
MFISH-Green				X		X				X	X					X	X	X			X	X	X	X
MFISH-Red			X					X			X		X		X				X		X	X		X
MFISH-DEAC		X					X			X			X	X		X			X	X	X	X	X	X
	Red	Green	Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Olive	Teal	Purple	Light Green	Light Blue	Light Yellow	Light Cyan	Light Magenta	Light Brown	Light Green	Light Blue	Light Yellow	Light Cyan	Light Magenta	Light Brown

24XCyte Variation-2

Una vez creado el fluomapa, haga clic en **Done** (Hecho) y guárdelo junto con la lista de capturas mediante la función **Save list** (Guardar lista) de la ventana de selección de fluorocromos.

Aunque los nombres de los fluorocromos son diferentes entre los distintos kits de sondas, sus propiedades espectrales son equivalentes. Un kit estándar de filtros M-FISH de banda estrecha sería:

- DAPI (estándar)
- Filtro Spectrum Aqua (para aguamarina o DEAC)
- Filtro Spectrum Green para Green, FITCand
- Filtro Spectrum Gold (amarillo) para Gold, Orange, Cy3, TRITC.
- Filtro Spectrum Red para Red, Texas Red o Cy3.5
- Filtro Spectrum FRed filter para Far Red o Cy5

Filtros y microscopía

Si utiliza filtros de microscopio preexistentes, asegúrese de que se trata de filtros de banda estrecha que impidan el sangrado de la señal, especialmente de las etiquetas de sonda cercanas como el naranja (Cy3) y el rojo.

- Los kits de sondas que utilizan Cy3/Orange y Texas Red/Cy3.5 en combinación deben ser imágenes con filtros que de estos 2 canales de color similares. Debe utilizarse Spectrum Gold de banda estrecha en lugar de un conjunto de filtros Spectrum Orange o TRITC de banda ancha.
- No utilice filtros genéricos «verdes», «naranjas» o «rojos» que pueden adquirirse en muchos proveedores de filtros, ya que aumentan el riesgo de que se produzcan filtraciones de color, lo que podría interferir en el procesamiento y la clasificación correctos.
- En caso de duda, póngase en contacto con su representante de asistencia Leica para comprobar las especificaciones del filtro y de la sonda.

Durante el uso del microscopio se recomienda reducir en lo posible la exposición a la luz ultravioleta más dañina (utilizada para la contratinción con DAPI), ya que la luz U.V. es un excitador genérico de todos los fluorocromos del portaobjetos, especialmente el Cy5/Far Red, que puede ser susceptible de decoloración.

- Normalmente, uno de los otros componentes de la sonda (por ejemplo, Spectrum Gold/Orange) muestra una intensidad de señal suficiente para encontrar células a bajo aumento y para el primer canal de captura.
- A continuación se captura la señal espectral FRed (Cy5) de menor intensidad, seguida de (sin ningún orden en particular) el verde, el rojo, el aguamarina y, por último, la contratinción DAPI
- Si es posible, utilice el control por software de una fuente de luz fluorescente (Xylis/X-Cite 120 PC) para reducir la intensidad de la luz que llega a la diapositiva, reduciendo al mínimo cualquier fotoblanqueamiento.

Captura de imágenes M-FISH

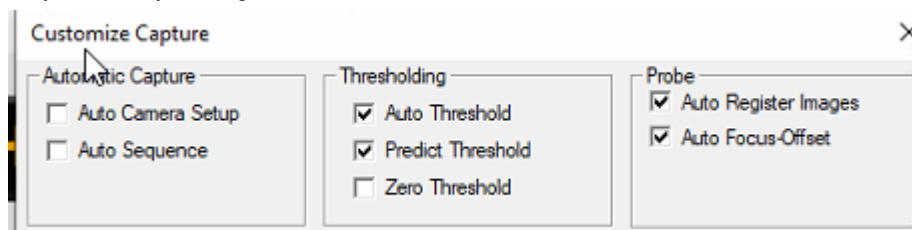
Ejemplo de procedimiento basado en la observación manual al microscopio para identificar las células para su captura.

