

Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives



Зонд *CytoVision** DX (9.0)

* Зарегистрировано в Патентном ведомстве США и других юрисдикциях по всему миру.

Указания по эксплуатации



Прикладное ПО CytoVision DX версии 9.0 предназначено для диагностики *in vitro*

Указания по эксплуатации CytoVision* DX: зонд

Настоящее руководство применимо к системам сканирования и записи *CytoVision DX* и прикладному ПО *CytoVision DX* версии 9.0

Уведомление об авторских правах

© Leica Biosystems Richmond, Inc., 2024. Все права защищены.

LEICA и логотип Leica являются зарегистрированными торговыми марками компании Leica Microsystems IR GmbH.

CytoVision является товарным знаком компании Leica Biosystems Richmond, Inc. Все товарные знаки других производителей принадлежат соответствующим владельцам.

* Зарегистрировано в Патентном ведомстве США и других юрисдикциях по всему миру.

Компания Leica Biosystems Richmond, Inc не несет никакой ответственности за информацию, содержащуюся в данном документе, и может вносить изменения в такую информацию без предварительного уведомления.

Запрещается создавать копии, распространять, передавать, переписывать, хранить в какой бы то ни было системе поиска информации, а также переводить на любой естественный или машинный язык какую бы то ни было часть настоящего руководства в любой форме и любыми способами с помощью электронных, механических, магнитных, физических и любых других средств, а также раскрывать информацию, содержащуюся в настоящем руководстве, третьим лицам без явного разрешения компании Leica Biosystems Richmond, Inc, 5205 Route 12, Richmond, IL 60071, США.

Производитель и дистрибьютор систем *CytoVision DX*:



Leica Biosystems Richmond, Inc.

5205 Route 12



Richmond, IL 60071

США

Тел. (800)-537-4669



Контактная информация

Чтобы узнать, как связаться с ближайшим дилером компании Leica Biosystems или обратиться в службу поддержки клиентов, посетите веб-сайт www.LeicaBiosystems.com.

Содержание

Меры предосторожности и примечания	6
Введение.....	8
Ресурсы	8
Значение символов	9
Предупреждения и меры предосторожности	9
Технические характеристики образцов и предметных стекол.....	10
Общие сведения о зонде <i>CytoVision DX</i>	12
Сканирование предметных стекол FISH	12
Запись и вывод на экран по методу FISH	13
Отображение и анализ изображений FISH	14
Изображения и типы данных FISH.....	15
Вход в систему и запуск прикладного ПО	16
Сканирование предметного стекла с интерфазами	18
Процедура быстрого старта.....	18
Шаблоны предметного стекла	18
Классификаторы	18
Опции автоматической записи	18
Загрузка предметных стекол и лотков.....	19
Сканирование партии образцов (интерфазы).....	20
Настройка ручного сканирования	22
Назначение задания и шаблона.....	22
Рабочие процессы настройки ручного сканирования.....	23
Сканирование с использованием штрихкодов	25
Настройка назначения предметных стекол.....	26
Рабочие процессы сканирования с использованием штрихкодов	26
Шаблоны предметного стекла (FISH)	27
Область сканирования	28
Предварительное сканирование	28
Сканирование	29
Автоматическая запись.....	30
Вывод на экран и корректировка изображения	33
Просмотр списка интерфаз	35
Просмотр примечаний (Интерфазы).....	35
Просмотр предметного стекла (Интерфаза).....	36
Классификаторы сканирования.....	37
Автоматическая запись	40
Автоматическая запись.....	40

Запись с помощью зонда (изображения клеток)	42
Управление объективом	42
Запись с помощью зонда: обзор процедуры	43
Элементы управления записью	43
Списки записи	44
Запись и настройка флуорохромов	45
Запись с пользовательскими настройками	49
Обработка по пороговым значениям	51
Автоматическая обработка по пороговым значениям	52
Повторная обработка необработанного изображения по пороговым значениям	52
Запись с помощью зонда (Список кадров)	53
Управление объективом	54
Запись с помощью списка кадров: обзор процедуры	54
Параметры настройки записи	55
Добавление каналов	55
Настройка канала	55
Работа со списками записи	58
Запись изображений	58
Завершение записи	59
Вывод изображений зонда	60
Вывод на экран	60
Поиск и устранение неполадок	63
Система записи	63
Ошибки при подключении к микроскопу	63
Влияние качества света микроскопа	63
Система сканирования GSL	63
Ошибки при подключении к GSL	63
Проблемы фокуса при сканировании с 10-кратным увеличением	64
Проблемы при сканировании с 10-кратным увеличением	64
Проблемы при записи с 63-кратным увеличением	65
Проблемы при записи с помощью канала зонда	65
Совместимость предметного стекла и лотка	65
Экспорт журналов диагностики	66
Приложение: Подсчет количества точек	67
Обзор функции подсчета количества точек	67
Анализ в рамках подсчета количества точек	68
Редактирование анализов для записи по точкам	69
Сканирование и запись точек	72
Шаблон предметного стекла (Настройка сканирования)	72

Ручная запись	73
Запись и мониторинг класса	74
Остановка автоматической записи ПО ТОЧКАМ.....	75
Приложение: Tissue FISH	76
Обзор Tissue FISH	76
Сканирование и запись с помощью Tissue FISH	76
1) Автоматическое сканирование и автоматическая запись:	76
2) Автоматическое сканирование и ручная разметка областей:	77
3) Ручной выбор области для автоматической записи:	77
Ручная запись	78
Травление предметного стекла.....	78
Tissue FISH Markup (Отложенная запись)	79
Экран Markup Viewer	79
Приложение: Запись с помощью M-FISH	82
Введение в технику M-FISH	82
Обзор процедуры записи	83
Настройка записи	83
Список записи	83
Fluomark	84
Фильтры и микроскопия	85
Запись изображений методом M-FISH	86
Ручная обработка по пороговым значениям	88
Повторная обработка по пороговым значениям.....	89
Повторная обработка	89
Приложение: Примеры пошаговых процедур.....	90
Стандартная запись с помощью зонда	90
Ручная запись с помощью зонда с использованием кадров изображений.....	91
Ручная запись по точкам	92
GSL: Автоматический подсчет количества точек	93

Меры предосторожности и примечания

Несмотря на то что для обеспечения точности приведенной информации были приложены все возможные усилия, некоторые сведения и иллюстрации могут отличаться в зависимости от версии конкретной системы.

Некоторые категории могут не иметь отношения к конфигурации конечного пользователя.

Технические характеристики и эффективность

Технические характеристики прибора и его компонентов см. в *Технических характеристиках CytoVision DX*.

Установка аппаратного оборудования

Аппаратные компоненты системы сканирования и записи *CytoVision DX* поставляются для установки только компанией Leica Biosystems или ее уполномоченными представителями.

Установка прикладного программного обеспечения

На поставляемые Leica Biosystems компьютерные рабочие станции предустановлено прикладное ПО. Конкретные инструкции по установке ПО на отдельный ПК см. в *Руководстве пользователя CytoVision DX*.

Обучение

Данное руководство и *Руководство пользователя CytoVision DX* являются дополнением к обучению оператора и другим расширенным инструкциям, предоставляемым компанией Leica Biosystems или ее уполномоченными представителями.

Техническое обслуживание, поиск и устранение неисправностей

Сведения о поиске и устранении неисправностей в процессе сканирования и записи см. в главе [Поиск и устранение неисправностей](#).

Сведения об общем техническом обслуживании системы, а также о поиске и устранении неисправностей см. в *Руководстве пользователя CytoVision DX*.

Ремонт

Ремонт может выполняться только уполномоченным представителем Leica Biosystems. После произведения любой операции по ремонту обратитесь к технику для проверки работы прибора, чтобы убедиться, что прибор находится в ожидаемом рабочем состоянии.

Кибербезопасность

Не забывайте, что рабочие станции уязвимы для вредоносного программного обеспечения, вирусов, повреждения данных и нарушений конфиденциальности. Рекомендации по кибербезопасности для конечных пользователей см. в *Руководстве пользователя CytoVision DX*.

Обеспечьте защиту рабочих станций совместно с ИТ-администратором в соответствии с политикой в отношении паролей и безопасности, принятой в вашем учреждении. Конкретные рекомендации по защите рабочих станций и серверов см. в *Технических характеристиках CytoVision DX*; раздел *Администрация сети*.

Безопасность

Защита может быть нарушена, если данное устройство используется способами, отличными от указанных производителем.

Информацию о работе системы и безопасности см. в *Руководстве пользователя CytoVision DX*.

Введение

CytoVision DX — это качественная автоматизированная система для создания и просмотра оцифрованных изображений предметных стекол.

Система CytoVision DX выполняет роль вспомогательного инструмента диагностики *in vitro* для квалифицированного лаборанта и используется в целях просмотра и интерпретации цифровых изображений метафазных хромосом, полученных из периферической крови и костного мозга.

- Система CytoVision DX помогает обнаружить интерфазные и метафазные ядра на стандартных предметных стеклах для микроскопа, которые в противном случае подверглись бы ручной визуализации с помощью обычных методов светлопольной и флуоресцентной микроскопии.
- Квалифицированный лаборант обязан опираться на соответствующие процедуры и меры предосторожности для обеспечения достоверности интерпретации изображений, полученных с помощью системы CytoVision DX.

При подготовке, обработке, хранении и утилизации микропрепаратов необходимо соблюдать методические рекомендации лаборатории, а также правила и процедуры, принятые в вашем учреждении.

