

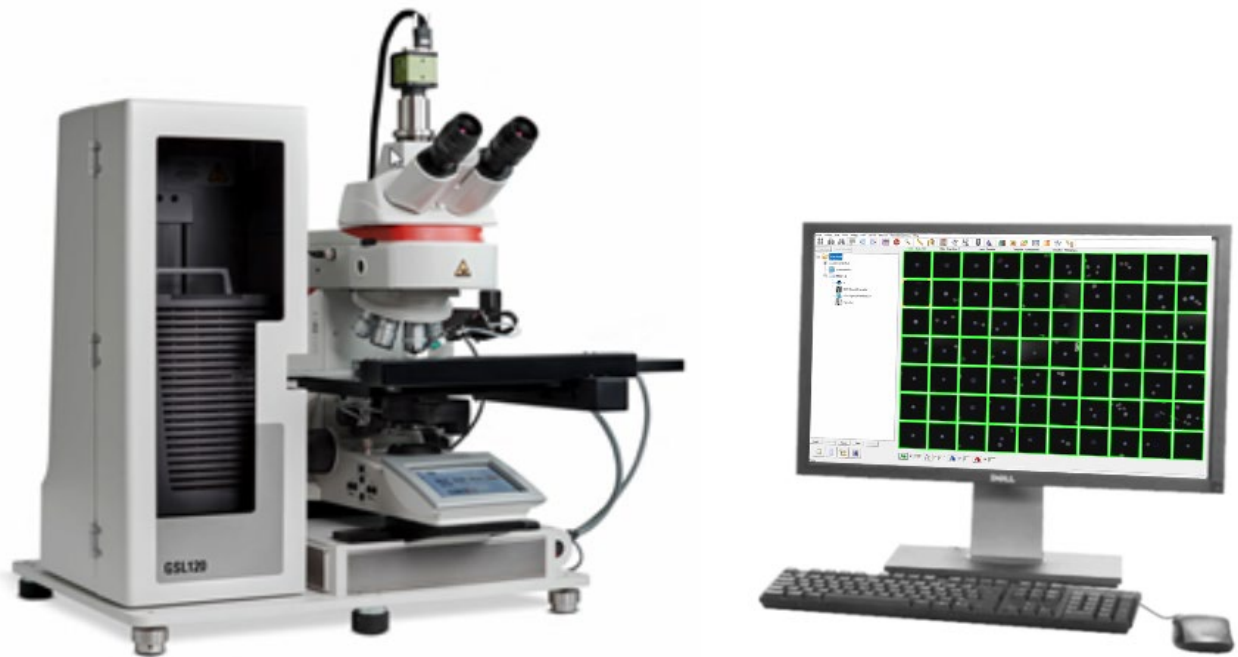
Advancing Cancer Diagnostics  
Improving Lives



# *CytoVision*\* DX (9.0)-probe

\*Registrert hos United States Patent and Trademark Office og i andre jurisdiksjoner rundt omkring i verden.

## Driftsinstruksjoner



**CytoVision DX versjon 9.0 er beregnet for in vitro-diagnostisk bruk**

## Driftsinstruksjoner for CytoVision\* DX: Probe

Denne håndboken gjelder for *CytoVision DX*-skanne- og avbildningssystemer og *CytoVision DX*-programvare versjon 9.0

### Merknad om opphavsrett

© 2024 Leica Biosystems Richmond, Inc. Med enerett.

LEICA og Leica-logoen er registrerte varemerker for Leica Microsystems IR GmbH.

*CytoVision* er et varemerke som tilhører Leica Biosystems Richmond, Inc. Alle tredjeparts varemerker tilhører de respektive eierne.

\*Registrert hos United States Patent and Trademark Office og i andre jurisdiksjoner rundt omkring i verden.

Informasjonen i dette dokumentet kan endres uten forvarsel, og representerer ingen forpliktelse for Leica Biosystems Richmond, Inc.

Ingen del av denne håndboken skal kopieres eller distribueres, transkriberes, lagres i et demaskeringssystem eller oversettes til noe menneskelig eller databasert språk i noen form eller på noen måte, elektronisk, mekanisk, magnetisk, manuelt eller å annen måte, eller formidles til tredjepart, uten uttrykkelig tillatelse fra Leica Biosystems Richmond, Inc, 5205 Route 12, Richmond, IL 60071, USA.

### CytoVision DX-systemer produseres og distribueres av:



Leica Biosystems Richmond, Inc.

5205 Route 12

Richmond, IL 60071

U.S.A

Tlf (800)-537-4669



### Kontaktinformasjon

Gå til [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) for å finne kontaktdetaljer for ditt nærmeste salgs- og støttesenter for Leica Biosystems.

# Innhold

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Advarsler og merknader .....</b>                   | <b>6</b>  |
| <b>Innledning .....</b>                               | <b>7</b>  |
| <b>Ressurser.....</b>                                 | <b>7</b>  |
| <b>Symbolidentifisering.....</b>                      | <b>8</b>  |
| <b>Advarsler og forholdsregler.....</b>               | <b>8</b>  |
| <b>Spesifikasjoner for prøve og objektglass .....</b> | <b>9</b>  |
| <b>Oversikt over <i>CytoVision DX</i>-probe .....</b> | <b>10</b> |
| <b>FISH-objektglasskanning.....</b>                   | <b>10</b> |
| <b>FISH-avbildning og -visning .....</b>              | <b>11</b> |
| <b>FISH-bildevisning og -analyse .....</b>            | <b>11</b> |
| <b>FISH-bilde og -datatyper .....</b>                 | <b>12</b> |
| <b>Brukerpålogging og start av programvare.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>Skanning av interfase-objektglass .....</b>        | <b>14</b> |
| <b>Hurtigstartprosedyre.....</b>                      | <b>14</b> |
| Objektglassmaler .....                                | 14        |
| Klassifiserere.....                                   | 14        |
| Alternativer for automatisk avbildning .....          | 14        |
| Lasting av objektglass og brett .....                 | 15        |
| Skanne batch med objektglass (interfase).....         | 16        |
| <b>Manuell skannekonfigurasjon.....</b>               | <b>17</b> |
| Tilordning av sak og mal .....                        | 17        |
| Arbeidsflyter for manuell skannekonfigurasjon.....    | 18        |
| <b>Strekodeskanning .....</b>                         | <b>20</b> |
| Konfigurerings av tilordning av objektglass .....     | 20        |
| Arbeidsflyter for strekodeskanning .....              | 20        |
| <b>Objektglassmaler (FISH) .....</b>                  | <b>21</b> |
| Skanneområde .....                                    | 21        |
| Forhåndsskanning .....                                | 22        |
| Skanning.....                                         | 22        |
| AutoCapture (Automatisk avbildning).....              | 23        |
| Bildevisning og -justering .....                      | 27        |
| <b>Gjennomgang av interfaselister.....</b>            | <b>28</b> |
| Visning av merknad (interfase) .....                  | 28        |
| Objektglassvisning (interfase).....                   | 29        |
| Skanneklassifiserere.....                             | 30        |
| <b>Automatisk avbildning .....</b>                    | <b>33</b> |
| Automatisk avbildning.....                            | 33        |

---

|                                             |           |
|---------------------------------------------|-----------|
| <b>Probeavbildning (cellebilder)</b>        | <b>34</b> |
| Objektivkontroll                            | 34        |
| Probeavbildning: Prosedyreoversikt          | 34        |
| Avbildningskontroller                       | 35        |
| Avbildningslister                           | 36        |
| Konfigurasjon av avbildning og fluorokromer | 37        |
| Tilpass avbildning                          | 39        |
| Terskelbehandling                           | 41        |
| Automatisk terskelbehandling                | 42        |
| Ny terskelbehandling av råbilder            | 42        |
| <b>Probeavbildning (bildeliste)</b>         | <b>43</b> |
| Objektivkontroll                            | 44        |
| Avbildning av bildeliste: Prosedyreoversikt | 44        |
| Alternativer for avbildningskonfigurasjon   | 45        |
| Legge til kanaler                           | 45        |
| Konfigurere en kanal                        | 45        |
| Arbeide med avbildningslister               | 47        |
| Ta bilder                                   | 47        |
| Avslutte avbildning                         | 48        |
| <b>Visning av probebilder</b>               | <b>49</b> |
| Skjermvisning                               | 49        |
| <b>Feilsøking</b>                           | <b>52</b> |
| Avbildningssystem                           | 52        |
| Feil ved tilkobling til mikroskop           | 52        |
| Effekt i mikroskopets lyskvalitet           | 52        |
| GSL-skannesystem                            | 52        |
| Feil ved tilkobling til GSL                 | 52        |
| Problemer med 10x-skannefokus               | 53        |
| Problemer med 10x-skanneklassifisering      | 53        |
| Problemer med 63x-avbildningsfokus          | 53        |
| Problemer med avbildning av probekanal      | 53        |
| Kompatibilitet for objektglass/brett        | 54        |
| Eksport av diagnoselogger                   | 54        |
| <b>Vedlegg: Punkttelling</b>                | <b>55</b> |
| Oversikt over punkttelling                  | 55        |
| Analyse av punkttelling                     | 56        |
| Redigere analyser for punktavbildning       | 57        |
| Punktskanning og -avbildning                | 59        |
| Objektglassmal (skannekonfigurasjon)        | 59        |

---

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| Manuell avbildning .....                                         | 60        |
| Avbildnings- og klasseskjerm.....                                | 61        |
| Stoppe automatisk avbildning for SPOT .....                      | 61        |
| <b>Vedlegg: Tissue FISH .....</b>                                | <b>62</b> |
| <b>Oversikt over Tissue FISH .....</b>                           | <b>62</b> |
| <b>Skanning og avbildning med Tissue FISH .....</b>              | <b>62</b> |
| 1) Automatisk skanning og automatisk avbildning: .....           | 62        |
| 2) Automatisk skanning og manuell regionmarkering:.....          | 63        |
| 3) Manuelt regionvalg av region for automatisk avbildning: ..... | 63        |
| Manuell avbildning .....                                         | 63        |
| Objektglassetsing.....                                           | 63        |
| <b>Tissue FISH-markering (utsatt avbildning) .....</b>           | <b>64</b> |
| Visningsprogramskjerm for markering .....                        | 65        |
| <b>Vedlegg: M-FISH-avbildning .....</b>                          | <b>67</b> |
| <b>Introduksjon til M-FISH-teknikken .....</b>                   | <b>67</b> |
| <b>Avbildningsoversikt.....</b>                                  | <b>67</b> |
| <b>Avbildningskonfigurasjon .....</b>                            | <b>68</b> |
| Avbildningsliste .....                                           | 68        |
| Fluomap .....                                                    | 69        |
| Filtre og mikroskopi.....                                        | 70        |
| Ta M-FISH-bilder .....                                           | 71        |
| Manuell terskelbehandling .....                                  | 72        |
| Ny terskelbehandling .....                                       | 73        |
| Behandle på nytt .....                                           | 73        |
| <b>Vedlegg: Eksempel på trinnvis prosedyre .....</b>             | <b>74</b> |
| <b>Standard probeavbildning .....</b>                            | <b>74</b> |
| <b>Manuell probeavbildning for bilderamme .....</b>              | <b>75</b> |
| <b>Manuell punktavbildning.....</b>                              | <b>76</b> |
| <b>GSL: Automatisk punkttelling.....</b>                         | <b>77</b> |

# Advarsler og merknader

Selv om alle anstrengelser er gjort for å sikre at informasjonen er nøyaktig, kan noen av detaljene og illustrasjonene være forskjellige mellom de enkelte systemvariantene.

Ikke alle kategorier gjelder nødvendigvis for sluttbrukerkonfigurasjonen.

## Spesifikasjoner og ytelse

For produkt- og komponentspesifikasjoner, se **CytoVision DX-spesifikasjonene**.

## Maskinvareinstallering

Maskinvarekomponenter i *CytoVision DX*-skanne- og avbildningssystem leveres for installering av Leica Biosystems eller deres autoriserte representanter.

## Installering av programvare

PC-arbeidsstasjoner levert av Leica Biosystems vil være forhåndsinstallert med programvare. For spesifikke instruksjoner om programinstallasjon på en separat PC, se **brukerveiledning for CytoVision DX**.

## Opplæring

Denne håndboken og **brukerveiledningen for CytoVision DX** er et supplement til operatør opplæringen og andre avanserte instruksjoner gitt av Leica Biosystems eller deres autoriserte representanter.

## Vedlikehold og feilsøking

For informasjon om feilsøking ved skanne- og avbildningsproblemer, se kapittelet **Feilsøking**.

For informasjon om generelt systemvedlikehold og feilsøking ved problemer, se **brukerveiledning for CytoVision DX**.

## Reparasjon

Reparasjoner må kun utføres av en autorisert representant fra Leica Biosystems. Etter reparasjonsarbeid ber du teknikeren om å utføre driftskontroller for å bekrefte at produktet er i forventet driftstilstand.

## Cybersikkerhet

Vær oppmerksom på at arbeidsstasjoner er utsatt for skadelig programvare, virus, datafeil og personvernbrudd. For retningslinjer for cybersikkerhet for sluttbrukere, se **brukerveiledning for CytoVision DX**.

Samarbeid med IT-administratoren om å beskytte arbeidsstasjoner ved å følge institusjonens retningslinjer for passord og sikkerhet. For spesifikke instruksjoner anbefalinger for beskyttelse av arbeidsstasjoner og servere, se **CytoVision DX-spesifikasjonene**, avsnittet Nettkverksadministrasjon.

## Sikkerhet

Sikkerhetsbeskyttelsen kan bli svekket hvis denne enheten brukes på en måte som ikke er spesifisert av produsenten.

For informasjon om systemdrift og sikkerhet, se **brukerveiledningen for CytoVision DX**.

# Innledning

**CytoVision DX**-systemet er et kvalitativt automatisert system for digital opprettelse og visning av objektglass.

CytoVision DX-systemet er beregnet for in vitro-diagnostisk bruk som et hjelpemiddel for en kvalifisert tekniker for å gjennomgå og tolke digitale bilder av metafasekromosomer fra perifert blod og benmarg.

- CytoVision DX-systemet hjelper til med plasseringen av interfase- og metafasekjerner på standard mikroskopobjektglass på en måte som ellers ville vært egnet for manuell visualisering ved konvensjonell helfeltmikroskopi og fluorescerende mikroskopi.
- En kvalifisert tekniker har ansvaret for å følge hensiktsmessige prosedyrer og sikkerhetstiltak for å sikre gyldigheten av tolkningen av bildene som innhentes ved hjelp av CytoVision DX-systemet.

Påse at du følger korrekt laboratoriepraksis, samt regelverk og prosedyrer som kreves av din institusjon for å støtte klargjøring, behandling, oppbevaring og avfallshåndtering av objektglass.

Dette utstyret skal bare brukes til dette formålet og på måten som beskrives i dette dokumentet og **brukerveiledningen for CytoVision DX**.

## Ressurser

| Ressurs                                                                     | Beskrivelse                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Brukerveiledning for CytoVision DX</b><br><b>23MAN9D03</b>               | Gir referanseinformasjon og instruksjoner for brukerkalibrering, objektglasskanning, bildeopptak, bildevisning, saks- og databehandling, feilsøking og vedlikehold.                                |
| <b>Driftsinstruksjoner for CytoVision DX Karyotyper</b><br><b>23MAN9D02</b> | Inneholder instruksjoner for objektglasskanning ved metafase, bildeopptak, bildevisning, kromosomanalyse (karyotyping) og feilsøking av programmer.                                                |
| <b>Driftsinstruksjoner for CytoVision DX-probe</b><br><b>23MAN9D01</b>      | (Dette dokumentet) Inneholder instruksjoner for fluorescerende (FISH) objektglasskanning, bildeopptak, bildevisning, kromosomanalyse (karyotyping) og feilsøking av programmer (dette dokumentet). |
| <b>Spesifikasjoner for CytoVision DX</b><br><b>23MAN9D03</b>                | Gir detaljerte spesifikasjoner for <i>CytoVision DX</i> -produktalternativene.                                                                                                                     |

## Symbolidentifisering

| Symbol                                                                            | Forklaring                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>ADVARSEL</b> , laserstråle: beskytt øyne og hud mot eksponering<br>Optisk stråling, se aldri direkte inn i lysstrålen. |
|  | <b>FORSIKTIG</b> : Klemfare: Hold fingrene unna bevegelige deler.                                                         |
|  | CE-merking for samsvar                                                                                                    |
|  | Produsent                                                                                                                 |

## Advarsler og forholdsregler

Et avbildnings- eller skannesystem utstyrt med mikroskop og motoriserte skannekomponenter er et presisjonsinstrument som skal håndteres med forsiktighet og kun betjenes av personale med hensiktsmessig opplæring. Unngå å utsette systemet for plutselige eller kraftige støt til enhver tid. For mer informasjon, se **brukerveiledning for CytoVision DX**.

## Spesifikasjoner for prøve og objektglass

| Egenskap                        | Detalj                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Prøvetype                       | <p>Funksjonaliteten for <i>CytoVision DX</i>-probe brukes til påvisning og bildetaking av fluorescerende fargede metafasekromosomer, interfasecellekjerner og vev.</p> <p>Prøver for prøvemateriale skal utføres med aksepterte teknikker for cellekulturer og forberedelse, og kan presenteres på mikroskopobjektglass.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Prøvefarging                    | <p>Systemet er optimalisert for DAPI-farging av interfaseceller.</p> <p>Ytelsen er ikke validert ved alle mulige prøvefargings- og prepareringsteknikker og er direkte relatert til kvaliteten og intensiteten av prøvefarging og bakgrunnsrester på mikroskopobjektglasset.</p> <p>Atypisk fargeintensitet eller høy bakgrunn kan redusere effektiviteten til celleregistrering og automatisk avbildning, og krever derfor ytterligere brukeraktivitet.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Spesifikasjoner for objektglass | <p><b>Objektglasstype:</b> Mikroskopobjektglass i glass med rette (vertikale) kanter.</p> <p><b>Dimensjoner for objektglass:</b> Firkantet hjørne på 90° innenfor området 75,1 til 76,1 mm lengde, 24,9 til 26,1 mm bredde og 0,9 til 1,2 mm tykkelse</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Objektglass som overskrider disse dimensjonene, vil kanskje ikke passe inn i GSL-brett og støttes ikke for skannesystemdrift.</li> <li>Objektglass med dimensjoner som er mindre enn disse, eller med 45° (beskårne) hjørner, passer kanskje ikke inn i det standard GSL-brettet og bør bruke det alternative (skråkant) brettet <b>23GSL903XXX001</b>. Dette må spesifiseres i systembestillingen.</li> </ul> <p>Bruk av objektglass som ikke er laget av glass, anbefales ikke, da disse kanskje ikke vil passe sikkert i hylleinnsettsdelen eller kan utsettes for bevegelser i hyllen, noe som kan påvirke systemets ytelse når det gjelder bildekvalitet.</p> |
| Objekt-glassdekke               | <p>Bruk og montering av et glassdekke er nødvendig ved fluorescerende avbildning.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Et dekke med en tykkelse på 170 µm (+/- 5 µm) er optimalt for optisk nøyaktighet med oljeimmersjonsobjektiver med høy forstørrelse.</li> <li>Dekket skal ikke stikke ut forbi kanten på glassobjektglasset. Hele dekket og etiketten må festes til glassobjektglasset.</li> <li>Dekket som benyttes skal være fritt for luftbobler, og det må hardne før det brukes.</li> </ul> <p>Monteringen skal ikke forhindre at mikroskopobjektivene når sine fokalposisjoner i forhold til prøven.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Begrensninger for objektglass   | <p>DAPI-fargede objektglass skal presentere en lys fargeintensitet med høy kontrast som er synlig for brukeren ved en visning på 10x gjennom mikroskopets kikkhull, med antifalming for å redusere fotobleking.</p> <p>Redusert konsentrasjon eller intensitet av DAPI-farge på objektglasset kan føre til redusert pålitelighet for 10x fokus- og skanneoperasjon eller skannefeil.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

# Oversikt over CytoVision DX-probe

Driftsinstruksjonene i dette dokumentet dekker programkontroll og operasjoner som er spesifikke for prosedyrer for FISH-objektglasskanning, avbildning, visning og scoring som gjelder for CytoVision DX-systemer konfigurert for den **probe**-lisensierte programvaremodulen.

Det er nødvendig at brukeren er kjent med den generelle bruken av programmet, skjermfunksjoner, maskinvaregrensesnittkontroller, saksbehandling, skjerm- og bildevisningsfunksjoner og tilhørende programmer som er felles for alle systemer installert med *CytoVision DX*-programvare.

- Flere detaljer om disse finnes i **brukerveiledningen for CytoVision DX**:

Ytterligere driftsinstruksjoner er gitt for prøve- og arbeidsflytspesifikke instruksjoner om prosedyrer for objektglasskanning ved metafase, avbildning og karyotyping.

- Flere detaljer om disse finnes i **driftsinstruksjonene for CytoVision DX Karyotyper**:

Alle avgjørelser om bildetolkning tas av brukeren. Det er ingen kvalitative krav til prøven, men bildeopptaks- og visningsverktøyene er optimalisert for bilder tatt ved hjelp av en mikroskopobjektivlinse med oljeimmersjon og høy forstørrelse, med DAPI-farget prøvemateriale som viser farge-DNA-prober ved hjelp av fluorescerende filtersett med smalband som matcher prøven.

## FISH-objektglasskanning

FISH-objektglasskanning og automatisk avbildning bruker de fluorescerende programvarefunksjonene for å finne, klassifisere, flytte og avbilde prøver.

I forkant av automatisert skanning og automatisk avbildning:

- Det må utføres en **kalibrering av fluorescerende skanning** for kameraintensiteten og fokusforskyvningene mellom objektivene for skanning og avbildning.
- Moduser for *AutoCapture* (Automatisk avbildning) for objektglassmaler bruker fluorokrom- og **avbildningsinnstillinger** fra avbildningsskjermens konfigurasjon for *Build List* (Bygg liste), *Save List* (Lagre liste) eller *Customize Capture* (Tilpass avbildning). Disse må settes opp og konfigureres i forkant av automatisk skanning og automatisk avbildning.

For hver prøvetype er det en anbefalt skannemodus for *Finder* (Søker) og *AutoCapture* (Automatisk avbildning) basert på de forventede visningskravene for prøvetypen.

| Objektglass-type | Forhåndsskanning (1,25x) | Modusen Finder (Søker) (fluorescerende) | Modusen AutoCapture (Automatisk avbildning)                 | Bildeformat |
|------------------|--------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------|
| Metafase FISH    | I/R                      | Metafase                                | Probe                                                       | Cellemappe  |
| Interfase FISH   | I/R                      | Metafase                                | Probe                                                       | Cellemappe  |
| Interfase FISH   | I/R                      | Interfase                               | ProbeAuto (Automatisk probe) / Spot Counting (Punkttelling) | Bildeliste  |
| Tissue-FISH      | Registrere etsing        | Vev                                     | ProbeAuto (Automatisk probe) / Spot Counting (Punkttelling) | Bildeliste  |
| M-FISH           | I/R                      | Metafase                                | I/R (kun manuell)                                           | Cellemappe  |

- Søkemodusen *Tissue* (Vev) krever den lisensierte modulen **Tissue FISH**.

- Avbildning med *Spot Counting* (Punkttelling) krever den lisensierte modulen **Spot Counting** for automatisert signalbehandling av interfase-FISH-bilder under bildeopptak.
- Alternative kombinasjoner av skanne- og avbildningsmoduser er ikke begrenset for brukeroprasjon, men er kanskje ikke optimale for avbildning eller påfølgende visningskrav.

En objektglassmal for GSL-skannesystem kan stilles inn med flere overlappende skanneområder på samme objektglass. Hvert skanneområde kan stilles inn for en annen modus for fluorescerende automatisk avbildning hvis det er nødvendig å ha bilder av både cellemappe- og bildelisteformater for visning.

## FISH-avbildning og -visning

CytoVision DX-systemer bruker 2 bildeformater som FISH-bilder kan lagres som for påfølgende bildevisning: **cellemappe** og **bilderamme** (Framelist (Bildeliste)).

| Prøvetype                                           | AutoCapture (Automatisk avbildning) | Manuell avbildning            | Avbildningsalternativer     |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Metafase FISH                                       | Probe                               | Probe (celle)                 | Terskelbehandling           |
| Interfase FISH                                      | Probe                               | Probe (celle)                 | Terskelbehandling, Z-stabel |
| Interfase FISH                                      | ProbeAuto (Automatisk probe)        | Probe (bilde)                 | Z-stabel                    |
| Interfase FISH                                      | Spot Counting (Punkttelling)        | Spot Counting (Punkttelling)* | Punktanalyse                |
| MFISH (metafase)                                    | I/R                                 | MFISH* (celle)                | I/R                         |
| * krever ytterligere lisensierte programvaremoduler |                                     |                               |                             |

## FISH-bildevisning og -analyse

| Bildetype                                                                                                               | Analysebruk                         | Analysealternativer                                          | Alternativer for visning/utdata |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Cellemappebilder (standard probe- eller M-FISH-avbildning)</b>                                                       |                                     |                                                              |                                 |
| Råbilde                                                                                                                 | Ny terskelbehandling                | i/r                                                          | Eksport                         |
| Probe (Metafase FISH)                                                                                                   | Visning, opprette metafase*         | Vise saksvisning, beskrivelse                                | Eksport og utskrift             |
| Probe (MFISH*)                                                                                                          | Visning                             | Vise saksvisning, beskrivelse                                | Eksport og utskrift             |
| Probe (Interfase FISH)                                                                                                  | Visning                             | Vise saksvisning, beskrivelse                                | Eksport og utskrift             |
| Metafase (MFISH*)                                                                                                       | Segmentering og opprette karyogram* | Antall og nummer for saksvisning. Beskrivelse, MFISH-visning | Eksport og utskrift             |
| * Krever ytterligere lisensierte programvaremoduler (for karyogramalternativer, se driftsinstruksjoner for Karyotyper). |                                     |                                                              |                                 |
| <b>Bilder i bildeliste (Probe-Auto (Automatisk probe) eller Spot Counting (Punkttelling))</b>                           |                                     |                                                              |                                 |

| Bildeliste                                                                                                | i/r | i/r | i/r |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| <i>Bilder krever bruk av separat bildeanalyseprogramvare som er kompatibel med formatet «bildeliste».</i> |     |     |     |

## FISH-bilde og -datatyper

Det er 2 bildeformater som brukes av *CytoVision DX* for avbildning.

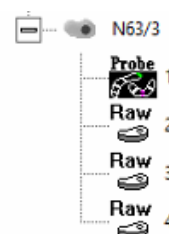
1. Saksbilder (cellemappe) som er avbildet ved hjelp av standard skjermalternativer for avbildning.
2. Bildelisteobjektglass som er avbildet ved hjelp av de dedikerte (bilderamme) probeavbildningsmodusene.

Før du fortsetter med skanning eller avbildning av FISH-objektglass, er det viktig at den mest hensiktsmessige avbildningsmodusen brukes for å bestemme hvilke visnings- og analysealternativer som vil være tilgjengelige.

### Probe (cellemappe).

Et cellebasert format designet for metafase- eller interfase-FISH-prøver, med bildevisning og interaksjon ved hjelp av standard oppstartsskjemmverktøy.

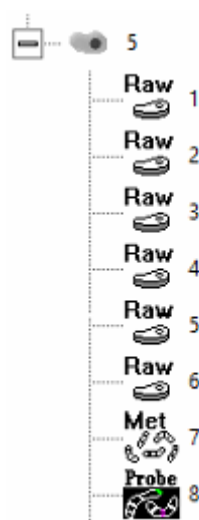
- Manuell avbildning ved hjelp av *Probe*-modusen for avbildningsskjem.
- Skannesystemets automatiske avbildning ved hjelp av avbildningsmodusen *Probe* i objektglassmalen.
- Farge- og råbilder lagres i individuelle celler på objektglassnivå i saksnavigasjon.
- Alternativer for bildeforbedring, beskrivelse, utskrift og eksport.
- Bilder kan vises i saksviisning.
- Valgfri terskelbehandling (bakgrunnssletting) oppretter objekter som kan kopieres til fleksible skjermer og kombineres med bildeobjekter fra andre standard avbildningsmoduser eller saker.
- Probekaryotyper kan opprettes fra FISH-metafasebilder på et system med den karyotype-lisensierte programvaremodulen aktivert.



