

Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives



CytoVision DX (9.0)* Sonda

*Registado no Escritório de Patentes e Marcas Registradas dos EUA e em jurisdições em todo o mundo.

Instruções de Funcionamento



O CytoVision* 9.0 destina-se a uma utilização em diagnóstico *in vitro*

Instruções de funcionamento do *CytoVision* DX*: Sonda

Este manual aplica-se aos sistemas de digitalização e captura *CytoVision DX* e ao software de aplicação *CytoVision DX* versão 9.0

Aviso de direitos de autor

© 2024 Leica Biosystems Richmond, Inc. Todos os direitos reservados.

LEICA e o logótipo Leica são marcas comerciais registadas da Leica Microsystems IR GmbH.

CytoVision é a marca registada da Leica Biosystems Richmond, Inc. Todas as marcas registadas de terceiros são propriedade dos respetivos detentores.

*Registado no Escritório de Patentes e Marcas Registadas dos EUA e em jurisdições em todo o mundo.

As informações que constam no presente documento estão sujeitas a alteração sem aviso e não representam um compromisso por parte da Leica Biosystems Richmond, Inc.

Nenhuma parte deste manual pode ser copiada ou distribuída, transmitida, transcrita, guardada num sistema de recuperação ou traduzida para qualquer língua humana ou linguagem informática, em qualquer forma ou por quaisquer meios, sejam eles eletrónicos, mecânicos, magnéticos, manuais ou outros; ou revelada a terceiros sem o consentimento expresso da Leica Biosystems Richmond, Inc, 5205 Route 12, Richmond, IL 60071, EUA.

Os Sistemas *CytoVision DX* são fabricados e distribuídos por:



Leica Biosystems Richmond, Inc.
5205 Route 12



Richmond, IL 60071

EUA

Tel. (800)-537-4669

Informações de contacto

Visite www.LeicaBiosystems.com para obter informações de contacto dos departamentos de vendas e assistência técnica mais próximos da Leica Biosystems.

Índice

Precauções e notas	6
Introdução.....	7
Recursos.....	7
Identificação dos símbolos.....	8
Avisos e precauções	8
Especificações das amostras e lâminas.....	9
Descrição geral da sonda do <i>CytoVision DX</i>.....	10
Digitalização de lâminas FISH	10
Captura de FISH e Ecrã.....	11
Visualização e análise de imagens FISH.....	11
Imagem FISH e tipos de dados	12
Início de sessão do utilizador & Início do software de aplicação	14
Digitalização de lâminas interfásicas.....	15
Procedimento de arranque rápido	15
Modelos de lâminas.....	15
Classificadores.....	15
Opções de captura automática.....	15
Carregamento de lâminas e bandeja	16
Digitalizar lote de lâminas (interfase)	17
Configuração de digitalização manual.....	19
Atribuição de casos e modelos.....	19
Fluxos de trabalho de configuração manual da digitalização	20
Digitalização de códigos de barras.....	22
Atribuir configuração de lâminas	22
Fluxos de trabalho de leitura de códigos de barras.....	23
Modelos de lâminas (FISH)	24
Área de digitalização	24
Pré-Digitalização.....	25
Digitalização	25
Captura automática	26
Visualização e ajuste de imagens	29
Revisão das listas de interfase	30
Vista de notas (interfase)	31
Vista de lâminas (interfase)	32
Classificadores de digitalização.....	33
Captura automática.....	35
Captura automática	35

Captura de sonda (imagens de células).....	37
Controlo da objetiva	37
Captura da sonda: Síntese do procedimento	38
Controlos de captura	38
Listas de captura.....	39
Configuração de captura e fluorocromos.....	40
Personalizar captura.....	43
Delimitação	45
Delimitação automática	46
Nova delimitação da imagem em bruto.....	46
Captura de sonda (lista de fotogramas).....	47
Controlo da objetiva	48
Captura da lista de fotogramas: Síntese do procedimento	48
Opções de configuração de captura.....	49
Adicionar canais.....	49
Configurar um canal	49
Trabalhar com listas de captura	51
Captura de imagens	52
Terminar a captura.....	53
Exibição de imagens da sonda	54
Exibição do ecrã	54
Resolução de problemas.....	57
Sistema de captura	57
Erros na ligação ao microscópio.....	57
Efeito de qualidade da luz do microscópio	57
Sistema de digitalização GSL	57
Erros na ligação ao GSL	57
Problemas de focagem de digitalização 10x.....	58
Problemas de classificação de digitalização 10x.....	58
Problemas de focagem da captura 63x	58
Problemas de captura de canal de sonda	59
Compatibilidade de lâmina/bandeja	59
Exportar registos de diagnóstico	60
Anexo: Contagem de pontos.....	61
Visão geral da contagem de pontos	61
Ensaio de contagem de pontos	62
Editar ensaios para captura de pontos	63
Digitalização e captura de pontos	65
Modelo de lâmina (configuração da digitalização).....	65

Captura manual.....	67
Captura e monitor de classe	67
Paragem da captura de pontos automática.....	68
Anexo: FISH de tecidos	69
Descrição geral da FISH de tecidos	69
Digitalização e captura da FISH de tecidos	69
1) Digitalização automática e captura automática:	69
2) Digitalização automática e marcação manual de regiões:.....	70
3) Seleção manual da região para a captura automática:.....	70
Captura manual.....	70
Gravação de lâminas.....	71
Marcação da FISH de tecidos (captura diferida)	72
Ecrã Markup Viewer [Visualizador de marcação]	72
Anexo: Captura de M-FISH	75
Introdução à técnica M-FISH.....	75
Descrição geral da captura	76
Configuração da captura	76
Lista de capturas.....	76
Fluomap.....	77
Filtros e microscopia.....	78
Captura de imagens de M-FISH	79
Delimitação manual	81
Nova delimitação	81
Reprocessar	82
Anexo: Exemplo de procedimentos passo a passo	83
Captura de sonda padrão	83
Captura de sonda manual de fotogramas de imagem	84
Captura de pontos manual.....	85
GSL: Contagem de pontos automática.....	86

Precauções e notas

Embora tenham sido envidados todos os esforços para assegurar a precisão das informações, alguns dos detalhes e ilustrações podem diferir entre as variantes individuais do sistema.

Nem todas as categorias podem aplicar-se à configuração do utilizador final.

Especificações e desempenho

Para obter as especificações do produto e dos componentes, consulte as **Especificações do CytoVision DX**.

Instalação de hardware

Os componentes de hardware do Sistema de captura e digitalização *CytoVision DX* são fornecidos para instalação apenas pela Leica Biosystems e respetivos representantes autorizados.

Instalação do software da aplicação

As estações de trabalho para PC fornecidas pela Leica Biosystems serão pré-instaladas com software de aplicação. Para obter instruções específicas sobre a instalação da aplicação num PC separado, consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.

Formação

Este manual e o **Manual do Utilizador do CytoVision DX** são complementares à formação do operador e a outras instruções avançadas fornecidas pela Leica Biosystems ou pelos seus representantes autorizados.

Manutenção e resolução de problemas

Para obter informações sobre a resolução de problemas de digitalização e captura, consulte o capítulo **Resolução de problemas**.

Para obter informações sobre a manutenção geral do sistema e a resolução de problemas, consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.

Reparação

As reparações só podem ser efetuadas por um representante autorizado da Leica Biosystems. Após qualquer trabalho de reparação, peça ao técnico para efetuar verificações de funcionamento para confirmar que o produto está nas condições de funcionamento previstas.

Cibersegurança

Esteja ciente de que as estações de trabalho são suscetíveis a malware, a vírus, a corrupção de dados e a quebras de privacidade. Para obter orientações de cibersegurança para o utilizador final, consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.

Deve trabalhar com o administrador informático para proteger as estações de trabalho, seguindo as políticas de palavras-passe e de segurança da sua instituição. Para obter instruções específicas e recomendações sobre como proteger as estações de trabalho e os servidores, consulte a secção **Especificações do CytoVision DX; Administração da rede**.

Segurança

A proteção de segurança pode ser prejudicada se este dispositivo for utilizado de uma forma não especificada pelo fabricante.

Para obter informações sobre o funcionamento e a segurança do sistema, consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.

Introdução

O sistema **CytoVision DX** é um sistema qualitativo e automatizado para a criação e visualização de lâminas digitais.

O sistema CytoVision DX destina-se a ser utilizado em diagnóstico *in vitro* como auxiliar de um técnico qualificado para rever e interpretar imagens digitais de cromossomas em metáfase do sangue periférico e da medula óssea.

- O sistema CytoVision DX auxilia na localização de núcleos em interfase e metáfase em lâminas de vidro de microscópio *standard* que, de outra forma, seriam apropriadas para visualização manual por microscopia convencional de campo claro e fluorescente.
- É da responsabilidade do técnico qualificado utilizar procedimentos e salvaguardas adequados para garantir a validade da interpretação das imagens obtidas com o sistema CytoVision DX.

Certifique-se de que segue as boas práticas laboratoriais adequadas e as políticas e procedimentos exigidos pela sua instituição para a preparação, processamento, armazenamento e eliminação de lâminas.

Utilize este equipamento apenas para a finalidade e da forma descrita neste documento e no **Manual do utilizador do CytoVision DX**.

Recursos

Recurso	Descrição
Manual do utilizador do CytoVision DX 23MAN9D03	Fornece informações de referência e instruções para calibração pelo utilizador, digitalização de diapositivos, captura de imagens, visualização de imagens, gestão de casos e dados, resolução de problemas e manutenção.
Instruções de funcionamento do cariotipador CytoVision DX 23MAN9D02	Contém instruções para digitalização de lâminas metafásicas, captura de imagens, visualização de imagens, análise de cromossomas (cariotipagem) e resolução de problemas da aplicação.
Instruções de utilização da sonda do CytoVision DX 23MAN9D01	(Este documento) Contém instruções para a digitalização de lâminas fluorescentes (FISH), captura de imagens, visualização de imagens, análise cromossómica (cariotipagem) e resolução de problemas da aplicação (este documento).
Especificações do CytoVision DX 23MAN9D03	Fornece especificações pormenorizadas para as opções do produto CytoVision DX.

Identificação dos símbolos

Símbolo	Explicação
	AVISO , raio laser: proteger os olhos e a pele da exposição Radiação ótica, nunca olhe diretamente para o raio de luz.
	ATENÇÃO : Perigo de compressão: mantenha os dedos afastados das peças em movimento.
	Marcação CE de conformidade
	Fabricante

Avisos e precauções

O sistema de captura ou digitalização fornecido com microscópio e componentes de digitalização motorizados é um instrumento de precisão que deve ser manuseado com cuidado e operado apenas por pessoal com formação adequada. Sujeitar o sistema a um impacto súbito ou grave deve ser sempre evitado.

Para mais informações, consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.

Especificações das amostras e lâminas

Funcionalidades	Detalhe
Tipo de amostra	A funcionalidade da sonda do <i>CytoVision DX</i> é utilizada para a detecção e aquisição de imagens de cromossomas metafásicos com coloração com fluorescência, núcleos de células em interfase e tecidos. As amostras dos exemplares devem ser efetuadas utilizando técnicas homologadas de cultura e preparação de células e devem ser apresentadas em lâminas de microscópio de vidro.
Coloração das amostras	O sistema está otimizado para a coloração DAPI de células em interfase. O desempenho não está validado em todas as técnicas possíveis de coloração e preparação de amostras e está diretamente relacionado com a qualidade e intensidade da coloração da amostra e dos resíduos de fundo na lâmina do microscópio. Uma intensidade de coloração ou de fundo atípica pode reduzir a detecção das células e a eficiência da captura automática e requerer intervenções adicionais por parte do utilizador.
Especificações das lâminas	Tipo de lâmina: Lâminas de vidro para microscópio com rebordo quadrado (vertical). Dimensões das lâminas: 90° com cantos quadrados dentro do intervalo de 75,1 a 76,1 mm de comprimento; 24,9 a 26,1 mm de largura; 0,9 a 1,2 mm de espessura - As lâminas que excedam estas dimensões podem não caber na bandeja GSL e não são suportadas para a operação do sistema de digitalização. - As lâminas mais pequenas do que estas dimensões ou com cantos de 45° (cortados) podem não caber na bandeja GSL <i>standard</i> e devem utilizar a bandeja alternativa (biselada) 23GSL903XXX001 - isto tem de ser especificado com a encomenda do sistema. A utilização de lâminas que não sejam de vidro não é recomendada, pois elas podem não encaixar com segurança na platina ou podem estar sujeitas ao movimento na mesma, o que pode afetar o desempenho do sistema e a qualidade da imagem.
Lamela da lâmina	A utilização e montagem de uma lamela de vidro é necessária para a obtenção de imagens de fluorescência. - Uma espessura de lamela de 170 um (+/- 5 um) é ideal para precisão ótica com lentes objetivas de imersão em óleo de grande ampliação. - A lamela não deve ultrapassar a margem da lâmina de vidro de microscópio. Toda a lamela e etiqueta têm de ser coladas à lâmina de vidro. - A montagem da lamela deve estar isenta de bolhas de ar e deve assentar antes de ser usada. A montagem da lamela não deve impedir que as objetivas do microscópio atinjam as suas posições focais relativamente à amostra.
Limitações das lâminas	As lâminas com coloração com DAPI devem apresentar uma intensidade de coloração brilhante e de elevado contraste, visível para o utilizador quando visualizadas a 10x através das oculares do microscópio, com anti-desbotamento para reduzir a fotobranqueamento. Uma concentração ou intensidade reduzida da coloração DAPI na lâmina pode levar a uma diminuição da fiabilidade da focagem de 10x e do funcionamento da digitalização ou a falhas na digitalização.

Descrição geral da sonda do CytoVision DX

As instruções de funcionamento contidas neste documento abrangem o controlo da aplicação e as operações específicas dos procedimentos de digitalização, captura, visualização e pontuação de lâminas FISH aplicáveis aos sistemas *CytoVision DX* configurados para o módulo de software licenciado da **Sonda**.

É necessário que o utilizador esteja familiarizado com a utilização geral da aplicação, as funções do ecrã, os controlos da interface de hardware, a gestão de casos, as funções de visualização do ecrã e da imagem e as aplicações associadas que são comuns a todos os sistemas instalados com o software de aplicação do *CytoVision DX*.

- Estes são descritos no **Manual do Utilizador do CytoVision DX**:

São fornecidas Instruções de Funcionamento adicionais para instruções específicas de amostras e de fluxo de trabalho sobre procedimentos de digitalização de lâminas metafásicas, captura e cariotipagem.

- Estas são descritas em pormenor no **manual de instruções do cariotipador CytoVision DX** :

Todas as decisões de interpretação de imagem são tomadas pelo utilizador. Não existe qualquer requisito qualitativo para a amostra, no entanto, as ferramentas de captura e visualização de imagens estão otimizadas para imagens adquiridas utilizando uma lente objetiva de microscópio de imersão em óleo e de grande ampliação com material de amostra com coloração com DAPI, apresentando sondas de ADN coloridas utilizando conjuntos de filtros de fluorescência de banda estreita e adequados à amostra.

Digitalização de lâminas FISH

O rastreio de lâminas FISH e a captura automática utilizam as funções de localização, classificação, realocação e captura de amostras fluorescentes do software da aplicação.

Antes de qualquer digitalização automática e captura automática;

- Deve ser efetuada uma **Calibração de Digitalização Fluorescente** para a intensidade da câmara e os desvios de focagem entre as objetivas de digitalização e de captura.
- Os modos de *Captura automática* de modelos de diapositivos utilizam fluorocromos e definições de captura a partir do ecrã de **captura**, configuração de *Lista de criação*, *Lista de gravação ou Personalizar*. Estes devem ser definidos e configurados antes de qualquer digitalização automática e captura automática.

Para cada tipo de amostra, existe um modo recomendado *Localizador* de digitalização e *Captura automática* com base nos requisitos de visualização previstos para o tipo de amostra.

Slide Type	Pré-digitalização (1,25x)	Modo localizador (fluorescente)	Modo de captura automática	Formato da imagem
FISH metafásico	N/A	Metáfase	Sonda	Pasta de células
FISH interfásico	N/A	Metáfase	Sonda	Pasta de células
FISH interfásico	N/A	Interfase	Sonda automática / Contagem de pontos	Lista de fotografias
Tecido-FISH	Deteção de gravura	Tecido	Sonda automática / Contagem de pontos	Lista de fotografias
M-FISH	N/A	Metáfase	N/A (apenas manual)	Pasta de células

- O modo Localizador de *tecidos* requer o módulo licenciado **Tecido FISH**.
- A captura de *contagem de pontos* requer o módulo licenciado de **Contagem de pontos** para o processamento automático de sinais de imagens FISH interfásicas durante a captura de imagens.
- As combinações alternativas de modos de digitalização e captura não estão limitadas ao funcionamento do utilizador, mas podem não ser ideais para a captura ou para os requisitos de visualização subsequentes.

Um modelo de diapositivo do sistema de digitalização GSL pode ser definido com várias áreas de digitalização sobrepostas na mesma lâmina - cada área de digitalização pode ser definida para um modo de captura automática fluorescente diferente - se for necessário ter imagens nos formatos de pasta de células e de lista de fotogramas para visualização.

Captura de FISH e Ecrã

Os sistemas *CytoVision DX* utilizam 2 formatos de imagem nos quais as imagens FISH podem ser guardadas para posterior visualização de imagens: **pasta de células** e **Frames de imagens** (*Lista de fotogramas*).

Tipo de amostra	Captura automática	Captura manual	Opções de captura
FISH metafásico	Sonda	Sonda (célula)	Delimitação
FISH interfásico	Sonda	Sonda (célula)	Delimitação, pilha Z
FISH interfásico	Sonda automática	Sonda (Fotograma)	Pilha Z
FISH interfásico	Contagem de pontos	Contagem de pontos*	Ensaio de pontos
MFISH (metáfase)	N/A	MFISH* (Célula)	N/A
* requer módulos de software licenciados adicionais			

Visualização e análise de imagens FISH

Tipo de imagem	Utilização de análise	Opções de análise	Opções de ecrã/saída
Imagens de pastas de células (sonda padrão ou captura M-FISH)			
Guardar Imagem em Bruto	Voltar a delimitar	n/a	Exportar
Sonda (FISH Metafásico)	Mostrar, Criar metáfase*	Mostrar Visualização de casos, anotação	Exportar e imprimir
Sonda (MFISH*)	Ecrã	Mostrar Visualização de casos, anotação	Exportar e imprimir
Sonda (FISH interfásico)	Ecrã	Mostrar Visualização de casos, anotação	Exportar e imprimir
Metáfase (MFISH*)	Segmentação e criação de cariograma*	Contagem e número de visualizações de casos. Anotação, visualização MFISH	Exportar e imprimir

** Requer módulos de software licenciados adicionais (para opções de cariógrama , consulte o **Manual de instruções do cariotipador**).*

Imagens da lista de fotogramas (Captura automática da sonda ou contagem de pontos)

Lista de fotogramas	n/a	n/a	n/a
---------------------	-----	-----	-----

As imagens requerem a utilização de software de análise de imagem separado compatível com o formato "lista de fotogramas".

Imagem FISH e tipos de dados

Existem 2 formatos de imagem utilizados pelo *CytoVision DX* para captura.

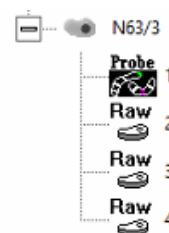
1. Imagens de casos (pasta de células) que são capturadas utilizando as opções de ecrã de captura padrão.
2. Lâminas da lista de fotogramas que são capturadas utilizando os modos dedicados de Captura de sonda (Quadro de imagem).

Antes de proceder à digitalização ou captura de lâminas FISH, é importante utilizar o modo de captura mais adequado para determinar as opções de visualização e análise disponíveis.

Sonda (pasta de células).

Um formato baseado em células concebido para amostras de FISH em metáfase ou interfase, com visualização de imagens e interação utilizando ferramentas de ecrã de arranque padrão.

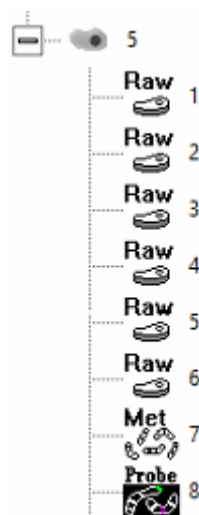
- Captura manual utilizando o modo de *Sonda* do ecrã de captura.
- Captura automática do sistema de digitalização utilizando o modo de captura de *Sonda* no modelo de diapositivo.
- As imagens a cores e em bruto são guardadas em células individuais ao nível do diapositivo do Navegador de casos.
- Opções de melhoria de imagem, anotação, impressão e exportação.
- As imagens podem ser apresentadas na vista de casos.
- A delimitação opcional (eliminação de fundo) cria objetos que podem ser copiados para ecrãs Flexíveis e combinados com objetos de imagem de outros modos ou casos de captura padrão.
- Os cariótipos de sonda podem ser criados a partir de imagens de metáfase FISH num sistema com o módulo de software licenciado Karyotype ativado.



M-FISH.

Um formato baseado em células concebido para amostras FISH combinatórias marcadas (multicoloridas), com visualização de imagens e interação utilizando ferramentas de ecrã de arranque padrão.

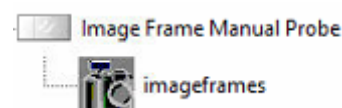
- Captura manual utilizando o modo *MFISH* do ecrã de captura.
- A captura automática do sistema de digitalização não é possível.
- As imagens a cores e em bruto são guardadas em células individuais ao nível do diapositivo do Navegador de casos.
- Os cariótipos M-FISH podem ser criados a partir de imagens metafásicas num sistema com o módulo de software licenciado *Karyotype* ativado.
- Opções de melhoria de imagem, anotação, impressão e exportação.
- As imagens podem ser apresentadas na vista de casos.
- Os objetos podem ser copiados para ecrãs flexíveis e combinados com objetos de imagem de outros modos ou casos de captura de pastas celulares.



Sonda (Lista de fotografamas).

Um formato de imagem completo concebido para amostras de FISH em interfase ou em tecidos, compatível com software de análise de imagens separado para visualização e interação.

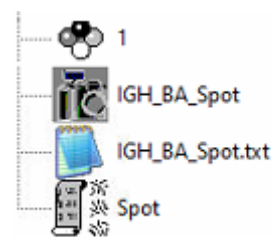
- Captura manual utilizando o ecrã **Captura de sonda** de fotograma de imagem.
- Captura automática do sistema de digitalização utilizando o Modo de captura *SondaAuto* no modelo de diapositivo.
- Sem limiar de objetos. Todos os dados de imagem a cores e em bruto são combinados numa única *lista de fotografamas* ao nível do diapositivo.
- As camadas da pilha Z são guardadas como imagens individuais juntamente com a projeção máxima.



Contagem de pontos.

Nos sistemas com o módulo de **contagem de pontos**, estão disponíveis as opções adicionais;

- Captura manual utilizando o modo de *contagem de pontos* do ecrã de captura padrão (guarda como lista de fotografamas).
- Captura automática do sistema de digitalização utilizando o modo de captura de *contagem de pontos* no modelo de digitalização.
- Processamento automático de sinais utilizando um ensaio pontual configurável para parâmetros de captura e digitalização.

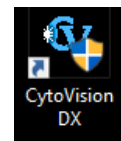


Ao selecionar quando utilizar as opções alternativas de captura Sonda, devem ser consideradas as principais diferenças entre cada tipo de captura e as capacidades de análise subsequentes.

Os dados de *Lista de fotografamas* (Lista de fotografamas de sondas e contagem de pontos) não têm opção de visualização ou análise com a aplicação *CytoVision DX* e requerem a utilização de software de análise de imagens separado compatível com o formato "lista de fotografamas".

Início de sessão do utilizador & Início do software de aplicação

1. Ligar o monitor da estação de trabalho e o PC e, quando solicitado, iniciar sessão com um nome de utilizador que tenha as permissões de segurança adequadas para a aplicação.
2. Ligar os controladores da GSL, do microscópio e da lâmpada fluorescente, conforme necessário para a utilização.
3. Inicie a aplicação fazendo duplo clique no ícone do ambiente de trabalho ou seleccionando o atalho no **menu Iniciar do Windows (Todos os programas) > CytoVision DX > CytoVision DX**
4. É apresentada a confirmação do utilizador final.



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. Clique em **Aceitar** para confirmar a utilização e continuar com a aplicação (ou **Cancelar** para fechar).

Digitalização de lâminas interfásicas

Procedimento de arranque rápido

Estas instruções pressupõem que, antes de iniciar um exame completo com detecção de interfase fluorescente e captura automática de imagens;

1. O sistema foi corretamente configurado e calibrado (incluindo a **Calibração de Digitalização Fluorescente**) de acordo com os procedimentos padrão da Leica Biosystems, tal como descrito no **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.
2. Está disponível um **classificador** de células adequado.
3. Foi concluída uma captura manual com a criação de **listas de fluorocromos** e **opções de pós-captura** para os modos de sonda.
4. Foi criado um **modelo de diapositivo** com uma área de digitalização válida e regras de digitalização e captura.
5. As lâminas foram colocadas na cassete da bandeja GSL, começando no tabuleiro 1, posição 1.

Modelos de lâminas

Cada lâmina a digitalizar tem de ser atribuída a um modelo de digitalização que contém todas as definições necessárias para permitir ao sistema localizar células, classificá-las e ordená-las numa sequência de captura e, em seguida, capturar automaticamente o número necessário de imagens.

- Para mais informações, consulte a secção [Modelos de lâminas](#).

Classificadores

Os classificadores por predefinição fornecidos com o software baseiam-se em amostras representativas de interfase fluorescente que se espera que permitam o funcionamento inicial sem modificações significativas.

- Estes classificadores podem não corresponder às características das amostras do utilizador devido à variação esperada e normal na preparação de amostras e lâminas.
- Para cada um dos tipos de amostras a utilizar no sistema, o desempenho do classificador escolhido deve ser revisto para determinar se é necessária uma maior otimização.
- Imagens adicionais de novas digitalizações podem ser adicionadas aos classificadores predefinidos ou podem ser criados novos classificadores.
- Para mais informações, consulte a secção [Classificadores > Formação e edição](#).

Opções de captura automática

Cada um dos modos de captura automática disponíveis após a localização de células requer uma configuração de captura adequada para permitir a utilização com várias sondas (fluorocromos).

Para cada ensaio de sonda, a combinação de fluorocromos deve ser capturada manualmente para criar, modificar e guardar as **listas de fluorocromos** ou as **opções de pós-captura** necessárias no modelo de digitalização.

Estes devem ser configurados durante a captura manual de lâminas de FISH representativas para cada tipo de amostra ou kit de sonda ou ensaio Spot que se pretenda utilizar posteriormente para o rastreio e captura.

- Capture uma imagem representativa utilizando a captação manual no modo **Sonda**.

- Confirme as definições de filtro e cor para cada nome de fluorocromo e guardar a combinação de canais da sonda como uma "Lista de fluorocromos" para utilização com Captura automática de *Sonda* e *Sonda automática*.
- O modo de sonda também requer *opções de Pós-captura (Personalizar modelo de captura)*.
- O modo de contagem de pontos requer um ensaio associado a nomes de fluorocromos predefinidos.
- Para mais informações, consulte a secção de captura de cada modo.