Использование данного оборудования разрешено исключительно в таких целях в порядке, описанном в настоящем документе и в **Руководстве пользователя CytoVision DX**.

Ресурсы

Ресурс	Описание
Руководство пользователя CytoVision DX 23MAN9D03	Содержит справочную информацию и инструкции по калибровке пользователем, сканированию предметных стекол, записи изображений, выводу изображений на экран, управлению заданиями и данными, поиску и устранению неисправностей и техническому обслуживанию.
Указания по эксплуатации кариотайпера CytoVision DX 23MAN9D02	Содержат инструкции по сканированию предметных стекол с метафазами, записи изображений, выводу изображений на экран, анализу хромосом (кариотипированию), а также поиску и устранению неисправностей в работе ПО.
Указания по эксплуатации зонда CytoVision DX 23MAN9D01	(Данный документ) содержит инструкции по флуоресцентному сканированию (FISH) предметных стекол, записи изображений, выводу изображений на экран, анализу хромосом (кариотипированию), а также поиску и устранению неисправностей в работе ПО.
Технические характеристики CytoVision DX 23MAN9D03	Содержат подробные технические характеристики различных версий прибора CytoVision DX.

Значение символов

Символ	Пояснение
	ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ относительно лазерного луча. Защищайте глаза и кожу от его воздействия Оптическое излучение — запрещается направлять пучок света в глаза.
	ВНИМАНИЕ! Опасность заземления: не прикасайтесь к движущимся деталям.
	Знак CE
	Изготовитель

Предупреждения и меры предосторожности

Система сканирования или записи, поставляемая с микроскопом и моторизованными компонентами для сканирования, представляет собой требующий аккуратного обращения прецизионный инструмент, к эксплуатации которого допускается только специально обученный персонал. Ни в коем случае не допускается подвергать систему резкому или сильному механическому воздействию.

Подробнее см. в **Руководстве пользователя CytoVision DX**.

Технические характеристики образцов и предметных

Характеристика	Подробное описание
Тип образцов	Зонд <i>CytoVision DX</i> используется для обнаружения и получения изображений флуоресцентно-окрашенных метафазных хромосом, интерфазных ядер клеток и тканей. Образцы необходимо подготовить с использованием принятых методов культивирования и подготовки клеток и нанести на предметные стекла для микроскопа.
Окрашивание образцов	Система оптимизирована для окрашивания клеток интерфазы красителем DAPI. Эффективность проверялась не для всех возможных вариантов окрашивания образцов и методов подготовки и напрямую зависит от качества и интенсивности окрашивания образца, а также от присутствия фоновых посторонних веществ на предметном стекле. Такие факторы, как атипичная интенсивность окрашивания или сильный фон, могут снизить эффективность нахождения клеток и автоматической записи и потребовать дополнительного вмешательства пользователя.
Технические характеристики предметных стекол	Тип предметных стекол. Стекланные предметные стекла с квадратными (вертикальными) краями. Размеры предметных стекол. Прямоугольные стекла с углами 90° в пределах 75,1–76,1 мм в длину; 24,9–26,1 мм в ширину; 0,9–1,2 мм толщиной - Предметные стекла, размеры которых превышают указанные, могут не поместиться в лоток GSL, поэтому их нельзя использовать в системе сканирования. - Предметные стекла с размерами менее указанных или с углами 45° (обрезанными) могут не поместиться в стандартный лоток GSL, поэтому следует использовать альтернативный (скошенный) лоток артикула 23GSL903XXX001 — это следует указать при заказе системы. Не рекомендуется использовать предметные стекла, изготовленные не из стекла, так как они могут неплотно прилегать к вставке предметного столика или двигаться на предметном столике, что способно отрицательно повлиять на работу системы и качество изображений.

Покровное стекло	Для получения флуоресцентных изображений необходимо устанавливать стеклянное покровное стекло. • Толщина покровного стекла 170 мкм (± 5 мкм) является оптимальной для обеспечения оптической точности при использовании масляных иммерсионных объективов с высоким коэффициентом увеличения. • Покровное стекло не должно выступать за края предметного стекла. Покровное стекло и этикетка должны полностью прилегать к предметному стеклу. • В заливочной среде не должно быть пузырьков воздуха; не следует начинать работу до фиксации заливочной среды. Установка покровного стекла не должна мешать объективам микроскопа достичь необходимого фокусного расстояния относительно образца.
Ограничения для предметных стекол	Предметные стекла, окрашиваемые DAPI, должны иметь яркую, высококонтрастную интенсивность окрашивания, различного пользователем при просмотре в окулярах микроскопа при 10-кратном увеличении, с защитой от выцветания для уменьшения фотообесцвечивания. Снижение концентрации или интенсивности окрашивания DAPI на предметном стекле может привести к снижению надежности 10-кратной фокусировки и операции сканирования либо к сбоям сканирования.

Общие сведения о зонде CytoVision DX

Указания по эксплуатации, содержащиеся в данном документе, относятся к управлению ПО и операциям, выполняемым при сканировании предметных стекол FISH, записи и выводе на экран, а также к процедурам подсчета, применимым к системе CytoVision DX и сконфигурированным для лицензионного программного модуля **Probe** (Зонд).

Пользователь должен быть знаком со стандартным применением приложения, функциями экранов, аппаратными элементами управления, управлением заданиями, функциями отображения экрана и изображений и связанными с ними приложениями, одинаковыми для всех систем, на которых установлено прикладное ПО CytoVision DX.

- Подробнее см. в **Руководстве пользователя CytoVision DX**.

Дополнительные указания по эксплуатации содержат конкретные инструкции для образцов и рабочих процессов сканирования, записи и кариотипирования предметных стекол с метафазами.

- Подробные сведения см. в **Указаниях по эксплуатации кариотайпера CytoVision DX**.

Все решения в процессе интерпретации изображений принимаются пользователем. Качественные требования к образцу отсутствуют, однако инструменты записи и вывода на экран оптимизированы для получения изображений с помощью цветочувствительных ДНК-зондов с иммерсионным объективом микроскопа с высоким коэффициентом увеличения для анализа окрашенного DAPI материала образца с использованием комплектов узкополосных флуоресцентных фильтров в зависимости от образца.

Сканирование предметных стекол FISH

При сканировании и автоматической записи предметных стекол методом FISH используются функции поиска, классификации, перемещения и записи флуоресцентных образцов в прикладном ПО.

Перед началом любого автоматического сканирования и автоматической записи:

- Необходимо использовать функцию **Fluorescent Scan Calibration** (Калибровка флуоресцентного сканирования) для определения интенсивности съемки и смещения фокуса между объективами для сканирования и записи.
- Режимы автоматической записи шаблонов предметного стекла используют флуорохром и параметры записи из настроек экрана записи (*Build List* (Создать список), **Save List** (Сохранить список) или *Customize Capture* (Пользовательские настройки записи)). Такие настройки устанавливаются и конфигурируются до начала любого автоматического сканирования и автоматической записи.

Для каждого типа образца предусмотрен рекомендуемый режим сканирования *Finder* (Поиск) и *AutoCapture* (Автоматическая запись), основанный на ожидаемых требованиях к выводу на экран данного типа образца.

Тип предметных стекол	Предварительное сканирование (1,25-кратное)	Режим поиска (флуоресцентный)	Режим автоматической записи	Формат изображения
Метафаза FISH	Н/Д	Метафаза	Зонд	Папка клетки
Интерфаза FISH	Н/Д	Метафаза	Зонд	Папка клетки
Интерфаза FISH	Н/Д	Интерфаза	ProbeAuto / Подсчет количества точек	Список кадров
Tissue-FISH	Обнаружение области травления	Ткань	ProbeAuto / Подсчет количества точек	Список кадров
M-FISH	Н/Д	Метафаза	Н/Д (Только вручную)	Папка клетки

- Для режима *Tissue Finder* необходим лицензионный модуль **Tissue FISH**.
- Для записи с подсчетом количества точек необходим лицензионный модуль **Spot Counting** (Подсчет количества точек) в целях автоматической обработки сигналов изображений интерфаз FISH в процессе записи изображений.
- Альтернативные комбинации режимов сканирования и записи не ограничены для работы пользователя, однако они могут оказаться неоптимальными для обязательных настроек записи или последующего вывода на экран.

Шаблон предметного стекла системы сканирования GSL можно установить с несколькими перекрывающимися областями сканирования на одном предметном стекле; каждая область сканирования может быть настроена для отдельного режима автоматической записи с использованием флуоресцентной подсветки, если для вывода на экран необходимо наличие изображений как в формате папки с клетками, так и в формате списка кадров.

Запись и вывод на экран по методу FISH

Система *CytoVision DX* использует 2 формата изображений FISH, которые можно сохранять для последующего вывода на экран: **Cell folder** (Папка клетки) и **Image Frame** (Кадр изображения) (список кадров).

