

Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives



*CytoVision** DX (9.0) Probe

*Brevetto e marchio commerciale registrati negli USA e in altre giurisdizioni in tutto il mondo.

Istruzioni operative



CytoVision DX versione 9.0 è destinato all'uso diagnostico in vitro

Istruzioni per l'uso di CytoVision* DX: Sonda

Questo manuale si applica ai sistemi di scansione e acquisizione *CytoVision DX* e al software applicativo *CytoVision DX* versione 9.0

Informazioni sul copyright

© 2024 Leica Biosystems Richmond, Inc. Tutti i diritti riservati.

LEICA e il logo Leica sono marchi registrati di Leica Microsystems IR GmbH.

CytoVision è un marchio di Leica Biosystems Richmond, Inc. Tutti i marchi di terze parti appartengono ai rispettivi proprietari.

*Brevetto e marchio commerciale registrati negli USA e in altre giurisdizioni in tutto il mondo.

Le informazioni contenute in questo documento sono soggette a modifica senza preavviso e non rappresentano un impegno da parte di Leica Biosystems Richmond, Inc.

Nessuna parte di questo manuale può essere copiata o distribuita, trasmessa, trascritta, archiviata in un sistema di recupero o tradotta in qualsiasi linguaggio umano o informatico, in qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo, elettronico, meccanico, magnetico, manuale o altro, o divulgata a terzi senza l'espressa autorizzazione di Leica Biosystems Richmond, Inc, 5205 Route 12, Richmond, IL 60071, USA.

I sistemi *CytoVision DX* sono prodotti e distribuiti da:



Leica Biosystems Richmond, Inc.

5205 Route 12

Richmond, IL 60071

USA

Tel.: (800)-537-4669



Recapiti

Per i dettagli di contatto del rivenditore e dell'assistenza Leica Biosystems più vicini, visitare il sito www.LeicaBiosystems.com.

Indice

Avvertenze e note	6
Introduzione	7
Risorse.....	7
Identificazione dei simboli	8
Avvertenze e precauzioni.....	8
Specifiche relative al campione e al vetrino	9
Panoramica di <i>CytoVision DX Probe</i>.....	10
Scansione di vetrini FISH.....	10
Acquisizione e visualizzazione FISH.....	11
Visualizzazione e analisi delle immagini FISH	11
Tipi di dati e immagini FISH	12
Accesso utente e accesso software applicazione	14
Scansione dei vetrini interfase.....	15
Procedura di avvio rapido.....	15
Modelli vetrino	15
Classificatori	15
Opzioni di acquisizione automatica.....	15
Caricamento di vetrino e vassoio	16
Scansione batch di vetrini (interfase)	18
Impostazione della scansione manuale.....	19
Assegnazione modello e caso	19
Flussi di lavoro di impostazione scansione manuale.....	20
Scansione dei codici a barre.....	22
Configurazione assegnazione del vetrino	22
Flussi di lavoro di scansione dei codici a barre	23
Modelli di vetrini (FISH).....	24
Area di scansione	24
Pre-Scan (Pre-scansione).....	25
Scansione.....	25
AutoCapture	26
Visualizzazione e regolazione delle immagini	29
Revisione degli elenchi di interfase	30
Visualizzazione note (Interfase).....	31
Visualizzazione vetrino (interfase).....	32
Classificatori di scansione.....	33
Acquisizione automatica.....	35
Acquisizione automatica.....	35

Acquisizione Probe (immagini cellule)	37
Controllo obiettivo	37
Acquisizione Probe (Sonda): Panoramica della procedura	38
Comandi di acquisizione	38
Elenchi acquisizioni	39
Impostazione fluorocromi e acquisizione	40
Personalizzazione dell'acquisizione	43
Sogliatura	45
Sogliatura automatica	46
Risogliatura dell'immagine RAW	46
Modalità di acquisizione (Framelist)	47
Controllo obiettivo	48
Acquisizione framelist: Panoramica della procedura	48
Opzioni di configurazione dell'acquisizione	49
Aggiunta di canali.....	49
Impostazione di un canale	49
Lavorare con gli elenchi di acquisizioni.....	52
Acquisizione di immagini	52
Completamento dell'acquisizione	53
Visualizzazione dell'immagine sonda	54
Visualizzazione schermo	54
Ricerca e risoluzione problemi	57
Sistema di acquisizione	57
Errori di connessione al microscopio.....	57
Effetto della qualità della luce del microscopio.....	57
Sistemi di scansione GSL	57
Errori di connessione al GSL	57
Problemi di messa a fuoco della scansione 10x	58
Problemi di classificazione della scansione 10x.....	58
Problemi di messa a fuoco di acquisizione 63x.....	58
Problemi di acquisizione del canale della sonda.....	59
Compatibilità vetrino/vassoio	59
Esportazione dei log diagnostici	60
Appendice: Conteggio spot	61
Panoramica del conteggio spot	61
Test conteggio spot	62
Modifica dei test per l'acquisizione spot.....	63
Acquisizione e scansione spot	65
Modello di vetrino (impostazione scansione).....	65

Acquisizione manuale.....	67
Acquisizione e monitoraggio classe	67
Arresto acquisizione automatica SPOT	68
Appendice: Tessuti FISH	69
Panoramica Tissue FISH.....	69
Scansione e acquisizione Tissue FISH	69
1) Scansione automatica e acquisizione automatica:	69
2) Scansione automatica e markup manuale della regione:	70
3) Selezione manuale della regione per acquisizione automatica:.....	70
Acquisizione manuale.....	70
Incisione vetrini	71
Markup Tissue FISH (acquisizione differita)	72
Schermata Markup Viewer (Visualizzatore marcatura)	72
Appendice: Acquisizione M- FISH.....	75
Introduzione alla tecnica M-FISH	75
Panoramica sulla cattura	75
Configurazione dell'acquisizione.....	76
Elenco acquisizioni	76
Fluomap.....	77
Filtri e microscopia.....	78
Acquisizione di immagini M-FISH.....	79
Sogliatura manuale.....	80
Ri-sogliatura	81
Rielaborazione	81
Appendice: Procedure di esempio passo dopo passo.....	82
Acquisizione sonda standard	82
Acquisizione della sonda manuale del frame dell'immagine	83
Acquisizione manuale Spot	84
GSL: Conteggio automatico degli spot.....	85

Avvertenze e note

Sebbene siano stati fatti tutti gli sforzi per garantire l'accuratezza delle informazioni, alcuni dettagli e illustrazioni potrebbero differire tra le singole varianti di sistema.

È possibile che non tutte le categorie siano applicabili alla configurazione dell'utente finale.

Specifiche e prestazioni

Per le specifiche del prodotto e dei componenti, vedere le **specifiche relative a CytoVision DX**.

Installazione dell'hardware

I componenti hardware del sistema di scansione e acquisizione di *CytoVision DX* sono forniti per l'installazione solo da Leica Biosystems o dai suoi rappresentanti autorizzati.

Installazione del software applicativo

Le workstation PC fornite da Leica Biosystems saranno preinstallate con il software applicativo. Per istruzioni specifiche sull'installazione dell'applicazione su un PC separato, vedere la **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

Training (formazione)

Questo manuale e la **Guida per l'utente di CytoVision DX** sono complementari alla formazione dell'operatore e ad altre istruzioni avanzate fornite da Leica Biosystems o dai suoi rappresentanti autorizzati.

Manutenzione e risoluzione dei problemi

Per informazioni sulla risoluzione dei problemi di scansione e acquisizione, vedere il capitolo **Risoluzione dei problemi**.

Per informazioni sulla manutenzione generale del sistema e sulla risoluzione dei problemi, vedere la **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

Riparazione

Le riparazioni possono essere eseguite solo da un rappresentante autorizzato Leica Biosystems. Dopo qualsiasi intervento di riparazione, chiedere al tecnico di eseguire controlli di funzionamento per confermare che il prodotto sia nelle condizioni operative previste.

Sicurezza informatica

Tenere presente che le workstation sono soggette a malware, virus, corruzione dei dati e violazioni della privacy. Per le linee guida sulla sicurezza informatica per gli utenti finali, consultare la **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

Collaborare con il proprio amministratore IT per proteggere le workstation seguendo le politiche di sicurezza e sulla password del proprio istituto. Per istruzioni e raccomandazioni specifiche sulla protezione delle workstation e dei server, consultare la sezione **Specifiche di CytoVision DX; Amministrazione di rete**.

Sicurezza

La protezione della sicurezza potrebbe essere compromessa se questo dispositivo viene utilizzato in un modo non specificato dal produttore.

Per informazioni sul funzionamento e la sicurezza del sistema, consultare la **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

Introduzione

Il sistema **CytoVision DX** è un sistema di creazione e visualizzazione di vetrini digitali automatizzato qualitativo.

Il sistema CytoVision DX è destinato all'uso diagnostico in vitro come ausilio per un tecnico qualificato allo scopo di rivedere e interpretare le immagini digitali dei cromosomi in metafase provenienti dal sangue periferico e dal midollo osseo.

- Il sistema CytoVision DX aiuta a individuare i nuclei di interfase e metafase sui vetrini standard per microscopio che altrimenti sarebbero adatti alla visualizzazione manuale mediante microscopia convenzionale a campo chiaro e a fluorescenza.
- È responsabilità del tecnico qualificato impiegare procedure e misure di sicurezza appropriate per garantire la validità dell'interpretazione delle immagini ottenute utilizzando il sistema CytoVision DX.

Assicurarsi di seguire le buone pratiche di laboratorio appropriate e le politiche e le procedure richieste dal proprio istituto per la preparazione, l'elaborazione, la conservazione e lo smaltimento dei vetrini.

Utilizzare questa apparecchiatura solo per questo scopo e nel modo descritto in questo documento e nella **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

Risorse

Risorsa	Descrizione
Guida per l'utente di CytoVision DX 23MAN9D03	Fornisce informazioni di riferimento e istruzioni per la calibrazione utente, la scansione di vetrini, l'acquisizione di immagini, la visualizzazione di immagini, la gestione di casi e dati, la risoluzione dei problemi e la manutenzione.
Istruzioni per l'uso di CytoVision DX Karyotyper 23MAN9D02	Contiene istruzioni per la scansione di vetrini in metafase, l'acquisizione di immagini, la visualizzazione di immagini, l'analisi cromosomica (cariotipizzazione) e la risoluzione dei problemi relativi alle applicazioni.
Istruzioni per l'uso di CytoVision DX Probe 23MAN9D01	(Questo documento) Contiene istruzioni per la scansione di vetrini fluorescenti (FISH), l'acquisizione di immagini, la visualizzazione di immagini, l'analisi cromosomica (cariotipizzazione) e la risoluzione dei problemi delle applicazioni (questo documento).
Specifiche di CytoVision DX 23MAN9D03	Fornisce specifiche dettagliate per le opzioni del prodotto <i>CytoVision DX</i> .

Identificazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	AVVERTENZA , fascio laser: proteggere gli occhi e la cute dall'esposizione Radiazione ottica, non guardare mai direttamente nel raggio di luce.
	ATTENZIONE : Pericolo di pizzicamento: tenere lontane le dita dalle parti mobili.
	Marchio di conformità CE
	Produttore

Avvertenze e precauzioni

Un sistema di acquisizione o scansione dotato di microscopio o di componenti di scansione motorizzati è uno strumento di precisione che deve essere maneggiato con cura e utilizzato solo da personale adeguatamente formato. Evitare sempre di sottoporre il sistema a urti improvvisi e violenti.

Per altre informazioni consultare la **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

Specifiche relative al campione e al vetrino

Caratteristica	Dettagli
Tipo di campione	La funzionalità <i>CytoVision DX</i> Probe viene utilizzata per il rilevamento e l'acquisizione di immagini di cromosomi in metafase, nuclei cellulari in interfase e tessuti colorati con fluorescenza. I campioni devono essere creati secondo le tecniche di coltura cellulare e preparazione accettate, oltre a essere presentati su vetrini per microscopio per l'acquisizione d'immagine.
Colorazione del campione	Il sistema è ottimizzato per la colorazione DAPI delle cellule in interfase. Le prestazioni non sono convalidate su tutte le possibili tecniche di colorazione e preparazione dei campioni e sono direttamente correlate alla qualità e all'intensità della colorazione del campione e ai detriti di fondo sul vetrino del microscopio. L'intensità della colorazione atipica o uno sfondo ricco di elementi possono ridurre l'efficienza di individuazione delle cellule e di acquisizione automatica e richiedere un ulteriore intervento da parte dell'utente.
Specifiche del vetrino	Tipo di vetrino: vetrini per microscopio in vetro con bordi squadrati (verticali). Dimensioni del vetrino: angolo di 90° nell'intervallo da 75,1 a 76,1 mm di lunghezza; da 24,9 a 26,1 mm di larghezza; da 0,9 a 1,2 mm di spessore • I vetrini che superano tali dimensioni, potrebbero non essere adatti al vassoio GSL e non sono supportati per il funzionamento del sistema di scansione. • I vetrini più piccoli di queste dimensioni o con angoli a 45° (tagliati) potrebbero non entrare nel vassoio GSL standard e devono essere utilizzati con il vassoio alternativo (smussato), articolo 23GSL903XXX001, che deve essere specificato al momento dell'ordine del sistema. Si sconsiglia l'uso di vetrini non di vetro perché potrebbero non inserirsi saldamente oppure muoversi nel tavolino, influenzando negativamente sulle prestazioni del sistema e sulla qualità d'immagine.
Vetrino coprioggetto	Per l'imaging a fluorescenza sono richiesti l'uso e il montaggio di un vetrino coprioggetto in vetro. • Uno spessore del vetrino coprioggetto pari a 170 µm (+/- 5 µm) è ottimale per la precisione ottica con lenti dell'obiettivo a immersione in olio ad alto ingrandimento. • Il vetrino coprioggetto non deve sporgere oltre il margine del vetrino in vetro. L'intero vetrino coprioggetto e l'etichetta devono essere aderenti al vetrino. • L'adesivo per fissaggio per il vetrino coprioggetto deve essere privo di bolle d'aria e deve riposare prima di essere utilizzato. Il montaggio del vetrino coprioggetto non deve impedire agli obiettivi del microscopio di raggiungere le loro posizioni focali in relazione al campione.
Limitazioni relative ai vetrini	I vetrini colorati con DAPI devono presentare un'intensità di colorazione brillante e ad alto contrasto visibile all'utente quando si osserva a 10x attraverso gli oculari del microscopio, con anti-sbiadimento per ridurre il fotobleaching. Una concentrazione o un'intensità ridotte di colorazione DAPI sul vetrino possono portare a una minore affidabilità della messa a fuoco 10x e del funzionamento della scansione o a errori della scansione.

Panoramica di CytoVision DX Probe

Le istruzioni operative contenute in questo documento riguardano il controllo dell'applicazione e le operazioni specifiche per la scansione, l'acquisizione, la visualizzazione e le procedure di punteggio dei vetrini FISH applicabili ai sistemi CytoVision DX configurati per il modulo software con licenza **Probe**.

È necessario che l'utente abbia familiarità con l'uso generale dell'applicazione, le funzioni dello schermo, i comandi dell'interfaccia hardware, la gestione dei casi, le funzioni di visualizzazione dello schermo e delle immagini e le applicazioni associate che sono comuni a tutti i sistemi installati con il software applicativo CytoVision DX.

- Tali elementi sono indicati in dettaglio nella **guida per l'utente di CytoVision DX**:

Sono fornite istruzioni operative aggiuntive per le istruzioni specifiche relative al campione e al flusso di lavoro sulle procedure di scansione, acquisizione e cariotipizzazione dei vetrini in metafase.

- Tali elementi sono espressi in dettaglio nelle istruzioni operative del **CytoVision DX Karyotyper**:

Tutte le decisioni di interpretazione delle immagini sono prese dall'utente. Non vi è alcun requisito qualitativo per il campione, tuttavia, gli strumenti di acquisizione e visualizzazione delle immagini sono ottimizzati per le immagini acquisite utilizzando un obiettivo per microscopio ad immersione in olio ad alto ingrandimento con materiale campione colorato con DAPI che visualizza sonde di DNA a colori utilizzando set di filtri a fluorescenza a banda stretta abbinati al campione.

Scansione di vetrini FISH

La scansione di vetrini FISH e l'acquisizione automatica utilizzano le funzioni di ricerca, classificazione, ricollocazione e acquisizione del campione fluorescente del software applicativo.

In anticipo a qualsiasi scansione e acquisizione automatica;

- È necessario completare una **calibrazione della scansione fluorescente** per l'intensità della fotocamera e gli offset di messa a fuoco tra gli obiettivi di scansione e acquisizione.
- Le modalità di acquisizione automatica (*AutoCapture*) del modello di vetrino utilizzano le impostazioni di acquisizione e fluorocromo dalla configurazione *Build List (Crea elenco)*, *Save List (Salva elenco)* o *Customize Capture (Personalizza acquisizione)* della schermata **Capture (Acquisizione)**. Tali elementi devono essere impostati e configurati prima di qualsiasi scansione automatizzata e acquisizione automatica.

Per ogni tipo di campione è disponibile una modalità *Finder* di scansione e *AutoCapture* (*Acquisizione automatica*) consigliata in base ai requisiti di visualizzazione previsti per il tipo di campione.

Slide Type	PreScan (1,25x)	Modalità Finder (Fluorescente)	Modalità AutoCapture (Acquisizione automatica)	Formato dell'immagine
FISH metafase	N/D	Metafase	Sonda	Cartella cellule
FISH interfase	N/D	Metafase	Sonda	Cartella cellule
FISH interfase	N/D	Interfase	ProbeAuto / Conteggio Spot	Framelist
Tessuto-FISH	Rilevamento etch	Tessuto	ProbeAuto / Conteggio Spot	Framelist
M-FISH	N/D	Metafase	N/A (solo manuale)	Cartella cellule

- La modalità *Finder tessuto* richiede il modulo con licenza **Tissue FISH**.
- L'acquisizione *Conteggio Spot* richiede il modulo con licenza **Conteggio Spot** per l'elaborazione automatica del segnale delle immagini FISH in interfase durante l'acquisizione delle immagini.
- Le combinazioni di modalità di scansione e acquisizione alternative non sono limitate per l'uso da parte dell'utente, ma potrebbero non essere ottimali per l'acquisizione o i requisiti di visualizzazione successivi.

Un modello di vetrina del sistema di scansione GSL può essere impostato con più aree di scansione sovrapposte sullo stesso vetrino - ogni area di scansione può essere impostata per una diversa modalità di acquisizione automatica fluorescente - se è necessario disporre di immagini di entrambi i formati cartella cellule e framelist per la visualizzazione.

Acquisizione e visualizzazione FISH

I sistemi *CytoVision DX* utilizzano 2 formati di immagine in cui le immagini FISH possono essere salvate per la visualizzazione successiva delle immagini: **cartella cellule** e **frame immagine** (*Framelist*).

Tipo di campione	AutoCapture	Acquisizione manuale	Opzioni di acquisizione
FISH metafase	Sonda	Sonda (cellula)	Sogliatura
FISH interfase	Sonda	Sonda (cellula)	Sogliatura, Z-stack
FISH interfase	ProbeAuto	Sonda (Frame)	Z-stack
FISH interfase	Conteggio spot	Conteggio spot*	Test spot
MFISH (metafase)	N/D	MFISH* (Cell)	N/D
* richiede moduli software aggiuntivi con licenza			

Visualizzazione e analisi delle immagini FISH

Image Type (Tipo di immagine)	Utilizzo analisi	Opzioni di analisi	Opzioni di visualizzazione/output
Immagini cartella cellula (sonda standard o acquisizione M-FISH)			
Immagine non elaborata	Ri-sogliatura	n/d	Esportazione
Sonda (FISH in metafase)	Visualizzazione, Creazione metafase*	Visualizzazione vista caso, Annotazione	Esportazione e stampa
Sonda (MFISH*)	Display	Visualizzazione vista caso, Annotazione	Esportazione e stampa
Sonda (FISH interfase)	Display	Visualizzazione vista caso, Annotazione	Esportazione e stampa
Metafase (MFISH*)	Segmentazione e creazione cariogramma*	Conteggio e numero visualizzazione caso. Annotazione, visualizzazione MFISH	Esportazione e stampa

* Richiede moduli software aggiuntivi con licenza (per le opzioni del cariotogramma, **vedere le istruzioni operative del dispositivo di cariotipizzazione**).

Immagini Framelist (acquisizione Probe-Auto o Conteggio Spot)

Framelist	n/d	n/d	n/d
-----------	-----	-----	-----

Le immagini richiedono l'uso di un software di analisi delle immagini separato compatibile con il formato "framelist".

Tipi di dati e immagini FISH

Ci sono 2 formati di immagini utilizzati da *CytoVision DX* per l'acquisizione.

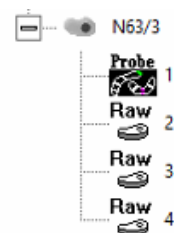
1. Immagini del caso (cartella cellule) acquisite utilizzando le opzioni standard della schermata di acquisizione.
2. Vetrini Framelist acquisiti utilizzando le modalità dedicate (Image Frame) Probe Capture.

Prima di procedere con la scansione o l'acquisizione di vetrini FISH è importante utilizzare la modalità di acquisizione più appropriata per determinare quali opzioni di visualizzazione e analisi saranno disponibili.

Sonda (cartella cellula).

Un formato basato su cellule ideato per campioni FISH in metafase o interfase, con visualizzazione e interazione delle immagini tramite strumenti standard della schermata di avvio.

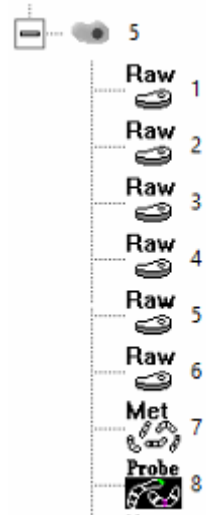
- Acquisizione manuale tramite modalità *Probe* della schermata di acquisizione.
- Acquisizione automatica del sistema di scansione tramite modalità *Probe Capture* (acquisizione probe) nel modello di vetrino.
- Le immagini a colori e raw vengono salvate in singole cellule a livello di vetrino del Case Navigator.
- Opzioni di miglioramento delle immagini, annotazione, stampa ed esportazione.
- Le immagini possono essere visualizzate in Case View (Visualizzazione caso).
- La soglia opzionale (eliminazione dello sfondo) crea oggetti che possono essere copiati in schermate Flexible (flessibili) e combinati con oggetti immagine provenienti da altre modalità di acquisizione standard o casi.
- I cariotipi sonda possono essere creati da immagini di metafase FISH su un sistema con il modulo software con licenza Karyotype abilitato.



M-FISH.

Un formato basato su cellule progettato per campioni FISH etichettati in modo combinatorio (multicolore), con visualizzazione delle immagini e interazione tramite strumenti standard della schermata di avvio.

- Acquisizione manuale tramite la modalità *MFISH* della schermata di acquisizione.
- L'acquisizione automatica del sistema di scansione non è possibile.
- Le immagini a colori e raw vengono salvate in singole cellule a livello di vetrino del Case Navigator.
- I cariotipi M-FISH possono essere creati da immagini di metafase su un sistema con il modulo software con licenza Karyotype abilitato.
- Opzioni di miglioramento delle immagini, annotazione, stampa ed esportazione.
- Le immagini possono essere visualizzate in Case View (Visualizzazione caso).
- Gli oggetti possono essere copiati in schermate Flexible (flessibili) e combinati con oggetti immagine provenienti da altre modalità di acquisizione di cartelle di cellule o casi.



Sonda (Framelist).

Un formato di immagine completo progettato per campioni FISH tessuto o interfase compatibile con software di analisi delle immagini separato per la visualizzazione e l'interazione.

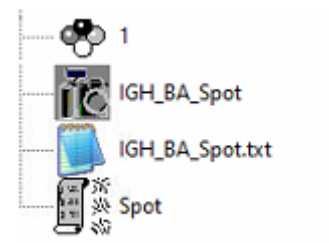
- Acquisizione manuale tramite la schermata **Probe Capture** (Acquisizione sonda) del frame immagine.
- Acquisizione automatica del sistema di scansione tramite la modalità *ProbeAuto Capture* (Acquisizione *ProbeAuto*) nel modello di vetrino.
- Nessuna soglia oggetto. Tutti i dati di colore e delle immagini raw vengono combinati in un singolo *Framelist* a livello di vetrino.
- Gli strati Z-stack vengono salvati come immagini singole insieme alla proiezione massima.



Conteggio spot.

Sui sistemi con modulo **Spot Counting** (Conteggio spot) sono disponibili opzioni aggiuntive;

- Acquisizione manuale tramite la modalità Capture screen *Spot Counting* (Conteggio spot schemata di acquisizione) (salva come Framelist).
- Acquisizione automatica del sistema di scansione tramite la modalità *Spot Counting* (Conteggio spot) nel modello di scansione.
- Elaborazione automatica del segnale tramite un test spot configurabile per i parametri di acquisizione e scansione.

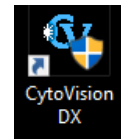


Nella selezione di quando utilizzare le opzioni di acquisizione sonda alternative, è necessario considerare le differenze chiave tra ciascun tipo di acquisizione e le successive capacità di analisi.

I dati del frame immagine (Probe Framelist (Framelist sonda) e Spot Counting (Conteggio spot)) non hanno alcuna opzione di visualizzazione o analisi tramite l'applicazione *CytoVision DX* e richiedono l'uso di un software di analisi delle immagini separato compatibile con il formato "framelist".

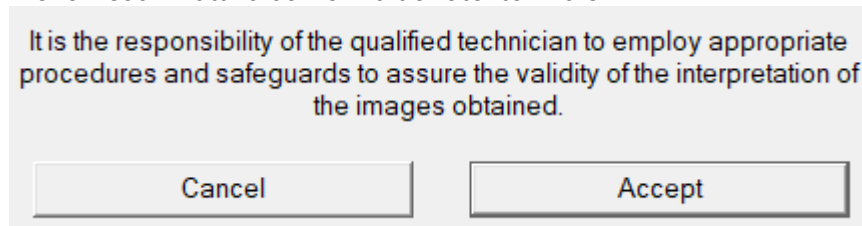
Accesso utente e accesso software applicazione

1. Accendere il monitor della workstation e il PC, quando richiesto. Accedere con un nome utente che abbia le autorizzazioni di sicurezza appropriate per l'applicazione.
2. Accendere i controller GSL, microscopio e lampada fluorescente come richiesto per l'uso.
3. Avviare l'applicazione facendo doppio clic sull'icona del desktop o selezionando il collegamento da



Start di Windows (Tutti i programmi) > *CytoVision DX* > *CytoVision DX*

4. Viene visualizzata la conferma dell'utente finale.



5. Fare clic su **Accept** (Accetta) per confermare l'uso e continuare con l'applicazione (o su **Cancel** (Annulla) per chiudere).

Scansione dei vetrini interfase

Procedura di avvio rapido

Queste istruzioni presuppongono che, prima di avviare una scansione completa con ricerca di interfase fluorescente e acquisizione automatica di immagini;

1. Il sistema sia stato configurato e calibrato correttamente (inclusa la **calibrazione della scansione fluorescente**) seguendo le procedure standard Leica Biosystems come descritto nella **Guida per l'utente di CytoVision DX**.
2. È disponibile un **classificatore** di cellule appropriato.
3. È stata completata un'acquisizione manuale con la creazione di **elenchi di fluorocromi e opzioni di post-acquisizione** per le modalità sonda.
4. È stato creato un **modello di vetrino** con un'area di scansione valida, regole di scansione e acquisizione.
5. I vetrini sono stati posizionati nella cassetta del vassoio GSL a partire dal vassoio 1, posizione 1.

Modelli vetrino

A ogni vetrino di cui si deve effettuare la scansione deve essere assegnato un modello di scansione che contiene tutte le impostazioni necessarie per consentire al sistema di localizzare le cellule, classificarle e ordinarle in una sequenza di acquisizione, per poi effettuare l'acquisizione automatica del numero necessario di immagini.

- Per altri dettagli, fare riferimento alla sezione **Modelli vetrino**.

Classificatori

I classificatori predefiniti forniti con il software si basano su campioni rappresentativi di interfase fluorescente che dovrebbero consentire il funzionamento iniziale senza modifiche significative.

- Tali classificatori potrebbero non corrispondere alle caratteristiche dei campioni utente a causa della variazione prevista e normale nella preparazione di campioni e vetrini.
- Per ciascuno dei tipi di campione da utilizzare sul sistema, le prestazioni del classificatore scelto devono essere esaminate per determinare se è necessaria un'ulteriore ottimizzazione.
- È possibile aggiungere immagini aggiuntive da nuove scansioni ai classificatori predefiniti oppure creare nuovi classificatori.
- Per maggiori dettagli, fare riferimento alla sezione **Classifiers > Training and Editing (Classificatori > Training e modifica)**.

Opzioni di acquisizione automatica

Ognuna delle modalità di acquisizione automatica disponibili dopo il rilevamento delle cellule richiede un'adeguata configurazione di acquisizione per consentire l'utilizzo con più sonde (fluorocromi).

Per ogni analisi della sonda, la combinazione di fluorocromi deve essere prima acquisita manualmente per creare, modificare e salvare gli **elenchi di fluorocromi** o le **opzioni di post-acquisizione** necessari nel modello di scansione.

Tali elementi devono essere impostati durante l'acquisizione manuale di vetrini FISH rappresentativi per ogni tipo di campione o kit sonda o test spot destinati a essere utilizzati successivamente per la scansione e l'acquisizione.