Carregamento de lâminas e bandeja

Abra a porta e retire a cassete da bandeja do empilhador GSL.

- O empilhador tem de estar na sua posição mais baixa antes de o mecanismo de bloqueio da porta poder ser aberto e as bandejas serem adicionadas ou retiradas da cassete.
- O botão **Desbloquear porta** está disponível na janela **Configuração de digitalização*** do ecrã de digitalização (lote de digitalização de lâminas) ou quando clica no botão **Carregar lâmina** no ecrã Capturar. Este passo faz baixar a cassete e desbloqueia o mecanismo.



Colocar a(s) lâmina(s) limpa(s) na bandeja GSL com a etiqueta virada para trás.

- A lâmina 1 de cada bandeja está à esquerda. A lâmina deve estar isenta de resíduos de óleo e a lamela/amostra deve estar virada para cima.
- Certifique-se de que a lâmina está plana no encaixe e empurrada para cima (para trás) e para a esquerda contra as extremidades de referência antes de soltar o punho de mola para a manter no lugar.
- Quando o punho de mola estiver solto, certifique-se de que está a segurar firmemente a lâmina sem qualquer movimento se tocar ligeiramente na lâmina.
- Repetir o procedimento para as restantes lâminas e bandejas.



Nos sistemas GSL120, quando cada bandeja estiver carregada com lâminas, deve ser encaixada de novo na cassete da bandeja com o íman fixado no interior e o orifício sub-X virado para fora.

- A bandeja 1 é a posição mais baixa e a bandeja 24 a mais alta.
- Certifique-se de que cada bandeja está inserida ao nível (horizontal) na sua própria ranhura e que a extremidade exterior de cada bandeja está ao nível dos seus vizinhos.

Depois de fechar a porta, antes de iniciar uma nova digitalização ou captura automática, o sistema voltará a digitalizar a cassette em busca de bandejas.

- Durante a leitura de códigos de barras, todas as bandejas que forem detetados serão carregados e verificados quanto a lâminas que contenham códigos de barras.
- Na digitalização manual, a posição da bandeja corresponde às posições atribuídas manualmente com um nome de caso e de modelo no ecrã *Configuração da digitalização*.



Durante a digitalização e a captura automática, a cassette é levantada para bloquear a porta, por motivos de segurança. Se for necessário adicionar ou remover uma bandeja, é necessário parar a digitalização ou captura em curso.

* Uma verificação de utilização de memória é executada quando a *configuração de digitalização* é selecionada para determinar se um lote completo de lâminas pode ser digitalizado. Se a utilização da memória da aplicação for superior a um limiar configurado.

- Uma mensagem de aviso será exibida e a janela *Configuração de digitalização* não será aberta.
- A aplicação tem de ser reiniciada antes de se poder realizar qualquer atividade relacionada com a verificação.

Digitalizar lote de lâminas (interfase)

1. Garantir que a GSL e os componentes do microscópio estão ligados e que existe óleo suficiente no mecanismo de lubrificação.
2. Inicie a aplicação *CytoVision DX* e passe para o ecrã de digitalização, permitindo que a aplicação estabeleça a ligação e o hardware.
3. Clique no ícone "Scan batch of slides" [Digitalizar lote de lâminas], abrindo a janela de configuração manual da digitalização (para diapositivos com código de barras que tenham os seus códigos de barras associados a um nome de caso e a um modelo de diapositivo, salte para o passo **12** após a colocação das lâminas nas bandejas e na cassette).
4. Clique e realce a lâmina 1 (posição 1 a platina).
5. Selecione o caso em que os dados da imagem serão guardados.
6. Selecione o modelo de lâminas que tem as regras de digitalização e captura automática corretas para a lâmina.
7. Clique na etiqueta na extremidade fosca da apresentação da lâmina para lhe dar um nome.
6. Colocar a lâmina de amostra que corresponde ao caso selecionado (e nome da lâmina) na posição 1 da bandeja. (Para mais informações, consulte o procedimento de Carregamento de lâminas e bandejas).

7. Selecione o ícone da lâmina seguinte e atribua um caso e um modelo de digitalização. Adicionar a lâmina de amostra correspondente à bandeja e verificar se está corretamente colocada.
8. Repetir o procedimento para as restantes lâminas e posições a utilizar na primeira bandeja. Carregue a bandeja 1 na primeira posição (mais baixa) do empilhador/cassete.
9. Repita este procedimento para todas as restantes lâminas e bandejas e carregue a cassete na unidade de empilhamento.
10. Coloque a cassete no empilhador GSL e feche a porta.
11. Selecione o botão Digitalizar para iniciar a digitalização.
(Para lâminas com códigos de barras, selecione o ícone *Digitalizar lâminas com códigos de barras*).
12. A primeira lâmina será digitalizada com as opções de digitalização definidas no modelo.
- Digitalizar (10x): ver [Modelos de lâminas > Digitalizar](#)
13. Para poder iniciar uma digitalização de 10x, o sistema deve completar um mapa de focagem em vários pontos dentro da área de digitalização.
- Isto depende da correta **Calibração da digitalização fluorescente e**
- do ponto de focagem inicial estar próximo da amostra, definido durante a **Calibração Espacial** (modificado por qualquer desvio de focagem guardado no Modelo de lâmina).
14. Durante a digitalização de 10x, o sistema analisa as imagens da câmara em cada movimento de fase (fotograma) e compara quaisquer objetos detetados com o [classificador](#) configurado no Modelo de diapositivo. Isto determina quantas células classificadas estão disponíveis para captura.
15. Uma vez concluído o exame 10x, as células classificadas são ordenadas para determinar a classificação da captura antes de passar à fase de *Captura automática*.
16. O óleo é então automaticamente adicionado e a lente de grande ampliação é colocada em posição, fazendo uma "dança do óleo" para o espalhar uniformemente pela superfície da lâmina.
17. As imagens (fotogramas) são então capturadas com grande ampliação. Para cada imagem, o sistema faz a focagem automática para determinar a posição focal e, em seguida, capta utilizando as definições específicas do modelo antes de passar para a célula seguinte.
18. Quando o número correto de imagens tiver sido captado (conforme configurado no modelo de digitalização ou no ensaio de pontos), a captura termina e o *CytoVision DX* passa para a lâmina seguinte, repetindo a digitalização, a lubrificação e a captura automática até todas as lâminas estarem completas.
19. A aplicação do **Monitor de digitalização** regista a atividade e os tempos de cada fase de Pré-digitalização, Digitalização e Captura do lote de digitalização e deve ser revista para detetar qualquer problema inesperado.

Para mais fluxos de trabalho passo a passo, consulte o [Anexo](#) no final deste manual.

Configuração de digitalização manual

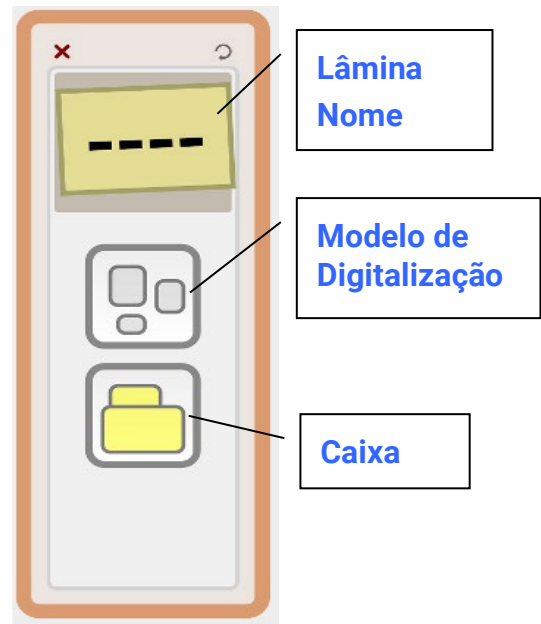


Com todas as configurações manuais de digitalização, e de lâmina, é importante verificar que a caixa e o modelo são correspondentes às lâminas reais, colocando-as fisicamente no sistema.

- Para reduzir os riscos de erro, recomenda-se a dupla verificação das lâminas e das definições, ou a utilização de uma folha de dados com as posições desejadas da caixa e das lâminas.
- A utilização da [leitura de códigos de barras](#) em lâminas etiquetadas nos sistemas GSL otimiza a eficiência da leitura e reduz o risco de erro na configuração da leitura.

Atribuição de casos e modelos

- No ecrã de Digitalização, selecione o ícone **Scan batch of slides** [Digitalizar lote de lâminas] a partir da barra de ferramentas principal, abrir-se-á uma janela que apresenta todas as potenciais posições de lâminas que podem ser definidas para a digitalização.
- Para cada lâmina a ser digitalizada atribua uma Caixa e Modelo. O nome da lâmina é opcional; se não for introduzido nenhum, o sistema utiliza o número seguinte possível para o caso com um identificador de posição da lâmina no final, ou seja, Lâmina 1_1 (para a bandeja 1).
- Clique no ícone do ficheiro da caixa e aparecerá uma lista de caixas que estão na rede. Selecione desta lista ou escreva o nome de uma nova caixa, que será criada.
- Quando seleccionar uma caixa, esta irá aparecer na parte direita do ecrã de configuração com um número de identificação.
 - É este número que é visualizado na apresentação da lâmina.
 - Sempre que a aplicação é reiniciada, esta lista é reposta.
- Se digitalizar várias lâminas do mesmo caso, clique no nome do caso nesta lista para atribuir rapidamente o caso em vez de procurar no painel da pasta de casos. Clique no seletor Modelo de digitalização para seleccionar e atribuir um modelo à bandeja.
 - Quando o modelo tiver sido criado, este também irá aparecer na secção superior esquerda do ecrã de configuração da Digitalização para uma selecção rápida.
- Os nomes das lâminas são opcionais. Se for necessário um nome específico, clique na secção "Nome da lâmina" e escreva a descrição correta.
- Podem ser seleccionadas múltiplas lâminas utilizando as teclas **Ctrl** ou **Shift** e clicando com o rato.



Captura automática diferida

Quando todas as caixas e modelos tiverem sido atribuídos para o lote de lâminas no microscópio, aparecerá uma seta de seleção por baixo de cada lâmina.



Esta é a janela **Deferred Auto-Capture** [Captura Automática Diferida] que permite a um modelo ser substituído para separar os componentes de digitalização e captura automática;

- **Nenhum.** (Predefinição). O sistema digitaliza e captura automaticamente (se configurado) a lâmina antes de passar ao seguinte.
- Configuração padrão para digitalização e captura GSL com lubrificação automática.
- **Digitalizar.** Selecione esta opção para executar apenas a componente de digitalização do modelo. Após cada digitalização o sistema passará para a lâmina seguinte.
- Utilize num sistema GSL se estiver a rever manualmente as miniaturas de digitalização antes da captura automática (diferida).
- **Capture [Captura].** Selecione esta opção para efetuar apenas a Captura automática. Esta opção é selecionável se existirem células classificadas (bandeira verde) na lista de lâminas. A Captura irá seguir as regras do modelo, para o número de células e opções de organização.

Nota: As opções Digitalizar ou Capturar apenas selecionadas manualmente não são típicas da digitalização de amostras FISH para amostras interfásicas, mas são opcionais para a digitalização metafásica.

Quando todas as lâminas, caixas e modelos tiverem sido atribuídas e as bandejas tiverem sido colocadas na GSL, prima o botão **Scan [Digitalizar]** na parte inferior da página *Scan Setup* [Configuração da digitalização] para iniciar o processo de digitalização. O sistema funciona com cada uma das combinações de configuração de lâminas e modelos.

Fluxos de trabalho de configuração manual da digitalização

Na prática, isto abrange 2 fluxos de trabalho principais;

1. Digitalização e captura automáticas

Este é o procedimento de rotina para os sistemas GSL que utilizam a seleção de digitalização Metáfase fluorescente e Deteção de interfases.

As lâminas são definidas em *Configuração da digitalização* e **Nenhum** é confirmado a partir das opções de **Captura automática diferida**;

- A primeira lâmina é digitalizada com uma amplificação baixa e processada com o classificador selecionado.
- As células classificadas são ordenadas usando as regras de organização do modelo de Captura Automática.
- O óleo é automaticamente distribuído na lâmina e a captura automática de alta ampliação é iniciada. As células são focadas automaticamente e capturadas utilizando o modo de captura e as definições configuradas.
- Assim que o número de células selecionado estiver capturado, a platina move-se para a próxima lâmina ou bandeja e inicia a digitalização e captura automática para essa lâmina.
- O processo é repetido até que todas as lâminas existentes no lote estejam concluídas.

2. Digitalização com captura automática diferida (Metáfase)

Este procedimento é opcional para os sistemas GSL que utilizam a leitura da Detecção de metáfase fluorescente, em que existe um requisito do utilizador para rever, adicionar ou remover células classificadas antes de iniciar a captura automática.

As lâminas são selecionadas na página Configuração da digitalização e **Scan only** [Apenas digitalização] escolhida nas opções de **Deferred Auto-Capture** [Captura automática diferida];

- Todas as lâminas são digitalizadas com uma ampliação reduzida e processadas com o classificador selecionado.
- Quando a digitalização estiver concluída, o sistema regressa ao ecrã Digitalizar e para.

O operador tem agora a opção de iniciar imediatamente o processo de Captura Automática, ou primeiro rever qualquer das listas de metáfases, para modificar as células classificadas para captura, antes de guardar e voltar ao **Scan screen** [ecrã de Digitalização];

- Selecione o ícone *Scan Batch of Slides* [Digitalizar o lote de lâminas] manual para abrir a janela de Configuração da digitalização.
- Selecione o botão **Deferred** [Diferido] que estará agora presente na parte inferior da página.
Todos os diapositivos que só foram digitalizados no lote anterior (e que têm pelo menos 1 célula assinalada a verde na sua lista) terão a sua posição na bandeja e o nome do caso recarregados no ecrã com a visualização de captura "C" definida.
- Eliminar/Limpar (Opcional) quaisquer lâminas que não deseje capturar. Esta opção pode ser útil após uma revisão manual das listas de metáfases e para a identificação de que não existe nada de qualidade aceitável para captura em algumas das lâminas.
- Selecione o botão **Scan** [Digitalizar] para iniciar o processo de deslocamento automático comparando 10x as posições de focagem.
- As células classificadas são ordenadas usando as regras de organização do modelo de Captura Automática.

Utilizando *Deferred Capture* [Captura Diferida], o sistema faz um novo mapa de focagem no slide e compara-o com as imagens guardadas da digitalização original, aplicando um desvio automático que se ajusta a qualquer movimento menor da lâmina ou da bandeja introduzida durante a carga e descarga das bandejas.

- O óleo é automaticamente distribuído na lâmina e a captura automática de alta ampliação é iniciada. As células são focadas e capturadas automaticamente utilizando as regras das **Post Capture Options** [Opções de pós-captura] *Capture Customize* [Capturas personalizadas].
- Assim que o número de células selecionado estiver capturado, a platina move-se para a próxima lâmina ou bandeja e inicia o processo de captura para essa lâmina.
- A Captura automática é repetida sem que sejam necessárias mais interações, até que todas as lâminas atribuídas ao lote estejam concluídas.

Digitalização de lotes mistos

Todos os modos de digitalização FISH e de captura automática podem ser executados num lote misto no sistema GSL.

- Apenas as lâminas "digitalizadas" completarão o componente de digitalização de 10x
- As lâminas definidas com a opção "Nome" [Nenhum] realizarão os componentes de localização de ambas as células e captura automática.

- No final da primeira passagem, as lâminas *de captura diferida* podem ser atualizadas no ecrã de configuração da digitalização, premindo o botão **Deferred** [Diferido] para carregar as lâminas que ainda têm o componente de captura por concluir.
- Clique novamente em **Scan** [Digitalizar] para iniciar a captura automática das restantes lâminas.

NOTA: Em todas as configurações manuais de lâminas e digitalização, é importante verificar se a caixa e os modelos correspondem corretamente às lâminas físicas que estão a ser colocadas na cassete do carregador de lâminas.

- Para reduzir os riscos de erro, recomenda-se que se verifique novamente as lâminas e as definições, ou que se faça uma referência cruzada com uma folha de dados com as posições desejadas da caixa e das lâminas.
- Utilizar Leitura de códigos de barras em lâminas etiquetadas nos sistemas GSL otimiza a eficiência da leitura e reduz o risco de erro na configuração da digitalização.

Digitalização de códigos de barras



A digitalização de códigos de barras permite uma utilização ótima de um sistema de leitura GSL. A atribuição de casos e modelos é efetuada antes da digitalização, utilizando a função **Assign Slide Barcodes** [Atribuir códigos de barras de lâminas] ou se existir uma interface separada do sistema de gestão de informações laboratoriais (LIS).

- A aplicação Barcode Manager [Gestor de códigos de barras] pode ser utilizada para visualizar e atualizar as atribuições de códigos de barras.
- Para obter detalhes sobre isto e informações adicionais sobre o suporte e as limitações dos códigos de barras, consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.

Atribuir configuração de lâminas

Clique no ícone **Assign Slide Barcodes** [Atribuir códigos de barras] no ecrã Digitalização para abrir a janela de configuração.



1. **Selecionar Modelo:** Serão apresentados no ecrã os modelos de digitalização disponíveis. Podem ser criados novos aqui, mas este não é um fluxo de trabalho típico.
2. **Detalhes da lâmina** (opcional). Uma vez realçado um modelo, é possível ligar um modelo de dados de lâminas guardado se for necessário registar informações específicas sobre as lâminas antes de uma digitalização, clicando no botão **Details** [Detalhes].
3. **Selecionar Caixa.** A lista atual de caixas é apresentada (podem ser criadas novas caixas). Quando selecionar uma caixa válida fica ativa a opção **Manually Enter Barcode** [Inserir Manualmente Código de Barras].
4. **Digitalizar códigos de barras das lâminas.** Utilize um leitor de código de barras portátil* para digitalizar o código de barras diretamente a partir da lâmina (os dados do código de barras da linha podem ser introduzidos manualmente). Este é apresentado no ecrã, para serem verificadas as com informações acerca do modelo e caixa. Quaisquer códigos de barras duplicados serão destacados em vermelho. Clique no botão **Manually Enter Barcode** [Introduzir código de barras manualmente] se o leitor de código de barras portátil não estiver pré-programado para abrir esta janela automaticamente.

* Não é fornecido um leitor de códigos de barras portátil com os sistemas de leitura. Recomenda-se a utilização de um leitor capaz de suportar totalmente códigos de barras 2D, como o DS6707 da Motorola (Symbol) ou equivalente.

Fluxos de trabalho de leitura de códigos de barras

O menu de texto **Barcode Scanning** [Digitalização de código de barras], por cima da barra de ferramentas principal, dá acesso a 3 comandos de digitalização e/ou captura.

Digitalizar e Capturar

Esta opção tem a mesma função que clicar no ícone **Scan slides with Barcodes** [Digitalizar lâminas com códigos de barras] existente na barra de ferramentas principal.

- Cada bandeja da cassete é carregada em sequência, a começar pela bandeja 1, e cada uma das 5 posições da bandeja é lida para detetar lâminas etiquetadas com códigos de barras.
- Ao detetar códigos de barras válidos na base de dados, o sistema irá proceder à Digitalização e Captura de uma lâmina de cada vez com base nas regras do modelo.

Apenas digitalização

Esta ação inicia a lâmina de código de barras equivalente à Captura automática diferida. O GSL carrega sequencialmente cada bandeja e lê as informações do código de barras mas só irá executar a componente de digitalização de ampliação baixa do modelo para cada lâmina.

- A função *Scan only* [Apenas digitalização] destina-se a ser utilizada quando é planeada uma revisão manual das listas de metáfases para verificar as células marcadas classificadas para captura ou para adicionar/remover células da categoria de células marcadas a verde.
- O *Scan Only* [Apenas digitalização] não é compatível com a utilização típica de amostras interfásicas.

Apenas captura

Esta opção só deve ser utilizada imediatamente após uma operação de **Scan only** [Apenas digitalização] de código de barras, depois de as listas de células ou áreas de região adequadas da digitalização terem sido revistas ou modificadas. O sistema irá digitalizar novamente as lâminas com códigos de barras existentes na cassete e executará as regras de captura automática do modelo de digitalização.

A componente de Captura funciona da mesma forma que a **Deferred Capture** [Captura diferida], em que o sistema compara as posições de mapeamento da focagem de 10x com uma memória guardada daquelas posições da própria digitalização. Isto permite que seja aplicada uma compensação automática para compensar qualquer pequeno movimento da lâmina, ou da bandeja, que tenha acontecido durante o carregamento ou descarregamento das bandejas.

A opção **Capture Only** [Apenas captura] do código de barras funcionará corretamente se:

- Nenhuma digitalização tiver sido efetuada no sistema desde que foi selecionada a opção **Scan only** [Apenas digitalização] do código de barras.
- As lâminas a capturar não foram retiradas nem recolocadas nas bandejas desde a **Scan only** [Apenas digitalização] do código de barras. Também é recomendável que não mude as bandejas para posições diferentes na cassete antes da opção **Capture Only** [Apenas captura].

Nota: É efetuada uma verificação da utilização da memória quando qualquer uma das opções de digitalização de códigos de barras é selecionada para determinar se um lote completo de lâminas pode ser digitalizado.

- Se a utilização da memória da aplicação for superior a um limite configurado, é apresentada uma mensagem de aviso e a análise não prossegue.

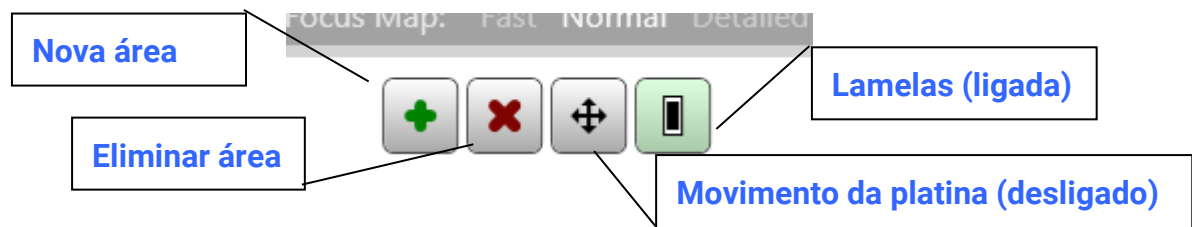
- A aplicação tem de ser reiniciada antes de se poder realizar qualquer atividade relacionada com a verificação.

Modelos de lâminas (FISH)

- Abra a janela Configuração de digitalização e selecione o ícone Atribuir digitalização (modelo de lâmina) para qualquer uma das posições de lâmina para visualizar a janela **Choose a slide Template** [Escolher um modelo de lâmina].
- Se não existirem modelos presentes, clique no botão **Create New Slide Template** [Criar novo modelo de lâmina], ou então selecione **New** [Novo] para criar um novo modelo ou em **Edit** [Editar] para modificar um modelo existente.

Deve ser utilizado um nome de modelo que descreva o tipo de digitalização que será efetuada. Normalmente, trata-se de uma referência à amostra ou ao Kit de sondas, como "FL-Blood" ou "DGO".

Área de digitalização

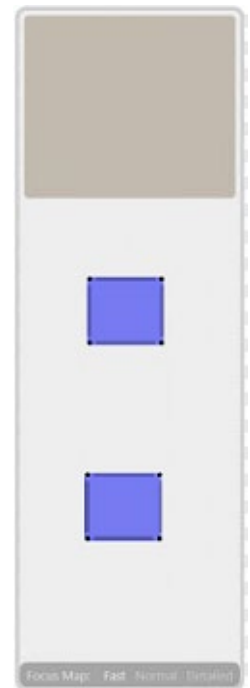


Clique no símbolo verde de mais (+) para adicionar uma área de digitalização nova ou adicional ao modelo existente.

- As áreas múltiplas são típicas para a digitalização FISH, quer para digitalizar a mesma área da lâmina com modos de deteção de metáfase e interfase, quer para permitir áreas posicionais separadas da amostra, cada uma hibridizada com um kit de sonda diferente.

Para lâminas FISH, assegurar;

- A definição da lamela está ativada para todas as áreas, caso contrário o sistema não irá calcular com exatidão as posições de digitalização ou de captação de focagem automática.
- A área de digitalização que é ajustada para ser mais pequena do que a colocação da amostra, uma vez que isto reduz o risco de os pontos do mapa de focagem falharem se não houver material de amostra presente.
- No caso da digitalização de interfase, é normal definir apenas uma pequena área de digitalização devido à elevada densidade esperada de células classificadas durante a digitalização.
- Para reduzir os tempos de mapa de focagem e o risco de fotobranqueamento, as áreas mais pequenas utilizarão 1 ou 5 pontos de mapa de focagem, consoante o tamanho e o tipo de mapa de focagem: *Mapa normal* ou de *focagem: Rápido* está selecionado.



Uma vez definida uma área de digitalização no modelo, tem acesso aos painéis de digitalização e captura.

Pré-Digitalização

A Pré-digitalização utiliza a lente objetiva de 1,25x para identificar as características da lâmina sob luz de campo claro.

- As opções de pré-digitalização padrão estão desativadas para os modos de digitalização fluorescente.

Digitalização

Esta secção contém as opções de localização de células necessárias para permitir uma leitura otimizada dos tipos de amostras;

- **Scan Mode [Modo de digitalização]:** Fluorescente para lâminas FISH (requer compatibilidade com microscópio/filtro).
- **Finder Application [Aplicação de deteção]:** seleccionar entre Localizador de Metáfase e Localizador de Interfase.
- **Classifier [Classificador]:** seleccionar um classificador adequado para o tipo de amostra.
- **Objetiva:** 10x como predefinição.
- **Parar a leitura após:** para a passagem de leitura quando é atingido um número mínimo de células Classificadas (Bandeira Verde). Se esta opção estiver desativada, a digitalização continua através da área de digitalização seleccionada. Isto não é típico da análise FISH e só deve ser utilizado com classificadores que tenham sido otimizados para amostras de utilizadores.

Digitalizar > Configurar

O painel "Configure Finder Application" [Configurar a aplicação de deteção] dá acesso a várias opções de configuração, consoante o tipo de amostra e a utilização.

- O botão "Reset to Default" [Repor as predefinições] mostra as definições iniciais de **Configuração**.
- Estes valores são apenas valores típicos e podem ter de ser alterados em amostras reais.

Para a digitalização de rotina, o ajuste típico é para;

1. Modificação das definições de área **mínima** e **máxima** da metáfase/interfase.
2. Definir um modo de amostra (apenas para a deteção de metáfase).

Área mínima/máxima da interfase

Os objetos abaixo da área mínima ou acima da área máxima de pixels não serão processados durante a digitalização para apresentação ou classificação na lista de lâminas.



- Para a digitalização de interfase, a área mínima predefinida (40) é normalmente inferior ao necessário e pode ser aumentada para 80 a 100 sem alteração das células de interfase utilizáveis.
- A redução da área máxima (predefinição 500) irá reduzir a classificação dos grupos de células se estes não forem úteis para a análise.

Carregar apenas classificados

- Utilize esta opção para guardar apenas imagens de digitalização classificadas com base no classificador utilizado.
- *Upload Classified Only* [Carregar apenas classificados] deve ser desmarcado durante a configuração e o teste iniciais do classificador.
- Após a otimização do classificador, recomenda-se que esta opção seja ativada, especialmente se a digitalização de detecção interfase estiver a produzir muitos objetos de fundo não classificados, o que pode tornar a digitalização mais lenta, aumentar o tempo de processamento e aumentar o tamanho da *lista de digitalização guardada*.