Тип образцов	Автоматическая запись	Ручная запись	Опции записи
Метафаза FISH	Зонд	Зонд (Клетка)	Обработка по пороговым значениям
Интерфаза FISH	Зонд	Зонд (Клетка)	Пороговые значения, карта срезов по оси Z
Интерфаза FISH	ProbeAuto	Зонд (Кадр)	Карта срезов по оси Z
Интерфаза FISH	Подсчет количества точек	Подсчет количества точек*	Анализ точек
MFISH (Метафаза)	Н/Д	MFISH* (Клетка)	Н/Д
* Требуется дополнительных лицензионных модулей ПО			

Отображение и анализ изображений FISH

Тип изображения	Применение анализа	Параметры анализа	Параметры экрана/отображения
Изображения из папки клетки (стандартный зонд или запись методом M-FISH)			
Raw Image (Исходное изображение)	Повторная обработка по пороговым значениям	Н/Д	Export (Экспорт)
Зонд (Метафаза FISH)	Экран, создание метафаз*	Экран просмотра заданий, комментариев	Экспорт и печать
Зонд (MFISH*)	Экран	Экран просмотра заданий, комментариев	Экспорт и печать
Зонд (Интерфаза FISH)	Экран	Экран просмотра заданий, комментариев	Экспорт и печать
Метафаза (MFISH*)	Сегментация и создание кариограммы*	Количество просмотров задания и номер Комментарий, вывод на экран MFISH	Экспорт и печать
* Требуется дополнительных лицензионных модулей ПО (сведения об опциях кариограммы см. в Указаниях по эксплуатации кариотайпера).			
Изображения списка кадров (ProbeAuto или запись с подсчетом количества точек)			
Список кадров	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Работа с изображениями требует использования отдельного ПО для анализа изображений, совместимого с форматом списка кадров.			

Изображения и типы данных FISH

CytoVision DX использует для записи 2 формата изображений.

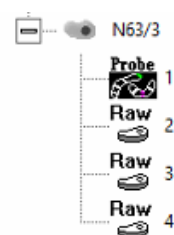
1. Изображения заданий (папки клетки), которые записываются с помощью стандартных опций экрана записи.
2. Предметные стекла списка кадров, которые записываются с помощью специальных режимов записи зонда (кадр изображения).

Прежде чем приступить к сканированию или записи предметных стекол методом FISH, важно выбрать наиболее подходящий режим записи, чтобы определить доступные опции для вывода на экран и анализа.

Зонд (Папка клетки).

Формат на основе клеток, предназначенный для записи образцов метафаз и интерфаз, полученных методом FISH, с выводом на экран изображений и участием оператора, использующего стандартные инструменты на начальном экране.

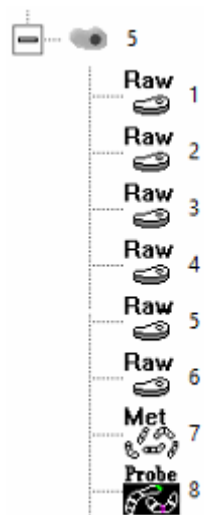
- Ручная запись с использованием режима зонда на экране записи.
- Автоматическая запись с помощью системы сканирования с использованием режима записи с помощью зонда в шаблоне предметного стекла.
- Цветные и необработанные изображения сохраняются для отдельных клеток на уровне предметных стекол в инструменте «Навигатор заданий».
- Параметры улучшения, комментирования, печати и экспорта изображений.
- Изображения могут выводиться на экран в режиме просмотра заданий.
- Дополнительная обработка по пороговым значениям (удаление фона) создает объекты, которые можно копировать на гибкие экраны и объединять с объектами изображений из других стандартных режимов записи или заданий.
- Кариотипы зонда могут быть созданы на основе изображений метафаз методом FISH в системе с активированным модулем лицензионного ПО Karyotype.



M-FISH.

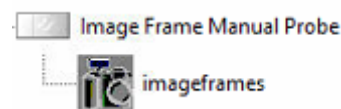
Формат на основе клеток, предназначенный для комбинаторных маркированных (разноцветных) образцов, полученных методом FISH, с выводом на экран изображений и участием оператора, использующего стандартные инструменты на начальном экране.

- Ручная запись с использованием режима *MFISH* на экране записи.
- Автоматическая запись с помощью системы сканирования не возможна.
- Цветные и необработанные изображения сохраняются для отдельных клеток на уровне предметных стекол в инструменте «Навигатор заданий».
- Кариотипы M-FISH могут быть созданы на основе изображений метафаз методом FISH в системе с активированным модулем лицензионного ПО Karyotype.
- Параметры улучшения, комментирования, печати и экспорта изображений.
- Изображения могут выводиться на экран в режиме просмотра заданий.
- Объекты можно копировать на гибкие экраны и объединять с объектами изображений из других режимов записи с использованием папки клетки или заданий.



Зонд (Список кадров).

Формат целого изображения, разработанный для создания образцов интерфейсы или Tissue FISH, совместимый с отдельным ПО для анализа изображений и взаимодействия.

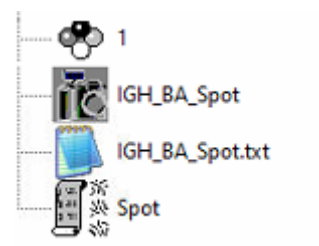


- Ручная запись с использованием экрана **Probe Capture** (Запись с помощью зонда) с помощью кадров изображений.
- Автоматическая запись с помощью системы сканирования с использованием режима записи *ProbeAuto* в шаблоне предметного стекла.
- Отсутствие обработки по пороговым значениям для объектов. Все данные цветных и необработанных изображений объединяются в единый список кадров на уровне предметного стекла.
- Слои карты срезов по оси Z сохраняются как отдельные изображения вместе с максимальной проекцией.

Подсчет количества точек.

Для систем с модулем **Spot Counting** (Подсчет количества точек) доступны дополнительные опции.

- Ручная запись в стандартном режиме экрана записи *Spot Counting* (Подсчет количества точек) (сохраняет информацию как список кадров).
- Автоматическая запись с помощью системы сканирования с использованием режима записи *Подсчет количества точек* в шаблоне предметного стекла.
- Автоматическая обработка сигнала с использованием конфигурируемого анализа точек для параметров записи и сканирования.



При выборе альтернативных опций записи с помощью зонда следует учитывать ключевые различия между каждым типом записи и возможности последующего анализа.

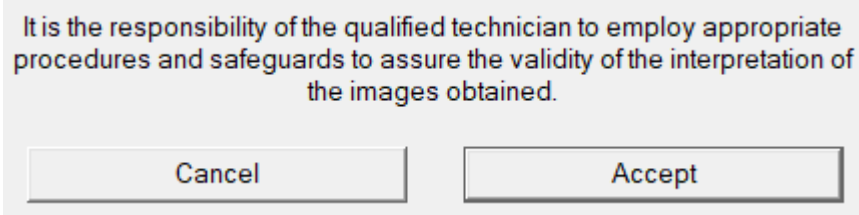
Данные функции *Кадры изображений* (список кадров зонда и подсчет количества точек) не имеют опций вывода на экран и анализа в приложении для *CytoVision DX* и требуют использования отдельного ПО для анализа изображений, совместимого с форматом списка кадров.

Вход в систему и запуск прикладного ПО

1. Включите монитор рабочей станции и ПК, при появлении запроса выполните вход под именем пользователя, которому предоставлены соответствующие разрешения безопасности для данного приложения.
2. Включите GSL, микроскоп и контроллеры флуоресцентных ламп, необходимые для предполагаемого использования.
3. Запустите приложение, дважды щелкнув ярлык на рабочем столе или выбрав пункт в меню **Windows Пуск (Все программы) > CytoVision DX > CytoVision DX**.



4. На экране появится подтверждение для конечного пользователя.



5. Щелкните **Accept** (Принять) для подтверждения использования и продолжения работы с приложением (или **Cancel** (Отмена), чтобы закрыть окно).

Сканирование предметного стекла с интерфейсами

Процедура быстрого старта

Данные инструкции предполагают, что перед началом полного сканирования с поиском интерфейсов с использованием флуоресцентной подсветки и автоматической записи изображений соблюдены следующие условия:

1. Система была правильно настроена и откалибрована (включая функцию **Fluorescent Scan Calibration** (Калибровка флуоресцентного сканирования)) в соответствии со стандартными процедурами Leica Biosystems, в соответствии с **Руководством пользователя CytoVision DX**.
2. Доступен соответствующий **Classifier** (Классификатор) клеток.
3. По завершении ручной записи созданы **Fluorochrome Lists** (Списки флуорохромов) и **Post Capture Options** (Действия после записи) для режимов зонда.
4. Создан **Slide Template** (Шаблон предметного стекла) с действительной областью сканирования и правилами сканирования и записи.
5. Предметные стекла размещены в кассете с лотками GSL, начиная с 1-го положения 1-го лотка.

Шаблоны предметного стекла

Каждому предметному стеклу, которое предстоит сканировать, необходимо присвоить определенный шаблон сканирования, содержащий в себе все необходимые настройки, которые позволяют системе обнаруживать клетки, классифицировать и сортировать их в специальную последовательность записи, а затем выполнять автоматическую запись необходимого количества изображений.

- Подробнее см. в разделе [Шаблоны предметного стекла](#).

Классификаторы

Стандартные классификаторы, поставляемые с программным обеспечением, основаны на репрезентативных образцах интерфейсов, полученных с флуоресцентной подсветкой, которые, как ожидается, позволяют начать работу без существенной модификации.

- Данные классификаторы могут не соответствовать характеристикам образцов пользователя по причине предполагаемой и стандартной вариативности при подготовке образцов и предметных стекол.
- Для каждого из типов образцов, которые будут использоваться системой, важно проанализировать эффективность выбранного классификатора, чтобы понять необходимость дальнейшей оптимизации.
- К стандартным классификаторам можно добавить дополнительные изображения из новых сканов либо создать новые классификаторы.
- Подробнее см. в разделе [Классификаторы > Обучение и редактирование](#).

Опции автоматической записи

Каждый из доступных режимов автоматической записи после обнаружения клеток требует соответствующей настройки записи для использования с несколькими зондами (флуорохромами).