- Acquisire un'immagine rappresentativa utilizzando l'acquisizione manuale in modalità **Probe** (Sonda).

- Confermare le impostazioni di filtro e colore per ogni nome di fluorocromo e salvare la combinazione di canali sonda come "Elenco fluorocromi" per l'utilizzo con acquisizione automatica *ProbeAuto* e *Probe* (Sonda).
- La modalità sonda richiede anche *opzioni di post-acquisizione* (personalizza modello di acquisizione).
- La modalità Spot Counting (Conteggio spot) richiede un test collegato ai nomi di fluorocromo predefiniti.
- Per maggiori dettagli, fare riferimento alla sezione di acquisizione per ogni modalità.

Caricamento di vetrino e vassoio

Aprire lo sportello e rimuovere la cassetta del vassoio dallo stacker GSL.

- Lo stacker deve essere nella posizione più bassa prima che il meccanismo di bloccaggio dello sportello possa essere aperto e i vassoi aggiunti o rimossi dalla cassetta.
- Il pulsante **Unlock Door** (Sblocca sportello) è disponibile nella finestra **Scan Setup*** (Impostazione scansione*) della schermata Scan (Scansione) (scansione di batch di vetrini) o quando si fa clic sul pulsante **Load Slide** (Carica vetrino) nella schermata Capture (Acquisizione). In questo modo si abbassa la cassetta e si sblocca il meccanismo.



Posizionare il/i vetrino/i puliti nel vassoio GSL con l'etichetta rivolta verso la parte posteriore.

- Il vetrino 1 in ogni vassoio è a sinistra. Il vetrino deve essere privo di residui di olio e il coprioggetto/campione deve essere rivolto verso l'alto.
- Assicurarsi che il vetrino sia in posizione piatta nell'inserto e spinto verso l'alto (indietro) e verso sinistra contro i bordi di riferimento prima di rilasciare il dispositivo di presa a molla per tenerlo in posizione.
- Una volta rilasciata il dispositivo di presa a molla, assicurarsi che blocchi saldamente il vetrino in modo che non si verifichi alcun movimento se si tocca leggermente il vetrino.
- Ripetere per i vetrini e i vassoi rimanenti.



Sui sistemi GSL120, una volta caricato ogni vassoio con i vetrini, deve essere reinserito nella cassetta del vassoio con l'attacco magnetico all'interno e il foro sub-X rivolto verso l'esterno.

- Il vassoio 1 rappresenta la posizione più bassa, il vassoio 24 quella più alta.
- Assicurarsi che ogni vassoio sia inserito a livello (in orizzontale) nel proprio slot e che il bordo rivolto verso l'esterno di ogni vassoio sia allo stesso livello di quello degli elementi vicini.

Dopo aver chiuso lo sportello, prima di avviare una nuova scansione o acquisizione automatica, il sistema eseguirà una nuova scansione della cassetta in relazione ai vassoi.

- Durante la scansione del codice a barre, tutti i vassoi rilevati verranno caricati e controllati in relazione ai vetrini contenenti codici a barre.
- Durante la scansione manuale, la posizione del vassoio viene abbinata alle posizioni assegnate manualmente con un nome di caso e modello nella schermata *Scan Setup* (Impostazione scansione).



Durante la scansione e l'acquisizione automatica, per motivi di sicurezza la cassetta viene sollevata per bloccare lo sportello. Se deve essere aggiunto o rimosso un vassoio, è necessario arrestare il processo di scansione o di acquisizione corrente.

* Viene eseguito un controllo dell'utilizzo della memoria quando si seleziona *Scan Setup* (Impostazione scansione) per determinare se è possibile eseguire la scansione di un batch completo di vetrini. Se l'utilizzo della memoria dell'applicazione è superiore a una soglia configurata.

- Verrà visualizzato un messaggio di avviso e la finestra *Scan Setup* (Impostazione scansione) non si aprirà.
- L'applicazione deve essere riavviata prima che possa essere eseguita qualsiasi attività correlata alla scansione.

Scansione batch di vetrini (interfase)

1. Assicurarsi che i componenti GSL e microscopio siano accesi e che ci sia olio sufficiente nel meccanismo di lubrificazione.
2. Avviare l'applicazione *CytoVision DX* e passare alla schermata Scan (Scansione), consentendo all'applicazione di connettersi e per l'esecuzione dell'homing dell'hardware.
3. Fare clic sull'icona di "Scansione batch di vetrini", aprendo la finestra [Scan Setup](#) (Impostazione scansione) manuale
(Per vetrini con codice a barre i cui codici a barre sono stati collegati a un nome caso e a un modello di vetrino, passare al passaggio 12 dopo il posizionamento del vetrino nei vassoi e nella cassetta).
4. Fare clic e selezionare il vetrino 1 (posizione tavolino 1).
5. Selezionare il caso in cui verranno salvati i dati dell'immagine.
6. Selezionare il modello di vetrino che rappresenta le regole di scansione e acquisizione automatica corrette per il vetrino.
7. Fare clic sull'etichetta in corrispondenza dell'estremità opacizzata della visualizzazione del vetrino per assegnare un nome al vetrino.
8. Posizionare il vetrino campione corrispondente al caso selezionato (e al nome del vetrino) nella posizione 1 sul vassoio. (Fare riferimento alla procedura di [caricamento di vetrino e vassoio](#) per maggiori informazioni).
9. Selezionare l'icona del vetrino successiva e assegnare un caso e un modello di scansione. Aggiungere il vetrino campione corrispondente nel vassoio e verificare che sia posizionato correttamente.
10. Ripetere per i vetrini rimanenti e le posizioni da utilizzare nel primo vassoio. Caricare il vassoio 1 nella prima posizione (più bassa) nello stacker/cassetta.
11. Ripetere questa procedura per tutti i vetrini e i vassoi rimanenti e caricare la cassetta nell'unità stacker.
12. Posizionare la cassetta nello stacker GSL e chiudere lo sportello.
13. Selezionare il pulsante Scan (Scansione) per iniziare la scansione.
(Per i vetrini con codice a barre, selezionare l'icona *Scan Slides with Barcodes* (Scansione vetrini con codici a barre)).
14. Il primo vetrino verrà scansionato con le opzioni di scansione impostate nel modello.
- Scansione (10x): vedere [Slide Templates > Scan](#) (Modelli vetrino > Scansione)
15. Per poter avviare una scansione 10x, il sistema deve completare una mappa di messa a fuoco su diversi punti all'interno dell'area di scansione.
- Ciò dipende dalla corretta **calibrazione della scansione fluorescente** e
- il punto di messa a fuoco iniziale è vicino al campione, impostato durante la **calibrazione spaziale** (modificato da qualsiasi offset di messa a fuoco salvato nel modello vetrino).
16. Durante la scansione 10x, il sistema esamina le immagini dalla fotocamera in corrispondenza di ogni movimento del tavolino (frame) e confronta tutti gli oggetti rilevati con il [classificatore](#) configurato nel modello vetrino. Ciò determina quante cellule classificate sono disponibili per l'acquisizione.
17. Una volta completata la scansione 10x, le cellule classificate vengono ordinate per determinare la classificazione di acquisizione prima di passare alla fase di acquisizione automatica (*AutoCapture*).
18. Viene quindi aggiunto automaticamente l'olio e la lente ad alto ingrandimento viene spostata in posizione, eseguendo una "danza dell'olio" per distribuire l'olio uniformemente sulla superficie del vetrino.

19. Le immagini (frame) vengono quindi acquisite ad alto ingrandimento. Per ogni immagine il sistema esegue la fuoco automaticamente allo scopo di determinare la posizione focale, quindi esegue l'acquisizione utilizzando le impostazioni specifiche del modello prima di passare alla cellula successiva.
20. Una volta acquisito il numero corretto di immagini (come configurato nel modello di scansione o nell'test spot), l'acquisizione terminerà e *CytoVision DX* passerà al vetrino successivo, ripetendo la scansione, l'applicazione olio e l'acquisizione automatica fino al completamento di tutti i vetrini.
21. L'applicazione **Scan Monitor** (Monitoraggio scansione) registra l'attività e i tempi per ogni fase di Pre-scansione, Scansione e Acquisizione per il batch di scansione e deve essere esaminata in relazione a eventuali problemi imprevisti.

Per ulteriori flussi di lavoro passo dopo passo, vedere l'[Appendice](#) alla fine di questo manuale.

Impostazione della scansione manuale

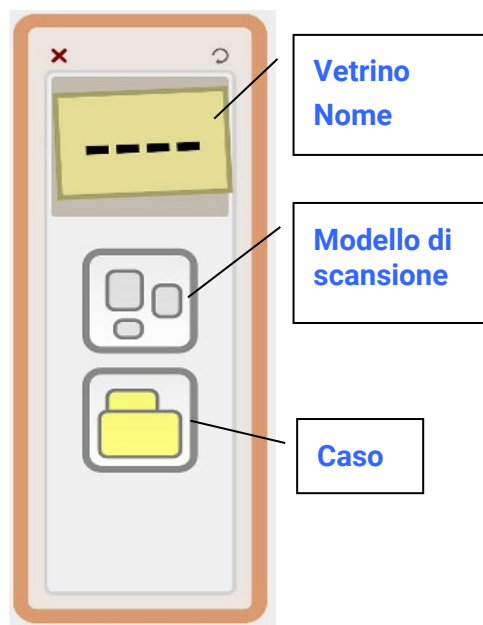


Con la configurazione del vetrino e di scansione manuale, è importante verificare che il caso e i modelli corrispondano correttamente ai vetrini reali posti fisicamente nel sistema.

- Per ridurre i rischi di errore, si consiglia di controllare nuovamente i vetrini e le impostazioni o di utilizzare un data-sheet con il caso e le posizioni del vetrino desiderate.
- L'utilizzo della [Scansione del codice a barre](#) sui vetrini etichettati sui sistemi GSL ottimizza l'efficienza della scansione e riduce il rischio di errori nell'impostazione della scansione.

Assegnazione modello e caso

- Nella schermata Scan (Scansione) selezionare l'icona **Scan batch of slides** (Scansione lotto vetrini) dalla barra degli strumenti principale per aprire una finestra che visualizza tutte le potenziali posizioni del vetrino impostabili per la scansione.
- A ciascun vetrino da analizzare, assegnare un caso e un modello. Il nome del vetrino è opzionale; se non è inserito, il sistema utilizza il numero successivo possibile per il caso con un identificatore di posizione del vetrino alla fine, ad es. Vetrino 1_1 (per il vassoio 1).
- Fare clic sull'icona della cartella del caso e compare un elenco di casi nella rete. Selezionare da questo elenco o inserire il nome di un nuovo caso da creare.
- Una volta che il caso è stato selezionato, compare sul lato destro della schermata di configurazione con un numero di identificazione.
 - Questo è il numero che compare nel display (visualizzatore) del vetrino.
 - Ogni volta che l'applicazione viene riavviata, questo elenco si azzerà.
- Se si esegue la scansione di più vetrini derivanti dallo stesso caso, fare clic sul nome del caso da questo elenco per assegnare rapidamente il caso anziché cercare nel pannello della cartella Casi
Fare clic sul selettore Scan Template (Modello di scansione) per selezionare e assegnare un modello per il vetrino.



Una volta che i modelli sono stati creati, compaiono nella sezione in alto a sinistra della schermata di configurazione della scansione per una rapida selezione.

- I nomi dei vetrini sono facoltativi. Se è richiesto un nome specifico, fare clic nella sezione "Slide Name" (Nome vetrino) e digitare la descrizione corretta.
- Possono essere selezionati più vetrini utilizzando i tasti di Windows **Ctrl** o **Maiusc** e facendo clic con il mouse.

Deferred auto-capture (Acquisizione automatica differita)

Quando tutti i casi e i modelli sono stati assegnati per il lotto di vetrini sul microscopio, compare una freccia di selezione sotto di ogni vetrino.



Si tratta della finestra **Deferred Auto-Capture** (Acquisizione automatica differita), che consente di sovrascrivere il modello per separare i componenti di scansione e quelli di acquisizione automatica;

- **Nessuna.** (Predefinita). Il sistema eseguirà la scansione e l'acquisizione automatica (se configurata) del vetrino prima di passare al successivo.
- Impostazione standard per la scansione e l'acquisizione GSL con applicazione olio automatica.
- **Scansione.** Selezionare questa opzione per effettuare solo la scansione del modello. Dopo ogni scansione, il sistema passa al vetrino successivo.
- Da utilizzare su un sistema GSL in caso di revisione manuale delle miniature delle scansioni prima dell'acquisizione automatica (differita).
- **Capture (Acquisisci).** Selezionare questa opzione per effettuare solo l'acquisizione automatica. Questa opzione è selezionabile in presenza di cellule classificate (flag verde) nell'elenco dei vetrini. L'acquisizione segue le regole di acquisizione del modello per numero di cellule e opzioni di ordinamento.

Nota: le opzioni solo Scan o Capture (Scansione o Acquisizione) selezionate manualmente non sono tipiche della scansione dei campioni FISH per i campioni interfase, ma sono facoltative per la scansione in metafase.

Una volta che tutte le assegnazioni di vetrini, casi e modelli sono state effettuate e i vassoi caricati nel GSL, premere il pulsante **Scan** (Scansione) nella parte inferiore della pagina *Scan Setup* (Impostazione scansione) per avviare il processo di scansione. Il sistema agirà in relazione a ciascuna delle combinazioni di impostazione vetrini e modelli.

Flussi di lavoro di impostazione scansione manuale

In pratica, questa operazione riguarda 2 flussi di lavoro;

1. Scansione e acquisizione automatica

Si tratta della procedura di routine per i sistemi GSL che utilizzano la selezione di scansione Fluorescent Metaphase and Interphase Finder (Finder interfase e metafase fluorescente).

I vetrini vengono impostati in *Scan Setup* (Impostazione scansione) e viene poi confermato **None** (Nessuno) dalle opzioni **Deferred Auto-Capture** (Acquisizione automatica differita);

- Il primo vetrino viene analizzato a ingrandimento ridotto ed elaborato con il classificatore selezionato.
- Le cellule classificate sono categorizzate utilizzando le regole di ordinamento dell'acquisizione automatica del modello.

- L'olio viene automaticamente distribuito sul vetrino e si avvia l'acquisizione automatica ad alto ingrandimento. Le cellule vengono messe a fuoco automaticamente e acquisite utilizzando la modalità di acquisizione e le impostazioni configurate.
- Una volta acquisito il numero selezionato di cellule, il tavolino si sposta al vetrino o vassoio successivo e inizia la scansione e l'acquisizione automatica di tale vetrino.
- La procedura viene ripetuta finché tutti i vetrini assegnati nel lotto non sono completati.

2. Scansione con acquisizione automatica differita (Metafase)

Questa procedura è facoltativa per i sistemi GSL che utilizzano la scansione Fluorescent Metaphase Finder (Finder metafase fluorescente), in cui è richiesto all'utente di rivedere, aggiungere o rimuovere le cellule classificate prima di avviare l'acquisizione automatica.

Tutti i vetrini vengono selezionati nella pagina di Scan Setup (Impostazione della scansione) e **Scan only** (Solo scansione) è l'opzione scelta tra le opzioni di **Deferred Auto-Capture** (Acquisizione automatica differita);

- Di tutti i vetrini viene eseguita la scansione a ingrandimento ridotto e vengono poi elaborati con il classificatore selezionato.
- Una volta completata la scansione, il sistema ritorna alla schermata di scansione e si arresta.

L'operatore ora ha la possibilità di avviare immediatamente la procedura di Auto-Capture (Acquisizione automatica) o di riesaminare prima uno qualsiasi degli elenchi delle metafasi per modificare le cellule contrassegnate con flag verde da acquisire, prima di salvare e ritornare alla schermata **Scan** (Scansione);

- Selezionare l'icona *Manually Scan Batch of Slides* (Batch di scansione manuale del lotto di vetrini) per aprire la finestra di Scan Setup (Impostazione della scansione).
- Selezionare il pulsante **Deferred** (Differita) in fondo alla pagina.
Per tutti i vetrini che sono stati scansionati solo nel batch precedente (e che hanno almeno 1 cellula contrassegnata in verde nel relativo elenco) la posizione del vassoio e il nome del caso verranno ricaricati sullo schermo con la visualizzazione di acquisizione "C" impostata.
- (Opzionale) Eliminare/Cancelare ogni vetrino da non acquisire. Questo risulta utile dopo una revisione manuale degli elenchi di metafasi e per determinare l'assenza di elementi di qualità accettabile da acquisire su tali vetrini.
- Selezionare il pulsante **Scan** (Scansione) per avviare la procedura di Auto-Offset (Offset automatico) confrontando le posizioni di messa a fuoco a 10x.
- Le cellule classificate sono categorizzate utilizzando le regole di ordinamento dell'acquisizione automatica del modello.

Utilizzando *Deferred Capture* (Acquisizione differita), il sistema esegue una nuova mappa di messa a fuoco del vetrino e la confronta con le immagini salvate della scansione originale, applicando un offset automatico che compensa qualsiasi piccolo movimento del vetrino o del vassoio durante il caricamento e lo scaricamento dei vassoi.

- L'olio viene automaticamente distribuito sul vetrino e si avvia l'acquisizione automatica ad alto ingrandimento. Le cellule vengono messe a fuoco automaticamente e acquisite usando le regole di acquisizione personalizzate (*Capture Customize*) delle **Post Capture Options** (Opzioni post-acquisizione).
- Una volta acquisito il numero selezionato di cellule, il tavolino si sposta al vetrino o vassoio successivo e avvia la procedura di acquisizione di tale vetrino.
- L'acquisizione automatica è ripetuta senza richiedere ulteriori interazioni, finché tutti i vetrini assegnati nel lotto non sono completati.

Scansione batch mista

Tutte le modalità di scansione FISH e di acquisizione automatica possono essere eseguite in un batch misto sul sistema GSL.

- Solo i vetrini "Scan" completeranno il componente di scansione 10x
- I vetrini indicati con "None" (Nessuno) completeranno il passaggio di ricerca delle cellule e di acquisizione automatica.
- Al termine del primo passaggio, i vetrini di acquisizione differita (*Deferred capture*) possono essere aggiornati nella schermata di configurazione della scansione premendo il pulsante **Deferred** (Differito) per caricare i vetrini che presentano ancora il componente di acquisizione da completare.
- Fare nuovamente clic su **Scan** (Scansione) per avviare l'acquisizione automatica per i vetrini rimanenti.

NOTA: con tutte le configurazioni manuali di vetrini e scansioni è importante verificare che il caso e i modelli siano correttamente abbinati ai vetrini fisici inseriti nella cassetta del caricatore di vetrini.

- Per ridurre i rischi di errore, si consiglia di ricontrollare i vetrini e le impostazioni o di fare un riferimento incrociato con una scheda tecnica con le posizioni desiderate dei vetrini e dei casi.
- L'utilizzo della Scansione del codice a barre sui vetrini etichettate sui sistemi GSL ottimizza l'efficienza della scansione e riduce il rischio di errori nell'impostazione della scansione.

Scansione dei codici a barre

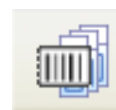


La scansione dei codici a barre consente un utilizzo ottimale di un sistema di scansione GSL. L'assegnazione di casi e modelli viene eseguita prima della scansione tramite la funzione **Assign Slide Barcodes** (Codici a barre assegnazione vetrini) o se è presente un'interfaccia separata del sistema di gestione delle informazioni di laboratorio (LIS).

- L'applicazione Barcode Manager può essere utilizzata per visualizzare e aggiornare le assegnazioni dei codici a barre.
- Per i dettagli e ulteriori informazioni sul supporto e le limitazioni dei codici a barre, fare riferimento alla **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

Configurazione assegnazione del vetrino

Fare clic sull'icona **Assign Slide Barcodes** (Assegna codici a barre vetrino) nella schermata Scan (Scansione) per aprire la finestra di configurazione.



1. **Selezionare il modello:** sullo schermo compare una schermata con i modelli di scansione disponibili. Qui è possibile crearne di nuovi, ma non è un flusso di lavoro tipico.
2. **Slide Details** (Dettagli vetrino) (opzionale). Se il vetrino richiede la registrazione di specifiche informazioni prima della scansione, dopo aver evidenziato il modello è possibile collegarlo a un modello di vetrino salvato, facendo clic sul pulsante **Details** (Dettagli).
3. **Selezionare il Caso.** Viene mostrato l'elenco dei casi attuali (possono esserne creati di nuovi). Una volta selezionato un caso valido, la funzione **Manually Enter Barcode** (Inserimento manuale del codice a barre) diventa attiva.
4. **Scansione dei codici a barre dei vetrini.** Utilizzare un lettore di codici a barre portatile* per leggere il codice a barre direttamente dal vetrino (i dati del codice a barre sulla linea possono essere digitati manualmente). Il codice è visualizzato sullo schermo insieme alle informazioni su caso e modello da verificare.

Ogni codice a barre duplicato sarà evidenziato in rosso. Se il lettore portatile del codice a barre non è pre-programmato per aprire automaticamente la finestra, fare clic sul pulsante **Manually Enter Barcode** (Inserimento manuale del codice a barre).

* Un lettore di codici a barre portatile non è fornito con i sistemi di scansione. Si consiglia un lettore in grado di supportare completamente i codici a barre 2D, come il Motorola (Symbol) DS6707 o equivalente.

Flussi di lavoro di scansione dei codici a barre

Il menu **Barcode Scanning** (Scansione del codice a barre) sopra la barra degli strumenti principale visualizza 3 opzioni di acquisizione.

Scansione e acquisizione

Equivale all'icona **Scan slides with Barcodes** (Acquisisci vetrini con codici a barre) sulla barra principale degli strumenti.

- Ogni vassoio nella cassetta viene caricato in sequenza, a partire dal vassoio 1, e ciascuna delle 5 posizioni dei vassoi viene letta per i vetrini etichettati con codice a barre.
- Quando rileva un codice a barre valido nel database, il sistema procede alla scansione e all'acquisizione di un vetrino per volta in base alle regole del modello.

Solo scansione

Questa opzione avvia l'equivalente per i vetrini con codice a barre dell'acquisizione automatica differita. Il sistema GSL carica ogni vassoio in sequenza e legge i dettagli del codice a barre, ma esegue la scansione a ingrandimento ridotto del modello per ciascun vetrino.

- La funzione *Scan only* (Solo scansione) serve dove è prevista la revisione manuale degli elenchi di metafasi per verificare le cellule classificate per l'acquisizione o per aggiungere/rimuovere cellule dalla categoria con contrassegno verde.
- La sola scansione (*Scan Only*) non è compatibile con l'uso tipico del campione interfase.

Solo acquisizione

Questa funzione deve essere utilizzata solo immediatamente dopo un'operazione di **Scan Only** (Solo scansione) del codice a barre, una volta che gli elenchi di cellule o le aree delle regioni appropriate della scansione sono stati esaminati o modificati. Il sistema effettua nuovamente la scansione dei vetrini con codice a barre nella cassetta e implementa le regole di acquisizione automatica del modello di scansione.

Il componente Capture (Acquisizione) funziona allo stesso modo di **Deferred Capture** (Acquisizione differita), con il sistema che confronta le posizioni di mappatura della messa a fuoco 10x con una memoria salvata di queste posizioni dalla scansione stessa. Questo consente di applicare una compensazione automatica per compensare qualsiasi movimento minore di vetrino o vassoio, introdotto durante il caricamento e lo scaricamento dei vassoi.

Capture Only (Solo acquisizione) del codice a barre funziona come previsto se:

- Nessun'altra scansione è stata effettuata sul sistema da quando è stata selezionata l'opzione **Scan only** (Solo scansione) del codice a barre.
- I vetrini da acquisire non sono stati rimossi o sostituiti nei vassoi da quando è stata selezionata l'opzione **Scan only** (Solo scansione) del codice a barre. Si consiglia di non spostare i vassoi in posizioni diverse nella cassetta prima di selezionare l'opzione **Capture Only** (Solo acquisizione).

Nota: un controllo dell'utilizzo della memoria viene eseguito quando viene selezionata una qualsiasi delle opzioni di scansione del codice a barre per determinare se è possibile scansionare un batch completo di vetrini.

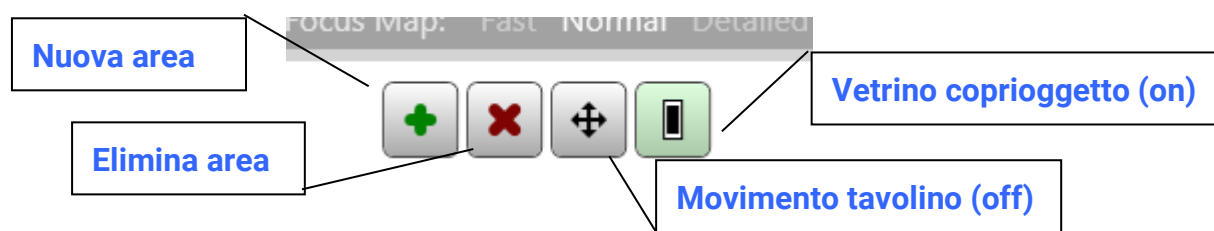
- Se l'utilizzo della memoria dell'applicazione è superiore a una soglia configurata, verrà visualizzato un messaggio di avviso e la scansione non verrà eseguita.
- L'applicazione deve essere riavviata prima che possa essere eseguita qualsiasi attività correlata alla scansione.

Modelli di vetrini (FISH)

- Aprire la finestra Scan Setup (Impostazione scansione) e selezionare l'icona Assegna scansione (Modello di vetrino) per una qualsiasi delle posizioni di vetrino per visualizzare la finestra **Choose a slide Template** (Scegli un modello di vetrino).
- Se non sono presenti modelli, fare clic sul pulsante **Create New Slide Template** (Crea nuovo modello di vetrino), altrimenti selezionare **New** (Nuovo) per creare un nuovo modello, o **Edit** (Modifica) per modificarne uno esistente.

Deve essere utilizzato un nome modello che descriva il tipo di scansione che verrà eseguita. In genere, esso è un riferimento al campione o al kit sonda come "FL-Blood" o "DGO".

Area di scansione

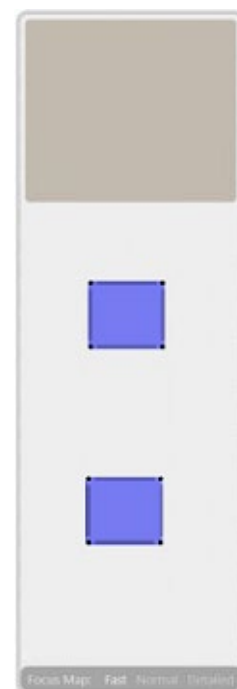


Fare clic sul simbolo verde (+) per aggiungere un'area di scansione al modello esistente.

- Aree multiple sono tipiche della scansione FISH, sia per la scansione della stessa area del vetrino con modalità di ricerca metafase e interfase, sia per consentire aree posizionali separate del campione, ciascuna ibridata con un diverso Probe Kit (Kit sonde).

Per i vetrini FISH assicurarsi che:

- L'impostazione del vetrino coprioggetto è attiva per tutte le aree, altrimenti il sistema non calcolerà la scansione o non acquisirà le posizioni di messa a fuoco automatica in modo accurato.
- L'area di scansione che viene regolata in modo da essere più piccola del posizionamento del campione, poiché ciò riduce il rischio di errore dei punti della mappa di messa a fuoco se non è presente materiale campione.
- Per la scansione interfase, è tipico impostare solo un'area di scansione piccola a causa di un'elevata densità prevista di cellule classificate durante la scansione.
- Per ridurre i tempi della mappa di messa a fuoco e il rischio di fotobleaching, le aree più piccole utilizzeranno 1 o 5 punti della mappa di messa a fuoco a seconda delle dimensioni e se è selezionata la *Focus Map* (Mappa di messa a fuoco): *Normal* (Normale) o *Focus Map* (Mappa di messa a fuoco): Viene selezionato *Fast* (Veloce).



Una volta definita l'area di scansione del modello, è possibile accedere ai pannelli di scansione e acquisizione.

Pre-Scan (Pre-scansione)

Pre-Scan (pre-scansione) utilizza l'obiettivo 1,25x per identificare le caratteristiche del vetrino sotto luce in campo chiaro.

- Le opzioni Pre-Scan standard sono disabilitate per le modalità di scansione fluorescente.

Scansione

Questa sezione contiene le opzioni di ricerca delle cellule necessarie per consentire una scansione ottimale per i tipi di campione;

- Modalità di scansione:** fluorescente per vetrini FISH (richiede compatibilità con microscopio e filtro).
- Finder Application** (Applicazione finder): selezionare lo strumento di ricerca (finder) della metafase e lo strumento di ricerca (finder) di interfase.
- Classificatore:** selezionare un classificatore appropriato per il tipo di campione.
- Obiettivo:** 10X come da impostazione predefinita.
- La funzione **Stop Scanning after** (Interrompi scansione dopo), interrompe il passaggio di scansione una volta raggiunto un numero minimo di cellule classificate (Flag verde). Se la funzione è disabilitata, la scansione continua sull'intera area di scansione selezionata. Essa non è tipica per la scansione FISH e deve essere utilizzata solo con classificatori ottimizzati per campioni utente.

Scansione > Configura

Il pannello "Configure Finder Application" (Configura applicazione Finder) consente di accedere a varie opzioni di configurazione a seconda del tipo di campione e dell'uso.

- Il pulsante "Reset to Defaults" (Ripristina impostazioni predefinite) mostra le impostazioni di configurazione iniziali.
- Questi sono solo valori tipici e potrebbero dover essere modificati su campioni effettivi.