Pontos focais (validação de células)

O painel "Cell Validation" [Validação de células] é uma função de processamento de imagem para o mapa de focagem de digitalização.

- Recomenda-se que a validação celular seja **desativada** para modelos de digitalização FISH de rotina.
- Para obter detalhes sobre esta opção e informações adicionais sobre a opção de digitalização de lâminas metafásicas, consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.

Captura automática

As opções de Captura automática definem as regras para o número e o tipo de imagens a serem capturadas após uma digitalização, usando opções de classificação para a qualidade apropriada das imagens.

- A Captura automática total só pode ser configurada se for escolhido um classificador no Modelo de digitalização (a predefinição "Tudo" não é um classificador e apresenta todos os objetos digitalizados como não classificados na lista de lâminas).
- A Captura automática segue imediatamente após uma digitalização em sistemas GSL usando lubrificação automática, a menos que o fluxo de trabalho **Deferred AutoCapture** [Captura automática diferida] seja utilizado.

A menos que sejam necessárias todas as células (normalmente apenas para lâminas metafásicas se tiver sido efetuada uma revisão manual), desmarque a opção **Capture all cells** [Capturar todas as células] e escolha as suas regras para o tipo de amostra.

Captura automática interfásica

Para amostras interfásicas, o número de imagens a capturar é definido no painel AutoCapture [Captura automática].

Tem de ser definido um classificador interfásico adequado no painel de digitalização do Modelo de diapositivo, de modo a que as células classificadas e marcadas a verde estejam disponíveis para captura e a opção **Perform AutoCapture** [Executar captura automática] seja selecionável.

Existem três **Capture Modes** [Modos de captura] para a captura de imagens FISH de rotina nos sistemas de digitalização *CytoVision DX*: **Probe** [Sonda], **ProbeAuto** [Sonda automática] e **Spot Counting** [Contagem de pontos].

1. O utilizador deve estar familiarizado com os procedimentos manuais de Captura de Sonda e com os fluorocromos.
2. A Captura automática requer uma *lista de fluorocromos* ou um ensaio pontual que tenha sido previamente criado e guardado. Esta ligação permite aceder aos nomes dos fluorocromos, às definições da pilha Z, à configuração dos filtros e das cores.
3. Cada modo tem uma definição **Objetiva**: para selecionar a lente de grande ampliação utilizada para a captação automática, normalmente 63x para melhorar o campo de visão e os efeitos de intensidade.
4. O estado de **Autocamera setup** [configuração da câmara automática] irá determinar a forma como as imagens são capturadas em alta ampliação durante a captação automática;
 - **Ativo** (assinalado): Para cada canal a capturar, o sistema efetua um ajuste automático da câmara (exposição) com base na intensidade de qualquer fluorescência presente no campo de visão.
 - **Inativo** (desmarcado): Para cada canal a ser capturado, o sistema utiliza os valores fixos da câmara que foram guardados pela última vez na lista de fluorocromos no ecrã de captura.

Estão disponíveis opções adicionais de visualização e seleção com base no modo específico selecionado.

Modo de captura da sonda:

Este modo de captura irá criar imagens para análise através do ecrã de arranque da aplicação principal.

AutoCapture

☒ Perform AutoCapture

☐ Capture all cells

Capture up to cells, ordered on

Autocamera setup ☒ Setup using Average Frames

Objective:

Capture Mode:

Fluorochrome list:

Post capture options:

- **Capturar todas as células** ou **Capturar até n células**: - o utilizador pode definir quantas células são necessárias para a captura e com base num critério de ordenação e classificação.
- **Lista de fluorocromos**: - Liga a uma lista de captura de sonda previamente criada e guardada.
- **Opções de pós-captura**: - utiliza modelos de personalização da captura para que o utilizador possa definir como pretende que as imagens sejam capturadas. Estes modelos têm de ter sido pré-configurados na janela *Customize* [Personalizar] do ecrã de captura.

Modo de captura da sonda automática:

Este modo de captura irá criar imagens da *lista de fotogramas*.

Capture up to frames ordered on

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks ☒

Fluorochrome list:

Post capture options:

As **opções de pós-captura** não são utilizadas. Estão disponíveis as seguintes opções adicionais:

- **Configuração da contracoloração**: Melhora o cálculo da exposição da **Autocamera Setup** [configuração automática da câmara] nos canais de fluorocromo, trabalhando apenas nas áreas que contêm sinal DAPI (máscara de coloração de contraste) e sendo menos afetado por resíduos fluorescentes fora da célula.
- **Configuração na sonda**: Melhora o cálculo de exposição da **Autocamera Setup** [configuração automática da câmara] em canais de fluorocromo utilizando um cálculo baseado no tamanho para ser menos afetado por detritos fluorescentes brilhantes dentro da célula.
- **Configuração com Média**: Captura os primeiros n fotogramas utilizando o cálculo de exposição automática padrão para obter um valor médio de integração do fluorocromo para todos os fotogramas restantes.
- **Guardar pilhas Z**: Guarda cada imagem de pilha e fluorocromos juntamente com a projeção máxima.

Modo de captura de contagem de pontos:

Este modo de captura cria imagens no formato *framelis*.

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks ☒

DGO

Fluorochrome list:

As definições são as mesmas do **ProbeAuto** [sonda automática] com as alterações adicionais;

- **Selecionar ensaio de pontos:** abre o painel Seleccionador de Ensaios para escolher um Ensaio adequado que contém os nomes dos fluorocromos utilizados para construir a lista de captura, as definições da pilha Z e os parâmetros de paragem de captura automática.
- **Lista de fluorocromos:** não é seleccionável. As definições da lista de captura e dos fluorocromos são definidas no ensaio de pontos e estão ligadas aos fluorocromos da "Lista de criação".

Nota: Se existirem nomes de listas nos painéis **Lista de fluorocromos** ou **Opções pós-captura**, isso significa que a área de digitalização foi previamente definida para o modo Sonda ou Sonda Automática, onde estes são obrigatórios.

Recomenda-se a criação de uma nova área para as operações de contagem de pontos, de modo a manter estas áreas em branco.

Visualização e ajuste de imagens

À direita do ecrã está uma imagem em tempo real, com controlos da platina e do foco, que pode ser usada para verificar a posição da área de digitalização, e confirmar as definições da câmara, utilizadas durante a Focagem Automática de 10x (Digitalização).

É aconselhável carregar uma lâmina típica antes de usar o modelo, pela primeira vez, para verificar que os valores calibrados de posição do foco e da câmara são aceitáveis.



Nota: As definições da câmara utilizadas durante a digitalização são determinadas durante o mapa de focagem de digitalização e não deve ser necessário ajustar regularmente a visualização da imagem em tempo real no modelo.

- A intensidade da imagem em tempo real e a posição de focagem são determinadas a partir da calibração do sistema, que se espera que apresente uma imagem visível *perto do plano focal da amostra*, sem ajustes significativos das lâminas de rotina.
- Se a imagem estiver significativamente escura, clara ou muito longe da focagem, isso pode indicar que a calibração não está correta e pode ser necessário repeti-la.

Se os botões **Auto Camera [Câmara automática]** ou **Record Z [Gravar Z]** tiverem um ecrã **vermelho**, isso indica que estão a utilizar as definições dos sistemas Calibrados - isto é normal e esperado na digitalização de rotina.



Se os botões **Auto Camera [Câmara automática]** ou **Record Z [Gravar Z]** tiverem um ecrã **verde**, isso indica que foram modificados anteriormente no modelo e estão agora a utilizar valores guardados apenas para este modelo.



Alterar os valores da câmara automática ignorará os valores de **Fluorescent Scan Calibration [Calibração de digitalização fluorescente]** da câmara e utilizará as definições de modelo apenas para as rotinas de mapa de focagem 10x.

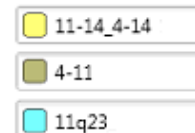
- Espera-se isto em casos em que se prevê que os valores de amostra a serem utilizados com este modelo sejam diferentes da calibragem padrão, como amostras fluorescentes com coloração DAPI fraca ou desvanecida.
- Não se prevê que as amostras de campo claro precisem de valores de câmara específicos para o modelo

A alteração da opção Record Z [Gravar Z] (posição de focagem) só deve ser efetuada se o modelo se destinar a ser utilizado numa lâmina específica ou num tipo de amostra em que o plano de focagem da amostra seja superior ou inferior ao tipo de lâmina de rotina, p. ex., devido a uma diferença física da lâmina ou da lamela, do material ou da espessura da preparação.

- A posição de focagem apenas afeta o mapeamento de focagem de 10x e a digitalização, não tendo qualquer efeito nas rotinas de focagem de captura automática de ampliação elevada.

Após qualquer atualização da **calibração de digitalização fluorescente**, todos os modelos de digitalização que tenham modificado os valores da câmara ou da focagem serão apresentados com um símbolo de aviso no ecrã de configuração do lote de digitalização, indicando que podem estar a utilizar definições que já não são apropriadas para o sistema e que devem ser verificados ou "Reiniciados".

Slide Templates



Revisão das listas de interfase

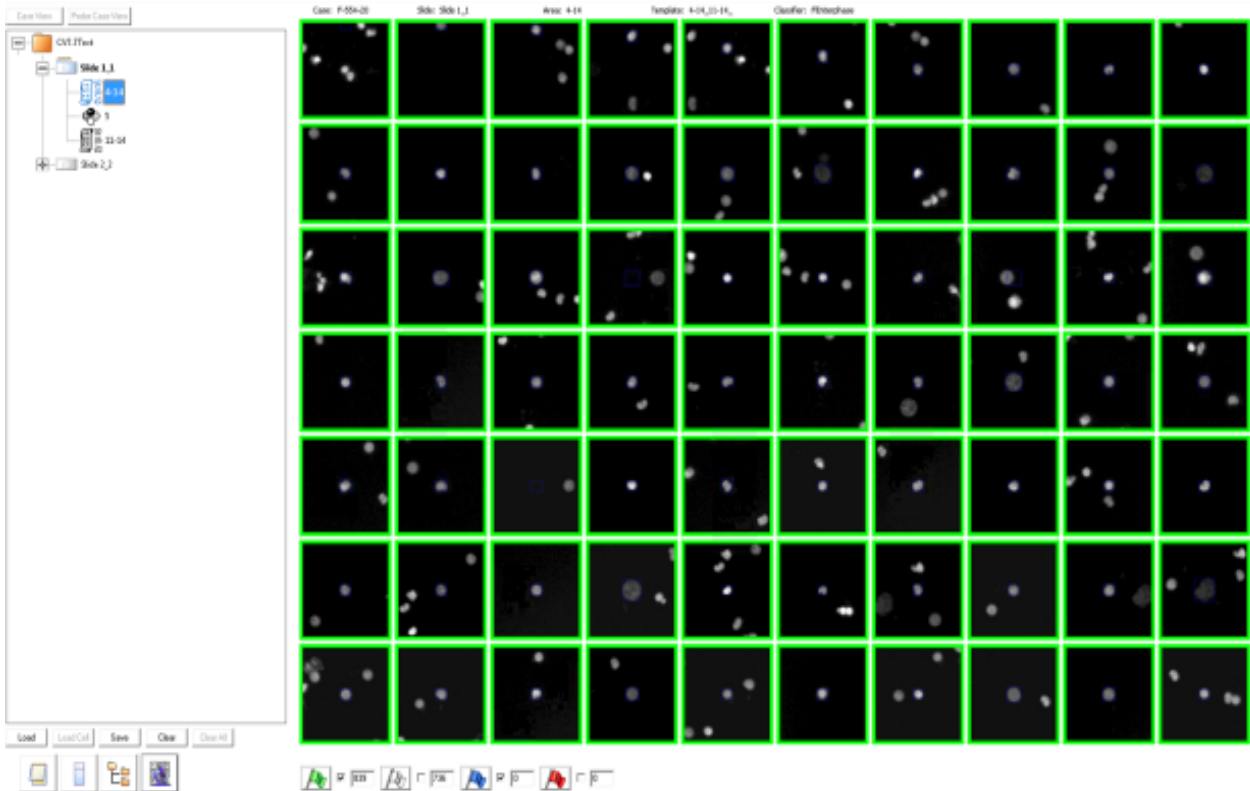
As imagens digitalizadas são guardadas numa lista de lâminas apresentada no Navegador, na pasta de células.

As listas de imagens só podem ser carregadas e apresentadas no ecrã Review [Revisão] e são utilizadas em

- Criação ou edição do classificador de digitalização.
- Consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX** para obter informações gerais sobre a visualização e o controlo do ecrã Review [Revisão].



No caso da digitalização fluorescente, esta é normalmente utilizada apenas para rever a exatidão dos classificadores de células.



Vista de notas (interfase)

Clicar no ícone **Notes [Notas]** substitui a vista do Navegador por uma tabela de dados que contém informações e medições de cada uma das miniaturas apresentadas na janela principal.

Id	Height	Area	CMP	Circ	Perimeter	HWRatio	R
1	15	100	829	687	49	933	1
3	20	165	863	745	65	850	2
6	16	114	829	688	52	1000	3
7	19	183	879	772	68	1000	4
8	15	105	810	671	48	933	5

A maioria das colunas da tabela contém medidas calculadas a partir do processamento de imagem executado nas miniaturas de imagens.

- Cada coluna pode ser utilizada para classificar/ordenar a apresentação das miniaturas no ecrã e associada ao modelo de lâmina como uma ordem de classificação para a captura automática no modo de sonda *standard*.
- As medições não têm correlação direta com a qualidade da célula e são relevantes apenas para o treino do classificador.

As colunas mais relevantes para utilização em interfase são

- **Identificação da célula.** Cada célula é numerada à medida que é encontrada durante a digitalização. Esta numeração transforma-se num número único de identificação da célula que não pode ser eliminado ou alterado, independentemente da ordenação usada. Este número é incluído como parte do nome da célula em qualquer célula que seja criada a partir de uma captura automática em modo **Probe [Sonda]**.

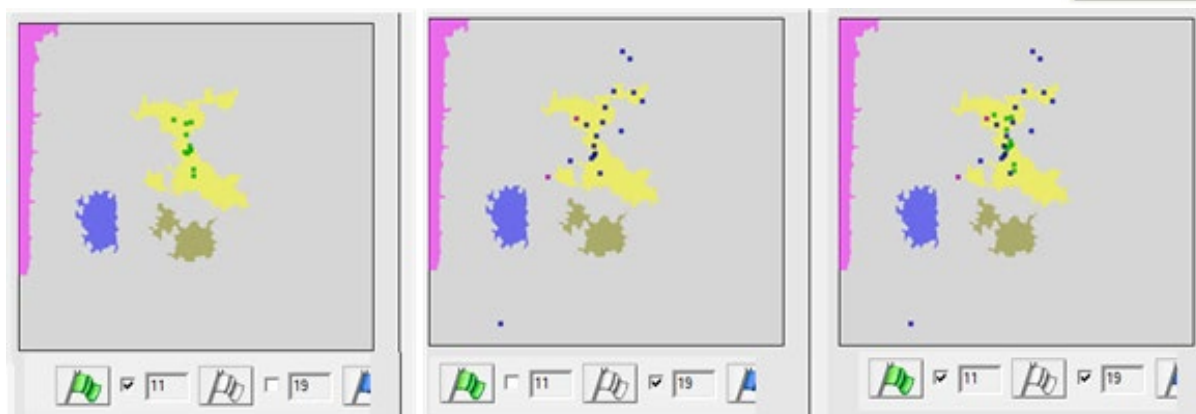
- **EF.** Apresenta as posições England Finder únicas para cada célula, como foram usadas para as opções de captura automática e funções de conversão de coordenadas. Isto é incluído como parte do nome da célula em qualquer imagem que seja criada a partir de uma captura automática no modo **Probe [Sonda]** e guardada como metadados numa lista de fotogramas **ProbeAuto** [Sonda automática] e apresentada no ecrã Frame View [Visualização de fotogramas].
- **Área.** Área da célula em pixéis. Útil para determinar se é necessário ajustar a definição da área mínima ou máxima no modelo de digitalização.
- **Circ.** Circularidade, uma possível opção de seleção para a captura automática em interfase no modo **Probe [Sonda]**.



Vista de lâminas (interfase)

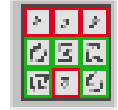
Clicar no ícone **Slide [Lâmina]** substitui a vista Navigator [Navegador] ou Notes [Notas] por um gráfico de lâminas que mostra a área de digitalização e a indicação das células que foram identificadas durante a digitalização.

Ao ocultar ou apresentar os diferentes sinalizadores de miniaturas para a digitalização, as posições das células serão apresentadas como uma sobreposição no gráficos das lâminas.



Classificadores de digitalização

O software de aplicação inclui classificadores predefinidos *FIMetaphase* e *FLInterphase* para amostras de fluorescência.



Os classificadores são atribuídos a Modelos de Digitalização para digitalizações de rotina, criando uma lista de captura de células com Marcação a Verde.

- O sistema também permite a aplicação de diferentes classificadores no ecrã Review [Revisão], independentemente do classificador utilizado na digitalização original.
- Clique em Apply Classifier [Aplicar classificador] na barra de ferramentas principal. É apresentada uma lista de classificadores do utilizador.
- Selecione o classificador a ser utilizado e clique em OK. As miniaturas do ecrã Review [Revisão] são reprocessadas usando os novos parâmetros do classificador, com seleção automática das células marcadas a verde das células mais semelhantes às imagens usadas na formação do classificador.
- Desta forma, a *Lista de Digitalização* pode ser reclassificada em qualquer momento sem a necessidade de voltar a digitalizar a lâmina. Isto é especialmente útil durante a formação inicial do sistema e a avaliação de um novo classificador.

Normalmente, não é necessário atualizar ou treinar novos classificadores para a digitalização FISH, embora seja opcional testar ou acomodar a gama esperada de variação de amostras encontrada durante a preparação das lâminas entre diferentes locais de utilizadores finais.

- Recomenda-se que as imagens adicionais das digitalizações realizadas após a instalação do sistema sejam adicionadas (**Anexadas**) ao classificador existente para otimizar ainda mais os classificadores, ou para criar novos classificadores utilizando apenas dados de digitalização da amostra do utilizador.
- No caso das amostras de metáfase FISH, este valor terá em conta a gama esperada de variação de amostras encontrada durante a preparação de lâminas entre diferentes locais de utilizadores finais.

Diretrizes para treino e edição de classificadores



Quando se "treina" um classificador a partir de uma lista de lâminas (digitalização), todas as células atualmente nas classes Verde ou Branco são colocadas no classificador selecionado.

- certifique-se de que apenas as células que pretende e que reviu estão presentes nos sinalizadores Verde ou Branco (não há problema em adicionar zero células como verdes ou brancas).
- As células de sinalização azul e vermelha de uma lista de digitalização não são adicionadas a um classificador, mas pode mover células para azul ou vermelho durante a edição posterior do classificador para evitar que os seus dados sejam utilizados.
- As células azuis não são utilizadas pelo processamento de imagem, pelo que pode colocar aí quaisquer células e movê-las entre verde ou branco como parte do teste para ver os efeitos.
- Quando uma célula é colocada na classe vermelha, será eliminada se o classificador for guardado (a menos que tenha um ícone de câmara, que indica que foi capturada automaticamente antes de ser adicionada ao classificador).

Para garantir a exatidão, são necessários exemplos de células boas (verdes) e más (brancas). Ao editar um classificador, verifique se;

- O sinalizador verde não contém imagens com *clusters* de células ou detritos grandes/intensos.
- O sinalizador branco contém imagens de "não-células" (detritos, marcas, intensidade de coloração atípica, *clusters*, artefactos, etc.).
- A classe branca não contém células "boas".

Erros comuns no treino dos classificadores.

1. Durante o treino dos classificadores, todas as imagens dos sinalizadores brancos não foram movidas para a classe de sinalizadores azuis (retenção) antes da seleção de células verdes e brancas específicas.
 - O classificador tem demasiadas células com sinalizador branco, mais do dobro do número de células verdes
 - O classificador tem células boas na classe de sinalizador branco.
2. Durante o treino do classificador, só foram consideradas as células boas e não foram adicionadas células brancas
 - O classificador só tem células com sinalizador verde ou mais do dobro do número de células brancas.
3. As células selecionadas como "boas" para o treino não verificaram a existência de objetos de fundo/detritos dentro da "caixa de captura" apresentada na miniatura. Qualquer coisa que esteja dentro do limite estará a adicionar as suas medições aos dados da célula e pode diluir os valores reais de interfase ou metáfase dos dados de treino.
 - O sinalizador verde contém células de variação de metáfase extrema.
 - O sinalizador verde contém imagens com núcleos grandes/escuros dentro da caixa de captura.

Nota: Os classificadores de metáfase são mais sensíveis a estas questões do que os classificadores de interfase.

Treino (anexação) de classificadores

Para atualizar ou criar um novo classificador, utilize as lâminas digitalizadas com células normais para o tipo de amostra.



- Execute uma digitalização usando o classificador **Everything [Tudo]**.
- Aceda ao ecrã **Review [Revisão]** e abra um processo, carregando a lista de metáfases.
- Selecione **Select All [Todas as]** células e marque-as como **Nonspecific (Blue Flag) [Não-específicas (Marcação a Azul)]**, isto serve para não adicionar acidentalmente células inapropriadas ao classificador.
- Selecione 5-15 miniaturas com a qualidade pretendida (células "boas") e assinale-as com um **sinalizador verde**. Não adicione mais do que este valor a partir de uma lâmina, pois pode criar uma tendência artificial no classificador.
- Selecione um número equivalente de imagens para serem usadas como exemplos de células "más" no classificador e assinale-as com **White Flag [Marcação a Branco] (Unclassified [Não classificadas])**.
Devem ser miniaturas que não contenham detritos grandes/intensos ou células boas.
- Confirme que apenas as células que escolheu estão em cada uma das classes de sinalizador Verde e Branco.
- Clique em **Train [Treinar]** (ícone da tabela);
Para criar um *novo* classificador, selecione **New [Novo]** e introduza o nome do classificador no campo **Current selection [Seleção atual]**.
- Para *atualizar* um classificador existente, selecione **Existing [Existente]** e **Append [Anexar]** as novas células num classificador existente (não clique em **Overwrite [Substituir]** a não ser que deseje substituir completamente os dados antigos do classificador mantendo o seu nome).

- Clique em **OK**. O classificador é criado e a vista regressa à lista de miniaturas da digitalização carregada.
- Repita até que existam 100-200 células verdes e brancas, para operações de rotina do classificador, para cada tipo de amostra diferente.

Edição de classificadores



Um classificador é efetivamente uma *Lista de Digitalização* de vários processos, contendo todas as imagens sinalizadas a verde e branco que foram utilizadas para o criar e atualizar. É possível rever e modificar os conteúdos do classificador, para garantir que foi usado o número e qualidade correta de imagens.

- Clique no ícone **Edit [Editar]**.
- Selecione o classificador desejado e os botões **Delete [Eliminar]** e **OK** ficam ativos.
- (Ao selecionar **Delete [Eliminar]**, faz aparecer uma mensagem de confirmação; isto irá eliminar permanentemente o classificador e todos os seus dados).
- Selecione **OK** para carregar as miniaturas das imagens do classificador (se tiver uma lista de lâminas ativa aberta, ser-lhe-á pedido que a guarde primeiro antes de ver as imagens do classificador).
- Reveja ou modifique as miniaturas das imagens, conforme necessário.
- Selecione **Save [Guardar]** para fechar a apresentação das miniaturas de imagens e guardar as alterações..

O classificador pode ser modificado da mesma forma que qualquer *lista de digitalização*, as células podem ser reclassificadas para qualquer uma das 4 classes de cor,

- Apenas as categorias de sinalizador verde e branco são utilizadas para os parâmetros do classificador.
- A classe de sinalizador azul estará disponível para edição futura, mas não será utilizada no funcionamento do classificador.
- As células assinaladas a vermelho (exceto as que foram registadas como capturadas automaticamente) serão permanentemente eliminadas quando guardadas.

Ordenação do valor mais próximo para captura automática

A ordenação de células num classificador permite a utilização da opção do *valor mais próximo* no modelo de lâminas.

- Destina-se a ser utilizado com amostras de metáfases. Consulte as **instruções do funcionamento do cariotipador CytoVision DX**.

Captura automática

Para obter informações sobre a configuração da câmara e da captura, consulte a secção [Captura FISH \(Manual\)](#).

Captura automática



A captura automática começa após a digitalização 10x e a classificação das células.

- As células classificadas (sinalizador verde) são mapeadas para a área de digitalização e depois utilizadas para calcular quais as células a capturar (modo **Probe [Sonda]**) ou para selecionar as áreas (fotogramas) que contêm as células a captura (modos **ProbeAuto [Sonda automática]** e **SpotCounting [Contagem de pontos]**).

- A aplicação muda automaticamente para o ecrã de captura, desloca-se para a primeira célula ou fotograma e inicia o processo de captura, apresentando um painel de progresso da captura automática.
- Depois de ter sido capturado o número correto de células, o sistema passa para a lâmina seguinte.
- O botão **Pause [Pausa]** no painel de progresso da captura automática pode ser utilizado para permitir a interação manual com as definições da câmara ou do filtro (normalmente não é necessário).
- Se estiver em pausa, o botão **Next [Seguinte]** (lâmina) pode ser utilizado se não for necessária mais captura na lâmina atual, ou o botão **Stop [Parar]** (lote) pode ser utilizado para saltar todas as lâminas restantes.

Opções de Captura Automática

O modo de captura automática **Probe [Sonda]** está associado às opções num modelo *personalizado* (**opções pós-captura**). As regras normais da captura automática são:

- Configuração automática da câmara
- Delimitação automática
- Limiar zero
- Ampliação do Contraste
- Guardar imagem em bruto (Raw)



Captura diferida manual

Uma lâmina que tenha uma *lista de digitalização* pode ser capturada automaticamente iniciando uma "Captura diferida manual";

- Abra a janela de Configuração de Digitalização e atribua o nome da Caixa para a lâmina.
- Clique na seta de seleção de Captura Diferida.
- A secção **Capture [Capturar]** mostra quais as lâminas do processo que têm uma *lista de digitalização* que pode ser selecionada para captura automática.
- Selecione a lista correta para a lâmina no GSL.
- (Opcional) Clique em **Set Offset [Definir compensação]** para carregar a bandeja e definir uma compensação manual para as células com ampliação baixa que serão mostradas. Depois de definir a compensação feche a janela.
- Clique em **Scan [Digitalizar]** para iniciar o processo de captura automática, como descrito acima.

NOTA: as lâminas que foram removidas da platina após a digitalização, necessitarão de **Set Offset [Definir compensação]**, pois é extremamente improvável que a lâmina esteja na mesma posição na bandeja em que estava quando foi digitalizada.

- A "Captura diferida manual" não é um procedimento destinado a várias lâminas de cada vez ou a qualquer utilização de rotina do fluxo de trabalho de amostras fluorescentes.

Captura de sonda (imagens de células)



O ecrã de captura manual *standard* contém ferramentas para interagir com a câmara, o *hardware* do microscópio motorizado e as definições para visualizar e capturar uma imagem de sonda numa pasta de células no Navegador.