Для каждого зонда комбинация флуорохромов должна быть сначала записана вручную, чтобы создавать, изменять и сохранять необходимые **Fluorochrome Lists** (Списки флуорохромов) или **Post Capture Options** (Действия после записи) в шаблоне сканирования.

Последние должны быть настроены во время ручной записи репрезентативных предметных стекол методом FISH для каждого типа образца, комплекта зонда или анализа точек, которые впоследствии будут использованы для сканирования и записи.

- Запись репрезентативного изображения производится с использованием ручной записи в режиме **Probe** (Зонд).
- Подтвердите настройки фильтра и цвета для каждого названия флуорохрома и сохраните комбинацию каналов зонда как «Список флуорохромов» для использования в режимах автоматической записи *Зонд* и *ProbeAuto*.
- Для режима зонда также требуются *Post Capture options* (Действия после записи) (Шаблон записи *Пользовательские настройки*).
- Для режима подсчета количества точек требуется анализ, привязанный к названиям флуорохромов по умолчанию.
- Подробные сведения см. в разделе, посвященном записи, для каждого режима.

Загрузка предметных стекол и лотков

Откройте дверцу и извлеките кассету с лотками из укладчика GSL.

- Укладчик необходимо опустить в самое нижнее положение, прежде чем можно будет разблокировать механизм фиксации дверцы и добавить или извлечь из кассеты лотки.
- Кнопка **Unlock Door** (Разблокировать дверцу) расположена в окне **Scan Setup*** (Настройка сканирования), которое открывается с экрана сканирования (сканирование партии образцов), а также появляется при нажатии кнопки **Load Slide** (Загрузить предметное стекло) на экране записи. При этом кассета будет опущена, а механизм фиксации дверцы разблокирован.



Поместите чистые предметные стекла в лоток GSL этикетками назад.

- Предметное стекло 1 в каждом лотке находится с левой стороны. На предметном стекле не должно быть остатков масла, а покровное стекло или образец должны располагаться лицевой стороной вверх.
- Убедитесь, что предметное стекло размещено ровно во вставку и сдвинуто вверх (назад) и влево относительно контрольных краев, прежде чем отпустить фиксирующий его пружинный зажим.
- Отпустив пружинный зажим, убедитесь, что он крепко удерживает предметное стекло. Прикоснитесь к предметному стеклу, оно не должно двигаться.
- Повторите описанные действия для оставшихся предметных стекол и лотков.



В системах GSL120 после загрузки предметных стекол в лоток его следует вставить обратно в кассету с лотками таким образом, чтобы магнитное крепление находилось внутри, а отверстие доп. оси X было обращено наружу.

- Лоток 1 находится в самом нижнем положении, лоток 24 — в самом верхнем.
- Убедитесь, что каждый лоток вставлен ровно (горизонтально) в свое гнездо и что внешний край каждого лотка находится на одном уровне с соседними.

После закрытия дверцы и до начала нового сканирования или автоматической записи система повторно сканирует кассету на наличие лотков.

- При сканировании с использованием штрихкодов все обнаруженные лотки будут загружены и проверены на наличие предметных стекол, содержащих штрихкоды.
- При ручном сканировании положение лотка соответствует положениям, назначенным вручную с указанием названия задания и шаблона на экране настройки сканирования.



Во время сканирования и автозаписи из соображений безопасности кассета поднята, чтобы закрыть дверь. Если требуется вставить или извлечь лоток, необходимо остановить текущее сканирование или запись.

* При выборе параметра *Scan Setup* (Настройки сканирования) выполняется проверка использования памяти, чтобы определить, можно ли отсканировать всю партию образцов. Если использование памяти приложения превышает заданные пороговые значения,

- появится предупреждающее сообщение, а окно настройки сканирования не откроется.
- Перед выполнением любых действий, связанных со сканированием, необходимо перезапустить приложение.

Сканирование партии образцов (интерфазы)

1. Убедитесь, что компоненты GSL и микроскопа включены и что в устройстве подачи масла достаточно масла.
2. Запустите приложение *CytoVision DX* и перейдите на экран сканирования, чтобы приложение могло подключиться и переместить оборудование в исходное положение.
3. Щелкните значок «Сканировать партию образцов». Откроется окно [Scan Setup](#) (Настройка сканирования) для сканирования вручную.
(В случае образцов с штрихкодами, связанных с названием задания и шаблоном предметного стекла, перейдите к шагу **12** после размещения образцов в лотках и кассете.)
4. Нажмите и выделите предметное стекло 1 (положение предметного столика 1).
5. Выберите задание, в котором будут сохранены данные изображения.
6. Выберите шаблон предметного стекла, который имеет правильные правила сканирования и автоматической записи для данного предметного стекла.
7. Щелкните этикетку на матированном конце изображения предметного стекла, чтобы присвоить предметному стеклу имя.

6. Поместите предметное стекло с образцом, соответствующим выбранному заданию (и названию образца) в 1-е положение лотка. (Подробные сведения см. в процедуре [Загрузка предметных стекол и лотков](#)).
7. Выберите значок следующего предметного стекла и назначьте ему задание и шаблон сканирования. Добавьте соответствующее предметное стекло с образцом в лоток и проверьте, правильно ли оно размещено.
8. Повторите описанные действия для оставшихся предметных стекол и положений, которые будут использоваться для первого лотка. Загрузите лоток 1 в первое (самое нижнее) положение в укладчике/кассете.
9. Повторите данную процедуру для всех оставшихся предметных стекол и лотков и загрузите кассету в блок укладчика.
10. Поместите кассету в укладчик GSL и закройте дверцу.
11. Нажмите кнопку Scan (Сканирование), чтобы начать сканирование.
(В случае образцов с штрихкодами щелкните значок *Scan Slides with Barcodes* (Сканировать образцы с штрихкодами)).
12. Первое предметное стекло будет отсканировано с использованием параметров сканирования, установленных в шаблоне.
- Сканирование (с 10-кратным увеличением): см. [Шаблоны предметного стекла > Сканирование](#)
13. Для запуска 10-кратного сканирования система должна составить карту фокусировки по нескольким точкам в области сканирования.
На эту процедуру влияют:
- правильность настройки **Fluorescent Scan Calibration** (Калибровка флуоресцентного сканирования); а также
- близость к образцу начальной точки фокусировки, установленной во время процедуры **Spatial Calibration** (Пространственная калибровка) (изменения происходят в результате любого смещения фокуса, сохраненного в шаблоне предметного стекла).
14. Во время сканирования с 10-кратным увеличением система просматривает изображения с камеры при каждом перемещении предметного столика (кадре) и сравнивает обнаруженные объекты с [классификатором](#), настроенным в шаблоне предметного стекла. Это позволяет определить, сколько классифицированных клеток можно записать.
15. После завершения сканирования с 10-кратным увеличением классифицированные клетки сортируются для определения приоритета записи перед переходом к этапу *автоматической записи*.
16. Происходит автоматическая подача масла, и объектив с высоким коэффициентом увеличения перемещается в нужное положение, способствуя равномерному распределению масла по поверхности предметного стекла.
17. После этого записываются изображения (кадры) с высоким коэффициентом увеличения. Для каждого изображения система автоматически фокусируется, чтобы определить фокусное расстояние, а затем выполняет запись с использованием специальных настроек для выбранного шаблона и переходит к следующей клетке.
18. Как только будет записано нужное количество изображений (в соответствии с настройками шаблона сканирования или анализа точек), запись завершится, и *CytoVision DX* перейдет к следующему предметному стеклу, повторно воспроизводя этапы сканирования, подачи масла и автоматической записи до тех пор, пока все предметные стекла не будут обработаны.
19. Приложение **Scan Monitor** (Монитор сканирования) записывает действия и время их выполнения для каждой фазы предварительного и основного сканирования и записи в ходе сканирования партии. С ним необходимо сверяться в случае любой непредвиденной проблемы.

Более подробные пошаговые рабочие процессы см. в [Приложении](#) в конце данного руководства.

Настройка ручного сканирования



Если все параметры образцов и сканирования настраиваются вручную, важно, чтобы выбранные шаблоны и задания отвечали физическим образцам, установленным в системе.

- Чтобы снизить вероятность ошибки, рекомендуется тщательно сверять соответствие предметных стекол и настроек или использовать специальную таблицу с выбранными заданиями и положениями предметных стекол.
- Использование функции [Сканирование штрихкодов](#) на предметных стеклах с этикетками в системах GSL оптимизирует эффективность сканирования и снижает риск ошибок при настройке сканирования.

Назначение задания и шаблона

- На экране сканирования выберите на главной панели инструментов значок **Scan batch of slides** (Сканировать партию образцов). Откроется окно, в котором будут отображаться все потенциальные места расположения предметных стекол, которые можно выбрать для сканирования.
- Назначьте задание и шаблон для каждого сканируемого образца. Название предметного стекла указывать необязательно. Если его не ввести, система будет использовать следующий доступный для данного задания номер, добавляя в конце положение предметного стекла в качестве идентификатора, т. е. Slide 1_1 (лоток 1).
- Щелкните значок задания, чтобы открыть список заданий, имеющихся в сети. Выберите задание из списка или введите имя, если необходимо создать новое задание.
- После выбора задания оно будет отображаться вместе с идентификационным номером в правой части экрана настройки.
 - Это номер, который отображается на экране предметного стекла.
 - При перезапуске приложения выполняется сброс этого списка.
- При сканировании нескольких образцов из одного задания щелкните название задания в этом списке, чтобы быстро назначить задание, вместо того чтобы искать его на панели с папками задания. Щелкните селектор шаблона предметного стекла, чтобы выбрать и назначить шаблон для образца.
 - Созданные шаблоны для удобства выбора отображаются также в левом верхнем углу окна настройки сканирования.
- Указывать названия предметных стекол необязательно. Если нужно ввести определенное имя, перейдите в поле Slide Name (Имя образца) и введите имя, соответствующее данному образцу.
- Выбрать несколько образцов можно с помощью мыши, удерживая при этом клавишу **Ctrl** или **Shift** в ОС Windows.