### M-FISH.

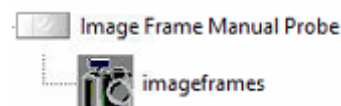
Et cellebasert format designet for kombinatoriske merkede (flerfargede) FISH-prøver, med bildevisning og interaksjon ved hjelp av standard oppstartsskjemmverktøy.

- Manuell avbildning ved hjelp av MFISH-modus for avbildningsskjem.
- Skannesystemets automatiske avbildning er ikke mulig.
- Farge- og råbilder lagres i individuelle celler på objektglassnivå i saksnavigasjon.
- M-FISH-karyotyper kan opprettes fra metafasebilder på et system med den *karyotype*-lisensierte programvaremodulen aktivert.
- Alternativer for bildeforbedring, beskrivelse, utskrift og eksport.
- Bilder kan vises i saksviisning.
- Objekter kan kopieres til fleksible skjermer og kombineres med bildeobjekter fra andre avbildningsmoduser eller saker for cellemappe.



## Probe (bildeliste).

Et helbildeformat designet for Interfase- eller Tissue FISH-prøver som er kompatibelt med separat bildeanalyseprogramvare for visning og interaksjon.

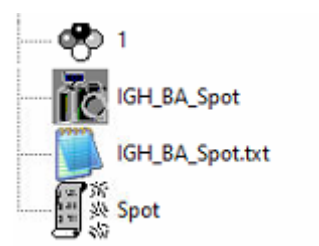


- Manuell avbildning ved hjelp av skjermen **Probe Capture** (Probeavbildning) for bilderamme.
- Skannesystemets automatiske avbildning ved hjelp av avbildningsmodusen *ProbeAuto* (Automatisk probe) i objektglassmalen.
- Ingen terskelbehandling for objekter. Alle farge- og råbilledata kombineres til én enkelt bildeliste på objektglassnivå.
- Z-stabellag lagres som individuelle bilder sammen med maksimal projeksjon.

## Spot Counting (Punkttelling).

På systemer med modulen **Spot Counting** (Punkttelling) er ytterligere alternativer tilgjengelige:

- Manuell avbildning ved hjelp av modusen *Spot Counting* (Punkttelling) for standard avbildningsskjerm (lagres som bildeliste).
- Skannesystemets automatiske avbildning ved hjelp av avbildningsmodusen *Spot Counting* (Punkttelling) i skannemalen.
- Automatisk signalbehandling ved hjelp av konfigurert punktanalyse for avbildnings- og skanneparametere.

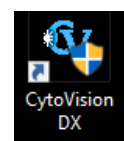


Når du velger når du skal bruke de forskjellige alternativene for probeavbildning, skal de viktigste forskjellene mellom hver avbildningstype og de påfølgende analysefunksjonene vurderes.

*Bilderamme-data* (bildeliste og punkttelling for probe) har ingen visnings- eller analysemulighet ved hjelp av *CytoVision DX*-programmet og krever bruk av separat bildeanalyseprogramvare som er kompatibel med formatet «bildeliste».

## Brukerpålogging og start av programvare

1. Slå på arbeidsstasjonsskjermen og PC-en, når du blir bedt om det. Logg på med et brukernavn som har de riktige sikkerhetstillatelsene for programmet.
2. Slå på GSL, mikroskop og fluorescerende lampekontroller som kreves for bruk.
3. Start programmet ved å dobbeltklikke på skrivebordsikonet eller velge snarveien fra **Windows Start (All Programs (Alle programmer)) > CytoVision DX > CytoVision DX**
4. Sluttbrukerbekreftelsen vises.



It is the responsibility of the qualified technician to employ appropriate procedures and safeguards to assure the validity of the interpretation of the images obtained.

Cancel

Accept

5. Klikk på **Accept** (Godta) for å bekrefte bruk og fortsette med programmet (eller **Cancel** (Avbryt) for å lukke).

# Skanning av interfase-objektglass

## Hurtigstartprosedyre

Disse instruksjonene forutsetter at følgende gjelder før du starter en fullstendig skanning med fluorescerende interfasesøk og automatisk avbildning av bilder:

1. Systemet er riktig konfigurert og kalibrert (inkludert **kalibrering av fluorescerende skanning**) i henhold til standard prosedyrer for Leica Biosystems som beskrevet i **brukerveiledningen for CytoVision DX**.
2. En egnet celle-**klassifiserer** er tilgjengelig.
3. En manuell avbildning er fullført med opprettelse av **fluorokromlister** og **alternativer etter avbildning** for probemoduser.
4. En **objektglassmal** med gyldige skanneområder, skanne- og avbildningsregler er opprettet.
5. Objektglass er plassert i GSL-brettkassetten fra brett 1, posisjon 1.

## Objektglassmaler

Alle objektglass som skal skannes må tilordnes en skannemal som inneholder alle de nødvendige innstillingene som gjør det mulig for systemet å finne celler, klassifisere og sortere dem til en avbildningssekvens og deretter automatisk avbilde det nødvendige antallet bilder.

- For flere detaljer, se seksjonen [\*\*Objektglassmaler\*\*](#).

## Klassifiserere

Standard klassifiserere som følger med programvaren er basert på representative fluorescerende interfaseprøver som forventes å tillate innledende drift uten vesentlige endringer.

- Disse klassifisererne samsvarer kanskje ikke med egenskapene til brukerprøver på grunn av forventet og normal variasjon i prøve- og objektglassklargjøring.
- For hver av prøvetypene som skal brukes på systemet, skal ytelsen til den valgte klassifisereren gjennomgås for å avgjøre om ytterligere optimalisering er nødvendig.
- Flere bilder fra nye skanninger kan legges til for de standard klassifisererne, eller nye klassifiserere kan opprettes.
- For flere detaljer, se seksjonen [\*\*Klassifiserere > Opplæring og redigering\*\*](#).

## Alternativer for automatisk avbildning

Hver av de tilgjengelige modusene for automatisk avbildning etter cellesøk krever en egnet avbildningskonfigurasjon for å tillate bruk med flere prober (fluorokromer).

For hver probeanalyse må kombinasjonen av fluorokromer først registreres manuelt for å opprette, endre og lagre de nødvendige **fluorokromlistene** eller **alternativene etter avbildning** i skannemalen.

Disse skal konfigureres under manuell avbildning av representative FISH-objektglass for hver prøvetype eller hvert probesett eller hvert punktanalyse som er beregnet for senere bruk innen skanning og avbildning.

- Ta et representativt bilde ved hjelp av manuell avbildning i modusen **Probe**.
- Bekreft filter- og fargeinnstillinger for hvert fluorokromnavn, og lagre kombinasjonen av probekanaler som en «fluorokromliste» for bruk med automatisk avbildning for bruk med *Probe* og *ProbeAuto* (Automatisk probe).
- Modusen *Probe* krever også alternativer etter avbildning (tilpass avbildningsmal).
- Modusen Spot Counting (Punkttelling) krever en analyse knyttet til standard fluorokromnavn.
- For flere detaljer, se seksjonen om avbildning for hver modus.

## Lasting av objektglass og brett

Åpne døren og ta ut brettkassetten fra GSL-løftmaskinen.

- Løftmaskinen må stå i sin laveste posisjon før dørens låsemekanisme kan åpnes og brett kan legges til eller fjernes fra kassetten.
- Knappen **Unlock Door** (Lås opp dør) er tilgjengelig i skanneskjermens vindu for **skannekonfigurasjon\*** (skann objektglassbatch) eller når du klikker på knappen **Load Slide** (Last objektglass) i avbildningsskjermen. Dette senker kassetten og låser opp mekanismen.



Plasser rene objektglass i GSL-brettet med etiketten bak.

- Objektglass 1 i hvert brett er til venstre. Objektglasset må være fritt for oljerester, og dekket/prøven må være vendt opp.
- Sørg for at objektglasset ligger flatt i innsatsen og er skjøvet opp (bak) og til venstre mot referanseplankantene før du slipper fjærgrepet for å holde det på plass.
- Når fjærgrepet er sluppet, sørg for at det holder objektglasset fast uten at det oppstår bevegelse hvis du berører objektglasset lett.
- Gjenta for resterende objektglass og brett.



Når hvert brett er lastet med objektglass, skal det på GSL120-systemer settes tilbake i brettkassetten med magnetfestet på innsiden og sub-X-hullet vendt utover.

- Brett 1 er den laveste posisjonen, brett 24 den høyeste.
- Sørg for at hvert brett er satt plant (horisontalt) inn i sitt eget spor, og at den utovervendte kanten av hvert brett er på nivå med de ved siden av.

Når døren lukkes, vil systemet skanne kassetten for brett på nytt før det starter en ny skanning eller automatisk avbildning.

- Ved strekkodeskanning vil alle brett som registreres bli lastet og sjekket for objektglass som inneholder strekkoder.
- Ved manuell skanning tilpasses brettposisjonen til posisjonene som er tilordnet manuelt med en sak og et malnavn på skjermen *Scan Setup* (Skannekonfigurasjon).

Under skanning og automatisk avbildning heves kassetten for å låse døren av sikkerhetsårsaker. Hvis et brett skal legges til eller fjernes, må du stoppe den pågående skanningen eller avbildningen.



\* Det utføres en minnebrukskontroll når *Scan Setup* (Skannekonfigurasjon) velges, for å avgjøre om en hel batch med objektglass kan skannes. Hvis programminnebruken er over en konfigurert terskel, vil følgende skje.

- Det vises en advarsel, og vinduet *Scan Setup* (Skannekonfigurasjon) åpnes ikke.
- Programmet må startes på nytt før noen skannerrelatert aktivitet kan utføres.

## Skanne batch med objektglass (interfase)

1. Sørg for at GSL- og mikroskopkomponentene er slått på og at det er tilstrekkelig med olje i oljemekanismen.
2. Start *CytoVision DX*-programmet og gå til skanneskjermen, slik at programmet kan koble til og starte maskinvaren.
3. Klikk på ikonet «Skann batch med objektglass» og åpne vinduet for manuell [Scan Setup](#) (Skannekonfigurasjon)  
(For strekkodeobjektglass som har strekkodene knyttet til et saksnavn og en objektglassmal, hopp til trinn **12** etter plassering av objektglass i brett og kasset).
4. Klikk på og uthev objektglass 1 (hylleposisjon 1).
5. Velg saken bildedataene skal lagres i.
6. Velg objektglassmalen som har de riktige reglene for skanning og automatisk avbildning for objektglasset.
7. Klikk på etiketten i den frostede enden av objektglassvisningen for å gi objektglasset et navn.
6. Plasser prøveobjektglasset som samsvarer med valgt sak (og objektglassnavn) i posisjon 1 på brettet. (Se prosedyren [Lasting av objektglass og brett](#) for mer informasjon).
7. Velg neste objektglassikon, og tilordne en sak og en skannemal. Legg det samsvarende prøveobjektglasset i brettet og sjekk at det er riktig plassert.
8. Gjenta for de resterende objektglassene og posisjonene som skal brukes i det første brettet. Last brett 1 i første (laveste) posisjon i løftemaskinen/kassetten.
9. Gjenta denne prosedyren for alle resterende objektglass og brett, og last kassetten inn i løftemaskinenheten.
10. Plasser kassetten i GSL-løftemaskinen og lukk døren.
11. Velg knappen Scan (Skann) for å begynne skanningen.  
(For strekkodeobjektglass velger du ikonet *Skann objektglass med strekkoder*).
12. Det første objektglasset vil bli skannet med skannealternativer som er angitt i malen.  
– Skanning (10x): se [Objektglassmaler > Skanning](#)
13. For å kunne starte en 10x-skanning må systemet fullføre et fokuskart på flere punkter innenfor skanneområdet.  
– Dette er avhengig av riktig **kalibrering av fluorescerende skanning** og av at startfokuspunktet er nær prøven, angitt under **spatial kalibrering** (endret av en fokusforskyvning som er lagret i objektglassmalen).
14. Under 10x-skanningen gjennomgår systemet bilder fra kameraet ved hver hyllebevegelse (bilde) og sammenligner eventuelle objekter som registreres med [klassifisereren](#), som er konfigurert i objektglassmalen. Dette bestemmer hvor mange klassifiserte celler som er tilgjengelige for avbildning.
15. Når 10x-skanningen er fullført, sorteres de klassifiserte cellene for å bestemme avbildningsrangeringen før de går til fasen for *AutoCapture* (Automatisk avbildning).
16. Olje tilsettes deretter automatisk, linsen med høy forstørrelse flyttes på plass og gjør en «oljedans» for å spre oljen jevnt over overflaten av objektglasset.
17. Bilder (rammer) tas deretter med høy forstørrelse. For hvert bilde fokuserer systemet automatisk for å bestemme fokusposisjonen, og tar deretter bilder ved hjelp av de spesifikke innstillingene for mal før det går videre til neste celle.
18. Når riktig antall bilder er tatt (som konfigurert i skannemalen eller punktanalysen), vil avbildningen fullføres, og *CytoVision DX* vil gå videre til neste objektglass, gjenta skanningen, oljetilsettingen og den automatiske avbildningen til alle objektglassene er fullført.
19. Programmet for skanneovervåking registrerer aktivitet og tidsberegninger for hver fase for forhåndsskanning, skanning og avbildning for skannebatchen, og skal gjennomgå for eventuelle uventede problemer.

For flere trinnvise arbeidsflyter, se [vedlegget](#) på slutten av denne håndboken.

## Manuell skannekonfigurasjon

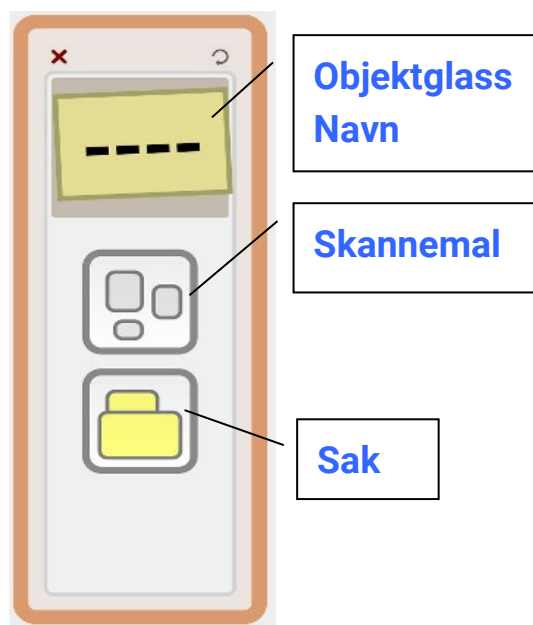


Med all manuell objektglass- og skannekonfigurasjon er det viktig å kontrollere at saken og malene samsvarer med de ekte objektglassene som fysisk plasseres i systemet.

- For å redusere risikoen for feil anbefales det å dobbeltsjekke objektglass og innstillinger, eller å bruke et dataark med ønsket sak og ønskede objektglassposisjoner.
- Bruk av [strekkodeskanning](#) på merkede objektglass på GSL-systemene optimaliserer skanneeffektiviteten og reduserer risikoen for feil i skannekonfigurasjonen.

### Tilordning av sak og mal

- I skjermen Skanning velger du ikonet **Skann objektglassbatch** fra hovedverktøylinen, et vindu åpnes og viser alle de potensielle objektglassposisjonene som kan angis for skanningen.
- Tilordne en sak og en mal for hvert objektglass som skal skannes. Objektglassnavn er valgfritt. Hvis dette ikke angis, bruker systemet det neste mulige tallet for saken med en identifikator for objektglassposisjon til slutt, dvs. objektglass\_1\_1 (for brett 1).
- Klikk på ikonet saksmappe, og en liste med saker på nettverket vises. Velg fra denne listen eller skriv inn navnet på en ny sak som er i ferd med å opprettes.
- Når en sak er valgt vil den vises på høyre side av konfigurasjonsskjermen med et identifikasjonsnummer.
  - Dette nummeret vises i objektglassvisningen.
  - Hver gang programmet startes på nytt, tilbakestilles denne listen.
- Hvis du skanner flere objektglass fra samme sak, klikker du på saksnavnet fra denne listen for raskt å tilordne saken i stedet for å søke gjennom saksmappepanelet. Klikk på velgeren for skannemal og tilordne en mal for objektglasset.
  - Når maler er opprettet, vises de også øverst til venstre på konfigurasjonsskjermen for hurtigvalg.
- Objektglassnavn er valgfrie. Hvis et spesifikt navn er påkrevd, klikker du på seksjonen «Objektglassnavn» og skriver inn den riktige beskrivelsen.
- Flere objektglass kan velges med Windows-tastene **Ctrl** eller **Shift** og klikk med musen.



## Utsatt automatisk avbildning

Når alle saker og maler er tilordnet for objektglassgruppen på mikroskopet, vil en pil for valg vises under hvert objektglass.



Dette er vinduet **Utsatt automatisk avbildning** som gjør det mulig å overstyre malen til separate komponenter for skanning og automatisk avbildning.

- **Ingen.** (Standard). Systemet vil skanne og utføre automatisk avbildning (hvis konfigurert) på objektglasset før det går videre til neste.
  - Standard innstilling for GSL-skanning og avbildning med automatisk oljetilsetting.
- **Skanning.** Velg denne for å kun utføre skannekomponenten til malen. Etter hver skanning vil systemet gå videre til neste objektglass.
  - Bruk på et GSL-system ved manuell gjennomgang av skanneminiatyrbilder før (utsatt) automatisk avbildning.
- **Avbildning.** Velg dette for kun å utføre automatisk avbildning. Dette alternativet kan velges dersom det er klassifiserte (grønt flagg) celler i objektglasslisten. Avbildning vil følge malens avbildningsregler for antall celler og sorteringsalternativer.

**Merk:** Manuelt valgte alternativer for kun skanning eller avbildning er ikke typiske for FISH-prøveskanning for interfaseprøver, men er valgfrie for metafaseskanning.

Når tilordning av alle objektglass, saker og maler er utført, og brettene er lastet inn i GSL, trykker du på knappen **Scan** (Skanning) nederst på siden for skannekonfigurasjon for å starte skanneprosessen. Systemet vil jobbe seg gjennom hver av kombinasjonene av objektglasskonfigurasjoner og maler.

## Arbeidsflyter for manuell skannekonfigurasjon

I praksis dekker dette 2 hovedarbeidsflyter,;

### 1. Automatisk skanning og avbildning

Dette er rutineprosedyren for GSL-systemer som bruker skanningsvalg for fluorescerende metafase- og interfasesøk.

Objektglass angis i *skannekonfigurasjon*, og **Ingen** bekreftes fra alternativene for **utsatt automatisk avbildning**.

- Det første objektglasset skannes ved lav forstørrelsesgrad og behandles med den valgte klassifisereren.
- Klassifiserte celler rangeres med malen sorteringsregler for automatisk avbildning.
- Olje påføres objektglasset automatisk, og automatisk avbildning med høy forstørrelse startes. Cellene fokuseres automatisk og avbildes ved hjelp av den konfigurerte avbildningsmodusen og innstillingene.
- Når det valgte antallet celler er avbildet, går hyllen videre til neste objektglass eller brett og starter skanning og automatisk avbildning for det objektglasset.
- Prosessen gjentas til alle objektglass tilordnet gruppen er fullført.

### 2. Skanning med utsatt automatisk avbildning (metafase)

Denne prosedyren er valgfri for GSL-systemer som bruker skanning med fluorescerende metafasesøk, der det er et brukerkrav om å gjennomgå, legge til eller fjerne klassifiserte celler før du starter automatisk avbildning.

Objektglass velges på siden for skannekonfigurasjon og **Kun skanning** valgt fra **alternativene for utsatt automatisk** avbildning.

- Alle objektglass skannes ved lav forstørrelsesgrad og behandles med den valgte klassifisereren.
- Når skanningen er fullført, går systemet tilbake til skanneskjermen og stopper.

Nå har operatøren muligheten til å starte prosessen for automatisk avbildning øyeblikkelig, eller å først gå gjennom metafaselistene for å modifisere celler med grønt flagg for avbildning før han/hun lagrer og går tilbake til skjermen **Skanning**.

- Velg ikonet *Skann objektglassbatch* manuelt for å åpne vinduet for skannekonfigurasjon.
- Velg knappen **Deferred** (Utsatt), som nå vil vises nederst på skjermen. Alle objektglass som kun ble skannet i forrige batch (og har minst 1 celle flagget med grønt i listen) vil få brettposisjonen og saksnavnet lastet inn på nytt på skjermen med avbildningsvisningssettet «C».
- (Valgfri) Slett/fjern objektglass du ikke ønsker å avbilde. Dette kan være nyttig etter en manuell gjennomgang av metafaselister og identifisering av at det ikke finnes noe av akseptabel kvalitet for avbildning på noen av objektglassene.
- Velg knappen **Scan** (Skanning) for å starte prosessen for automatisk forskyvning som sammenligner 10x-fokusposisjoner.
- Klassifiserte celler rangeres med malen sorteringsregler for automatisk avbildning.

Ved bruk av *Deferred Capture* (Utsatt avbildning) utfører systemet en ny fokuseringskartlegging på objektglasset og sammenligner dette med lagrede bilder av den opprinnelige skanningen. Systemet anvender en automatisk forskyvning som kompenserer for eventuelle mindre objektglass- eller brettbevegelser som introduseres under lasting og avlasting av brett.

- Olje påføres objektglasset automatisk, og automatisk avbildning med høy forstørrelse startes. Cellene fokuseres automatisk og avbildes ved hjelp av **reglene for avbildningstilpasning, Alternativer etter avbildning**.
- Når det valgte antallet celler er avbildet, går hyllen videre til neste objektglass eller brett og starter avbildningsprosessen for det objektglasset.
- Automatisk avbildning gjentas til alle objektglass tilordnet gruppen er fullført.

### Skanning av blandet batch

Alle moduser for FISH-skanning og automatisk avbildning kan kjøres i en blandet batch på GSL-systemet.

- Bare «Skanning»-objektglass vil fullføre 10x-skannekomponenten
- Objektglass etterlatt som «Ingen», vil fullføre komponenter for både celledøk og automatisk avbildning.
- På slutten av den første passeringen kan objektglass med *utsatt avbildning* oppdateres i skjermen for skannekonfigurasjon ved å trykke på knappen **Deferred** (Utsatt), for å laste inn objektglassene som fortsatt har avbildningskomponenten som skal fullføres.
- Klikk på **Scan** (Skanning) på nytt for å starte automatisk avbildning for de resterende objektglassene.

**MERK:** Med all manuell objektglass- og skannekonfigurasjon er det viktig å kontrollere at saken og malene samsvarer med de fysiske objektglassene som plasseres i objektglasslasterkassetten.

- For å redusere risikoen for feil anbefales det å dobbeltsjekke objektglass og innstillinger, eller å kryssjekke med et dataark med ønsket sak og ønskede objektglassposisjoner.
- Bruk av strekkodeskanning på merkede objektglass på GSL-systemene optimaliserer skanneeffektiviteten og reduserer risikoen for feil i skannekonfigurasjonen.

## Strekodeskanning



Strekodeskanning muliggjør optimal bruk av et GSL-skannesystem. Saks- og multilordning gjøres før skanning ved hjelp av funksjonen **Tilordne strekkoder til objektglass**, eller hvis det er et eget grensesnitt for system for administrasjon av laboratorieinformasjon (LIS).

- Programmet Barcode Manager (Strekcodeadministrasjon) kan brukes for å vise og oppdatere strekkodetilordninger.
- For detaljer om dette og ytterligere informasjon om strekkodestøtte og begrensninger, se **brukerveiledningen for CytoVision DX**.

## Konfigurering av tilordning av objektglass

Klikk på **Assign Slide Barcodes** (Tilordne strekkoder til objektglass)-ikonet i skanningsskjermen for å åpne konfigurasjonsvinduet.



1. **Velg mal:** En visning av tilgjengelige skannemaler vises på skjermen. Nye kan opprettes her, men dette er ikke en typisk arbeidsflyt.
2. **Objektglassdetaljer** (valgfritt). Når en mal er merket, er det mulig å koble til en lagret mal for objektglassdata hvis spesifikk objektglassinformasjon må registreres før en skanning ved å klikke på knappen **Details** (Detaljer).
3. **Velg sak.** Den gjeldende sakslisten vises (nye kan opprettes). Når en gyldig sak er valgt bli **Angi strekkode manuelt** aktiv.
4. **Skanne objektglasstrekkoder.** Bruk en håndholdt strekkodeleser\* til å skanne strekkoden direkte fra objektglasset (linjestrekkodedata kan skrives inn manuelt). Denne vises på skjermen sammen med saks- og malinformasjon for kontroll. Dupliserte strekkoder vil merkes med rødt. Klikk på knappen **Manually Enter Barcode** (Angi strekkode manuelt) hvis den håndholdte strekkodeleseren ikke er forhåndsprogrammert til åpne dette vinduet automatisk.

\* En håndholdt strekkodeleser leveres ikke med skannesystemer. En leser som er i stand til full 2D-strekkodestøtte anbefales, for eksempel Motorola (Symbol) DS6707 eller tilsvarende.

## Arbeidsflyter for strekkodeskanning

Tekstmenyen **Strekodeskanning** over hovedverktøylinjen gir tilgang til de tre skanne- og/eller avbildningskommandoene.

### Skanning og avbildning

Dette er et samme som å klikke på ikonet **Scan slides with Barcodes** (Skann objektglass med strekkoder) på hovedverktøylinjen.

- Hvert brett i kassetten lastes i rekkefølge. Det starter med brett 1, og hver av de 5 brettposisjonene leses for strekkodemerkede objektglass.
- Når en gyldig strekkode registreres i databasen, vil systemet fortsette til skanning og avbildning av ett objektglass av gangen basert på malregler.

### Kun skanning

Dette starter strekkodeobjektglasset som tilsvarer utsatt automatisk avbildning. GSL laster hvert brett i rekkefølge og leser strekkodedetaljene, men utfører kun skannekomponenten med lav forstørrelse fra malen for hvert objektglass.

- **Kun skanning** er egnet for bruk dersom manuell gjennomgang av metafaselistene er planlagt for å kontrollere de klassifiserte cellene for avbildning eller for å legge til / fjerne celler fra kategorien grønt flagg.
- **Kun skanning** er ikke kompatibel med vanlig bruk av interfaseprøver.

## Kun avbildning

Dette skal kun brukes øyeblikkelig etter strekkodefunksjonen **Kun skanning** når de hensiktsmessige celledistene eller regionområdene fra skanningen er gjennomgått eller modifisert. Systemet vil skanne objektglassene med strekkode på nytt i kassetten, og utføre reglene for automatisk avbildning fra skannemalen.

Avbildningskomponenten fungerer på samme måte som **Utsatt avbildning**, hvor systemet sammenligner 10x-fokuseringens posisjoner til et lagret minne av disse posisjonene fra selve skanningen. Dette muliggjør bruk av en automatisk utligning for å kompensere for mindre objektglass- eller brettbevegelser som introduserer under lasting og avlasting av brett.

Kun avbildning av strekkode vil fungere som designet hvis:

- Ingen andre skanninger har blitt utført på systemet siden strekkodealternativet **Kun skanning** ble valgt.
- Objektglass som skal avbildes har ikke blitt fjernet eller satt tilbake i brettene siden **Kun skanning** av strekkoden. Det anbefales også at brettene ikke flyttes til andre posisjoner i kassetten før **Kun avbildning**.

**Merk:** Det utføres en minnebrukskontroll når alternativene for strekkodeskanning velges, for å avgjøre om en hel batch med objektglass kan skannes.