El objetivo es capturar cada imagen de la forma más eficiente posible, reduciendo todo aquello que introduzca retrasos en el proceso o mantenga la luz fluorescente (especialmente la UV/DAPI) en el portaobjetos más tiempo del necesario.

- Si es posible, utilice uno de los canales de sonda más brillantes (como Spectrum Gold) para identificar las metafases para su captura.
- El rojo lejano (Cy5) no es visible al ojo, para determinar la exposición de la captura y el enfoque debe utilizar la imagen en vivo de la cámara. Evite utilizar la configuración automática para este canal debido a las largas exposiciones.
- Si debe utilizarse DAPI en su lugar, no mantenga la luz sobre el portaobjetos más tiempo del necesario para encontrar y capturar la imagen, a fin de reducir el fotoblanqueo de los canales de la sonda.
- El escaneado de portaobjetos M-FISH a 10x para crear una lista de portaobjetos para la reubicación en metafase requeriría el uso de DAPI, ya que no se esperaría que ningún otro canal mostrara suficiente intensidad y detalle de objeto para un sistema de escaneado.

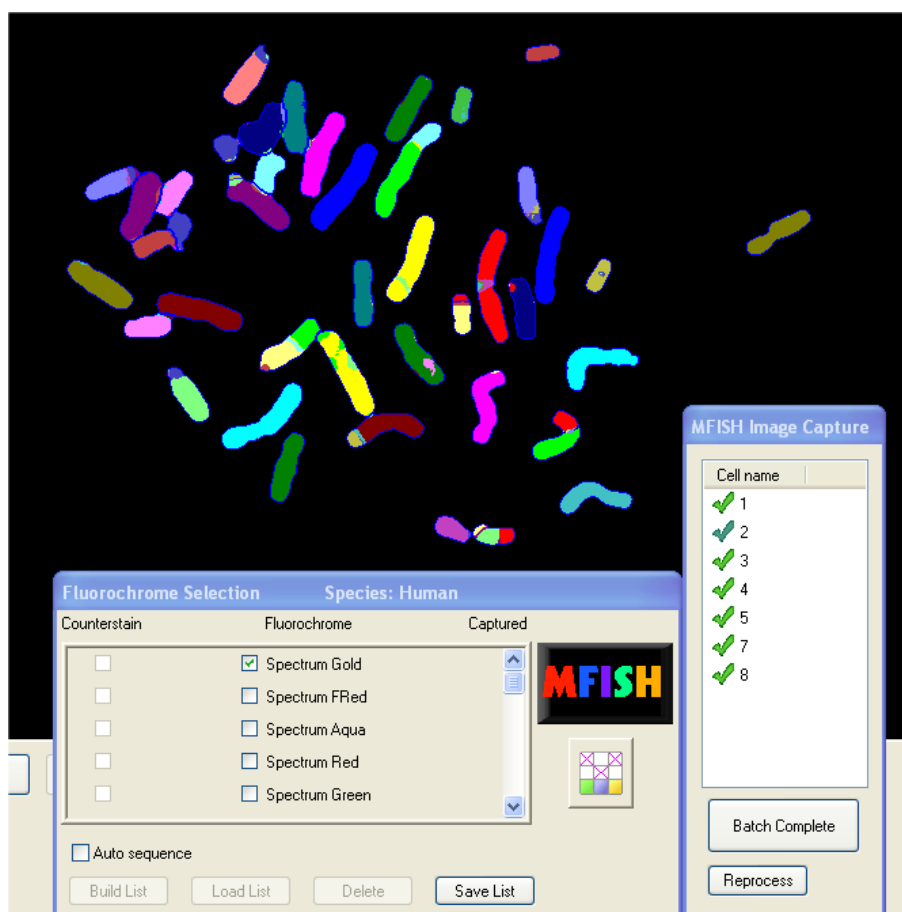
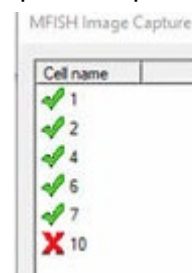
Opciones de personalización de captura

- Auto Threshold (umbral automático) debe estar activado; la configuración automática de la cámara debe estar desactivada.
- La primera captura manual debe identificar la exposición apropiada de la cámara utilizando AutoSetup (Autoajuste) bajo la ventana principal de la imagen para cada canal, que debe mantenerse para las capturas posteriores. Utilizar el autoajuste para el canal Far-Red introducirá retrasos innecesarios mientras se realizan cada vez los cálculos de la exposición prolongada.