Num sistema GSL, é necessário utilizar o fluxo de trabalho de captura manual *standard* para confirmar a resposta do *hardware*, configurar as definições de *software* ideais para a qualidade da imagem, criar uma lista de fluorocromos e guardar as "opções pós-captura" (modelos de captura personalizada) utilizadas na captura automática.

No arranque, o ecrã Capture [Capturar] assume por predefinição o último modo de captura selecionado; verifique ou altere-o utilizando o botão **Capture Mode [Modo de captura]**.

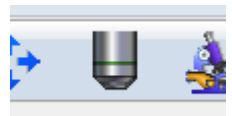


- **Sonda** - para configuração, teste e captura manual de imagens de metáfase de lâmina corada com fluorescência, interfase ou material celular com um ou mais canais de sonda de ADN.
- **Contagem de pontos** - para a captura manual de imagens de interfase corada por fluorescência ou material celular com um ou mais canais de sonda de ADN. As imagens são guardadas como uma lista de fotogramas com processamento automático de imagens utilizando um ensaio de pontos.
- **M-FISH** - para captura manual de células em metáfase de lâminas coradas com fluorescência com múltiplos canais de sondas de ADN numa combinação específica de cromossomas para análise de cariótipos.

Os sistemas *CytoVision DX* utilizam uma câmara monocromática para capturar as imagens. Para criar o ecrã de imagens da sonda a cores, os fluorocromos individuais da lâmina têm de ser captados, pseudo-coloridos e sobrepostos uns sobre os outros, produzindo uma imagem composta a cores multicanal.

- Cada canal de fluorocromos separado tem de ter valores predefinidos para a cor e o filtro do microscópio, que são definidos e guardados através do painel *Fluorochrome Selection (Seleção de fluorocromos)*.

Controlo da objetiva



Na captura manual, a aplicação utiliza a posição da lente objetiva do microscópio a partir do painel "Objectives" [Objetivas] para atualizar a ampliação.

Quando a aplicação é iniciada, a lente configurada na posição 1 é a predefinida. Nos sistemas de microscópio motorizado, esta é a lente objetiva de 10x

- Se o painel tátil do LCD do microscópio for utilizado para mudar as lentes das objetivas, o software não identificará que a ampliação foi alterada e continuará a utilizar o valor da posição 1.
- Para trabalhos de captura manual, deve também/apenas alterar a objetiva utilizando o painel *Objectives [Objetivas]* antes da captura. Para que este valor não seja interpretado incorretamente.
- Aparecerá uma mensagem de aviso no ecrã se ainda estiver definida uma ampliação inesperada da objetiva quando o procedimento de captura for iniciado.

Captura da sonda: Síntese do procedimento

- **New Cell** [Nova célula]. Cria uma célula vazia no **Navigator** [Navegador] pronta para a captura.
 - **Live** [Tempo real]. Apresenta a imagem da câmara na janela principal.
 - move-se automaticamente para o filtro do microscópio para o fluorocromo selecionado
 - ativa o obturador fluorescente para iluminar a lâmina
 - **Capture** [Captura]. Adquire a imagem em tempo real e envia-a para delimitação opcional.
1. Selecione o Processo e a Lâmina no Navegador e clique em **New Cell** [Nova célula].
 2. Crie ou carregue uma **lista de fluorocromos** previamente guardada, adequada à amostra.
 3. Localize uma área de amostra na lâmina do microscópio e clique em **Live** [Em tempo real].
 4. Ajuste a configuração da câmara (Auto Setup [Configuração automática]), depois verifique a apresentação da imagem e clique em **Capture** [Capturar].
 5. (Opcional) **Threshold** [Delimitação] para remover o fundo escuro à volta dos objetos da imagem.
 6. Prima **Live** [Em tempo real] para o canal de fluorocromos seguinte na lâmina.
 7. Ajuste a configuração da câmara (Auto Setup [Configuração automática]), depois verifique a apresentação da imagem e clique em **Capture** [Capturar].
 8. Repita o procedimento nos restantes canais de fluorocromos.
 9. Clique em **New Cell** [Nova célula] para a imagem seguinte.

Não...

- ... mova a lente objetiva manualmente sem utilizar o painel **Objectives** [Objetivas] para confirmar a ampliação correta da lente de captura.
- ... ajuste manualmente a Exposição - deixe o sistema calcular esta definição com a **Auto Setup** [Configuração automática].
- ... mova a platina nem foque antes de completar todos os canais da *lista de fluorocromos*.

Controlos de captura

A imagem em tempo real será apresentada na janela principal do ecrã de captura. Por baixo desta imagem encontram-se os botões do processo dos controlos de captura.

- Quando o modo de captura por sonda é selecionado, o painel **Fluorochrome Selection** [Seleção de fluorocromos] abre-se para selecionar ou criar listas de captura.
- Para cada fluorocromo, o painel **Capture Setup** [Configuração da captura] permite o acesso aos controlos da câmara, do filtro e da lâmpada fluorescente.

Nova célula e Tempo real

O botão **New Cell** [Nova Célula] cria uma nova pasta no processo em que a imagem será guardada. Uma vez localizada uma imagem, o botão **Live** [Em tempo real] apresenta a vista da câmara na janela principal utilizando o filtro de microscópio configurado e as definições de lâmpada fluorescente/obturador.

- Se necessário, mova a platina do microscópio para posicionar a amostra centralmente na janela principal e assegurar que está focada.

Configuração automática da câmara

A captura de rotina deve ser efetuada utilizando **Auto Setup [Configuração automática]** da câmara para otimizar a exposição da câmara e a gama de contraste apresentada na imagem.

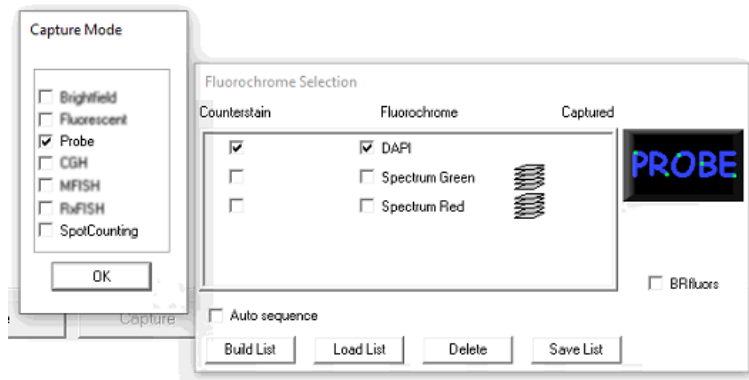
- Os valores finais da imagem baseiam-se na intensidade da fluorescência, determinada pela qualidade da amostra, pelo tipo de filtro e pela fonte de luz fluorescente.
- Qualquer desvanecimento de cor vermelha e azul vista na imagem indica saturação de cor. Para a captura FISH, recomenda-se uma pequena saturação de vermelho no material da amostra (contracoloração ou sinais) com o fundo escuro ou com apenas uma pequena quantidade de saturação de azul para melhorar o contraste.
- A quantidade de saturação de vermelho/azul na imagem real é modificada usando o painel **Autosettings [Definições automáticas]** na configuração da captura.

Isto pode ser ativado manualmente, a partir da caixa de verificação junto à barra de contraste ou através da função "Customize" [Personalizar] da função **Auto-camera setup [Configuração automática da câmara]**, que inicia os ajustes da câmara assim que o botão **Live [Tempo real]** é pressionado.

- Todos os valores das **Auto Settings [Definições automáticas]** serão aplicados imediatamente.
- A **configuração automática** falha se a luz de fluorescência estiver desligada ou definida para uma intensidade muito baixa, o que deve ser verificado.
- A **configuração automática** pode falhar se o sinal de fluorescência da amostra tiver baixa intensidade ou contraste.

Listas de captura

O modo de captura por sonda abre o painel **Fluorochrome Selection [Seleção de fluorocromos]** utilizado na configuração e captura.

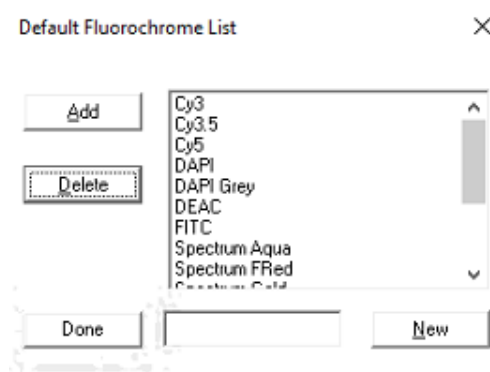


Aqui pode criar uma lista dos fluorocromos na lâmina e selecionar a contracoloração (p. ex., DAPI) que é exigida pela aplicação durante o processo de captura e para trabalho de análise posterior.

Para adicionar novos fluorocromos à lista de captura, selecione o comando **Build List [Lista de criação]**. Aparecerá uma caixa de menu com uma lista de fluorocromos disponíveis e pré-programados.

Clique nos que pretende para a sua lista de captura e selecione **Add [Adicionar]** para cada um.

- Crie a lista pela ordem em que pretende capturar a célula, com a contracoloração em primeiro lugar.
- Assinale a caixa correspondente à **Counterstain [Contracoloração]** correta.
- Para cada nome de fluorocromo, verifique e modifique as definições conforme necessário através do painel *Capture and Fluorochrome Setup [Configuração da captura e do fluorocromo]*.
- Utilize a opção **Save List [Guardar lista]** para criar uma *lista de fluorocromos* que pode ser associada a um modelo de digitalização nos modos de captura **Probe [Sonda]** e **ProbeAuto [Sonda automática]**.



Nota: Se pretender manter os valores de Configuração ajustados, terá de clicar em **Save List [Guardar lista]** após os ajustes.

Configuração de captura e fluorocromos



A opção **Capture Setup [Configuração de captura]** abre uma janela de controlo da câmara e do *hardware*. Clique na caixa de Avançadas para aceder às posições do filtro dicróico e controlos avançados da câmara para modificar as definições.

- **Cor:** Define a cor de *overlay* do fluorocromo utilizado na captura.
- **Dicróico:** Configura o filtro do microscópio utilizado durante a captura do fluorocromo.



Ambos têm de ser definidos e guardados utilizando a opção "Save as Default" [Guardar como predefinição] antes de qualquer operação de captura manual ou automática para cada fluorocromo a utilizar numa lista de captura ou ensaio de pontos.

Seletores de câmara

O ganho, o desvio e a exposição são definidos automaticamente na **configuração automática** ou podem ser visualizados e modificados manualmente utilizando as 3 barras seletoras.



O ajuste manual dos seletores (através da janela **Capture Setup [Configuração de captura]**) não deve ser necessário, a menos que a opção **Auto Setup [Configuração automática]** falhe ou a imagem contenha demasiados objetos de fundo que possam desviar o contraste da célula ou dos sinais.

Brilho (ganho da câmara).

- Se for necessária mais (ou menos) saturação de vermelho, numa só imagem, pode ajustar manualmente o controlo deslizante de Luminosidade.

- Quaisquer áreas vermelhas na visualização em direto serão guardadas como brancas na imagem captada antes da aplicação da pseudo-cor.
- A saturação do vermelho nos sinais da sonda pode resultar numa apresentação de cor melhorada e mais "intensa", que é útil para a apresentação visual do sinal.
- Uma saturação excessiva resultará na perda de informação relativa ou quantitativa que seja útil para uma análise posterior (p. ex., bandas DAPI em cromossomas em metáfase).

Preto (desvio da câmara).

- Se for necessária mais (ou menos) saturação de azul, numa só imagem, pode ajustar manualmente o controlo deslizante de Preto.
- As áreas azuis no ecrã em tempo real serão guardadas como pretas na imagem captada.
- A saturação azulada no fundo escuro da imagem proporcionará um melhor contraste na imagem final, mas não deve estender-se a toda a imagem.

Exposição (integração da câmara).

- Não é recomendado o ajuste manual da barra deslizante de exposição para capturas de rotina e deve utilizar sempre a **configuração automática** para encontrar a melhor exposição.
- Para amostras fluorescentes, a exposição máxima depende da intensidade, mas deve ser sempre, no mínimo, 0,005 (5 ms).

Definições automáticas

As **Auto-settings** [Definições automáticas] modificam os resultados da **Auto-setup** (Configuração Automática) da câmara, para exagerar o nível de saturação de Vermelho ou Azul na imagem final em Tempo Real. Os canais de fluorocromos individuais podem ser ajustados separadamente, conforme necessário.

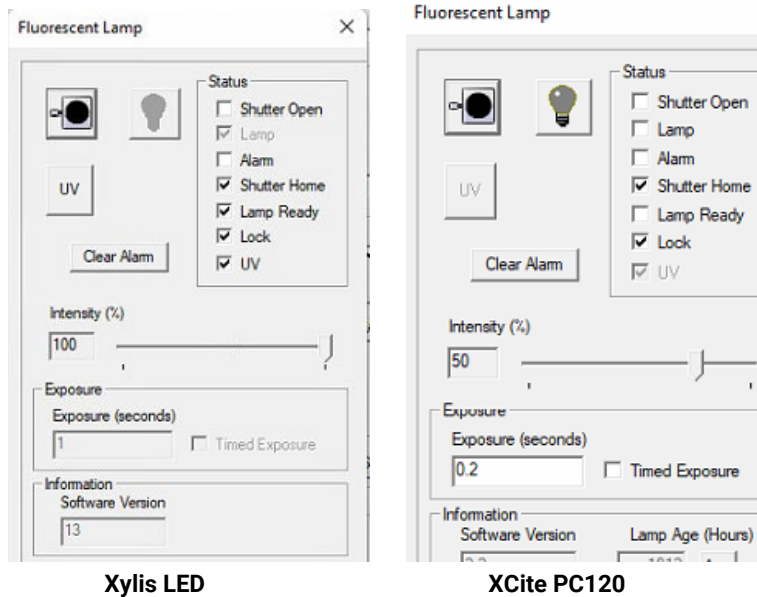
Para melhorar a apresentação da intensidade das imagens FISH, sugerem-se os seguintes valores;

- Ajustar o valor Máx. (vermelho) entre **(+) 3 - 5**, aumentando a intensidade do sinal.
- Ajustar o valor Mín. (azul) para **(+) 0,5**, escurecendo o ruído de fundo.

Configuração da lâmpada fluorescente

O painel de controlo da lâmpada fluorescente Xylis/X-Cite pode ser aberto clicando no ícone da lâmpada no painel Capture Setup [Configuração de captura] (a opção "Avançadas" tem de estar ativa para ver isto).





O painel da lâmpada fluorescente pode ser utilizado para verificar o funcionamento da lâmpada durante um procedimento de captura manual.

- O botão Shutter [Obturador] que se encontra neste painel funciona como botão de alternância para abrir e fechar o obturador.
- Os controlos Exposure [Exposição] mostram a intensidade da lâmpada e os tempos de exposição.
- é normalmente utilizado a 100% de intensidade em tarefas de rotina de digitalização e captura FISH
- As caixas de verificação de Status [Estado] mostram em que estado se encontram as diferentes partes da lâmpada.

Os sistemas que utilizam uma unidade XCite PC 120 também têm controlo da lâmpada;

- O botão Lamp [Lâmpada] liga ou desliga a lâmpada.
- O ícone fica amarelo quando a lâmpada está ligada e pronta a ser utilizada.
- Quando o ícone está cinzento, a lâmpada está desligada e em "standby" (isto será apresentado como "bulb" no painel LCD na parte da frente do controlador da lâmpada). Será ativada automaticamente durante uma digitalização, mas terá de ser ativada manualmente para ser utilizada no ecrã de captura.

Se estiver a executar um lote de digitalização e captura automática de lâminas FISH sem supervisão, pode definir a aplicação para desligar automaticamente a lâmpada X-Cite no final do lote;

- Aceda ao ecrã **Scan [Digitalização]** e selecione o menu Utilities [Utilitários].
- A informação mostra qual é a definição atual do sistema;
"Leave fluorescent lamp on after batch" [Deixar a lâmpada fluorescente ligada após o lote] ou "Switch fluorescent lamp off after batch" [Desligar lâmpada fluorescente após o lote]
- Se clicar no texto, este mudará para a definição alternativa (que será então apresentada).

Pilha Z

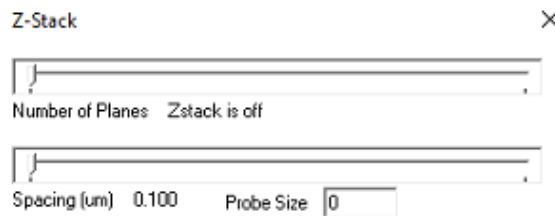
A **Z-Stack [Pilha Z]** é utilizada para capturar sinais de sonda em diferentes planos focais.

Durante a captura, o ponto de focagem da contracoloração (DAPI) é utilizado como centro da gama focal para cada captura de fluorocromos, sendo que o motor de focagem se move a distância de espaçamento entre cada pilha.

- A imagem final é guardada com as pilhas fundidas como uma única camada de **Maximum Projection [Projeção máxima]**.
- Não é possível rever as imagens individuais da pilha após a captura. Se tal for necessário, as imagens FISH têm de ser capturadas numa lista de fotogramas utilizando a contagem manual de pontos ou a captura de sonda de *Fotograma de Imagem* para visualização utilizando *software* de análise de imagens separado compatível com o formato "framelist".

Para configurar um fluorocromo para a captura da Pilha Z, clique em **Z-Stack [Pilha Z]** na caixa de diálogo *Capture and Fluorochrome Setup (Configuração de captura e fluorocromos)*.

- Abre-se a caixa de diálogo Z-Stack [Pilha Z].
- Selecione **Number of planes [Número de planos]** e o **Spacing [Espaçamento]** entre eles. O espaçamento está em micrómetros com incrementos de 0,1 µm.
- Para remover a pilha Z, defina o **número de planos** como 0 (a pilha Z está desativada).
- Clique em **Apply [Aplicar]** para concluir.



Nota: Para a captura manual de contagem de pontos, as definições da pilha Z são criadas a partir das definições do ensaio de pontos configuradas separadamente.

Personalizar captura



Uma vez compreendido o processo básico de captura, utilize as opções **Customize [Personalizar]** para modificar a quantidade de interação necessária do utilizador.

Opções de captura de sonda de rotina:

Definições recomendadas;

- **Auto-camera Setup [Configuração Automática da Câmara]** - Inicia a **Auto-Setup [Configuração Automática]** da câmara quando o botão live está selecionado.
- **Auto-Threshold [Delimitação automática]** - Salta a delimitação manual (remoção de fundo) e utiliza as definições de **Zero Threshold [Limiar zero]** ou **Predict Threshold [Previsão de delimitação]**.
- Esta opção tem de ser ativada nos modelos guardados utilizados em **Probe Auto-Capture [Captura automática de sonda]** no GSL e utilizados em conjunto com **Save Raw Image [Guardar imagem em bruto]**.
- **Zero-Threshold [Limiar zero]** - Não remove o fundo da imagem à volta dos dados da imagem em tempo real, criando uma imagem de bloco único. Isto é aplicado automaticamente se for utilizada a **Auto-Threshold [Delimitação automática]** e é ideal para a captura rápida de FISH em interfase.
- **Probe Background Cut [Corte de fundo da sonda]** - melhora a visualização dos sinais FISH em interfase contra o fundo.
- **Contrast Stretch [Ampliação de contraste]** - Normaliza a imagem final guardada para melhorar a visualização. Esta opção deve ser sempre utilizada em imagens em que é utilizada a delimitação, para evitar que as margens dos restantes objetos pareçam artificialmente intensas.
- **Save Raw Image [Guardar imagem em bruto]** - Cria um ficheiro de imagem separado para cada canal fluorescente capturado.

A imagem em bruto não tem qualquer remoção de fundo nem melhoramentos e pode ser "novamente capturada" utilizando o ícone de delimitação na barra de ferramentas principal.

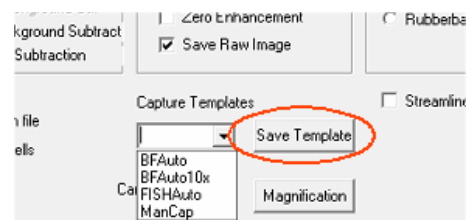
- Esta nova delimitação pode ser útil para a metáfase de imagens em interfase em que se pretenda separar objetos individuais para um melhoramento específico da imagem ou para copiar para um ecrã flexível, ou para criar um cariótipo de sonda.
- Recomenda-se guardar a imagem em bruto para a captura de **sonda**, especialmente se for utilizada a **delimitação automática**.
- O acesso aos dados de imagem não processados pode também ser um requisito do laboratório local.

Definições opcionais;

- **Auto Sequence (Sequência automática)** - Após a captura da imagem de contracoloração (DAPI), a captura prossegue sem necessidade de premir "Live" (Em tempo real) ou "Capture" (Capturar) nos restantes canais da sonda.
 - **Predict Threshold [Previsão de delimitação]** - Calcula um limiar adequado para eliminar o fundo à volta dos objetos na imagem. É aplicado automaticamente se for utilizada a opção **Auto-Threshold [Delimitação automática]** e é ideal para cromossomos em metáfase em que é necessária a cariotipagem por sonda.
 - **Auto Register Images [Registo automático de imagens]** - Captura as imagens da sonda com um desvio X/Y ajustável em comparação com a imagem DAPI (contracoloração), para compensar qualquer desvio ótico ou do filtro.
 - Não se espera que seja utilizado, exceto se houver um problema ótico com um cubo de filtro ou com o alinhamento da trajetória da luz do microscópio.
 - **Auto Focus Offset [Desvio de focagem automática]** - Quando ativado, os movimentos de focagem efetuados com a barra deslizante de focagem durante uma captura manual são registados em relação à contracoloração e aplicados automaticamente às capturas subsequentes. Os desvios são guardados na lista de fluorocromos
- Nota:** Não é utilizado pela captura automática Spot Counting [Contagem de pontos] como parte de um modelo de digitalização.

As melhores definições a utilizar serão influenciadas pelo tipo de espécime. Utilize o botão **Save Template [Guardar modelo]** para atribuir nomes de rotina às definições;

- Nos sistemas de digitalização GSL, são utilizados como **opções pós-captura** durante a captura automática da sonda



Ampliação

As definições de **Magnification [Ampliação]** são necessárias para criar um fator de escala de imagem preciso durante a captura.

- A **Capture Objective [Objetiva de captura]** utiliza a posição da objetiva do microscópio (para a captura FISH, espera-se que seja 63x).
- O valor **C-Mount [Suporte em C]** deve ser definido para o conetor de suporte em C na câmara (1x como predefinição).

Em combinação, estes dois valores calculam uma escala de objeto e uma resolução de visualização, utilizadas para calcular o tamanho dos objetos utilizados na cariotipagem FISH em metáfase e o tamanho dos sinais da *lista de fotografamas*.



A captura manual utiliza a posição da lente objetiva do microscópio que está definida no painel **Objectives [Objetivas]** para atualizar a ampliação.

- Isto é configurado na aplicação **Microscope Calibration [Calibração do microscópio]** pelo módulo "Objectives" [Objetivas].
- Os microscópios com uma torre objetiva motorizada devem ser configurados para todas as posições físicas disponíveis para o microscópio. (*Standard* nos sistemas GSL).

Os valores incorretos provocam erros de classificação do cariograma ou de visualização do tamanho do sinal;

Se for tentada a captura manual utilizando uma objetiva de captura de baixa ampliação, aparecerá uma mensagem de aviso quando for premido o botão **Live [Em tempo real]** - selecione "Continue" [Continuar] e mude para a objetiva correta utilizando os controlos do software antes de premir **Capture [Capturar]**.

Isto pode ser causado pela deslocação manual da lente objetiva do microscópio (ou pelo painel tátil LCD) sem utilizar o controlo **Objectives [Objetivas]** da aplicação para definir a ampliação correta.

- Quando a aplicação é iniciada, a lente configurada na posição 1 é a predefinida.
- Se o painel tátil do LCD do microscópio for utilizado para mudar as lentes das objetivas, o software não identificará que a ampliação foi alterada e continuará a utilizar o valor da posição 1.
- Para trabalhos de captura manual, deve também/apenas alterar a objetiva utilizando o painel **Objectives [Objetivas]** antes da captura. Para que este valor não seja interpretado incorretamente.

Nota: A posição correta da objetiva será ajustada automaticamente como parte da captura automática no GSL e a escala do objeto é calculada utilizando a componente "Image Scales" [Escala de imagens] da **Calibração espacial** para a lente objetiva selecionada.

Delimitação

A delimitação é opcional na captura de sonda (e está desativada na captura de pontos e em M-FISH).

- É possível efetuar uma nova delimitação nas imagens em bruto após a captura para atualizar a imagem da sonda.
- Se a opção **Auto-Threshold [Delimitação automática]** estiver inativa nas definições **Auto-Threshold [Personalizar]**, a janela de delimitação aparecerá durante uma **captura** manual.

A delimitação de imagens da sonda é semelhante à delimitação de metáfases em campo claro. A diferença é que, ao delimitar as sondas, qualquer área não coberta pela máscara azul terá a cor escolhida para esse fluorocromo aplicada a ela.

Os valores de limiar pouco rigorosos podem resultar em grandes sinais irregulares. O ruído de fundo e os detritos também podem dificultar a delimitação, pelo que existem ferramentas adicionais para a delimitação na captura da sonda.

- A **Counterstain Mask [Máscara de contracoloração]** elimina todas as partes da imagem que não contêm contracoloração. Esta é uma boa ferramenta para utilizar se tiver muito ruído de fundo.
- A **Region of Interest [Região de interesse]** permite-lhe definir uma ou mais áreas para delimitação. Esta é uma boa ferramenta para isolar pequenos sinais de artefactos ou detritos.

Nota: Não se espera que os melhoramentos de captura sejam utilizados na captura manual de imagens da sonda, exceto no caso de imagens em metáfase em que o bandeamento DAPI seja útil para a interpretação de imagens ou cariotipagem.

- Para obter mais informações sobre as opções de delimitação manual *standard*, consulte o manual de **instruções de funcionamento do cariotipador** e consulte a secção Help [Ajuda] da aplicação.

Delimitação automática

Se a função **Auto-Threshold [Delimitação automática]** estiver ativa nas definições Customize [Personalizar], a janela de delimitação não aparecerá quando a imagem em tempo real for capturada. Esta é a operação esperada num sistema de digitalização GSL.

- O sistema utiliza o valor **Predict Threshold [Previsão de delimitação]** ou **Zero Threshold [Limiar zero]** para remover o fundo. Isto funciona geralmente para imagens de fluorescência com um fundo de lâmina baixo.
- As melhorias são aplicadas utilizando as definições no modelo de captura guardado ou pode desativar as melhorias de captura utilizando a opção **Zero Enhancements [Zero melhorias]** em Customize Capture [Personalizar captura].
- A imagem em metáfase será guardada e apresentada no Navegador.
- Uma imagem em bruto guardada pode ser utilizada para uma nova delimitação manual, se necessário.

Nova delimitação da imagem em bruto



As imagens em bruto podem ser reprocessadas para atualizar a imagem da sonda se a delimitação original não for a ideal.