Отложенная автозапись

Когда всей партии предметных стекол в микроскопе будут назначены задания и шаблоны, под каждым образцом будет отображаться кнопка со стрелкой.



При ее нажатии открывается окно **Deferred Auto-Capture** (Отложенная автозапись), в котором можно переназначить параметры шаблона таким образом, чтобы разделить операции сканирования и автозаписи.

- **None (Нет).** (По умолчанию.) Система будет выполнять сканирование и автоматическую запись (если это предусмотрено настройкой) каждого предметного стекла, прежде чем переходить к следующему.
- Стандартная настройка для сканирования и записи GSL с автоматической подачей масла.
- **Scan (Сканирование).** Выберите это значение, если необходимо выполнить только операцию сканирования, предусмотренную шаблоном. После каждого сканирования система будет переходить к следующему образцу.
- Используйте в системе GSL при ручном просмотре эскизов сканов перед (отложенной) автоматической записью.
- **Capture (Запись).** Выберите это значение, если необходимо выполнить только автоматическую запись. Данную опцию можно выбрать только в том случае, если в списке предметных стекол есть классифицированные клетки (отмеченные зеленым флажком). При записи будут выполняться правила шаблона, установленные для количества клеток и порядка их сортировки.

Примечание. Выбранные вручную опции сканирования или только записи не характерны для сканирования образцов методом FISH, применимого к образцам интерфазы, и необязательны для сканирования метафаз.

После того как все предметные стекла, задания и шаблоны будут назначены, а лотки загружены в GSL, нажмите кнопку **Scan** (Сканирование) в нижней части страницы настройки сканирования, чтобы начать процесс сканирования. Система проработает все комбинации настроек образца и шаблона.

Рабочие процессы настройки ручного сканирования

В данном случае на практике выполняется 2 основных рабочих процесса:

1. Автоматическое сканирование и запись

Это стандартная процедура для системы GSL, использующей опцию поиска при флуоресцентном сканировании метафаз и интерфаз.

Предметные стекла настраиваются в окне настройки сканирования, и в разделе **Deferred Auto-Capture** (Отложенная автоматическая запись) подтверждается значение **None** (Нет).

- Выполняется сканирование первого образца с низким коэффициентом увеличения и его обработка с использованием выбранного классификатора.
- Классифицированные клетки упорядочиваются с использованием правил сортировки, определенных в шаблоне для операции автозаписи.
- На предметное стекло автоматически подается иммерсионное масло, и начинается операция автоматической записи с высоким коэффициентом увеличения. Выполняется автоматическая фокусировка и запись клеток в выбранном режиме записи с соответствующими настройками.

- После записи выбранного количества клеток, предметный столик перемещается к следующему предметному стеклу или лотку и начинает сканирование и автозапись следующего образца.
- Этот процесс повторяется для всех образцов в партии.

2. Сканирование и отложенная автоматическая запись (метафазы)

Данная процедура необязательна для системы GSL, использующей флуоресцентное сканирование с поиском метафаз, при котором пользователь обязан просмотреть, добавить или удалить классифицированные клетки перед началом автоматической записи.

На странице настройки сканирования выбраны предметные стекла, а для параметра **Deferred Auto-Capture** (Отложенная автоматическая запись) установлено значение **Scan only** (Только сканирование).

- Выполняется сканирование всех предметных стекол с низким коэффициентом увеличения и их обработка с использованием выбранного классификатора.
- После завершения сканирования система возвращается на экран сканирования и прекращает работу.

На данном этапе оператор может незамедлительно запустить процедуру автоматической записи или сначала посмотреть списки метафаз, с тем чтобы изменить классифицированные клетки для записи, а затем выполнить сохранение и вернуться на экран **Scan** (Сканирование).

- Выберите значок *Scan Batch of Slides* (Сканировать партию образцов) (вручную), чтобы открыть окно настройки сканирования.
- Нажмите кнопку **Deferred** (Отложенные), которая будет отображаться в нижней части экрана.
Все положения лотков и названия заданий для предметных стекол, которые были отсканированы только в предыдущей партии (и в списке которых есть хотя бы 1 клетка, отмеченная зеленым флажком), будут заново загружены на экран с комплектом для вывода на экран результатов записи «С».
- (Необязательный этап) Удалите все образцы, запись которых выполнять не нужно. Это может понадобиться после просмотра списков метафаз вручную, в ходе которого выяснится, что некоторые образцы не содержат материала с качеством, достаточным для записи.
- Нажмите кнопку **Scan** (Сканирование), чтобы запустить процедуру автоматической регулировки смещения расположения фокусировки при 10-кратном увеличении.
- Классифицированные клетки упорядочиваются с использованием правил сортировки, определенных в шаблоне для операции автозаписи.

С помощью функции отложенной записи система создает новую карту фокусировки на предметном стекле и сравнивает ее с сохраненными изображениями исходного скана, применяя автоматическое смещение, которое компенсирует любое незначительное движение предметного стекла или лотка во время загрузки и выгрузки лотков.

- На предметное стекло автоматически подается иммерсионное масло, и начинается операция автоматической записи с высоким коэффициентом увеличения. При этом выполняется автоматическая фокусировка и запись клеток с использованием правил пользовательской настройки для опции **Post Capture Options** (Действия после записи).
- После записи выбранного количества клеток предметный столик перемещается к следующему предметному стеклу или лотку и начинает процедуру записи следующего образца.

- Процедура автоматической записи будет выполняться без необходимости дальнейшего вмешательства оператора до тех пор, пока не будет выполнена для всех образцов в партии.

Сканирование смешанной партии

Все режимы сканирования и автоматической записи методом FISH могут быть запущены в системе GSL для смешанной партии.

- К предметным стеклам, для которых выбрано значение «Только сканирование», будет применен компонент сканирования с 10-кратным увеличением.
- Для образцов со статусом «Нет» будут выполнены и компоненты обнаружения клеток и автоматической записи.
- К концу первого прохода предметные стекла с отложенной записью можно обновить на экране настройки сканирования, нажав кнопку **Deferred** (Отложенные), чтобы загрузить предметные стекла, для которых еще предстоит выполнить компонент записи.
- Нажмите **Scan** (Сканирование) повторно, чтобы запустить автоматическую запись для оставшихся предметных стекол.

ПРИМЕЧАНИЕ. Если все параметры предметных стекол и сканирования настраиваются вручную, важно, чтобы задания и шаблоны соответствовали физическим предметным стеклам, установленным в устройство подачи предметных стекол кассеты.

- Чтобы снизить вероятность ошибки, рекомендуется тщательно проверить соответствие предметных стекол необходимым параметрам или свериться со специальной таблицей на предмет соответствия выбранного задания и положений предметных стекол.
- Использование функции Сканирование штрихкодов на предметных стеклах с этикетками в системах GSL оптимизирует эффективность сканирования и снижает риск ошибок при настройке сканирования.

Сканирование с использованием штрихкодов

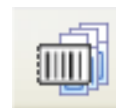


Сканирование с использованием штрихкодов позволяет оптимально использовать систему сканирования GSL. Назначение задания и шаблона осуществляется до сканирования с помощью функции **Assign Slide Barcodes** (Назначение штрихкодов предметным стеклам) или в случае наличия отдельного интерфейса системы управления лабораторными данными (LIS).

- Приложение диспетчера штрихкодов может использоваться для просмотра и обновления назначенных штрихкодов.
- Подробные сведения, а также дополнительную информацию о поддержке штрихкодов и ограничениях см. в **Руководстве пользователя CytoVision DX**.

Настройка назначения предметных стекол

На экране сканирования нажмите значок **Assign Slide Barcodes** (Назначение образцам штрихкодов), чтобы открыть окно настройки.



- Выбор шаблона.** На экране отображаются доступные шаблоны сканирования. Создать новые шаблоны на этом этапе можно, но, как правило, такая возможность не используется.
- Slide Details** (Подробная информация об образце) (необязательно). Выделив шаблон, можно установить связь с сохраненным шаблоном данных образца, если конкретную информацию об образце необходимо записывать перед сканированием. Для этого нажмите кнопку **Details** (Сведения).
- Выбор задания.** На экране отображается список существующих заданий (также можно создать новые задания). После того как будет выбрано подходящее задание, активируется функция **Manually Enter Barcode** (Ввод штрихкодов вручную).
- Считывание штрихкодов предметных стекол.** Для считывания штрихкода непосредственно с предметного стекла используйте ручной сканер штрихкодов* (данные линейного штрихкода могут вводиться вручную). Информация о считанном штрихкоде отображается на экране для проверки вместе с данными о задании и шаблоне. Штрихкоды, используемые для двух и более предметных стекол, будут отображаться красным цветом. Если ручной сканер штрихкодов не запрограммирован на автоматическое открытие данного окна, нажмите кнопку **Manually Enter Barcode** (Ввод штрихкодов вручную).

* Ручной сканер штрихкодов не входит в комплект поставки системы сканирования. Рекомендуется использовать сканер с полной поддержкой 2D-штрихкодов, например Motorola (Symbol) DS6707 или аналогичный.