1. **Abra o cree** un caso en el sistema y vaya a la **pantalla de captura**.
2. Localice visualmente las células a bajo aumento utilizando el **filtro Gold**.

3. Cambie a un 63x o 100x y capture primero Gold. El sistema realiza automáticamente la modificación del umbral y la imagen sin procesar guardada se mostrará en pantalla.
4. Capture a continuación el canal Far Red/Cy5. Este canal suele tener el requisito de exposición más largo y puede requerir un pequeño cambio de enfoque entre los otros canales.
5. Complete la captura de los otros canales y DAPI como lo haría con una imagen de sonda normal.
6. Una vez capturado el último canal, la aplicación empieza a procesar la célula y la opción New Cell (Nueva célula)/Live (en vivo) pasa a la siguiente célula lista para que se repita la captura.
7. Transcurridos unos segundos, el panel de *captura de imágenes MFISH* mostrará una marca verde o una cruz roja.
 - una cruz roja indica algún error en el procesamiento, normalmente debido a una fluorescencia baja o pobre o a un contraste deficiente. Si se observa esto, siga el procedimiento de modificación del umbral descrito a continuación o vuelva a capturar la célula.
8. Una vez completadas todas las células, seleccione «Batch Complete» (Lote completado) o pase a la pantalla de inicio para finalizar el procesamiento y cerrar las imágenes metafásicas listas para el análisis.



Nota: No es posible capturar células utilizando otros modos de captura en un portaobjetos M-FISH.

Modificación manual del umbral

En la captura rutinaria de M-FISH se espera el ajuste de *umbral automático* para una captura eficiente de todos los canales y el guardado de la imagen en bruto de cada canal de sonda que se procesan para crear la metafase para el análisis.



Esto puede desactivarse en el panel Customize Capture (Personalizar captura) para permitir un umbral manual para el canal de contratinción durante el procedimiento de captura en vivo.

- Durante la captura de la contratinción (DAPI) canalice el panel de modificación del umbral.
- Realice una **sustracción de fondo** en la imagen, se recomienda un ajuste de entre 15 y 25 en función del tamaño de los cromosomas.
- Después de esto, realice la modificación del umbral de forma normal. Solo el canal de contratinción presenta las opciones de umbralización manual, los canales de sonda se siguen procesando automáticamente.

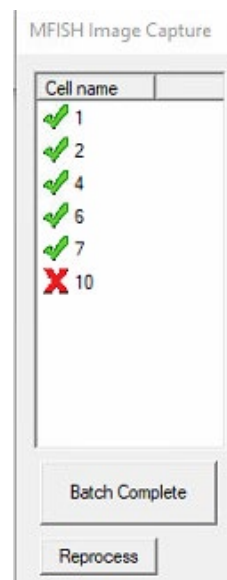
Puede utilizarse para evitar que los cromosomas pequeños o pálidos se pierdan o se borren durante el paso de modificación del umbral automática; sin embargo, no se recomienda para la captura rutinaria, ya que añade un retraso en el proceso de captura.

Nueva modificación del umbral

Una vez finalizada la captura se puede volver a modificar el umbral de la imagen de contratinción utilizando el panel de procesamiento M-FISH

Hay 2 ocasiones en las que puede ser necesario volver a modificar el umbral manualmente de la célula después del procesado:

- Si una célula falla en el procesamiento automático (una cruz roja solo suele aparecer cuando ha fallado el registro de la imagen, generalmente debido a uno o más componentes débiles o a un DAPI mal contrastado).
- Si el procesamiento automático ha dado lugar a que se supriman cromosomas pequeños o cromosomas próximos a núcleos. Esto ocurre con mayor frecuencia si la imagen de la contratinción con DAPI es deficiente, ya que el sistema no puede obtener correctamente una máscara completa de todos los cromosomas de la metafase.