Isto pode ser útil se a opção **Zero Threshold [Limiar zero]** tiver sido utilizada na captura original para criar posteriormente objetos para melhoramento, cariotipagem ou cópia para um ecrã flexível.

- Carregue a imagem em bruto (Raw) na janela de apresentação principal do ecrã de Captura.
- Clique no ícone **Threshold [Delimitação]** no centro da barra de ferramentas principal.
- Execute a delimitação manual da imagem. Assim que estiver concluída, é retirada da janela da imagem principal.

Captura de sonda (lista de fotogramas)

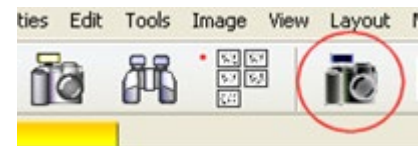


A **captura de sonda** *Image Frame* [Fotograma de imagem] é uma opção de captura de imagem única concebida para utilização de captura manual com torre de filtros motorizada e controlo de focagem do microscópio.

É um procedimento interativo sem definições ou ficheiros de configuração que são utilizados por um sistema de digitalização como parte da captura automática.

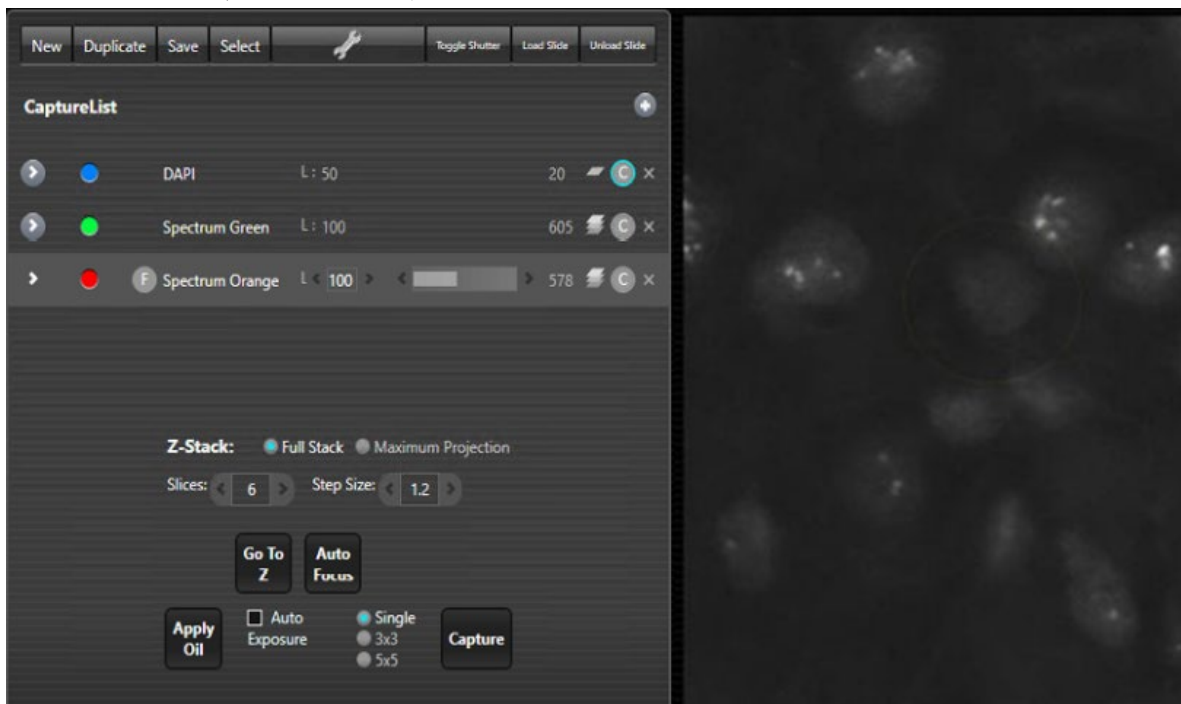
A captura manual *da lista de fotogramas* pode ser utilizada para capturar rapidamente uma área localizada manualmente de uma lâmina para obter um pequeno número de imagens da *lista de fotogramas*.

Abra um processo e clique no ícone Manual Probe Capture [Captura manual da sonda] na barra de ferramentas principal no ecrã de arranque da aplicação.



A disposição do ecrã **Probe Capture [Captura de sonda]** consiste numa janela de imagem em tempo real do lado direito.

- A imagem é sempre "em tempo real" utilizando a exposição da câmara do nome do fluorocromo selecionado na lista.
- Os controlos à esquerda permitem a interação com o microscópio (obturador e focagem) e a configuração de uma lista de captura.



Quando se utiliza a captura de sonda, verá as lâminas do seu processo apresentadas na parte superior do ecrã.

- Pode adicionar lâminas utilizando o botão New Slide [Nova lâmina] no canto superior direito da janela.
- Adicione canais, configure as definições de filtro, cor, pilha Z e guarde as listas de captura.

- Capture as imagens com ajuste manual ou automático da exposição da câmara.
- Capture um único fotograma ou grelhas retangulares maiores de 9 ou 25 fotogramas (movimento da platina GSL).
- Várias imagens capturadas são associadas a uma única lâmina.

Controlo da objetiva

Quando a aplicação é iniciada, a lente configurada na posição 1 é a predefinida. Nos sistemas de microscópio motorizados, esta é a lente objetiva de 10x.

- Se o painel tátil do LCD do microscópio for utilizado para mudar as lentes das objetivas, o software não identificará que a ampliação foi alterada e continuará a utilizar o valor da posição 1.
- Em qualquer tarefa de captura manual, só é necessário mudar a lente objetiva através da interface do *software* antes da captura. Para que este valor não seja interpretado incorretamente.

A captura da lista de fotogramas manual tem um conjunto de controlos de hardware diferente do ecrã de captura padrão, conforme descrito abaixo.

- O teclado é utilizado para mudar entre as lentes objetivas do microscópio utilizando as teclas de função (F).
- Para ver (ou ocultar) todos os atalhos de hardware e definições de tamanho de passo disponíveis, prima "**F10**".

Captura da lista de fotogramas: Síntese do procedimento

- **Revisão de imagens em tempo real.** Imagem da câmara "sempre ligada" na janela de exibição principal.
 - os canais, as definições e as opções de captura podem ser revistos ou modificados antes da captura.
- **Capture** [Captura]. Inicia uma captura automática de célula única completa de todos os canais utilizando cada uma das definições da lista de captura. Adquire as imagens em tempo real e guarda-as na lista de fotogramas da lâmina do **Navegador**.

1. Selecione o processo e a lâmina no Navegador e clique em **Probe Capture** [Captura de sonda].
2. Crie uma **nova** lista de captura ou **selecione** uma lista de captura previamente guardada adequada para a amostra.
3. Clique no canal de contracoloração na lista de captura (ativando o filtro/obturador fluorescente).
4. Localize uma área de amostra na lâmina do microscópio, posicione-a e foque na janela de exibição.
5. Clique em **Capture** [Capturar] para iniciar a sequência de captura automática.
 - se a opção "Exposição automática" estiver ativada, a configuração automática da câmara é efetuada para cada canal.
 - se a opção "Exposição automática" estiver desativada, os canais são captados utilizando os valores de exposição fixos a partir da lista de captura.
6. É apresentado um estado para cada canal que mostra quaisquer exposições e operações de pilha Z.
7. É apresentada uma miniatura de imagem a cores por baixo do painel de captura.
8. Repita o processo para quaisquer outras imagens.

Não...

- ... alterne manualmente entre lentes objetivas de baixa e alta ampliação. Utilize os controlos do teclado (F1 - F7) para mudar de objetiva e confirmar a ampliação correta da lente de captação
- ... mova a platina ou foque manualmente durante a captação.

Opções de configuração de captura

É necessário ter pelo menos um canal adicionado ao ecrã para poder aceder aos controlos de captura.

Adicionar canais

O botão "+" adiciona um canal à sua lista de captura atual, a coleção de canais de fluorocromos a capturar atualmente.



1. Selecione o canal (>)
2. Configure a cor do canal
3. Configure o filtro de canal (F)
4. Intensidade da lâmpada fluorescente (L: Xylis/XCite)
5. Exposição da câmara (ajuste manual)
6. Indicador de pilha Z (desligado/ligado)
7. Indicador de contracoloração (C)

Configurar um canal

(2) Cor de exibição do canal

Cada canal captado tem uma cor de exibição, que é apresentada à esquerda da linha do canal. Esta é a cor que será utilizada para o canal ao ver a imagem completa.



A cor pode ser alterada ao clicar no círculo colorido, o que abre um painel de grelha de **cores básicas** e a possibilidade de definir qualquer cor de exibição necessária.

(3) Filtro de microscópio

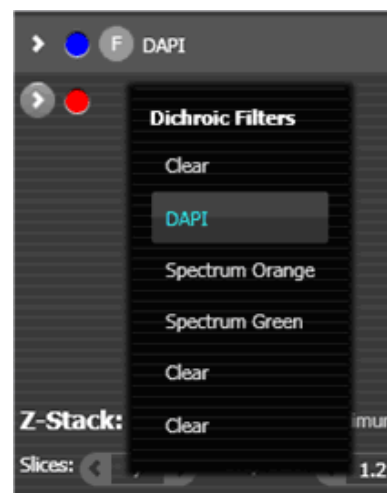
Quando um canal é selecionado, aparece um botão de filtro, representado por um "F", imediatamente antes do nome do canal. Ao clicar neste botão, são exibidos os filtros configurados para o seu microscópio.



Só pode utilizar um filtro configurado ou uma combinação para cada canal de fluorocromos. Uma vez selecionado um filtro, este é removido da lista de seleção seguinte.

Nota: O nome do canal é retirado das rodas de filtro configuradas no sistema.

- Se estiver a utilizar dois filtros, por exemplo, um filtro dicróico e um filtro de excitação, serão apresentadas as duas opções.
- Se os filtros disponíveis parecerem estar incorretos, verifique a configuração na aplicação **Calibração do microscópio**.



(4) Intensidade da lâmpada

Os sistemas com uma lâmpada fluorescente Xylis ou X-Cite apresentarão um ajuste de intensidade para modificar a intensidade da lâmpada utilizada para cada canal durante a captação.

- Para a captura rotineira de canais de sonda, o típico seria uma intensidade de 100%.
- Se a contracoloração for muito brilhante, a utilização de uma intensidade mais baixa pode permitir uma melhor exibição do contraste.
- Uma intensidade mais baixa pode também reduzir o foto-branqueamento rápido se a contracoloração ou o anti-desbotamento na lâmina não for estável.

(5) Exposição da câmara

Cada canal tem o seu próprio valor de exposição (em milissegundos) apresentado à direita do nome do canal, que controla a quantidade de integração da câmara utilizada.

- Quando um canal é selecionado, uma barra deslizante de exposição fica visível e pode ser ajustada arrastando com o botão esquerdo do rato dentro da barra ou clicando nas setas de cada lado.



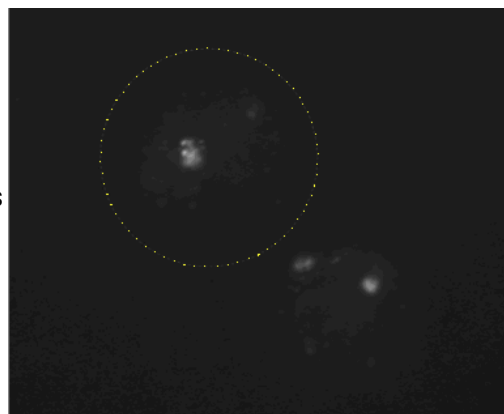
Se o obturador fluorescente estiver aberto, a imagem em tempo real é exibida no ecrã e os efeitos do ajuste da exposição podem ser vistos diretamente.

Em alternativa, pode clicar na imagem em tempo real diretamente com o rato. Isto define um "círculo-alvo" na imagem e a exposição automática da câmara é calculada apenas nesta área.

- Isto é exibido como um círculo pontilhado na imagem.

Isto permite-lhe direcionar a configuração automática, utilizando uma área da imagem que inclua material interessante e evitando áreas que possam incluir artefactos brilhantes que interfiram com os cálculos de exposição.

- Clique com o botão esquerdo do rato** na imagem novamente numa área diferente para aplicar um círculo de configuração automática diferente.
- Clique com o botão direito do rato** na imagem para cancelar uma configuração automática ou para anular a seleção de um círculo-alvo.

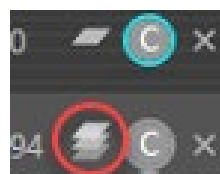


(6) Captura de pilha Z

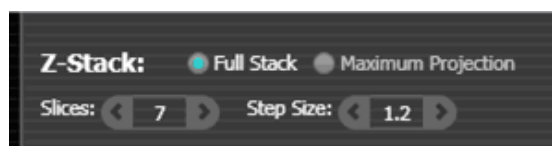
A pilha Z é a captura de várias imagens do mesmo canal em diferentes planos focais para identificar diferenças de sinal tridimensionais.

Clicar no gráfico de pilha à direita da definição de exposição alternará entre uma imagem única (pilha Z desligada) e uma pilha múltipla de imagens (pilha Z ligada).

- Não é habitual capturar uma pilha para a imagem de contracoloração



Assim que a pilha Z for ativada para um canal, serão exibidas opções adicionais acima do botão Capture [Capturar] para definir o número de **partes** na pilha e no espaçamento e o **tamanho do passo** entre cada pilha.



Pode escolher entre guardar a **pilha completa** ou apenas a **projeção máxima**:

- A **projeção máxima** capta uma pilha de imagens para criar apenas uma imagem composta - a Imagem de *projeção máxima*.
- As imagens individuais da pilha não são guardadas no fotograma de imagem final.
- A **pilha completa** capta e armazena as captações individuais na pilha Z juntamente com a *projeção máxima* combinada.

(7) Contracoloração

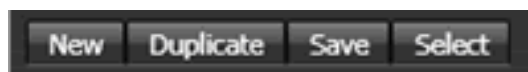
Um canal da lista deve ser selecionado como uma contracoloração antes de se poder iniciar a captura.



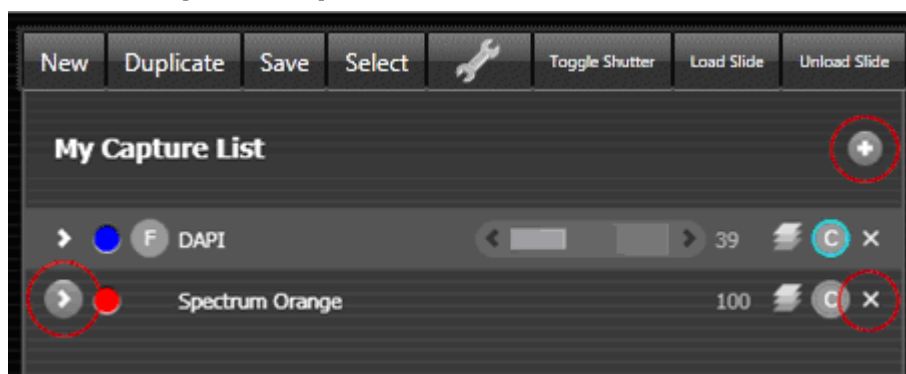
- Normalmente, este seria o canal DAPI.
- O canal de contracoloração é um ponto de referência e um centro de focagem para a captura da pilha Z (exceto se a focagem for reajustada manualmente num dos canais da sonda antes da captura).

Trabalhar com listas de captura

Um conjunto de canais é uma lista de captura. Os controlos das listas de captura são exibidos na parte superior do painel de captura: New [Novo], Duplicate [Duplicar], Save [Guardar] e Select [Selecionar].



- **New** [Novo] irá fornecer-lhe uma nova lista de captura contendo apenas um único canal. Isto substituirá todos os canais atualmente apresentados.
- **Duplicate** [Duplicar] faz uma cópia de uma lista atual.
- **Save** [Guardar] irá armazenar a lista de capturas atualmente apresentada na janela **Select** [Selecionar].
- As listas de captura anteriormente guardadas podem ser recuperadas utilizando o controlo **Select** [Selecionar].



- Para selecionar um canal diferente, prima o botão ">" à esquerda do nome do canal; ao selecionar um canal, a imagem em tempo real será alterada para refletir as definições do canal atual.
- Os canais podem ser removidos com o botão "x", exibido no fim de cada linha de canal, e adicionados com o botão +.

Captura de imagens

Depois de a lista de captura ter sido criada e de cada canal ter as definições adequadas de filtro, cor, contracoloração e pilha Z configuradas, pode ser captada uma imagem com base num cálculo de exposição da câmara.

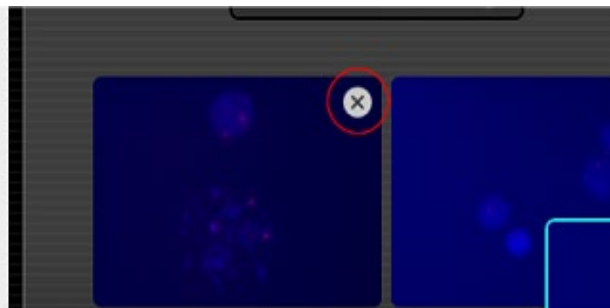


- Se a **exposição automática** estiver ativada, a seleção do botão **Capture** [Capturar] ajustará automaticamente a exposição da câmara para cada canal utilizando uma configuração automática baseada na intensidade da imagem.
 - Se tiver colocado um círculo-alvo para a configuração automática, cada canal utilizará apenas essa área de imagem para calcular os valores de exposição ideais.
 - Se não tiver colocado um círculo-alvo, a configuração automática basear-se-á na imagem inteira.
- Se a **exposição automática** estiver desativada, a seleção do botão **Capture** [Capturar] captará cada canal de fluorocromos na lista de captura em sequência, utilizando os valores de exposição que se encontram atualmente na lista de captura.
 - Deve confirmar os valores de exposição da câmara a utilizar antes de premir **Capture** [Capturar].

Uma vez iniciado, o processo de captura é contínuo para todos os canais.

- Não existe pausa entre a passagem pelos canais de fluorocromos.
- A exibição da imagem em tempo real não é atualizada durante a captura.

Após a captura, cada imagem é apresentada por baixo dos controlos de captura.



- Se passar o rato sobre uma miniatura de imagem, aparece uma versão ampliada da imagem.
- A pequena cruz no canto superior direito pode ser utilizada para eliminar a imagem, se necessário.

Nota: Apenas as imagens da lista de fotogramas captadas manualmente neste ecrã podem ser eliminadas desta forma. As imagens captadas pelos modos de captação **Sonda automática** ou **Contagem de pontos** do sistema de digitalização não podem ser eliminadas.

Terminar a captura

Quando tiver concluído a captura, saia do ecrã utilizando a cruz "close window" [fechar janela] no canto superior direito do ecrã, regressando ao ecrã de arranque das funções de gestão de processos.

Exibição de imagens da sonda

O *CytoVision DX* inclui várias ferramentas de exibição e saída de imagens baseadas na célula padrão da sonda e M-FISH, que podem ser carregadas no ecrã de arranque para exibição de imagens e cor geral, ajuste de contraste, cariotipagem ou anotação, exportação ou impressão.

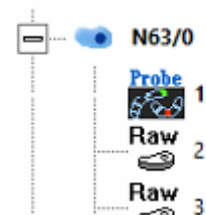
Os dados do fotograma da imagem não podem ser exibidos na aplicação *CytoVision DX*.

- É importante que seja utilizado o modo de captação mais adequado aos requisitos de exibição.
- Para mais informações, consulte as [Tabelas de captura e análise](#).

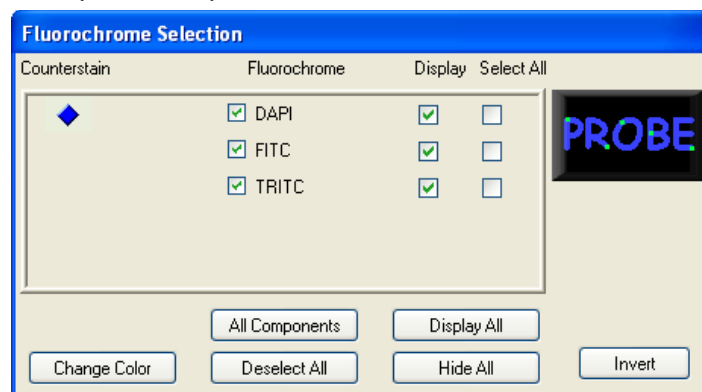
Exibição do ecrã

Todas as exibições e carregamentos de imagens são efetuados através do ecrã de arranque.

- Carregue uma imagem ao fazer duplo clique num ícone "Probe" [Sonda] no navegador e, em seguida, clique na janela de exibição principal.



Quando uma imagem da sonda é carregada na janela principal de análise, a caixa do **painel de seleção de fluorocromos** aparece na parte inferior do ecrã.



Esta caixa mostra quais os fluorocromos que foram utilizados quando a imagem foi captada e permite-lhe escolher quais os componentes da imagem da sonda combinada que pretende exibir;

- Cada imagem da sonda contém uma sobreposição de 2 ou mais canais de *fluorocromos*.
- Cada canal pode conter objetos separados que têm de ser selecionados individualmente antes de se poderem efetuar quaisquer ajustes.
- Ative várias caixas de verificação "Fluorocromo" para permitir a seleção de mais do que um canal de cada vez.
- Algumas funcionalidades de análise, como **Register** [Registar] ou **Change Color** [Alterar cor], requerem apenas a seleção de um componente.

Existe também uma caixa de verificação **Display** [Exibição] à direita de *Fluorochrome* [Fluorocromo].

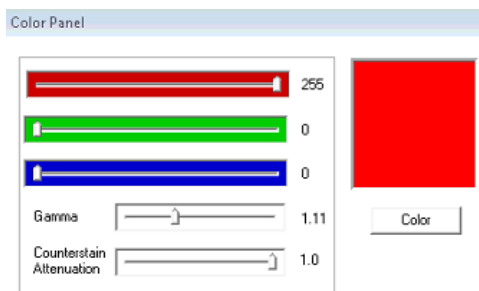
- Quando está ligada, serão exibidos todos os objetos desse canal.
- Quando está desligada, todos os objetos desse canal ficarão ocultos.

As combinações das opções Fluorochrome [Fluorocromo] ou Display [Exibição] são úteis para decidir que objetos estão disponíveis para seleção para melhorias, alteração de cor, registros de imagem e criação de ecrãs compostos.

Change Color [Alterar cor]

Esta funciona de forma semelhante à definição de cor na configuração de captura, atualizando a cor dos componentes na única imagem guardada. Isto pode ser útil para melhorar a exibição visual dos sinais sobrepostos e para ajudar na impressão.

- Clique no botão de comando **Change Color** [Alterar cor] para abrir o painel de cores. A imagem da contracoloração será selecionada automaticamente.
- Ajuste as 3 barras deslizantes para modificar a cor.
- Em alternativa, clique no botão **Color** [Cor] para selecionar a partir de uma tabela de cores.
- Clique num fluorocromo diferente para alterar a sua cor.
- Os comandos **Gamma** [Gama] e **Counterstain Attenuation** [Atenuação da contracoloração] funcionam da mesma forma do que na janela Capture Setup [Configuração da captura], mas os seus efeitos são apresentados instantaneamente na imagem da sonda.
O ajuste *gama* atua globalmente na imagem para melhorar a exibição; no entanto, o sinal de fundo ou não específico também será aumentado. Para melhorar apenas a exibição do sinal, selecione os objetos de interesse e utilize a opção **Contrast** [Contraste].



Clique em OK para fechar o painel Change Color [Alterar cor].

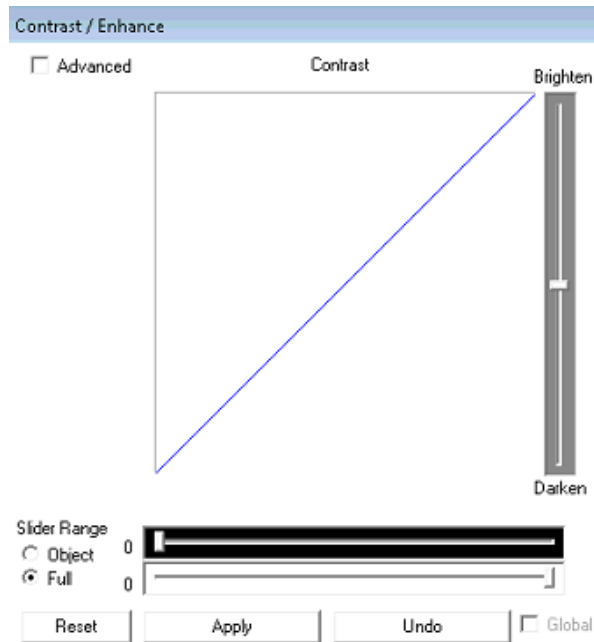


Contrast [Contraste]

É possível modificar o brilho e o contraste da imagem utilizando a ferramenta de contraste.

- O modo **Contrast** [Contraste] deve ser utilizado no modo **Global** [Global] ou **"Full"** [Cheio] como predefinição.
- Certifique-se de que a opção **"Preview enhancements"** [Pré-visualizar melhorias] em **Customize** [Personalizar] está selecionada.
- Confirme que o fluorocromo correto está selecionado no *painel de seleção Fluorocromo* e clique no sinal ou sinais que pretende clarear (aparecerá uma caixa de seleção à volta dos mesmos).





1. Para **clarear** um sinal, mova a barra deslizante à direita do histograma para cima.
2. Para **escurecer** um sinal, arraste a barra deslizante para baixo.
3. Os seletores de "corte" de cor sob o histograma podem ser utilizados para efetuar alterações extremas de intensidade.

Enhance (sharpen) [Melhorar (tornar mais nítido)]



A ferramenta Enhance/sharpen [Melhorar/tornar mais nítido] encontra-se por baixo da janela de contraste.



Normalmente, a **nitidez** só é utilizada no canal de contracoloração para melhorar os detalhes das margens ou do fundo, ou se estiver a trabalhar numa metáfase corada com DAPI para melhorar as bandas.

Não existem ferramentas de análise dedicadas para a exibição ou vista de imagens da sonda. As imagens de sonda têm acesso a opções semelhantes às de outros formatos de imagens de células.

- As imagens de sonda serão carregadas em **Case View** [Vista de processos] padrão para exibição no ecrã Organizar e utilização dos comentários Ctrl-B ou Ctrl-K no ecrã **Analisar**. Consulte o **Manual do Utilizador do CytoVision DX**.
- As imagens de sonda podem ter um limiar aplicado para criar objetos para utilização flexível no ecrã e para criar um par de metáfase e cariótipo FISH como parte de um fluxo de trabalho de análise de cariótipo. Consulte o **manual de instruções do cariotipador CytoVision DX**.

Resolução de problemas

As informações e verificações enumeradas nesta secção destinam-se a ser efetuadas como parte da resolução de problemas de apoio de 1.º nível pelos utilizadores familiarizados com as aplicações e o hardware do sistema.

- O **Manual do utilizador do CytoVision DX** contém verificações e ações gerais que também devem ser executadas e confirmadas como parte de qualquer contacto com a Leica Biosystems para obter assistência adicional.

Sistema de captura

Erros na ligação ao microscópio

- Controlador do microscópio desligado - ligue o controlador.
- Cabo USB do microscópio desligado - verifique o cabo.
- A porta USB do microscópio ou a ligação do cabo foi alterada (alteração da porta USB ou efeito do Windows) - confirme a porta no gestor de dispositivos e altere em **Microscope calibration** [Calibração do microscópio](requer acesso de administrador local).