Per la scansione di routine, la regolazione tipica è per:

- Modifica delle impostazioni dell'area **Minimum** (minima) e **Maximum** (massima) di metafase/interfase.
- Impostazione di una modalità campione (solo finder metafase).

Area minima/massima di interfase

Gli oggetti al di sotto dell'area pixel minima o al di sopra dell'area pixel massima non verranno elaborati durante la scansione per la visualizzazione o la classificazione nell'elenco dei vetrini.



- Per la scansione interfase, l'area minima predefinita (40) è in genere inferiore a quella richiesta e può essere aumentata tra 80 e 100 senza modificare le cellule interfase utilizzabili.
- La riduzione dell'area massima (predefinita 500) ridurrà la classificazione dei cluster di cellule se questi non sono utili per la revisione.

Carica solo classificate

- Utilizzare questa opzione per salvare solo le immagini di scansione classificate in base al classificatore utilizzato.
- *Upload Classified Only* (Carica solo classificate) deve essere deselezionato durante la configurazione iniziale e il test del classificatore.
- Dopo l'ottimizzazione del classificatore, si consiglia di attivare questa opzione, soprattutto se la scansione di rilevamento dell'interfase produce molti oggetti di sfondo non classificati che possono rallentare la scansione, aumentare il tempo di elaborazione e aumentare le dimensioni dell'elenco di scansione salvato.

Punti di messa a fuoco (validazione cellula)

Il pannello "Cell Validation" (Validazione cellula) è una funzione di elaborazione delle immagini per la mappa di messa a fuoco della scansione.

- Si consiglia di **disabilitare** la convalida cellula per i modelli di scansione FISH di routine.
- Per i dettagli su questa opzione e ulteriori informazioni sull'opzione di scansione del vetrino di metafase, fare riferimento alla **Guida per l'utente di CytoVision DX**.

AutoCapture

Le opzioni di AutoCapture (acquisizione automatica) impostano le regole per il numero e il tipo di cellule da acquisire dopo una scansione, utilizzando le opzioni di ordinamento per conseguire l'opportuna qualità delle immagini.

- La funzione AutoCapture (acquisizione automatica) completa può essere configurata solo se si sceglie un classificatore nel modello di scansione (il valore predefinito "Tutto" non è un classificatore e visualizza tutti gli oggetti scansionati come non classificati nell'elenco dei vetrini).
- AutoCapture (acquisizione automatica) segue immediatamente una scansione sui sistemi GSL che utilizzano l'applicazione di olio automatica, a meno che non venga utilizzato il flusso di lavoro **Deferred AutoCapture** (Acquisizione automatica differita).

A meno che non siano richieste tutte le cellule (solitamente solo per i vetrini di metafase se si effettua un riesame manuale), deselezionare l'opzione **Capture all cells** (Acquisisci tutte le cellule) e scegliere le proprie regole per il tipo di campione.

Acquisizione automatica interfase

Per i campioni interfase, il numero di immagini da acquisire è definito nel pannello AutoCapture (Acquisizione automatica).

È necessario impostare un classificatore interfase appropriato nel pannello di scansione del modello di vetrino in modo che le cellule classificate e contrassegnate in verde siano disponibili per l'acquisizione e l'opzione **Perform AutoCapture** (Esegui acquisizione automatica) sia selezionabile.

Sono disponibili tre **Capture Modes** (modalità di acquisizione) per l'acquisizione di immagini FISH di routine sui sistemi di scansione *CytoVision DX*: **Probe**, **ProbeAuto** e **Spot Counting**.

1. È necessario avere familiarità con le procedure manuali di acquisizione della sonda (Probe Capture) e i fluorocromi.
2. AutoCapture richiede un *elenco di fluorocromi* o un test spot precedentemente creato e salvato. Questo si collegherà ai nomi dei fluorocromi, alle impostazioni Z-Stack, alla configurazione del filtro e del colore.
3. Ogni modalità ha un'impostazione **Objective** (Obiettivo) per selezionare la lente ad alto ingrandimento utilizzata per l'acquisizione automatica, in genere 63x per un campo visivo migliorato ed effetti di intensità.
4. Lo stato **Autocamera setup** (Impostazione fotocamera automatica) determinerà il modo in cui le immagini vengono acquisite ad alto ingrandimento durante l'acquisizione automatica;
 - **Active** (Attivo) (selezionato): Per ogni canale da acquisire, il sistema eseguirà una regolazione automatica della telecamera (esposizione) in base all'intensità di qualsiasi fluorescenza presente nel campo visivo.
 - **Inactive** (Inattivo) (non selezionato): Per ogni canale da acquisire, il sistema utilizza valori fissi della fotocamera salvati per ultimi nell'Elenco fluorocromi nella schermata di acquisizione.

Sono disponibili opzioni di visualizzazione e selezione aggiuntive in base alla modalità specifica selezionata.

Modalità di acquisizione della sonda:

Questa modalità di acquisizione creerà immagini per l'analisi tramite la schermata di avvio dell'applicazione principale.

- **Capture all cells** (Acquisisci tutte le cellule) o **Capture up to n cells** (Acquisisci fino a n cellule): - L'utente può definire quante cellule sono necessarie per l'acquisizione e in base a criteri di ordinamento e classificazione.
- **Elenco fluorocromi**: - Collegamenti a un elenco di acquisizione delle sonde creato e salvato in precedenza.

- **Opzioni post-acquisizione:** - Utilizzare modelli di personalizzazione dell'acquisizione per consentire all'utente di definire come desidera che le immagini vengano acquisite. Questi modelli devono essere stati preconfigurati nella finestra *Customize* (Personalizza) nella schermata di acquisizione.

Modalità di acquisizione *ProbeAuto*:

Questa modalità di acquisizione creerà immagini *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:

Le **Post Capture Options** (Opzioni di post-acquisizione) non vengono utilizzate. Sono disponibili le seguenti opzioni aggiuntive:

- **Impostazione su colorazione di contrasto:** Migliora il calcolo dell'esposizione di **Autocamera Setup** (Impostazione fotocamera automatica) sui canali fluorocromi lavorando solo sulle aree contenenti il segnale DAPI (maschera di colorazione di contrasto) e risultando meno influenzato dai detriti fluorescenti all'esterno della cellula.
- **Impostazione su Probe:** Migliora il calcolo dell'esposizione di **Autocamera Setup** (Impostazione fotocamera automatica) sui canali fluorocromi utilizzando un calcolo basato sulle dimensioni per risultare meno influenzato dai detriti fluorescenti luminosi all'interno della cellula.
- **Impostazione tramite media:** Acquisisce i primi *n* fotogrammi utilizzando il calcolo dell'esposizione automatica standard per ottenere un valore di integrazione fluorocromi media per tutti i frame rimanenti.
- **Salva Z-stack:** Salva ogni immagine dello stack fluorocromi insieme alla proiezione massima.

Modalità di acquisizione con conteggio spot:

Questa modalità di acquisizione creerà immagini nel formato *framelis*.

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks ☒

DGO

Fluorochrome list:

Le impostazioni sono le stesse di **ProbeAuto** con le modifiche aggiuntive:

- **Select Spot assay** (Selezionare test spot): apre il pannello Assay Selector (Selettore test) per scegliere un test appropriato che contenga i nomi dei fluorocromi utilizzati per creare l'elenco di acquisizione, le impostazioni Z-stack e i parametri di arresto dell'acquisizione automatica.
- **Elenco dei fluorocromi:** non è selezionabile. L'elenco di acquisizione e le impostazioni dei fluorocromi sono impostati nel test spot e collegati ai fluorocromi "Build List".

Nota: se sono presenti nomi di elenchi nei pannelli dell'**elenco Fluorocromi** o delle **opzioni Post Capture** (post acquisizione), ciò significa che l'area di scansione è stata precedentemente impostata per la modalità Probe (Sonda) o Probe Auto (Sonda automatica), laddove queste sono richieste.

Si consiglia di creare una nuova area per le operazioni di Spot Counting (Conteggio spot) per mantenere queste aree vuote.

Visualizzazione e regolazione delle immagini

A destra della schermata sono visualizzate le immagini dal vivo e i comandi di tavolino e messa a fuoco utili per controllare la posizione dell'area di scansione e confermare le impostazioni della fotocamera utilizzate durante la messa a fuoco automatica 10x (scansione).

Si consiglia di caricare un vetrino tipico prima di utilizzare il modello per la prima volta, per verificare che la fotocamera calibrata e i valori della posizione di messa a fuoco siano accettabili.



Nota: le impostazioni della fotocamera utilizzate durante la scansione vengono determinate durante la mappa di messa a fuoco della scansione e non dovrebbe essere necessario regolare di routine la visualizzazione dell'immagine live nel modello.

- L'intensità dell'immagine live e la posizione di messa a fuoco vengono determinate dalla calibrazione del sistema che dovrebbe visualizzare un'immagine visibile *vicino* al piano focale del campione senza una regolazione significativa per i vetrini di routine.
- Se l'immagine è significativamente scura, luminosa o molto lontana dalla messa a fuoco, ciò potrebbe indicare che la calibrazione non è corretta e potrebbe essere necessario ripeterla.

Se i pulsanti **Auto Camera** o **Record Z** presentano una visualizzazione **rossa**, ciò indica che stanno utilizzando le impostazioni di sistema calibrate: ciò è normale e previsto per la scansione di routine.



Se i pulsanti **Auto Camera** o **Record Z** presentano una visualizzazione **verde**, ciò indica che sono stati modificati in precedenza nel modello e ora stanno utilizzando valori salvati solo per questo modello.



La modifica dei valori di Auto Camera (Fotocamera automatica) aggirerà i valori di **Fluorescent Scan Calibration** (Calibrazione di scansione fluorescenza) e utilizzerà le impostazioni del modello solo per le routine della Mappa di messa a fuoco 10x.

- Ciò è progettato per situazioni in cui si prevede che i valori del campione da utilizzare con questo modello divergeranno da quelli della calibrazione standard, come, ad esempio, accade nei campioni fluorescenti con colorazione DAPI sbiadita o debole.
- Non ci si aspetta che i campioni di campo chiaro richiedano specifici valori per la fotocamera

La modifica a Record Z (Registra Z) (posizione di messa a fuoco) deve essere eseguita solo se il modello deve essere utilizzato su un vetrino in cui il piano di messa a fuoco del campione è superiore o inferiore al tipo di vetrino di routine a causa di una differenza fisica di spessore del vetrino stesso o del suo coprioggetto, del materiale o della preparazione.

- La posizione di messa a fuoco influirà solo sulla mappatura e scansione della messa a fuoco, non ha alcun effetto sulle routine di messa a fuoco con acquisizione automatica ad alto ingrandimento.

Dopo qualsiasi aggiornamento di **Fluorescent Scan Calibration** (Calibrazione scansione fluorescente), tutti i modelli di scansione che hanno modificato i valori della fotocamera o della messa a fuoco verranno visualizzati con un simbolo di avviso nella schermata di configurazione del batch di scansione, indicando che potrebbero utilizzare impostazioni non più appropriate per il sistema e che devono essere selezionate o "Reimpostate".

Slide Templates



Revisione degli elenchi di interfase

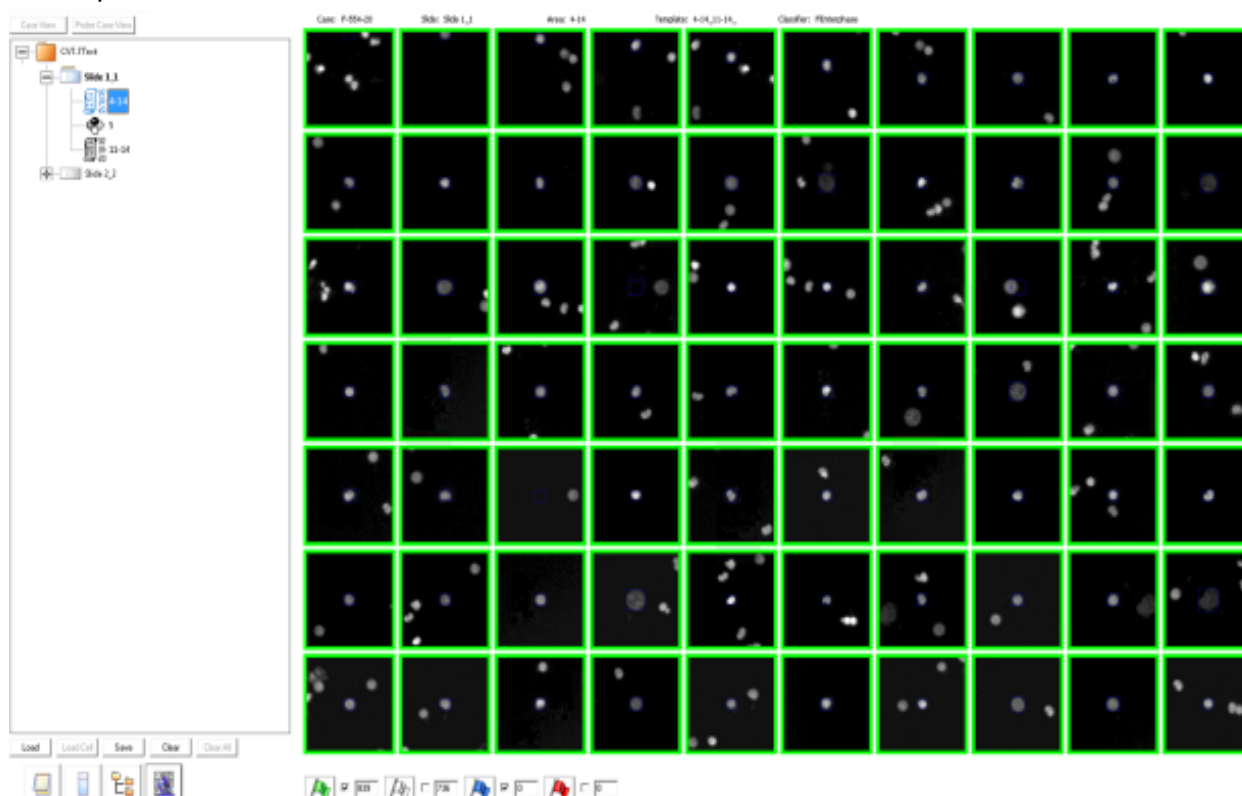


Le immagini di scansione vengono salvate in un elenco di vetrini visualizzato nel Navigator nella cartella delle cellule.

Gli elenchi di vetrini possono essere caricati e visualizzati solo nella schermata di revisione e vengono utilizzati nella

- creazione o modifica del Classificatore di scansione.
- Fare riferimento alla **Guida per l'utente di CytoVision DX** per informazioni generali sulla visualizzazione e il controllo della schermata di revisione.

Per la scansione fluorescente, questo viene in genere utilizzato solo per rivedere i classificatori di cellule per verificarne l'accuratezza.





Visualizzazione note (Interfase)

Facendo clic sull'icona delle **Note** si sostituisce la visualizzazione del Navigator con una tabella dati contenente informazioni e misurazioni di ciascuna miniatura visualizzata nella finestra principale.

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 maggior parte delle colonne della tabella contiene misurazioni calcolate dall'elaborazione dell'immagine effettuata sulle immagini in miniatura.

- Ogni colonna può essere utilizzata per classificare/ordinare la visualizzazione delle miniature delle immagini sullo schermo e collegata al modello di vetrino come ordine di classificazione per AutoCapture in modalità Probe (Sonda) standard.
- Le misurazioni non hanno una correlazione diretta con la qualità delle cellule e sono rilevanti solo per l'addestramento del classificatore.

Le colonne più importanti per l'interfase sono:

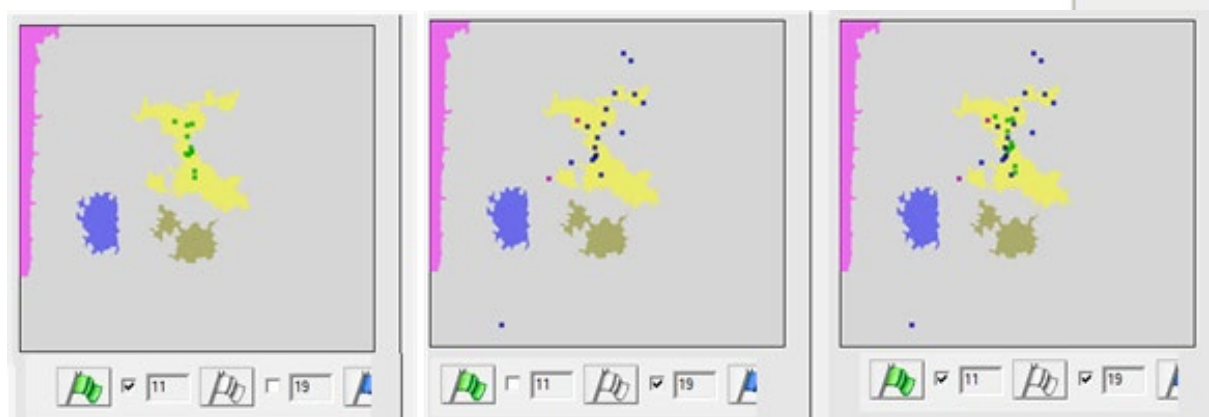
- **ID della cellula**. Ogni cellula è numerata in base al rilevamento durante una scansione. Tale identificativo diventa un ID univoco non cancellabile o modificabile, indipendentemente dalla classificazione utilizzata. Questo numero è incluso come parte del nome della cellula per qualsiasi cellula creata tramite un'acquisizione automatica in modalità **Probe**.
- **EF**. Visualizza la posizione England Finder unica di ciascuna cellula utilizzata per le opzioni di acquisizione automatica e le funzioni di conversione delle coordinate. Questo è incluso quale parte del nome della cellula per qualsiasi immagine creata da un'acquisizione automatica di **Probe** e salvata come metadati in un framelist di **ProbeAuto** e visualizzata nella schermata Frame View (Visualizzazione frame).
- **Area**. Area della cellula in pixel. Utile per determinare se è necessaria la regolazione dell'impostazione dell'area minima o massima nel modello di scansione.
- **Circ**. Circolarità, una potenziale opzione di ordinamento per l'acquisizione automatica della sonda (**Probe**) interfase.



Visualizzazione vetrino (interfase)

Cliccando sull'icona **Vetrino** si sostituisce la visualizzazione Navigator o Note con una grafica di vetrino che mostra l'area di scansione e l'indicazione delle cellule identificate durante una scansione.

Nascondendo o visualizzando i diversi flag miniatura per la scansione, le posizioni delle cellule verranno visualizzate come una sovrapposizione sulla grafica del vetrino.



Classificatori di scansione

Il software applicativo include i classificatori predefiniti *FIMetaphase* e *FLInterphase* per i campioni di fluorescenza.



I classificatori possono essere assegnati a un modello di scansione per le scansioni di routine, creando un elenco di acquisizione di cellule contrassegnate in verde.

- Il sistema consente anche l'applicazione di diversi classificatori nella schermata di revisione, indipendentemente dal classificatore (se presente) utilizzato per la scansione originale.
- Fare clic su Apply Classifier (Applica classificatore) dalla barra degli strumenti principale. Compare un elenco dei classificatori dell'utente.
- Selezionare il classificatore da utilizzare e fare clic su OK. Le miniature della schermata di revisione sono rielaborate utilizzando i parametri del nuovo classificatore con la selezione automatica del contrassegno verde che corrispondono meglio alle immagini utilizzate nel training del classificatore.
- In questo modo un *elenco di scansioni* può essere riclassificato in qualsiasi momento, senza esigere nuovamente la scansione del vetrino. Ciò è particolarmente utile durante il training iniziale del sistema e la valutazione di un nuovo classificatore.

Di solito non è necessario aggiornare o addestrare ulteriormente nuovi classificatori per la scansione FISH, sebbene ciò sia facoltativo per testare o adattare l'intervallo previsto di variazione del campione riscontrato durante la preparazione dei vetrini tra diversi siti dell'utente finale.

- Si consiglia di aggiungere immagini aggiuntive (**Appended** (allegate)) provenienti dalle scansioni eseguite dopo le installazioni del sistema al classificatore esistente per ottimizzare ulteriormente i classificatori o per creare nuovi classificatori utilizzando solo i dati di scansione del campione dell'utente.
- Per i campioni di metafase FISH, ciò si adatterà all'intervallo previsto di variazione del campione riscontrato durante la preparazione dei vetrini tra diversi siti dell'utente finale.

Linee guida per la modifica e il training del classificatore



Quando si "addestra" un classificatore da un elenco di vetrini (scansioni), tutte le cellule attualmente nelle classi Verde o Bianco vengono inserite nel classificatore selezionato.

- Assicurarsi che solo le cellule desiderate e revisionate siano presenti nei flag di colore Verde o Bianco (aggiungere zero cellule come verde o bianco è accettabile).
- Le cellule con flag Blu e Rosso da un elenco di scansione non vengono aggiunte a un classificatore, ma è possibile spostare le cellule in blu o rosso durante la successiva modifica del classificatore per evitare che i relativi dati vengano utilizzati.
- Le cellule in blu non vengono utilizzate dall'elaborazione delle immagini, quindi è possibile inserire qualsiasi cellula lì e spostarle tra verde o bianco quale parte del test per osservare gli effetti.
- Una volta che una cellula viene inserita nella classe rossa, verrà eliminata se il classificatore viene salvato (a meno che non presenti l'icona di una fotocamera, il che indica che è stata acquisita automaticamente prima di essere aggiunta al classificatore).

A scopo di accuratezza sono necessari esempi di cellule buone (verdi) e cattive (bianche), quando si modifica un classificatore verificare che:

- Il flag verde non contenga immagini con cluster di cellule o detriti grandi/intensi.

- Il flag bianco contenga immagini di "non cellule" (detriti, segni, intensità di colorazione atipica, cluster, artefatti ecc.).
- La classe bianca non contiene cellule "buone".

Errori comuni relativi al training (addestramento) del classificatore.

1. Durante l'addestramento del classificatore, tutte le immagini del flag bianco non sono state spostate nella classe del flag blu (di mantenimento) prima della selezione di specifiche cellule verdi e bianche.
 - Il classificatore presenta troppe cellule con flag bianco, più del doppio del numero di cellule verdi - Il classificatore presenta cellule "buone" nella classe con flag bianco.
2. Durante l'addestramento del classificatore sono state considerate solo cellule buone e non è stata aggiunta alcuna cellula bianca
 - Il classificatore presenta solo cellule con flag verde, o più del doppio del numero di cellule bianche.
3. Le cellule selezionate come "buone" per il training (addestramento) non hanno verificato la presenza di oggetti di sfondo/detriti all'interno della "casella di acquisizione" visualizzata nella miniatura. Tutto ciò che si trova all'interno del confine aggiungerà le relative misurazioni ai dati delle cellule e potrebbe diluire i valori reali di interfase o metafase derivanti dai dati di addestramento.
 - Il flag verde contiene cellule con variazione estrema della metafase.
 - Il flag verde contiene immagini con nuclei grandi/scuri all'interno della casella di acquisizione.

Nota: i classificatori di metafase sono più sensibili a questi problemi rispetto ai classificatori di interfase.

Formazione (aggiuntiva) di classificatori

Per aggiornare o creare un nuovo classificatore, utilizzare vetrini scansionati contenenti cellule tipiche in rapporto al tipo di campione.



- Effettuare una scansione utilizzando il classificatore **Everything** (Tutto)
- Accedere alla schermata **Review** (Riesame) e aprire il caso caricando l'elenco di metafase
- Con la funzione **Select All** (Seleziona tutte), selezionare tutte le cellule e contrassegnarle come **Nonspecific** (Non specifiche)(**Blue Flag**) (flag blu), in modo da non aggiungere accidentalmente al classificatore cellule non appropriate.
- Selezionare 5-15 miniature della qualità desiderata e contrassegnarle con un **Green flag** (flag verde). Non aggiungerne oltre da un vetrino, in quanto potrebbe alterarsi artificialmente il classificatore.
- Selezionare nel classificatore un equivalente numero di immagini da utilizzare come esempi di cellule "cattive" e contrassegnarle con un **White Flag** (flag bianco) (**Unclassified**) (Non classificate).
Dovrebbero essere miniature che non contengano detriti grandi/intensi o cellule buone.
- Confermare che solo le cellule prescelte sono state inserite nelle classe con flag Verde o Bianco.
- Fare clic su **Train (Formazione) (icona Tabella)**;
 - Per creare un nuovo classificatore, selezionare **New** (Nuovo) e inserire un nome per il classificatore nel campo **Current selection (Selezione corrente)**.
 - Per *aggiornare* un classificatore attuale selezionare **Existing** (Esistente) e **Append** (Aggiungi) per aggiungere le nuove cellule a un classificatore attuale (senza **sovrascrivere** a meno che non si desideri sostituire completamente i dati del vecchio classificatore, mantenendone il nome).
- Fare clic su **OK**. Il classificatore viene creato e la visualizzazione ritorna all'elenco delle miniature per la scansione caricata (MetList).

- Ripetere fino ad avere 100-200 cellule verdi e bianche per le operazioni di routine del classificatore per ogni tipo di campione distinto.

Modifica dei classificatori



Un classificatore è in realtà un *elenco di scansioni* da casi multipli, contenente tutte le immagini contrassegnate in verde e in bianco usate per crearlo e aggiornarlo. È possibile verificare e modificare i contenuti del classificatore per garantire il numero corretto e la qualità delle immagini utilizzate.

- Fare clic sull'icona **Edit** (Modifica).
- Selezionare il classificatore desiderato, i pulsanti **Delete** (Elimina) e **OK** si attivano.
- (Selezionando il pulsante **Delete** (Elimina), viene visualizzato un messaggio di conferma. L'azione elimina in modo definitivo il classificatore e tutti i suoi dati).
- Selezionare **OK** per caricare le miniature delle immagini del classificatore (se è aperto un elenco di vetrini attivo, verrà chiesto di salvarlo prima di visualizzare le immagini del classificatore).
- Verificare o modificare le immagini delle miniature, a seconda delle necessità
- Selezionare **Save** (Salva) per chiudere la visualizzazione delle miniature e salvare le modifiche.

Il classificatore può essere modificato allo stesso modo di qualsiasi *Scan List* (Elenco scansioni), le cellule possono essere riclassificate per una qualsiasi delle 4 classi di colore.

- Solo le categorie con flag verde e bianco vengono utilizzate per i parametri del classificatore.
- La classe con flag blu sarà disponibile per future modifiche ma non utilizzata nel funzionamento del classificatore.
- Le cellule contrassegnate in rosso (tranne quelle che sono state registrate come acquisite automaticamente) verranno eliminate in modo permanente al momento del salvataggio.

Ordinamento Nearest Neighbour (Primi vicini) per Auto-Capture (Acquisizione automatica)

L'ordinamento delle cellule in un classificatore consente di utilizzare l'opzione di classificazione Nearest Neighbour (Primi vicini) nel modello di vetrino.

- Questo è destinato a essere utilizzato con campioni di metafase, fare riferimento alle **istruzioni operative del CytoVision DX Karyotyper**.

Acquisizione automatica

Per informazioni sulla fotocamera e la configurazione di acquisizione, fare riferimento alla sezione [Acquisizione FISH \(Manuale\)](#).

Acquisizione automatica



L'acquisizione automatica inizia dopo la scansione 10x e la classificazione delle cellule.

- Le cellule classificate (flag verde) vengono mappate nell'area di scansione e quindi utilizzate per calcolare quali cellule acquisire (modalità **Probe**) o per selezionare le aree (frame) contenenti le cellule per l'acquisizione (modalità **ProbeAuto** e **SpotCounting**).
- L'applicazione passa automaticamente alla schermata di acquisizione, si sposta sulla prima cellula o frame e avvia il processo di acquisizione, visualizzando un pannello di avanzamento dell'acquisizione automatica.
- Dopo che è stato acquisito il numero corretto di cellule, il sistema passerà al vetrino successivo.

- Un pulsante **Pause** (Pausa) nel pannello di avanzamento dell'acquisizione automatica può essere utilizzato per consentire l'interazione manuale con le impostazioni della fotocamera o del filtro (solitamente non richiesto).
- Se in pausa, è possibile utilizzare il pulsante **Next** (Successivo) (vetrino) se non è richiesta un'ulteriore acquisizione sul vetrino corrente, oppure è possibile utilizzare il pulsante **Stop** (Arresta) (batch) per saltare tutti i vetrini rimanenti.

Opzioni di acquisizione automatica

La modalità di acquisizione automatica **Probe** è collegata alle opzioni in un modello *Customize* (Personalizzazione) (**Opzioni post acquisizione**). Le regole tipiche di acquisizione automatica sono:

- Configurazione fotocamera automatica
- Soglia automatica
- Soglia zero
- Estensione contrasto
- Salva immagine non elaborata

Acquisizione manuale differita

Qualunque vetrino che presenti uno *Scan List* (Elenco scansioni) può essere acquisito automaticamente avviando una "Manual Deferred Capture" (Acquisizione manuale deferita);



- Aprire la finestra **Scan Setup** (Configurazione della scansione) e assegnare il nome del caso per il vetrino.
- Fare clic sulla freccia di selezione **Deferred Capture** (Acquisizione differita).
- La sezione **Capture** (Acquisizione) mostrerà quali vetrini del caso presentano uno *Scan List* (Elenco scansioni) selezionabile per l'acquisizione automatica.
 - Selezionare l'elenco corretto per il vetrino in GLS.
- (Opzionale) Fare clic su **Set Offset** (Imposta offset) per caricare il vassoio e impostare un offset manuale per le cellule a ingrandimento ridotto che saranno visualizzate. Una volta impostato chiudere la finestra.
- Fare clic su **Scan** (Scansione) per avviare la procedura di acquisizione automatica come descritto in precedenza.