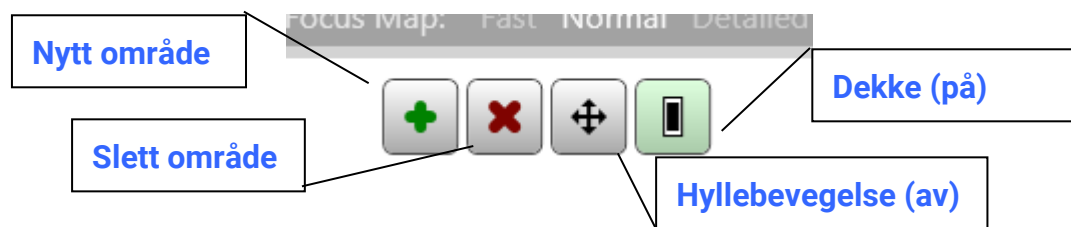
- Hvis programminnebruken er over en konfigurert terskel, vil det vises en advarselmelding, og skanningen vil ikke fortsette.
- Programmet må startes på nytt før noen skannerelatert aktivitet kan utføres.

## Objektglassmaler (FISH)

- Åpne vinduet Skannekonfigurasjon og velg ikonet Tilordne skanning (objektglassmal) for en av objektglassposisjonene for å vise vinduet Velg en objektglassmal.
- Hvis det ikke finnes noen maler, klikker du på knappen Create New Slide Template (Opprett ny objektglassmal), hvis ikke velger du New (Ny) for å lage en ny mal eller Edit (Rediger) for å endre en eksisterende mal.

Det skal brukes et malnavn som beskriver hvilken type skanning som skal utføres. Dette vil vanligvis være en referanse til prøven eller probesettet, for eksempel «FL-Blood» eller «DGO».

## Skanneområde

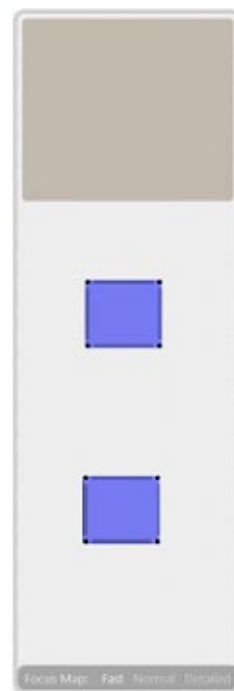


Klikk på det grønne pluss-symbolet (+) for å legge et nytt eller ytterligere skanneområde til en eksisterende mal.

- Flere områder er vanlig for FISH-skanning, enten for å skanne det samme objektglassområdet med moduser for metafase- og interfaseregistrering eller for å tillate separate posisjonsområder av prøven, der hvert av dem er hybridisert med et annet probesett.

For FISH-objektglass må du sørge for følgende:

- Innstillingen for dekket er på for alle områder, ellers vil ikke systemet beregne skanning eller avbilde posisjoner med automatisk fokus nøyaktig.
- Skanneområdet som justeres til å være mindre enn prøveplasseringen, da dette reduserer risikoen for at fokuskartpunkter mislykkes hvis det ikke er noe prøvemateriale til stede.
- For interfaseskanning er det vanlig å angi kun et lite skanneområde på grunn av forventet høy tetthet av klassifiserte celler under skanningen.
- For å redusere fokuskarttider og fotoblekingsrisiko vil mindre områder bruke 1 eller 5 fokuskartpunkter avhengig av størrelsen og om følgende gjelder for *Focus Map* (Fokuskart): *Normal* eller *Focus Map* (Fokuskart): *Fast* (Rask) er valgt.



Når et skanneområde er angitt i malen, har du tilgang til skanne- og avbildningspanelene.

## Forhåndsskanning

Forhåndsskanning bruker den 1,25x objektivlinsen for å identifisere objektglassfunksjoner under helfeltlys.

- Standard forhåndsskanningsalternativer er deaktivert for fluorescerende skannemoduser.

## Skanning

Denne seksjonen inneholder celledøkealternativene som er nødvendige for å tillate optimal skanning for prøvetyper.

- **Scan Mode** (Skannemodus): Fluorescerende for FISH-objektglass (krever kompatibilitet for mikroskop og filter).
- **Finder Application** (Registreringsprogram): Velg mellom metafasesøk og interfasesøk.
- **Classifier** (Klassifiserer): Velg en klassifiserer som passer for prøvetypen.
- **Objective** (Objektiv): 10x som standard.
- **Stop Scanning after** (Stopp skanning etter): stopper skanningen når minimumsantallet klassifiserte (grønt flagg) celler oppnås. Dersom dette er deaktivert, fortsetter skanningen for hele det valgte skanneområdet. Dette er ikke vanlig for FISH-skanning og skal kun brukes med klassifiserere som er optimalisert for brukerprøver.

## Skanne > Konfigurere

Panelet «Konfigurer registreringsprogram» gir tilgang til ulike konfigurasjonsalternativer avhengig av prøvetype og bruk.

- Knappen Reset to Defaults (Tilbakestill til standard) viser innledende innstillinger for **konfigurasjon**.
- Disse er kun vanlige verdier og må kanskje modifiseres på faktiske prøver.

For rutinemessig skanning er følgende vanlig justering:

1. Endre **minimum** og **maksimum** for områdeinnstillinger for metafase/interfase.
2. Angi en prøvemodus (kun metafasesøk).

### Minimum/maksimum interfaseområde

Objekter under minimum eller over maksimum pikselområde vil ikke bli behandlet under skanning for visning eller klassifisering i objektglasslisten.



- For interfaseskanning er standard minimumsområde (40) vanligvis lavere enn nødvendig og kan økes til mellom 80 og 100 uten endring i brukbare interfaseceller.
- Reduksjon av maksimumsområde (standard 500) vil redusere klassifiseringen av klynger av celler hvis disse ikke er nyttige for gjennomgang.

### Laste opp kun klassifiserte

- Bruk dette alternativet til å lagre bare klassifiserte skannede bilder basert på klassifiseringen som brukes.
- *Laste opp kun klassifiserte* skal velges bort under innledende konfigurasjon og testing av klassifiserer.
- Etter optimalisering av klassifiserer anbefales det å slå på dette alternativet, spesielt hvis interfasesøksskanningen produserer mange uklassifiserte bakgrunnsobjekter som kan bremse skanningen, øke behandlingstiden og øke størrelsen på den lagrede *skannelisten*.

### Fokuspunkter (cellevalidering)

Panelet «Cellevalidering» er en bildebehandlingsfunksjon for skannefokuskartet.

- Det anbefales at cellevalidering **deaktiveres** for rutinemessige FISH-skannemaler.
- For detaljer om dette og ytterligere informasjon om skannealternativet for metafaseobjektglass, se **brukerveiledningen for CytoVision DX**.

### AutoCapture (Automatisk avbildning)

Alternativer for AutoCapture (Automatisk avbildning) angir regler for antall og typen bilder som skal avbildes etter en skanning, ved bruk av sorteringsalternativer for bilder av hensiktsmessig kvalitet.

- Fullstendig AutoCapture (Automatisk avbildning) kan kun konfigureres hvis en klassifiserer er valgt i skannemalen (standarden «Alt» er ikke en klassifiserer og viser alle skannede objekter som uklassifisert i objektglasslisten).
- AutoCapture (Automatisk avbildning) følger umiddelbart etter en skanning på GSL-systemer som bruker automatisk oljetilsetting, med mindre arbeidsflyten **Deferred AutoCapture** (Utsatt automatisk avbildning) brukes.

Med mindre alle celler er påkrevd (vanligvis for metafaseobjektglass hvis en manuell gjennomgang er utført), fjerner du avmerkingen for alternativet **Avbildning av alle celler**, og velger reglene dine for prøvetypen.

### *AutoCapture (Automatisk avbildning) for interfase*

For interfaseprøver defineres antall bilder som skal tas, i panelet AutoCapture (Automatisk avbildning).

En egnet interfaseklassifiserer må angis i skannepanelet i objektglassmalen, slik at klassifiserte, celler med grønt flagg er tilgjengelige for skanning og alternativet **Perform AutoCapture** (Utfør automatisk avbildning) kan velges.

Det er tre **avbildningsmoduser** for rutinemessig FISH-bildeopptak på *CytoVision DX*-skannesystemer, **Probe**, **ProbeAuto** (Automatisk probe) og **Spot Counting** (Punkttelling).

1. Du bør være kjent med manuelle prosedyrer for probeavbildning og fluorokromer.
2. AutoCapture (Automatisk avbildning) krever en *fluorokromliste* eller punktanalyse som er opprettet og lagret tidligere. Dette vil knyttes til fluorokromnavn, Z-stabelinnstillinger, filter- og fargekonfigurasjon.
3. Hver modus har et **objektiv**: innstilling for å velge objektivet med høy forstørrelse som brukes til automatisk avbildning, vanligvis 63x for forbedret synsfelt og intensitetseffekter.
4. **Konfigurasjonsstatusen for automatisk kamera** vil avgjøre hvordan bildene tas med høy forstørrelse under automatisk avbildning.
  - **Aktiv** (uthevet): For hver kanal som skal avbildes, vil systemet gjøre en justering av automatisk kamera (eksponering) basert på intensiteten til eventuell fluorescens som er til stede i synsfeltet.
  - **Inaktiv** (ikke uthevet): For hver kanal som skal avbildes, bruker systemet faste kameraverdier som sist ble lagret i fluorokromlisten på avbildningsskjermen.

Flere visnings- og valgalternativer er tilgjengelige basert på den spesifikke modusen som er valgt.

### *Avbildningsmodus for probe:*

Denne avbildningsmodusen vil opprette bilder for analyse via oppstartsskjermen til hovedprogrammet.

- **Capture all cells** (Ta bilde av alle celler) eller **Capture up to n cells** (Ta bilde av opptil n celler): – Brukeren kan definere hvor mange celler som kreves for avbildning basert på et sorterings- og rangeringskriterium.
- **Fluorochrome List** (Fluorokromliste): – Knyttet til en tidligere opprettet og lagret probeavbildningsliste.
- **Post capture options** (Alternativer etter avbildning): – bruker maler for avbildningstilpasning for at brukeren skal kunne definere hvordan bildene skal tas. Disse malene må være forhåndskonfigurert i vinduet *Customize* (Tilpass) på avbildningsskjermen.

### Avbildningsmodus for automatisk probe:

Denne avbildningsmodusen vil opprette *bildeliste*-bilder.

**Post capture options** (Alternativer etter avbildning) brukes ikke. Følgende tilleggsalternativer blir tilgjengelige:

- **Setup on Counterstain** (Konfigurasjon av kontrastfarge): Forbedrer beregningen av eksponering for **konfigurasjon av automatisk kamera** for fluorokromkanaler ved å kun fungere på områdene som inneholder DAPI-signalet (kontrastfargemaske) og bli mindre påvirket av fluorescerende rusk utenfor cellen.
- **Setup on Probe** (Konfigurasjon av probe): Forbedrer beregningen av eksponering for **konfigurasjon av automatisk kamera** for fluorokromkanaler ved hjelp av en størrelsesbasert beregning for å i mindre grad bli påvirket av lyst fluorescerende rusk i cellen.
- **Setup using Average** (Konfigurasjon ved hjelp av gjennomsnitt): Tar de første n bildene ved hjelp av standard automatisk eksponeringsberegning for å oppnå en gjennomsnittlig fluorokromintegrasjonsverdi for alle resterende bilder.
- **Save Z-stacks** (Lagre Z-stabler): Lagrer hvert fluorokromstabelbilde sammen med maksimal projeksjon.

## Avbildningsmodus for punkttelling:

Denne avbildningsmodusen vil opprette bilder i bildeliste-formatet.

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks ☒

DGO

Fluorochrome list:

Innstillingene er de samme som for **ProbeAuto** (Automatisk probe) med følgende tilleggsendringer:

- **Select Spot assay** (Velg punktanalyse): åpner analysevelgerpanelet for valg av en egnet analyse som inneholder fluorokromnavnene, som brukes for å bygge avbildningslisten, Z-stabelinnstillinger og stoppparametere for automatisk avbildning.
- **Fluorochrome List** (Fluorokromliste): kan ikke velges. Innstillingene for avbildningsliste og fluorokromer angis i punktanalysen og knyttes til «Bygg liste»-fluorokromene.

**Merk:** Hvis det er noen listenavn i **fluorokromlisten** eller **panelene for alternativer** etter avbildning, betyr dette at skanneområdet tidligere er angitt for modus for Probe eller Automatisk probe der dette er nødvendig.

Det anbefales å opprette et nytt område for punkttellingsoperasjoner for å holde disse områdene tomme.

## Bildevisning og -justering

På høyre side av skjermen vises et direktebilde med hylle- og fokuskontroller som kan brukes til å kontrollere posisjonen til skanneområdet og bekrefte kamerainnstillingene som ble brukt under skanningen med automatisk fokusering på 10x.

Det anbefales å laste et typisk objektglass før man bruker malen for første gang for å kontrollere at de kalibrerte verdiene for kamera og fokusposisjon er akseptable.

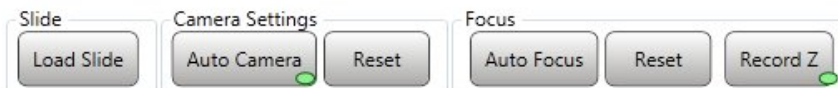
**Merk:** Kamerainnstillinger som brukes under skanningen, bestemmes under skanningens fokuskart, og det skal ikke være nødvendig å rutinemessig justere direkte bildevisning i malen.

- Intensiteten av direkte bilder og fokusposisjonen bestemmes ut fra systemkalibreringen, som forventes å vise et synlig bilde nær prøvens fokalplan uten vesentlig justering for rutinemessige objektglass.
- Hvis bildet er svært mørkt, lyst eller langt unna fokus, kan dette tyde på at kalibreringen ikke er riktig og kanskje må gjentas.

Hvis knappene **Auto Camera** (Automatisk kamera) eller **Record Z** (Ta opp Z) vises i **rødt**, betyr det at de bruker de kalibrerte systeminnstillingene. Dette er normalt og forventet for rutinemessig skanning.



Hvis knappene **Auto Camera** (Automatisk kamera) eller **Record Z** (Ta opp Z) vises i **grønt**, betyr det at de er blitt endret tidligere i malen og nå bruker verdier som er lagret kun for denne malen.



Endring av verdiene for Automatisk kamera vil omgå kameraverdiene for **Kalibrering av fluorescerende skanning** og bruke kun malinnstillingene for 10x-fokuskartrutiner.

- Dette er forventet for bruk i tilfeller der prøveverdier som skal brukes med denne malen, forventes å være forskjellige fra standardkalibreringen, som fluorescerende prøver med falmet eller svak DAPI-farging.
- Helfeltprøver forventes ikke å kreve malspesifikke kameraverdier.

Endring av Ta opp Z (fokusposisjon) skal bare utføres hvis malen skal brukes på et spesifikt objektglass eller en spesifikk prøvetype der prøvefokusplanet er høyere eller lavere enn rutineobjektglasstypen, f.eks. på grunn av en fysisk forskjell i objektglasset eller dekket, materialet eller preparatets tykkelse.

- Fokusposisjonen vil bare påvirke 10x-fokuskartlegging og -skanning. Den har ingen effekt på fokusrutiner for automatisk avbildning med høy forstørrelse.

Etter en oppdatering av **Kalibrering av fluorescerende skanning** vil alle skannemaler som har endrede kamera- eller fokusverdier, vises med et advarselssymbol på konfigurasjonsskjermen for skannebatchen, noe som indikerer at de kanskje bruker innstillinger som må sjekkes eller «Tilbakestilles».

### Slide Templates



## Gjennomgang av interfaselister

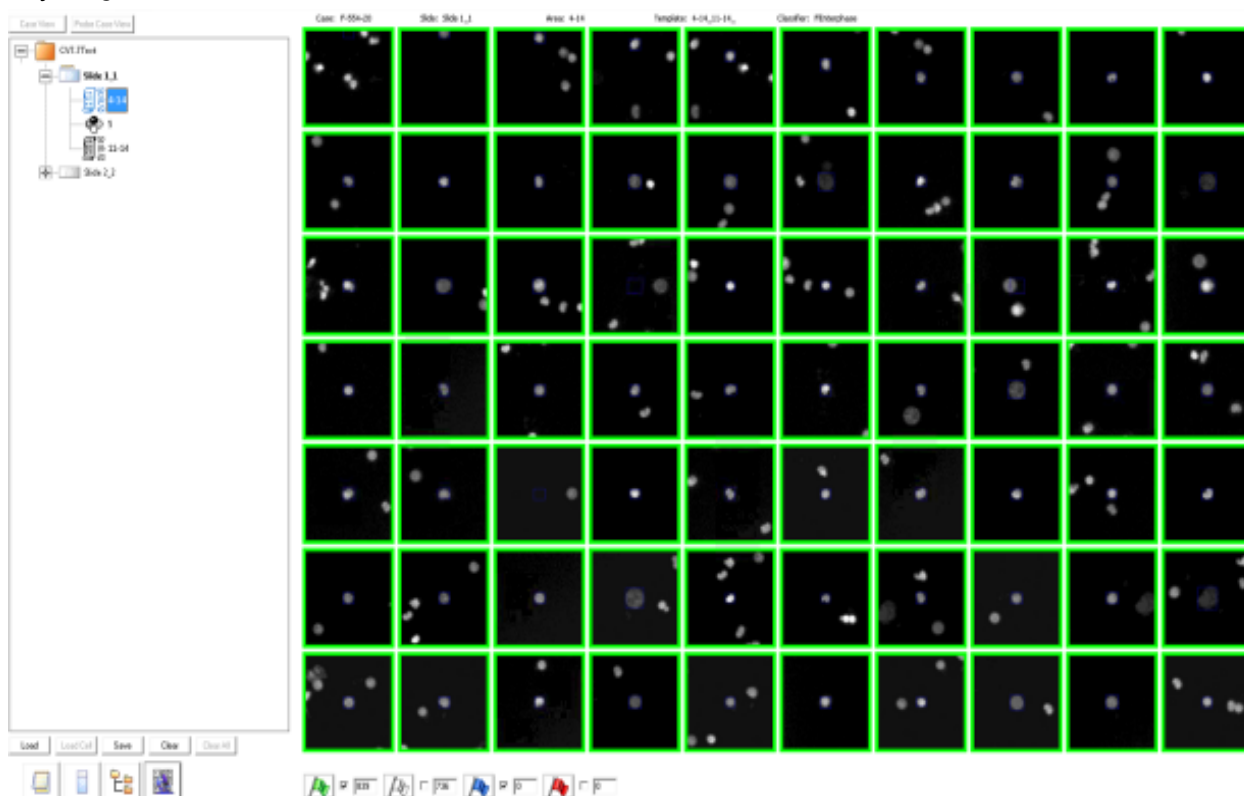


Skannede bilder lagres i en objektglassliste som vises i Navigator i cellemappen.

Objektglasslister kan bare lastes inn og vises i gjennomgangsskjermen og brukes i

- opprettelse eller redigering av skanneklassifisereren.
- Se **brukerveiledningen for CytoVision DX** for informasjon om skjermvisning av generell gjennomgang og kontroll.

For fluorescerende skanning brukes dette vanligvis bare for å gjennomgå celleklassifiserere for nøyaktighet.



## Visning av merknad (interfase)

Å klikke på ikonet **Merknader** skifter ut Navigator-visningen med en datatabell som inneholder informasjon om og målinger av miniatyrbildene som vises i hovedvinduet.

|  | 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 |

De fleste tabellkolonner inneholder målinger beregnet fra bildebehandling utført på miniatyrbildene.

- Hver kolonne kan brukes til å rangere/sortere visningen av miniatyrbilder på skjermen og kobles til objektglassmalen som en rangeringsrekkefølge for AutoCapture (Automatisk avbildning) i standard Probe-modus.

- Målingene har ingen direkte korrelasjon med cellekvalitet og er kun relevante for klassifisereropplæring.

Kolonnene som er mest relevante for interfasebruk er

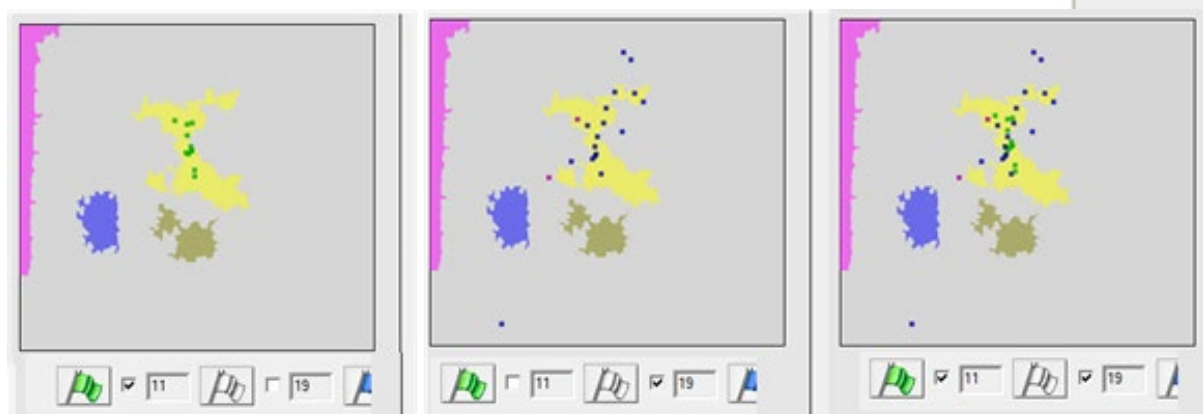
- **Cell (Celle) ID.** Hver celle nummereres etter hvert som den registreres i en skanning. Dette blir et unikt nummer for celle-ID-en som ikke kan slettes eller endre, uavhengig av rangeringen som brukes. Dette tallet er inkludert som en del av cellenavnet for enhver celle opprettet fra en automatisk avbildning i **Probe**-modus.
- **EF.** Viser den unike England Finder-posisjonen for hver celle som brukes til alternativer for automatisk avbildning og koordinatkonvertering. Dette er inkludert som en del av cellenavnet for alle bilder som opprettes fra en automatisk avbildning av **Probe** og lagres som metadata i en bildeliste for **ProbeAuto** (Automatisk probe) og vises på bildevisningsskjermen.
- **Area (Område).** Celleområde i piksler. Nyttig for å avgjøre om justering av innstilling for min. eller maks område er nødvendig i skannemalen.
- **Circ (Sirk.).** Sirkularitet er et potensielt sorteringsalternativ for automatisk avbildning av interfase-**probe**.



## Objektglassvisning (interfase)

Ved å klikke på ikonet **Objektglass** erstattes Navigator- eller Merknader-visningen med en objektglassgrafikk som viser skanneområdet og indikasjonen på cellene som har blitt identifisert under en skanning.

Ved å skjule eller vise de forskjellige miniatyrbildeflaggene for skanningen, vil celleposisjonene vises som et overlegg på objektglassgrafikken.



## Skanneklassifiserere

Programvaren inkluderer standardklassifisererne *FIMetaphase* og *FLInterphase* for fluorescerende prøver.



Klassifiserere tilordnes en skannemal for rutinemessige skanninger som oppretter en avbildningsliste av grønnflaggede celler.

- Systemet tillater også programmer mer forskjellige klassifiserere i gjennomgangsskjermen, uavhengig av hvilken klassifiserer som ble brukt for den opprinnelige skanningen.
- Klikk på Bruk klassifiserer fra hovedverktøylinjen. En liste over brukerklassifiserere presenteres.
- Velg klassifiserere som skal brukes og klikk på OK, miniatyrbildene på gjennomgangsskjermen behandles på nytt med den nye klassifisererparametrene med automatisk valg grønt flagg for cellene som samsvarer best med bildene brukt i opplæring av klassifisereren.
- Slik kan en *skanneliste* klassifiseres på nytt når som helst uten å måtte skanne objektglasset på nytt. Dette er spesielt nyttig under den første opplæringen av systemet og evaluering av en ny klassifiserer.

Det er normalt ikke nødvendig å oppdatere eller lære opp nye klassifiserere for FISH-skanning ytterligere, selv om dette er valgfritt for å teste eller imøtekomme det forventede utvalget av prøvevariasjoner som oppstår under klargjøring av objektglass ved forskjellige sluttbrukersteder.

- Det anbefales at ytterligere bilder fra skanner utføres etter systeminstallasjoner har blitt lagt til (**Tilføyd**) den eksisterende klassifisereren for å optimalisere klassifisererne ytterligere, eller for å opprette nye klassifiserere ved hjelp av kun skannedata fra brukerprøver.
- For FISH-metafaseprøver vil dette imøtekomme det forventede utvalget av prøvevariasjoner som oppstår under klargjøring av objektglass ved forskjellige sluttbrukersteder.

## Retningslinjer for opplæring og redigering av klassifiserere



Når du «lærer opp» en klassifiserer fra en objektglassliste (skanning), settes alle cellene i de grønne eller hvite klassene inn i den valgte klassifisereren.

- Sørg for at bare cellene du vil ha og har gjennomgått, er til stede i enten grønne eller hvite flagg (det er OK å legge til null celler som grønne eller hvite).
- Blå og røde flaggceller fra en skanneliste legges ikke til i en klassifiserer, men du kan flytte celler til blått eller rødt under senere redigering av klassifiserere for å hindre at dataene brukes.
- Blå celler brukes ikke av bildebehandlingen, så du kan legge inn alle celler der og flytte dem mellom grønt eller hvitt som en del av testingen for å se effektene.
- Når en celle er satt inn i den røde klassen, vil den bli slettet hvis klassifisereren er lagret (med mindre den har et kameraikon på seg, som indikerer at den ble automatisk avbildet før den ble lagt til klassifisereren).

Eksempler på både gode (grønne) og dårlige (hvite) celler er nødvendige for nøyaktighet. Når du redigerer en klassifiserer må du sjekke følgende:

- Det grønne flagget inneholder ikke bilder med celleklynger eller stort/mye rusk.
- Det hvite flagget inneholder bilder av «ikke-celler» (rusk, merker, atypisk fargeintensitet, klynger, artefakter osv.).
- Den hvite klassen inneholder ingen «gode» celler.

## Vanlige feil i klassifisereropplæring.

1. Under klassifisereropplæringen ble ikke alle bildene for hvite flagg flyttet til klassen for blått flagg (oppbevaring) før valg av spesifikke grønne og hvite celler.
  - Klassifisereren har for mange hvite flaggceller, mer enn dobbelt så mange som grønne.
  - Klassifisereren har gode celler i klassen for hvitt flagg.
2. Under klassifisereropplæringen ble bare gode celler vurdert og ingen hvite celler ble lagt til.
  - Klassifisereren har bare grønne flaggceller, eller mer enn dobbelt så mange som hvite.
3. Celler som ble valgt som «gode» for opplæring ble ikke merket av med bakgrunns-/ruskobjekter i «avbildningsboksen» som ble vist i miniatyrbildet. Alt innenfor grensen vil få målingene lagt til i celledataene og kan fortynne de faktiske interfase- eller metafaseverdiene fra opplæringsdataene.
  - Grønt flagg inneholder celler med ekstrem metafasevariasjon.
  - Grønt flagg inneholder bilder med store/mørke kjerner i avbildningsboksen.

**Merk:** Metafaseklassifiserere er mer følsomme for disse problemene enn interfaseklassifiserere.

## Opplæringsklassifiserere (tilføyde)

For å oppdatere eller opprette en ny klassifiserer, bruk skannede objektglass med celler som er typiske for prøvetypen.



- Utfør en skanning med klassifisereren **Alt**.
- Gå til **gjennomgangsskjermen** og åpne saken, last metafaselisten.
- **Velg alle** celler og merk dem som **uspesifikke (blått flagg)**, dette gjøres slik at du ikke legger til uegnede celler i klassifisereren utilsiktet.
- Velg 5–15 miniatyrbilder med ønsket kvalitet («gode» celler) og gi dem et **grønt flagg**. Ikke legg til flere enn dette fra ett objektglass, siden det kan påvirke klassifisereren på en kunstig måte.
- Velg et tilsvarende antall bilder som skal brukes som eksempler på «dårlige» celler i klassifisereren og merk disse med **hvitt flagg (uklassifisert)**. Dette skal være miniatyrbilder som ikke inneholder stort/mye rusk eller gode celler.
- Kontroller at kun cellene du har valgt er i hver av klassene grønnt flagg og hvitt flagg.
- Klikk på **Lær opp (tabellikon)**:
  - For å opprette en ny klassifiserer velger du **New (Ny)** og angir et navn for klassifiserer i feltet **Current selection** (Gjeldende utvalg).
  - For å *oppdatere* en gjeldende klassifiserer velger du **Existing** (Eksisterende) og **tilføyer** de nye cellene i en gjeldende klassifiserer (ikke **overskriv** med mindre du ønsker å erstatte de gamle klassifisererdataene helt, men beholde navnet).
- Klikk på **OK**. Klassifisereren opprettes og visningen går tilbake til miniatyrbildelisten for den lastede skannelisten.
- Gjenta til det er 100–200 grønne og hvite celler for rutinemessig klassifisererfunksjon for hver distinkte prøvetype.