Procedimiento

1. Seleccione la célula en la ventana de **captura de imágenes M-FISH** (si no se ha podido procesar aparecerá un mensaje de error).
2. Haga clic en el botón **Threshold** (Umbral) de la barra de herramientas principal de la pantalla. Aparecerá una ventana estándar de Umbral.
3. Realice una **sustracción de fondo** en la imagen, se recomienda un ajuste de entre 15 y 25 en función del tamaño de los cromosomas.
4. Después de esto, modifique el umbral como normal y acepte la operación. El sistema volverá a procesar la imagen utilizando su nueva máscara DAPI.

Nota: Tras el reprocesamiento de células individuales puede que no se pueda cargar la metafase de la última célula del portaobjetos correspondiente. Si esto ocurre, reinicie el software de aplicación y vuelva a abrir el caso antes de continuar.

Reprocesamiento

El reprocesado puede utilizarse en cualquier momento una vez finalizada la captura M-FISH para reiniciar todas las células del portaobjetos, borrando cualquier imagen metafásica o cariotipo existente, y repetir de nuevo el procesamiento de imágenes sin procesar.

- Se abre la ventana Fluomap que permite modificar cualquiera de las combinaciones de sondas (si se cometió un error en la creación original del mapa y no se identificó hasta después de la captura).

Apéndice: Ejemplos de procedimientos paso a paso

Para todos los procedimientos de ejemplo, asegúrese de que la lámpara fluorescente y los componentes del microscopio están encendidos. Para los sistemas de escaneado encienda el GSL y confirme que hay suficiente aceite en el mecanismo de engrase.

- Cuando cambie entre objetivos de aumento bajo y alto, utilice siempre los controles del software (panel de objetivos o teclas de función).

Captura de la sonda estándar



Ejemplo de procedimiento para la captura manual de imágenes FISH tras la carga manual del portaobjetos y la identificación de las células.

1. Acceda a la pantalla Standard Capture (Captura estándar) seleccionando el icono Capture Screen (Capturar pantalla) en la barra de herramientas principal.
2. Abra o cree un caso y seleccione un portaobjetos en el Navegador. Si necesita crear un portaobjetos, pulse el botón derecho del ratón sobre el caso y elija **New Slide (Nuevo portaobjetos)** en el menú.
3. Haga clic en **Capture Mode** (Modo de captura) y elija **Probe** (Sonda).
4. Configure los fluorocromos que utilizará para la captura en el panel de selección de fluorocromos (cargue una lista guardada previamente).
5. Seleccione las opciones que desea utilizar desde **Customize** (Personalizar) (Cargar una plantilla).
6. Haga clic en **New cell (Nueva célula)**.
7. Haga clic en **Live (en vivo)**.
8. Enfoque y centre la imagen.
9. (Opcional) Si tiene una fuerte intensidad de contramancha abra el panel de interfaz de la lámpara fluorescente y ajuste el porcentaje de la intensidad de la lámpara a un valor más bajo o reduzca el fotoblanqueo de los U.V. Filtro DAPI.
10. Haga clic en **Auto Setup (Configuración automática)** Los ajustes de la cámara optimizan el contraste de la imagen para cualquier cambio de enfoque o posición.
11. Si es difícil conseguir un buen contraste, abra la ventana **Capture Setup** (Configuración de la captura) para ajustarlo;
 - los controles deslizantes (avanzados) de Configuración automática, que controlan los
 - los controles deslizantes Negro y Brillo hasta conseguir un contraste de imagen mejorado. El fondo debe tener un aspecto liso y oscuro. Si la imagen tiene un aspecto plano, gris claro, puede que tenga demasiada luz; baje el nivel de exposición.
12. **Capture** una vez enfocada la imagen y continúe con el proceso de modificación del umbral.
13. Si **Auto Threshold** (Umbral automático) está activado, la imagen se procesará y la captura continuará.
 - En caso contrario, aparecerá la pantalla de modificación del umbral.
 - Ajuste el umbral para eliminar cualquier fondo no deseado.
14. Si la secuencia automática está activada, el sistema continuará con el siguiente fluorocromo tras la modificación del umbral.
 - Si no es así, pulse en **Live** (en vivo) para capturar el siguiente fluorocromo.
15. Repita los pasos 7-12 hasta que se hayan capturado todos los fluorocromos.
 - Si **Auto Camera Setup** (configuración automática de la cámara), **Auto Sequence** (secuencia automática) y **Auto Threshold** (umbral automático) están activados, el sistema seguirá capturando el resto de los fluorocromos.