Рабочие процессы сканирования с использованием штрихкодов

В меню **Barcode Scanning** (Сканирование с использованием штрихкодов), расположенного вверху главной панели инструментов, можно увидеть 3 опции сканирования и записи изображений.

Сканирование и запись

Действие эквивалентно функции значка **Scan slides with Barcodes** (Сканирование предметных стекол со штрихкодами) на главной панели инструментов.

- Каждый лоток в кассете загружается последовательно, начиная с лотка 1, и каждое из 5 положений лотка считывается на предмет наличия предметных стекол со штрихкодом.
- При обнаружении штрихкода подходящего формата в базе данных система продолжит сканирование и запись изображений для одного предметного стекла за раз в соответствии с правилами используемого шаблона.

Только сканирование

Данная функция запускает для предметных стекол со штрихкодом процедуру, подобную той, которая выполняется при отложенной автоматической записи. GSL последовательно загружает все лотки и считывает данные штрихкодов, однако при этом выполняется только процедура сканирования с низким коэффициентом увеличения для шаблона каждого предметного стекла.

- Функция *Scan only* (Только сканирование) предназначена для тех случаев, когда планируется просмотр списков метафаз вручную с целью проверить классифицированные клетки, отмеченные флажком для записи, и при необходимости добавить или снять зеленый флажок для клеток.

- Функция *Только сканирование* не совместима со стандартным использованием образцов интерфейз.

Только запись

Данная функция используется исключительно сразу после процедуры **Scan Only** (Только сканирование) с использованием штрихкодов, когда соответствующие списки клеток или области скана были просмотрены или изменены. Система проведет повторное сканирование образцов в кассете на предметных стеклах со штрихкодами и выполнит автозапись по правилам выбранного шаблона сканирования.

Данная функция записи выполняется точно так же, как и при **отложенной записи**, при которой позиции карты фокусировки с 10-кратным увеличением сравниваются с сохраненными данными этих позиций, полученными в результате сканирования. Это позволяет применять автоматическое смещение для учета незначительных изменений расположения образца или лотка в процессе установки или извлечения предметных стекол.

Правильная работа команды **Capture Only** (Только запись) штрихкодов будет выполняться при соблюдении следующих условий.

- После использования команды **Scan Only** (Только сканирование) система не выполняла никакое другое сканирование.
- Предметные стекла, изображения которых необходимо записать, не извлекались и не заменялись в лотках после использования команды **Scan only** (Только сканирование). Кроме того, не рекомендуется перемещать лотки в разные положения в кассете до выполнения команды **Capture only** (Только запись).

Примечание. При выборе любой опции сканирования с использованием штрихкодов выполняется проверка использования памяти, чтобы определить, можно ли отсканировать всю партию предметных стекол.

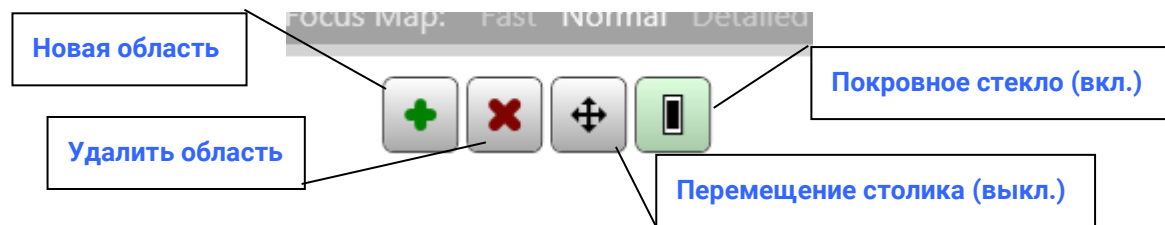
- Если использование памяти приложения превышает заданные пороговые значения, появится предупреждающее сообщение, и сканирование не будет выполнено.
- Перед выполнением любых действий, связанных со сканированием, необходимо перезапустить приложение.

Шаблоны предметного стекла (FISH)

- Откройте окно настроек сканирования и выберите значок «Назначить сканирование» («Шаблон предметного стекла») для любого из положений предметного стекла, чтобы открыть окно **Choose a slide Template** (Выбор шаблона предметного стекла).
- Если шаблоны отсутствуют, нажмите кнопку **Create New Slide Template** (Создать шаблон предметного стекла), а если готовые шаблоны уже имеются, выберите **New** (Новый), чтобы создать новый шаблон, или **Edit** (Изменить), чтобы изменить имеющийся.

Следует использовать название шаблона, которое описывает тип выбранного сканирования. Как правило, при этом указывается образец или комплект зонда, например, FL-Blood или DGO.

Область сканирования

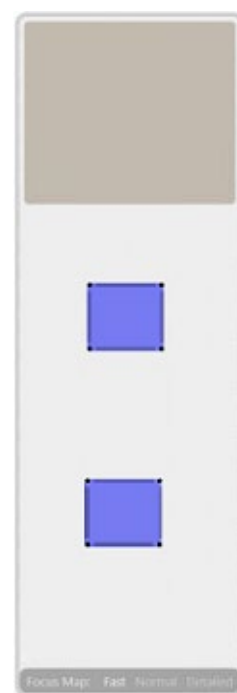


Чтобы добавить в уже имеющийся шаблон новую или дополнительную область сканирования, щелкните зеленый значок плюса (+).

- Для сканирования методом FISH характерно наличие нескольких областей: это необходимо либо для сканирования одной и той же области предметного стекла в режимах поиска метафаз и интерфаз, либо для создания отдельных позиционных областей образца, каждая из которых гибридизируется с разными комплектами зонда.

Для работы с предметными стеклами в рамках метода FISH необходимо следующее:

- Настройка покровного листа активна для всех областей, иначе система не сможет точно рассчитать расположение автофокуса для сканирования или записи.
- Область сканирования должна быть меньше площади размещения образца, так как это снижает риск сбоя точек на карте фокусировки при отсутствии материала образца.
- Для сканирования интерфаз обычно задается лишь небольшая область сканирования из-за ожидаемой высокой плотности классифицированных клеток в процессе сканирования.
- Чтобы сократить время составления карты фокусировки и уменьшить риск фотообесцвечивания, для небольших областей используется 1 или 5 точек на карте фокусировки, в зависимости от размера и выбранного значения: *Карта фокусировки: нормальный режим* или *Карта фокусировки: быстрый режим*.



После того как область сканирования будет сохранена в шаблоне, станут доступны панели сканирования и записи изображений.

Предварительное сканирование

При предварительном сканировании используется объектив с 1,25-кратным увеличением для обнаружения содержимого предметного стекла по методу светлого поля.

- Стандартные опции предварительного сканирования отключены для режимов флуоресцентного сканирования.

Сканирование

В этом разделе представлены опции поиска клеток, необходимые для оптимального сканирования различных типов образцов.

- **Режим сканирования.** Флуоресцентный для предметных стекол в рамках метода FISH (необходима совместимость микроскопа и фильтра).
- **Finder Application** (Приложение поиска): выбор между поиском метафаз и поиском интерфаз.
- **Classifier** (Классификатор): выбор классификатора, подходящего для конкретного типа образца.
- **Objective (Объектив):** 10-кратное увеличение по умолчанию.
- Функция **Stop Scanning after** (Остановка после сканирования) останавливает проход сканирования после того, как количество классифицированных (отмеченных зеленым флажком) клеток достигает минимального значения. Когда эта функция выключена, сканирование выполняется по всей выбранной области сканирования.
Данная функция не характерна для сканирования FISH и должна использоваться только с классификаторами, оптимизированными для пользовательских образцов.

Сканирование > Конфигурация

Панель «Конфигурация приложения поиска» предоставляет доступ к различным параметрам конфигурации в зависимости от типа образца и его использования.

- Кнопка «Сброс к настройкам по умолчанию» открывает начальные настройки меню **Configure** (Конфигурация).
- Приведенные значения являются стандартными и могут быть изменены в зависимости от реальных образцов.

Типичная корректировка для стандартного сканирования:

1. Изменение настроек **Minimum** (Минимум) и **Maximum** (Максимум) для областей метафаз/интерфаз.
2. Настройка режима образцов (только для поиска метафаз).

Минимальная / максимальная область интерфаз

Объекты, расположенные ниже минимальной или выше максимальной области пикселей, не будут обрабатываться во время сканирования для вывода на экран или классификации в списке предметных стекол.



- Для сканирования интерфаз минимальная область по умолчанию (40) обычно меньше, чем требуется, и может быть увеличена до 80–100 без изменения количества пригодных для использования клеток интерфазы.
- Уменьшение максимальной области (500 по умолчанию) приведет к уменьшению классификации скоплений клеток, если они не представляют интереса для просмотра.

Upload Classified Only (Загрузка только классифицированных сканов)

- Используйте данный параметр, чтобы сохранять только классифицированные сканы изображений на основании используемого классификатора.
- При первоначальной настройке и тестировании классификатора флажок *Upload Classified Only* (Загрузка только классифицированных сканов) должен быть снят.
- После оптимизации классификатора рекомендуется включить данный параметр, особенно если при сканировании с поиском интерфаз появляется много неклассифицированных фоновых объектов, что может замедлить сканирование, увеличить время обработки и размер сохраненного списка сканов.

Фокусные точки (проверка клеток)

Панель Cell Validation (Проверка клеток) — это функция обработки изображений для карты фокусировки системы сканирования.