Efeito de qualidade da luz do microscópio

Devem ser efetuadas verificações de rotina no microscópio ótico para confirmar que não existem modificações à configuração exigida para obter uma ótima captura de imagem. Estes aspetos também devem ser verificados no caso de existirem quaisquer problemas de qualidade de imagem durante a sua captura.

- Confirme se o fototubo do microscópio (divisor de luz) está a dirigir 100% da luz para a câmara
- Verifique se a guia da luz fluorescente está corretamente montada e se não está danificada/curvada, deteriorada ou para além da sua vida útil prevista.
- Verifique e limpe as lentes objetivas. O óleo velho e endurecido na lente de captação reduz a intensidade da luz, a iluminação (uniformidade) e o contraste da imagem
- Verifique se a lente do condensador é movida para fora do caminho da luz durante a digitalização e a captura para evitar qualquer reflexão da luz (isto é realizado automaticamente em microscópios configurados com um condensador motorizado).
- Inspeccione visualmente os filtros de fluorescência na torre do microscópio para detetar quaisquer sinais de danos causados pela luz ou pelo ambiente (sombras, aspeto salpicado, irregularidade da cor).

Sistema de digitalização GSL

Para a digitalização GSL, devem ser seguidos os controlos e procedimentos **adicionais**.

Erros na ligação ao GSL

- A unidade base do GSL está desligada - faça um ciclo de energia de GSL e verifique a ligação da fonte de alimentação externa.
- Cabo de rede desligado - verifique o cabo entre o GSL e o PC.
- Configuração do adaptador de rede - confirme que não houve qualquer alteração recente do administrador de TI/rede.

Problemas de focagem de digitalização 10x

- As lâminas estão limpas e sem óleo? As lâminas utilizadas não podem conter óleo de imersão para permitir uma focagem precisa.
- O plano de focagem da imagem está a ser atravessado durante a focagem automática?
- O ponto inicial de focagem automática não está próximo do plano focal da célula (o mapa de focagem de 10x não passa pelo plano focal da amostra): Problema da lâmina na bandeja, desvio do foco do modelo, pontos de referência do compartimento de calibração espacial (batida da platina).
- O mapa de focagem de 10x passa pelo plano focal mas não fornece pontos de focagem nítidos: Contraste ([efeito de qualidade da luz](#), baixa intensidade da contracoloração).
- Desvio de foco mal definido no modelo de digitalização - causará falhas no mapa de foco em 10x
- Verifique os modelos de digitalização quanto a desvios de focagem, definição da lamela e definição da validação da focagem
- A focagem é variável consoante a posição da platina da bandeja/compartimento?
- Luz insuficiente durante o mapa de focagem de 10x (efeito de qualidade da luz, desvio da câmara do modelo da lâmina).
- Luz excessiva durante o mapa de focagem de 10x (mudança de hardware, desvio da câmara do modelo de lâmina, intensidade da contracoloração).
- Se a imagem real for demasiado escura ou clara, verifique o separador de luz e o modelo de lâmina para ver se existe algum desvio da câmara; repita a **calibração de digitalização fluorescente**.

Problemas de classificação de digitalização 10x

- Qual é o aspeto das imagens em tempo real durante a digitalização? Estão bem focadas e com bom contraste?
- Isto está a acontecer em vários modelos de lâminas? Execute um novo modelo para verificar.
- Verifique o microscópio quanto a efeitos e problemas de [qualidade de luz](#).
- Verifique a lâmina da amostra quanto à concentração e intensidade da coloração DAPI e ao anti-desbotamento.
- Verifique se os classificadores estão mal treinados.

Problemas de focagem da captura 63x

- O ponto de início da focagem automática não está próximo do plano focal da célula. Verifique se a lente de captura está bloqueada (mola de pressão e mecanismo de torção na extremidade).
- O problema é consistente em várias lâminas? Se for variável, verifique a [compatibilidade da lâmina/bandeja](#).
- Qual é o aspeto das miniaturas da digitalização de 10x da lista metafásica no ecrã Review [Revisão]? Estão focadas?
- Para problemas de focagem de captura automática repetíveis, efetue uma nova **calibração de digitalização fluorescente**.
- Confirme que a opção da lamela do modelo de digitalização está corretamente definida
- Óleo insuficiente, bolhas de ar ou outros problemas relacionados com o óleo conduzem a uma focagem que não é a ideal. Confirme se existe óleo no reservatório da seringa e que a tubagem do lubrificante e extremidade dispensadora estão ligadas com segurança e desbloqueadas.

Problemas de captura de canal de sonda

- Filtro incorreto utilizado para a captura. Verifique a configuração da lista de captura (nome e posição do filtro dicróico) nas listas guardadas e na lista de criação predefinida.
- Os sinais da sonda não estão a ser focados. Verifique o tamanho do passo da pilha Z e o número de camadas e verifique o encaixe do filtro na torre do microscópio.

Compatibilidade de lâmina/bandeja

Slide placement in stage holder [Colocação da lâmina no suporte da platina].

As lâminas devem ser colocadas no suporte da platina com a superfície da amostra ou da lamela voltada para cima.

- Certifique-se de que não existem obstruções no local que possam impedir a colocação nivelada da lâmina e que a pinça da lâmina possui um contacto suficientemente forte para impedir qualquer movimento da mesma.

Consistência da fixação da lâmina.

Verifique se os grampos de mola estão a segurar a lâmina com força suficiente.

- Se a lâmina estiver solta (oscilação), verifique o aperto das pegas de mola.
- As lâminas são de canto quadrado ou de canto cortado? Se o canto for cortado, a bandeja tem o design "biselado" correto?

Consistência da fixação da bandeja.

Verifique se a bandeja GSL está a ser mantida firmemente na platina quando é carregada.

- Se houver alguma folga, verifique o ajuste do braço de pressão de plástico na parte da frente/esquerda da platina GSL (ajuste do parafuso).

Montagem de lamelas

Um revestimento espesso/duplo impedirá que se alcance o plano de focagem.

- Confirme que uma metáfase pode ser focada e capturada manualmente no ecrã normal de captura.

Preparação e coloração de amostras

A densidade das células da amostra, a intensidade da coloração de contraste e o efeito anti-desbotamento terão um efeito direto na fiabilidade da focagem do sistema, na velocidade e no desempenho da leitura e da captura automática.

- Não é aconselhável a diluição da contracoloração. A baixa intensidade aumenta a exposição da câmara e diminui o contraste, causando mais falhas de focagem e tempos de digitalização e captação mais longos.
- A eficácia anti-desbotamento diminui com a idade, a temperatura de armazenamento e a exposição à luz, causando uma névoa vermelha sobre a lâmina e um aumento do desbotamento das sondas e do DAPI. O DAPI/anti-desbotamento deve ser armazenado a 2-8 °C durante o maior tempo possível e pode ser aplicado nas lâminas ainda frias.
- Armazene as lâminas no escuro a 2-8 °C e deixe 30 minutos à temperatura ambiente antes da digitalização. As lâminas velhas devem ser coradas de novo com uma nova contracoloração e anti-desbotamento, se necessário.
- A baixa densidade celular aumenta os tempos de digitalização e captura e o número de imagens capturadas necessárias para a pontuação do sinal. Sempre que possível, ajuste a densidade de células durante a preparação da lâmina para obter um mínimo de 5 células marcadas por fotograma de captura (10-20 no máximo).

Exportar registos de diagnóstico

O *CytoVision DX* cria um conjunto evolutivo dos dados dos eventos de configuração do sistema, calibragem, processos e hardware durante o funcionamento de rotina. Na eventualidade da existência de um funcionamento inesperado, erros na digitalização ou captura ou se a aplicação falhar, estes ficheiros de registo podem conter informação relevante útil para as equipas de suporte da Leica tentarem diagnosticar a falha.

- Os registos contêm 7 a 10 dias de informações de diagnóstico detalhadas, pelo que deve ser efetuada uma exportação dentro deste prazo para qualquer problema que possa ser encaminhado para a Leica Biosystems.
- Os ficheiros de registo são guardados utilizando a funcionalidade **Export Logs** [Exportar registos] existente na barra de ferramentas do menu **Case** [Processo]. Isto irá comprimir todos os ficheiros num .zip e guardá-los numa localização escolhida pelo utilizador.
- Estes podem então ser guardados num cartão de memória ou partilhados com o pessoal de manutenção e apoio relevante, se necessário, numa data posterior.

Anexo: Contagem de pontos

Visão geral da contagem de pontos

A **contagem de pontos** utiliza definições num **ensaio de pontos** criado antes da captura para criar dados de imagem da *lista de fotogramas*.

As listas de fotogramas de pontos são capturadas como parte do fluxo de trabalho de digitalização e captura automática GSL totalmente automatizado, utilizando o modo de captura de contagem de pontos num modelo de lâmina de digitalização.

- Também é possível capturar manualmente uma lista de fotogramas para contagem de pontos no ecrã de captura utilizando o modo de captura "Contagem de pontos", semelhante à captura de sonda padrão e com base nos mesmos nomes de fluorocromos da "lista de criação".

A contagem de pontos tem algumas diferenças em relação aos dados de imagem da lista de fotogramas *Sonda automática*;

- Os ensaios de pontos podem ser criados e editados através do painel Seleccionador de Ensaios para diferentes canais de fluorocromos e definições de pilha Z.
- Um **Classificador de células** pode ser utilizado para determinar o tipo de material celular que está a ser processado como "informativo" na imagem durante a captura.
- O sistema de digitalização de **Captura automática** pode ser definido para um número máximo de células informativas ou um número máximo de fotogramas capturados.
- Os dados das imagens captadas são processados utilizando os parâmetros do *ensaio* para obter informações sobre a intensidade e o tamanho do sinal da sonda, incluindo definições para a forma da célula de contracoloração e limites de paragem do GSL.
- Os dados originais da célula e do processamento do sinal são guardados permanentemente na *lista de fotogramas*.

Nota: As listas de fotogramas da contagem de pontos contêm múltiplos ficheiros com um grande tamanho total de caso, por isso certifique-se que existe espaço livre suficiente no servidor de dados que aloja a base de processos.

- Uma lâmina com 40 fotogramas (imagens capturadas) terá aproximadamente 500 Mb de tamanho, com base em 5 pilhas por canal numa amostra de 2 sondas.
- Cerca de 80% destes dados serão as capturas individuais da pilha Z.
- Os dados do fotograma da imagem não podem ser exibidos na aplicação *CytoVision DX*. A revisão da imagem requer um software de análise de imagem separado compatível com o formato *lista de fotogramas*.

Existem 2 passos principais no fluxo de trabalho de pontos.

1. **Seleção do ensaio:** Um ensaio pode ser selecionado ou criado quando a contagem de pontos é selecionada como um modo de captura de modelos de lâminas de digitalização ou, para captura manual, quando selecionado na lista **Modo de captura** do ecrã de captura padrão.
2. **Captura:** As imagens da área selecionada da lâmina são captadas utilizando os procedimentos padrão de captura da sonda. Os dados de imagem são processados em tempo real para determinar os limites das células e os sinais das sondas.

Antes de capturar células para a contagem de pontos automática.

- O utilizador deve estar familiarizado com os procedimentos e fluorocromos de [Captura de sondas](#), visto que os ensaios de contagem de pontos utilizam os nomes e definições de fluorocromos ([Lista de criação](#)) predefinidos.
- Os ensaios têm de ser criados e configurados para que os fluorocromos sejam utilizados como lista de captura, com opções ajustáveis de pilha Z, tipo de sonda e classificador de células.
- Os sistemas de digitalização devem ter uma **calibração de digitalização fluorescente** em funcionamento para a intensidade típica da contracoloração da amostra e os desvios de focagem que serão utilizados durante a captura.
Os utilizadores devem estar familiarizados com os procedimentos de calibração de digitalização para manter o sistema corretamente e compensar qualquer variação na intensidade visível da contracoloração.
- Os sistemas de digitalização requerem um [modelo de lâmina](#) com uma área de digitalização adequada, um classificador de digitalização e um ensaio de pontos atribuído à lâmina.

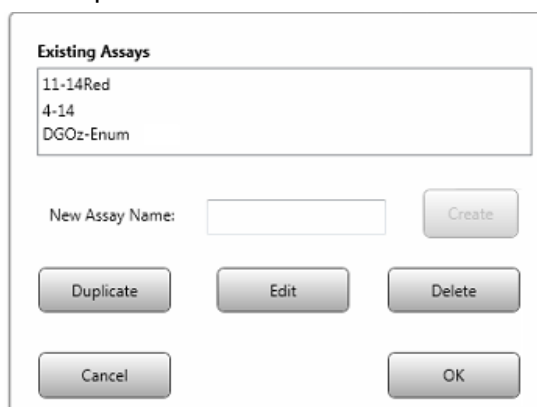
Ensaio de contagem de pontos

Um ensaio de pontos contém;

1. A lista de captura de fluorocromos para a contracoloração e sondas na lâmina.
2. As predefinições da pilha Z para cada canal de sonda.
3. O número máximo de fotogramas ou células a capturar automaticamente em sistemas de digitalização - as contagens de **Parar captura após**.
4. Opções para selecionar um classificador de células de contracoloração para determinar quais as células que são classificadas como informativas durante o processamento da imagem.

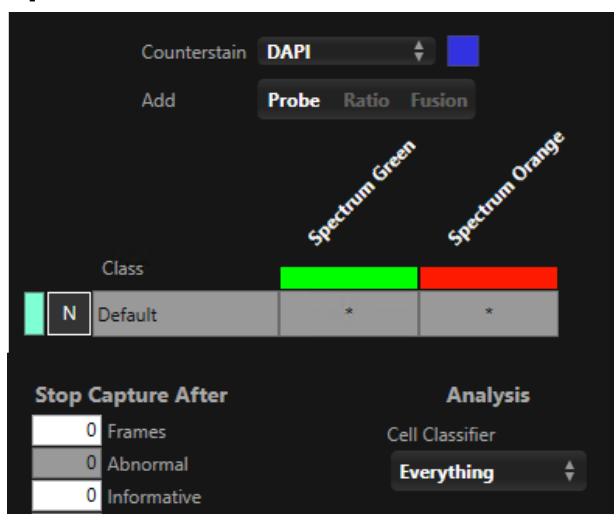
Para utilizar as funções de digitalização e de captura automática do sistema GSL, é necessário criar um ensaio antes da captura e configurá-lo utilizando a janela **Selecionador de ensaios de pontos**.

O **Selecionador de ensaios de pontos** será apresentado no ecrã de captura padrão (modo de contagem de pontos) ou como parte de um modelo de lâmina de digitalização quando a *Contagem de pontos* estiver definido para a captura automática



- **Criar um novo ensaio:** Introduza um novo nome para o ensaio e selecione **Create** [Criar]. Isto abre a caixa de diálogo **Configuração de pontos**.
- **Copiar um ensaio existente:** Realce um ensaio existente na lista. Clique no botão **Duplicate** [Duplicar].
- **Editar um ensaio existente:** Realce um ensaio existente na lista. Clique no botão **Edit** [Editar]. Isto abre a caixa de diálogo **Configuração de pontos**.

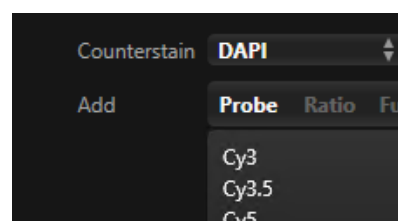
- **Eliminar um ensaio existente:** Realce um ensaio existente na lista. Clique no botão **Delete** [Eliminar].



Editar ensaios para captura de pontos

Seleção de fluorocromos

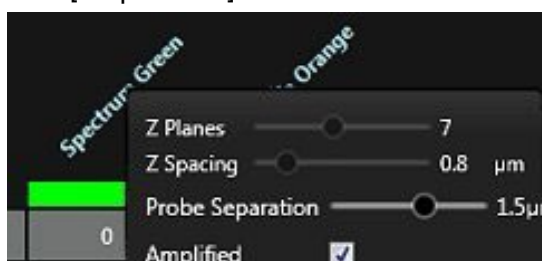
Selecione uma **Counterstain** [Contracoloração] no menu pendente de nomes de fluorocromos do sistema e, em seguida, clique no botão **(Add) Probe** [(Adicionar) sonda] e selecione da mesma forma até ter o número e os nomes corretos de fluorocromos para o kit de sonda utilizado na lâmina da amostra.



A lista de nomes é retirada da **Build List** [Lista de criação] da sonda, que tem de ser configurada para a cor de exibição e para as predefinições de filtro no [ecrã de captura](#) padrão.

Para cada sonda, clique no nome a configurar:

- Os **Z Planes** [Planos Z] e os **Z Spacing** [Espaçamento Z] (μm) para a captura de pilha Z. Os números variam com base nas características da amostra, mas para preparações interfásicas, uma distância total de focagem de aproximadamente 5 micrones é um valor inicial típico. Por exemplo, 7 planos a $0,8 \mu\text{m}$ ou 5 planos a $1,2 \mu\text{m}$ (intervalo de $4,8 \mu\text{m}$).
- Se o fluorocromo se destinar a um teste de amplificação, selecione a caixa de verificação **Amplified** [Amplificado].

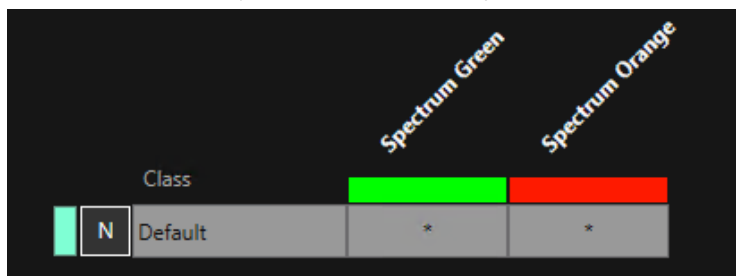


- **Probe Separation** [Separação da sonda] é um ajuste opcional, mas pode ser deixado na predefinição, visto que não tem relevância direta para o funcionamento de captura do CytoVision DX.

Tabela de classes

Após a definição da lista de captura, é criada uma tabela **Class** [Classe] que apresenta um nome de classe "Default" [Predefinição] que é utilizado para processar células informativas durante a captura de imagens.

- Não é editável para a operação de captura do CytoVision DX



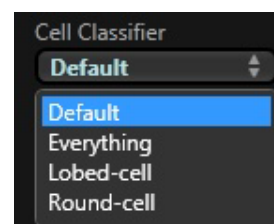
Classificador de células

Um novo ensaio não tem um conjunto de classificadores (**All**) [Tudo]:

- Todos os objetos nos fotogramas capturados que contenham sinais de sonda sobrepostos ao material de contracoloração serão classificados como "informativos" para a exibição da contagem de parâmetros GSL e do monitor de classe durante a captura.

A utilização de um classificador Cell (DAPI) permite filtrar células "informativas" com base nas formas do objeto de contracoloração (célula), que podem ser selecionadas na lista do menu pendente.

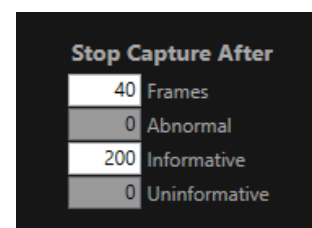
- **Predefinição:** Um classificador treinado num tipo de amostra de células mistas que elimina material DAPI pequeno ou de forma invulgar e grandes aglomerados de células.
- **Célula lobada:** Um classificador treinado em tipos de amostras de células multilobadas eliminando detritos simples de fundo, grandes aglomerados não segmentados e células que são maioritariamente de forma circular.
- **Célula redonda:** Um classificador treinado em tipos de amostras de células circulares eliminando detritos simples de fundo, grandes aglomerados não segmentados e células que são maioritariamente de forma lobada.



Parar captura após (contagens de paragem da captura automática)

Os sistemas de digitalização GSL continuarão até que todos os fotogramas dentro da área de digitalização tenham sido automaticamente capturados ou se for atingida uma das contagens de paragem definidas no ensaio.

- **Fotogramas:** Define um número máximo de fotogramas a capturar.
O valor utilizado pode ser definido como
 - uma "segurança" em caso de identificação insuficiente de objetos "informativos" na captura automática de rotina, destinada a evitar tempos de digitalização excessivos em lâminas de hibridação escassamente povoadas ou com falhas
 - para digitalizações em que é necessário um número fixo de capturas para efeitos de normalização ou comparação, como testes de densidade celular ou de qualidade da sonda



- **Informativo:** Isto analisa o total de todos os objetos que passam na seleção do *Classificador de células*.
- Prevê-se que este seja o critério de paragem de rotina quando é necessário um número total fixo de células para cumprir as expectativas de revisão ou análise a jusante.

Se ambas as contagens de paragem estiverem definidas no ensaio, a captura automática parará quando a primeira destas contagens for atingida; um valor de zero para qualquer uma das opções significa que não afetará a captura automática.

- As contagens de paragem não têm efeito na [captação manual](#).

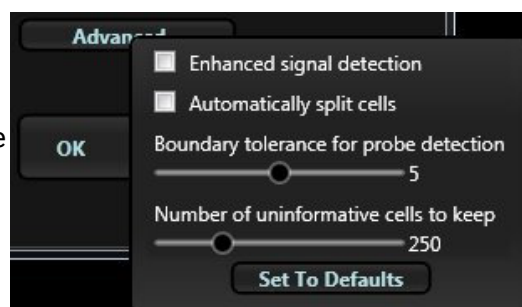
Avançado

O botão **Advanced** [Avançado] abre a caixa de diálogo Configuration [Configuração] dos parâmetros adicionais do ensaio.

- As opções **Boundary Tolerance for probe detection** [Tolerância de limites para a deteção de sondas] e **Number of Uninformative cells to Keep** [Número de células não informativas a manter] não são utilizadas para a operação de captura do CytoVision DX
- A **Enhanced Signal Detection** [Deteção de sinais melhorada] e as **Automatically Split Cells** [Dividir células automaticamente] podem ser utilizadas e resultarão num maior número de objetos classificados durante o processamento da imagem - isto pode parar a captura automática mais cedo com base na contagem de paragens **informativas**.

Deteção de sinais melhorada:

Se ativada, esta opção modifica algumas das comparações relativas de tamanho e intensidade durante o processamento da imagem, tornando mais provável que a intensidade de sinais pequenos ou fracos seja classificada como sinais informativos.



Dividir células automaticamente:

Se ativada, esta opção pode separar grupos de objetos de contraste em dois ou mais objetos **informativos** distintos.

Na janela de *Selecionador de ensaios* de contagem de pontos, o ensaio é guardado na lista predefinida do sistema quando se utiliza **OK** para fechar o painel.

Digitalização e captura de pontos

Modelo de lâmina (configuração da digitalização)

As opções de criação de modelos de lâminas e de digitalização são as mesmas do que para a digitalização interfásica de rotina

- Para mais pormenores, consulte [Modelos de lâminas \(FISH\)](#).

Para as amostras FISH, as regras de captura são definidas no painel *AutoCapture* [Captura automática] do Modelo de lâmina, selecionando "SpotCounting" [Contagem de pontos] na lista **Capture Mode** [Modo de captura].

- **Objetiva:** seleciona a lente utilizada para a captura automática; a lente de 63x é a ideal para FISH (100x não é recomendada devido a um campo de visão mais pequeno e a uma intensidade de luz reduzida).

AutoCapture

☒ Perform AutoCapture

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks ☒

No SPOT assay selected

Select Spot assay

- O estado de **Autocamera setup** [Configuração da câmara automática] determinará a forma como as imagens são captadas com grande ampliação durante a captura automática;
 - **Enabled** [Ativado]: (Recomendado) Para cada canal a captar, o sistema efetuará um ajuste de exposição automático com base na intensidade de qualquer fluorescência presente na imagem.
 - **Disabled** [Desativado]: Para cada canal a captar, o sistema utiliza valores de câmara fixos de fluorocromos da **Build List** [Lista de criação] ("Save as Default" [Guardar como predefinição] no painel de configuração da captação ou com o utilitário separado **Fluorochrome Camera Calibration** [Calibração da câmara de fluorocromo] - não recomendado para utilização de rotina).
- **Configuração da contracoloração:** Melhora o cálculo da exposição da **Autocamera Setup** [Configuração da câmara automática] nos canais de fluorocromo, trabalhando apenas nas áreas que contêm fluorescência de contracoloração (máscara DAPI) e sendo menos afetado por resíduos fluorescentes fora da célula.
- **Configuração na sonda:** Melhora o cálculo da exposição da **Autocamera Setup** [Configuração da câmara automática] utilizando um cálculo baseado no tamanho dos canais de fluorocromo para ser menos afetado por detritos fluorescentes brilhantes.
- **Configuração com Média:** Captura os primeiros n fotogramas utilizando o cálculo de exposição automática padrão para obter um valor médio de integração do fluorocromo para todos os fotogramas restantes (não recomendado para utilização de rotina).
- **Guardar pilhas Z:** Guarda cada imagem de pilha e fluorocromos juntamente com a camada de projeção máxima (combinada).
- **Select Spot assay** [Selecionar ensaio de pontos] abre o painel Assay Selector [Selecionador de ensaios] para escolher um ensaio de pontos adequado que será utilizado como lista de captura e para o processamento de imagens durante a captura automática.
- **Lista de fluorocromos:** não é selecionável. As definições da lista de captura e dos fluorocromos são definidas no ensaio de pontos e estão ligadas aos fluorocromos da **Build List** [Lista de criação] predefinida.
- **Post Capture options** [Opções pós-captura]: não é selecionável. A contagem de pontos cria dados de imagem da **Lista de fotogramas** que não utilizam as funções de delimitação ou de captura personalizada.

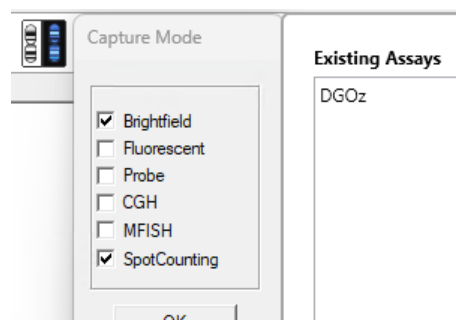
Nota: Se existirem nomes de listas nos painéis **Lista de fluorocromos** ou **Opções pós-captura**, isso significa que a área de digitalização foi previamente definida para o modo Sonda ou Sonda Automática, onde estes são obrigatórios.

- Recomenda-se a criação de uma nova área para a contagem de pontos, de modo a manter estas áreas em branco.

Captura manual

A captura manual de contagem de pontos utiliza o ecrã de captura padrão.

1. Clique em Capture Mode [Modo de captura] e selecione Spot Counting [Contagem de pontos] para abrir a caixa de diálogo Assay Seletor [Selecionador de ensaios].
2. Selecione ou crie um ensaio de pontos.
3. Quando um ensaio é selecionado, a lista de captura é criada automaticamente a partir dos fluorocromos padrão da *Build List* [Lista de criação] definidos no ensaio.
4. Confirme que o painel Fluorochrome Selection [Seleção de fluorocromos] apresenta os fluorocromos corretos.
As definições da pilha Z serão herdadas do ensaio, podendo no entanto ser alteradas antes da captura.
5. Confirme se o painel de captura *Customize* [Personalizar] está definido para a opção "Save Stacks" [Guardar pilhas] para guardar as camadas da pilha Z como imagens separadas na lista de fotogramas final.