Captura de sonda manual del fotograma de imagen

Ejemplo de procedimiento para la captura manual de imágenes FISH tras la carga manual del portaobjetos y la identificación de las células.



1. Abra o cree un caso y seleccione un portaobjetos en el Navegador. Si necesita crear un portaobjetos, pulse el botón derecho del ratón sobre el caso y elija **New Slide (Nuevo portaobjetos)** en el menú.
2. Entre en la pantalla de captura manual de la sonda seleccionando el icono negro de la cámara en la barra de herramientas principal (solo está disponible en la pantalla de inicio).
3. Configure o cargue la lista de captura de fluorocromos que vaya a utilizar para la captura.
4. Confirme que la contratinción está ajustada, que cada canal tiene el color correcto, la asignación de filtros y los ajustes de pila Z adecuados.
5. Seleccione el componente de contratinción, cuando el obturador fluorescente esté abierto podrá ajustar la barra deslizante de exposición si es necesario para ver la imagen en vivo.
6. Enfoque y posicione la imagen como desee.
7. Confirme que **Auto Exposure** (exposición automática) está marcada y haga clic en **Capture** (Capturar)
 - Se calcula la exposición óptima de la cámara para la contratinción y la imagen se captura automáticamente.
 - Una vez movidos los filtros, se calcula automáticamente la exposición óptima de la cámara para el primer canal de la sonda y se captura la imagen.
 - Los canales restantes se capturan automáticamente en secuencia.
8. Repita los pasos 5 a 7 para cada nueva imagen.

Alternativa: **Captura** con exposición de ajuste automático basada en un área seleccionada.

9. Seleccione el componente de contratinción, haga clic en una zona de la imagen en directo para ajustar automáticamente la exposición de la cámara utilizando únicamente la información de esa zona.
10. Enfoque y posicione la imagen como desee.
11. Haga clic en **Capture (Capturar)**
 - La exposición óptima de la cámara se recalcula para la contratinción en función de la zona seleccionada y se captura automáticamente la imagen.
 - Una vez movidos los filtros, se calcula automáticamente la exposición óptima de la cámara para la zona seleccionada en el primer canal de la sonda y se captura la imagen.
 - Los canales restantes se capturan automáticamente en secuencia.
12. Repita los pasos 9 a 11 para cada nueva imagen.

Alternativa: **Captura** (sin ajuste automático)

13. Seleccione el componente de contratinción, si es necesario, ajuste la barra deslizante de exposición manualmente o haciendo clic en una zona seleccionada de la imagen en vivo.
14. Enfoque y posicione la imagen como desee.
15. Seleccione el siguiente canal y, una vez movido el filtro, ajuste la barra deslizante de exposición manualmente o haciendo clic en una zona seleccionada de la imagen en directo.
16. Repita la operación para los canales restantes, asegurándose de que se preajusta una exposición óptima de la imagen en directo para cada componente de la lista de captura.
17. Confirme que **Auto Exposure** (exposición automática) no está marcada y haga clic en **Capture** (Capturar)
 - se captura inmediatamente la imagen de contratinción y, una vez desplazados los filtros, cada canal fluorocromo sin ajustar la exposición de la cámara.
18. Repita los pasos 13 - 17 para cada nueva imagen (reajustando la exposición en los pasos 15 y 16 en más imágenes si es necesario).