NOTA: i vetrini rimossi dal tavolino dopo la scansione richiedono la funzione **Set Offset** (Imposta offset) perché è estremamente improbabile che il vetrino estratto ritorni esattamente nella stessa posizione della precedente scansione.

- La "Manual Deferred Capture" (Acquisizione manuale differita) non è una procedura pensata per più vetrini contemporaneamente o per qualsiasi utilizzo di routine del flusso di lavoro del campione fluorescente.

Acquisizione Probe (immagini cellule)



La schermata di acquisizione manuale standard contiene strumenti per interagire con la fotocamera, l'hardware del microscopio motorizzato e le impostazioni per visualizzare e acquisire un'immagine Probe in una cartella delle cellule nel Navigator.

Su un sistema GSL è necessario utilizzare il flusso di lavoro standard di acquisizione manuale per confermare la risposta hardware, configurare le impostazioni software ottimali per la qualità dell'immagine, creare un elenco di fluorocromi e salvare le "Post Capture Options" (Opzioni post-acquisizione) (modelli di personalizzazione dell'acquisizione) utilizzate in Auto-Capture (Acquisizione automatica).

La schermata di acquisizione, per impostazione predefinita, all'avvio si troverà nell'ultima modalità di acquisizione selezionata; l'utente può selezionare o modificare questa impostazione servendosi del pulsante **Capture Mode** (Modalità di acquisizione).

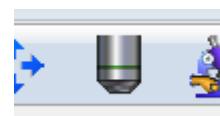


- **Probe (Sonda):** per la configurazione, il test e l'acquisizione manuale delle immagini di metafase, interfase o materiale cellulare di vetrini colorati a fluorescenza con uno o più canali sonda del DNA.
- **Spot Counting (Conteggio spot):** per l'acquisizione manuale delle immagini di interfase o materiale cellulare colorati a fluorescenza con uno o più canali sonda del DNA. Le immagini vengono salvate come framelist con elaborazione automatica delle immagini tramite Spot Assay (test spot).
- **M-FISH:** per l'acquisizione manuale di cellule di metafase di vetrini colorati a fluorescenza con più canali sonda del DNA in una combinazione specifica del cromosoma per l'analisi del cariotipo.

I sistemi *CytoVision DX* utilizzano una fotocamera monocromatica per acquisire le immagini. Per creare la visualizzazione dell'immagine della sonda a colori, i singoli fluorocromi sul vetrino devono essere acquisiti, pseudocolorati e sovrapposti l'uno sull'altro, producendo un'immagine composita a colori multicanale.

- Ogni canale fluorocromico separato deve avere valori preimpostati per il colore e il filtro del microscopio che vengono impostati e salvati tramite il pannello *Fluorochrome Selection* (Selezione fluorocromo).

Controllo obiettivo



Nell'acquisizione manuale, l'applicazione utilizza la posizione dell'obiettivo del microscopio dal pannello "Objectives" (Obiettivi) per aggiornare l'ingrandimento.

Quando l'applicativo *CytoVision* si avvia, passa per impostazione predefinita sulla lente configurata in posizione 1. Nei sistemi di microscopi motorizzati qsi tratta della lente dell'obiettivo 10x

- Se il touchpad LCD del microscopio viene utilizzato per cambiare le lenti degli obiettivi, il software non identificherà che l'ingrandimento è cambiato e continuerà a utilizzare il valore della posizione 1.
- Per qualsiasi lavoro di acquisizione manuale, è necessario anche/solo cambiare l'obiettivo utilizzando il pannello Obiettivi prima dell'acquisizione. In modo che questo valore non venga letto male.
- Apparirà sullo schermo un messaggio di avviso se è ancora impostato un ingrandimento obiettivo inaspettato quando si avvia la procedura di acquisizione.

Acquisizione Probe (Sonda): Panoramica della procedura

- **New Cell** (Nuova cellula). Crea una cellula vuota nel **Navigator** pronta per l'acquisizione.
- **Live** (dal vivo). Visualizza l'immagine della fotocamera nella finestra del display principale.
 - passa automaticamente al filtro del microscopio per il fluorocromo selezionato
 - attiva l'otturatore fluorescente per illuminare il vetrino
- **Capture** (Acquisisci). Consente di acquisire l'immagine dal vivo e di inviarla al processo di Sogliatura opzionale.

1. Selezionare un Caso e un Vetrino nel Navigator, quindi fare clic su **New Cell** (Nuova cellula).
2. Creare o caricare un **Fluorochrome List** (Elenco dei fluorocromi) pre-salvato appropriato per il campione.
3. Localizzare un'area campione sul vetrino del microscopio e fare clic su **Live** (Dal vivo).
4. Regolare le impostazioni della fotocamera (configurazione automatica), controllare la visualizzazione dell'immagine e fare clic su **Capture** (Acquisizione).
5. (Facoltativo) Utilizzare **Threshold** (Soglia) per rimuovere lo sfondo scuro attorno agli oggetti dell'immagine.
6. Premere **Live** (Dal vivo) per il canale dei fluorocromi successivo sul vetrino.
7. Regolare le impostazioni della fotocamera (configurazione automatica), controllare la visualizzazione dell'immagine e fare clic su **Capture** (Acquisizione).
8. Ripetere per tutti i canali dei fluorocromi rimanenti.
9. Fare clic su **New Cell** (Nuova cellula) per l'immagine successiva.

Non...

- ... spostare manualmente la lente dell'obiettivo senza utilizzare il pannello **Obiettivi** per confermare il corretto ingrandimento della lente di acquisizione.
- ...regolare manualmente l'esposizione: lasciare che il sistema la calcoli avvalendosi della funzione **Auto Setup** (Configurazione automatica).
- ... spostare il tavolino o la messa a fuoco prima di completare tutti i canali nell'elenco dei fluorocromi (*Fluorochrome List*).

Comandi di acquisizione

La finestra del display principale della schermata di acquisizione presenterà l'immagine in tempo reale. Al di sotto di questa immagine si trovano i pulsanti dei flussi di lavoro relativi ai controlli dell'acquisizione.

- Quando si seleziona la modalità di acquisizione Probe (sonda), si apre il pannello **Fluorochrome Selection** (Selezione fluorocromo) per selezionare o creare elenchi di acquisizione.
- Per ogni fluorocromo, il pannello **Capture Setup** (Impostazione acquisizione) consente di accedere ai comandi della fotocamera, del filtro e della lampada fluorescente.

Nuova cellula e live

Il pulsante **New Cell** (Nuova cellula) crea una nuova cartella nel caso in cui l'immagine venga salvata.

Una volta individuata un'immagine, il pulsante **Live** (Dal vivo) visualizza la vista della fotocamera nella finestra principale utilizzando il filtro del microscopio configurato e le impostazioni della lampada fluorescente/otturatore.

- Se necessario, spostare il tavolino del microscopio posizionando il campione centralmente nella finestra principale, verificando che l'immagine sia a fuoco.

Configurazione automatica della fotocamera

L'acquisizione di routine deve essere eseguita utilizzando l'**Auto Setup** (Impostazione automatica) della fotocamera per ottimizzare l'esposizione della fotocamera e l'intervallo di contrasto visualizzato nell'immagine.

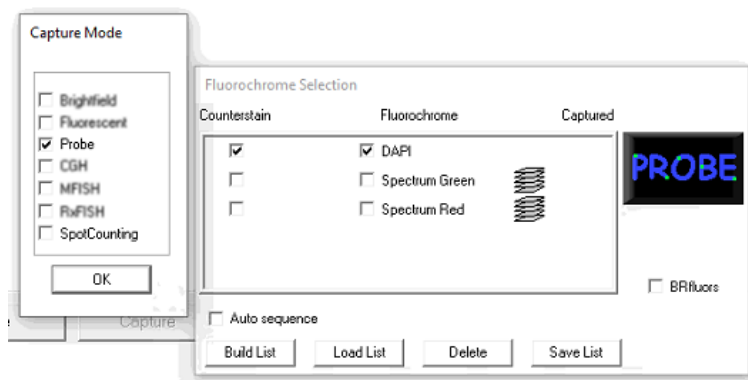
- I valori finali dell'immagine saranno basati sull'intensità della fluorescenza, determinata dalla qualità del campione, dal tipo di filtro e dalla sorgente di luce fluorescente.
- Ogni colorazione rossa e blu visibile sull'immagine indica la saturazione della luce. Per l'acquisizione FISH si raccomanda di avere una piccola saturazione rossa nel materiale campione (colorazione di contrasto o segnali) con lo sfondo scuro o con solo una piccola quantità di saturazione blu, per migliorare il contrasto.
- La quantità di saturazione rosso/blu nell'immagine live viene modificata tramite il pannello **Autosettings** (Impostazioni automatiche) in Capture Setup (Configurazione acquisizione).

La fotocamera può essere attivata manualmente nella casella di controllo, accanto alla barra del contrasto, oppure tramite la funzione "Customize" **Auto-camera setup** (Personalizza configurazione automatica della fotocamera), che avvia la regolazione della fotocamera non appena premuto il pulsante **Live** (Dal vivo).

- Verranno immediatamente applicati tutti i valori di **Auto Settings** (Impostazioni automatiche).
- L'**Auto Setup** (Configurazione automatica) non riuscirà se la luce fluorescente è spenta o impostata su un'intensità molto bassa, dunque è necessario controllare queste circostanze.
- L'Auto Setup (Configurazione automatica) potrebbe non riuscire se il segnale fluorescente sul campione presenta un'intensità o un contrasto bassi.

Elenchi acquisizioni

La modalità di acquisizione della sonda aprirà un pannello di selezione del fluorocromo (**Fluorochrome Selection**) utilizzato nella configurazione e nell'acquisizione.

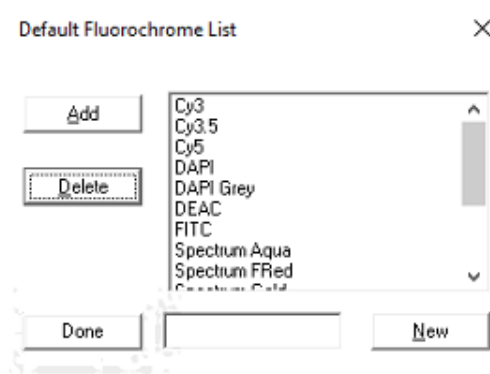


Qui è possibile creare un elenco dei fluorocromi sul vetrino e selezionare la colorazione di contrasto (ad esempio, DAPI) richiesta dall'applicazione durante il processo di acquisizione e per il lavoro di analisi successivo.

Per aggiungere nuovi fluorocromi all'elenco di acquisizione, selezionare il comando **Build List** (Crea elenco). Apparirà una casella di menu contenente un elenco di fluorocromi disponibili e pre-programmati.

Fare clic su quelli che desideri per l'elenco di acquisizione e selezionare **"Add"** (Aggiungi) per ciascuno.

- Creare l'elenco nell'ordine in cui si desidera acquisire la cellula, con la colorazione di contrasto per prima.
- Selezionare la casella per la colorazione di contrasto corretta.
- Per ogni nome di fluorocromo, controllare e modificare le impostazioni come richiesto tramite il pannello *Capture* (Acquisizione) e *Fluorochrome Setup* (Impostazione fluorocromo).
- Utilizzare **Save List** (Salva elenco) per creare un **Fluorochrome List** (Elenco dei fluorocromi) che può essere collegato a un modello di scansione per le modalità di acquisizione **Probe** (Sonda) e **ProbeAuto**.

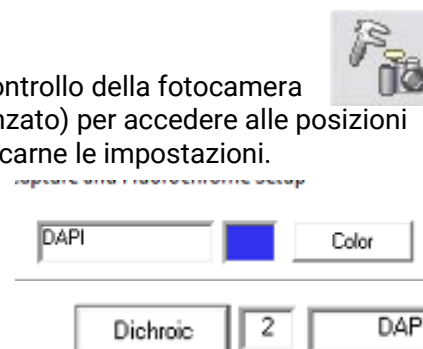


Nota: se si desidera mantenere i valori di Setup (Impostazione) modificati, sarà necessario salvare l'elenco (**Save List**) dopo ogni modifica.

Impostazione fluorocromi e acquisizione

Capture Setup (Impostazione acquisizione) apre una finestra di controllo della fotocamera e dell'hardware. Fare clic sulla casella di controllo *Advanced* (Avanzato) per accedere alle posizioni del filtro dicroico e ai comandi avanzati della fotocamera e modificarne le impostazioni.

- **Colore:** imposta il colore di sovrapposizione per il Fluorocromo utilizzato nell'acquisizione.
- **Dicroico:** configura il filtro del microscopio utilizzato durante l'acquisizione del fluorocromo.



Entrambi devono essere impostati e salvati utilizzando l'opzione "Save as Default" (Salva come predefinito) prima di qualsiasi operazione di acquisizione manuale o automatica per ogni Fluorocromo da utilizzare in un elenco di acquisizione o test spot.

Cursori della fotocamera

Guadagno, offset ed esposizione vengono impostati automaticamente da **Auto-setup** (Impostazione automatica) oppure possono essere visualizzati e modificati manualmente utilizzando le 3 barre di scorrimento.



La regolazione manuale dei cursori (attraverso la finestra **Capture Setup** (Configurazione acquisizione)) è superflua, a meno che la procedura **Auto Setup** (Configurazione automatica) fallisca o l'immagine contenga un numero eccessivo di oggetti sullo sfondo che alterano il contrasto relativamente a cellula o segnali.

Luminosità (guadagno fotocamera).

- Se è necessaria una maggiore (o minore) saturazione del rosso in una singola immagine, il cursore Luminosità è regolabile manualmente.

- Tutte le aree rosse nella visualizzazione live (dal vivo) saranno salvate come bianche nell'immagine acquisita prima che venga applicato lo pseudo-colore.
- La saturazione rossa sui segnali della sonda può determinare una visualizzazione del colore migliorata e più "intensa", utile per la visualizzazione del segnale visivo.
- Una saturazione eccessiva determinerà la perdita di qualsiasi informazione relativa o quantitativa, se utile per un'analisi successiva (come la formazione di bande DAPI nei cromosomi in metafase).

Nero (offset della fotocamera).

- Se è necessaria una maggiore (o minore) saturazione del blu in una singola immagine, il cursore Nero è regolabile manualmente.
- Tutte le aree blu nella visualizzazione live (dal vivo) saranno salvate come nere nell'immagine acquisita.
- La saturazione blu sullo sfondo scuro dell'immagine fornirà un contrasto dell'immagine finale migliorato, ma non deve estendersi all'intera immagine.

Esposizione (integrazione della fotocamera).

- La regolazione manuale del cursore dell'esposizione per l'acquisizione di routine è sconsigliata; utilizzare sempre la configurazione automatica (**auto-setup**) per trovare la migliore esposizione.
- Per i campioni fluorescenti l'esposizione massima dipende dall'intensità, ma deve essere sempre di almeno 0,005 (5 ms).

Impostazioni automatiche

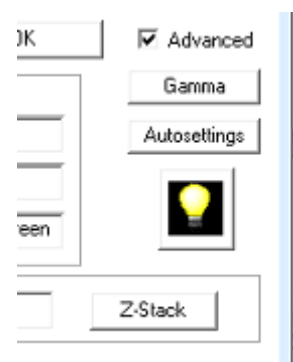
La funzione **Auto-settings** (Impostazioni automatiche) modifica i risultati di **Auto-setup** (Configurazione automatica) della fotocamera esagerando il livello di saturazione nel blu o nel rosso dell'immagine finale dal vivo. I singoli canali dei fluorocromi possono essere regolati separatamente, a seconda delle necessità.

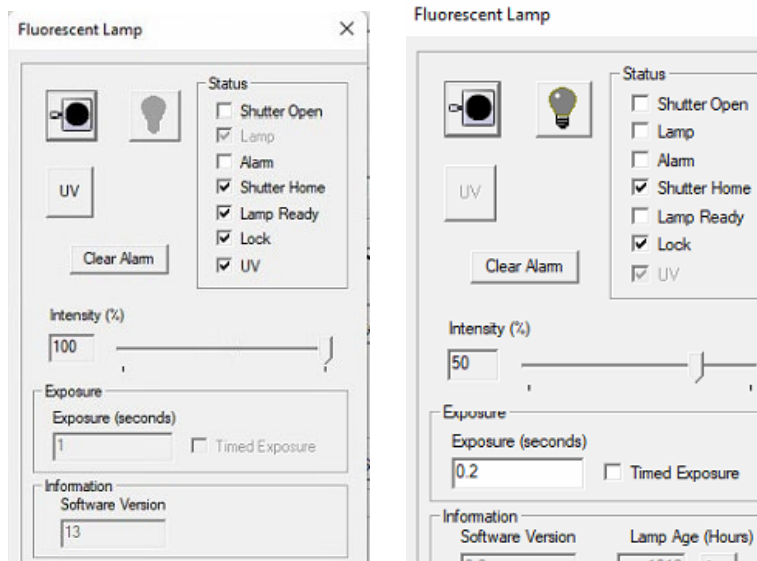
Per migliorare la visualizzazione dell'intensità delle immagini FISH, i valori suggeriti sono:

- Regolare il valore Max (rosso) tra **(+) 3 - 5**, aumentando l'intensità del segnale.
- Regolare il valore Min (blu) su **(+) 0,5**, attenuando il rumore di fondo.

Impostazione lampada fluorescente

Il pannello di controllo della lampada fluorescente Xylis/X-Cite può essere aperto facendo clic sull'icona della lampada nel pannello Capture Setup (Impostazione acquisizione) (il pulsante "Advanced" (Avanzate) deve essere attivo per la relativa visualizzazione).





Xylis LED XCite PC120

Il pannello della lampada fluorescente può essere utilizzato per controllare il funzionamento della lampada durante una procedura di acquisizione manuale.

- Il pulsante Shutter (Otturatore) su questo pannello funziona come un pulsante per aprire e chiudere l'otturatore.
- I controlli Exposure (Esposizione) mostrano l'intensità della lampada e i tempi di esposizione. - viene in genere utilizzato al 100% di intensità per la scansione FISH di routine e il lavoro di acquisizione
- Le caselle di controllo *Status* (Stato) mostrano in quale stato si trovano le diverse parti della lampada.

I sistemi che utilizzano un'unità XCite PC 120 dispongono anche di controllo lampada;

- Il pulsante Lamp (Lampada) accende o spegne la lampada.
- L'icona è gialla quando la lampada è accesa e pronta per l'uso.
- Quando l'icona è grigia, la lampada è spenta e in "standby" (verrà visualizzata come "lampadina" sul pannello LCD nella parte anteriore del controller della lampada). Verrà attivata automaticamente durante una scansione ma dovrà essere attivata manualmente per l'uso nella schermata di acquisizione.

Se si esegue una scansione di vetrini FISH senza supervisione e un batch di acquisizione automatica, è possibile impostare l'applicazione in modo che spenga automaticamente la lampada X-Cite alla fine del batch;

- Andare alla schermata **Scan** (Scansione) e selezionare il menu Utilities (Utilità).
- Le informazioni mostreranno l'impostazione corrente del sistema: "Leave fluorescent lamp on after batch" (Lascia accesa la lampada fluorescente dopo il batch) o "Switch fluorescent lamp off after batch" (Spegni la lampada fluorescente dopo il batch).
- Se si fa clic sul testo, verrà modificata l'impostazione alternativa (che verrà quindi visualizzata).

Z-stack

Z-stack viene utilizzato per acquisire segnali di sonda in diversi piani focali.

Durante l'acquisizione, il punto di messa a fuoco della colorazione di contrasto (DAPI) viene utilizzato come centro dell'intervallo focale per ogni acquisizione di fluorocromo, con il motore di messa a fuoco che sposta la distanza di spaziatura tra uno stack e l'altro.

- L'immagine finale viene salvata con gli stack uniti come un singolo strato di **proiezione massima**.
- Non è possibile rivedere le singole immagini stack dopo l'acquisizione. Se necessario, le immagini FISH devono essere acquisite in una Framelist utilizzando il conteggio manuale degli spot o l'acquisizione della sonda del *frame dell'immagine* per la visualizzazione tramite un software di analisi delle immagini separato compatibile con il formato "framelist".

Per impostare un fluorocromo per l'acquisizione Z-Stack, fare clic su **Z-Stack** nella finestra di dialogo *Capture and Fluorochrome Setup* (Impostazione fluorocromi e acquisizione).

- Si aprirà la finestra di dialogo Z-Stack.
- Scegliere il **Number of planes** (Numero di piani) e la **Spacing** (Spaziatura) tra di essi. La spaziatura è data in micrometri con incrementi di 0,1 µm.
- Per rimuovere Z-Stack, impostare il **numero di piani** su 0 (**Z-Stack è disattivato**).
- Fare clic su **Apply** (Applica) per terminare.



Nota: per quanto riguarda le impostazioni Z-stack di acquisizione Spot Counting (Conteggio spot) vengono create dalle impostazioni Spot Assay (test spot) configurate.

Personalizzazione dell'acquisizione



Una volta compreso il processo di acquisizione base, è possibile usare le opzioni di **Customize** (Personalizzazione) per modificare il numero di interazioni richieste all'utente.

Opzioni di acquisizione sonda di routine:

Impostazioni raccomandate:

- **Auto-camera Setup** (Configurazione automatica fotocamera) - quando viene selezionato il pulsante Live, questa funzione inizializza l'**Auto-Setup** (Configurazione automatica) della fotocamera.
- **Auto-Threshold** (Soglia automatica) - Salta la sogliatura manuale (rimozione dello sfondo) e utilizza le impostazioni **Zero-** o **Predict Threshold** (Previsione soglia). - Deve essere abilitato per i modelli salvati utilizzati in **GSL Probe Auto-Capture** (Acquisizione automatica sonda GLS) e utilizzato insieme a **Save Raw Image** (Salva immagine RAW).
- **Zero-Threshold** (Soglia zero) - Non rimuove lo sfondo dell'immagine dai dati dell'immagine live, creando un'immagine a blocco singolo. Viene applicato automaticamente se si utilizza **Auto-Threshold** (Soglia automatica) ed è ottimale per la rapida acquisizione FISH interfase.
- **Probe Background Cut** (Taglio sfondo sonda) - migliora la visualizzazione dei segnali FISH interfase sullo sfondo.
- **Contrast Stretch** (Estensione contrasto) - normalizza l'immagine dopo il processo di sogliatura per migliorare la visualizzazione. Deve essere sempre utilizzato per le immagini in cui si utilizza la funzione Thresholding (Sogliatura), per evitare che i bordi degli oggetti rimanenti appaiano artificialmente intensi.
- **Save Raw Image** (Salva immagine non elaborata) - Crea un file di immagine separato per ogni canale fluorescente acquisito.

L'immagine RAW non presenta rimozione o miglioramenti dello sfondo e può essere "Ri-acquisita" utilizzando l'icona Soglia sulla barra degli strumenti principale.

- Tale ri-soglia può essere utile per le immagini in metafase o interfase in cui si desidera separare singoli oggetti per un miglioramento specifico dell'immagine o per la copia su uno schermo flessibile, oppure per creare un cariotipo di sonda.

- Si consiglia di salvare l'immagine RAW per l'acquisizione **Sonda**, soprattutto se si utilizza **Auto-Threshold** (Soglia automatica).

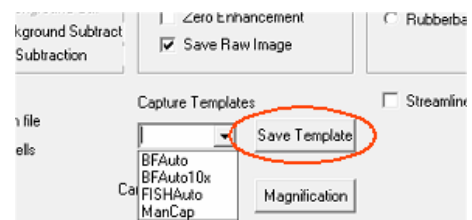
- L'accesso ai dati dell'immagine non elaborati può anche essere un requisito del laboratorio locale.

Impostazioni opzionali

- **Auto Sequence** (Sequenza automatica) - dopo l'acquisizione dell'immagine di colorazione di contrasto (DAPI), l'acquisizione procede senza dover premere "Live" o "Capture" (Acquisisci) per i canali di sonda rimanenti.
- **Predict Threshold** (Soglia di previsione) - stima una soglia appropriata per eliminare lo sfondo attorno agli oggetti nell'immagine. Viene applicato automaticamente se si utilizza **Auto-Threshold** (Soglia automatica) ed è ottimale per i cromosomi in metafase in cui è richiesto il cariotipo di sonda.
- **Auto Register Images** (Registrazione automatica delle immagini) - acquisisce le immagini della sonda con uno spostamento X/Y regolabile rispetto all'immagine DAPI (colorazione di contrasto), per compensare qualsiasi spostamento ottico o del filtro.
- Non deve essere utilizzato a meno che non ci sia un problema ottico con un cubo filtro o un allineamento del percorso della luce del microscopio.
- **Auto Focus Offset** (Offset messa a fuoco automatica) - quando attivato, i movimenti di messa a fuoco effettuati con la barra di scorrimento della messa a fuoco durante un'acquisizione manuale vengono registrati in relazione alla colorazione di contrasto e applicati automaticamente alle acquisizioni successive. Gli offset vengono salvati nell'elenco dei fluorocromi
Nota: non utilizzato dall'acquisizione automatica del conteggio spot come parte di un modello di scansione.

Le impostazioni migliori da utilizzare saranno influenzate dal tipo di campione. Utilizzare il pulsante **Save Template** (Salva modello) per assegnare alle impostazioni nomi di routine;

- Su sistemi di scansione GLS questi vengono utilizzati come **Post Capture Options** (Opzioni post-acquisizione) durante l'acquisizione automatica



Ingrandimento

Le impostazioni di **ingrandimento** sono necessarie per creare un fattore di scala dell'immagine accurato durante l'acquisizione.

- Il **Capture Objective** (Obiettivo di acquisizione) utilizza la posizione dell'obiettivo del microscopio (per l'acquisizione FISH deve essere 63x).
- Il valore **C-Mount** deve essere impostato per il connettore C-mount sulla fotocamera (1x è l'impostazione predefinita).

In combinazione, questi 2 valori calcolano una scala dell'oggetto e una risoluzione di visualizzazione, utilizzate per calcolare le dimensioni dell'oggetto utilizzate nel cariotipo metafaseico FISH e le dimensioni del segnale *framelist*.



L'acquisizione manuale utilizza la posizione della lente dell'obiettivo del microscopio impostata nel pannello **Objectives** (Obiettivi) per aggiornare l'ingrandimento.

- Ciò è configurato nell'applicazione **Microscope Calibration** (Calibrazione microscopio) dal modulo "Objectives" (Obiettivi).
- I microscopi con una torretta degli obiettivi motorizzata devono essere configurati per tutte le posizioni fisiche disponibili sul microscopio. (Standard sui sistemi GSL).

Valori non corretti causeranno errori di classificazione del cariogramma o di visualizzazione delle dimensioni del segnale;

Se si tenta di effettuare un'acquisizione manuale utilizzando un obiettivo di acquisizione a basso ingrandimento, verrà visualizzato un messaggio di avviso quando si preme il pulsante **Live** (Dal vivo): selezionare "Continue" (Continua) e passare all'obiettivo corretto utilizzando i controlli software prima di premere **Capture** (Acquisisci).

Ciò può essere causato dallo spostamento manuale della lente dell'obiettivo del microscopio (o tramite il touchpanel LCD) senza utilizzare il controllo **Objectives** (Obiettivi) dell'applicazione per impostare l'ingrandimento corretto.

- Quando l'applicativo CytoVision si avvia, passa per impostazione predefinita sulla lente configurata in posizione 1.
- Se il touchpad LCD del microscopio viene utilizzato per cambiare le lenti degli obiettivi, il software non identificherà che l'ingrandimento è cambiato e continuerà a utilizzare il valore della posizione 1.
- Per qualsiasi lavoro di acquisizione manuale, è necessario anche/solo cambiare l'obiettivo utilizzando il pannello Obiettivi prima dell'acquisizione. In modo che questo valore non venga letto male.

Nota: la posizione corretta dell'obiettivo verrà regolata automaticamente come parte dell'acquisizione automatica GSL e la scala dell'oggetto viene calcolata utilizzando il componente "Image Scales" (Scale immagini) della **Spatial Calibration** (Calibrazione spaziale) per la lente selezionata.

Sogliatura

La sogliatura è facoltativa per Probe Capture (Acquisizione sonda) (ed è disabilitato in Spot Capture (Acquisizione spot) e M-FISH).

- La risogliatura può essere eseguita su immagini RAW dopo l'acquisizione per aggiornare l'immagine Probe (Sonda).
- Se l'opzione **Auto-Threshold** (Soglia automatica) non è attiva nelle impostazioni **Customize** (Personalizza), viene visualizzata la finestra Threshold (Soglia) durante una **Acquisizione** manuale.

La sogliatura delle immagini sonda è simile alla sogliatura per le metafasi in campo chiaro. La differenza è che quando si applicano le sonde di sogliatura, qualsiasi area non coperta dalla maschera blu avrà il colore scelto per quel fluorocromo applicato.

Valori di soglia allentati possono causare grandi segnali irregolari. Anche il rumore di fondo e i detriti possono rendere difficile la sogliatura, pertanto sono disponibili strumenti aggiuntivi per la sogliatura nell'acquisizione sonda.

- **Counterstain Mask** (Maschera di colorazione di contrasto) elimina tutte le parti dell'immagine che non contengono colorazione di contrasto. Questo è un buon strumento da usare nel caso sia presente notevole rumore di sfondo.