## Redigere klassifiserere



En klassifiserer er en skanneliste fra flere saker, som inneholder alle bilder med grønne og hvite flagg som ble brukt til å opprette og oppdatere den. Det er mulig å gjennomgå og modifisere klassifisererinnholdet for å sørge for at korrekt antall bilder med korrekt kvalitet er brukt.

- Klikk på ikonet **Rediger**.
- Velg den ønskede klassifisereren, så blir knappene **Delete** (Slett) og **OK** aktive.
- (Hvis du velger **Delete** (Slett) vil du se en bekreftelsesmelding, denne vil slette klassifisereren og alle tilknyttede data for godt).

- Velg **OK** for å laste klassifisererens miniatyrbilder (hvis du har et aktivt objektglass åpent, vil du bli bedt om å lagre dette først før du kan se klassifisererbildene).
- Gå gjennom eller modifierer miniatyrbildene etter behov.
- Velg **Save** (Lagre) for å lukke miniatyrbildevisningen og lagre endringene.

Klassifisereren kan modifieres på samme måte som alle *skannelister*, celler kan klassifiseres på nytt for alle de 4 fargeklassene.

- Kun kategorier med grønne og hvite flagg brukes til klassifisererparametrene.
- Klassen blått flagg vil være tilgjengelig for fremtidig redigering, men kan ikke brukes i klassifisererfunksjon.
- Rødflaggede celler (bortsett fra de som er registrert som automatisk avbildet) vil slettes for godt etter lagring.

### *Sortering for Nearest Neighbour (Nærmeste nabo) ved automatisk avbildning*

Sortering av celler i en klassifiserer tillater bruk av rangeringsalternativet Nearest Neighbour (Nærmeste nabo) i objektglassmalen.

- Dette er ment å brukes med metafaseprøver, se **driftsinstruksjonene for CytoVision DX Karyotyper**.

## Automatisk avbildning

For informasjon om kamera- og avbildningskonfigurasjon, se seksjonen [FISH-avbildning \(manuell\)](#).

### Automatisk avbildning



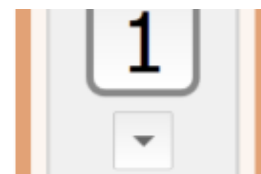
Automatisk avbildning starter etter 10x skanning og celleklassifisering.

- De klassifiserte cellene (grønt flagg) tilordnes skanneområdet og brukes deretter til å beregne hvilke celler som skal avbildes (modusene **Probe**) eller til å velge områdene (bildene) som inneholder cellene for skanning (modusene **ProbeAuto** (Automatisk probe) og **SpotCounting** (Punkttelling)).
- Programmet bytter automatisk til avbildningsskjermen, flytter til den første cellen eller det førte bildet og starter avbildningsprosessen, der et vises et fremdriftspanel for automatisk avbildning.
- Etter at et korrekt antall celler er avbildet vil systemet gå videre til neste objektglass.
- En **Pause**-knapp i fremdriftspanelet for automatisk avbildning kan brukes til å tillate manuell interaksjon med innstillingene for kamera eller filter (vanligvis ikke nødvendig).
- Hvis prosessen er satt på pause, kan knappen **Next** (Neste) (objektglass) brukes hvis ytterligere avbildning på gjeldende objektglass ikke er nødvendig, eller **Stop** (Stopp) (batch) som brukes til å hoppe over alle resterende objektglass.

### Alternativer for automatisk avbildning

Modus for automatisk avbildning av **probe** er koblet til alternativene i Tilpass maler (**Alternativer etter avbildning**). Typiske regler for automatisk avbildning er;

- Automatisk kamerakonfigurasjon
- Automatisk terskel
- Null terskel
- Kontraststrekking
- Lagre primitivt bilde



### Manuell utsatt avbildning

Ethvert objektglass som har en *skanneliste* kan automatisk avbildes ved å starte en «Manuell utsatt avbildning»:

- Åpne vinduet for skannekonfigurasjon og tilordne saksnavn for objektglasset.
- Klikk på pilen velg Utsatt avbildning.
- Seksjonen **Avbildning** vil vise hvilke objektglass i saken som har en *skanneliste* som kan velges for automatisk avbildning.
  - Velg den riktige listen for objektglasset i GSL.
- (Valgfritt) Klikk på **Set Offset** (Angi forskyvning) for å laste brettet og angi en manuell forskyvning for celler med lav forstørrelsesgrad som vil vises. Når angitt lukker du vinduet.
- Klikk på **Scan** (Skanning) for å starte den automatiske avbildningsprosessen som over.

**MERK:** Objektglass som har blitt fjernet fra hyllen etter skanning vil kreve en **Angi forskyvning** siden det er ekstremt usannsynlig at objektglasset vil være på samme posisjon i brettet som når det ble skannet.

- «Manuell utsatt avbildning» er ikke en prosedyre ment for flere objektglass samtidig eller for rutinemessig bruk av arbeidsflyt for fluorescerende prøver.

# Probeavbildning (cellebilder)



Den standard manuelle avbildningsskjermen inneholder verktøy for å samhandle med kamera, maskinvare for motorisert mikroskop og innstillinger for å vise og ta et probebilde i en cellemappe i navigatoren.

På et GSL-system er det nødvendig å bruke standard arbeidsflyt for manuell skanning for å bekrefte maskinvarerespons, konfigurere optimale programvareinnstillinger for bildekvalitet, lage en fluorokromliste og lagre «alternativer etter avbildning» (maler for avbildningstilpasning) som brukes i automatisk avbildning.

Avbildningsskjermen vil som standard vise sist valgte avbildningsmodus ved oppstart, kontroller eller endre dette med knappen **Capture Mode** (Avbildningsmodus).

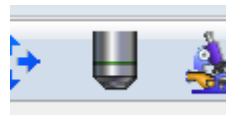


- **Probe** – for konfigurasjon, testing og manuelt bildeopptak av fluorescerende, farget objektglassmetafase, interfase- eller cellemateriale med én eller flere DNA-probekanaler.
- **Punkttelling** – for manuelt bildeopptak av fluorescerende, farget objektglassmetafase eller interfase- eller cellemateriale med én eller flere DNA-probekanaler. Bilder lagres som en bildeliste med automatisert bildebehandling ved hjelp av en punktanalyse.
- **M-FISH** – for manuell avbildning av fluorescerende, fargede metafaseceller i objektglass med flere DNA-probekanaler i en kromosomspesifikk kombinasjon for karyotypeanalyse.

CytoVision DX-systemer bruker et monokromt kamera for å ta bildene. For å opprette visningen av fargeprobebildet, må de individuelle fluorokromene på objektglasset avbildes, pseudofarges og legges oppå hverandre, noe som gir et flerkanals, sammensatt fargebilde.

- Hver separate fluorokromkanal må ha forhåndsinnstilte verdier for farge- og mikroskopfilter som angis og lagres gjennom panelet *Fluorokromvalg*.

## Objektivkontroll



Ved manuell avbildning bruker programmet mikroskopets objektivlinseposisjon fra panelet «Objektiver» for å oppdatere forstørrelsen.

Når programmet starter, vil linsen som er konfigurert i posisjon 1 bli benyttet som standard. På motoriserte mikroskopsystemer er dette 10x-objektivlinse

- Hvis mikroskopets LCD-pekeplate brukes til å endre objektivlinser, vil ikke programvaren registrere at forstørrelsen har endret seg og vil fortsatt bruke verdien for posisjon 1.
- For arbeid med manuell avbildning må du også/kun endre objektivet ved hjelp av panelet Objektiver før avbildning. Slik at denne verdien ikke blir feiltolket.
- En advarselmelding vises på skjermen hvis en uventet objektivforstørrelse fortsatt er angitt når avbildningsprosedyren startes.

## Probeavbildning: Prosedyreoversikt

- **Ny celle.** Oppretter en tom celle i **Navigator** som er klar til avbildning.
- **Direkte.** Viser kamerabildet i hovedvinduet.
  - flytter automatisk til mikroskopfilteret for det valgte fluorokromet
  - aktiverte den fluorescerende lukkeren for å lyse opp objektglasset
- **Avbildning.** Henter direktebildet og sender det til [terskelbehandling](#).

1. Velg sak og objektglass i Navigator, og klikk deretter på **New Cell** (Ny celle).
2. Opprett eller last inn en forhåndslagret **Fluorokromliste** som passer for prøven.
3. Finn et prøveområde på mikroskopobjektglasset og klikk på **Live** (Direkte).
4. Juster kameraoppsettet (automatisk konfigurasjon), kontroller bildevisning og **Avbildning**.
5. (Valgfritt) **Terskel** for å fjerne mørk bakgrunn rundt bildeobjekter.
6. Trykk på **Live** (Direkte) for neste fluorokromkanal på objektglasset.
7. Juster kameraoppsettet (automatisk konfigurasjon), kontroller bildevisning og **Avbildning**.
8. Gjenta for eventuelle gjenværende fluorokromkanaler.
9. Klikk på **New Cell** (Ny celle) for neste bilde.

Ikke ...

- ... flytt objektivlinsen for hånd uten å bruke panelet **Objektiver** for å bekrefte riktig linseforstørrelse for avbildningen.
- ... juster Eksponering manuelt – la systemet beregne det med **Automatisk** oppsett.
- ... flytt hyllen eller fokuset før du fullfører alle kanalene i fluorokromlisten.

## Avbildningskontroller

Direktebildet vil presenteres i hovedvinduet på avbildningsskjermen. Du finner avbildningskontrollenes arbeidsflytknapper under dette bildet

- Når Probeavbildning er valgt, åpnes panelet **Fluorokromvalg** for å velge eller opprette avbildningslister.
- For hvert fluorokrom gir panelet **Avbildningskonfigurasjon** tilgang til kontroller for kamera, filter og fluorescerende lampe.

### Ny celle og Direkte

Knappen **New Cell** (Ny celle) oppretter en ny mappe i saken bildet skal lagres i.

Når et bilde er funnet, viser knappen **Live** (Direkte) kameravisningen i hovedvinduet ved hjelp av det konfigurerte mikroskopfilteret og innstillingene for fluorescerende lampe/lukker.

- Ved behov flytter du mikroskophyllen for å plassere prøven midt i hovedvinduet. Sørg for at den i fokus.

### Automatisk oppsett av kamera

Rutinemessig avbildning skal gjøres ved hjelp av kameraets **automatiske konfigurasjon** for å optimalisere kameraeksponeringen og kontrastområdet som vises i bildet.

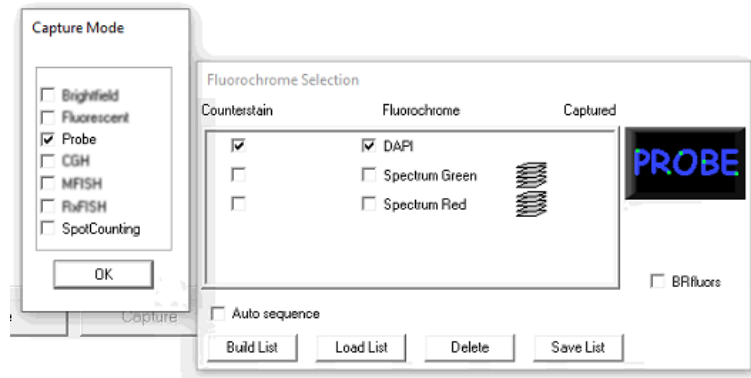
- De endelige bildeverdiene vil være basert på den fluorescerende intensiteten, bestemt av prøve kvalitet, filtertype og fluorescerende lyskilde.
- Rød- og blåfarge som vises på bildet indikerer fargemetning. For FISH-avbildning anbefales det å ha litt rød metning i prøvematerialet (kontrastfarge eller signaler) og mørk bakgrunn, eller bare ha en liten mengde blå metning for å forbedre kontrasten.
- Mengden rød/blå metning i direktebildet endres ved hjelp av panelet **Automatiske innstillinger** i avbildningskonfigurasjon.

Dette kan aktiveres manuelt fra avmerkingsboksen ved siden av kontrastlinjen, eller via funksjonen «Tilpass» **Automatisk kamerakonfigurasjon**, som starter kamerajusteringen så snart man trykker på knappen **Live** (Direkte).

- Alle verdier fra **Automatisk oppsett** vil aktiveres øyeblikkelig.
- **Automatisk konfigurasjon** vil mislykkes hvis det fluorescerende lyset er av eller satt til en veldig lav intensitet. Dette bør sjekkes.
- **Automatisk konfigurasjon** kan mislykkes hvis det fluorescerende signalet for prøven har lav intensitet eller kontrast.

## Avbildningslister

Modusen Probeavbildning åpner et panel for **Fluorokromvalg**, som brukes i konfigurasjon og avbildning.

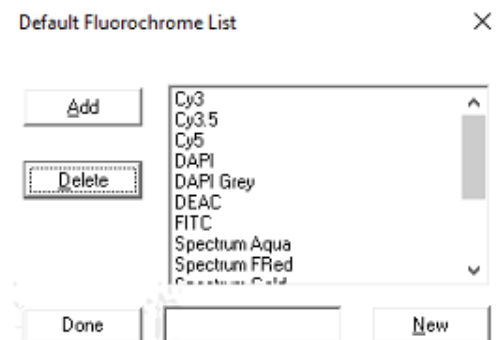


Her kan du bygge en liste over fluorokromene på objektglasset og velge kontrastfargen (f.eks. DAPI) som kreves av programmet under avbildningsprosessen og for senere analysearbeid.

Hvis du vil legge til nye fluorokromer i avbildningslisten, velger du kommandoen **Bygg liste**. Det vises en menyboks som inneholder en liste over tilgjengelige, forhåndsprogrammerte fluorokromer.

Klikk på de du vil ha for avbildningslisten, og velg «**Add**» (Legg til) for hver av dem.

- Bygg listen i den rekkefølgen du vil avbilde cellen, med kontrastfargen først.
- Uthev boksen for riktig **kontrastfarge**.
- For hvert fluorokromnavn sjekker og endrer du innstillingene etter behov via panelet *Konfigurasjon av avbildning og fluorokromer*.
- Bruk **Save List** (Lagre liste) for å opprette en *fluorokromliste* som kan kobles til en skannemal for avbildningsmoduser for **Probe** og **ProbeAuto** (Automatisk probe).



Merk: Hvis du vil beholde justerte konfigurasjonsverdier, må du lagre listen etter eventuelle justeringer.

## Konfigurasjon av avbildning og fluorokromer

Avbildningskonfigurasjon åpner et vindu for kamera- og maskinvarekontroll. Klikk på boksen **Avansert** for å få tilgang til posisjoner for dikroisk filter for avanserte kamerakontroller for innstillingsmodifikasjon.



- **Color** (Farge): Angir overleggsfargen for fluorokromet som brukes i avbildningen.
- **Dichroic** (Dikroisk): Konfigurerer mikroskopfilteret som brukes under avbildning av fluorokromet.



Begge disse må angis og lagres ved hjelp av alternativet «Lagre som standard» før enhver manuell eller automatisk operasjon for automatisk avbildning for hvert fluorokrom som skal brukes i en avbildningsliste eller punktanalyse.

### Glidebrytere for kamera

Forsterkning, forskyvning og eksponering angis automatisk av **Automatisk** avbildning eller kan vises og endres manuelt ved hjelp av de 3 glidebryterne.



Manuell justering av glidebrytere (via vinduet **Avbildningskonfigurasjon**) er ikke påkrevd med mindre **Automatisk konfigurasjon** mislykkes eller hvis bildet inneholder overskytende bakgrunnsobjekter som kan skifte kontrasten bort fra celler eller signaler.

### Lysstyrke (kameraforsterkning).

- Dersom mer (eller mindre) rød metning er påkrevd på ett bilde, kan glidebryteren for lysstyrke justeres manuelt.
- Eventuelle røde områder i direktevisningen vil bli lagret som hvite i bildet som er tatt, før det blir lagt til pseudofarger.
- Rød metning på probesignaler kan resultere i en forbedret, mer «intens» fargevisning, som er nyttig for visning av visuelle signaler.
- Overdreven metning vil resultere i tap av relativ eller kvantitativ informasjon hvis det er nyttig for senere analyse (for eksempel DAPI-banding i metafasekromosomer).

### Svart (kameraforskyvning).

- Dersom mer (eller mindre) blå metning er påkrevd på ett bilde, kan glidebryteren for svartfarge justeres manuelt.
- Eventuelle blå områder i direktevisningen vil bli lagret som svarte i bildet som er tatt.
- Blå metning i den mørke bildebakgrunnen vil gi en forbedret endelig bildekontrast, men bør ikke strekke seg over hele bildet.

### Eksponering (kameraintegrering).

- Manuell justering av glidebryteren for eksponering for rutinemessig avbildning er ikke å anbefale, **automatisk konfigurasjon** skal alltid brukes til å finne beste eksponering.
- For fluorescerende prøver avhenger maksimal eksponering av intensiteten, men skal alltid være minst 0,005 (5 ms).

## Automatiske innstillinger

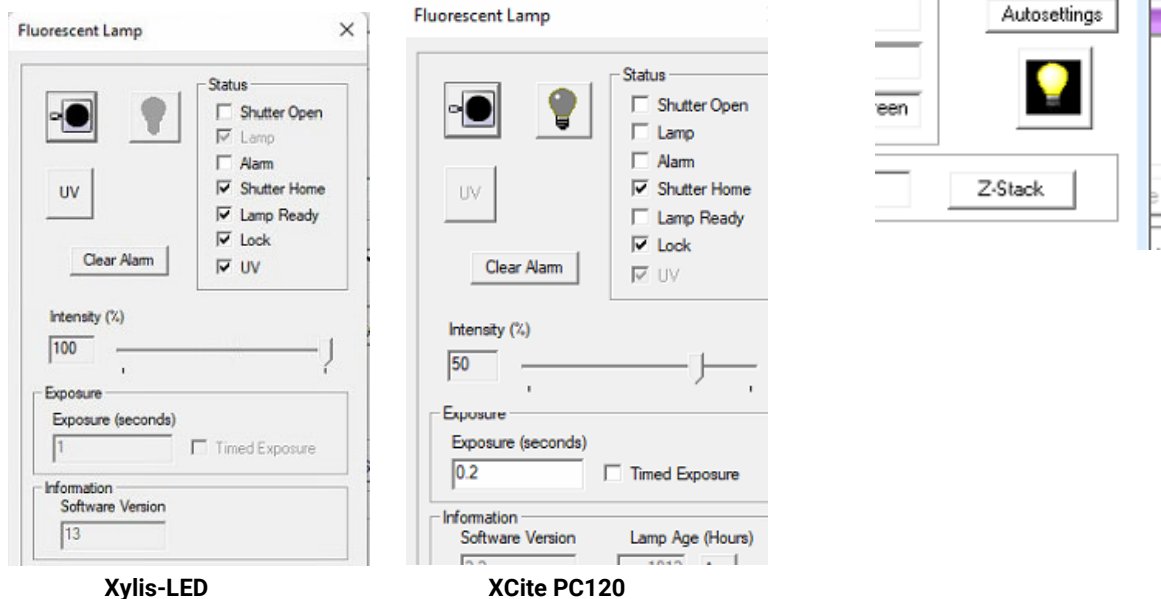
**Automatiske innstillinger** modifierer kameraets resultater for **automatisk konfigurasjon** for å overdrive mengden blå eller rød metning i det endelige direktebildet. Individuelle fluorokromkanaler kan justeres separat etter behov.

For å forbedre intensitetsvisningen av FISH-bilder er foreslåtte verdier følgende:

- Juster maksverdi (rød) til (+) **3–5**, noe som øker signalintensiteten.
- Juster minimumsverdi (blå) til (+) **0,5**, noe som gjør bakgrunnsstøyen mørkere.

## Konfigurasjon av fluorescerende lampe

Kontrollpanelet for den fluorescerende Xylis/X-Cite-lampen kan åpnes ved å klikke på lampeikonet i panelet Avbildningskonfigurasjon («Avansert»-bryteren må være aktiv for å se dette).



Panelet for den fluorescerende lampen kan brukes for å kontrollere lampens funksjon under en manuell avbildningsprosedyre.

- Lukkerknappen på dette panelet fungerer som en bryter for å åpne og lukke lukkeren.
- Eksponeringskontrollene viser lampeintensiteten og eksponeringstidene.  
– brukes vanligvis med 100 % intensitet for arbeid med rutinemessig FISH-skanning og -avbildning
- Sjekkboksene Status viser hvilken tilstand de forskjellige delene av lampen er i.

Systemer som bruker en XCite PC 120-enhet, som også har lampekontroll.

- Lampeknappen slår lampen på eller av.
- Ikonet er gult når lampen er på og klar til bruk.
- Når ikonet er grått, er lampen av og i «standby» (dette vil vises som en «lyspære» på LCD-panelet foran på lampekontrolleren). Den aktiveres automatisk under en skanning, men må slås på manuelt for bruk på avbildningsskjermen.

Hvis du kjører en uovervåket batch med FISH-objektglasskanning og automatisk avbildning, kan du stille inn programmet til å slå av X-Cite-lampen automatisk på slutten av batchen.

- Gå til skjermen **Scan** (Skanning) og velg Verktøy-menyen.

- Informasjonen vil vise hva systemet for øyeblikket er satt til:  
«La den fluorescerende lampen stå på etter batch» eller «Slå av den fluorescerende lampen etter batch»
- Hvis du klikker på teksten, endres den til den alternative innstillingen (som da vises).

## Z-stabel

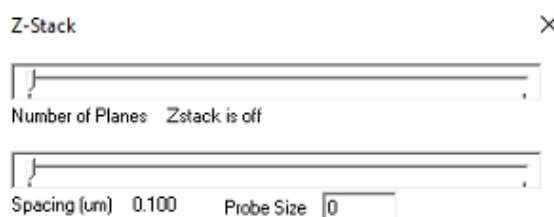
**Z-stabel** brukes til å avbilde probesignaler i forskjellige fokalplan.

Under avbildning brukes fokuspunktet for kontrastfarge (DAPI) som sentrum av brennvidden for hver fluorokromavbildning, der fokusmotoren flytter avstanden mellom hver stabel.

- Det endelige bildet lagres med stablene slått sammen som et enkelt lag med **maksimum projeksjon**.
- Det er ikke mulig å se gjennom de enkelte stabelbildene etter at de er tatt.  
Hvis dette er nødvendig, må FISH-bildene tas i en bildeliste ved hjelp av manuell punkttelling eller *probeavbildning* med bilderamme for visning ved hjelp av separat bildeanalyseprogramvare som er kompatibel med «bildeliste»-formatet.

For å konfigurere et fluorokrom for Z-stabelavbildning, klikker du på **Z-stabel** i dialogboksen *Konfigurasjon av avbildning og fluorokromer*.

- Dialogboksen for Z-stabel åpnes.
- Velg Antall plan og **Avstand mellom** dem. **Avstanden** er gitt i mikrometer med trinn på 0,1 µm.
- For å fjerne Z-stabelen, setter du **Antall plan** til 0 (**Z-stabel er av**).
- Klikk på **Apply** (Bruk) for å fullføre.



**Merk:** For avbildning med manuell punkttelling opprettes Z-stabelinnstillingene fra de separat konfigurerte punktanalyseinnstillingene.

## Tilpass avbildning



Når den grunnleggende avbildningsprosessen er forstått, bruker du alternativene for **Tilpass** for å endre mengden brukerinngrep som er påkrevd.

*Rutinemessige avbildningsalternativer for probe:*

**Anbefalte innstillinger:**

- **Automatisk konfigurasjon av kamera** – Starter kameraets **automatiske konfigurasjon** når direkteknappen velges.
- **Automatisk terskel** – Hopper over manuell terskelbehandling (fjerning av bakgrunn), og bruker innstillingene for **Null** terskel eller **Forutsi terskel**.  
– Dette må være aktivert for lagrede maler som brukes i automatisk avbildning av **GSL-probe** og brukes **sammen med Lagre råbilde**.
- **Null terskel** – Fjerner ikke bildebakgrunn rundt direktebilledataene, og oppretter et enkelt blokkbilde. Dette brukes automatisk hvis **Automatisk terskel** brukes og er optimalt for rask avbildning av interfase-FISH.
- **Probebakgrunnskutt** – forbedrer visningen av interfase-FISH-signaler mot bakgrunnen.

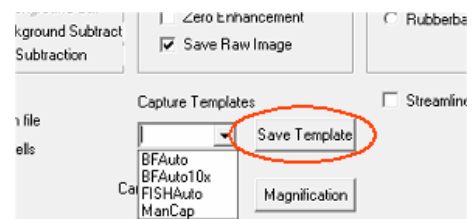
- **Kontraststrekking** – Normaliserer det endelige lagrede bildet for å forbedre visningen. Dette skal alltid brukes for bilder der terskelbehandling er brukt, for å forhindre at kantene på de resterende objektene ser kunstig intense ut.
- **Lagre råbilde** – Oppretter en separat bildefil for hver fluorescerende kanal som er avbildet. Råbildet har ingen bakgrunnsfjerning eller forbedringer og kan «tas på nytt» ved å bruke terskelikonet på hovedverktøylinjen.
  - Slik ny terskelbehandling kan være nyttig for metafase- av interfasebilder der du ønsker å skille ut individuelle objekter for spesifikk bildeforbedring eller kopiering til en fleksibel skjerm, eller for å lage en probekaryotype.
  - Lagre råbilde anbefales for **probeavbildning**, spesielt hvis **automatisk terskel** brukes.
  - Tilgang til ubehandlede bildedata kan også være et lokalt laboratoriekrav.

### Valgfrie innstillinger:

- **Automatisk sekvens** – Etter opptak av kontrastfargebildet (DAPI) fortsetter avbildningen uten at du må trykke på «Live» (Direkte) eller «Capture» (Avbildning) for de gjenværende probekanalene.
  - **Forutsi terskel** – Anslår en egnet terskel for å slette bakgrunn rundt objekter i bildet. Dette brukes automatisk hvis **Automatisk terskel** brukes og er optimalt for metafasekromosomer der det kreves probekaryotyping.
  - **Registrer bilder automatisk** – Tar probebildene med en justerbar X/Y-forskyvning sammenlignet med DAPI-bildet (kontrastfarge), for å kompensere for eventuelle optiske forskyvninger eller filterforskyvninger.
    - Forventes ikke å bli brukt med mindre det er et optisk problem med en filterkube eller justering av mikroskoplensbane.
  - **Forskyvning av automatisk fokusering** – Når det er slått på, blir fokusbevegelser du gjør med fokusglidebryteren under en manuell avbildning registrert i forhold til kontrastfargen og automatisk brukt på påfølgende avbildning. Forskyvninger lagres i fluorokromlisten
- Merk:** Brukes ikke av automatisk avbildning av punkttelling som en del av en skannemal.

De beste innstillingene å bruke vil være påvirket av typen prøve. Bruk knappen **Save Template** (Lagre mal) for å tilordne rutinemessige navn til innstillinger:

- På GSL-skannesystemer blir disse brukt som **alternativer etter avbildning** under automatisk avbildning av prober



### Forstørrelse

**Forstørrelse**-innstillinger kreves for å skape en nøyaktig bildeskaleringsfaktor under avbildning.

- **Avbildningsobjektivet** bruker mikroskopets objektivposisjon (for FISH-avbildning forventes det å være 63x).
- Verdien **C-montering** skal angis for C-monteringens kobling på kameraet (1x som standard).

I kombinasjon beregner disse 2 verdiene en objektskalering og skjermoppløsning, brukt til å beregne objektstørrelser brukt i FISH-metafasekaryotyping og *bildeliste*-signalstørrelser.