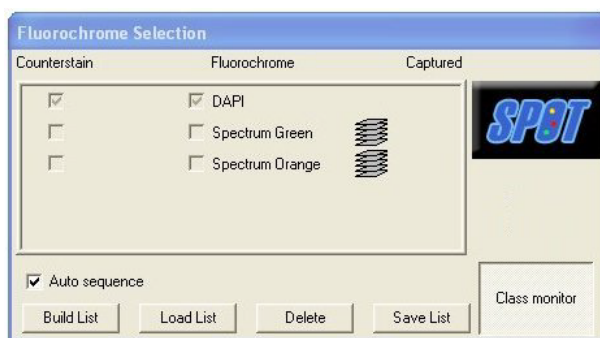


Capture a imagem das células tal como faria na [Probe capture](#) [Captura de sonda] normal.

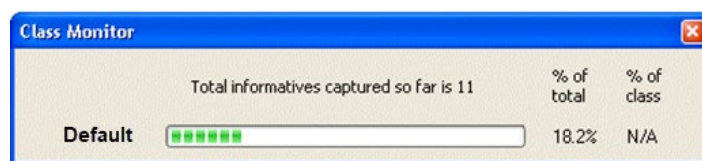
- Desligue a **Auto Sequence** [Sequência automática] e a **Auto Camera Setup** [Configuração automática da câmara] e efetue uma ou duas capturas para obter as definições corretas da câmara.
 - O botão de alternância **Auto Setup** [Configuração automática] por baixo da imagem pode ainda ser utilizado para determinar automaticamente as melhores definições para a lâmina.
 - Quando as definições da câmara estiverem corretas, ligue a **Auto Sequence** [Sequência automática]. Este processo será mais rápido do que utilizar a **Auto Camera Setup** [Configuração automática da câmara] para cada fotograma.
- As imagens serão processadas pelo ensaio à medida que forem captadas. Não existe delimitação, os dados em bruto são utilizados para criar uma lista de fotogramas para processamento de imagens.
- Assim que terminar a captura, passe para o ecrã Analysis [Análise]. Isto concluirá o processamento das células na lista de fotogramas.

Captura e monitor de classe

Quando a Captura de pontos automática ou manual é iniciada, o painel **Fluorochrome Selection** [Seleção de fluorocromos] de pontos é exibido, mostrando os nomes dos fluorocromos definidos no ensaio.



Clique no ícone **Class Monitor** [Monitor de classe] para exibir a caixa de diálogo do monitor de classe.



O número total de células informativas processadas até ao momento é apresentado na parte superior da caixa de diálogo.

- A barra mostra o número de células *informativas* como uma percentagem da contagem de Parâmetros do ensaio.

Paragem da captura de pontos automática

A captura automática do *CytoVision DX* GSL destina-se a ser executada sem necessidade de ajuste ou interação.

A captura automática para quando se verifica uma das seguintes condições:

- O número de **Fotogramas** em Stop After [Parar após] foi atingido.
- O número de Células **Informativas** em Stop After [Parar após] foi atingido.
- A captura foi concluída para todos os fotogramas na área de digitalização.
- O botão **Stop** [Parar] é premido manualmente.

A menos que o botão **Stop** (Parar) seja premido, o GSL passará então para a lâmina seguinte no lote e efetuará a digitalização ou a captura automática nessa lâmina, conforme necessário.

Consulte o [exemplo de procedimentos passo a passo](#) para executar uma lâmina de contagem de pontos para [captura manual](#) ou para uma [digitalização e captura automática](#) completa.

Anexo: FISH de tecidos

Descrição geral da FISH de tecidos

A funcionalidade da FISH de tecidos foi concebida para permitir a obtenção de imagens de lâminas da FISH de tecidos, utilizando o hardware de digitalização ou captura do sistema e, em seguida, a revisão ou análise das imagens.

- As opções de digitalização permitem a seleção manual ou automática das áreas de digitalização para captura.
- Os dados da lista de fotogramas são obtidos com o modo de captura automática *Sonda automática* ou através da aplicação da [Captura manual de sonda](#).

A Captura da lista de fotogramas destina-se a ser utilizada com sondas de FISH de ADN, a aplicação não tem qualquer funcionalidade que se destine ao funcionamento com lâminas de amostras de IHC de tecidos ou imunofluorescentes.

- A capacidade do módulo licenciado da *FISH de tecidos* controla o acesso a opções adicionais de Modelos de lâminas nos sistemas de digitalização GSL, não é uma configuração de captura ou análise.
- Todas as funções de captura são funcionalidades de série da capacidade de licença do software da sonda.
- Não existem ferramentas dedicadas de exibição, morfologia ou análise da FISH de tecidos.

Digitalização e captura da FISH de tecidos

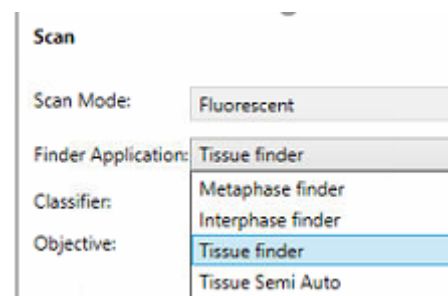
Existem 3 fluxos de trabalho para a configuração de digitalização da FISH de tecidos, que estão disponíveis através de definições no ecrã de modelos de lâminas e são descritos abaixo.

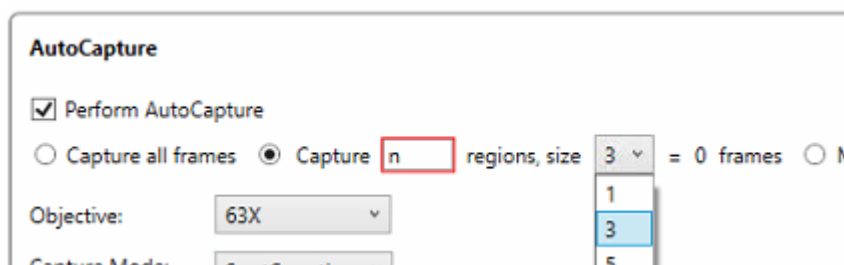
1. Digitalização automática e captura automática (modo Localizador de tecidos, captura automática)
2. Digitalização automática e marcação manual de regiões (modo Localizador de tecidos, captura diferida)
3. Seleção manual da região (Procedimento de tecidos semiautomático, sem digitalização, captura automática)

1) Digitalização automática e captura automática:

Utiliza a aplicação de localização **Tissue finder** [Localizador de tecidos] como parte de um Modelo de lâmina.

- Pré-digitalização de campo claro 1,25x opcional para detetar a gravação na área da lâmina.
- Mapa de focagem de 10x e digitalização que deteta fotogramas de tecido corado com DAPI.
- Captura automática da lista de fotogramas de todos os fotogramas ou de várias regiões da grelha dentro da área de digitalização/gravação.

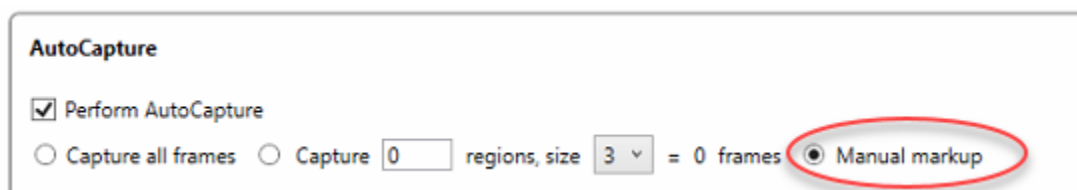
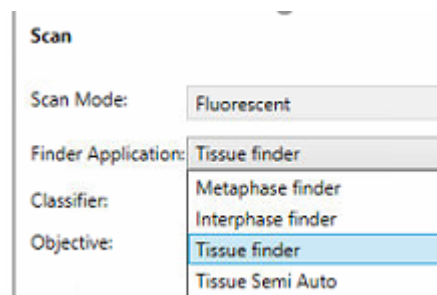




2) Digitalização automática e marcação manual de regiões:

Utiliza a aplicação de localização **Tissue finder** [Localizador de tecidos] como parte de um Modelo de lâmina, com uma Captura automática diferida baseada em regiões selecionadas.

- Pré-digitalização de campo claro 1,25x opcional para detetar a gravação na área da lâmina.
- Mapa de focagem de 10x e digitalização que deteta fotogramas de tecido corado com DAPI.
- Marcação manual de fotogramas ou regiões selecionados utilizando a aplicação da [Marcação da FISH de tecidos](#).
- Captura automática da lista de fotogramas de todos os fotogramas ou de várias regiões da grelha dentro da área de digitalização/gravação.



A marcação manual apenas pode ser utilizada num modelo de digitalização com uma única área de digitalização. Caso tente criar várias áreas de digitalização, gerar-se-á uma mensagem de aviso e não será possível guardar o modelo até que as áreas adicionais sejam eliminadas.

3) Seleção manual da região para a captura automática:

Utiliza a aplicação de localização **Tissue Semi Auto** [Procedimento de tecidos semiautomático] como parte de um Modelo de lâmina com procedimento de Marcação de região individual (pré-digitalização de campo claro opcional para detetar a gravação da área da lâmina) para avaliar e definir regiões para a captura da sonda automática de alta ampliação de uma *lista de fotogramas*.

- Este fluxo de trabalho requer que um joystick USB seja ligado ao sistema.
- Não é efetuada qualquer digitalização, trata-se de um fluxo de trabalho interativo que requer a visualização da lâmina ao microscópio ou em tempo real para definir áreas para posterior captura automática.

Captura manual

Qualquer sistema *CytoVision DX* com configuração de sonda pode utilizar a aplicação de [Captura manual de sonda](#) para criar uma lista de fotogramas.

- As imagens da Captura manual de sonda podem ser capturadas individualmente. Os sistemas de digitalização podem utilizar as opções automáticas de fotogramas 3x3 e 5x5.

Gravação de lâminas

A digitalização de lâminas da FISH de tecidos foi concebida para funcionar de forma ideal em lâminas que tenham sido gravadas com uma caneta de gravação de lâminas/com ponta de diamante, permitindo que a área de digitalização seja determinada automaticamente utilizando uma Pré-digitalização de campo claro antes de quaisquer operações de digitalização e captura.

- Para uma detecção fiável da área, a gravação da lâmina deve ser clara e ininterrupta, afastada dos bordos da lâmina ou da lamela e de qualquer excesso de meios de montagem da lâmina.
- Se a Pré-digitalização estiver definida no Modelo de lâmina e não for detetada uma área gravada, a digitalização não continuará.
- Se a lâmina tiver várias áreas gravadas dentro da área de digitalização, a Pré-digitalização deteta-as e inclui-as nos passos de digitalização e captura automática.
- A opção de pré-digitalização também está disponível utilizando a Digitalização semiautomática para ajudar a identificar manualmente as regiões e para exibir a Descrição geral da lâmina.



Nota: Geralmente, o marcador não cria uma linha nítida de contraste escuro e não é recomendada para uma detecção fiável ou consistente.

A pré-digitalização de lâminas gravadas utiliza a lente de 1,25x com luz de campo claro, pelo que é necessária uma **Calibração da digitalização de campo claro** antes de uma operação bem sucedida.

Marcação da FISH de tecidos (captura diferida)

A Marcação de regiões da FISH de tecidos é uma opção de seleção manual de regiões para utilização com o modo de digitalização Localizador de tecidos.

- As lâminas são digitalizadas a 10x utilizando um modelo definido com a opção de captura automática "Manual markup" [Marcação manual].
- As imagens digitalizadas são disponibilizadas num Visualizador de marcação da FISH de tecidos que apresenta uma descrição geral unida do tecido fluorescente, permitindo ao utilizador criar regiões de captura.
- Uma captura diferida é iniciada utilizando o Modo de captura *Sonda automática* padrão quando todas as lâminas tiverem definido regiões de Captura automática.

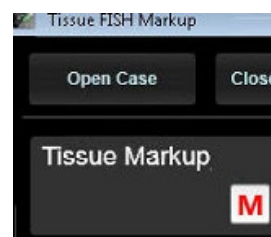


A aplicação do Visualizador de **marcação da FISH de tecidos** é utilizada para selecionar regiões de Captura automática para lâminas digitalizadas com a opção de Captura automática "Manual markup" [Marcação manual] do Localizador de tecidos.

- O Visualizador de marcação pode ser aberto diretamente num sistema de digitalização, no ecrã de configuração Scan Batch of Slides [Digitalizar lote de lâminas], quando uma lâmina com dados de marcação for carregada como parte de um fluxo de trabalho de captura diferida.
- Clique no "M" vermelho por baixo da lâmina exibida para ir para o ecrã de visualização da lâmina.

Em alternativa, o Visualizador de marcação pode ser aberto através de uma aplicação autónoma que possa ser executada em qualquer sistema *CytoVision DX* ligado em rede.

1. Abra a aplicação em **Start [Iniciar] > All Programs [Todos os programas] > CytoVision DX > Tissue FISH Markup [Marcação da FISH de tecidos]**.
2. É exibido o botão Open Case [Abrir processo] num fundo preto.
3. Selecione Open Case [Abrir processo] para exibir a janela Select Cases [Selecionar processos].
4. Pesquise e abra um processo conhecido por conter digitalizações, utilizando a opção Manual Markup [Marcação manual].
5. Quaisquer lâminas de marcação da FISH de tecidos com dados de digitalização de 10x serão automaticamente atualizadas no ecrã - um "M" vermelho indica que não foram definidas regiões de Captura automática.
6. Clique no "M" para abrir o ecrã Tissue FISH Markup Viewer [Visualizador de marcação da FISH de tecidos].

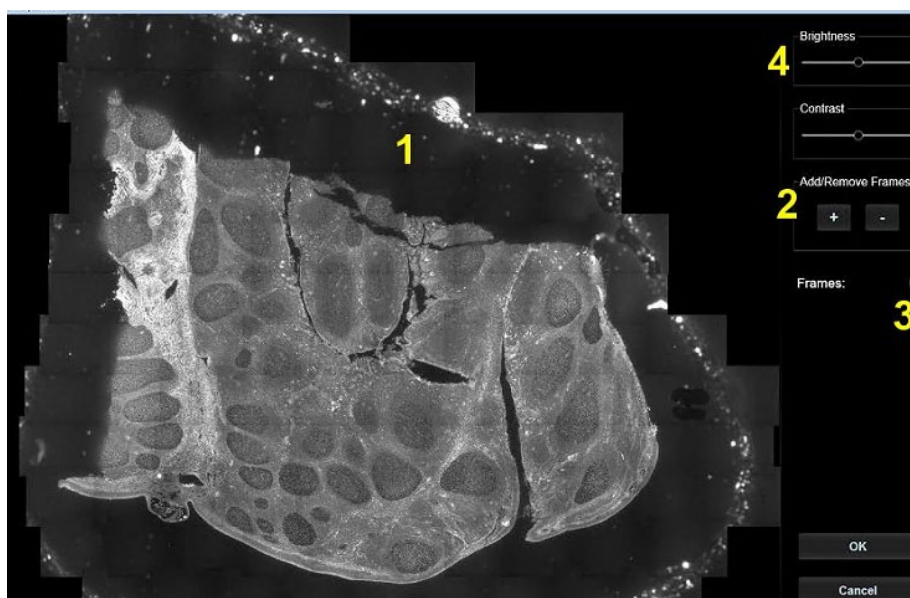


Se um processo estiver a ser digitalizado ou for aberto noutra sistema ou no Visualizador de marcação, será apresentado um símbolo com um cadeado. Antes de se tentar o procedimento de marcação, o Monitor de digitalização deve ser utilizado para confirmar que a digitalização está concluída para um processo num lote de digitalização ativo.

Ecrã Markup Viewer [Visualizador de marcação]

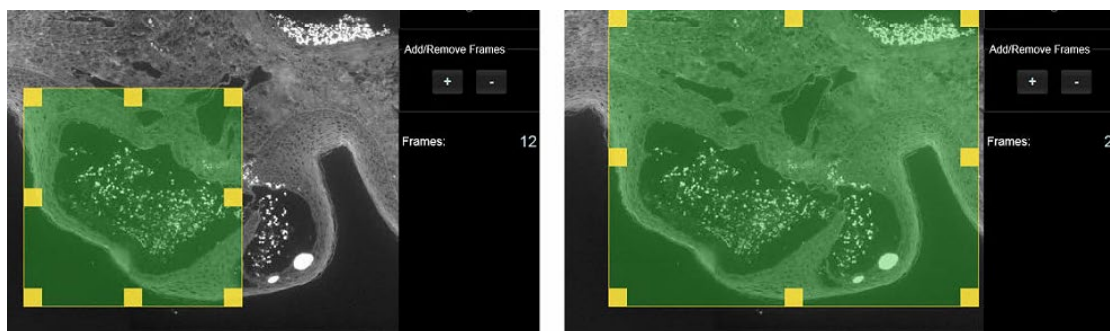
O ecrã Tissue FISH Markup Viewer [Visualizador de marcação da FISH de tecidos] apresenta uma descrição geral da digitalização do Localizador de tecidos a 10x com ferramentas para adicionar ou remover regiões de Captura automática.

1. **Exibição de digitalização** das imagens unidas de digitalização fluorescente a 10x.
 - Aumente/reduza o zoom utilizando a roda do rato.
 - Mova a imagem ampliada arrastando-a com qualquer um dos botões do rato.
2. **Adicionar ou remover** regiões de Captura automática.
 - Selecione o botão "+" e clique na imagem para soltar uma região.
 - Selecione o símbolo "-" e clique numa região existente para a remover.
3. **Exibição de fotogramas.**
 - Quando uma região é adicionada, é exibido um número de fotogramas que indica quantas capturas estão previstas para a Captura automática.
 - Alterar o tamanho da região na exibição de imagens aumentará ou diminuirá esse número à medida que o sistema recalcula as posições de Captura automática.
4. **Seletores de melhoria de imagem.**
 - As opções Brightness [Brilho] e Contrast [Contraste] ajustam a exibição da descrição geral da digitalização de 10x, se necessário, para melhorar a identificação visual das áreas a capturar.



Exemplo de fluxo de trabalho

- Utilize a roda do rato para aumentar o zoom até ao nível de detalhe necessário para determinar as regiões de captura.
- Selecione a opção "+", que estará destacado a azul.
- Clique com o botão esquerdo do rato sobre a imagem para soltar uma caixa de região, sombreada a verde.
- Arraste a caixa com o botão esquerdo do rato premido para a reposicionar, arraste as margens da caixa com o botão esquerdo do rato premido para a redimensionar;
 - O sistema calcula o número de fotogramas completos e parciais da lente de captura de alta ampliação que são necessários para incluir toda a área da região
 - O redimensionamento modificará a exibição de fotogramas à medida que o sistema recalcula

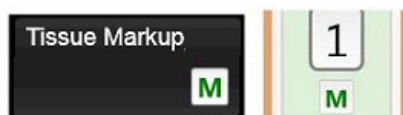


Podem ser adicionadas várias regiões da mesma forma

- As regiões próximas ou sobrepostas não permitirão realizar duas vezes a captura do mesmo fotograma. O número de fotogramas só aumentará quando for necessário capturar novos fotogramas completos.
- Para remover regiões, selecione o símbolo " - " e clique na região a eliminar

Clique em OK para fechar a janela Viewer [Visualizador], voltando assim ao ecrã Markup Case Open [Processo de marcação aberto] ou ao ecrã Scan Batch of Slides [Digitalizar lote de lâminas].

- As lâminas atualizadas com regiões de captura passam agora a ser exibidas com um "M" verde.



Assim que se iniciar uma digitalização diferida, a Captura automática continuará. Prevê-se que a *Sonda automática* seja utilizada para gerar imagens da Lista de fotogramas.

Anexo: Captura de M-FISH

As informações abaixo requerem que o sistema *CytoVision DX* esteja ativado para os módulos licenciados *Probe* [Sonda] e *MFISH*, de modo a permitir as definições de configuração adicionais necessárias para a captura de imagens de M-FISH.

- As imagens capturadas devem ser analisadas num sistema que também tenha o módulo licenciado *Karyotype* [Cariótipo] ativado.
- Para a análise de imagens de M-FISH e procedimentos de cariotipagem, consulte as **Instruções de funcionamento do cariotipador *CytoVision DX***.

Introdução à técnica M-FISH

M-FISH é uma abreviatura aceite de **Hibridação in situ fluorescente multicolor** ou **multiplex** e é utilizada para definir a cariotipagem de 24 cores de preparações cromossômicas (também conhecida como *Cariotipagem espectral* ou *SKY*).

Trata-se de uma técnica de FISH combinatória em que a mistura de sondas contém um conjunto de tintas de ADN de biblioteca para cada cromossoma numa metáfase. Cada conjunto de sondas cromossômicas é identificado com uma combinação única de fluorocromos que, quando observados à luz fluorescente com filtros e processados com um sistema de imagiologia, produzem uma "cor" distinta.

Isto pode ser utilizado para classificar os cromossomas num cariótipo e identificar material cromossômico rearranjado.

- Não é possível utilizar a M-FISH de cromossomas completos para identificar rearranjos cromossômicos internos, como inversões, deleções ou duplicações.
- Os cromossomas derivados não fornecem diretamente informações sobre os braços p ou q.

A M-FISH é uma técnica experimental difícil de dominar, exigindo uma boa experiência na FISH em laboratório e uma utilização eficiente dos componentes do microscópio.

- Os filtros corretos para a imagiologia fluorescente e as lentes objetivas equivalentes Plan-Fluor ou Plan Apo são tão essenciais como o software do sistema de imagiologia.

Os kits de sondas de M-FISH disponíveis no mercado utilizam uma contracoloração de DAPI com 5 etiquetas adicionais de fluorocromos, permitindo 31 combinações possíveis (2^5-1), embora geralmente sejam utilizadas apenas 24.

- Os kits de sondas de M-FISH utilizam frequentemente fluorocromos semelhantes, mas não necessariamente os mesmos, sendo que os filtros utilizados para um conjunto podem não ser os ideais para outro.
- Poderá ser necessário obter filtros adicionais ou versões modificadas dos filtros utilizados nos trabalhos de rotina de FISH para reduzir o risco de qualquer fuga de luz das outras etiquetas na lâmina.
- Os filtros de M-FISH devem ser de banda estreita ou com máximos de excitação ou emissão concebidos para funcionar com os outros fluorocromos da amostra e não apenas com o mais eficiente para um determinado fluorocromo.

Descrição geral da captura

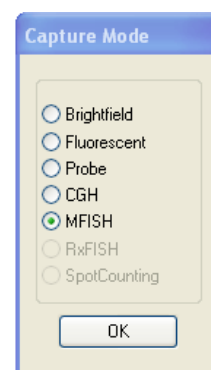
A captura da M-FISH baseia-se na [Captura de sonda](#) normal sem uma opção de delimitação manual - existe um processamento automático em segundo plano dos dados em bruto.

- A familiaridade com os controlos do ecrã e o fluxo de trabalho de captura é essencial antes de se tentar configurar a M-FISH e realizar operações de captura.
- A M-FISH é uma técnica de captura manual e não pode ser utilizada como parte de um fluxo de trabalho de digitalização e captura automáticas num sistema de digitalização CytoVision.
- É possível efetuar a captura manual num sistema de digitalização *CytoVision DX* utilizando a funcionalidade de realocação de metáfases. Consulte as **Instruções de funcionamento do cariotipador *CytoVision DX***.

Configuração da captura

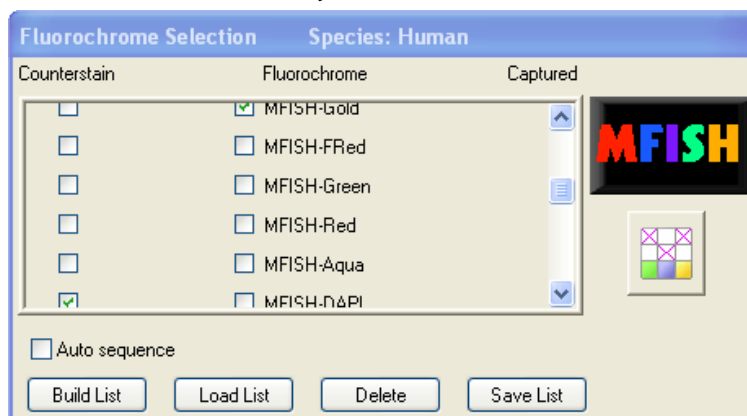
Clique no ícone **Capture Mode** (Modo de captura) no ecrã de captura normal e selecione M-FISH.

- Abre-se o painel Fluorochrome Selection [Seleção de fluorocromos].
- Se tiver criado e guardado anteriormente uma lista de capturas de M-FISH, carregue-a; caso contrário, crie uma nova lista utilizando as opções padrão da Lista de criação da sonda.



Lista de capturas

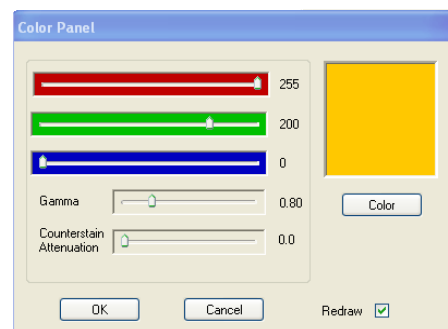
A lista de capturas no painel **Fluorochrome Selection** [Seleção de fluorocromos] deve ser criada pela ordem de captura, sendo a contracoloração o último canal.



Recomenda-se a utilização de nomes de fluorocromos de M-FISH especialmente criados com definições de cor específicas para melhorar a sobreposição de cores a ser observada na análise.

As cores exatas da sonda podem ser modificadas, no entanto, a configuração de cores recomendada para os fluorocromos é a seguinte:

Cor \ Fluo	VERMELHO	VERDE	AZUL
DAPI	63	63	63
Verde-água/DEAC	0	145	255
FITC/Verde	0	220	0
Dourado/Cy3	255	200	0
Vermelho	255	0	0
Vermelho remoto/Cy5	0	0	255
Cy5.5	0	145	255
Normalmente, não se utiliza verde-água/DEAC e Cy5.5 em conjunto			



Fluomap

Quando uma nova lista de capturas estiver pronta, é necessário definir o Fluomap. Trata-se das combinações únicas de fluorocromos que se encontram no kit de sonda utilizado e que devem ser definidas para criar as classificações de M-FISH necessárias para a identificação cromossômica e a cariotipagem.

- Clique nas caixas correspondentes por baixo de cada classe de cromossoma para definir as combinações de sondas, sendo apresentadas cruzes.
- O FluoMap tem de ser combinado com o kit de sonda específico com que se está a trabalhar.
- Os exemplos apresentados abaixo servem apenas de referência e mostram combinações de sondas de M-FISH anteriores que podem ter sido utilizadas numa determinada altura.



	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 (Descontinuado)

	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 - Descontinuado)

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

24XCyte Variation-1

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

24XCyte Variation-2

Depois de criar o Fluomap, clique em **"Done"** [Concluído] e guarde-o juntamente com a lista de capturas, utilizando a função **"Save list"** [Guardar lista] na janela Fluorochrome selection [Seleção de fluorocromos].