- La **Region of Interest** (Regione di interesse) consente di definire una o più aree per la sogliatura. Si tratta di un buon strumento da usare per isolare piccoli segnali da artefatti o detriti

Nota: non è previsto che i miglioramenti di acquisizione vengano usati nell'acquisizione manuale delle immagini della sonda, a meno che non si tratti di immagini in metafase in cui il banding DAPI è utile per l'interpretazione delle immagini o il cariotipo.

- Per i dettagli sulle opzioni di sogliatura manuale standard, fare riferimento al manuale delle **Istruzioni operative del Karyotyper** e leggere la guida dell'applicazione.

Sogliatura automatica

Se la **soglia automatica** è attiva nelle impostazioni personalizzate, la finestra Threshold (Soglia) non verrà visualizzata quando viene catturata l'immagine live. Questa è l'operazione prevista su un sistema di scansione GSL.

- Il sistema usa il valore **Predict Threshold** (Soglia predittiva) o **Zero Threshold** (Soglia zero) per la rimozione dello sfondo. Ciò funziona generalmente per le immagini di fluorescenza con sfondo vetrino basso.
- I miglioramenti vengono applicati utilizzando le impostazioni nel modello di acquisizione salvato oppure è possibile disattivare i miglioramenti di acquisizione utilizzando l'opzione **Zero miglioramenti** in Personalizza acquisizione.
- L'immagine metafase verrà salvata e visualizzata nel Navigator.
- Un'immagine RAW salvata può essere utilizzata per la risogliatura manuale, se necessario.

Risogliatura dell'immagine RAW



Le immagini RAW possono essere rielaborate per aggiornare l'immagine Probe (Sonda) se la soglia originale non era ottimale.

Ciò può essere utile se è stata utilizzata **Zero Threshold** (Soglia zero) per l'acquisizione originale per creare in seguito oggetti per il miglioramento, la cariotipizzazione o la copia su uno schermo flessibile.

- Caricare l'immagine non elaborata nella finestra di visualizzazione principale della schermata Capture (Acquisisci).
- Fare clic sull'icona **Threshold** (Soglia) al centro della barra principale degli strumenti.
- Applicare manualmente la Threshold (Soglia) all'immagine, una volta completata l'immagine viene cancellata dalla finestra dell'immagine principale.

Modalità di acquisizione (Framelist)

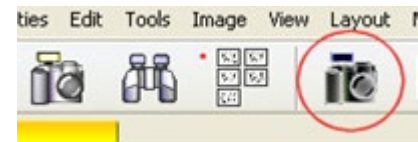


Image Frame Probe Capture (Acquisizione sonda frame immagine) è un'opzione di acquisizione di immagini singole progettata per l'uso di acquisizione manuale con torretta portafiltri motorizzata e controllo della messa a fuoco del microscopio.

È una procedura interattiva senza impostazioni o file di configurazione utilizzati da un sistema di scansione come parte dell'acquisizione automatica.

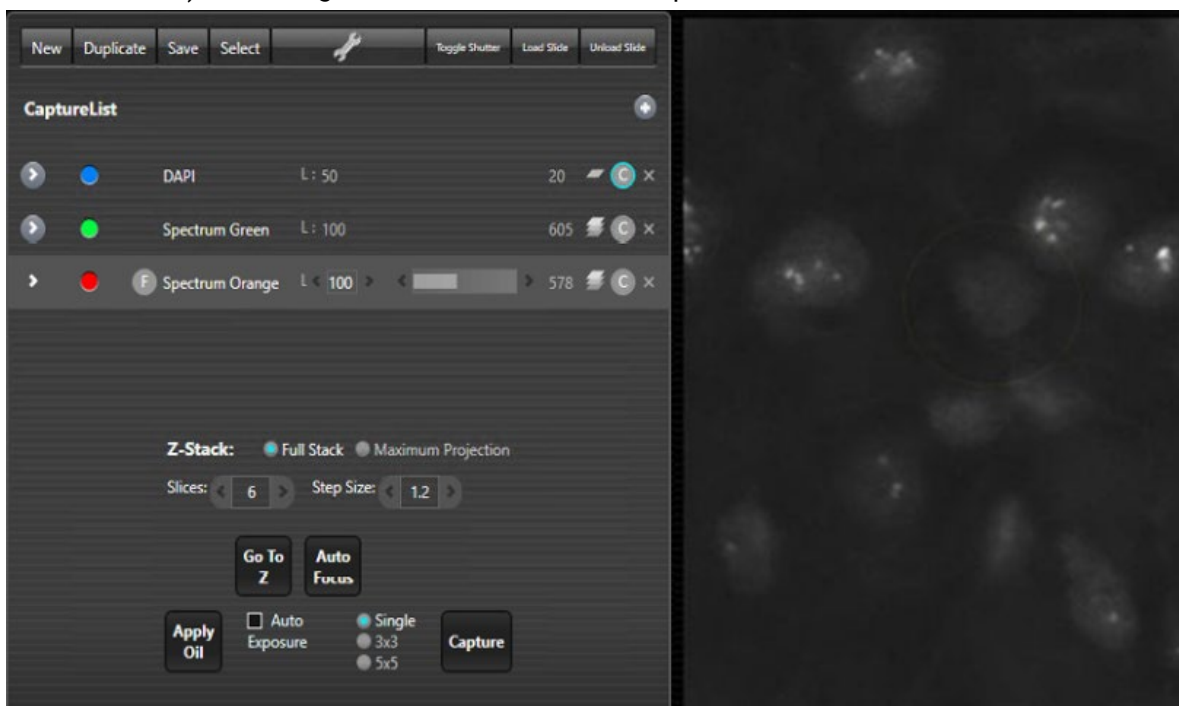
L'acquisizione manuale di *Framelist* può essere utilizzata per acquisire rapidamente un'area di un vetrino individuata manualmente per ottenere un numero ridotto di immagini di *framelist*.

Aprire un caso e fare clic sull'icona Acquisizione sonda manuale sulla barra degli strumenti principale nella schermata di avvio dell'applicazione.



Il layout della schermata **Probe Capture** (Acquisizione sonda) è costituito da una finestra Live Image (Immagine live) sul lato destro.

- L'immagine è sempre "Live" utilizzando l'esposizione della fotocamera del nome del fluorocromo selezionato nell'elenco.
- I controlli a sinistra consentono l'interazione con il microscopio (otturatore e messa a fuoco) e la configurazione di un elenco di acquisizione.



Una volta utilizzato Probe Capture (Acquisizione sonda), si vedranno i vetrini relativi al proprio caso visualizzati nella parte superiore dello schermo.

- È possibile aggiungere vetrini utilizzando il pulsante New Slide (Nuovo vetrino) nella parte superiore destra della finestra.
- Aggiungere canali, configurare le impostazioni di filtro, colore, Z-stack e salvare gli elenchi di acquisizione.

- Acquisire immagini con regolazione manuale o automatica dell'esposizione della fotocamera.
- Acquisire un singolo fotogramma o griglie rettangolari più grandi di 9 o 25 frame (movimento del tavolino GSL).
- Più immagini acquisite sono associate a un singolo vetrino.

Controllo obiettivo

Quando l'applicazione CytoVision si avvia, passa per impostazione predefinita sulla lente configurata in posizione 1. Nei sistemi di microscopi motorizzati, questa è la lente obiettivo 10x.

- Se il touchpad LCD del microscopio viene utilizzato per cambiare le lenti degli obiettivi, il software non identificherà che l'ingrandimento è cambiato e continuerà a utilizzare il valore della posizione 1.
- Per qualsiasi lavoro di acquisizione manuale, è necessario cambiare la lente obiettivo solo tramite l'interfaccia software prima dell'acquisizione. In modo che questo valore non venga letto male.

L'acquisizione manuale Framelist presenta un set di controlli hardware diverso dalla schermata di acquisizione standard, come descritto di seguito.

- La tastiera viene utilizzata per cambiare le lenti dell'obiettivo del microscopio utilizzando i tasti Funzione (F).
- Per visualizzare (o nascondere) tutte le scorciatoie hardware disponibili e le impostazioni di dimensione del passo, premere "F10".

Acquisizione framelist: Panoramica della procedura

- **Revisione delle immagini in tempo reale.** Immagine della fotocamera "sempre attiva" nella finestra di visualizzazione principale.
- canali, impostazioni e opzioni di acquisizione possono essere esaminati o modificati prima dell'acquisizione.
 - **Capture** (Acquisisci). Avvia un'acquisizione automatica completa di una singola cellula di tutti i canali utilizzando ciascuna delle impostazioni dell'elenco di acquisizione. Acquisisce le immagini in tempo reale e le salva nell'elenco framelist del vetrino nel **Navigator**.
1. Selezionare il caso e il vetrino nel Navigator, quindi fare clic su **Probe Capture** (Acquisizione sonda).
 2. Crearne uno **nuovo** o selezionare un elenco di acquisizione pre-salvato appropriato per il campione.
 3. Fare clic sul canale di colorazione di contrasto nell'elenco di acquisizione (attivando il filtro/otturatore fluorescente).
 4. Individuare un'area del campione sul vetrino del microscopio e posizionare e mettere a fuoco nella finestra di visualizzazione.
 5. Fare clic su **Capture** (Acquisizione) per avviare la sequenza di acquisizione automatica.
- se l'"Auto Exposure" (Esposizione automatica) è attiva, l'impostazione automatica della telecamera viene eseguita per ciascun canale.
- se l'"Auto Exposure" (Esposizione automatica) è disattivata, i canali vengono acquisiti utilizzando i valori di esposizione fissi dall'elenco di acquisizione.
 6. Viene visualizzato uno stato per ciascun canale che mostra tutte le operazioni di esposizione e Z-stack.

7. Una miniatura dell'immagine a colori viene visualizzata sotto il pannello di acquisizione.
8. Ripetere il processo per qualsiasi altra immagine.

Non...

- ... passare manualmente da lenti dell'obiettivo a basso e alto ingrandimento. Utilizzare i controlli della tastiera (F1 – F7) per cambiare obiettivo per confermare il corretto ingrandimento della lente di acquisizione
- ... spostare il tavolino o mettere a fuoco manualmente durante l'acquisizione.

Opzioni di configurazione dell'acquisizione

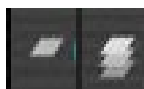
È necessario che almeno un canale sia aggiunto alla schermata prima di poter accedere ai controlli di acquisizione.

Aggiunta di canali

Il pulsante "+" aggiunge un canale all'elenco di acquisizione corrente, la raccolta di canali fluorocromici attualmente da acquisire.



1. Selezionare il canale (>)
2. Configurare il colore canale
3. Configurare il filtro canale (F)
4. Intensità lampada fluorescente (L: Xylis/XCite)
5. Esposizione fotocamera (regolazione manuale)
6. Indicatore Z-stack (off/on)
7. Indicatore di colorazione di contrasto (C)



Impostazione di un canale

(2) Colore di visualizzazione canale

Ogni canale acquisito presenta un colore di visualizzazione, che viene mostrato verso sinistra della riga del canale. Si tratta del colore che verrà utilizzato per il canale quando si visualizza l'intera immagine.



Il colore può essere modificato cliccando sul cerchio colorato che apre un pannello griglia **Basic Colors** (Colori di base) e la possibilità di definire qualsiasi colore di visualizzazione richiesto.

(3) Filtro microscopio

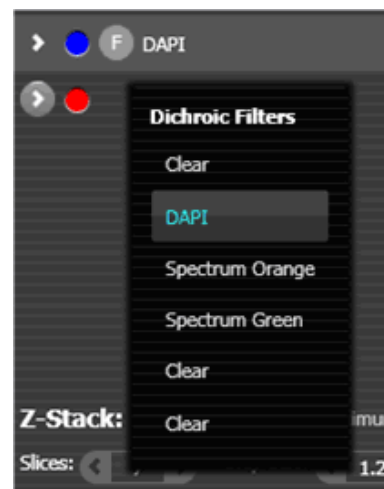
Una volta selezionato un canale, un pulsante filtro, rappresentato con una "F", appare appena prima del nome del canale. Facendo clic su questo pulsante verranno visualizzati i filtri configurati per il microscopio.



È possibile utilizzare solo un filtro configurato o una combinazione per ogni canale fluorocromo, una volta selezionato un filtro, questo lo rimuove dall'elenco di selezione successivo.

Nota: il nome del canale è tratto dalle ruote portafiltri configurate sul sistema.

- Se si utilizzano due filtri, ad esempio un filtro di eccitazione e un filtro di eccitazione, verranno presentate entrambe le opzioni.
- Se i filtri disponibili sembrano errati, controllare la configurazione nell'applicazione di **calibrazione del microscopio**.



(4) Intensità della lampada

I sistemi con una lampada fluorescente Xylis o X-Cite presenteranno una regolazione dell'intensità per modificare l'intensità della lampada utilizzata per ogni canale durante l'acquisizione.

- Per l'acquisizione del canale sonda di routine, il 100% rappresenta il valore tipico.
- Se la colorazione di contrasto è molto luminosa, utilizzare un'intensità inferiore può consentire una migliore visualizzazione del contrasto.
- Un'intensità inferiore può anche ridurre il rapido fotobleaching se la colorazione di contrasto o l'anti-sbiadimento sul vetrino non sono stabili.

(5) Esposizione della fotocamera

Ogni canale ha il proprio valore di esposizione (in millisecondi) visualizzato a destra del nome del canale che controlla la quantità di integrazione della fotocamera utilizzata.

- Quando viene selezionato un canale, è visibile una barra di scorrimento dell'esposizione che può essere regolata trascinando con il tasto sinistro del mouse all'interno della barra o facendo clic sulle frecce su entrambi i lati.



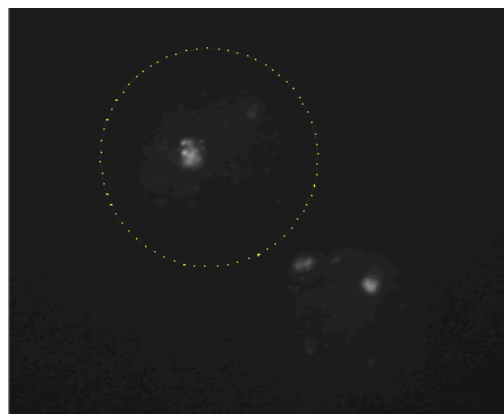
Se l'otturatore fluorescente è aperto, l'immagine live viene visualizzata sullo schermo e gli effetti della regolazione dell'esposizione possono essere osservati direttamente.

In alternativa, è possibile fare clic sull'immagine live direttamente con il mouse. Ciò imposta un "cerchio di destinazione" sull'immagine e un'esposizione automatica della fotocamera viene calcolata solo su quest'area.

- Ciò viene visualizzato come un cerchio tratteggiato sull'immagine.

Ciò consente di indirizzare l'Auto Setup (Impostazione automatica), utilizzando un'area dell'immagine che includa materiale interessante ed evitando aree che potrebbero includere artefatti luminosi che interferiranno con i calcoli dell'esposizione.

- Fare clic con il **tasto sinistro** del mouse sull'immagine di nuovo in un'area diversa per applicare un cerchio diverso di Auto Setup (Impostazione automatica).
- Fare clic con il **tasto destro** del mouse sull'immagine per annullare un'Auto Setup (Impostazione automatica) o per deselectare un cerchio di destinazione.

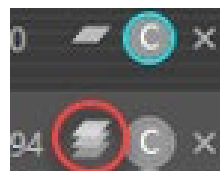


(6) Acquisizione Z-Stack

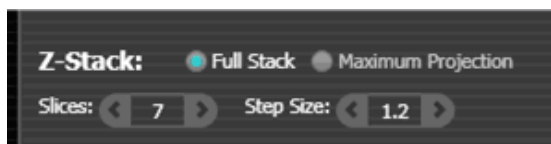
Z-Stack è l'acquisizione di più immagini dello stesso canale in diversi piani focali per identificare differenze di segnale tridimensionali.

Facendo clic sul grafico dello stack a destra dell'impostazione relativa all'Esposizione si passa da un'immagine singola (Z-stack disattivato) a uno stack multiplo di immagini (Z-stack attivato).

- Non è tipico acquisire uno stack per l'immagine della colorazione di contrasto



Una volta attivato Z-stack per un canale, verranno visualizzate opzioni aggiuntive sopra il pulsante Capture (Acquisizione) per impostare il numero di **Slices** (Sezioni) nello stack e la spaziatura, **Step Size**, tra uno stack e l'altro.



È possibile scegliere tra salvare solo **Full Stack** (Stack completo) o la **Maximum Projection** (Proiezione massima):

- La **Proiezione massima** acquisirà uno stack di immagini per creare solo un'immagine composita, l'Immagine di *Proiezione massima*.
- Le singole immagini dello stack non vengono salvate nel Frame immagine finale.
- Lo **Stack completo** acquisirà e memorizzerà le singole acquisizioni nello Z-stack insieme alla *Proiezione massima* unita.

(7) Colorazione di contrasto

Un canale dell'elenco deve essere selezionato come Colorazione di contrasto prima che l'acquisizione possa essere avviata.

- Normalmente si tratta del canale DAPI.
- Il canale di colorazione di contrasto è un punto di riferimento e un centro di messa a fuoco per l'acquisizione Z-stack (a meno che la messa a fuoco non venga regolata manualmente su uno dei canali sonda prima dell'acquisizione).

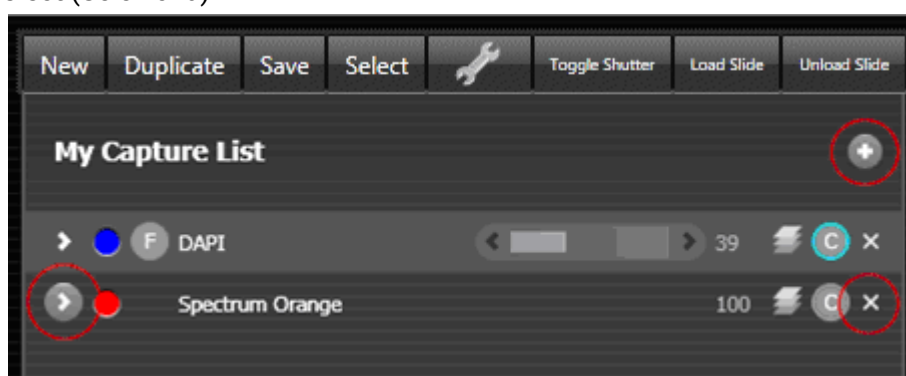


Lavorare con gli elenchi di acquisizioni

Una raccolta di canali è un elenco di acquisizioni. I controlli per gli elenchi di acquisizioni sono visualizzati nella parte superiore del pannello di acquisizione: New, Duplicate, Save and Select (Nuovo, Duplica, Salva e Seleziona).



- **New** (Nuovo) fornisce un nuovo elenco di acquisizioni contenente un solo canale. Questo sostituirà tutti i canali attualmente visualizzati.
- **Duplicate** (Duplica) crea una copia di un elenco corrente.
- **Save** (Salva) memorizza l'elenco di acquisizioni attualmente visualizzato nella finestra **Select** (Seleziona).
- Gli elenchi di acquisizioni salvati in precedenza possono essere recuperati utilizzando **Select** (Seleziona).



- Per selezionare un canale diverso, premere il pulsante ">" a sinistra del nome del canale; selezionando un canale, l'immagine live (dal vivo) cambierà per riflettere le impostazioni del canale corrente.
- I canali possono essere rimossi con il pulsante "x", visualizzato alla fine di ogni riga del canale e aggiunti utilizzando il segno +.

Acquisizione di immagini

Una volta creato l'elenco di acquisizioni e configurate le impostazioni appropriate per filtro, colore, colorazione di contrasto e Z-stack per ogni canale, è possibile acquisire un'immagine in base a un calcolo dell'esposizione della fotocamera.

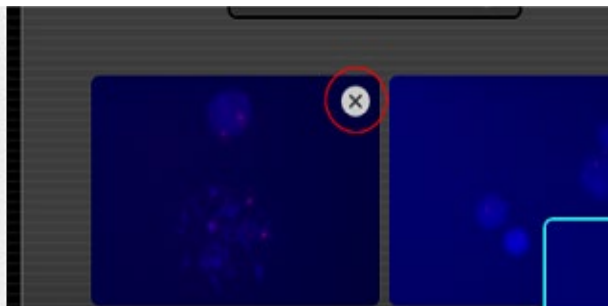


- Se è abilitata l'**esposizione automatica**, selezionando il pulsante **Capture** (Acquisizione) si regolerà automaticamente l'esposizione della fotocamera per ogni canale utilizzando un'impostazione automatica basata sull'intensità dell'immagine.
 - Se è stato posizionato un cerchio di destinazione per l'impostazione automatica, ogni canale utilizzerà solo quell'area dell'immagine per calcolare i valori di esposizione ottimali.
 - Se non è stato posizionato un cerchio target, l'impostazione automatica si baserà sull'intera immagine.
- Se l'esposizione automatica è disabilitata, selezionando il pulsante **Capture** (Acquisizione) si acquisirà ogni canale fluorocromico nell'elenco di acquisizione in sequenza utilizzando i valori di esposizione attualmente presenti nell'elenco di acquisizione.
 - È necessario confermare i valori di esposizione della fotocamera richiesti da utilizzare prima di premere **Capture** (Acquisizione).

Una volta avviato, il processo di acquisizione è continuo per tutti i canali.

- Non vi è alcuna pausa tra lo spostamento attraverso i canali fluorocromici.
- La visualizzazione dell'immagine live (dal vivo) non viene aggiornata durante l'acquisizione.

Dopo l'acquisizione, ogni immagine viene visualizzata sotto i controlli di acquisizione.



- Tenendo il mouse su un'immagine in miniatura verrà visualizzata una versione ingrandita dell'immagine.
- La piccola croce nell'angolo in alto a destra può essere utilizzata per eliminare l'immagine, se necessario.

Nota: solo le immagini framelist acquisite manualmente in questa schermata possono essere eliminate in questo modo. Le immagini acquisite dalle modalità di acquisizione **ProbeAuto** o **Spot Counting** (Conteggio spot) del sistema di scansione non possono essere eliminate.

Completamento dell'acquisizione

Una volta completata l'acquisizione, uscire dalla schermata utilizzando la crocetta di "chiudi finestra" in alto a destra della schermata, che riporta alla schermata di avvio per le funzioni di gestione dei casi.

Visualizzazione dell'immagine sonda

CytoVision DX include vari strumenti di visualizzazione e output delle immagini basati sulla sonda standard e sulla cellula M-FISH, che possono essere caricati nella schermata di avvio per la visualizzazione delle immagini e il colore generale, la regolazione del contrasto, il cariotipo o l'annotazione, l'esportazione o la stampa.

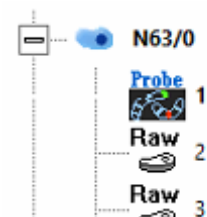
I dati del frame dell'immagine non possono essere visualizzati nell'applicazione CytoVision DX.

- È importante che venga utilizzata la modalità di acquisizione più appropriata per i requisiti di visualizzazione.
- Per ulteriori informazioni, fare riferimento alla [Tabella di acquisizione e analisi](#).

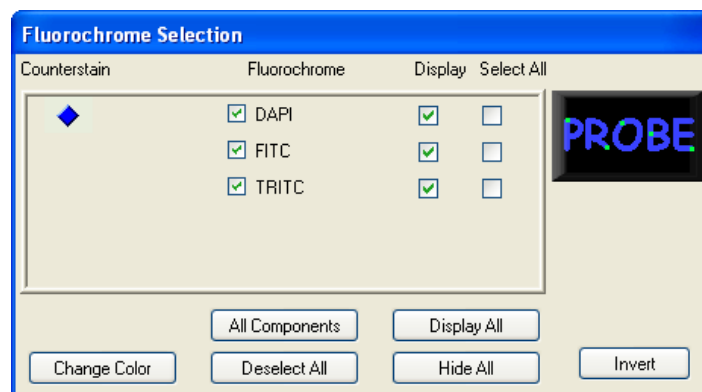
Visualizzazione schermo

Tutte le immagini visualizzate e caricate vengono eseguite tramite la **schermata di avvio**.

- Caricare un'immagine facendo doppio clic su un'icona "Sonda" nel navigator, quindi fare clic sulla finestra di visualizzazione principale.



Quando un'immagine sonda viene caricata nella finestra di analisi principale, la casella **Fluorochrome Selection Panel** (Pannello di selezione fluorocromi) appare nella parte inferiore dello schermo.



Questa casella mostra quali fluorocromi sono stati utilizzati quando l'immagine è stata acquisita e consente di scegliere quali componenti dell'immagine sonda unita si desidera visualizzare;

- Ogni immagine sonda contiene una sovrapposizione di 2 o più canali di *fluorocromi*.
- Ogni canale può contenere oggetti separati che devono essere selezionati individualmente prima che sia possibile apportare qualsiasi regolazione.
- Attivare più caselle di controllo "Fluorochrome" (Fluoricromo) per consentire la selezione di più canali contemporaneamente.
- Alcune funzioni di analisi, come **Register** (Registra) o **Change Color** (Cambia colore), richiedono la selezione di un solo componente.

È presente anche una casella di controllo **Display** (Visualizza) a destra del Fluorocromo.

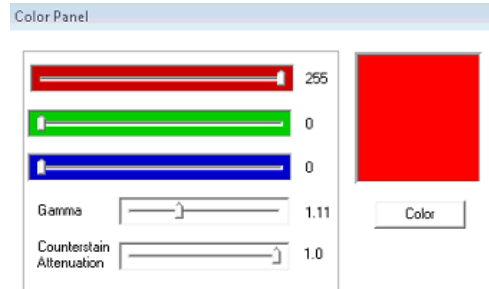
- Quando attivata, saranno visualizzati tutti gli oggetti per quel canale.
- Quando disattivata, tutti gli oggetti in quel canale saranno nascosti.

Le combinazioni di opzioni "Fluorochrome" (Fluorocromo) o "Display" (Visualizza) sono utili per decidere quali oggetti sono disponibili per la selezione per miglioramenti, cambio colore, registrazioni di immagini e creazione di schermate composite.

Modifica colore

Funziona in modo simile all'impostazione Color (Colore) in Capture Setup (Impostazione acquisizione), aggiornando il colore dei componenti nella singola immagine salvata. Può essere utile per migliorare la visualizzazione dei segnali sovrapposti e per facilitare la stampa.

- Fare clic sul pulsante di comando **Change Color** (Cambia colore) per aprire il pannello colore, l'immagine della colorazione di contrasto verrà selezionata automaticamente.
- Regola le 3 barre di scorrimento per modificare il colore.
- In alternativa, fare clic sul pulsante **Color** (Colore) per effettuare la selezione da una tabella colori.
- Fare clic su un fluorocromo diverso per cambiarne il colore.
- I comandi **Counterstain Attenuation** (Attenuazione colorazione di contrasto) e **Gamma** funzionano come nella finestra Capture Setup (Impostazione acquisizione), ma i loro effetti vengono visualizzati immediatamente sull'immagine Sonda.
La regolazione *Gamma* agisce globalmente sull'immagine per migliorare la visualizzazione; tuttavia, anche lo sfondo o il segnale non specifico saranno aumentati. Per migliorare solo la visualizzazione del segnale, selezionare gli oggetti di interesse e utilizzare l'opzione **Contrast** (Contrasto).



Fare clic su OK per chiudere il pannello di modifica del colore.

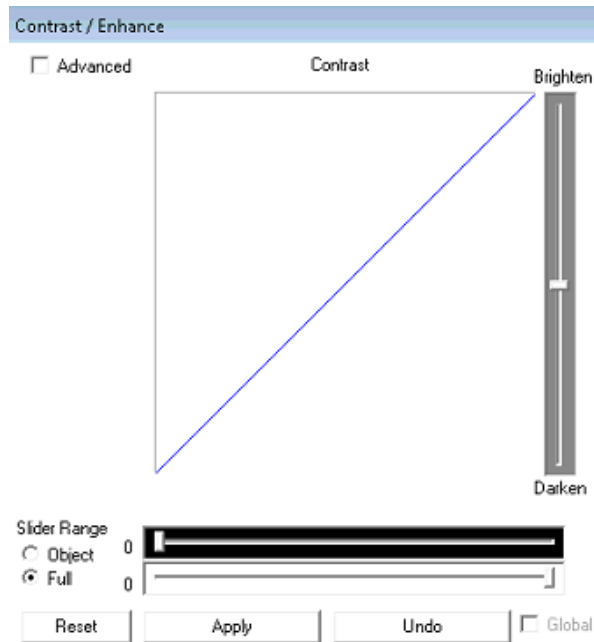


Contrasto

È possibile modificare la luminosità e il contrasto dell'immagine usando lo strumento di contrasto.

- Il contrasto deve essere utilizzato in modalità **Global** (Globale) o "Full" (Completa) come impostazione predefinita.
- Assicurarsi che "**Preview enhancements**" (Anteprima miglioramenti) in Customize (Personalizza) sia selezionato.
- Confermare che sia selezionato il fluorocromo corretto nel *pannello di selezione Fluorochrome* (Fluorocromo) e fare clic sul segnale o sui segnali che si desidera rendere visibili (apparirà una casella di selezione attorno a essi).





1. Per rendere **visibile** un segnale, spostare verso l'alto la barra di scorrimento a destra dell'istogramma.
2. Per **oscurare** un segnale, trascinare la barra di scorrimento verso il basso.
3. I cursori "cut-off" del colore sotto l'istogramma possono essere usati per apportare modifiche estreme all'intensità.

Migliora (nitidezza)



Lo strumento Enhance/sharpen (Migliora/nitidezza) si trova sotto la finestra del contrasto.