Manuell avbildning bruker mikroskopets objektivlinseposisjon som er angitt i panelet **Objektiver** for å oppdatere forstørrelsen.



- Dette konfigureres i programmet **Mikroskopkalibrering** av modulen «Objektiver».

- Mikroskoper med motorisert objektivrevolver må konfigureres for alle fysiske posisjoner som er tilgjengelige for mikroskopet. (Standard på GSL-systemer).

Feil verdier vil forårsake feil ved karyogramklassifisering eller signalstørrelsesvisning.

Hvis manuell avbildning forsøkes ved hjelp av et objektiv med lav forstørrelse, vil en advarselmelding vises når knappen **Live** (Direkte) trykkes – velg «Fortsett» og bytt til riktig objektiv ved hjelp av programvarekontrollene før du trykker på **Capture** (Avbildning).

Dette kan være forårsaket av å flytte mikroskopets objektivlinse manuelt (eller av LCD-berøringspanelet) uten å bruke programkontrollen **Objektiver** for å angi riktig forstørrelse.

- Når programmet starter, vil linsen som er konfigurert i posisjon 1 bli benyttet som standard.
- Hvis mikroskopets LCD-pekeplate brukes til å endre objektivlinser, vil ikke programvaren registrere at forstørrelsen har endret seg og vil fortsatt bruke verdien for posisjon 1.
- For arbeid med manuell avbildning må du også/kun endre objektivet ved hjelp av panelet Objektiver før avbildning. Slik at denne verdien ikke blir feiltolket.

**Merk:** Riktig objektivposisjon justeres automatisk som en del av automatisk GSL-avbildning, og objektskaleringen beregnes ved hjelp av komponenten «Bildeskaleringer» i **spatial kalibrering** for det valgte objektivet.

## Terskelbehandling

Terskelbehandling er valgfritt for probeavbildning (og er deaktivert i punktavbildning og M-FISH).

- Ny terskelbehandling kan utføres på råbilder etter opptak for å oppdatere probebildet.
- Dersom **Automatisk terskel** ikke er aktiv i **Tilpass**-innstillingene, vil Terskel-vinduet vises under en manuell **Avbildning**.

Probebilder i terskelbehandling ligner på terskelbehandling for helfeltmetafaser. Forskjellen er at når du terskelbehandler prober, vil ethvert område som ikke dekkes av den blå masken ha fargen valgt for fluorokromet som er brukt.

Løse terskelverdier kan gi store uregelmessige signaler. Bakgrunnsstøy og rusk kan også gjøre terskelbehandling vanskelig, derfor finnes det flere verktøy for terskelbehandling i probeavbildning.

- **Kontrastfargemaske** eliminerer alle deler av bildet som ikke inneholder kontrastfarge. Dette er et godt verktøy å bruke hvis du har mye høy bakgrunnsstøy.
- **Med Interesseområde** kan du definere ett eller flere områder for terskelbehandling. Dette er et godt verktøy å bruke for å isolere små signaler fra artefakter eller rusk.

**Merk:** Forbedret bildetaking forventes ikke å bli brukt i manuelt opptak av probebilder, bortsett fra for metafasebilder der DAPI-banding er nyttig for bildetolkning eller karyotyping.

- For detaljer om standard alternativer for manuell terskelbehandling, se håndboken med **driftsinstruksjoner for Karyotyper** og gjennomgå programhjelpen.

## Automatisk terskelbehandling

Dersom **Automatisk terskel** er aktiv i Tilpass-innstillingene, vil ikke Terskel-vinduet vises når direktebildet avbildes. Dette er den forventede operasjonen på et GSL-skannesystem.

- Systemet bruker verdien **Forutsi terskel** eller **Null terskel** for fjerning av bakgrunn. Dette fungerer vanligvis bra for fluorescerende bilder med lav objektglassbakgrunn.
- Forbedringer brukes ved hjelp av innstillinger i den lagrede avbildningsmalen, eller du kan slå av Avbildningsforbedringer ved å bruke alternativet **Null forbedringer** i Tilpass avbildning.
- Metafasebildet vil bli lagret og vist i Navigator.
- Et lagret råbilde kan brukes til manuell ny terskelbehandling om nødvendig.

## Ny terskelbehandling av råbilder



Råbilder kan behandles på nytt for å oppdatere probebildet hvis den opprinnelige terskelen ikke var optimal.

Dette kan være nyttig hvis **null terskel** ble brukt for den opprinnelige avbildningen for senere å lage objekter for forbedring, karyotyping eller kopiering til en fleksibel skjerm.

- Last det primitive bildet i hovedvinduet på avbildningsskjermen.
- Klikk på ikonet **Terskel** midt på hovedverktøylinjen.
- Utfør manuell terskelbehandling av bildet. Når du er ferdig, fjernes bildet fra hovedvinduet.

# Probeavbildning (bildeliste)

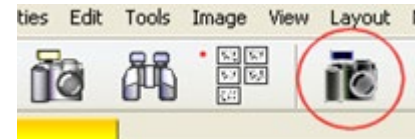


**Probeavbildning** for bilderamme er et enkelt bildeopptaksalternativ designet for bruk ved manuell avbildning med motorisert filterdreieskive og fokuskontroll for mikroskopet.

Det er en interaktiv prosedyre uten innstillinger eller konfigurasjonsfiler som brukes av et skannesystem som en del av automatisk avbildning.

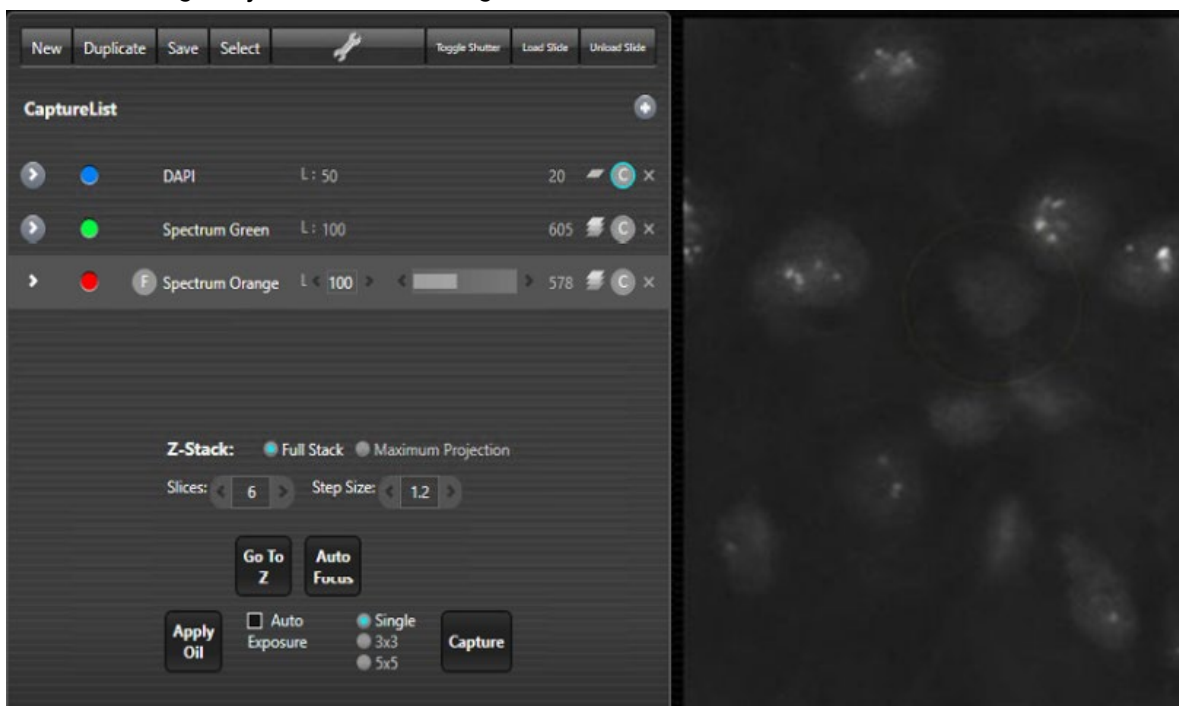
Manuell avbildning av *bildeliste* kan brukes til raskt å avbilde et manuelt plassert område for et objektglass for å hente et lite antall *bildeliste*-bilder.

Åpne en sak, og klikk på ikonet Manuell probeavbildning på hovedverktøylinjen i programmets oppstartsskjerm.



Skjermlayouten for **Probeavbildning** består av et vindu for direktebilde på høyre side.

- Bildet er alltid «Live» (Direkte) ved bruk av kameraeksponeringen til det valgte fluorokromnavnet i listen.
- Kontrollene til venstre tillater interaksjon med mikroskopet (lukker og fokus) og konfigurasjon av en avbildningsliste.



Når du bruker probeavbildning, vil du se objektglassene for saken vist øverst på skjermen.

- Du kan legge til objektglass ved å bruke knappen New Slide (Nytt objektglass) øverst til høyre i vinduet.
- Legg til kanaler, konfigurer filter, farge, Z-stabelinnstillinger og lagre avbildningslister.
- Ta bilder med manuell eller automatisk justering av kameraets eksponering.
- Ta et enkelt bilde eller større rektangulære rutenett med 9 eller 25 bilder (GSL-hyllebevegelse).
- Flere bilder som er tatt er knyttet til ett enkelt objektglass.

## Objektivkontroll

Når programmet starter, vil linsen som er konfigurert i posisjon 1 bli benyttet som standard. På motoriserte mikroskopsystemer er dette 10x-objektivlinser.

- Hvis mikroskopets LCD-pekeplate brukes til å endre objektivlinser, vil ikke programvaren registrere at forstørrelsen har endret seg og vil fortsatt bruke verdien for posisjon 1.
- For arbeid med manuell avbildning må du kun endre objektivlinser via programvaregrensesnittet før avbildning. Slik at denne verdien ikke blir feiltolket.

Manuell avbildning av bildeliste har et annet sett med maskinvarekontroller enn den standard Avbildningsskjermen, som beskrevet nedenfor.

- Tastaturet brukes til å bytte mellom mikroskopobjektivlinser ved hjelp av funksjonstastene (F).
- For å se (eller skjule) alle tilgjengelige maskinvaresnarveier og trinnstørrelsesinnstillinger, trykk på «F10».

## Avbildning av bildeliste: Prosedyreoversikt

- **Gjennomgang av direkte bilde.** Kamerabildet er «alltid på» i hovedvisningsvinduet.  
– Kanaler, innstillinger og avbildningsalternativer kan gjennomgås eller endres før avbildning.
- **Avbildning.** Starter en fullstendig automatisk avbildning enkeltceller for alle kanalene ved hjelp av hver av innstillingene for avbildningslisten. Henter direktebildene og lagrer dem i bildelisten for objektglass i **Navigator**.

1. Velg sak og objektglass i Navigator, og klikk deretter på **Probe Capture** (Probeavbildning).
2. Opprett en **Ny** eller **Velg** en forhåndsagret avbildningsliste som passer for prøven.
3. Klikk på kontrastfargekanalen i avbildningslisten (aktivering av fluorescerende filter/lukker).
4. Finn et prøveområde på mikroskopobjektglasset for plassering og fokusering i visningsvinduet.
5. Klikk på **Capture** (Avbildning) for å starte sekvensen for automatisk avbildning.  
– Hvis «Automatisk eksponering» er på, utføres kameraets automatiske konfigurering for hver kanal.  
– Hvis «Automatisk eksponering» er av, avbildes kanalene ved hjelp av de faste eksponeringsverdiene fra avbildningslisten.
6. En status vises for hver kanal som viser eventuelle eksponerings- og Z-stabeloperasjoner.
7. Et miniatyrbilde av fargebildet vises under avbildningspanelet.
8. Gjenta prosessen for ytterligere bilder.

Ikke ...

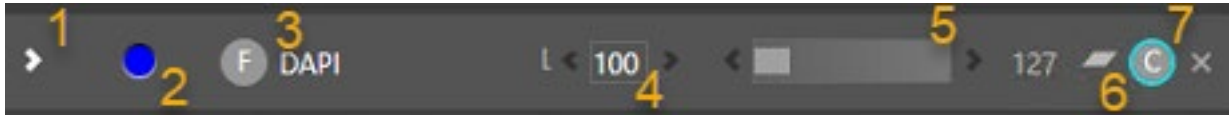
- ... flytt mellom objektivlinser med lav og høy forstørrelse for hånd. Bruk tastaturkontrollene (F1–F7) for å endre objektiver for å bekrefte riktig avbildningslinseforstørrelse
- ... flytt hyllen eller fokuset manuelt under avbildning.

## Alternativer for avbildningskonfigurasjon

Du må legge til minst én kanal på skjermen før du får tilgang til avbildningskontrollene.

### Legge til kanaler

«+»-knappen legger til en kanal til i den gjeldende avbildningslisten, samlingen av fluorokromkanaler som for øyeblikket skal avbildes.



1. Velg kanal ( > )
2. Konfigurer kanalfarge
3. Konfigurer kanalfilter ( F )
4. Intensitet for fluorescerende lampe ( L: Xylis/XCite)
5. Kameraeksponering (manuell justering)
6. Z-stabelindikator (av/på)
7. Kontrastfargeindikator ( C )



### Konfigurere en kanal

#### (2) Kanalvisningsfarge

Hver avbildet kanal har en visningsfarge, som vises til venstre for kanallinjen. Dette er fargen som skal brukes for kanalen når du ser på hele bildet.



Fargen kan endres ved å klikke på den fargede sirkelen som åpner et rutenettpanel for **basisfarger** og muligheten til å definere hvilken som helst visningsfarge som kreves.

#### (3) Mikroskopfilter

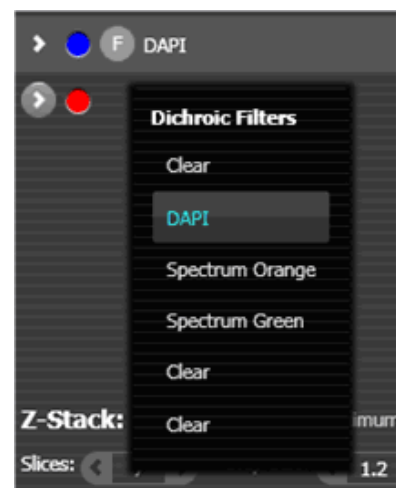
Når en kanal er valgt, vises en filterknapp, representert med en «F», rett før kanalnavnet. Ved å klikke på denne knappen vises filtrene som er konfigurert for mikroskopet.



Du kan bare bruke ett konfigurert filter eller en kombinasjon for hver fluorokromkanal. Når du har valgt et filter, fjernes det fra neste valgliste.

**Merk:** Kanalens navn er hentet fra filterhjulene som er konfigurert på systemet.

- Hvis du bruker to filtre, for eksempel et dikroisk filter og et eksiteringsfilter, vil begge alternativene bli presentert.
- Hvis de tilgjengelige filtrene virker feil, sjekk konfigurasjonen i programmet **Mikroskopkalibrering**.



#### (4) Lampeintensitet

Systemer med en fluorescerende Xylis- eller X-Cite-lampe vil presentere en intensitetsjustering for å endre lampeintensiteten som brukes for hver kanal under avbildning.

- For rutinemessig avbildning av probekanal vil 100 % være vanlig.
- Hvis kontrastfargen er veldig lys, kan bruk av lavere intensitet gi bedre kontrastvisning.
- En lavere intensitet kan også redusere rask fotobleking hvis kontrastfargen eller antifalmingen på objektglasset ikke er stabil.

#### (5) Kameraeksponering

Hver kanal har sin egen eksponeringsverdi (i millisekunder) som vises til høyre for kanalnavnet og styrer hvor stor grad av kameraintegrasjon som brukes.

- Når en kanal er valgt, er en eksponeringsglidebryter synlig og kan justeres ved å dra med venstre museknapp inne i linjen eller ved å klikke på pilene på hver side.



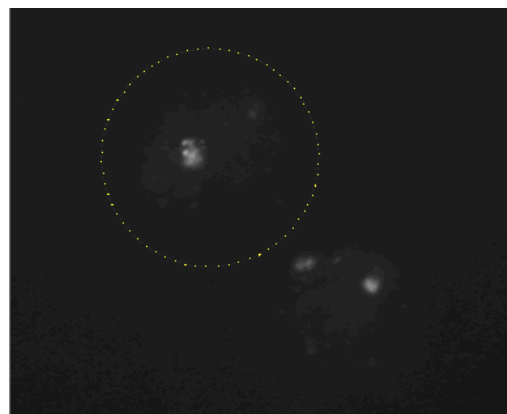
Hvis den fluorescerende lukkeren er åpen, vises direktebildet på skjermen og effekten av eksponeringsjusteringen kan sees direkte.

Alternativt kan du klikke på direktebildet direkte med musen. Dette angir en «målsirkel» på bildet, og kameraets automatisk eksponering beregnes kun på dette området.

- Dette vises som en stiplet sirkel på bildet.

Dette lar deg målrette den automatiske konfigurasjonen ved å bruke et område av bildet som inneholder interessant materiale, og unngå områder som kan inneholde lyse artefakter som vil forstyrre eksponeringsberegningene.

- **Venstreklikk** på bildet igjen i et annet område for å bruke en annen sirkel for automatisk konfigurasjon.
- **Høyreklikk** på bildet for å avbryte en automatisk konfigurasjon eller for å velge bort en målsirkel.

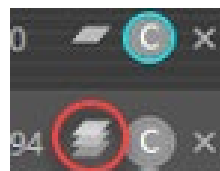


#### (6) Z-stabelavbildning

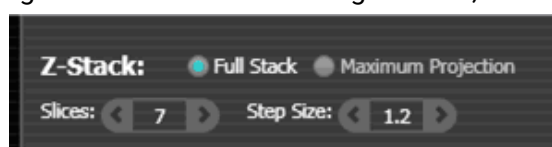
Z-stabel er opptak av flere bilder av samme kanal i forskjellige fokalplan for å identifisere 3-dimensjonale signalforskjeller.

Hvis du klikker på stabelgrafikken til høyre for eksponeringsinnstillingen, veksler du mellom ett enkelt bilde (Z-stabel av) og flere stabler med bilder (Z-stabel på).

- Det er ikke vanlig å avbilde en stabel for kontrastfargebildet



Når Z-stabel er aktivert for en kanal, vil flere alternativer vises over knappen Capture (Avbildning) for å angi antall **skiver** i stabelen og avstand, **trinnstørrelse**, mellom hver stabel.



Du kan velge mellom å lagre kun **full stabel** eller **maksimum projeksjon**:

- **Maksimum projeksjon** vil avbilde en stabel med bilder for kun å lage et sammensatt bilde – bildet med *maksimum projeksjon*.  
– De enkelte stabelbildene lagres ikke i den endelige bilderammen.
- **Full stabel** vil avbilde og lagre de individuelle avbildningene i Z-stabelen sammen med sammenslått *maksimum projeksjon*.

## (7) Kontrastfarge

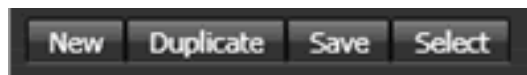


En kanal i listen må velges som kontrastfarge før avbildning kan startes.

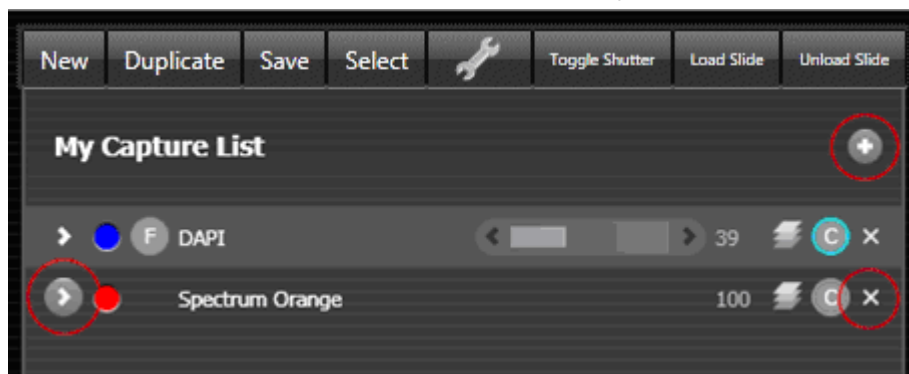
- Dette vil vanligvis være DAPI-kanalen.
- Kontrastfargekanalen er et referansepunkt og fokussenter for Z-stabelavbildning (med mindre fokuset justeres manuelt på en av probekanalene før avbildning).

## Arbeide med avbildningslister

En samling kanaler er en avbildningsliste. Kontrollene for avbildningslister vises øverst i avbildningspanelet: Ny, duplikat, lagre og velg.



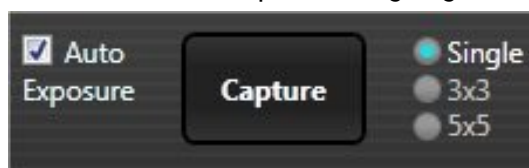
- **Ny** vil gi deg en ny avbildningsliste som kun inneholder en enkelt kanal. Dette vil erstatte alle kanaler som vises for øyeblikket.
- **Duplikat** lager en kopi av en gjeldende liste.
- **Lagre** lagrer avbildningslisten som for øyeblikket vises i **Velg**-vinduet.
- Tidligere lagrede avbildningslister kan hentes ved hjelp av **Velg**.



- For å velge en annen kanal, trykk på «>»-knappen til venstre for kanalnavnet. Hvis du velger en kanal, endres direktebildet for å gjenspeile innstillingene for gjeldende kanal.
- Kanaler kan fjernes med «x»-knappen, som vises på slutten av hver kanallinje og legges til ved hjelp av +.

## Ta bilder

Når avbildningslisten er opprettet og hver kanal har konfigurert egnede innstillinger for filter, farge, kontrastfarge og Z-stabel, kan et bilde tas basert på en beregning av kameraeksponering.



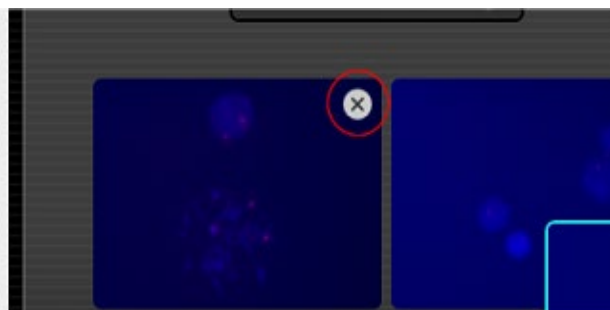
- Hvis **automatisk eksponering** er aktivert, vil valg av knappen **Capture** (Avbildning) justere kameraeksponeringen automatisk for hver kanal ved hjelp av automatisk konfigurering basert på bildeintensiteten.

- Hvis du har plassert en målsirkel for automatisk konfigurasjon, vil hver kanal bare bruke det bildeområdet for å beregne optimale eksponeringsverdier.
- Hvis du ikke har plassert en målsirkel, vil automatisk konfigurasjon være basert på hele bildet.
- Hvis **automatisk eksponering** er deaktivert, vil valg av knappen **Capture** (Avbildning) avbilde hver fluorokromkanal i avbildningslisten i rekkefølge ved hjelp av eksponeringsverdiene som for øyeblikket finnes i avbildningslisten.
  - Du bør bekrefte de nødvendige kameraeksponeringsverdiene før du trykker på **Capture** (Avbildning).

Når den er startet, er avbildningsprosessen kontinuerlig for alle kanaler.

- Det er ingen pause når den går gjennom fluorokromkanalene.
- Visningen av direktebilder er ikke oppdatert under avbildning.

Etter avbildning vises hvert bilde under avbildningskontrollene.



- Hvis du holder musen over et miniatyrbilde, vises en forstørret versjon av bildet.
- Det lille krysset i øvre høyre hjørne kan brukes til å slette bildet om nødvendig.

**Merk:** Bare bildelistebilder som er tatt manuelt på dette skjermbildet, kan slettes på denne måten. Bilder som er tatt med skannesystemets avbildningsmoduser **ProbeAuto** (Automatisk probe) eller **Spot Counting** (Punkttelling), kan ikke slettes.

## Avslutte avbildning

Når du er ferdig med avbildningen, gå du ut av skjermen ved å bruke krysset «lukk vindu» øverst til høyre på skjermen. Det tar deg tilbake til oppstartsskjermen for saksadministrasjonsfunksjoner.

# Visning av probebilder

CytoVision DX inkluderer ulike bildevisnings- og utgangsverktøy basert på standard probe og M-FISH-celle, som kan lastes inn i oppstartsskjermen for bildevisning og generell farge, kontrastjustering, karyotyping eller beskrivelse, eksport eller utskrift.

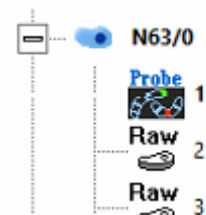
Bilderammedata kan ikke vises i CytoVision DX-programmet.

- det er viktig at den mest hensiktsmessige avbildningsmodusen brukes for visningskravene.
- se [tabellen for avbildning og analyses](#) for mer informasjon.

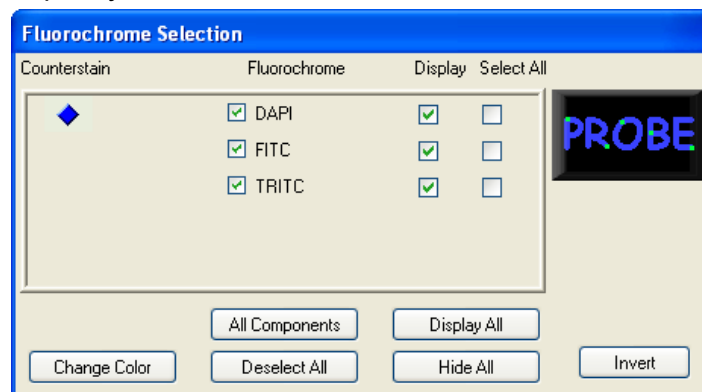
## Skjermvisning

All bildevisning og lasting gjøres gjennom **oppstartsskjermen**.

- Last inn et bilde ved å dobbeltklikke på et «Probe»-ikon i navigatoren, og klikk deretter på hovedvisningsvinduet.



Når et probebilde lastes inn i hovedanalysevinduet, vises **boksen for panelet Fluorokromvalg** nederst på skjermen.



Denne boksen viser deg hvilke fluorokromer som ble brukt da bildet ble tatt, og lar deg velge hvilke komponenter i det sammenslåtte probebildet du vil vise.

- Hvert probebilde inneholder et overlegg med 2 eller flere *fluorokrom*-kanaler.
- Hver kanal kan inneholde separate objekter som må velges individuelt før justeringer kan utføres.
- Slå på flere «Fluorokrom»-sjekkbokser for å tillate valg eller flere enn én kanal om gangen.
- Noen analysefunksjoner, for eksempel **Registrer** eller **Endre farge**, krever at bare én komponent velges.

Det er også en **Visning**-sjekkboks til høyre for *Fluorokrom*.

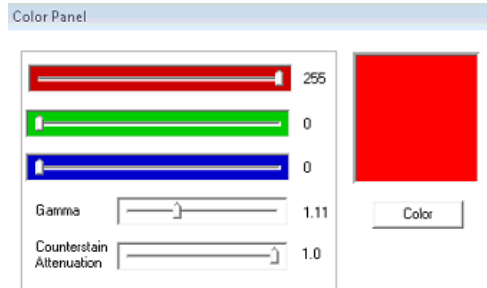
- Når den er slått på, vil alle objektene for den kanalen vises.
- Når den er slått av, vil alle objektene i den kanalen være skjult.

Kombinasjonene av alternativene «Fluorokrom» eller «Visning» er nyttige for å bestemme hvilke objekter som er tilgjengelige for valg for forbedringer, fargeendring, bilderegistreringer og opprettelse av sammensatte skjermer.

## Endre farge

Dette fungerer på samme måte som fargeinnstillingen i Avbildningskonfigurasjon, ved å oppdatere fargen på komponentene i det enkelt lagrede bildet. Dette kan være nyttig for å forbedre den visuelle visningen av overleggssignalene og for å hjelpe til med utskrift.