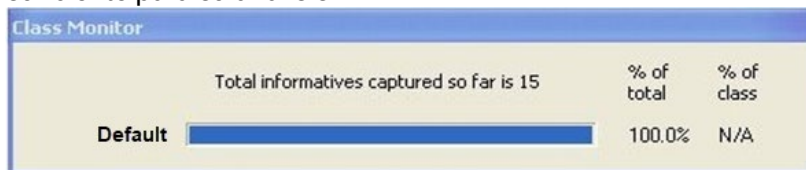
Captura manual de puntos



Ejemplo de procedimiento para la captura de imágenes de recuento de puntos en un sistema de captura.

1. Acceda a la pantalla Standard Capture (Captura estándar) seleccionando el icono Capture Screen (Capturar pantalla) en la barra de herramientas principal.
2. Abra o cree un caso y seleccione un portaobjetos en el Navegador. Si necesita crear un portaobjetos, pulse el botón derecho del ratón sobre el caso y elija New Slide (Nuevo portaobjetos) en el menú.
3. Haga clic en **Capture Mode** (Modo de captura) y elija *Spot Counting* (recuento de puntos) 
4. Se abrirá la ventana **Existing Assays** (Ensayos existentes), seleccione un ensayo apropiado para el portaobjetos y el kit de sondas que vaya a utilizar y haga clic en Aceptar para asignarlo al portaobjetos.
5. Confirme que los ajustes de **fluorocromos en el panel de selección** de fluorocromos son correctos para el portaobjetos y las sondas que se van a capturar.
6. Confirme que las opciones **Auto Camera Setup** (Configuración automática de la cámara) y **Save stack** (Guardar pilas) están seleccionadas en la ventana **Capture Customize** (Personalizar captura).
7. Utilice la tecla de acceso directo del teclado (número) para desplazarse al filtro de contratinción correcto y abrir el obturador fluorescente.
8. Busque manualmente una zona que contenga material celular y cambie al objetivo de captura de gran aumento utilizando el panel *Objectives* (Objetivos). Enfoque y transfiera toda la luz a la cámara.
9. Haga clic en **New cell** (Nueva célula)
10. Haga clic en **Live* (en vivo)***. La imagen se muestra en pantalla y la exposición de la cámara se ajusta para obtener un contraste óptimo.
11. (Opcional) Si tiene una fuerte intensidad de contramancha abra el panel de interfaz de la lámpara fluorescente y ajuste el porcentaje de la intensidad de la lámpara a un valor más bajo o reduzca el fotoblanqueo de los U.V. Filtro DAPI. 
12. Reenfoque y coloque las células en la imagen en directo. Se puede seleccionar la *configuración automática* si esto cambia el contraste o la saturación. Si es necesario, abra la ventana **Capture & Fluorochrome Setup** (Configuración de captura y fluorocromos) para ajustar
 - los controles deslizantes Black (Negro) y Bright (Brillo) hasta conseguir un contraste de imagen mejorado
 - los controles deslizantes (avanzados) de configuración automática pueden modificarse para mejorar el contraste de la **configuración automática**
13. Vuelva a comprobar el enfoque de la imagen y haga clic en **Capture** Capturar. La imagen se guardará.
14. Si **Auto Sequence**(secuencia automática) está activada, el sistema capturará los fluorocromos restantes en secuencia*, ajustando automáticamente la exposición de la cámara y capturando los múltiples planos de pila Z configurados en el ensayo.
15. Si la **secuencia automática** está desactivada, pulse **Live* (en vivo)**. para capturar el siguiente fluorocromo y repita los pasos 10 - 13 hasta que se hayan capturado todos los fluorocromos.
16. Haga clic en el botón **Class Monitor** (Monitor de clase) situado en la parte inferior de la ventana Fluorochrome Selection (Selección de fluorocromos) para ver cuántas células se han procesado y puntuado a partir de la captura.

17. Repita los pasos 9 - 12 (13) para capturar imágenes posteriores en distintas zonas de la diapositiva hasta que el total de informativos (total informativos) del **monitor de clase** sea suficiente para su análisis.



18. Pase a la pantalla de **análisis** para finalizar la captura y el procesamiento.

* Se le pedirá que cambie los filtros si no tiene una interfaz activa para el revólver dicróico del microscopio.