La funzione di **nitidezza** viene in genere utilizzata solo sul canale di colorazione di contrasto per migliorare i dettagli dei bordi o dello sfondo, oppure se si lavora su una metafase colorata con DAPI per migliorare la formazione di bande.

Non ci sono strumenti di analisi dedicati per la visualizzazione o la visualizzazione delle immagini Probe (sonda). Le immagini Probe (sonda) hanno accesso a opzioni simili ad altri formati di immagini cellulari.

- Le immagini Probe (sonda) verranno caricate nella **Visualizzazione casi** standard per la visualizzazione nella schermata Organize (Organizza) e per l'uso dei commenti Ctrl-B o Ctrl-K nella schermata **Analyze** (Analizza). Fare riferimento alla **Guida per l'utente di CytoVision DX**.
- Le immagini Probe (sonda) possono avere una soglia applicata per creare oggetti per un uso flessibile dello schermo e per creare una coppia di metafase FISH e cariotipo come parte di un flusso di lavoro di analisi del cariotipo. Fare riferimento alle **Istruzioni operative di CytoVision DX Karyotyper**.

Ricerca e risoluzione problemi

Le informazioni e i controlli elencati in questa sezione sono destinati a essere eseguiti come parte della risoluzione dei problemi di supporto di 1° livello da parte degli utenti che hanno familiarità con le applicazioni e l'hardware del sistema.

- La **Guida per l'utente di CytoVision DX** contiene controlli e azioni generali che devono essere eseguiti e confermati come parte di qualsiasi contatto con Leica Biosystems per ulteriore supporto.

Sistema di acquisizione

Errori di connessione al microscopio

- Controller del microscopio spento: spegnere e riaccendere il controller.
- Cavo USB del microscopio scollegato: controllare il cavo.
- La porta USB del microscopio o la connessione del cavo sono cambiate (cambio di porta USB o effetto Windows): confermare la porta in Device Manager (Gestione dispositivi) e modificare nella **Microscope calibration** (Calibrazione del microscopio) (richiede l'accesso come amministratore locale).

Effetto della qualità della luce del microscopio

Svolgere controlli periodici sul microscopio ottico per confermare l'assenza di variazioni nella configurazione richiesta per un'acquisizione ottimale dell'immagine. In caso di problemi di qualità dell'immagine durante l'acquisizione dell'immagine, devono essere controllati anche i seguenti aspetti.

- Confermare che il fototubo del microscopio (divisore di luce) stia dirigendo il 100% della luce verso la fotocamera
- Controllare che la guida della luce fluorescente sia montata correttamente e non sia danneggiata/piegata, deteriorata o abbia superato la sua durata di vita prevista.
- Controllare e pulire le lenti dell'obiettivo. L'olio vecchio e indurito sulla lente di acquisizione ridurrà l'intensità della luce, l'illuminazione della luce (uniformità) e il contrasto dell'immagine
- Controllare che la lente del condensatore venga spostata fuori dal percorso della luce durante la scansione e l'acquisizione per evitare qualsiasi riflesso della luce (ciò avviene automaticamente sui microscopi configurati con un condensatore motorizzato).
- Ispezionare visivamente i filtri fluorescenti nella torretta del microscopio per eventuali segni di luce o danni ambientali (ombreggiatura, aspetto maculato, irregolarità del colore).

Sistemi di scansione GSL

Per la scansione GSL devono essere seguiti controlli e una procedura **aggiuntivi**.

Errori di connessione al GSL

- Unità base GSL spenta: spegnere e riaccendere il GSL, controllare la connessione dell'alimentatore esterno.
- Cavo di rete scollegato: controllare il cavo tra GSL e PC.
- Configurazione dell'adattatore di rete: confermare che non vi siano recenti modifiche dell'amministratore IT/di rete.

Problemi di messa a fuoco della scansione 10x

- I vetrini sono puliti e privi di olio? I vetrini utilizzati devono essere privi di olio per immersione per consentire una messa a fuoco accurata.
- Il piano di messa a fuoco dell'immagine viene attraversato durante la messa a fuoco automatica?
- Il punto di messa a fuoco automatica iniziale non è vicino al piano focale della cellula (la mappa di messa a fuoco 10x non attraversa il piano focale del campione): Problema relativo al vetrino nel vassoio, offset di messa a fuoco del modello, riferimenti dello scomparto di calibrazione spaziale (urto del tavolino).
- La mappa di messa a fuoco 10x attraversa il piano focale ma non fornisce punti di messa a fuoco nitidi: Contrasto ([effetto della qualità della luce](#), bassa intensità di contrasto).
- Offset di messa a fuoco impostato in modo errato nel modello di scansione: causerà errori nella mappa di messa a fuoco in 10x
- Controllare i modelli di scansione per offset di messa a fuoco, impostazione del coprioggetto, impostazione di convalida della messa a fuoco
- La messa a fuoco è variabile in base alla posizione del vassoio/vano tavolino?
- Luce insufficiente durante la mappa di messa a fuoco 10x (effetto della qualità della luce, offset della fotocamera del modello di vetrino).
- Luce eccessiva durante la mappa di messa a fuoco 10x (cambio hardware, offset della fotocamera del modello di vetrino, intensità della colorazione di contrasto).
- Se l'immagine live è troppo scura o chiara, controllare il divisore di luce e il modello di vetrino per eventuali offset della fotocamera, ripetere la **Fluorescent Scan Calibration** (Calibrazione della scansione fluorescente).

Problemi di classificazione della scansione 10x

- Come appaiono le immagini live durante la scansione, sono a fuoco e il contrasto è corretto?
- Si verifica su più modelli di vetrini? Eseguire un nuovo modello per la verifica.
- Controllare il microscopio in relazione all'[effetto della qualità della luce](#), problemi.
- Controllare il vetrino campione in relazione alla concentrazione e all'intensità della colorazione DAPI e all'anti-sbiadimento.
- Controlla i classificatori per errori di addestramento.

Problemi di messa a fuoco di acquisizione 63x

- Il punto di messa a fuoco automatica iniziale non è vicino al piano focale della cellula. Controllare la lente di acquisizione in relazione al blocco della lente (molla di spinta e meccanismo di torsione all'estremità).
- Il problema è ricorrente su più vetrini? Se variabile, controllare la [Compatibilità vetrino/vassoio](#).
- Come appaiono le miniature della scansione 10x dell'elenco metafase nella schermata di revisione: sono a fuoco?
- Per problemi di messa a fuoco con acquisizione automatica ripetibile, eseguire una nuova **Fluorescent Scan Calibration** (Calibrazione della scansione fluorescente).
- Confermare che l'opzione coprioggetto del modello di scansione sia impostata correttamente

- Olio insufficiente, bolle d'aria o altri problemi correlati all'olio portano a una messa a fuoco non ottimale. Confermare che ci sia olio nel serbatoio della siringa e che il tubo dell'oliatore e la punta di erogazione siano saldamente fissati e sbloccati.

Problemi di acquisizione del canale della sonda

- Filtro non corretto utilizzato per l'acquisizione. Controllare la configurazione dell'elenco di acquisizione (nome e posizione del filtro dicroico) negli elenchi salvati e nell'elenco di build predefinito.
- Segnali della sonda non a fuoco. Controllare la dimensione del passo dello stack Z e il numero di strati, controllare il corretto inserimento del filtro nella torretta del microscopio.

Compatibilità vetrino/vassoio

Posizionamento del vetrino nel supporto del tavolino.

I vetrini devono essere posizionati piatti nel portavetrini, con la superficie del campione o il coprioggetto rivolti verso l'alto.

- Verificare che non siano presenti ostacoli nell'inserito che potrebbero impedire il posizionamento in piano del vetrino e che la presa del vetrino sia ben salda per evitarne il movimento.

Coerenza di tenuta del vetrino.

Controllare se le clip a molla tengono il vetrino sufficientemente saldo.

- Se il vetrino è allentato (oscillazione), controllare che le prese molla siano ben strette.
- I vetrini sono ad angolo squadrato o ad angolo tagliato? Se l'angolo tagliato è il vassoio con il corretto design "smussato"?

Consistenza della tenuta del vassoio.

Controllare se il vassoio GSL è tenuto saldamente sul tavolino quando caricato.

- Se c'è allentamento, controllare la regolazione del braccio di spinta in plastica sulla parte anteriore/sinistra del tavolino GSL (regolazione della vite).

Montaggio del coprioggetto

Un coprioggetto spesso/doppio impedirà di raggiungere il piano di messa a fuoco.

- Verificare che una metafase possa essere messa a fuoco e acquisita manualmente nella normale schermata di acquisizione.

Preparazione e colorazione del campione

La densità delle cellule del campione, l'intensità della colorazione di contrasto e l'effetto anti-sbiadimento avranno un effetto diretto sull'affidabilità della messa a fuoco del sistema, sulla velocità e sulle prestazioni di scansione e acquisizione automatica.

- La diluizione della colorazione di contrasto non è consigliata. Una bassa intensità aumenta le esposizioni della fotocamera e riduce il contrasto, causando maggiori errori di messa a fuoco e tempi di scansione e acquisizione più lunghi.
- L'efficacia dell'anti-sbiadimento diminuisce con l'età, la temperatura di conservazione e l'esposizione alla luce, causando una sorta di "foschia rossa" sul vetrino e un aumento dello sbiadimento di entrambe le sonde e DAPI. DAPI/antisbiadimento richiedono conservazione a 2-8 °C quanto più a lungo possibile e possono essere applicati ai vetrini quando sono ancora freddi.

- Conservare i vetrini al buio a 2-8 °C e lasciare 30 minuti a temperatura ambiente prima della scansione. I vetrini vecchi devono essere nuovamente colorati con una nuova colorazione di contrasto e anti-sbiadimento, se necessario.
- Una bassa densità cellulare aumenta i tempi di scansione e acquisizione e il numero di immagini acquisite necessarie per la valutazione del segnale. Ove possibile, regolare la densità cellulare durante la preparazione del vetrino per ottenere un minimo di 5 cellule valutate per fotogramma di acquisizione (10-20 rappresenta il valore ottimale).

Esportazione dei log diagnostici

CytoVision DX genera una serie ricorrente di dati evento relativi a configurazione del sistema, calibrazione, processo e hardware durante le operazioni di routine. In caso di funzionamento imprevisto, errori di scansione e acquisizione o arresti anomali dell'applicazione, questi file di log potrebbero contenere informazioni significative, utili all'assistenza Leica per la diagnosi di un guasto.

- I registri contengono 7-10 giorni di informazioni diagnostiche dettagliate e l'esportazione deve essere effettuata entro questo lasso di tempo per qualsiasi problema che si desidera segnalare a Leica Biosystems.
- I file di registro vengono salvati tramite la funzione **Export Logs** (Esporta registri) dalla barra degli strumenti del menu **Case** (Caso). Questo comprimerà tutti i file in un file .zip e li salverà in una posizione scelta dall'utente.
- Questi possono quindi essere salvati su una chiavetta di memoria o condivisi con il personale di assistenza e supporto pertinente, se necessario in un secondo momento.

Appendice: Conteggio spot

Panoramica del conteggio spot

Lo **Spot Counting** (Conteggio spot) utilizza le impostazioni in uno **Spot Assay** (test spot) creato prima dell'acquisizione per creare dati di immagine *Framelist*.

I *framelist* spot vengono acquisiti come parte del flusso di lavoro **GSL Scan** (Scansione GLS) e **Auto-Capture** (Acquisizione automatica) completamente automatizzato utilizzando la modalità di acquisizione **SpotCounting** in un Modello di vetrino di scansione.

- Un *framelist* di conteggio spot può anche essere acquisito manualmente nella schermata **Capture** (Acquisizione) utilizzando la modalità di acquisizione "Spot Counting" (Conteggio spot), simile all'acquisizione sonda standard e basata sugli stessi nomi fluorocromici "Build List".

Il conteggio spot presenta alcune differenze rispetto ai dati immagine del *framelist* *ProbeAuto*;

- I test spot possono essere creati e modificati tramite il pannello **Selettore test** per diversi canali fluorocromici e impostazioni Z-stack.
- Può essere utilizzato un **classificatore cellulare** per determinare il tipo di materiale cellulare elaborato come "Informativo" nell'immagine durante l'acquisizione.
- Il sistema di scansione **AutoCapture** può essere impostato su un numero massimo di cellule informative o un numero massimo di frame acquisiti.
- I dati dell'immagine acquisita vengono elaborati utilizzando i parametri **Assay (Test)** per l'intensità del segnale della sonda e le informazioni sulle dimensioni, comprese le impostazioni relative alla forma delle cellule di colorazione di contrasto e i limiti di arresto **GSL**.
- I dati originali di elaborazione delle cellule e del segnale vengono salvati in modo permanente nel *framelist*.

Nota: i *framelist* di **Spot Counting** (conteggio spot) contengono più file con una dimensione totale del caso elevata, dunque è bene assicurarsi che vi sia spazio libero sufficiente sul server dati che ospita la **Casebase**.

- Un vetrino con 40 frame (immagini) acquisiti avrà una dimensione di circa 500 Mb, in base a 5 stack per canale su un campione di 2 sonde.
- Circa l'80% di questi dati saranno le singole acquisizioni Z-stack.
- I dati del frame dell'immagine non possono essere visualizzati nell'applicazione *CytoVision DX*. La revisione delle immagini richiede un software di analisi delle immagini separato compatibile con il formato *Framelist*.

Ci sono 2 passaggi principali nel flusso di lavoro **Spot**.

1. **Selezione Assay (Test):** Un test può essere selezionato o creato quando **Spot Counting** (Conteggio spot) è selezionato come modalità di acquisizione del modello di vetrino di scansione o, per l'acquisizione manuale, quando selezionato nell'elenco **Capture Mode** (Modalità di acquisizione) della schermata di acquisizione standard.
2. **Immagine:** le immagini dall'area del vetrino selezionata vengono acquisite utilizzando le procedure standard di acquisizione delle sonde. I dati delle immagini vengono elaborati in tempo reale per determinare i confini delle cellule e i segnali delle sonde.

Prima di acquisire le cellule per il conteggio automatico degli spot.

- È necessario avere familiarità con le procedure di [Acquisizione Probe \(Sonda\)](#): e i fluorocromi, poiché i test conteggio spot utilizzano i nomi e le impostazioni predefiniti ([Build List](#)) dei fluorocromi.
- I test devono essere creati e configurati per i fluorocromi da utilizzare come elenco di acquisizione, con opzioni regolabili di Z-stack, tipo di sonda e classificatore cellulare.
- I sistemi di scansione devono avere una **calibrazione di scansione fluorescente** funzionante per l'intensità tipica della colorazione di contrasto del campione e gli offset di messa a fuoco che saranno utilizzati durante l'acquisizione.
Gli utenti devono avere familiarità con le procedure di calibrazione della scansione per mantenere il sistema correttamente e compensare qualsiasi variazione dell'intensità della colorazione di contrasto visibile.
- I sistemi di scansione richiedono un [modello di vetrino](#) con un'area di scansione appropriata, un classificatore di scansione e un test spot assegnati per il vetrino.

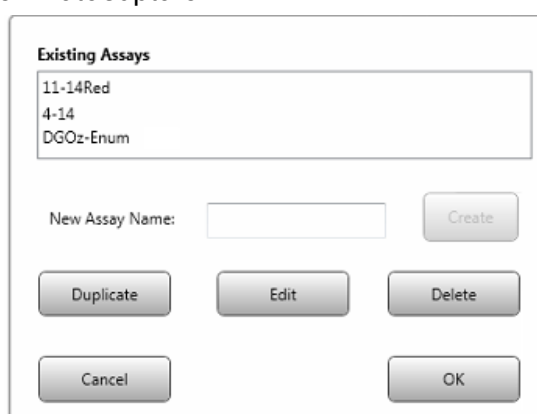
Test conteggio spot

Uno Spot Assay (test spot) contiene:

1. L'elenco Fluorochrome Capture (Acquisizione fluorocromi) per la colorazione di contrasto e le sonde sul vetrino.
2. Le impostazioni predefinite Z-Stack per ogni canale sonda.
3. Il numero massimo di frame o cellule da acquisire automaticamente sui sistemi di scansione: **Stop Capture After Counts** (Interruzione acquisizione dopo i conteggi).
4. Opzioni per selezionare un classificatore di cellule di colorazione di contrasto per determinare quali cellule sono classificate come informative durante l'elaborazione delle immagini.

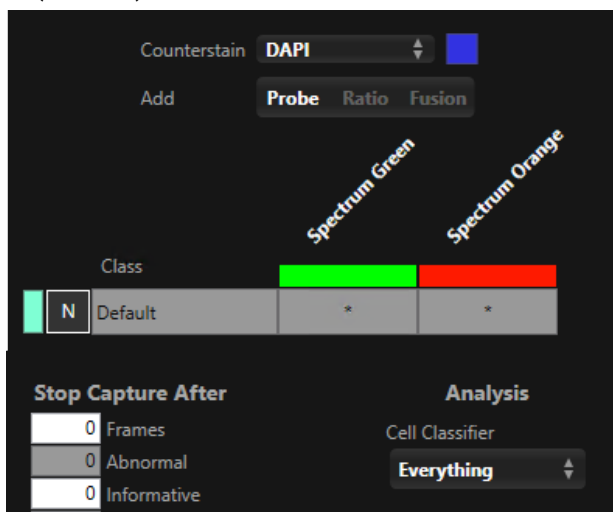
Per utilizzare le funzioni di scansione e acquisizione automatica del sistema GSL, è necessario creare un test prima dell'acquisizione e configurarlo utilizzando la finestra Spot Assay Selector (Selettore test spot).

Lo **Spot Assay Selector** (Selettore test spot) verrà visualizzato nella schermata di acquisizione standard (modalità di conteggio spot) o come parte di un modello di vetrino di scansione quando *SpotCounting* è impostato per l'AutoCapture



- **Creazione di un nuovo test:** Immettere un nuovo nome di test, quindi selezionare **Create** (Crea). Si apre la finestra di dialogo **Spot Configuration** (Conferma spot).
- **Copia di un test esistente:** Evidenzia un test esistente nell'elenco. Fare clic sul pulsante **Duplicate** (Duplica).
- **Modifica di un test esistente:** Evidenzia un test esistente nell'elenco. Fare clic sul pulsante **Edit** (Modifica). Si apre la finestra di dialogo **Spot Configuration** (Conferma spot).

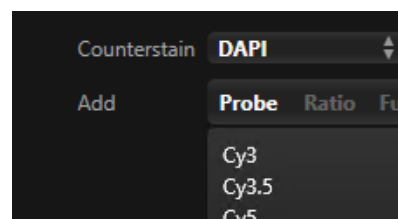
- **Eliminazione di un test esistente:** Evidenzia un test esistente nell'elenco. Fare clic sul pulsante **Delete** (Elimina).



Modifica dei test per l'acquisizione spot

Selezione del fluorocromo

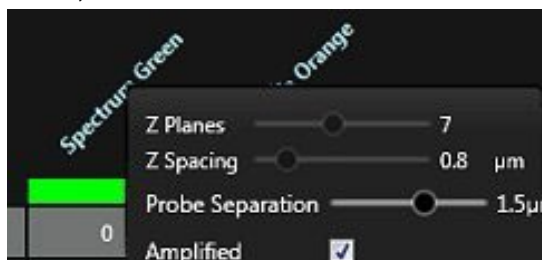
Seleziona un **Counterstain** (Colorazione di contrasto) da un menu a discesa di nomi di fluorocromi di sistema, quindi fare clic sul pulsante **(Add) Probe** ((Aggiungi) Sonda) e selezionare allo stesso modo finché non si ha il numero e i nomi corretti di fluorocromi per il kit sonda utilizzato sul vetrino campione.



L'elenco dei nomi è tratto dall'elenco di creazione sonda che deve essere configurato per visualizzare i colori e i valori predefiniti del filtro nella [schermata Capture \(Acquisizione\)](#) standard.

Per ogni sonda fare clic sul nome per configurare:

- I piani Z (**Z Planes**) e la spaziatura Z (**Z Spacing**) (μm) per l'acquisizione Z-stack. I numeri variano in base alle caratteristiche del campione, ma per le preparazioni interfase una distanza di messa a fuoco totale di circa 5 micron è un valore iniziale tipico. Ad esempio, 7 piani a $0,8 \mu\text{m}$ o 5 piani a $1,2 \mu\text{m}$ (intervallo $4,8 \mu\text{m}$).
- Se il fluorocromo è per un test di amplificazione, impostare la casella di controllo **Amplified** (Amplificato).

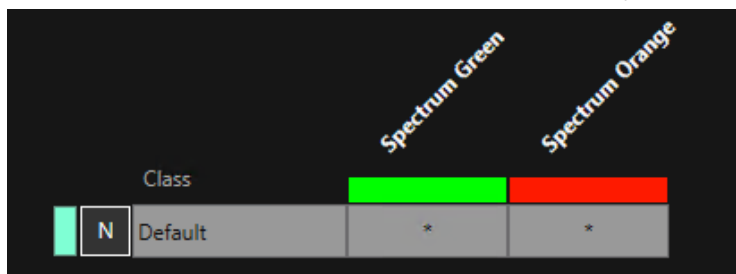


- **Probe Separation** (Separazione sonda) è una regolazione facoltativa, ma può essere lasciata all'impostazione predefinita poiché non ha alcuna rilevanza diretta per l'operazione di acquisizione di *CytoVision DX*.

Tabella classe

Una volta impostato l'elenco di acquisizione, viene creata una tabella **Class** (Classe) che visualizza un nome di classe "Default" utilizzato per elaborare le cellule informative durante l'acquisizione delle immagini.

- Ciò non è modificabile per l'operazione di acquisizione di CytoVision DX



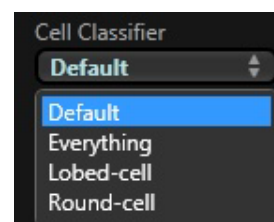
Classificatore cellule

Un nuovo test non presenta alcun classificatore impostato (**Everything**, tutti):

- Tutti gli oggetti presenti nei frame acquisiti contenenti segnali di sonda sovrapposti al materiale di colorazione di contrasto saranno classificati come "informativi" per la visualizzazione GSL Stop Count e Class Monitor durante l'acquisizione.

L'uso di un classificatore Cell (DAPI) (cellule (DAPI)) consentirà di filtrare le cellule "informative" in base alle forme dell'oggetto della colorazione di contrasto (cellula), che possono essere selezionate dall'elenco del menu a discesa.

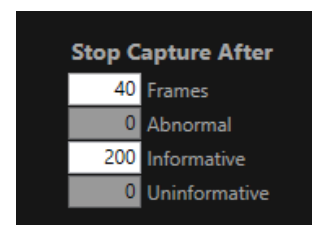
- **Predefinito:** Un classificatore addestrato su tipi di campioni di cellule misti che elimina materiale DAPI piccolo o di forma insolita e grandi cluster di cellule.
- **Cellula lobata:** Un classificatore addestrato su tipi di campioni di cellule multilobate che elimina semplici detriti di sfondo, grandi cluster non segmentati e cellule che sono per lo più di forma circolare.
- **Cellula rotonda:** Un classificatore addestrato su tipi di campioni di cellule circolari che eliminano semplici detriti di sfondo, grandi cluster non segmentati e cellule che sono per lo più di forma lobata.



Arresto acquisizione dopo (conteggi di arresto acquisizione automatica)

I sistemi di scansione GSL continueranno finché tutti i fotogrammi all'interno dell'area di scansione non saranno stati automaticamente acquisiti o se viene raggiunto uno dei conteggi di arresto impostati nel test.

- **Frame:** Imposta un numero massimo di frame da acquisire. Il valore utilizzato può essere impostato come:
 - "fail-safe" (a prova di errori) in caso di oggetti "Informativi" insufficienti identificati in AutoCapture di routine, destinati a prevenire tempi di scansione eccessivi su vetrini di ibridazione scarsamente popolati o non riusciti - per scansioni in cui è richiesto un numero fisso di acquisizioni per scopi di standardizzazione o confronto, come test di densità cellulare o di qualità della sonda
- **Informazioni (informativo):** Esamina il totale di tutti gli oggetti che superano la selezione del *classificatore cellulare*.
 - Questo dovrebbe essere il criterio di arresto di routine in cui è necessario un numero totale fisso di cellule per soddisfare le aspettative di revisione o analisi a valle.



Se entrambi i conteggi di arresto sono impostati nel test, AutoCapture si arresterà quando viene raggiunto il primo di questi conteggi; un valore pari a zero per entrambe le opzioni significa che non influirà sull'acquisizione automatica.

- I conteggi di arresto non hanno effetto sull'[acquisizione manuale](#).

Comunicazione

Il pulsante Advanced (Avanzata) aprirà la finestra di dialogo parameters Configuration (Configurazione dei parametri) di test aggiuntivi.

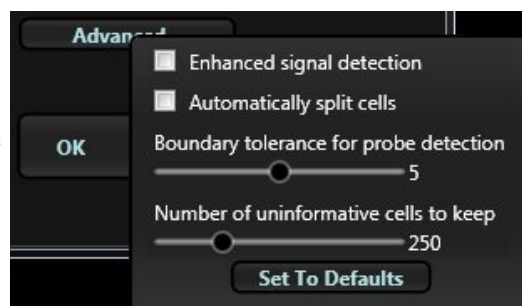
- La **Boundary Tolerance for probe detection** (Tolleranza del limite per il rilevamento della sonda) e il **Number of Uninformative cells to Keep** (Numero di cellule non informative da mantenere) non vengono utilizzati per l'operazione di acquisizione di CytoVision DX
- È possibile utilizzare **Enhanced Signal Detection** (Rilevamento del segnale avanzato) e **Automatically Split Cells** (Divisione automatica delle cellule), che determineranno un aumento del numero di oggetti classificati durante l'elaborazione delle immagini. Ciò potrebbe interrompere prima l'acquisizione automatica in base al conteggio di arresto **Informative** (Informativo).

Rilevamento del segnale avanzato:

Se abilitato, modifica alcuni dei confronti di intensità e dimensioni relative durante l'elaborazione delle immagini, rendendo più probabile che un'intensità di segnale piccola o debole venga classificata come segnale informativo.

Divisione automatica delle cellule:

Se abilitato, può separare i cluster di oggetti di colorazione di contrasto in due o più oggetti **informativi** separati.



Nella finestra Spot Counting Assay Selector (Selettore test conteggio spot), il test viene salvato nell'elenco predefinito del sistema quando si usa **OK** per chiudere il pannello.

Acquisizione e scansione spot

Modello di vetrino (impostazione scansione)

La creazione del modello di vetrino e le opzioni di scansione sono le stesse della scansione interfase di routine

- Fare riferimento a [Modelli di vetrini \(FISH\)](#) per i dettagli.

Per i campioni FISH, le regole di acquisizione sono definite nel pannello *AutoCapture* del modello di vetrino selezionando "SpotCounting" dall'elenco **Capture Mode:** (Modalità di acquisizione:).

- **Objective** (Obiettivo): seleziona la lente utilizzata per l'acquisizione automatica, il 63x è ottimale per FISH (100x non è consigliato a causa di un campo visivo più piccolo e di un'intensità luminosa ridotta).

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

- Lo stato **Autocamera setup** (Impostazione fotocamera automatica) determinerà il modo in cui le immagini vengono acquisite ad alto ingrandimento durante l'acquisizione automatica;
 - **Enabled (Abilitata)**: (Consigliato) Per ogni canale da acquisire, il sistema eseguirà una regolazione automatica dell'esposizione in base all'intensità di qualsiasi fluorescenza presente nell'immagine.
 - **Disabled (Disabilitata)**: Per ogni canale da acquisire, il sistema utilizza valori fissi della fotocamera dai fluorocromi della **Build List** ("Save as Default" (Salva come predefinito) nel pannello di configurazione dell'acquisizione o con l'utilità separata **Fluorochrome Camera Calibration** (Calibrazione fotocamera fluorocromi); ciò non è non consigliato per l'uso di routine).
- **Impostazione su colorazione di contrasto**: Migliora il calcolo dell'esposizione dell'Autocamera Setup (Impostazione fotocamera automatica) sui canali fluorocromi lavorando solo sulle aree contenenti fluorescenza di colorazione di contrasto (maschera DAPI) e risultando meno influenzato dai detriti fluorescenti all'esterno della cellula.
- **Impostazione su sonda**: Migliora il calcolo dell'esposizione dell'**impostazione automatica della fotocamera** utilizzando un calcolo basato sulle dimensioni sui canali dei fluorocromi in modo che risulti meno influenzato dai detriti fluorescenti luminosi.
- **Impostazione tramite media**: Acquisisce i primi n fotogrammi utilizzando il calcolo dell'esposizione automatica standard per ottenere un valore di integrazione fluorocromi media per tutti i frame rimanenti (non raccomandato per l'uso di routine).
- **Salva Z-stack**: Salva ogni immagine dello stack del fluorocromo insieme allo strato di proiezione massima (unito).
- **Select Spot assay** (Seleziona test spot) apre il pannello Assay Selector (Selettore test) per scegliere un Test spot appropriato che verrà utilizzato come elenco di acquisizione e per l'elaborazione delle immagini durante l'acquisizione automatica.
- **Elenco dei fluorocromi**: non è selezionabile. L'elenco di acquisizione e le impostazioni dei fluorocromi sono impostati nel test spot e collegati ai fluorocromi "Build List".
- **Post Capture Options** (Opzioni di post-acquisizione): non selezionabili. Spot Counting (Conteggio spot) crea dati di immagini *Framelist* che non utilizzano funzioni di soglia o Capture Customize (Personalizzazione acquisizione).