- Klikk på kommandoknappen **Change Color** (Endre farge) for å åpne fargepanelet, kontrastfargebildet velges automatisk.
- Juster de 3 glidebryterne for å endre fargen.
- Alternativt kan du klikke på knappen **Color** (Farge) for å velge fra et fargekart.
- klikk på et annet fluorokrom for å endre fargen.
- Kommandoene **Gamma** og **Kontrastfargedemping** fungerer på samme måte som i vinduet Avbildningskonfigurasjon, men effekten av disse vises umiddelbart på probebildet.  
Gamma-justering virker globalt på bildet for å forbedre visningen. Bakgrunnssignal eller uspesifikt signal vil imidlertid også økes. For å forbedre bare signalvisningen, velg objektene av interesse og bruk alternativet **Kontrast**.



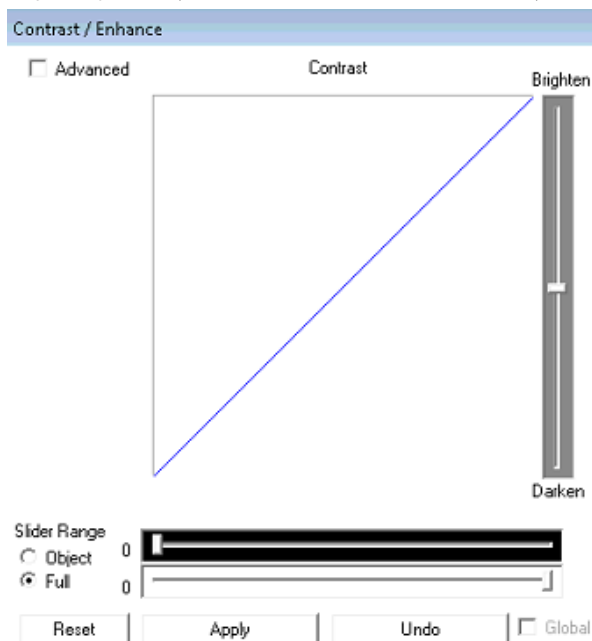
Klikk på OK for å lukke panelet Endre farge.



## Kontrast

Det er mulig å endre lysstyrken og kontrasten til bildet ved hjelp av kontrastverktøyet.

- **Kontrast** skal brukes i modusen **Global** eller «Full» som standard.
- Sørg for at «**Forhåndsvis forbedringer**» i *Tilpass* er merket av.
- Bekreft at riktig fluorokrom er valgt i *Fluorokrom-valgpanelet*, og klikk på signalet eller signalene du vil gjøre lysere (en valgboks vises rundt dem).



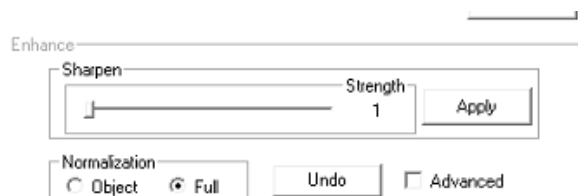
1. Hvis du vil gjøre et signal lysere, flytter du glidebryteren til høyre for histogrammet opp.
2. Hvis du vil gjøre et signal mørkere, drar du glidebryteren nedover.

3. Glidebryterne for «avskjæring» for farge under histogrammet kan brukes til å foreta ekstreme intensitetsendringer.

### Forbedre (skarphet)



Verktøyet Forbedre/skarphet er under kontrastvinduet.



**Skarphet** brukes vanligvis bare på kontrastfargekanalen for å forbedre kant- eller bakgrunnsdetaljer, eller for å forbedre banding hvis du arbeider med en DAPI-farget metafase.

Det finnes ingen dedikerte analyseverktøy for visning av probebilder. Probebilder har tilgang til lignende alternativer som andre cellebildeformater.

- Probebilder lastes inn i standard **saksvisning** for visning i Organiser-skjermen og bruk av Ctrl-B- eller Ctrl-K-kommentarer i **Analyser**-skjermen. Se **brukerveiledning for CytoVision DX**.
- Probebilder kan ha en terskel brukt for å lage objekter for fleksibel skjermbruk og for å lage et FISH-metafase- og karyotypepar som en del av en arbeidsflyt for karyotypeanalyse. Se **driftsinstruksjoner for CytoVision DX Karyotyper**.

# Feilsøking

Informasjonen og kontrollene som er oppført i denne delen er ment å gjøres som en del av feilsøking på første støttenivå av brukere som er kjent med programmene og maskinvaren til systemet.

- **Brukerveiledningen for CytoVision DX** inneholder generelle kontroller og tiltak som også bør utføres og bekreftes som en del av enhver kontakt med Leica Biosystems for ytterligere støtte.

## Avbildningssystem

### Feil ved tilkobling til mikroskop

- Mikroskopkontrolleren slått av – slå kontrolleren av og på.
- Mikroskopets USB-kabel frakoblet – sjekk kabelen.
- Mikroskopet USB-port eller kabeltilkobling er endret (USB-portendring eller Windows-effekt) – bekreft port i Enhetsbehandling og endring i **mikroskopkalibrering** (krever lokal administratortilgang).

### Effekt i mikroskopets lyskvalitet

Man bør utføre regelmessige kontroller av det optiske mikroskopet for å kontrollere at det ikke er endringer i konfigurasjonen som er nødvendig for optimal bildetaking. Dersom problemer med bildekvaliteten oppstår under bildetaking, skal også disse aspektene kontrolleres.

- Bekreft at mikroskopfotorøret (lysdeleren) retter 100 % lys mot kameraet
- Sjekk at den fluorescerende lyslederen er riktig montert og ikke er skadet/bøyd, forringet eller forbi forventet levetid.
- Sjekk og rengjør objektivlinsene. Gammel, herdet olje på avbildningslinsen vil redusere lysintensiteten, belysningen (jevnheten) og bildekontrasten
- Sjekk at kondensatorlinsen er flyttet ut av lysbanen under skanning og avbildning for å forhindre lysrefleksjon (dette gjøres automatisk på mikroskoper konfigurert med en motorisert kondensator).
- Inspiser visuelt fluorescerende filtre i mikroskopdreieskiven for tegn på lys- eller miljøskader (skyggelegging, flekkete utseende, fargeujevnheter).

## GSL-skannesystem

For GSL-skanning skal **tilleggskontrollene** og prosedyren følges.

### Feil ved tilkobling til GSL

- GSL-baseenhet slått av – slå av og på GSL, sjekk tilkoblingen av ekstern strømforsyning.
- Nettverkskabel frakoblet – sjekk kabelen mellom GSL og PC.
- Konfigurasjon av nettverksadapter – bekreft ingen nylig endring av IT-/nettverksadministrator.

## Problemer med 10x-skannefokus

- Er objektglassene rene og oljefrie? Objektglass som brukes må være frie for immersjonsolje for å muliggjøre nøyaktig fokusering.
- Sendes fokusplanet til bildet gjennom under automatisk fokusering?
- Startpunkt for automatisk fokusering er ikke i nærheten av cellefokalplanet (10x-fokuskart går ikke gjennom prøvefokalplanet): Problem med objektglass i brett, forskyvning av malfokus, nisjenullpunkt for spatial kalibrering (dunk i hylle).
- 10x-fokuskart går gjennom fokalplanet, men gir ikke skarpe fokuspunkter: Kontrast ([lyskvalitetseffekt](#), lav kontrastfargeintensitet).
- Feilinnstilt fokusforskyvning i skannemal – vil føre til feil på fokuskartet i 10x
- Sjekk skannemaler for fokusforskyvninger, innstilling av dekke, innstilling for fokusvalidering
- Er fokuset variabelt avhengig av hylleposisjon for brett/brønn?
- Utilstrekkelig lys under 10x-fokuskart (lyskvalitetseffekt, kameraforskyvning for objektglassmal).
- For sterkt lys under 10x-fokuskart (maskinvareendring, kameraforskyvning for objektglassmal, kontrastfargeintensitet).
- Dersom direktebildet er for mørkt eller for lyst, sjekk lysdeleren og objektglassmalen for kameraforskyvning, gjenta **kalibrering av fluorescerende skanning**.

## Problemer med 10x-skanneklassifisering

- Hvordan ser direktebildene ut under skanning, har de godt fokus og god kontrast?
- Skjer dette på flere objektglassmal? Kjør en ny mal for å sjekke.
- Sjekk mikroskopet for problemer med [lyskvalitetseffekt](#).
- Sjekk prøveobjektglasset for DAPI-fargekonsentrasjon og -intensitet og antifalming.
- Sjekk klassifiserere for feilopplæring.

## Problemer med 63x-avbildningsfokus

- Startpunkt for automatisk fokusering er ikke i nærheten av cellefokalplanet. Sjekk avbildningslinsens linselås (fjær med skyve- og vrimekanisme på enden).
- Er problemet konsekvent på flere objektglass? Hvis det varierer, sjekk [kompatibilitet for objektglass/brett](#).
- Hvordan ser metafaselistens 10x-skanneminiatyrbilder ut i gjennomgangsskjermen – er de i fokus?
- For gjentatte fokusproblemer med automatisk avbildning, utfør en ny **kalibrering av fluorescerende skanning**.
- Bekreft at alternativet for dekke for skannemal er riktig angitt
- Utilstrekkelig med olje, luftbobler eller andre oljerelaterte problemer fører til suboptimal fokusering. Bekreft at det er olje i sprøytebeholderen og at smørerslangen og munnstykket er godt festet og ikke tilstoppet.

## Problemer med avbildning av probekanal

- Feil filter brukt til avbildning. Sjekk at konfigurasjonen av avbildningslisten (navn og posisjon for dikroisk filter) i lagrede lister og standard Bygg liste.
- Probesignaler er ikke i fokus. Sjekk Z-stabelens trinnstørrelse og antall lag, sjekk filtertilpasningen i mikroskopdreieskiven.

## Kompatibilitet for objektglass/brett

### *Plassering av objektglass i hylleholder.*

Objektglass skal plasseres flatt i objektglassholderen med prøveoverflaten eller vernet vendt oppover.

- Sørg for at innsatsen ikke har hindringer som kan forhindre plan plassering av objektglasset, og at objektglassets gripeanordning har god kontakt med objektglasset for å forhindre bevegelse.

### *Konsistens for objektglassoppbevaring.*

Sjekk om fjærklemmene holder objektglasset godt nok.

- Hvis objektglasset er løst (vingler), sjekk at fjærgrepene er stramme nok.
- Har objektglassene firkantede hjørner eller er hjørnene beskåret? Hvis hjørnene er beskåret, har brettet riktig «skråstilt» design?

### *Konsistens for brettoppbevaring.*

Sjekk om GSL-brettet holdes godt på hyllen når det lastes.

- Hvis det er løst, sjekk justeringen av plastskyvearmen foran / til venstre for GSL-hyllen (skruejustering).

### *Montering av dekke*

Tykt/dobbelt dekke vil forhindre at fokusplanet nås.

- Bekreft at en metafase kan fokuseres og avbildes manuelt på den vanlige avbildningsskjermen.

### *Prøveklargjøring og farging*

Prøvecelletetthet, kontrastfargeintensitet og antifalmingseffekt vil ha en direkte effekt på systemfokuspålitelighet, hastighet for skanning og automatisk avbildning og ytelse.

- Fortynning av kontrastfargen anbefales ikke. Lav intensitet øker kameraeksponeringen og reduserer kontrasten, noe som fører til økt forekomst av fokusfeil og lengre skanne- og avbildningstider.
- Antifalmingseffekten avtar med alder, lagringstemperatur og lyseksponering, noe som forårsaker en rød dis over objektglasset og økt falming av både prober og DAPI. DAPI/antifalming skal oppbevares ved 2–8 °C så lenge som mulig og kan brukes på objektglassene mens de fortsatt er kalde.
- Oppbevar objektglass i mørket ved 2–8 °C og la de stå i 30 minutter i romtemperatur før skanning. Gamle objektglass skal farges på nytt med ny kontrastfarge og antifalming etter behov.
- Lav celletetthet øker skanne- og avbildningstiden og antall bilder som kreves for signalscoring. Der det er mulig justerer du celletettheten under klargjøring av objektglasset for å få minimum 5 scorede celler per avbildningsramme (10–20 er optimalt).

## Eksport av diagnoseligger

CytoVision DX generer et rullende sett med hendelsesdata for systemkonfigurasjon, kalibrering, prosess og maskinvare under rutinemessig drift. Ved uventet handling, feil ved skanning eller avbildning eller hvis programmet krasjer, kan disse loggfilene inneholde relevant informasjon som er nyttig for Leica-støtteorganisasjonen som prøver å diagnostisere en feil.

- Loggene inneholder 7–10 dager med detaljert diagnostikkinformasjon, og eksport av eventuelle problemer du kan sende videre til Leica Biosystems skal utføres innenfor denne tidsrammen.
- Loggfilene lagres med funksjonen **Eksporter logger** fra menyverktøylinjen for **Sak**. Dette vil komprimere alle filer til en .zip og lagre den på en brukerbestemt plassering.
- Disse kan deretter lagres på minnepinne eller fildeles med relevant service- og støttepersonell ved behov på et senere tidspunkt.

# Vedlegg: Punkttelling

## Oversikt over punkttelling

**Punkttelling** bruker innstillinger i en **punktanalyse** som ble opprettet før avbildning, for å opprette bildedata i bildelisten.

Punktbildelister avbildes som en del av den helautomatiske arbeidsflyten for GSL-skanning og automatisk avbildning ved hjelp av avbildningsmodusen SpotCounting (Punkttelling) i en objektglassmal for skanning.

- En bildeliste for punkttelling kan også avbildes manuelt på avbildningsskjermen ved hjelp av avbildningsmodusen «Punkttelling», på samme måte som standard probeavbildning og basert på de samme fluorokromnavnene som for «Bygg liste».

Punkttelling har noen forskjeller fra bildedataene i bildelisten for *ProbeAuto* (Automatisk probe):

- Punktanalyser kan opprettes og redigeres gjennom analysevelgerpanelet for forskjellige fluorokromkanaler og Z-stabelinnstillinger.
- Det kan brukes en **celleklassifiserer** for å bestemme typen cellemateriale som skal behandles som «informativ» i bildet under avbildning.
- Skannesystemets **AutoCapture** (Automatisk avbildning) kan settes til et maksimalt antall informative celler eller et maksimalt antall bilder tatt.
- Avbildede bildedata behandles ved hjelp av analyse-parametere for probesignalintensitet og størrelsesinformasjon, inkludert innstillinger for kontrastfargecelleform og GSL-stoppgrenser.
- Opprinnelige celle- og signalbehandlingsdata lagres permanent i *bildelisten*.

**Merk:** Punkttelling-bildelister inneholder flere filer med en stor total saksstørrelse, så sørg for at det er nok ledig plass på dataserveren som drifter saksbasen.

- Et objektglass med 40 bilder (avbildede (bilder) vil ha en størrelse på omtrent 500 MB, basert på 5 stabler per kanal på en prøve med 2 prober.
- Omtrent 80 % av disse dataene vil være de individuelle Z-stabelavbildningene.
- Bilderammedata kan ikke vises i *CytoVision DX*-programmet. Bildegjennomgang krever separat bildeanalyseprogramvare som er kompatibel med *bildeliste*-formatet.

Det er 2 hovedtrinn i Punkt-arbeidsflyten.

1. **Analysevalg:** En analyse kan velges eller opprettes når punkttelling er valgt som skannemodus for objektglassmal, eller for manuell skanning når den velges i listen **Avbildningsmodus** på standard avbildningsskjerm.
2. **Ta bilde:** Bilder fra det valgte objektglassområdet tas ved hjelp av standard prosedyrer for probeavbildning. Bildedata behandles i sanntid for å bestemme cellegrenser og probesignaler.

Før avbildning av celler for automatisk punkttelling.

- Du bør være kjent med prosedyrer for [probeavbildning](#) og fluorokromer, ettersom punkttellingsanalyser bruker standard ([Bygg liste](#)) fluorokromnavn og -innstillinger.
- Analyser må opprettes og konfigureres for at fluorokromene skal brukes som en avbildningsliste, med justerbar Z-stabel, probetype og justerbare alternativer for celleklassifiserer.
- Skannesystemer må ha en fungerende **kalibrering av fluorescerende skanning** for vanlig kontrastfargeintensitet for prøver og fokusforskyvninger som skal brukes under avbildning.

Brukere skal være kjent med prosedyrer for skannekalibrering for å vedlikeholde systemet på riktig måte og kompensere for eventuelle variasjoner i synlig kontrastfargesintensitet.

- Skannesystemer krever en **objektglassmal** med egnet skanneområde, skanneklassifiserer og punktanalyse tilordnet for objektglasset.

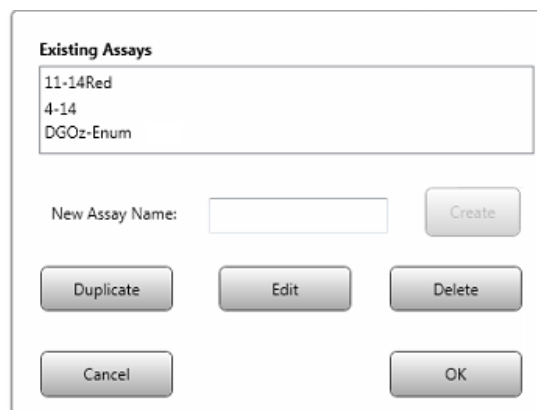
## Analyse av punkttelling

En punktanalyse inneholder følgende:

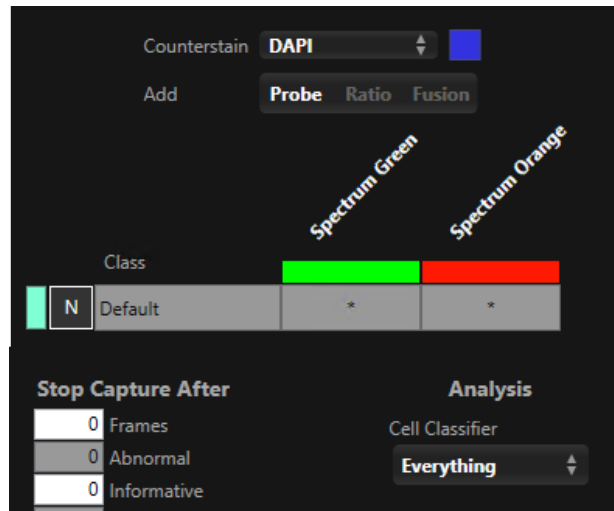
1. Fluorokromavbildningslisten for kontrastfarge og prober på objektglasset.
2. Standard Z-stabelinnstillinger for hver probekanal.
3. Maksimum antall bilder eller celler som skal automatisk avbildes på skannesystemer – **stopp skanning etter** tellinger.
4. Alternativer for å velge en celleklassifiserer for kontrastfarge for å bestemme hvilke celler som er klassifisert som informative under bildebehandling.

For bruk av funksjonene for skanning og automatisk avbildning i GSL-systemet må en analyse opprettes før skanning og konfigureres ved hjelp av vinduet **Punktanalysevelger**.

**Punktanalysevelgeren** vises på standard avbildningsskjerm (punkttellingsmodus) eller som en del av en objektglassmal for skanning når SpotCounting (Punkttelling) er konfigurert for AutoCapture (Automatisk avbildning)



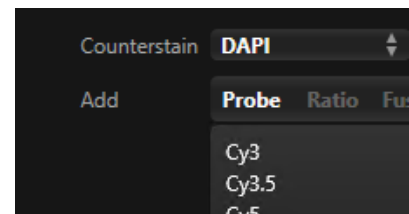
- **Opprette en ny analyse:** Angi et nytt analysenavn, og velg deretter **Create** (Opprett). Dette åpner dialogboksen **Punktkonfigurasjon**.
- **Kopiere en eksisterende analyse:** Uthev en eksisterende analyse i listen. Klikk på knappen **Duplicate** (Duplikat).
- **Redigere en eksisterende analyse:** Uthev en eksisterende analyse i listen. Klikk på knappen **Edit** (Rediger). Dette åpner dialogboksen **Punktkonfigurasjon**.
- **Slette en eksisterende analyse:** Uthev en eksisterende analyse i listen. Klikk på knappen **Delete** (Slett).



## Redigere analyser for punktavbildning

### Fluorokromvalg

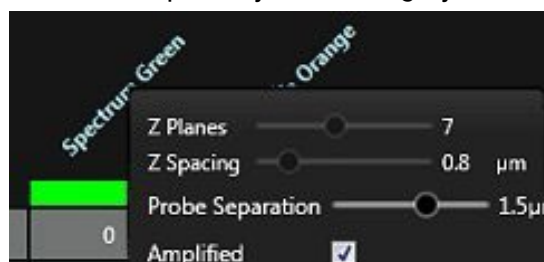
Velg en **kontrastfarge**, en nedtrekksmeny med systemfluorokromnavn, klikk deretter på knappen (**Add** (Legg til)) **probe** og velg på samme måte til du har riktig antall og navn på fluorokromer for probesettet som brukes på prøveobjektglasset.



Listen over navn er hentet fra **Bygg liste** for probe, som må konfigureres for visningsfarge og filterstandarder i standard [avbildningsskjerm](#).

For hver probe klikker du på navnet for å konfigurere:

- Z-plan og **Z-avstand** ( $\mu\text{m}$ ) for **Z-stabelavbildning**. Tallene vil variere basert på prøveegenskapene, men for interfaseklargjøring er en total fokusavstand på omtrent 5 mikroner en vanlig startverdi. F.eks. 7 plan ved  $0,8 \mu\text{m}$  eller 5 plan ved  $1,2 \mu\text{m}$  ( $4,8 \mu\text{m}$  rekkevidde).
- Hvis fluorokromet er til en amplifikasjonstest, angi sjekkboksen **Amplifisert**.

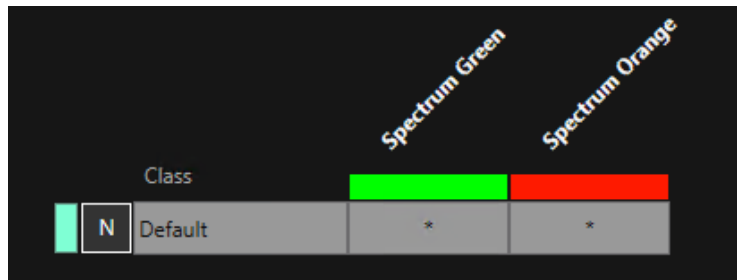


- **Probeseparasjon** er en valgfri justering, men kan stå i standardinnstillingen da den ikke har noen direkte relevans for CytoVision DX-avbildningsoperasjon.

### Klassetabell

Når avbildningslisten er angitt, opprettes en **klassetabell** som viser et «standard» klassenavn som brukes til å behandle informative celler under bildetaking.

- Dette kan ikke redigeres for CytoVision DX-avbildningsoperasjon



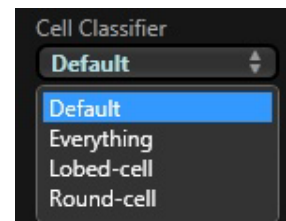
## Celleklassifiserer

En ny analyse har ingen klassifiserer angitt (**Alt**):

- Alle objekter i bildene som er tatt som inneholder probesignaler som ligger over kontrastfargemateriale, vil bli klassifisert som «informative» for visning av GSL-stopptelling og klasseskjermen under avbildning.

Bruk av en celleklassifiserer (DAPI) vil tillate filtrering av «informative» celler basert på formene på kontrastfargeobjekter (celle), og disse kan velges fra rullegardinmenyen.

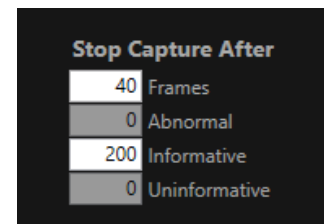
- **Standard:** En klassifiserer som er lært opp på en blandet celleprøvetype som eliminerer små eller uvanlig formede DAPI-materialer og store celleklynger.
- **Fliket celle:** En klassifiserer som er lært opp på flerflikede celleprøvetyper som eliminerer enkelt bakgrunnsrusk, store usegmenterte klynger og celler som for det meste er sirkulære i form.
- **Rund celle:** En klassifiserer som er lært opp på sirkulære celleprøvetyper som eliminerer enkelt bakgrunnsrusk, store usegmenterte klynger og celler som for det meste er fliket i form.



## Stopp avbildning etter (stopptellinger for automatisk avbildning)

GSL-skannesystemer vil fortsette til alle bilder innenfor skanneområdet er automatisk avbildet, eller hvis én av stopptellingene som er angitt i analysen er nådd.

- **Bilder:** Angir maksimum antall bilder som skal tas. Verdien som brukes kan angis som enten
  - en «helgardering» i utilstrekkelige «informative» objekter som identifiseres i rutinemessig AutoCapture (Automatisk avbildning), ment å forhindre for lange skannetider på dårlig fylte eller mislykkede hybridiseringsobjektglass
  - eller for skanninger der et fast antall avbildninger er nødvendig for standardiserings- eller sammenligningsformål, for eksempel tester av celletetthet eller probekvalitet
- **Informativ:** Dette ser på summen av alle objekter som passerer celleklassifiserer-utvalget.
  - Dette forventes å være de rutinemessige stoppkriteriene der et fast totalt antall celler er nødvendig for å oppfylle forventningene til nedstrøms gjennomgang eller analyse.



Hvis begge stopptellingene er angitt i analysen, stopper AutoCapture (Automatisk avbildning) når den første av disse tellingene er nådd. En verdi på null for et av alternativene betyr at det ikke vil påvirke den automatiske avbildningen.

- Stopptellinger har ingen effekt på manuell avbildning.

## Avansert

Knappen **Advanced** (Avansert) vil få opp konfigurasjonsdialogen for ytterligere analyseparametere.

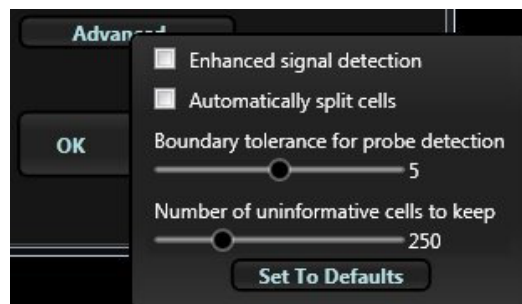
- **Grensetoleranse for proberegistrering** og **Antall uninformative celler som skal beholdes** brukes ikke til CytoVision DX-avbildningsoperasjon
- **Forbedret signalregistrering** og **Automatisk deling av celler** kan brukes, og vil føre til et økt antall objekter klassifisert under bildebehandling. Dette kan stoppe automatisk avbildning tidligere basert på den **informative** stopptellingen.

### Forbedret signalregistrering:

Hvis dette er aktivert, endrer dette noen av de relative størrelses- og intensitetssammenligningene under bildebehandling, noe som gjør det mer sannsynlig at liten eller svak signalintensitet vil bli klassifisert som informative signaler.

### Automatisk deling av celler:

Hvis dette er aktivert, kan dette skille klynger av kontrastfargeobjekter i to eller flere separate **informative** objekter.



I vinduet *Analysevelger* for punkttelling lagres analysen i systemets standardliste når **OK** brukes til å lukke panelet.

## Punktskanning og -avbildning

### Objektglassmal (skannekonfigurasjon)

Alternativene for opprettelse og skanning av objektglassmaler er de samme som for rutinemessig interfaseskanning

- Se [Objektglassmaler \(FISH\)](#) for detaljer.

For FISH-prøver defineres avbildningsreglene i panelet *AutoCapture* (Automatisk avbildning) i objektglassmalen ved å velge «SpotCounting» (Punkttelling) fra **avbildningsmodusen**: liste.

- **Objektiv**: velger linsen som brukes for automatisk avbildning, 63x er optimalt for FISH (100x anbefales ikke på grunn av et mindre synsfelt og redusert lysintensitet).