Embora os nomes dos fluorocromos variem consoante os kits de sondas, as suas propriedades espectrais são equivalentes. Um kit convencional de filtros de M-FISH de banda estreita seria o seguinte:

- DAPI (convencional)
- Filtro Spectrum Aqua (para verde-água ou DEAC)
- Filtro Spectrum Green para verde, FITCe
- Filtro Spectrum Gold (Yellow) para dourado, laranja, Cy3, TRITC.
- Filtro Spectrum Red para vermelho, Texas Red ou Cy3.5
- Filtro Spectrum FRed para vermelho remoto ou Cy5

Filtros e microscopia

Se utilizar filtros de microscópio pré-existent, certifique-se de que são filtros de especificação de banda estreita que evitam a fuga de sinal, especialmente de etiquetas de sondas próximas, como laranja (Cy3) e vermelho.

- Os kits de sondas que utilizam Cy3/laranja e Texas Red/Cy3.5 em combinação devem ser imagens com filtros que utilizem estes dois canais de cor semelhantes. Deve ser utilizado o Spectrum Gold de banda estreita em vez de um conjunto de filtros de banda larga Spectrum Orange ou TRITC.
- Não utilize filtros genéricos de "verde", "laranja" ou "vermelho", disponíveis em muitos fornecedores de filtros, uma vez que estes aumentam o risco de passagem de cor, o que pode interferir com o processamento e a classificação corretos.
- Em caso de dúvida, contacte o representante de assistência da Leica para verificar as especificações dos filtros e das sondas.

Durante a utilização do microscópio, recomenda-se reduzir ao máximo a exposição à luz ultravioleta, mais nociva (utilizada para a contracoloração de DAPI), uma vez que a luz ultravioleta é um excitador genérico de todos os fluorocromos na lâmina, especialmente o Cy5/vermelho remoto, que pode ser suscetível de sofrer descoloração.

- Normalmente, um dos outros componentes da sonda (por exemplo, Spectrum Gold/Orange) apresenta uma intensidade de sinal suficiente para detetar células com uma ampliação reduzida e para o 1.º canal de captura.
- Em seguida, capta-se o sinal de Spectrum FRed (Cy5) de menor intensidade, seguido (sem ordem específica) de verde, vermelho, verde-água e, por fim, do DAPI de contracoloração.
- Se possível, utilize o controlo por software de uma fonte de luz fluorescente (Xylis/X-Cite 120 PC) para diminuir a intensidade da luz que chega à lâmina, reduzindo ao mínimo qualquer foto-branqueamento.

Captura de imagens de M-FISH

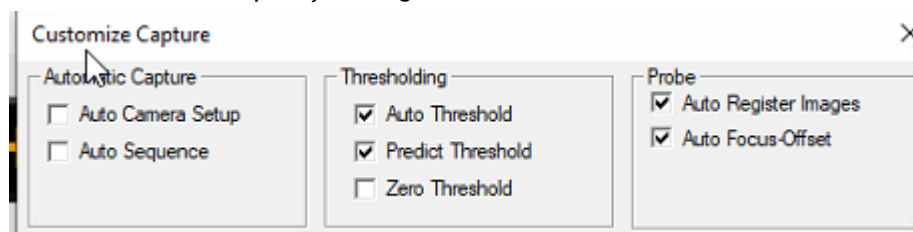
Exemplo de procedimento que tem por base a visualização manual ao microscópio para a identificação de células para captura.

O objetivo é capturar cada imagem da forma mais eficiente possível, reduzindo tudo o que cause atrasos no processo ou mantenha a luz fluorescente (especialmente a Uv/o DAPI) na lâmina durante mais tempo do que o necessário.

- Se possível, utilize um dos canais de sonda com maior luminosidade - como o Spectrum Gold - para identificar metáfases para captura.
- O vermelho remoto (Cy5) não é visível a olho nu, por isso, para determinar a exposição e a focagem de captura, é necessário utilizar a imagem da câmara em tempo real. Evite utilizar a configuração automática para este canal devido a exposições longas.
- Se, em vez disso, for necessário utilizar o DAPI, não mantenha a luz a incidir sobre a lâmina mais tempo do que o necessário para detetar e capturar a imagem, de modo a reduzir o foto-branqueamento dos canais da sonda.
- A digitalização de lâminas de M-FISH a 10x para criar uma lista de lâminas para realocação de metáfases exigiria a utilização de DAPI, uma vez que nenhum outro canal mostraria intensidade e detalhes do objeto suficientes num sistema de digitalização.

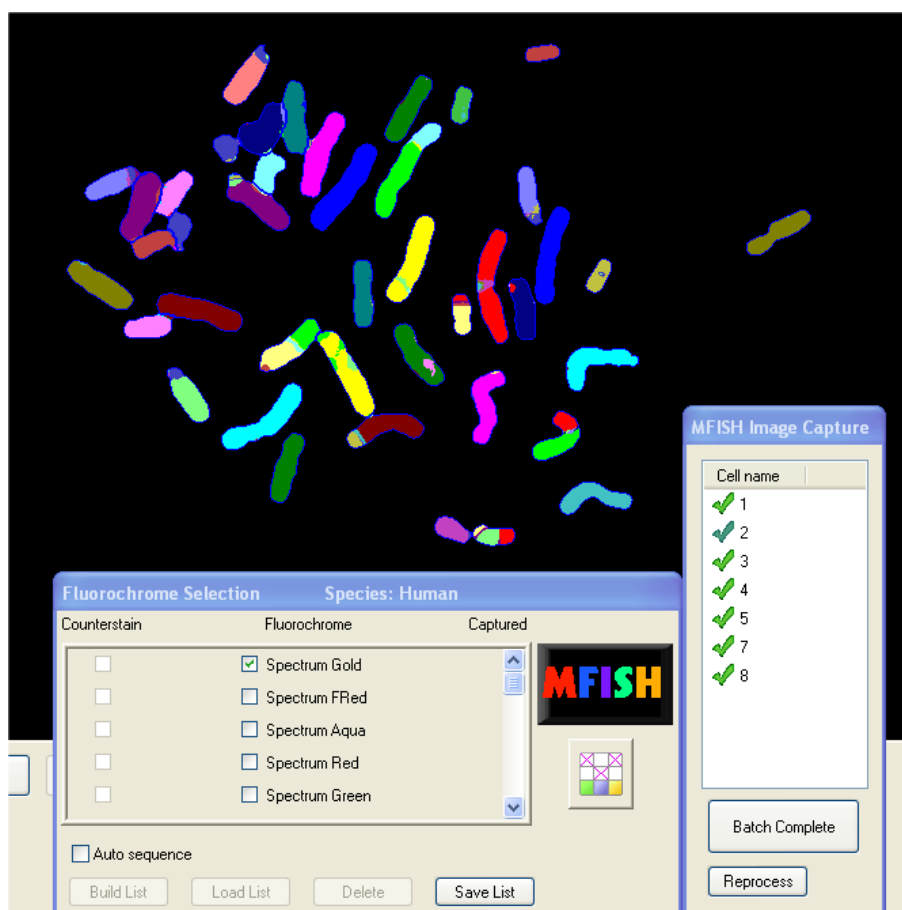
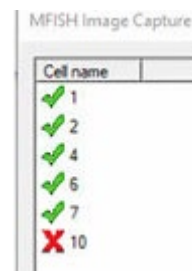
Opções de Customize Capture [Personalizar captura]

- A opção Auto Threshold [Delimitação automática] deve estar ativada; a opção Auto Camera Setup [Configuração automática da câmara] deve estar desativada.
- A primeira captura manual deve identificar a exposição adequada da câmara utilizando a opção "AutoSetup" [Configuração automática] na janela principal da imagem para cada canal, que deve ser mantida em capturas subsequentes - a utilização da configuração automática para o canal de vermelho remoto causará atrasos desnecessários sempre que os cálculos de exposição longa forem efetuados.



1. **Abra** ou **crie** um processo no sistema e aceda ao **ecrã Capture [Captura]**.
2. Detete visualmente as células com uma ampliação reduzida, utilizando o **filtro dourado**.

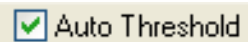
3. Mude para uma ampliação de 63x ou 100x e capture primeiro o canal de dourado. A delimitação é efetuada automaticamente pelo sistema e a imagem em bruto guardada é exibida no ecrã.
4. Em seguida, capte o canal de vermelho remoto/Cy5. Normalmente, este canal tem o requisito de exposição mais longo, podendo exigir uma pequena mudança de focagem entre os outros canais.
5. Termine a captura dos outros canais e de DAPI, tal como faria numa imagem de sonda normal.
6. Assim que o último canal for capturado, a aplicação começa a processar a célula e a opção New Cell/Live [Nova célula/Tempo real] passa para a célula seguinte, pronta para repetir a captura.
7. Após alguns segundos, o painel de *MFISH Image Capture* [Captura de imagens de M-FISH] apresentará um visto verde ou uma cruz vermelha.
 - uma cruz vermelha indica um erro no processamento, normalmente devido a uma fluorescência baixa ou fraca ou a um contraste fraco. Se isto se verificar, efetue o procedimento de nova delimitação descrito abaixo ou volte a capturar a célula.
8. Assim que terminar em todas as células, selecione "Batch Complete" [Lote concluído] ou passe para o ecrã de arranque para concluir o processamento e criar as imagens de metáfases prontas para análise.



Nota: Não é possível capturar células utilizando outros modos de captura numa lâmina de M-FISH.

Delimitação manual

Na captura de M-FISH de rotina, espera-se que a definição *Auto Threshold* [Delimitação automática] permita uma captura eficiente de todos os canais e a gravação da imagem em bruto de cada canal de sonda que é processada para criar a metáfase para análise.



Esta opção pode ser desativada no painel Customize Capture [Personalizar captura], de modo a permitir uma delimitação manual para o canal de contracoloração durante o procedimento de captura em tempo real.

- Durante a captura da contracoloração (DAPI), canalize o painel de delimitação.
- Efetue uma **remoção de fundo** na imagem, sendo recomendada uma definição entre 15 e 25, consoante o tamanho dos cromossomas.
- Depois, defina a delimitação como habitualmente - apenas o canal de contracoloração apresenta as opções de delimitação manual, pois os canais de sonda continuam a ser processados automaticamente.

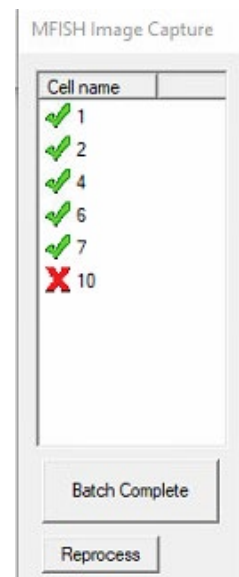
Esta opção pode ser utilizada para evitar que cromossomas pálidos ou de pequenas dimensões se percam ou sejam eliminados durante o passo de delimitação automática; no entanto, não é recomendada para a captura de rotina, uma vez que atrasa o processo de captura.

Nova delimitação

É possível efetuar uma nova delimitação da imagem de contracoloração utilizando o painel de processamento de M-FISH depois de concluída a captura.

Existem 2 ocasiões em que pode ser necessária uma nova delimitação manual da célula após o processamento:

- Se o processamento automático da célula falhar (normalmente, só aparece uma cruz vermelha quando o registo da imagem falha, geralmente devido a um ou mais componentes fracos ou a um DAPI com fraco contraste).
- Se o processamento automático resultar na eliminação de cromossomas de pequenas dimensões ou de cromossomas próximos de núcleos. Isto ocorre com maior frequência se a imagem da contracoloração de DAPI for fraca, uma vez que o sistema não consegue obter corretamente uma máscara completa para todos os cromossomas na metáfase.



Procedimento

1. Selecione a célula na janela **M-FISH Image capture** [Captura de imagens de M-FISH] (em caso de falha no processamento, aparecerá uma mensagem de erro).
2. Clique no botão **Threshold** [Delimitação] na barra de ferramentas principal do ecrã. Aparece uma janela Threshold [Delimitação] geral.
3. Efetue uma **remoção de fundo** na imagem, sendo recomendada uma definição entre 15 e 25, consoante o tamanho dos cromossomas.
4. Em seguida, defina a delimitação como habitualmente e selecione Accept [Aceitar]. O sistema voltará a processar a imagem utilizando a sua nova máscara de DAPI.

Nota: Após o reproprocessamento de uma única célula, poderá não ser possível carregar a metáfase da última célula da devida lâmina. Se isso acontecer, reinicie o software da aplicação e reabra o processo antes de continuar.

Reprocessar

O reprocessamento pode ser utilizado em qualquer altura após a conclusão da captura de M-FISH para repor todas as células na lâmina, eliminando quaisquer imagens de metáfases ou cariótipos existentes, e repetir novamente o processamento de imagens em bruto.

- Abre-se a janela Fluomap, permitindo a modificação de qualquer uma das combinações de sondas (caso tenha ocorrido um erro na criação original do mapa e este só tenha sido identificado após a captura).

Anexo: Exemplo de procedimentos passo a passo

Em todos os exemplos de procedimentos, certifique-se de que a lâmpada fluorescente e os componentes do microscópio estão ligados e, nos sistemas de digitalização, ligue o GSL e confirme que existe óleo suficiente no mecanismo de lubrificação.

- Para alternar entre objetivas de baixa e alta ampliação, utilize sempre os controlos do software (painel de objetivas ou teclas de função).

Captura de sonda padrão



Exemplo de procedimento para a captura manual de imagens de FISH após o carregamento manual da lâmina e a identificação das células.

1. Entre no ecrã de captura padrão selecionando o ícone do ecrã de captura na barra de ferramentas principal.
2. Abra ou crie um processo e selecione uma lâmina no Navegador. Se for necessário criar uma lâmina, clique com o botão direito do rato no processo e selecione **New Slide** [Nova lâmina] no menu.
3. Clique em **Capture Mode** [Modo de captura] e selecione **Probe** [Sonda]. 
4. Configure os fluorocromos que vai utilizar para a captura no painel Fluorochrome Selection [Seleção de fluorocromos] (para carregar uma lista pré-guardada).
5. Selecione as opções que pretende utilizar em **Customize** [Personalizar] (para carregar um modelo). 
6. Clique em **New Cell** [Nova célula].
7. Clique em **Live** [Tempo real].
8. Foque e centre a imagem.
9. (Opcional) Se a intensidade da contracoloração for forte, abra o painel de interface da lâmpada fluorescente e ajuste a % de intensidade da lâmpada para um valor mais baixo, por forma a reduzir o foto-branqueamento do filtro de U.V./DAPI. 
10. Clique em **Auto Setup** [Configuração automática]. As definições da câmara otimizam o contraste da imagem para quaisquer alterações na focagem ou posição.
11. Caso seja difícil obter um bom contraste, abra a janela **Capture Setup** [Configuração da captura] para ajustar:
 - os seletores de **Autosettings** [Definições automáticas] (avançadas), que controlam a exibição da configuração automática da câmara
 - os seletores **Black** [Preto] e **Bright** [Brilho] até obter um melhor contraste de imagem. O fundo deve ter um aspeto suave e escuro. Se a imagem tiver um aspeto baço e cinzento claro, pode ter demasiada luz, pelo que deve reduzir o nível de exposição.
12. Selecione **Capture** [Capturar] quando a imagem estiver focada e continue com o processo de delimitação.
13. Se a opção **Auto Threshold** [Delimitação automática] estiver ativa, a imagem será processada e a captura continuará.
 - Caso contrário, aparecerá o ecrã de delimitação.
 - Ajuste a delimitação para eliminar um fundo indesejado.
14. Se a opção **Auto Sequence** [Sequência automática] estiver ativa, o sistema continuará para o fluorocromo seguinte após a delimitação.
 - Caso contrário, clique em **Live** [Tempo real] para capturar o fluorocromo seguinte.
15. Repita os passos 7-12 até que todos os fluorocromos tenham sido capturados.
 - Se as opções **Auto Camera Setup** [Configuração automática da câmara], **Auto Sequence**

[Sequência automática] e **Auto Threshold** [Delimitação automática] estiverem ativas, o sistema continuará a capturar o resto dos fluorocromos.

Captura de sonda manual de fotogramas de imagem



Exemplo de procedimento para a captura manual de imagens de FISH após o carregamento manual da lâmina e a identificação das células.

1. Abra ou crie um processo e selecione uma lâmina no Navegador. Se for necessário criar uma lâmina, clique com o botão direito do rato no processo e selecione **New Slide** [Nova lâmina] no menu.
2. Entre no ecrã Manual Probe Capture [Captura manual de sonda] selecionando o ícone preto da câmara na barra de ferramentas principal, que só está disponível no ecrã de arranque.
3. Configure ou carregue a lista de capturas de fluorocromos que vai utilizar para a captura.
4. Confirme que a contracoloração está definida e que cada canal tem a cor, a atribuição do filtro e as definições da pilha Z corretas, conforme apropriado.
5. Selecione o componente de contracoloração. Quando o obturador fluorescente estiver aberto, a barra deslizante de exposição pode ser ajustada, se necessário, para visualizar a imagem em tempo real.
6. Foque e posicione a imagem conforme necessário.
7. Confirme que a opção **Auto Exposure** [Exposição automática] está selecionada e clique em **Capture** [Capturar]
 - A exposição ideal da câmara é calculada para a contracoloração e captura automaticamente a imagem.
 - Assim que os filtros são mudados, a exposição ideal da câmara é automaticamente calculada para o primeiro canal da sonda, e a imagem é capturada.
 - Os restantes canais são automaticamente capturados de forma sequencial.
8. Repita os passos 5 a 7 para cada imagem nova.

Alternativa: Selecione **Capture** [Capturar] com exposição de configuração automática com base numa área selecionada.

9. Selecione o componente de contracoloração, clique numa área da imagem em tempo real para ajustar automaticamente a exposição da câmara utilizando apenas as informações dessa área.
10. Foque e posicione a imagem conforme necessário.
11. Clique em **Capture** [Capturar]
 - A exposição ideal da câmara é recalculada para a contracoloração com base na área selecionada e captura automaticamente a imagem.
 - Assim que os filtros são mudados, a exposição ideal da câmara para a área selecionada é automaticamente calculada para o primeiro canal da sonda, e a imagem é capturada.
 - Os restantes canais são automaticamente capturados de forma sequencial.
12. Repita os passos 9 a 11 para cada imagem nova.

Alternativa: Selecione **Capture** [Capturar] (sem configuração automática)

13. Selecionar o componente de contracoloração, se necessário, e ajuste a barra deslizante de exposição manualmente ou clicando numa área selecionada da imagem em tempo real.
14. Foque e posicione a imagem conforme necessário.
15. Selecione o canal seguinte e, depois de o filtro ser mudado, ajuste a barra deslizante de exposição manualmente ou clicando numa área selecionada da imagem em tempo real.

16. Repita o procedimento para os restantes canais, assegurando que fica predefinida uma exposição ideal da imagem em tempo real para cada componente da lista de capturas.
17. Confirme que a opção **Auto Exposure** [Exposição automática] está desmarcada e clique em **Capture** [Capturar]
- a imagem de contracoloração é imediatamente capturada e, assim que os filtros são mudados, é capturado cada canal de fluorocromos sem ajustar a exposição da câmara.
18. Repita os passos 13 - 17 para cada imagem nova (reajustando a exposição nos passos 15 e 16 em imagens adicionais, se necessário).

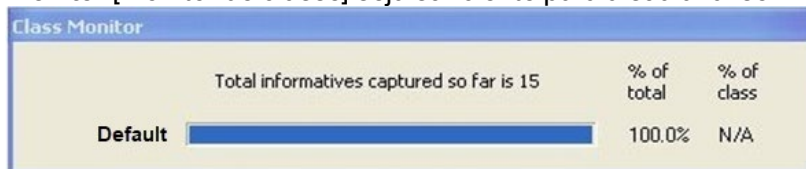
Captura de pontos manual



Exemplo do procedimento para a captura de imagens de contagem de pontos num Sistema de captura.

1. Entre no ecrã de captura padrão selecionando o ícone do ecrã de captura na barra de ferramentas principal.
2. Abra ou crie um processo e selecione uma lâmina no Navegador. Se for necessário criar uma lâmina, clique com o botão direito do rato no processo e selecione New Slide [Nova lâmina] no menu.
3. Clique em **Capture Mode** [Modo de captura] e selecione *Spot Counting* [Contagem de pontos] 
4. Abra-se a janela **Existing Assays** [Ensaio existentes]. Selecione um ensaio adequado para a lâmina e o kit de sondas a utilizar e clique em OK para o atribuir à lâmina.
5. Confirme se as definições dos fluorocromos no **painel Fluorochrome Selection** [Seleção de fluorocromos] estão corretas para a lâmina e para as sondas a capturar.
6. Confirme que as opções **Auto Camera Setup** [Configuração automática da câmara] e **Save stacks** [Guardar pilhas] estão selecionadas na janela **Customize** [Personalizar] da captura.
7. Utilize a tecla de atalho do teclado (número) para aceder ao filtro de contracoloração correto e abrir o obturador fluorescente.
8. Detete manualmente uma área que contenha material celular e mude para a objetiva de captura de alta ampliação utilizando o painel *Objectives* [Objetivas]. Foque e transfira toda a luz para a câmara.
9. Clique em **New Cell** [Nova célula]
10. Clique em **Live** [Tempo real]*. A imagem é exibida no ecrã e a exposição da câmara é ajustada para um contraste ideal.
11. (Opcional) Se a intensidade da contracoloração for forte, abra o painel de interface da lâmpada fluorescente e ajuste a % de intensidade da lâmpada para um valor mais baixo, por forma a reduzir o foto-branqueamento do filtro de U.V./DAPI. 
12. Posicione e volte a focar as células na imagem em tempo real. A opção *Auto Setup* [Configuração automática] pode ser selecionada em caso de alteração do contraste ou da saturação. Se necessário, abra a janela **Capture & Fluorochrome Setup** [Configuração de captura e fluorocromos] para ajustar:
- os seletores Black [Preto] e Bright [Brilho] até obter um melhor contraste de imagem
- os seletores de **Autosettings** [Definições automáticas] (avançadas) podem ser modificados para melhorar o contraste de *Auto Setup* [Configuração automática]
13. Volte a verificar a focagem da imagem e clique em **Capture** [Capturar]. A imagem será guardada.
14. Se a opção **Auto Sequence** [Sequência automática] estiver ativa, o sistema irá capturar os restantes fluorocromos de forma sequencial*, ajustando automaticamente a exposição da câmara e capturando os vários planos da pilha Z configurados no ensaio.

15. Se a opção Auto Sequence [Sequência automática] estiver desativada, clique em **Live** [Tempo real]* para capturar o fluorocromo seguinte e repita os passos 10 - 13 até todos os fluorocromos terem sido capturados.
16. Clique no botão **Class Monitor** [Monitor de classe] na parte inferior da janela Fluorochrome Selection [Seleção de fluorocromos] para ver quantas células foram processadas e marcadas a partir da captura.
17. Repita os passos 9 - 12 (13) para capturar imagens subsequentes em diferentes áreas da lâmina até que o número de "Total informatives..." [Total de células informativas] do **Class Monitor** [Monitor de classe] seja suficiente para a sua análise.



18. Passe para o ecrã **Analysis** [Análise] para concluir a captura e o processamento.

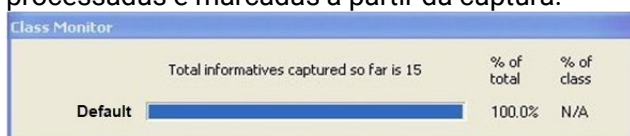
* Ser-lhe-á solicitado que troque os filtros se não tiver uma interface ativa para a torre dicroica do microscópio.

GSL: Contagem de pontos automática

Exemplo de fluxo de trabalho do procedimento para digitalização e captura automática de imagens de contagem de pontos da FISH interfásica num Sistema de digitalização GSL sem etiquetas de código de barras.

1. Passe para o ecrã **Scan** [Digitalização], permitindo à aplicação ligar e alojar o hardware. 
2. (Opcional) Coloque uma lâmina na platina e utilize o [Procedimento de captura de pontos manual](#) em várias imagens para confirmar os valores da câmara, do filtro e da pilha Z.
 - Isto criará um fotograma de imagem onde os parâmetros do ensaio podem ser avaliados num conjunto controlado de imagens.
 - Descarregue a bandeja quando terminar e limpe quaisquer vestígios de óleo na lâmina se esta for utilizada novamente para digitalização
3. No ecrã Scan [Digitalização], selecione o ícone **Scan batch of slides** [Digitalizar lote de lâminas]. 
4. Clique e realce o ícone de lâmina 1 (posição 1, bandeja 1);
 - Selecione o processo em que os dados da imagem serão guardados.
 - Selecione um modelo de digitalização adequado para a lâmina.
5. (Opcional) Pode atribuir um nome a cada lâmina clicando na etiqueta na extremidade fosca da exibição da lâmina.
6. Edite o modelo, confirmando que está configurado para *Fluorescent* [Fluorescente] e *Interphase Finding* [Deteção de interfases], e que o modo de captura está definido como **SpotCounting** [Contagem de pontos].
7. Clique no botão **Select SPOT Assay** [Selecionar ensaio de pontos] para abrir a caixa de diálogo **Existing Assay** [Ensaio existente].
 - Selecione um ensaio da lista ou crie um novo ensaio adequado para a lâmina.
 - Confirme as definições do ensaio e clique em **OK** para atribuir o ensaio selecionado.
8. O modelo de digitalização está pronto a ser utilizado, clique em **OK** para o atribuir à lâmina selecionada.
9. Coloque a lâmina de amostra correta (correspondente ao processo selecionado no passo 5) na posição 1 da bandeja.

10. Selecione o ícone da lâmina seguinte e atribua um caso e um modelo de digitalização. Adicionar a lâmina de amostra correspondente à bandeja e verificar se está corretamente colocada.
11. Repita o procedimento para quaisquer lâminas restantes e posições a utilizar na primeira bandeja. Carregue a bandeja na primeira posição (mais baixa) do empilhador/cassete.
12. Repita o passo para um máximo de 5 lâminas na bandeja 2, colocando a bandeja na posição seguinte (mais baixa) do empilhador/cassete. **Ctrl** ou **Shift** permite-lhe selecionar várias lâminas com o rato e atribuir-lhes o mesmo processo ou modelo.
- Nos sistemas GSL 120, repita este procedimento para todas as restantes lâminas e bandejas a utilizar e, em seguida, coloque a cassete no empilhador e feche a porta.
13. Selecione **Scan** [Digitalizar]: a primeira lâmina será digitalizada com uma ampliação de 10x para detetar células, o óleo é automaticamente adicionado e depois capturado com alta ampliação.
14. Durante a captura, o visor apresentará o ecrã de captura padrão no modo **Spot Counting** [Contagem de pontos] (consulte [Captura de pontos manual](#) para mais informações).
15. (Opcional) Clique no botão *Class Monitor* [Monitor de classe] na parte inferior da janela Fluorochrome Selection [Seleção de fluorocromos] para ver quantas células foram processadas e marcadas a partir da captura.



16. Quando a primeira das contagens de paragem do ensaio é atingida, a captura termina e passa para a lâmina seguinte, repetindo a digitalização, a lubrificação e a captura automática até todas as lâminas estarem concluídas.