- Рекомендуется **отключить** функцию «Проверка клеток» для стандартных шаблонов сканирования FISH.
- Подробные сведения, а также дополнительную информацию об опции сканирования предметных стекол с метафазами см. в **Руководстве пользователя CytoVision DX**.

Автоматическая запись

Параметры автоматической записи определяют правила записи после сканирования на основании количества и типа изображений с использованием параметров сортировки для обеспечения надлежащего качества изображений метафаз.

- Полностью автоматическую запись можно настроить только в том случае, если в шаблоне сканирования выбран классификатор (значение по умолчанию Everything (Все) не является классификатором и приводит к отображению всех отсканированных объектов в списке предметных стекол как неклассифицированных).

- В системах GSL с автоматической подачей масла автоматическая запись выполняется сразу после сканирования, если не используется рабочий процесс **Deferred AutoCapture** (Отложенная автоматическая запись).

Если нет необходимости записывать все клетки (обычно это применимо только к клеткам метафазы после выполнения ручного просмотра), снимите флажок для поля **Capture all cells** (Запись всех клеток) и выберите правила для данного типа образца.

Автоматическая запись интерфаз

При работе с образцами интерфаз количество изображений для записи задается на панели автоматической записи.

На панели сканирования шаблона предметного стекла должен быть установлен соответствующий классификатор интерфазы, чтобы классифицированные клетки, отмеченные зеленым флажком, были доступны для записи и чтобы можно было выбрать параметр **Perform AutoCapture** (Выполнить автоматическую запись).

Для стандартной записи изображений методом FISH в системе сканирования *CytoVision DX* предусмотрено три режима записи: **Probe** (Зонд), **ProbeAuto** и **Spot Counting** (Подсчет количества точек).

1. Вам необходимо владеть процедурами ручной записи с помощью зонда и порядком использования флуорохромов.
2. Для автоматической записи требуется предварительно созданный и сохраненный список флуорохромов или анализ точек. Это позволяет выполнить привязку к названиям флуорохромов, настройкам карты срезов по оси Z, конфигурациям фильтра и цвета.
3. Для каждого режима предусмотрен параметр **Objective** (Объектив): настройка для выбора объектива с высоким коэффициентом увеличения, используемого для автоматической записи — обычно 63-кратного с целью улучшения поля просмотра и степени интенсивности.
4. Параметр **Autocamera setup** (Автоматическая настройка камеры) определяет, каким образом будут записываться изображения с высоким коэффициентом увеличения во время автоматической записи.
 - **Active** (Активна) (флажок присутствует): Для каждого записываемого канала система выполняет автоматическую регулировку камеры (экспозиции), основываясь на интенсивности флуоресценции в поле просмотра.
 - **Inactive** (Неактивна) (флажок отсутствует): Для каждого записываемого канала система использует фиксированные параметры камеры, которые были сохранены в последний раз в списке флуорохромов на экране записи.

Дополнительные параметры вывода на экран и выбора доступны в зависимости от конкретного режима.

Режим записи с помощью зонда:

В этом режиме записи изображения для анализа создаются на главном начальном экране приложения.

- **Capture all cells** (Запись всех клеток) или **Capture up to n cells** (Записывать до n клеток) - Пользователь может определить, сколько клеток требуется для записи, на основе сортировки и критериев приоритетности.
- **Список флуорохромов:** - Привязан к ранее созданному и сохраненному списку для записи с помощью зонда.
- **Post capture options (Действия после записи):** - Использует шаблоны пользовательских настроек для того, чтобы определить желаемый способ записи изображений для пользователя. Данные шаблоны должны быть предварительно настроены в окне *Пользовательские настройки* на экране записи.

Режим записи ProbeAuto.

Данный режим записи позволяет создавать *списки кадров* изображений.

Post Capture Options (Действия после записи) не используются. Доступны следующие дополнительные параметры:

- **Настройка на основе контрастного красителя.** Улучшает расчет экспозиции на основе параметра **Autocamera Setup** (Автоматическая настройка камеры) для каналов флуорохромов, охватывая только области, содержащие сигнал DAPI (маскирующий слой для контрастного красителя), и меньше подвергаясь влиянию флуоресцирующих посторонних веществ за пределами клеток.
- **Настройка для зонда.** Улучшает расчет экспозиции на основе параметра **Autocamera Setup** (Автоматическая настройка камеры) для каналов флуорохромов, используя расчет на основе размера, чтобы меньше подвергаться влиянию ярких флуоресцирующих посторонних веществ в пределах клетки.

- **Настройка с использованием среднего значения.** Записывает первые *n* кадров с использованием стандартного автоматического расчета экспозиции для получения среднего значения интегрирования флуорохромов для всех оставшихся кадров.
- **Сохранение карт срезов по оси Z.** Сохраняет каждое изображение стека флуорохромов вместе с максимальной проекцией.

Режим записи с подсчетом количества точек:

Данный режим записи создает изображения в формате *списка кадров*.

Objective: 63X

Capture Mode: SpotCounting

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

Save Z-Stacks ☒

DGO

Select Spot assay

Fluorochrome list

Настройки аналогичны настройкам **ProbeAuto**, с учетом дополнительных изменений.

- **Select Spot assay** (Выбор анализа точек). Открывает панель выбора анализа для поиска подходящего анализа; панель содержит названия флуорохромов, используемых для создания списка записи, настройки карты срезов по оси Z и параметры остановки автоматической записи.
- **Список флуорохромов:** не доступен для выбора. Список записи и настройки флуорохромов задаются в разделе анализа точек и встраиваются в список создания флуорохромов.

Примечание. Если на панелях **Fluorochrome list** (Список флуорохромов) или **Post Capture options** (Действия после записи) присутствуют какие-либо названия списков, это означает, что область сканирования ранее была настроена на режим Probe (Зонд) или ProbeAuto, для которых это необходимо.

Рекомендуется создать новую область для выполнения операций подсчета количества точек, а не оставлять данные области пустыми.

Вывод на экран и корректировка изображения

В правой части экрана выводится изображение в интерактивном режиме, а также расположены элементы управления предметным столиком и фокусировкой, с помощью которых можно проверить расположение области сканирования и подтвердить настройки камеры, которые будут использоваться для автоматической фокусировки при сканировании с 10-кратным увеличением.

Перед первым использованием шаблона рекомендуется загрузить типичный образец, чтобы проверить, подходят ли для него параметры, установленные в процессе калибровки камеры и фокуса.



Примечание. Настройки камеры, используемые во время сканирования, определяются при составлении карты фокусировки системы сканирования; необходимость в регулярной настройке вывода на экран интерактивных изображений в шаблоне отсутствует.

- Интенсивность интерактивного изображения и положение фокуса определяются в результате калибровки системы, которая должна отображать видимое изображение *вблизи* от фокальной плоскости образца без значительной корректировки для стандартных предметных стекол.
- Если изображение значительно темнее, ярче или расположено далеко от фокуса, это может указывать на неправильную калибровку и необходимость ее повторения.

Если кнопки **Auto Camera** (Автоматическая настройка камеры) или **Record Z** (Запись по оси Z) отображаются в **красном** цвете, это значит, что используются настройки, определенные в процессе калибровки системы. Так и должно быть во время стандартного сканирования.



Если кнопки **Auto Camera** (Автоматическая настройка камеры) или **Record Z** (Запись по оси Z) отображаются в **зеленом** цвете, это значит, что они были ранее изменены и используются значения, сохраненные только для данного шаблона.



Изменение значений автоматической настройки камеры приведет к исключению значений опции **Fluorescent Scan Calibration** (Калибровка флуоресцентного сканирования); настройки шаблона будут использоваться только для стандартных процедур карт фокусировки с 10-кратным увеличением.

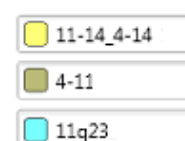
- Такие настройки ожидаются для случаев, если значения образца, используемые с данным шаблоном, могут отличаться от стандартной калибровки, к примеру флуоресцентные образцы с обесцвеченным или слабым окрашиванием DAPI.
- Для образцов, исследуемых по методу светлого поля, не требуются зависящие от шаблона значения камеры.

Изменение значения Record Z (расположения фокусировки) следует выполнять только в тех случаях, когда шаблон необходимо использовать с предметным стеклом или образцом определенного типа, у которого плоскость фокусировки выше или ниже стандартного положения, например из-за отличий предметного или покровного стекла, толщины материала или препарата.

- Расположение фокусировки затрагивает только карту фокусировки с 10-кратным увеличением и сканирование, не затрагивая стандартные процедуры фокусировки для записи с высоким коэффициентом увеличения.

После обновления параметра **Fluorescent Scan Calibration** (Калибровка флуоресцентного сканирования) любые шаблоны сканирования с измененными значениями камеры или фокусировки будут отображаться с предупреждающим символом на экране настройки пакета сканирования; это означает, что они могут использовать настройки, которые больше не подходят для системы и должны быть проверены или «сброшены».