#### 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

- **Konfigurasjonsstatusen for automatisk kamera** vil avgjøre hvordan bildene tas med høy forstørrelse under automatisk avbildning:
  - **Aktivert**: (Anbefalt) For hver kanal som skal avbildes, vil systemet gjøre en justering av automatisk eksponering basert på intensiteten til eventuell fluorescens som er til stede i bildet.
  - **Deaktivert**: For hver kanal som skal avbildes, bruker systemet faste kameraverdier fra fluorokromer i **Bygg liste** («Lagre som standard» i panelet for avbildningskonfigurasjon

eller med det separate verktøyet for **kamerakalibrering for fluorokromer** – anbefales ikke for rutinemessig bruk).

- **Setup on Counterstain** (Konfigurasjon av kontrastfarge): Forbedrer beregningen av eksponering for **konfigurasjon av automatisk kamera** for fluorokromkanaler ved å kun fungere på områdene som inneholder fluorescerende kontrastfarge (DAPI-maske) og bli mindre påvirket av fluorescerende rusk utenfor cellen.
- **Konfigurasjon av probe**: Forbedrer beregningen av eksponering for **konfigurasjon av automatisk kamera** ved hjelp av en størrelsesbasert beregning for fluorokromkanaler for å i mindre grad bli påvirket av lyst fluorescerende rusk.
- **Setup using Average** (Konfigurasjon ved hjelp av gjennomsnitt): Tar de første *n* bildene ved hjelp av standard automatisk eksponeringsberegning for å oppnå en gjennomsnittlig fluorokromintegrasjonsverdi for alle resterende bilder (anbefales ikke for rutinemessig bruk).
- **Save Z-stacks** (Lagre Z-stabler): Lagrer hvert fluorokromstabelbilde sammen med (det sammenslåtte) laget med maksimal projeksjon.
- **Select Spot assay** (Velg punktanalyse) åpner analysevelgerpanelet for valg av en egnet punktanalyse som vil bli brukt som avbildningsliste og til bildebehandling under automatisk avbildning.
- **Fluorochrome List** (Fluorokromliste): kan ikke velges. Innstillingene for avbildningsliste og fluorokromer angis i punktanalysen og knyttes til de standard *Bygg liste*-fluorokromene.
- **Alternativer etter avbildning**: kan ikke velges. Punkttelling oppretter *bildedata* for bildeliste som ikke bruker funksjoner for terskelbehandling eller avbildningstilpasning.

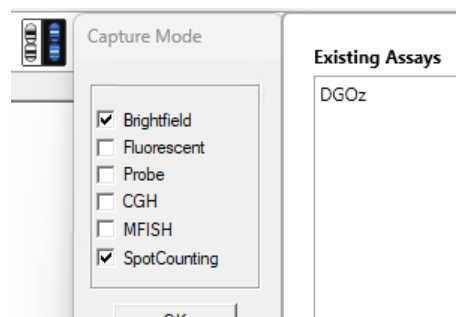
**Merk:** Hvis det er noen listenavn i **fluorokromlisten** eller panelene for **alternativer etter avbildning**, betyr dette at skanneområdet tidligere er angitt for modus for Probe eller Automatisk probe der dette er nødvendig.

- Det anbefales å opprette et nytt område for punkttelling for å holde disse områdene tomme.

## Manuell avbildning

Manuell avbildning av punkttelling bruker standard avbildningsskjerm.

1. Klikk på Capture Mode (Avbildningsmodus) og velg Spot Counting (Punkttelling) for å åpne dialogboksen Analysevelger.
2. Velg eller opprett en punktanalyse.
3. Når en analyse er valgt, opprettes avbildningslisten automatisk fra standard *Bygg liste*-fluorokromer som er definert i analysen.
4. Bekreft at fluorokromvalgpanelet viser de riktige fluorokromene. Z-stabelinnstillinger vil bli arvet fra analysen, men kan endres før avbildning.
5. Bekreft at *avbildningspanelet* Tilpass er angitt for alternativet «Lagre stabler» for å lagre Z-stabellagene som separate bilder i den endelige bildelisten.



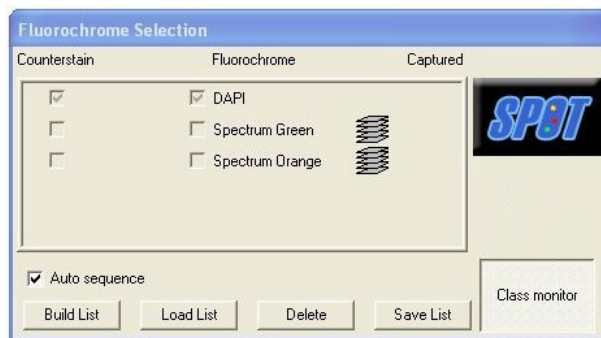
Avbild celler som du ville gjort for standard probeavbildning.

- Slå av **automatisk sekvens** og **automatisk kamerakonfigurasjon**, og utfør én eller to avbildninger for å få de riktige kamerainnstillingene.  
– Bryteren **Automatisk konfigurasjon** under bildet kan fortsatt brukes til å automatisk bestemme de beste innstillingene for objektglasset.

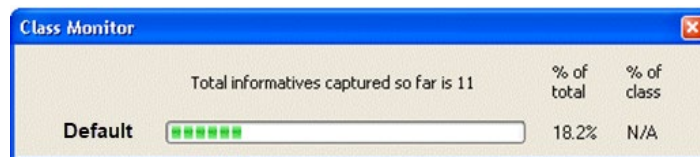
- Når kamerainnstillingene er riktige, slår du på **automatisk sekvens**. Dette vil være raskere enn å bruke **automatisk kamerakonfigurasjon** for hvert bilde.
- Bildene vil bli behandlet av analysen etter hvert som de tas. Det er ingen terskelbehandling, rådata brukes til å lage en bildeliste for bildebehandling.
- Når du er ferdig med avbildningen, bytter du til skjermen Analyse. Dette vil fullføre behandlingen av cellene i bildelisten.

## Avbildnings- og klasseskjerm

Når automatisk eller manuell punktavbildning starter, vises panelet **Fluorokromvalg** for punkter som viser fluorokromnavnene som er definert i analysen.



Klikk på ikonet **Klasseskjerm** for å vise dialogboksen for klasseskjerm



Det totale antallet informative celler som er behandlet så langt, vises øverst i dialogboksen.

- Linjen viser antall *informative* som en prosentandel av analysestopptellingen.

## Stoppe automatisk avbildning for SPOT

Automatisk avbildning for *CytoVision DX* GSL er ment å kjøres uten krav om justering eller interaksjon.

Automatisk avbildning stopper når én av følgende betingelser er oppfylt:

- Stopp etter **bilder**-antallet er nådd.
- Stopp etter **informative** celler-antallet er nådd.
- Avbildningen er fullført for alle bildene i skanneområdet.
- Knappen **Stop** (Stopp) trykkes manuelt.

Med mindre du trykker på knappen **Stop** (Stopp), vil GSL gå til neste objektglass i batchen og utføre skanning eller automatisk avbildning på det objektglasset etter behov.

Se [Eksempel på trinnvise prosedyrer](#) for å kjøre et punkttellingsobjektglass for [manuell avbildning](#) eller [full skanning og automatisk avbildning](#).

# Vedlegg: Tissue FISH

## Oversikt over Tissue FISH

Tissue FISH-funksjonalitet er designet for å tillate avbildning av Tissue FISH-objektglass ved hjelp av maskinvare for systemskanning eller -avbildning og deretter gjennomgang eller analyse av bildene.

- Skannealternativer gir mulighet for manuelt eller automatisert valg av skanneområder for skanning.
- Bildelistedata avbildes med automatisk avbildningsmodus for *ProbeAuto* (Automatisk probe) eller ved hjelp av programmet [Manuell probeavbildning](#).

Avbildning av bildeliste er beregnet for bruk med DNA Fish-prober. Programmet har ingen funksjonalitet beregnet for bruk med Tissue IHC-prøveobjektglass eller immunfluorescerende prøveobjektglass.

- Funksjonaliteten til den lisensierte modulen *Tissue FISH* kontrollerer tilgangen til flere alternativer for objektglassmal på GSL-skannesystemer. Det er ikke en avbildnings- eller analysekonfigurasjon.
- Alle avbildningsfunksjoner er standardfunksjoner for Probe-programvarelisensen.
- Det er ingen dedikert Tissue FISH-visning, morfologi eller dedikerte analyseverktøy.

## Skanning og avbildning med Tissue FISH

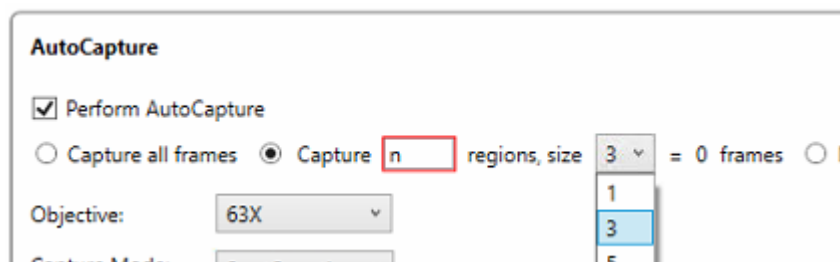
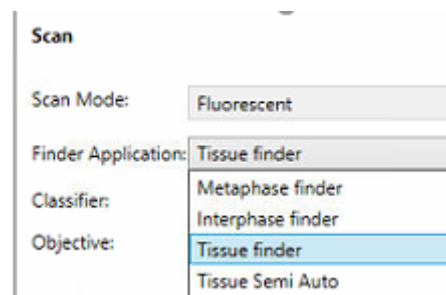
Det er 3 arbeidsflyter for konfigurasjon av Tissue FISH-skanning tilgjengelig gjennom innstillinger i skjermen for objektglassmal, og de er beskrevet nedenfor.

1. Automatisk skanning og automatisk avbildning (modus for vevssøk, automatisk avbildning)
2. Automatisk skanning og manuell regionmarkering (modus for vevssøk, utsatt avbildning)
3. Manuelt regionvalg (halvautomatisk for vev, ingen skanning, automatisk avbildning)

### 1) Automatisk skanning og automatisk avbildning:

Bruker **registreringsprogrammet** Vevssøk som en del av en objektglassmal.

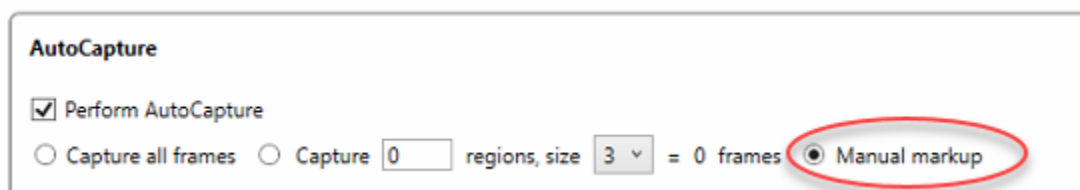
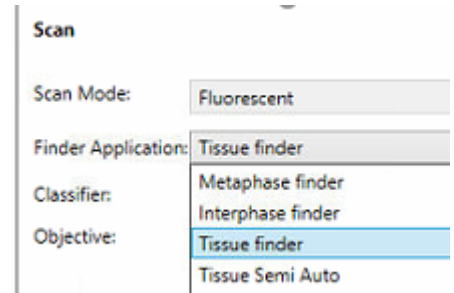
- Valgfri helfelts 1,25x forhåndsskanning for å registrere etsing på objektglassområde.
- 10x-fokuskart og -skanning for registrering av DAPI-fargede vevsrammer.
- Automatisk avbildning av bildeliste av alle bilder eller flere rutenettområder i skanne-/etseområdet.



## 2) Automatisk skanning og manuell regionmarkering:

Bruker **registreringsprogrammet** Vevssøk som en del av en objektglassmal, med en utsatt automatisk avbildning basert på valgte regioner.

- Valgfri helfelts 1,25x forhåndsskanning for å registrere etsing på objektglassområde.
- 10x-fokuskart og -skanning for registrering av DAPI-fargede vevsrammer.
- Manuell markering av valgte bilder eller regioner ved hjelp av programmet for [Tissue FISH-markering](#).
- Automatisk avbildning av bildeliste av alle bilder eller flere rutenettområder i skanne-/etseområdet.



Manuell markering kan bare brukes på en skannemal med ett enkelt skanneområde. Forsøk på å opprette flere skanneområder vil generere en advarsel, og du vil ikke kunne lagre malen før de ekstra områdene er slettet.

## 3) Manuelt regionvalg av region for automatisk avbildning:

Bruker **registreringsprogrammet** halvautomatisk for vev som en del av en objektglassmal med individuell regionmarkeringsprosedyre (valgfri helfelts forhåndsskanning for å oppdage etsing av objektglassområder) for å evaluere og angi regioner for ProbeAuto (Automatisk probe)-avbildning med høy forstørrelse for en *bildeliste*.

- Denne arbeidsflyten krever at en USB-joystick kobles til systemet.
- Ingen skanning utføres. Dette er en interaktiv arbeidsflyt som krever mikroskop eller direkte bildevisning av objektglasset for å angi områder for påfølgende automatisk avbildning.

## Manuell avbildning

Ethvert CytoVision DX-system med probekonfigurasjon kan bruke programmet for [manuell probeavbildning](#) for å lage en bildeliste.

- Bilder for manuell probeavbildning kan tas manuelt. Skannesystemer kan bruke 3x3 og 5x5 automatiske bildealternativer.

## Objektglassetsing

Tissue FISH-objektglasskanning er designet for å fungere optimalt på objektglass som er merket med en objektglassetsing/diamantspisspenn, slik at skanneområdet kan bestemmes automatisk ved hjelp av helfelts forhåndsskanning før skanne- og avbildningsoperasjoner.

- For pålitelig områderegistrering bør objektglassetsingen være klar og ubrutt, vekk fra kantene på objektglasset eller dekket og eventuelt overløp av objektglass.
- Hvis forhåndsskanning er angitt i objektglassmalen og et etset område ikke oppdages, vil ikke skanningen fortsette.

- Hvis objektglasset har flere etsede områder i skanneområdet, vil forhåndsskanningen oppdage disse og inkludere dem i de automatiske skanne- og avbildningstrinnene.
- Alternativet Forhåndsskanning er også tilgjengelig ved hjelp av halvautomatisk skanning for å bidra til å identifisere regioner manuelt og for objektglassvisning.



**Merk:** Markørpenn gir vanligvis ikke en klar, mørk kontrastlinje og anbefales ikke for pålitelig eller konsekvent registrering.

Forhåndsskanning for etsede objektglass bruker 1,25x-linsen med helfeltlys. Derfor er det **nødvendig med en kalibrering** av helfeltskanning før bruk.

## Tissue FISH-markering (utsatt avbildning)

Tissue FISH-regionmarkering er et alternativ for manuelt regionvalg for bruk med skannemodusen Vevssøk.

- Objektglass skannes 10x ved hjelp av et malsett med alternativet AutoCapture (Automatisk avbildning) med «manuell markering».
- Skannebilder gjøres tilgjengelig i et visningsprogram for Tissue FISH-markeringer, som viser en sammenføyd oversikt over det fluorescerende vevet slik at brukeren kan opprette avbildningsregioner.
- En utsatt avbildning startes ved hjelp av den standard avbildningsmodusen *Probe Auto* (Automatisk probe) når alle objektglassene har angitte regioner for AutoCapture (Automatisk avbildning).



Visningsprogrammet for **Tissue FISH-markering** brukes til å velge regioner for AutoCapture (Automatisk avbildning) for objektglass som er skannet ved hjelp av alternativet «manuell markering» for vevssøk med AutoCapture (Automatisk avbildning).

- Visningsprogrammet for markering kan åpnes direkte på et skannesystem fra konfigurasjonsskjermen Skann objektglassbatch når et objektglass som inneholder markeringsdata lastes inn som en del av en arbeidsflyt for utsatt avbildning.
- Klikk på den røde «M»-en under objektglassvisningen for å gå til visningsprogramskjermen for objektglasset.

Alternativt kan visningsprogrammet for markering åpnes gjennom et frittstående program som kan kjøres på et hvilket som helst nettverkstilkoblet *CytoVision DX*-system.

1. Åpne programmet fra **Start > All Programs > CytoVision DX> Tissue FISH Markup** (Start > Alle programmer > CytoVision DX> Tissue FISH-markering).
2. Knappen **Open Case** (Åpne sak) vises mot en svart bakgrunn.
3. Velg **Open Case** (Åpne sak) for å vise et valgt saksvindu.
4. Søk etter og åpne en sak som er kjent for å inneholde skanninger ved hjelp av alternativet **Manuell markering**.
5. Alle objektglass med Tissue FISH-markeringer med 10x-skannedata vil automatisk oppdateres på skjermen – en rød «M» indikerer at ingen regioner for AutoCapture (Automatisk avbildning) er angitt.
6. Klikk på «M» for å åpne visningsprogramskjermen for Tissue FISH-markering.

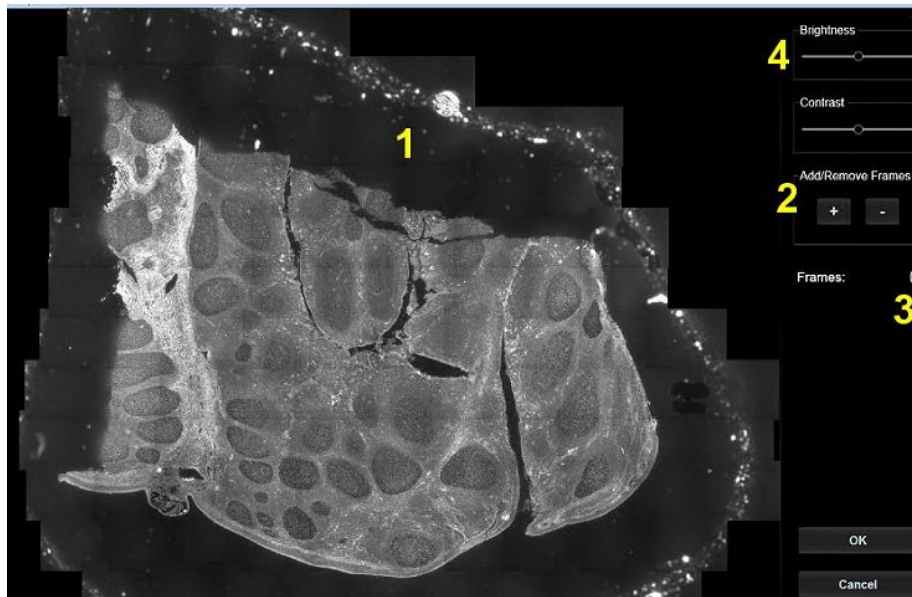


Hvis en sak skannes eller åpnes på et annet system eller i visningsprogrammet for markering, vises et låsesymbol. Skanneovervåking brukes til å bekrefte at skanningen er fullført for en sak i en aktiv skannebatch før du prøver markeringsprosedyren.

## Visningsprogramskjerm for markering

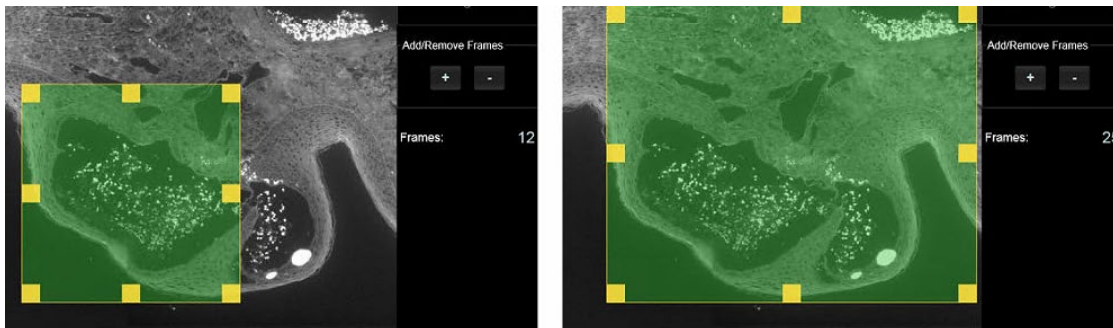
Visningsprogramskjermen for Tissue FISH-markering viser en oversikt over 10x-skanningen for vevssøk med verktøy for å legge til eller fjerne regioner for AutoCapture (Automatisk avbildning).

1. **Skannevisning** av de sammensatte 10x fluorescerende skannebildene.
  - Zoom inn/ut ved hjelp av musens rullehjul.
  - Panorer rundt det zoomede bildet ved å dra med en av museknappene.
2. **Legg til eller fjern** regioner for AutoCapture (Automatisk avbildning).
  - Velg «+», og klikk på bildet for å slippe en region.
  - Velg «-», og klikk på en eksisterende region for å fjerne den.
3. **Bildevisning.**
  - Når et område er lagt til, vises et bildenummer som angir hvor mange avbildninger som forventes for AutoCapture (Automatisk avbildning).
  - Endring av størrelsen på regionen i bildevisningen vil øke eller redusere dette tallet etter hvert som systemet beregner posisjonene for AutoCapture (Automatisk avbildning) på nytt.
4. **Glidebrytere for bildeforbedring.**
  - Lysstyrke og kontrast justerer oversiktsvisningen for 10x-skanning om nødvendig for å forbedre visuell identifikasjon av områder som skal avbildes.



### Eksempel på arbeidsflyt

- Bruk muserullingen til å zoome til detaljnivået som trengs for å bestemme avbildningsregioner.
- Velg «+», som vil bli uthevet i blått.
- Venstreklikk på bildet for å slippe en regionboks. Denne er skyggelagt med grønt.
- Dra til venstre på boksen for å flytte den, dra til venstre på kantene av boksen for å endre størrelsen.
  - Systemet beregner antall komplette og delvise linserammer med høy forstørrelse som trengs for å inkludere hele regionområdet.
  - Endring av størrelse vil endre bildevisningen etter hvert som systemet beregner på nytt

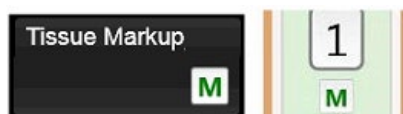


Flere regioner kan legges til på samme måte

- Nære eller overlappende regioner vil ikke tillate avbildning av samme bilde to ganger, antall bilder vil bare øke der nye komplette bilder må tas.
- For å fjerne regioner, velg «-», og klikk deretter på regionen du vil slette

Klikk på OK for å lukke visningsprogramvinduet, og gå tilbake til enten skjermen Åpen markeringssak eller skjermen Skann objektglassbatch.

- Objektglass oppdatert med avbildningsregioner vil nå vises med en grønn «M».



Når en utsatt skanning er startet, fortsetter AutoCapture (Automatisk avbildning). Det forventes at Probe Auto (Automatisk probe) vil bli brukt til å generere bilder i bildelisten.

## Vedlegg: M-FISH-avbildning

Informasjonen nedenfor krever at *CytoVision DX*-systemet er aktivert for både *Probe*- og *MFISH*-lisensierte moduler for å tillate de ekstra konfigurasjonsinnstillingene som kreves for M-FISH-bildetaking.

- Bilder som er tatt må analyseres på et system som også har den Karyotype-lisensierte modulen aktivert.
- For M-FISH-bildeanalyse og karyotypingsprosedyrer, se **driftsinstruksjonene for *CytoVision DX* Karyotype**.

### Introduksjon til M-FISH-teknikken

M-FISH er en akseptert forkortelse av **Multi-color** (Flerfarget) eller **Multiplex Fluorescence In-Situ Hybridization** (In situ hybridisering med multipleks fluorescens) og brukes til å definere 24-farget karyotyping av kromosompreparater (også kjent som spektral karyotyping eller SKY).

Dette er en kombinatorisk FISH-teknikk der probeblandingen inneholder et sett med bibliotekets DNA-maling for hvert kromosom i en metafase. Hvert kromosomprobesett er merket med en unik kombinasjon av fluorokromer som, når de vises under filterbasert fluorescerende lys og behandles ved hjelp av et bildesystem, produserer en distinkt «farge».

Dette kan brukes til å klassifisere kromosomene i en karyotype og identifisere reorganisert kromosommateriale.

- Du kan ikke bruke fullkromosom-M-FISH for å identifisere intern reorganisering av kromosomer som inversjoner, slettinger eller duplikasjoner.
- Avledede kromosomer gir ikke p- eller q-arminformasjon direkte.

M-FISH er en kompleks eksperimentell teknikk å mestre. Den krever god laboratorieerfaring med FISH og effektiv bruk av mikroskopkomponentene.

- De riktige filtrene for fluorescerende bildebehandling og Plan-Fluor- eller Plan Apo-tilsvarende objektivlinser er like viktige som systemprogramvaren for bildebehandling.

Kommersielt tilgjengelige M-FISH-probesett bruker en DAPI-kontrastfarge med 5 ekstra fluorokrometiketter, noe som gir mulighet for 31 mulige kombinasjoner (2<sup>5</sup>-1) – selv om bare 24 vanligvis brukes.

- M-FISH-probesett bruker ofte lignende, men ikke nødvendigvis de samme fluorokromene og filtrene. De som brukes til ett sett, er kanskje ikke optimale for et annet.
- Det kan være nødvendig å skaffe flere filtre eller modifiserte versjoner for de som brukes i rutinemessig FISH-arbeid for å redusere risikoen for gjennomblødning av lys fra de andre etikettene på objektglasset.
- M-FISH-filtre skal vanligvis ha smale bånd eller eksitasjons- eller emisjonsmaksimum designet for å fungere med de andre fluorokromene på prøven og ikke bare for de mest effektive for et bestemt fluorokrom.

### Avbildningsoversikt

M-FISH-avbildning er basert på standard [probeavbildning](#) uten et alternativ for manuell terskelbehandling – det er automatisk bakgrunnsbehandling av rådataene.

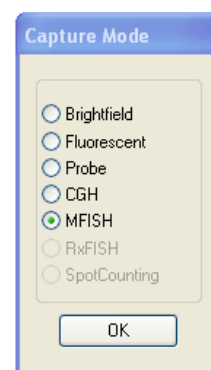
- Kjennskap til skjermkontroller og avbildningsarbeidsflyt er viktig før du prøver M-FISH-konfigurasjon og avbildningsoperasjoner.

- M-FISH er en manuell avbildningsteknikk og kan ikke brukes som en del av en automatisert arbeidsflyt for skanning og automatisk avbildning på et CytoVision-skannesystem.
- Manuell avbildning på et CytoVision DX-skannesystem er mulig ved hjelp av funksjonalitet for metafaseflytting. Se **driftsinstruksjoner for CytoVision DX Karyotype**.

## Avbildningskonfigurasjon

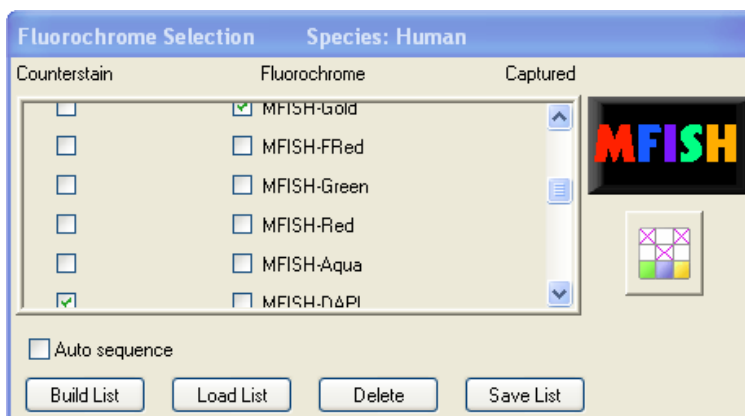
Klikk på ikonet **Avbildningsmodus** på den standard avbildningsskjermen, og velg M-FISH.

- Fluorokromvalgpanelet åpnes.
- Hvis du tidligere har opprettet og lagret en M-FISH-avbildningsliste, last inn denne, eller opprett en ny liste ved å bruke standard alternativer for Bygg liste for probe.



## Avbildningsliste

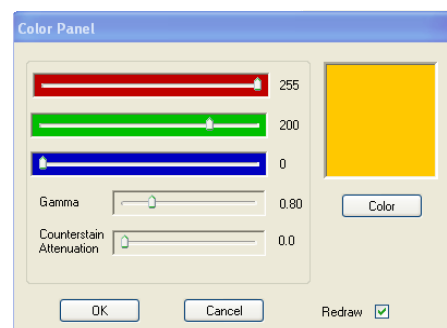
Avbildningslisten i **fluorokromvalgpanelet** skal opprettes i den rekkefølgen den blir tatt, med kontrastfargen som den siste kanalen.