GSL: Recuento de puntos automático

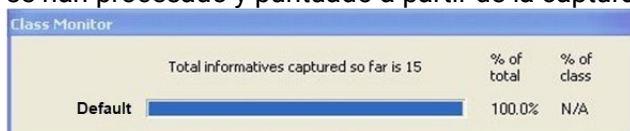
Ejemplo de flujo de trabajo de procedimiento para el escaneado y la captura automática de imágenes de recuento de puntos FISH interfásicos en un sistema de escaneado GSL sin etiquetas de códigos de barras.

1. Desplácese a la pantalla de **escaneado**, permitiendo que la aplicación conecte e inicie el hardware. 
2. (Opcional) Cargue un portaobjetos en la platina y utilice el [procedimiento de captura de puntos manual](#) para varias imágenes con el fin de confirmar los valores de la cámara, el filtro y la pila Z.
 - Esto creará un Marco de Imagen donde los parámetros del ensayo pueden ser evaluados en un conjunto controlado de imágenes. 
 - Descargue la bandeja al terminar y limpie el portaobjetos de cualquier resto de aceite si se va a volver a utilizar para escanear.
3. En la pantalla Scan (Escanear) seleccione el icono **Scan batch of slides** (escanear lote de portaobjetos).
4. Haga clic y resalte el icono de diapositiva 1 (posición 1, bandeja 1);
 - Seleccione la caja en la que se guardarán los datos de la imagen. 
 - Seleccione una plantilla de escaneado adecuada para la diapositiva.
5. (Opcional) Puede asignar un nombre a cada portaobjetos haciendo clic en la etiqueta situada en el extremo esmerilado de la pantalla del portaobjetos. 
6. Edite la plantilla, tras confirmar que está configurada para búsqueda fluorescente e interfásica y que el modo de captura está ajustado a **SpotCounting** (Recuento de puntos).
7. Haga clic en el botón **Select SPOT Assay** (Seleccionar ensayo SPOT) para abrir el diálogo **Existing Assay** (Ensayo existente).
 - Seleccione un ensayo de la lista o cree un nuevo ensayo apropiado para el portaobjetos.
 - Confirme los ajustes del ensayo y haga clic en **OK** para asignar el ensayo seleccionado.
8. La plantilla de escaneado está lista para ser utilizada. Haga clic en **OK** para asignarla a la diapositiva seleccionada.
9. Coloque el portaobjetos de muestra correcto (que coincida con el caso seleccionado en el paso 5) en la posición 1 de la bandeja.
10. Seleccione el icono de portaobjetos siguiente y asigne una plantilla de caso y escaneado. Añada el portaobjetos de muestra correspondiente en la bandeja y compruebe que está colocado correctamente.
11. Repita la operación para el resto de portaobjetos y posiciones que se utilizarán en la primera bandeja. Coloque la bandeja en la primera posición (la más baja) del apilador/casete.
12. Repita el paso para un máximo de 5 portaobjetos en la bandeja 2, cargando la bandeja en la siguiente posición (la más baja) en el apilador/casete. **Ctrl** o **Mayús** permiten seleccionar

varios portaobjetos con el ratón y asignarles el mismo caso o plantilla.

- En los sistemas GSL 120 repita este procedimiento para todas los portaobjetos y bandejas restantes que vaya a utilizar, después coloque el casete en la unidad del apilador y cierre la puerta.

13. Seleccione **Scan** Escanear: el primer portaobjetos se escaneará a 10x para encontrar células, se añadirá aceite automáticamente y después se capturará a gran aumento.
14. Durante la captura, la pantalla mostrará la pantalla de captura estándar en el modo de **recuento de puntos** (para más información, consulte [Captura automática de puntos](#)).
15. (Opcional) Haga clic en el botón Class Monitor (Monitor de clase) situado en la parte inferior de la ventana Fluorochrome Selection (Selección de fluorocromos) para ver cuántas células se han procesado y puntuado a partir de la captura.



16. Cuando se alcance el primero de los recuentos de parada del ensayo, la captura finalizará y pasará al siguiente portaobjetos, repitiéndose el escaneado, el engrase y la captura automática hasta que se completen todos los portaobjetos.