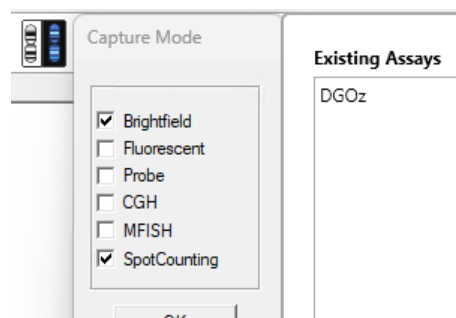
Nota: se sono presenti nomi di elenchi nei pannelli dell'**elenco Fluorocromi** o delle **opzioni Post Capture** (post acquisizione), ciò significa che l'area di scansione è stata precedentemente impostata per la modalità Probe (Sonda) o Probe Auto (Sonda automatica), laddove queste sono richieste.

- Si consiglia di creare una nuova area per le operazioni di Spot Counting (Conteggio spot) per mantenere queste aree vuote.

Acquisizione manuale

L'acquisizione manuale del conteggio spot utilizza la schermata di acquisizione standard.

1. Fare clic su Capture Mode (Modalità di acquisizione) e selezionare Spot Counting (Conteggio spot) per aprire la finestra di dialogo Assay Selector (Selettore test).
2. Selezionare o creare un test spot.
3. Quando si seleziona un test, l'elenco di acquisizione verrà creato automaticamente dai fluorocromi *Build List* standard definiti nel test.
4. Verificare che il pannello Fluorochrome Selection (Selezione fluorocromi) mostri i fluorocromi corretti.
Le impostazioni Z-stack verranno ereditate dal test, ma potrebbero essere modificate prima dell'acquisizione.
5. Verificare che il pannello *Customize capture* (Personalizza acquisizione) sia impostato per l'opzione "Save Stacks" (Salva stack) per salvare i livelli Z-stack come immagini separate nel framelist finale.

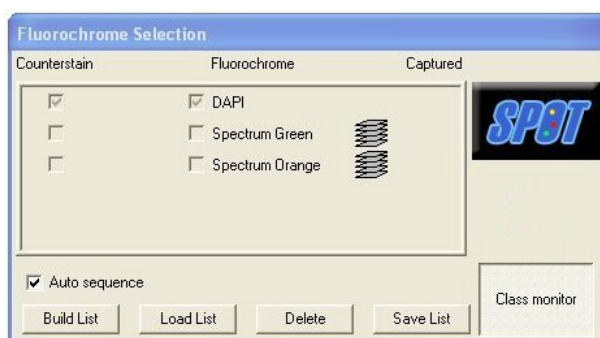


Acquisire le cellule come si farebbe per la [acquisizione della sonda](#) standard.

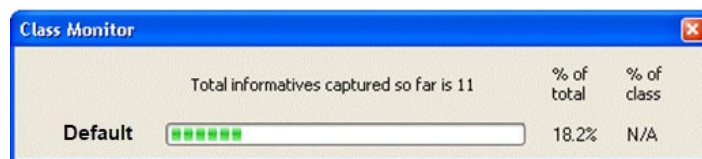
- Disattivare **Auto Sequence** (Sequenza automatica) e **Auto Camera Setup** (Impostazione fotocamera automatica) ed eseguire una o due acquisizioni per ottenere le impostazioni corrette della fotocamera.
 - Il pulsante **Auto Setup** (Impostazione automatica) sotto l'immagine può comunque essere utilizzato per determinare automaticamente le impostazioni migliori per il vetrino.
 - Quando le impostazioni della fotocamera sono corrette, attivare **Auto Sequence** (Sequenza automatica). Ciò sarà più veloce rispetto all'utilizzo di **Auto Camera Setup** (Impostazione fotocamera automatica) per ogni frame.
- Le immagini saranno elaborate dal test man mano che vengono acquisite. Non c'è alcuna soglia, i dati raw vengono utilizzati per creare un Framelist per l'elaborazione delle immagini.
- Una volta terminata l'acquisizione, passare alla schermata Analysis (Analisi) Ciò completerà l'elaborazione delle cellule nel Framelist.

Acquisizione e monitoraggio classe

Quando si avvia l'acquisizione spot automatica o manuale, viene visualizzato il pannello **Spot Fluorochrome Selection** (Selezione fluorocromi spot) che mostra i nomi di fluorocromi definiti nel test.



Fai clic sull'icona **Class Monitor** (Monitoraggio classe) per visualizzare la finestra di dialogo di monitoraggio classe.



Il numero totale di cellule informative elaborate finora è mostrato nella parte superiore della finestra di dialogo.

- La barra mostra il numero di *informazioni* come percentuale del conteggio arresto test.

Arresto acquisizione automatica SPOT

GSL Auto-Capture (Acquisizione automatica GLS) di *CytoVision DX* è progettata per funzionare senza necessità di regolazione o interazione.

Auto-Capture (Acquisizione automatica) si arresterà quando si verifica una delle seguenti condizioni:

- È stato raggiunto il numero **Stop After Frames** (Arresta dopo frame).
- È stato raggiunto il numero Stop After **Informative** Cells (Arresta dopo cellule informative).
- L'acquisizione è stata completata per tutti i frame nell'area di scansione.
- Il pulsante **Stop** (Arresto) viene premuto manualmente.

A meno che non venga premuto il pulsante **Stop** (Arresta), GSL passerà al vetrino successivo nel batch ed eseguirà la scansione o l'acquisizione automatica su quel vetrino come richiesto.

Fare riferimento alle [Procedure di esempio passo dopo passo](#) per l'esecuzione di un vetrino di conteggio spot per l'[acquisizione manuale](#) o la [scansione completa e l'acquisizione automatica](#).

Appendice: Tessuti FISH

Panoramica Tissue FISH

La funzionalità Tissue FISH è progettata per consentire l'imaging di vetrini Tissue FISH utilizzando l'hardware di scansione o acquisizione del sistema e quindi la revisione o l'analisi delle immagini.

- Le opzioni di scansione consentono la selezione manuale o automatica delle aree di scansione per l'acquisizione.
- I dati Framelist vengono acquisiti con la modalità di acquisizione automatica *ProbeAuto* o utilizzando l'applicazione [Manual Probe capture](#) (Acquisizione manuale sonda).

L'acquisizione Framelist è destinata all'uso con sonde DNA Fish, l'applicazione non ha funzionalità destinate a funzionare con vetrini campione Tissue IHC o immunofluorescenti.

- La capacità del modulo con licenza *Tissue FISH* controlla l'accesso alle opzioni aggiuntive Slide Template (Modello vetrino) sui sistemi di scansione GSL, non è una configurazione di acquisizione o analisi.
- Tutte le funzioni di acquisizione sono funzionalità standard della capacità di licenza software Probe.
- Non ci sono strumenti dedicati di visualizzazione, morfologia o analisi Tissue FISH.

Scansione e acquisizione Tissue FISH

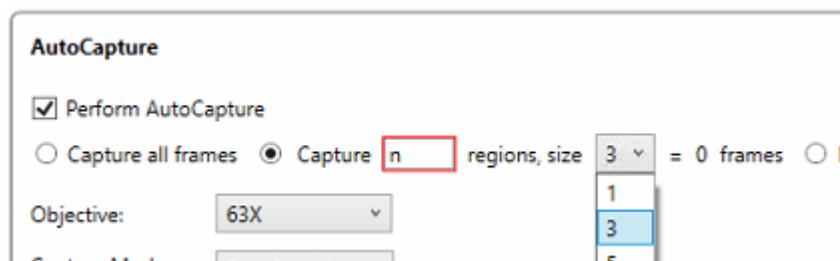
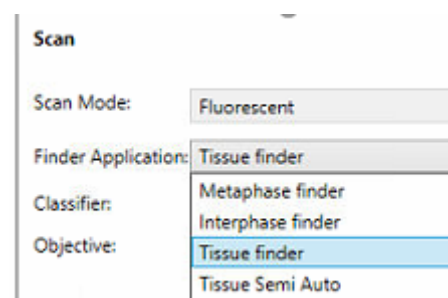
Sono disponibili 3 flussi di lavoro di configurazione della scansione FISH tramite le impostazioni nella schermata del modello di vetrino e come descritto di seguito.

1. Scansione automatica e acquisizione automatica (modalità Tissue Finder (Finder tessuto), acquisizione automatica)
2. Scansione automatica e markup manuale della regione (modalità Tissue Finder (Finder tessuto), acquisizione differita)
3. Selezione manuale della regione (Tissue Semi Auto, nessuna scansione, acquisizione automatica)

1) Scansione automatica e acquisizione automatica:

Utilizzare l'applicazione **Tissue finder** come parte di un modello di vetrino.

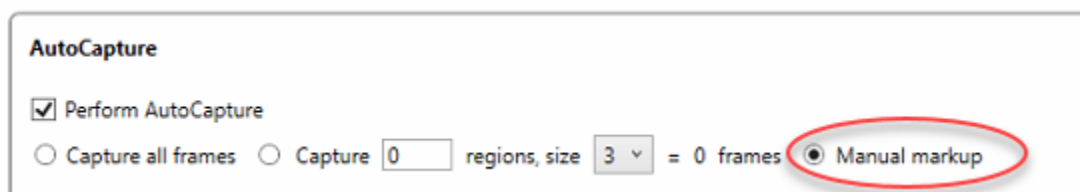
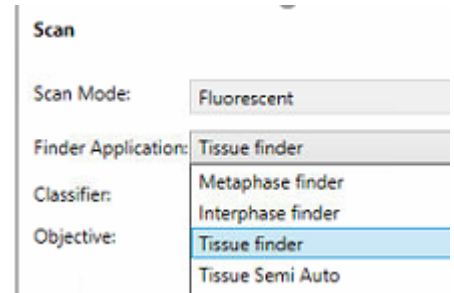
- Pre-scansione Brightfield 1,25x opzionale per rilevare l'incisione dell'area del vetrino.
- Mappa di messa a fuoco 10x e scansione che rileva i frame di tessuto colorati con DAPI.
- Acquisizione automatica Framelist di tutti i frame o di più regioni della griglia all'interno dell'area di scansione/incisione.



2) Scansione automatica e markup manuale della regione:

Utilizzare l'applicazione **Tissue finder** come parte di un modello di vetrino, con un'acquisizione automatica differita in base alle regioni selezionate.

- Pre-scansione Brightfield 1,25x opzionale per rilevare l'incisione dell'area del vetrino.
- Mappa di messa a fuoco 10x e scansione che rileva i frame di tessuto colorati con DAPI.
- Markup manuale dei fotogrammi o delle regioni selezionati tramite l'applicazione [Tissue FISH Markup](#).
- Acquisizione automatica Framelist di tutti i frame o di più regioni della griglia all'interno dell'area di scansione/incisione.



Il markup manuale può essere utilizzato solo su un modello di scansione con una singola area di scansione; il tentativo di creare più aree di scansione genererà un messaggio di avviso e non sarà possibile salvare il modello finché non verranno eliminate le aree aggiuntive.

3) Selezione manuale della regione per acquisizione automatica:

Utilizzare l'applicazione Tissue Semi Auto Finder come parte di un modello di vetrini con procedura di markup di regione individuale (pre-scansione campo chiaro opzionale per rilevare l'incisione dell'area del vetrino) per valutare e impostare le regioni per l'acquisizione ProbeAuto ad alto ingrandimento di un *Framelist*.

- Questo flusso di lavoro richiede che un joystick USB sia collegato al sistema.
- Non viene eseguita alcuna scansione, si tratta di un flusso di lavoro interattivo che richiede la visualizzazione al microscopio o dell'immagine in tempo reale del vetrino per impostare le aree per la successiva acquisizione automatica.

Acquisizione manuale

Qualsiasi sistema *CytoVision DX* con configurazione Probe (Sonda) può utilizzare l'applicazione di [Manual Probe capture](#) (Acquisizione sonda manuale) per creare un Framelist.

- Le immagini di acquisizione sonda manuale possono essere acquisite singolarmente. I sistemi di scansione possono utilizzare le opzioni automatiche 3x3 e 5x5.

Incisione vetrini

La scansione di vetrini FISH su tessuto è ideata per funzionare in modo ottimale su vetrini contrassegnati con una penna per incisione su vetrini/punta diamantata, consentendo di determinare automaticamente l'area di scansione mediante una prescansione Brightfield (campo chiaro) prima di qualsiasi operazione di scansione e acquisizione.

- Per un rilevamento affidabile dell'area, l'incisione su vetrini deve essere pulita e ininterrotta, lontano dai bordi del vetrino o del coprioggetto e da qualsiasi traboccamento del montante per vetrini.
- Se la prescansione è impostata nel modello di vetrino e non viene rilevata un'area incisa, la scansione non continuerà.
- Se il vetrino presenta più aree incise all'interno dell'area di scansione, la prescansione le rileverà e le includerà nelle fasi di scansione e acquisizione automatiche.
- L'opzione prescansione è disponibile anche utilizzando la scansione semi-automatica per aiutare nell'identificazione manuale delle regioni e per la visualizzazione della panoramica dei vetrini.



Nota: la penna di marcatura in genere non fornisce una linea di contrasto chiara e scura e non è consigliata per un rilevamento affidabile o coerente.

La pre-scansione per vetrini incisi utilizza la lente 1,25x con luce in campo chiaro, pertanto è richiesta una **calibrazione della scansione in campo chiaro** prima di un'operazione corretta.

Markup Tissue FISH (acquisizione differita)

Il markup della regione Tissue FISH è un'opzione di selezione manuale della regione da utilizzare con la modalità di scansione Tissue Finder.

- I vetrini vengono scansionati a 10x utilizzando un modello impostato con l'opzione AutoCapture (Acquisizione automatica) "Manual markup" (Marcatura manuale).
- Le immagini scansionate vengono rese disponibili in un visualizzatore di markup Tissue FISH che visualizza una panoramica "stitched" del tessuto fluorescente, consentendo all'utente di creare regioni di acquisizione.
- Un'acquisizione differita viene avviata utilizzando la modalità di acquisizione *automatica Probe (Sonda)* standard una volta che tutti i vetrini hanno impostato le regioni AutoCapture (Acquisizione automatica).

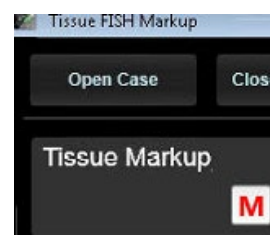


L'applicazione **Tissue FISH Markup Viewer** (Visualizzatore Markup Tissue FISH) viene utilizzata per selezionare le regioni AutoCapture (Acquisizione automatica) per i vetrini scansionati utilizzando l'opzione AutoCapture Tissue Finder (Acquisizione automatica Tissue Finder) "Manual markup" (Marcatura manuale).

- Markup Viewer (Visualizzatore marcatura) può essere aperto direttamente su un sistema di scansione dalla schermata di configurazione Scan Batch of Slides (Scansione di batch di vetrini), quando un vetrino contenente dati di markup viene caricato come parte di un flusso di lavoro di acquisizione differita.
- Fare clic sulla "M" rossa sotto la visualizzazione del vetrino per andare alla schermata di visualizzazione per il vetrino.

In alternativa, Markup Viewer (Visualizzatore marcatura) può essere aperto tramite un'applicazione autonoma che può essere eseguita su qualsiasi sistema CytoVision DX in rete.

1. Aprire l'applicazione da **Start > All Programs > CytoVision DX > Tissue FISH Markup** (Start > Tutti i programmi > CytoVision DX > Marcatura Tissue FISH).
2. Il pulsante Open Case (Apri caso) viene visualizzato su uno sfondo nero.
3. Selezionare Open Case (Apri caso) per visualizzare una finestra di Casi selezionati.
4. Cercare e aprire un caso noto per contenere scansioni utilizzando l'opzione di marcatura manuale.
5. Tutte i vetrini Tissue FISH Markup (Marcatura Tissue FISH) con dati di scansione 10x verranno automaticamente aggiornate sullo schermo: una "M" rossa indica che non sono state impostate regioni AutoCapture (Acquisizione automatica).
6. Fare clic sulla "M" per aprire la schermata Tissue FISH Markup Viewer (Visualizzatore marcatura Tissue FISH).

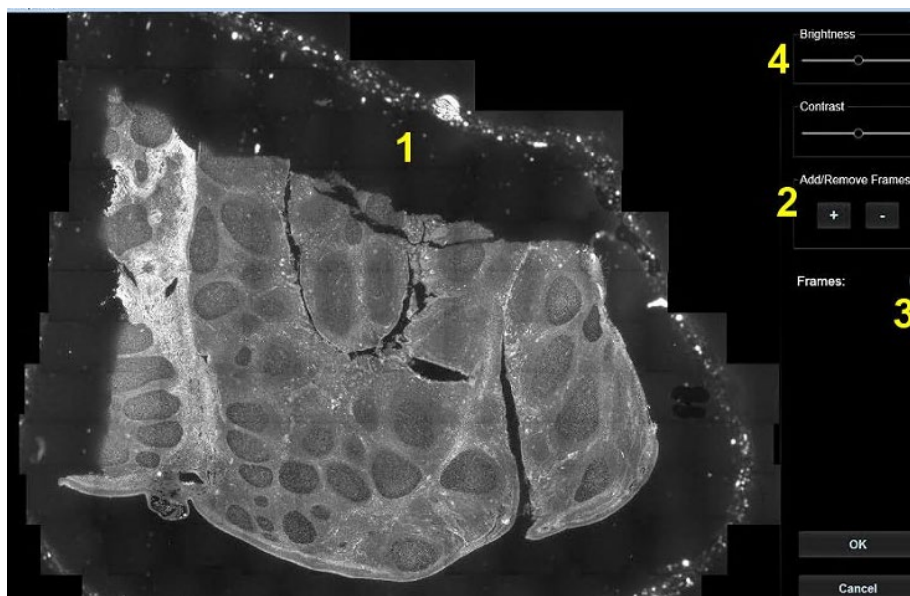


Se un caso è in fase di scansione o è aperto su un altro sistema o su Markup Viewer (Visualizzatore marcatura), verrà visualizzato un simbolo di lucchetto. Lo Scan Monitor (Monitoraggio scansione) deve essere utilizzato per confermare che la scansione è stata completata per un caso in un batch di scansione attivo prima di tentare la procedura di marcatura.

Schermata Markup Viewer (Visualizzatore marcatura)

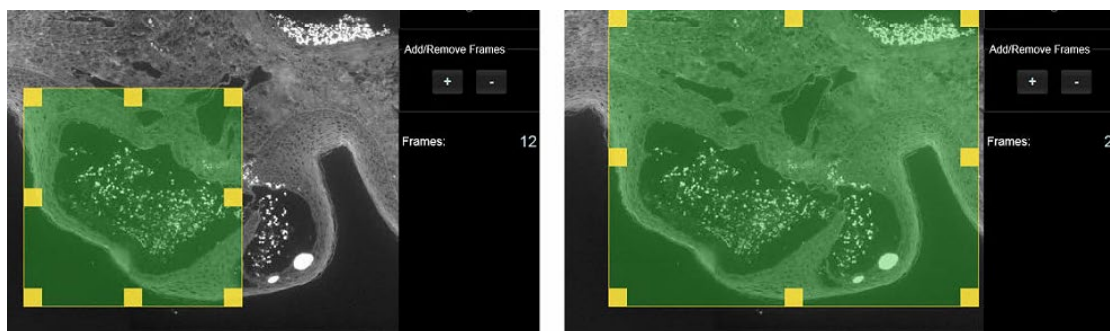
La schermata Tissue FISH Markup Viewer (Visualizzatore marcatura Tissue FISH) visualizza una panoramica della scansione Tissue Finder 10x con strumenti per aggiungere o rimuovere regioni AutoCapture (Acquisizione automatica).

1. **Scan Display** (Visualizzazione della scansione) delle immagini di scansione fluorescente 10x unite.
 - Ingrandire/ridurre utilizzando la rotellina di scorrimento del mouse.
 - Spostarsi nell'immagine ingrandita trascinandola con uno qualsiasi dei pulsanti del mouse.
2. **Add or Remove** (Aggiungi o rimuovi) regioni AutoCapture (Acquisizione automatica).
 - Selezionare " + " e fare clic sull'immagine per eliminare una regione.
 - Selezionare " - " e fare clic su una regione esistente per rimuoverla.
3. **Visualizzazione dei frame.**
 - Una volta aggiunta una regione, viene visualizzato un numero di frame che indica quante acquisizioni sono previste per AutoCapture (Acquisizione automatica).
 - La modifica delle dimensioni della regione nella visualizzazione dell'immagine aumenterà o diminuirà questo numero man mano che il sistema ricalcola le posizioni di AutoCapture (Acquisizione automatica).
4. **Cursori di miglioramento dell'immagine.**
 - Luminosità e contrasto regolano la visualizzazione della panoramica della scansione 10x se necessario per migliorare l'identificazione visiva delle aree da acquisire.



Esempio di flusso di lavoro

- Utilizzare lo scorrimento del mouse per ingrandire al livello di dettaglio necessario per determinare le regioni di acquisizione.
- Selezionare " + " che verrà evidenziato in blu.
- Fare clic con il pulsante sinistro del mouse sull'immagine per rilasciare una casella di regione: è ombreggiata in verde.
- Trascinare con il tasto sinistro sulla casella per riposizionarla, trascinare con il tasto sinistro sui bordi della casella per ridimensionarla;
 - Il sistema calcola il numero di frame completi e parziali dell'obiettivo di acquisizione ad alto ingrandimento necessari per includere tutta l'area della regione
 - Il ridimensionamento modificherà la visualizzazione dei fotogrammi mentre il sistema ricalcola

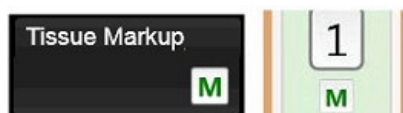


È possibile aggiungere più regioni nello stesso modo

- Le regioni vicine o sovrapposte non consentiranno l'acquisizione dello stesso frame due volte, il numero di frame aumenterà solo dove sarà necessario acquisire nuovi fotogrammi completi.
- Per rimuovere le regioni, selezionare "-" e quindi fare clic sulla regione da eliminare

Fare clic su OK per chiudere la finestra Viewer (Visualizzatore), tornando alla schermata Markup Case Open (Marca caso aperto) o alla schermata Scan Batch of Slides (Scansiona batch di vetrini).

- I vetrini aggiornati con le regioni di acquisizione verranno ora visualizzati con una "M" verde.



Una volta avviata una scansione differita, la AutoCapture (Acquisizione automatica) procederà. Si prevede che *Probe Auto* verrà utilizzato per generare immagini Framelist.

Appendice: Acquisizione M- FISH

Le informazioni di seguito richiedono che il sistema *CytoVision DX* sia abilitato per i moduli con licenza *Probe* e *MFISH* per consentire le impostazioni di configurazione aggiuntive richieste per l'acquisizione di immagini M-FISH.

- Le immagini acquisite devono essere analizzate su un sistema che abbia anche il modulo con licenza *Karyotype* abilitato.
- Per le procedure di analisi delle immagini M-FISH e di cariotipizzazione, fare riferimento alle **istruzioni operative di *CytoVision DX Karyotype***.

Introduzione alla tecnica M-FISH

M-FISH è un'abbreviazione accettata di **Multi-color o Multiplex Fluorescence In-Situ Hybridization** e viene utilizzata per definire la cariotipizzazione a 24 colori delle preparazioni cromosomiche (noto anche come *Spectral Karyotyping* o *SKY*).

Si tratta di una tecnica FISH combinatoria in cui la miscela di sonde contiene un set di vernici di DNA di libreria per ogni cromosoma in una metafase. Ogni set di sonde cromosomiche è etichettato con una combinazione unica di fluorocromi che, se visualizzati sotto luce fluorescente basata su filtro ed elaborati utilizzando un sistema di imaging, producono un "colore" distinto.

Questo può essere utilizzato per classificare i cromosomi in un cariotipo e identificare il materiale cromosomico riorganizzato.

- Non è possibile utilizzare l'M-FISH cromosomico completo per identificare riorganizzazioni cromosomiche interne come inversioni, eliminazioni o duplicazioni.
- I cromosomi derivati non forniscono informazioni direttamente sul braccio p o q.

M-FISH è una tecnica sperimentale complessa da padroneggiare, che richiede una buona esperienza di laboratorio in FISH e un uso efficiente dei componenti del microscopio.

- I filtri corretti per l'imaging fluorescente e le lenti dell'obiettivo equivalenti Plan-Fluor o Plan Apo sono essenziali quanto il software del sistema di imaging.

I kit di sonde M-FISH disponibili in commercio utilizzano una colorazione di contrasto DAPI con 5 etichette di fluorocromo aggiuntive, consentendo 31 possibili combinazioni (2⁵-1), sebbene in genere ne vengano utilizzate solo 24.

- I kit di sonde M-FISH spesso utilizzano fluorocromi simili, ma non necessariamente gli stessi, e i filtri utilizzati per un set potrebbero non essere ottimali per un altro.
- Potrebbe essere necessario procurarsi filtri aggiuntivi o versioni modificate rispetto a quelli utilizzati nel lavoro FISH di routine per ridurre il rischio di qualsiasi filtraggio di luce dalle altre etichette sul vetrino.
- I filtri M-FISH dovrebbero essere in genere a banda stretta o con massimi di eccitazione o emissione progettati per funzionare con gli altri fluorocromi sul campione e non solo per essere più efficienti per un particolare fluorocromo.

Panoramica sulla cattura

L'acquisizione M-FISH si basa sulla **acquisizione sonda** standard senza un'opzione di soglia manuale: è presente un'elaborazione automatica in background dei dati Raw.

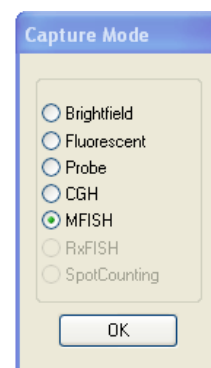
- La familiarità con i controlli dello schermo e il flusso di lavoro di acquisizione è essenziale prima di tentare le operazioni di configurazione e acquisizione M-FISH.
- M-FISH è una tecnica di acquisizione manuale e non può essere utilizzata come parte di una scansione automatizzata e di un flusso di lavoro di acquisizione automatica su un sistema di scansione *CytoVision*.

- L'acquisizione manuale su un sistema di scansione *CytoVision DX* è possibile utilizzando la funzionalità di ricollocazione della metafase. Fare riferimento alle **istruzioni operative del cariotipo *CytoVision DX***.

Configurazione dell'acquisizione

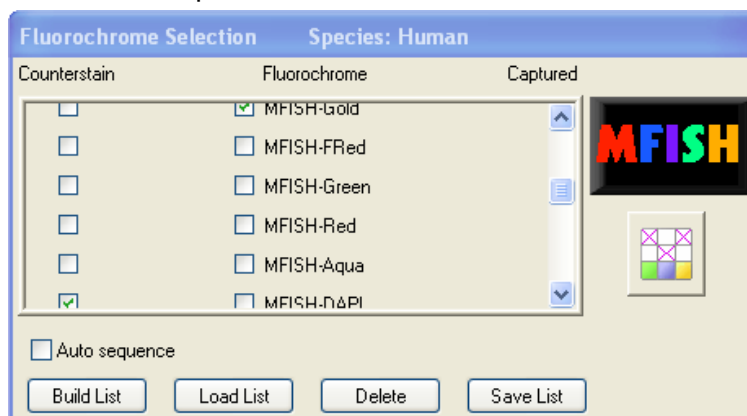
Fare clic sull'icona **Modalità di acquisizione** nella schermata standard di acquisizione e selezionare M-FISH.

- Si apre il pannello Fluorochrome Selection (Selezione fluorocromo).
- Se è stato precedentemente creato e salvato un elenco di acquisizione M-FISH, caricarlo, altrimenti creare un nuovo elenco utilizzando le opzioni standard Probe Build List (Elenco creazione sonda).



Elenco acquisizioni

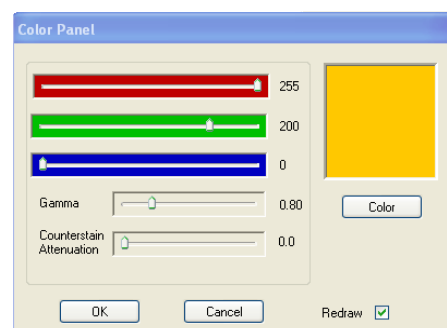
L'elenco delle acquisizioni nel pannello **Fluorochrome Selection** (Selezione fluorocromo) deve essere creato nell'ordine di acquisizione, con la colorazione di contrasto come ultimo canale.



Si consiglia di utilizzare nomi di fluorocromi M-FISH creati appositamente con impostazioni di colore specifiche per migliorare la sovrapposizione di colore da visualizzare in Analysis (Analisi).

I colori esatti della sonda possono essere modificati, ma le impostazioni di colore consigliate per i fluorocromi sono;

Colore \ Fluo	ROSSO	VERDE	BLU
DAPI	63	63	63
Acqua/DEAC	0	145	255
FITC/Verde	0	220	0
Oro/Cy3	255	200	0
Rosso	255	0	0
FRed/Cy5	0	0	255
Cy5.5	0	145	255
Aqua/DEAC e Cy5.5 di solito non vengono usate insieme			



Fluomap

Una volta pronto un nuovo elenco di acquisizione, è necessario impostare Fluomap. Si tratta delle combinazioni di fluorocromi univoche presenti nel kit sonda utilizzato e devono essere impostate per creare le classificazioni M-FISH necessarie per l'identificazione dei cromosomi e il cariotipo.