Det anbefales å bruke spesialopprettede M-FISH-fluorokromnavn med spesifikke fargeinnstillinger for å forbedre fargeoverlegget som skal sees i Analyse.

De nøyaktige probefargene kan endres, men anbefalt fargeoppsett for fluorokromene er:

| Farge \ Fluo                                            | RØD | GRØNN | BLÅ |
|---------------------------------------------------------|-----|-------|-----|
| DAPI                                                    | 63  | 63    | 63  |
| Aqua/DEAC                                               | 0   | 145   | 255 |
| FITC/Green                                              | 0   | 220   | 0   |
| Gold/Cy3                                                | 255 | 200   | 0   |
| Rød                                                     | 255 | 0     | 0   |
| FRed/Cy5                                                | 0   | 0     | 255 |
| Cy5.5                                                   | 0   | 145   | 255 |
| <b>Aqua/DEAC og Cy5.5 – vanligvis ikke brukt sammen</b> |     |       |     |



## Fluomap

Når en ny avbildningsliste er klar, må Fluomap angis. Dette er de unike fluorokromkombinasjonene som er i probesettet som brukes, og de må angis for å opprette M-FISH-klassifiseringene som trengs for kromosomidentifikasjon og karyotyping.



- Klikk i de aktuelle boksene under hver kromosomklasse for å angi probekombinasjonene, kryss vil vises.
- Fluomap må tilpasses det spesifikke probesettet du arbeider med.
- Eksemplene vist nedenfor er kun for referanseformål og viser tidligere M-FISH-probekombinasjoner som kan ha vært i bruk på et tidspunkt.

|          | 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 (avviklet)

|              | 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 – avviklet)

|              | 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 variasjon-1

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

**24XCyte variasjon-2**

Når du har opprettet fluomap, klikker du på «**Done**» (Ferdig) og lagrer det sammen med avbildningslisten ved hjelp av «**Lagre liste**»-funksjonen i fluorokromvalgvinduet.

Selv om fluorokromnavnene er forskjellige for ulike probesett, er de spektrale egenskapene likeverdige. Et standard smalbands M-FISH-filtersett vil være:

- DAPI (standard)
- Spectrum Aqua-filter (for Aqua eller DEAC)
- Spektrum grønt filter for grønn, FITC and
- Spektrum Gold (gult) filter for Gold, oransje, Cy3, TRITC.
- Spectrum rødt filter for rød, Texas Red eller Cy3.5
- Spectrum FRed filter for Far Red eller Cy5

## Filtre og mikroskopi

Hvis du bruker eksisterende mikroskopfiltre, sørg for at disse er smalbandsspesifikasjoner som forhindrer signalblødning, spesielt av nære probeetiketter som oransje (Cy3) og rød.

- Probesett som bruker Cy3/Orange og Texas Red/Cy3.5 i kombinasjon må være bilder med filtre som disse 2 lignende fargekanalene.  
Smalbands Spectrum Gold bør brukes i stedet for et bredbands Spectrum Orange eller TRITC-filtersett.
- Ikke bruk generiske «grønne», «oransje» eller «røde» filtre som er tilgjengelige fra mange filterleverandører, da disse øker risikoen for fargeblødning, noe som kan forstyrre riktig behandling og klassifisering.
- Hvis du er i tvil, kan du kontakte støtterepresentanten for Leica for å sjekke filter- og probespesifikasjonene.

Under bruk av mikroskop anbefales det å redusere eksponeringen for det mer skadelige ultrafiolette lyset (brukt til DAPI-kontrastfarge) så mye som mulig, da UV-lys er en generisk eksitasjonsfaktor for alle fluorokromer på objektglasset, spesielt Cy5/Far Red som kan være utsatt for faling.

- Vanligvis viser en av de andre probekomponentene (f.eks. Spectrum Gold/Orange) tilstrekkelig signalintensitet til å finne celler ved lav forstørrelse og for den første avbildningskanalen.
- Etter dette avbilder du opp Spectrum FRed (Cy5)-signalet med lavest intensitet, etterfulgt av (uten spesiell rekkefølge) grønn, rød, Aqua og til slutt kontrastfarge-DAPI.
- Hvis mulig, bruk programvarekontroll av en fluorescerende lyskilde (Xylis/X-Cite 120 PC) for å senke intensiteten av lyset som når objektglasset, og redusere eventuell fotobleking til et minimum.

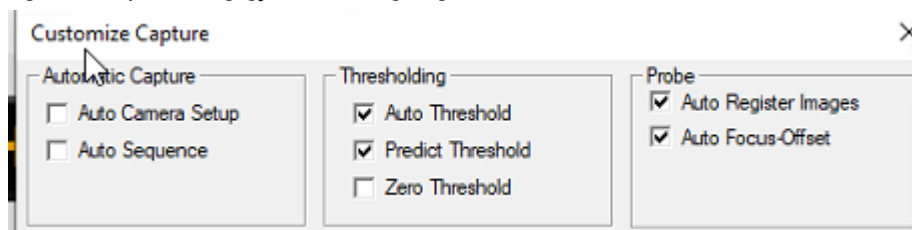
## Ta M-FISH-bilder

Eksempel på prosedyre basert på manuell mikroskopvisning for å identifisere celler for avbildning. Målet er å ta hvert bilde så effektivt som mulig, redusere alt som introduserer forsinkelser i prosessen eller holder fluorescerende lys (spesielt UV/DAPI) på objektglasset lenger enn nødvendig.

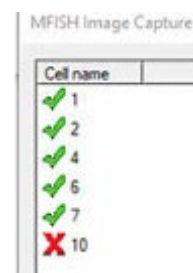
- Bruk om mulig én av de lyseste probekanalene – for eksempel Spectrum Gold – for å identifisere metafaser for avbildning.
- Far Red (Cy5) er ikke synlig for øyet. For å bestemme avbildningseksposering og fokus må du bruke direktekamerabildet. Unngå å bruke automatisk konfigurasjon for denne kanalen på grunn av lange eksponeringer.
- Hvis DAPI må brukes i stedet, må du ikke holde lyset på objektglasset lenger enn nødvendig for å finne og ta bildet. Dette for å redusere fotobleking av probekanalene.
- Skanning av M-FISH-objektglass ved 10x for å lage en objektglassliste for metafaseflytting vil kreve bruk av DAPI, da ingen andre kanaler forventes å vise nok intensitet og objektdetaljer for et skannesystem.

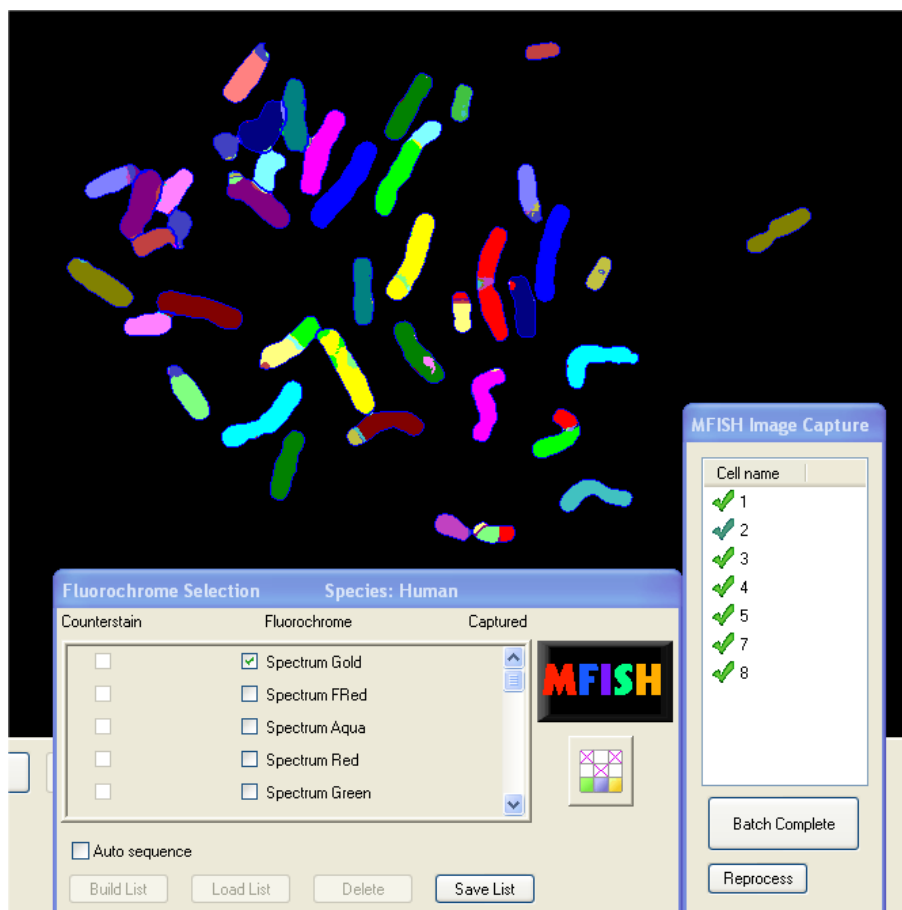
### Tilpasse avbildningsalternativer

- Automatisk terskelbehandling skal være aktivert. Automatisk kamerakonfigurasjon skal være deaktivert.
- Den første manuelle avbildningen skal identifisere egnet kameraeksponering ved å bruke «AutoSetup» (Automatisk konfigurasjon) under hovedbildevinduet for hver kanal, som skal opprettholdes for påfølgende avbildninger. Bruk av automatisk konfigurasjon for Far-Red-kanalen vil introdusere unødvendige forsinkelser, mens beregningene for langtidseksposering gjøres hver gang.



1. **Åpne** eller **opprett** en sak på systemet, og gå til **avbildningsskjermen**.
2. Finn celler med lav forstørrelse visuelt ved hjelp av Gold-filteret.
3. Bytt til 63x eller 100x, og avbild Gold først. Terskelbehandling utføres automatisk av systemet, og det lagrede råbildet vises på skjermen.
4. Avbild deretter Far Red/Cy5-kanalen. Denne kanalen har vanligvis det lengste eksponeringskravet og kan kreve et lite fokusskifte mellom de andre kanalene.
5. Fullfør avbildning av de andre kanalene og DAPI som du ville gjort med et vanlig probebilde.
6. Når den siste kanalen er avbildet, begynner programmet å behandle cellen, og alternativet Ny celle / Direkte flyttes til neste celle, klar for avbildning for å gjentas.
7. Etter noen sekunder vil panelet *MFISH-bildetaking* vise enten en grønn hake eller et rødt kryss.
  - Et rødt kryss indikerer en feil i behandlingen, vanligvis på grunn av lav eller dårlig fluorescens eller dårlig kontrast. Hvis dette blir sett, gå gjennom prosedyren for ny terskelbehandling beskrevet nedenfor, eller avbild cellen på nytt.
8. Når alle cellene er fullført, velg «Batch Complete» (Batch fullført) eller gå til oppstartsskjermen for å fullføre behandlingen og gjøre metafasebildene klare for analyse.





**Merk:** Det er ikke mulig å avbilde celler ved hjelp av andre avbildningsmoduser i et M-FISH-objektglass.

## Manuell terskelbehandling

I rutinemessig M-FISH-avbildning forventes bruk av innstillingen *Automatisk terskel* for effektiv avbildning av alle kanalene og lagring av hvert råbilde for probekanal som behandles for å opprette metafasen for analyse.

☒ Auto Threshold

Dette kan deaktiveres i panelet Tilpass avbildning for å tillate manuell terskelbehandling for kontrastfargekanalen under prosedyren for direkteavbildning.

- Under avbildning av kontrastfarge (DAPI) kanaliserer du panelet for terskelbehandling.
- Utfør en **bakgrunnssubtraksjon** på bildet. En innstilling på mellom 15 og 25 anbefales avhengig av størrelsen på kromosomene.
- Etter dette terskelbehandler du som normalt. Kun kontrastfargekanalen presenterer alternativene for manuell terskelbehandling, probekanaler behandles fortsatt automatisk.

Dette kan brukes til å forhindre at små eller bleke kromosomer går tapt eller slettes under trinnet for automatisk terskelbehandling, men det anbefales ikke for rutinemessig avbildning da det legger til en forsinkelse i avbildningsprosessen.

## Ny terskelbehandling

Ny terskelbehandling av kontrastfargebildet kan gjøres ved hjelp av M-FISH-behandlingspanelet etter at avbildningen er fullført.

Det er 2 anledninger hvor det kan være nødvendig å manuelt terskelbehandle cellen på nytt etter behandling:

- Hvis en celle mislykkes i automatisk behandling (et rødt kryss vises vanligvis kun når bilderegistreringen har mislyktes, vanligvis på grunn av én eller flere svake komponenter eller en DAPI med dårlig kontrast).
- Hvis den automatiske behandlingen har ført til at små kromosomer eller kromosomer ved siden av kjerner slettes. Dette skjer oftere hvis DAPI-kontrastfargebildet er dårlig, da systemet ikke kan få en full maske for alle kromosomene i metafasen.



### Prosedyre

1. Velg cellen fra **M-FISH-bildetakingsvinduet** (hvis den mislyktes i behandlingen, vil det være en feilmelding).
2. Klikk på knappen **Threshold** (Terskel) på hovedverktøylinjen på skjermen. Et standard terskelvindu vises.
3. Utfør en **bakgrunnssubtraksjon** på bildet. En innstilling på mellom 15 og 25 anbefales avhengig av størrelsen på kromosomene.
4. Etter dette terskelbehandler du som normalt og godtar, og systemet vil behandle bildet på nytt ved hjelp av den nye DAPI-masken.

**Merk:** Etter ny behandling av enkeltceller kan det være umulig å laste metafasen fra den siste cellen i objektglasset. Hvis dette oppdages, start programvaren på nytt og åpne saken på nytt før du fortsetter.

## Behandle på nytt

Ny behandling kan brukes når som helst etter at M-FISH-avbildningen er fullført for å tilbakestille alle cellene i objektglasset, slette eksisterende metafase- eller karyotypebilder og gjenta råbildebehandlingen på nytt.

- Fluomap-vinduet åpnes og tillater modifisering av noen av probekombinasjonene (hvis det ble gjort en feil i den opprinnelige opprettelsen av kartet som ikke blir identifisert før etter avbildning).

## Vedlegg: Eksempel på trinnvis prosedyre

For alle eksempler på prosedyrer må du sørge for at den fluorescerende lampen og mikroskopkomponentene er slått på, og for skannesystemer slå på GSL og bekreft at det er tilstrekkelig med olje i oljemekanismen.

- Når du bytter mellom objektiver med lav og høy forstørrelse, må du alltid bruke programvarekontrollene (objektivpanelet eller funksjonstastene).

### Standard probeavbildning

Eksempel på prosedyre for manuelt opptak av FISH-bilder etter manuell objektglasslasting og celleidentifikasjon.



1. Angi standard avbildningsskjerm ved å velge ikonet Avbildningsskjerm på hovedverktøylinjen.
2. Åpne eller opprett en sak, og velg et objektglass i Navigator. Hvis du trenger å opprette et objektglass, klikker du på høyre museknapp i saken og velger **New Slide** (Nytt objektglass) fra menyen.
3. Klikk på **Capture Mode** (Avbildningsmodus), og velg **Probe**.
4. Konfigurer fluorokromene du skal bruke til avbildning i fluorokromvalgpanelet (Last inn en forhåndslagret liste).
5. Velg hvilke alternativer du vil bruke fra **Tilpass** (Last inn en mal).
6. Klikk på **New Cell** (Ny celle).
7. Klikk på **Live** (Direkte).
8. Fokuser og sentrer bildet.
9. (Valgfritt) Hvis du har en sterk kontrastfargeintensitet, åpner du grensesnittpanelet for fluorescerende lampe og justerer % for lampeintensitet til en lavere verdi. Dette for å redusere UV-fotobleking. DAPI-filter.
10. Klikk på **Auto Setup** (Automatisk konfigurering). Kamerainnstillingene optimaliserer bildekontrasten for eventuelle endringer i fokusposisjon.
11. Hvis god kontrast er vanskelig å oppnå, åpner du vinduet **Avbildningskonfigurering** for å justere:
  - glidebryterne (avansert) for *automatiske innstillinger*, som styrer visningen av automatisk kamerakonfigurering
  - glidebryterne for **svart** og **lyst** til en forbedret bildekontrast er oppnådd. Bakgrunnen skal ha et jevnt mørkt utseende. Hvis bildet har et flatt, lysegrått utseende, kan det hende du har for mye lys. Flytt eksponeringsnivået ned.
12. **Utfør** avbildning når bildet er fokusert, og fortsett med terskelbehandlingsprosessen.
13. Hvis **Automatisk terskelbehandling** er på, vil bildet bli behandlet, og avbildningen vil fortsette.
  - Hvis ikke vises terskelbehandlingsskjermen.
  - Juster terskelen for å eliminere uønsket bakgrunn.
14. Hvis **Automatisk sekvens** er på, vil systemet fortsette til neste fluorokrom etter terskelbehandlingen.
  - Hvis ikke klikker du på **Live** (Direkte) for å avbilde neste fluorokrom.
15. Gjenta trinn 7–12 til alle fluorokromene er avbildet.
  - Hvis **Automatisk kamerakonfigurering**, **Automatisk sekvens** og **Automatisk terskel** er slått på, vil systemet fortsette å avbilde opp resten av fluorokromene.



## Manuell probeavbildning for bilderamme

Eksempel på prosedyre for manuelt opptak av FISH-bilder etter manuell objektglasslasting og celleidentifikasjon.



1. Åpne eller opprett en sak, og velg et objektglass i Navigator. Hvis du trenger å opprette et objektglass, klikker du på høyre museknapp i saken og velger **New Slide** (Nytt objektglass) fra menyen.
2. Angi skjermen for manuell probeavbildning ved å velge det svarte kameraikonet på hovedverktøylinjen. Dette er bare tilgjengelig på oppstartsskjermen.
3. Konfigurer eller last inn fluorokromavbildningslisten du skal bruke til avbildning.
4. Bekreft at kontrastfarge er angitt, at hver kanal har riktig farge, filtertilordning og Z-stabelinnstillinger etter behov.
5. Velg kontrastfargekomponenten. Når den fluorescerende lukkeren er åpen, kan eksponeringsglidebryteren justeres om nødvendig for å vise direktebildet.
6. Fokuser og plasser bildet etter behov.
7. Bekreft at **Automatisk eksponering** er uthvet, og klikk på **Avbildning**.
  - Den optimale kameraeksponeringen beregnes for kontrastfargen, og bildet tas automatisk.
  - Når filtrene er flyttet, beregnes den optimale kameraeksponeringen automatisk for den første probekanalen og bildet som tas.
  - Gjenværende kanaler avbildes automatisk i rekkefølge.
8. Gjenta trinn 5 til 7 for hvert nye bilde.

Alternativ: Ta **bilder** med automatisk konfigurert eksponering basert på et valgt område.

9. Velg kontrastfargekomponenten, klikk på et område av direktebildet for automatisk å justere kameraeksponeringen ved å bruke informasjonen kun i det området.
10. Fokuser og plasser bildet etter behov.
11. Klikk på **Avbildning**
  - Optimal kameraeksponering beregnes på nytt for kontrastfargen basert på det valgte området, og bildet tas automatisk.
  - Når filtrene er flyttet, beregnes den optimale kameraeksponeringen for det valgte området automatisk for den første probekanalen og bildet som tas.
  - Gjenværende kanaler avbildes automatisk i rekkefølge.
12. Gjenta trinn 9 til 11 for hvert nye bilde.

Alternativ: Ta **bilde** (uten automatisk konfigurasjon)

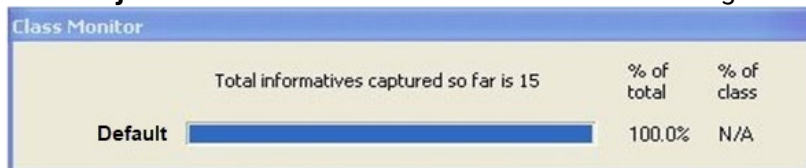
13. Velg kontrastfargekomponenten, juster om nødvendig eksponeringsglidebryteren manuelt eller ved å klikke på et valgt område av direktebildet.
14. Fokuser og plasser bildet etter behov.
15. Velg den neste kanalen, og etter at filteret er flyttet justerer du om nødvendig eksponeringsglidebryteren manuelt eller ved å klikke på et valgt område av direktebildet.
16. Gjenta for de gjenværende kanalene, og sørg for at en optimal direktebildeeksponering er forhåndsinnstilt for hver komponent i avbildningslisten.
17. Bekreft at **Automatisk eksponering** ikke er uthvet, og klikk på **Avbildning**. Kontrastfargebildet tas umiddelbart og, når filtrene er flyttet, hver fluorokromkanal uten å justere kameraeksponeringen.
18. Gjenta trinn 13–17 for hvert nye bilde (juster eksponeringen på nytt i trinn 15 og 16 for flere bilder om nødvendig).

## Manuell punktavbildning



Eksempel på prosedyre for opptak av punkttellingsbilder på et avbildningssystem.

1. Angi standard avbildningsskjerm ved å velge ikonet Avbildningsskjerm på hovedverktøylinjen.
2. Åpne eller opprett en sak, og velg et objektglass i Navigator. Hvis du trenger å opprette et objektglass, klikker du på høyre museknapp i saken og velger New Slide (Nytt objektglass) fra menyen.
3. Klikk på **Capture Mode** (Avbildningsmodus), og velg Punkttelling 
4. Vinduet **Eksisterende analyser** åpnes. Velg en analyse som passer for objektglasset og probesettet som skal brukes, og klikk på OK for å tilordne den til objektglasset.
5. Bekreft at fluorokrominnstillingene i **fluorokromvalgpanelet** er riktige for objektglasset og probene som skal avbildes.
6. Bekreft at **Automatisk kamerakonfigurasjon** og **Lagre stabler** er valgt i vinduet **Avbildningstilpasning**.
7. Bruk hurtigtasten på tastaturet (tall) for å gå til riktig kontrastfargefilter og åpne den fluorescerende lukkeren.
8. Finn et område som inneholder cellemateriale manuelt, og bytt til avbildningsobjektivet med høy forstørrelse ved hjelp av panelet *Objektiver*. Fokuser og overfør alt lys til kameraet.
9. Klikk på **New Cell** (Ny celle)
10. Klikk på **Live (Direkte)\***. Bildet vises på skjermen, og kameraeksponeringen justeres for optimal kontrast.
11. (Valgfritt) Hvis du har en sterk kontrastfargeintensitet, åpner du grensesnittpanelet for fluorescerende lampe og justerer % for lampeintensitet til en lavere verdi. Dette for å redusere UV-fotobleking. DAPI-filter. 
12. Fokuser på nytt, og plasser cellene i direktebildet. *Automatisk konfigurasjon* kan velges hvis dette endrer kontrasten eller metningen. Hvis det er nødvendig, åpner du vinduet **Konfigurasjon av avbildning og fluorokrom** for å justere:
  - glidebryterne for svart og lys til en forbedret bildekontrast er oppnådd
  - glidebryterne for (avanserte) **Automatiske innstillinger** kan endres hvis du vil forbedre kontrasten for automatisk konfigurasjon
13. Sjekk bildefokuset på nytt, og klikk på **Capture** (Avbildning). Bildet vil bli lagret.
14. Hvis **Automatisk sekvens** er aktiv, vil systemet fange opp de gjenværende fluorokromene i rekkefølge\*, automatisk justere kameraeksponeringen og avbilde flere Z-stabelplan som er konfigurert i analysen.
15. Hvis **Automatisk sekvens** er deaktivert, klikker du på **Live (Direkte)\*** for å avbilde neste fluorokrom, og gjenta trinn 10–13 til alle fluorokromene er avbildet.
16. Klikk på knappen **Class Monitor** (Klasseskjerm) nederst i vinduet Fluorokromvalg for å se hvor mange celler som har blitt behandlet og scoret fra avbildningen.
17. Gjenta trinn 9–12 (13) for å ta påfølgende bilder på forskjellige områder av objektglasset til **klasseskjermen** «Total antall informative ...» er tilstrekkelig for analysen.



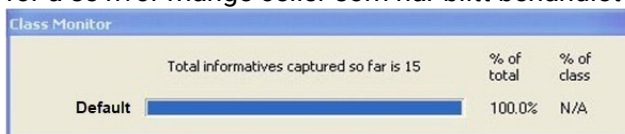
18. Gå til **Analyse**-skjermen for å fullføre avbildningen og behandlingen.

\* Du vil bli bedt om å bytte filtre hvis du ikke har et aktivt grensesnitt til mikroskopets dikroiske tårn.

## GSL: Automatisk punkttelling

Eksempel på prosedyrearbeidsflyt for skanning og automatisk avbildning av interfase-FISH-punkttellingsbilder på et GSL-skannesystem uten strekkodeetiketter.

1. Gå til **skanneskjermen**, slik at programmet kan koble til og starte maskinvaren.
2. (Valgfritt) Last inn et objektglass på hyllen, og bruk [prosedyren for manuell punktavbildning](#) for flere bilder for å bekrefte kamera-, filter- og Z-stabelverdier.
  - Dette vil opprette en bilderamme der analyseparametrene kan evalueres på et kontrollert sett med bilder.
  - Ta ut brettet når du er ferdig, og rengjør objektglasset for eventuell olje hvis det skal brukes igjen til skanning
3. I skanneskjermen velger du ikonet **Skann en objektglassbatch**.
4. Klikk og uthev objektglassikon 1 (posisjon 1, brett 1):
  - Velg saken bildedataene skal lagres i.
  - Velg en passende skannemal for objektglasset.
5. (Valgfritt) Du kan gi navn til hvert objektglass ved å klikke på etiketten i den frostede enden av objektglassvisningen.
6. Rediger malen, og bekreft at den er konfigurert for *fluorescerende søk* og *interfasesøk*, og at avbildningsmodusen er satt til **SpotCounting** (Punkttelling).
7. Klikk på knappen **Select SPOT Assay** (Velg SPOT-analyse) for å åpne dialogboksen **Eksisterende analyse**.
  - Velg en analyse fra listen eller opprett en ny analyse som passer for objektglasset.
  - Bekreft analyseinnstillingene, og klikk på **OK** for å tilordne den valgte analysen.
8. Skannemalen er klar til bruk. Klikk på **OK** for å tilordne den til det valgte objektglasset.
9. Plasser riktig prøveobjektglass (som samsvarer med saken som ble valgt i trinn 5) i posisjon 1 på brettet.
10. Velg neste objektglassikon, og tilordne en sak og en skannemal. Legg det samsvarende prøveobjektglasset i brettet og sjekk at det er riktig plassert.
11. Gjenta for eventuelle resterende objektglass og posisjoner som skal brukes i det første brettet. Last brettet i første (laveste) posisjon i løftemaskinen/kassetten.
12. Gjenta trinnet for opptil 5 objektglass i brett 2. Last brettet i neste (laveste) posisjon i løftemaskinen/kassetten. **Ctrl** eller **Shift** lar deg velge flere objektglass med musen og tilordne samme sak eller mal til dem.
  - På GSL 120-systemer gjentar du denne prosedyren for alle gjenværende objektglass og brett som skal brukes. Plasser deretter kassetten i løftemaskinen, og lukk døren.
13. Velg **Scan** (Skanning): Det første objektglasset vil bli skannet med 10x for å finne celler, olje tilsettes automatisk og blir deretter avbildet ved høy forstørrelse.
14. Under avbildning vil skjermen vise standard avbildningsskjerm i **punkttellingsmodus** (se [Automatisk punktavbildning](#) for mer informasjon).
15. (Valgfritt) Klikk på knappen Class Monitor (Klasseskjerm) nederst i vinduet Fluorokromvalg for å se hvor mange celler som har blitt behandlet og scoret fra avbildningen.



16. Når den første av analysestopptellingene er nådd, vil avbildningen fullføres og gå videre til neste objektglass, gjenta skanningen, oljetilsettingen og den automatiske avbildningen til alle objektglassene er fullført.