- Fare clic nelle caselle appropriate sotto ogni classe cromosomica per impostare le combinazioni di sonda, appariranno delle croci.
- Fluomap deve essere abbinato allo specifico kit sonda con cui si sta lavorando.
- Gli esempi mostrati di seguito sono solo a scopo di riferimento e mostrano precedenti combinazioni di sonda M-FISH che potrebbero essere state utilizzate in un dato 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 (fuori produzione)

	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 - fuori produzione)

	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																								
MFISH- Cy5																								
MFISH-Green																								
MFISH-Red																								
MFISH-DEAC																								

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																								
MFISH- Cy5																								
MFISH-Green																								
MFISH-Red																								
MFISH-DEAC																								

24XCyte Variation-2

Una volta creata la fluomap, fare clic su **"Done"** (Fatto), quindi salvarla insieme all'elenco di acquisizioni utilizzando la funzione **"Save list"** (Salva elenco) nella finestra di selezione del fluorocromo.

Sebbene i nomi dei fluorocromi siano diversi tra i vari kit di sonde, le loro proprietà spettrali sono equivalenti. Un kit di filtri M-FISH a banda stretta standard sarebbe:

- DAPI (standard)
- Filtro Spectrum Aqua (per Aqua o DEAC)
- Filtro Spectrum Green per Green, FITC e
- Filtro Spectrum Gold (giallo) per Gold, Orange, Cy3, TRITC.
- Filtro Spectrum Red per Red, Texas Red o Cy3.5
- Filtro Spectrum FRed per Far Red o Cy5

Filtri e microscopia

Se si utilizzano filtri per microscopio preesistenti, assicurarsi che siano a banda stretta che impediscano la fuoriuscita del segnale, in particolare di etichette di sonda vicine come Orange (Cy3) e Red.

- I kit di sonda che utilizzano Cy3/Orange e Texas Red/Cy3.5 in combinazione devono essere immagini con filtri di questi 2 canali di colore simili. Deve essere utilizzato Spectrum Gold a banda stretta al posto di un set di filtri Spectrum Orange o TRITC a banda larga.
- Non utilizzare filtri generici "verdi", "arancioni" o "rossi" disponibili presso molti fornitori di filtri, poiché aumentano il rischio di fuoriuscita del colore, che potrebbe interferire con la corretta elaborazione e classificazione.
- In caso di dubbi, contattare il rappresentante dell'assistenza Leica per verificare le specifiche del filtro e della sonda.

Durante l'uso del microscopio, si consiglia di ridurre il più possibile l'esposizione alla luce ultravioletta più dannosa (utilizzata per la colorazione di contrasto DAPI), poiché la luce UV è un eccitatore generico di tutti i fluorocromi sul vetrino, in particolare il Cy5/Far Red che può essere suscettibile allo sbiadimento.

- In genere, uno degli altri componenti della sonda (ad esempio, Spectrum Gold/Orange) mostra un'intensità di segnale sufficiente per trovare cellule a basso ingrandimento e per il primo canale di acquisizione.
- Dopo questo, si acquisisce il segnale Spectrum FRed (Cy5) di intensità più bassa, seguito da (senza un ordine particolare) Green, Red, Aqua e infine il colorante di contrasto DAPI.

- Se possibile, utilizzare il controllo software di una sorgente di luce fluorescente (Xylis/X-Cite 120 PC) per abbassare l'intensità della luce che raggiunge il vetrino, riducendo al minimo qualsiasi foto-sbiancamento.

Acquisizione di immagini M-FISH

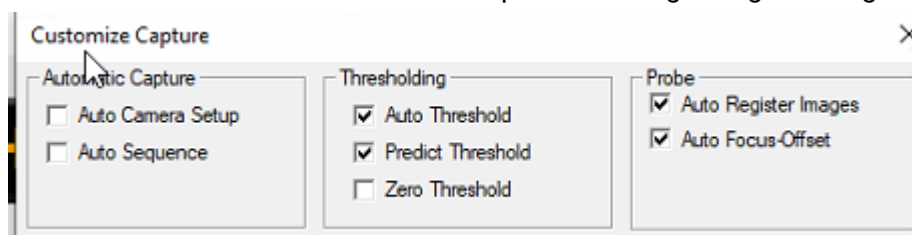
Procedura di esempio basata sulla visualizzazione manuale al microscopio per identificare le cellule da acquisire.

L'obiettivo è acquisire ogni immagine nel modo più efficiente possibile, riducendo qualsiasi cosa che abbia introdotto ritardi nel processo o mantenga la luce fluorescente (in particolare UV/DAPI) sul vetrino più a lungo del necessario.

- Se possibile, utilizzare uno dei canali sonda più luminosi, come Spectrum Gold, per identificare le metafasi da acquisire.
- Il Far Red (Cy5) non è visibile all'occhio, per determinare l'esposizione e la messa a fuoco dell'acquisizione è necessario utilizzare l'immagine della fotocamera in tempo reale. Evitare di utilizzare Auto-Setup (Impostazione automatica) per questo canale a causa delle lunghe esposizioni.
- Se invece è necessario utilizzare DAPI, non tenere la luce sul vetrino più a lungo del necessario per trovare e acquisire l'immagine per ridurre il fotobleaching dei canali sonda.
- La scansione di vetrini M-FISH a 10x per creare un elenco di vetrini per la ricollocazione delle metafasi richiederebbe l'uso di DAPI poiché nessun altro canale dovrebbe mostrare sufficiente intensità e dettaglio dell'oggetto per un sistema di scansione.

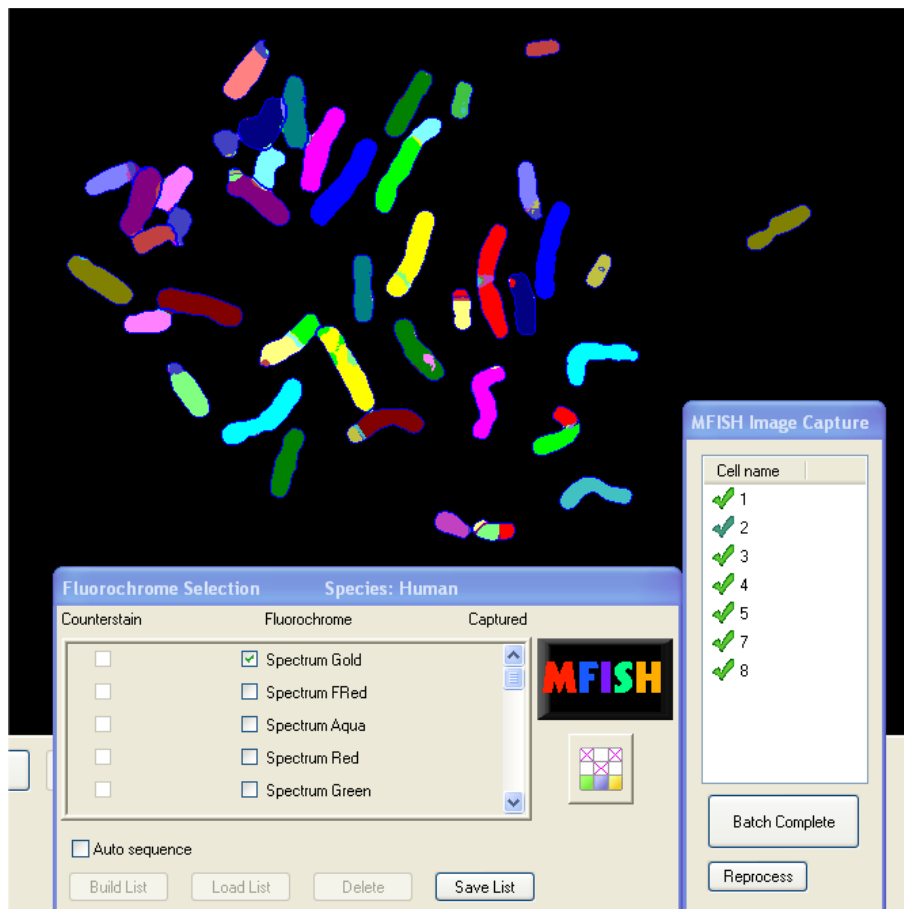
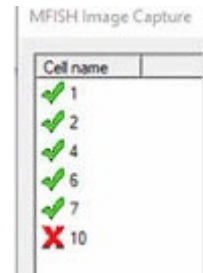
Personalizzare le opzioni di cattura

- La soglia automatica deve essere abilitata; la configurazione automatica della fotocamera deve essere disattivata.
- La prima acquisizione manuale deve identificare l'esposizione appropriata della fotocamera utilizzando "AutoSetup" (Impostazione automatica) nella finestra dell'immagine principale per ciascun canale che deve essere mantenuta per le acquisizioni successive: l'utilizzo della configurazione automatica per il canale Far-Red introdurrà ritardi non necessari mentre i calcoli di esposizione lunga vengono eseguiti ogni volta.



1. Aprire o creare un caso sul sistema e andare alla **schermata Capture** (Acquisizione).
2. Trovare visivamente le cellule a basso ingrandimento utilizzando il **filtro Gold**.
3. Passare a 63x o 100x e acquisire prima tale filtro. Il sistema esegue automaticamente la sogliatura e l'immagine Raw salvata verrà visualizzata sullo schermo.
4. Acquisire poi il canale Far Red/Cy5. Questo canale in genere ha il requisito di esposizione più lungo e potrebbe richiedere un piccolo spostamento di messa a fuoco tra gli altri canali.
5. Acquisizione completa degli altri canali e DAPI come si farebbe con una normale immagine di sonda.

6. Una volta acquisito l'ultimo canale, l'applicazione inizia a elaborare la cellula e l'opzione New Cell/Live (Nuova cellula/Live) passa alla cellula successiva pronta per la ripetizione dell'acquisizione.
7. Dopo alcuni secondi, il pannello *MFISH Image Capture* (Acquisizione immagine MFISH) mostrerà un segno di spunta verde o una croce rossa.
 - una croce rossa indica un errore nell'elaborazione, in genere dovuto a una fluorescenza bassa o scarsa o a un contrasto scarso. Se ciò si verifica, eseguire la procedura di nuova sogliatura descritta di seguito o ri-acquisire la cellula.
8. Una volta completate tutte le cellule, selezionare "Batch Complete" (Batch completato) o passare alla schermata di avvio per terminare l'elaborazione e creare le immagini metafase pronte per l'analisi.



Nota: non è possibile effettuare l'acquisizione delle cellule utilizzando altre modalità di acquisizione in un vetrino M-FISH.

Sogliatura manuale

Nell'acquisizione M-FISH di routine, l'impostazione *Auto Threshold* (Soglia automatica) è destinata all'acquisizione efficiente di tutti i canali e al salvataggio di ogni immagine raw del canale sonda elaborata per creare la metafase per l'analisi.

☒ Auto Threshold

Questa può essere disattivata nel pannello *Customize Capture* (Personalizza acquisizione) per consentire una sogliatura manuale per il canale di colorazione di contrasto durante la procedura di acquisizione live.

- Durante l'acquisizione del canale di colorazione di contrasto (DAPI), il pannello di sogliatura.

- Eseguire una **sottrazione dello sfondo** sull'immagine, si consiglia un'impostazione tra 15 e 25 a seconda delle dimensioni dei cromosomi.
- Dopodiché, soglia normale: solo il canale di colorazione di contrasto presenta le opzioni di soglia manuale, i canali sonda vengono comunque elaborati automaticamente.

Ciò può essere utilizzato per impedire che cromosomi piccoli o pallidi vengano persi o eliminati durante la fase di soglia automatica, tuttavia, non è consigliata per l'acquisizione di routine poiché aggiunge un ritardo nel processo di acquisizione.

Ri-sogliatura

La ri-sogliatura dell'immagine di colorazione di contrasto può essere eseguita utilizzando il pannello di elaborazione M-FISH dopo il completamento dell'acquisizione.

Ci sono 2 occasioni in cui potrebbe essere necessario ri-sogliare manualmente la cellula dopo l'elaborazione:

- Se una cellula non supera l'elaborazione automatica (di solito appare una croce rossa solo quando la registrazione dell'immagine non è riuscita, generalmente a causa di uno o più componenti deboli o di un DAPI con scarso contrasto).
- Se l'elaborazione automatica ha causato l'eliminazione di piccoli cromosomi o cromosomi accanto ai nuclei. Questo accade più frequentemente se l'immagine di colorazione di contrasto DAPI è scadente, poiché il sistema non riesce a ottenere correttamente una maschera completa per tutti i cromosomi in metafase.



Procedura

1. Selezionare la cellula dalla **M-FISH Image capture** (Finestra di acquisizione dell'immagine M-FISH) (se l'elaborazione non è riuscita, verrà visualizzato un messaggio di errore).
2. Fare clic sul pulsante **Threshold** (Soglia) sulla barra degli strumenti principale sullo schermo. Appare una finestra Soglia standard.
3. Eseguire una **sottrazione dello sfondo** sull'immagine, si consiglia un'impostazione tra 15 e 25 a seconda delle dimensioni dei cromosomi.
4. Dopodiché, impostare la soglia normalmente e Accettare, il sistema rielaborerà l'immagine utilizzando la nuova maschera DAPI.

Nota: dopo la rielaborazione di una singola cellula potrebbe essere impossibile caricare la metafase dall'ultima cellula nel vetrino dovuto. In tal caso, riavviare il software applicativo e riaprire il caso prima di procedere.

Rielaborazione

La rielaborazione può essere utilizzata in qualsiasi momento dopo il completamento dell'acquisizione M-FISH per reimpostare tutte le cellule nel vetrino, eliminando tutte le immagini di metafase o cariotipo esistenti e ripetere nuovamente l'elaborazione delle immagini raw.

- La finestra Fluomap si apre consentendo la modifica di una qualsiasi delle combinazioni di sonde (se è stato commesso un errore nella creazione originale della mappa e non è stato identificato fino a dopo l'acquisizione).

Appendice: Procedure di esempio passo dopo passo

Per tutte le procedure di esempio, assicurarsi che i componenti della lampada fluorescente e del microscopio siano accesi e, per i sistemi di scansione, accendere il GSL e confermare che ci sia olio sufficiente nel meccanismo di lubrificazione.

- Quando si passa da obiettivi a basso ingrandimento ad alto ingrandimento, utilizzare sempre i controlli software (pannello Objectives (Obiettivi) o tasti funzione).

Acquisizione sonda standard



Procedura di esempio per l'acquisizione manuale di immagini FISH dopo il caricamento manuale del vetrino e l'identificazione delle cellule.

1. Accedere alla schermata di acquisizione standard selezionando l'icona della schermata di acquisizione sulla barra degli strumenti principale.
2. Aprire o creare un caso e selezionare un vetrino nel Navigator. Se è necessario creare un vetrino, fare clic con il pulsante destro del mouse sul caso e scegliere **New Slide** (Nuovo vetrino) dal menu.
3. Fare clic su **Capture Mode** (Modalità di acquisizione) e scegliere **Probe** (Sonda).
4. Impostare i fluorocromi che verranno utilizzati per l'acquisizione nel pannello di selezione dei fluorocromi (caricare un elenco pre-salvato).
5. Selezionare le opzioni che si desidera utilizzare da **Customize** (Personalizza) (caricare un modello).
6. Fare clic su **New Cell** (Nuova cellula).
7. Fare clic su **Live**.
8. Mettere a fuoco e centrare l'immagine.
9. (Facoltativo) Se si ha una forte intensità di colorazione di contrasto, aprire il pannello dell'interfaccia della lampada fluorescente e regolare l'intensità della lampada % su un valore inferiore per ridurre il fotobleaching della foto dal filtro DAPI UV.
10. Fare clic su **Auto Setup** (Impostazione automatica). Le impostazioni della fotocamera ottimizzano il contrasto dell'immagine per qualsiasi modifica della messa a fuoco della posizione.
11. Se è difficile ottenere un buon contrasto, aprire la finestra **Capture Setup** (Impostazione acquisizione) per regolare;
 - i cursori **Autosettings** (Impostazioni automatiche) (avanzate), che controllano la visualizzazione Auto Camera Setup (Impostazione automatica fotocamera)
 - i cursori **Black** (Nero) e **Bright** (Luminoso) fino a ottenere un contrasto dell'immagine migliorato.

Lo sfondo dovrebbe avere un aspetto scuro uniforme. Se l'immagine ha un aspetto grigio chiaro e piatto, si potrebbe avere troppa luce, abbassare il livello di esposizione.
12. **Acquire** una volta che l'immagine è a fuoco e continuare con il processo di sogliatura.
13. Se **Auto Threshold** (Soglia automatica) è attiva, l'immagine verrà elaborata e l'acquisizione continuerà.
 - In caso contrario, verrà visualizzata la schermata di sogliatura.
 - Regolare la soglia per eliminare qualsiasi sfondo indesiderato.
14. Se **Auto Sequence** (Sequenza automatica) è attiva, il sistema continuerà con il fluorocromo successivo dopo la sogliatura.
 - In caso contrario, fare clic su **Live** per acquisire il fluorocromo successivo.



15. Ripetere i passaggi 7-12 finché non sono stati acquisiti tutti i fluorocromi.
 - Se **Auto Camera Setup**, **Auto Sequence** e **Auto Threshold** (Impostazione fotocamera automatica, Sequenza automatica e Soglia automatica) sono attivati, il sistema continuerà ad acquisire il resto dei fluorocromi.

Acquisizione della sonda manuale del frame dell'immagine



Procedura di esempio per l'acquisizione manuale di immagini FISH dopo il caricamento manuale del vetrino e l'identificazione delle cellule.

1. Aprire o creare un caso e selezionare un vetrino nel Navigator. Se è necessario creare un vetrino, fare clic con il pulsante destro del mouse sul caso e scegliere **New Slide** (Nuovo vetrino) dal menu.
2. Accedere alla schermata Manual Probe Capture (Acquisizione sonda manuale) selezionando l'icona della fotocamera nera sulla barra degli strumenti principale, disponibile solo nella schermata di avvio.
3. Impostare o caricare l'elenco di acquisizione fluorocromica che verrà utilizzato per l'acquisizione.
4. Verificare che la colorazione di contrasto sia impostata, che ogni canale abbia il colore corretto, che l'assegnazione del filtro e le impostazioni Z-stack siano appropriate.
5. Selezionare il componente di colorazione di contrasto, quando l'otturatore fluorescente è aperto, la barra di scorrimento dell'esposizione può essere regolata se necessario per visualizzare l'immagine live.
6. Mettere a fuoco e posizionare l'immagine come richiesto.
7. Verificare che **Auto Exposure** (Esposizione automatica) sia selezionata e fare clic su **Capture** (Acquisisci)
 - L'esposizione ottimale della fotocamera viene calcolata per la colorazione di contrasto e acquisisce automaticamente l'immagine.
 - Una volta spostati i filtri, l'esposizione ottimale della fotocamera viene calcolata automaticamente per il primo canale della sonda e l'immagine acquisita.
 - I canali rimanenti vengono acquisiti automaticamente in sequenza.
8. Ripetere i passaggi da 5 a 7 per ogni nuova immagine.

Alternative: **Acquire** con esposizione Auto-Setup (Impostazione automatica) in base a un'area selezionata.

9. Selezionare il componente di colorazione di contrasto, fare clic su un'area dell'immagine live per regolare automaticamente l'esposizione della fotocamera utilizzando solo le informazioni in quell'area.
10. Mettere a fuoco e posizionare l'immagine come richiesto.
11. Fare clic su **Capture** (Acquisisci)
 - L'esposizione ottimale della fotocamera viene ricalcolata per la colorazione di contrasto in base all'area selezionata e acquisisce automaticamente l'immagine.
 - Una volta spostati i filtri, l'esposizione ottimale della fotocamera per l'area selezionata viene calcolata automaticamente per il primo canale della sonda e l'immagine acquisita.
 - I canali rimanenti vengono acquisiti automaticamente in sequenza.
12. Ripetere i passaggi da 9 a 11 per ogni nuova immagine.

Alternative: **Acquire** (senza impostazione automatica)

13. Selezionare il componente di colorazione di contrasto, se necessario, regolare manualmente la barra di scorrimento dell'esposizione o fare clic su un'area selezionata dell'immagine live.

14. Mettere a fuoco e posizionare l'immagine come richiesto.
15. Selezionare il canale successivo e, dopo aver spostato il filtro, regolare manualmente la barra di scorrimento dell'esposizione o cliccare su un'area selezionata dell'immagine live.
16. Ripetere per i canali rimanenti, assicurandosi che un'esposizione ottimale dell'immagine live sia preimpostata per ogni componente nell'elenco di acquisizione.
17. Confermare che **Auto Exposure** (Esposizione automatica) non sia selezionata e fare clic su **Capture** (Acquisisce)
- l'immagine della colorazione di contrasto viene catturata immediatamente e, una volta spostati i filtri, ogni canale fluorocromo senza regolare l'esposizione della fotocamera.
18. Ripetere i passaggi da 13 a 17 per ogni nuova immagine (regolando nuovamente l'esposizione nei passaggi 15 e 16 su altre immagini, se necessario).

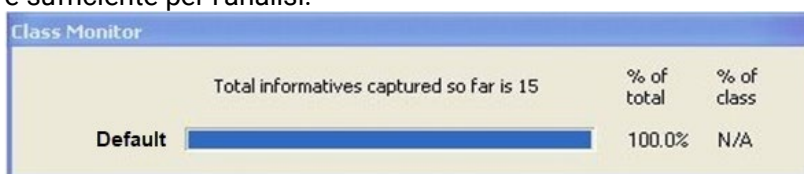
Acquisizione manuale Spot



Procedura di esempio per l'acquisizione di immagini di conteggio spot su un sistema di acquisizione.

1. Accedere alla schermata di acquisizione standard selezionando l'icona della schermata di acquisizione sulla barra degli strumenti principale.
2. Aprire o creare un caso e selezionare un vetrino nel Navigator. Se è necessario creare un vetrino, fare clic con il pulsante destro del mouse sul caso e scegliere New Slide (Nuovo vetrino) dal menu.
3. Fare clic su **Capture Mode** (Modalità di acquisizione) e scegliere *Spot Counting* (Conteggio spot) 
4. Si apre la finestra **Existing Assays** (Test esistenti), selezionare un test appropriato per il vetrino e il kit sonda da utilizzare e fare clic su OK per assegnarlo al vetrino.
5. Confermare che le impostazioni del **Fluorochrome Selection Panel** (Pannello di selezione del fluorocromo) siano corrette per il vetrino e le sonde da acquisire.
6. Confermare che **Auto Camera Setup** (Impostazione automatica fotocamera) e **Save stacks** (Salva stack) siano selezionati nella finestra **Capture Customize** (Personalizzazione acquisizione).
7. Utilizzare il tasto di scelta rapida (numero) della tastiera per passare al filtro di contrasto corretto e aprire l'otturatore fluorescente.
8. Trovare manualmente un'area contenente materiale cellulare e passare all'obiettivo di acquisizione ad alto ingrandimento utilizzando il pannello *Objectives* (Obiettivi). Mettere a fuoco e trasferire tutta la luce alla fotocamera.
9. Fare clic su **New Cell (Nuova cellula)**
10. Fare clic su **Live***. **L'immagine viene visualizzata sullo schermo e l'esposizione della fotocamera viene regolata per un contrasto ottimale.**
11. (Facoltativo) Se si ha una forte intensità di colorazione di contrasto, aprire il pannello dell'interfaccia della lampada fluorescente e regolare l'intensità della lampada % su un valore inferiore per ridurre il fotobleaching della foto dal filtro DAPI UV. 
12. Rimettere a fuoco e posizionare le cellule nell'immagine live. È possibile selezionare *Auto Setup* (Impostazione automatica) se ciò modifica il contrasto o la saturazione. Se necessario, aprire la finestra **Capture & Fluorochrome Setup** (Impostazione acquisizione e fluorocromo) per regolare:
- i cursori Black (Nero) e Bright (Luminoso) fino a ottenere un contrasto dell'immagine migliorato
- i cursori **Autosettings** (Impostazioni automatiche) (avanzate) possono essere modificati se si desidera migliorare il contrasto di Auto Setup (Impostazione automatica)
13. Ricontrollare la messa a fuoco dell'immagine e fare clic su **Capture** (Acquisisci). L'immagine verrà salvata.

14. Se l'**Auto Sequence** (Sequenza automatica) è attiva, il sistema acquisirà i fluorocromi rimanenti in sequenza*, regolando automaticamente l'esposizione della fotocamera e acquisendo i piani multipli Z-stack configurati nel test.
15. Se l'**Auto Sequence** (Sequenza automatica) è disabilitata, fare clic su **Live*** per acquisire il fluorocromo successivo e ripetere i passaggi da 10 a 13 fino a quando tutti i fluorocromi non saranno stati acquisiti.
16. Fare clic sul pulsante **Class Monitor** (Monitoraggio classe) nella parte inferiore della finestra Fluorochrome Selection (Selezione fluorocromo) per vedere quante cellule sono state elaborate e valutate dall'acquisizione.
17. Ripetere i passaggi 9 - 12 (13) per acquisire immagini successive su aree diverse del vetrino finché il "Total informatives..." (Informazioni totali) Class Monitor (Monitoraggio classe) non è sufficiente per l'analisi.



18. Passare alla schermata **Analysis** (Analisi) per terminare l'acquisizione e l'elaborazione.

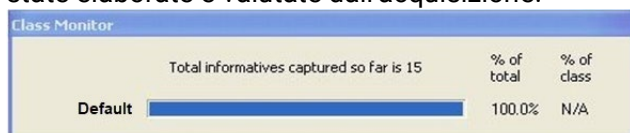
* Verrà richiesto di cambiare i filtri se non si dispone di un'interfaccia attiva per la torretta dicroica del microscopio.

GSL: Conteggio automatico degli spot

Esempio di flusso di lavoro della procedura per la scansione e l'acquisizione automatica di immagini di conteggio degli spot FISH interfase su un sistema di scansione GSL senza etichette con codice a barre.

1. Passare alla schermata **Scan** (Scansione), consentendo all'applicazione di connettersi e riportare l'hardware in posizione home. 
2. (Facoltativo) Caricare un vetrino sul tavolino e utilizzare la [procedura di acquisizione manuale degli spot](#) per diverse immagini per confermare i valori della fotocamera, del filtro e dello Z-stack.
 - Ciò creerà un frame dell'immagine in cui i parametri di test possono essere valutati su un set controllato di immagini.
 - Scaricare il vassoio al termine e pulire il vetrino da eventuali oli se deve essere utilizzato di nuovo per la scansione
3. Nella schermata Scan (Scansione), selezionare l'icona **Scansiona batch di vetrini**.
4. Fare clic ed evidenziare l'icona del vetrino 1 (posizione 1, vassoio 1);
 - Selezionare il caso in cui verranno salvati i dati dell'immagine.
 - Selezionare un modello di scansione appropriato per il vetrino.
5. (Facoltativo) Si può assegnare un nome a ciascun vetrino cliccando sull'etichetta nell'estremità "frosted" del display del vetrino. 
6. Modificare il modello, confermando che è configurato per *Fluorescent* (Fluorescente) e *Interphase Finding* (Ricerca interfase) e che la modalità di acquisizione è impostata su **SpotCounting** (Conteggio spot).
7. Fare clic sul pulsante **Select SPOT Assay** (Seleziona test SPOT) per aprire la finestra di dialogo **Existing Assay** (Test esistente).
 - Selezionare un test dall'elenco o creare un nuovo test appropriato per il vetrino.
 - Confermare le impostazioni del test e fare clic su **OK** per assegnare il test selezionato.
8. Il modello di scansione è pronto per essere utilizzato, fare clic su **OK** per assegnarlo al vetrino selezionato.

9. Posizionare il vetrino campione corretto (corrispondente al caso selezionato nel passaggio 5) nella posizione 1 sul vassoio.
10. Selezionare l'icona del vetrino successivo e assegnare un caso e un modello di scansione. Aggiungere il vetrino campione corrispondente nel vassoio e verificare che sia posizionato correttamente.
11. Ripetere per tutti i vetrini e le posizioni rimanenti da utilizzare nel primo vassoio. Caricare il vassoio nella prima posizione (più bassa) nello stacker/cassetta.
12. Ripetere il passaggio per un massimo di 5 vetrini nel vassoio 2, caricando il vassoio nella posizione successiva (più bassa) nello stacker/cassetta. **Ctrl** o **Maiusc** consentono di selezionare più vetrini con il mouse e di assegnare loro lo stesso caso o modello.
 - Sui sistemi GSL 120 ripetere questa procedura per tutti i vetrini e i vassoi rimanenti da utilizzare, quindi posizionare la cassetta nell'unità stacker e chiudere lo sportello.
13. Selezionare **Scan** (Scansiona): il primo vetrino verrà scansionato a 10x per trovare le cellule, l'olio verrà aggiunto automaticamente e quindi acquisito ad alto ingrandimento.
14. Durante l'acquisizione, il display mostrerà la schermata Capture (Acquisizione) in modalità **Spot Counting** (Conteggio spot) (vedere [Spot Auto Capture](#) (Acquisizione automatica spot) per maggiori dettagli).
15. (Facoltativo) Fare clic sul pulsante Class Monitor (Monitoraggio classe) nella parte inferiore della finestra Fluorochrome Selection (Selezione fluorocromi) per vedere quante cellule sono state elaborate e valutate dall'acquisizione.



16. Quando viene raggiunto il primo dei conteggi di arresto del test, l'acquisizione terminerà e passerà al vetrino successivo, ripetendo la scansione, l'applicazione di olio e l'acquisizione automatica fino al completamento di tutti i vetrini.