Slide Templates



Просмотр списка интерфаз

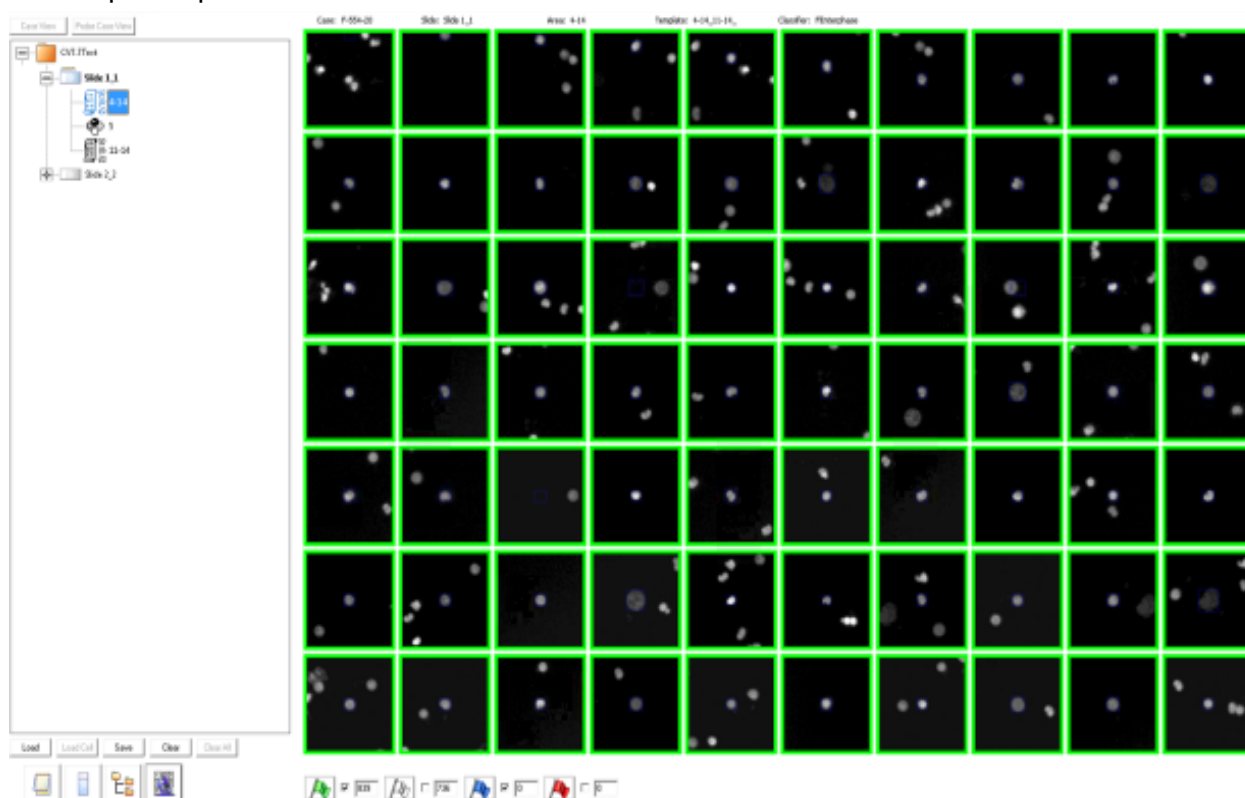


Сканы сохраняются в списке предметных стекол, отображаемом в инструменте «Навигатор», в папке клетки.

Списки предметных стекол можно загружать и отображать только на экране просмотра и использовать:

- при создании или редактировании классификатора сканов.
- Общие сведения об управлении и выводе на экран просмотра см. в **Руководстве пользователя CytoVision DX**.

При флуоресцентном сканировании это обычно используется только для проверки точности классификаторов клеток.



Просмотр примечаний (Интерфазы)

Если щелкнуть значок **Notes** (Примечания), инструмент «Навигатор» сменится таблицей с данными и результатами измерений по всем эскизам изображений, которые отображаются в главном окне.

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

Большинство столбцов в такой таблице содержат данные вычисляемых измерений, рассчитанных в процессе обработки эскизов изображений.

- Каждый столбец можно использовать для определения приоритетности/сортировки эскизов изображений на экране и связывать его с шаблоном предметного стекла в порядке приоритетности для автоматической записи в стандартном режиме зонда.
- Измерения не имеют прямой связи с качеством клеток и применимы только для обучения классификатора.

Для использования при работе с интерфазами наиболее важны следующие столбцы:

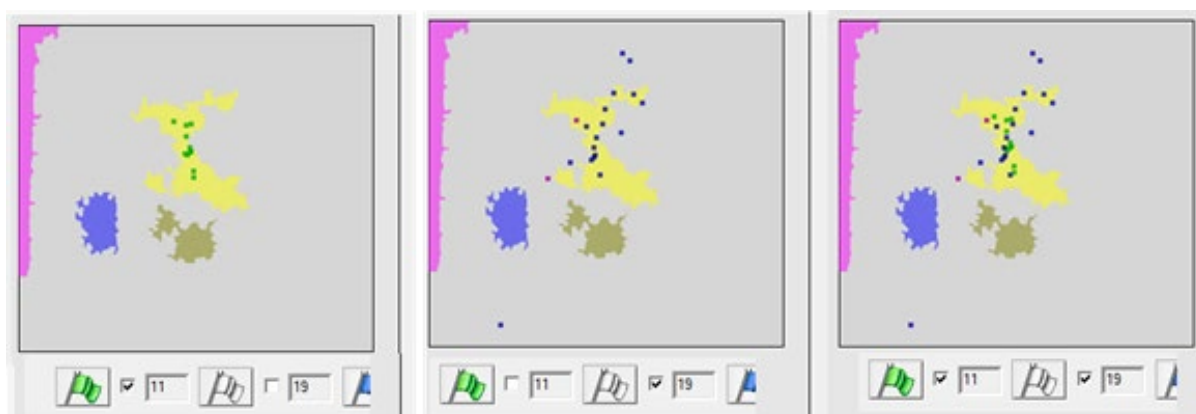
- **Cell ID** (Идентификатор клетки). В процессе сканирования каждой клетке присваивается свой номер. Он становится уникальным идентификатором клетки, который нельзя ни удалить, ни изменить, независимо от используемых приоритетов и порядка сортировки. Данный номер используется как часть названия клетки для всех клеток, создаваемых при автоматической записи в режиме **Probe** (Зонд).
- **EF**. Уникальное положение каждой клетки в координатах England Finder, которое используется в параметрах автоматической записи и в функциях преобразования координат. Данный параметр является частью названия клетки для любого изображения, созданного в процессе автоматической записи в режиме **Probe** (Зонд); он сохраняется в качестве метаданных в списке кадров **ProbeAuto** и отображается на экране просмотра кадров.
- **Область**. Область клеток, выраженная в пикселях. Используется для определения необходимости настройки минимальной или максимальной области в шаблоне сканирования.
- **Окруж.** Окружность — потенциальный вариант сортировки для автоматической записи интерфаз в режиме **Probe** (Зонд).



Просмотр предметного стекла (Интерфаза)

При нажатии на значок **Slide** (Предметное стекло) инструмент «Навигатор» или примечания заменяются графической схемой предметных стекол с изображением области сканирования и указанием клеток, которые были выявлены в процессе сканирования.

При скрытии или отображении различных флажков эскизов для сканирования положения клеток будут отображаться в виде наложения на графической схеме предметных стекол.



Классификаторы сканирования

Прикладное ПО включает классификаторы по умолчанию *FLMetaphase* и *FLInterphase* для образцов, обрабатываемых с флуоресцентной подсветкой.



Классификаторы назначаются шаблонам сканирования, которые будут использоваться для стандартных процедур сканирования и создания списка клеток с зелеными флажками для последующей записи.

- Кроме того, система позволяет использовать на экране просмотра разные классификаторы независимо от того, какой именно классификатор использовался для исходного сканирования.
- Нажмите кнопку Apply Classifier (Применить классификатор) на главной панели инструментов. Отобразится список пользовательских классификаторов.
- Выберите классификатор, который необходимо использовать, и нажмите кнопку OK. Эскизы изображений на экране просмотра будут заново обработаны с использованием параметров нового классификатора, зелеными флажками будут автоматически отмечены клетки, более всего отвечающие изображениям, которые использовались при обучении данного классификатора.
- Таким образом можно в любое время изменить классификацию клеток в списке сканов без необходимости повторного сканирования данного образца. Это особенно удобно при первоначальном обучении системы и при оценке работы нового классификатора.

Обычно дальнейшее обновление или обучение новых классификаторов для сканирования FISH не требуется. При этом оно не является обязательным для проверки или принятия в расчет ожидаемого диапазона различий образцов, обнаруживаемых при подготовке предметных стекол в различных лабораториях конечного пользователя.

- Результаты обучения на дополнительных изображениях, полученных в процессе сканирования после установки системы, рекомендуется добавлять к имеющимся классификаторам, чтобы дополнительно оптимизировать их, или создавать новые классификаторы, использующие только данные сканирования пользовательских образцов.
- При использовании метода FISH с образцами метафаз это позволит учесть ожидаемый диапазон различий образцов, обнаруживаемых при подготовке предметных стекол в различных лабораториях конечного пользователя.

Инструкции по обучению и редактированию классификаторов

Когда вы «обучаете» классификатор из списка предметных стекол (сканов), все клетки, которые в настоящее время отмечены зеленым или белым цветом, помещаются в выбранный классификатор.



- Убедитесь, что только нужные и проверенные клетки отмечены зеленым или белым флажком (если ни одной клетки не отмечено зеленым или белым флажком, ничего страшного).
- Клетки с синими и красными флажками из списка сканов не добавляются в классификатор, но можно перемещать клетки в эти категории в ходе дальнейшего редактирования классификатора, чтобы их данные больше не использовались.
- Клетки с синими флажками не используются при обработке изображений, поэтому в данный класс можно поместить любые клетки и перемещать их в зеленый или белый класс в рамках тестирования, чтобы посмотреть на результат.

- Клетки с красными флажками будут удалены при сохранении классификатора (если только на них нет значка камеры, означающего, что автоматическая запись была выполнена до добавления в классификатор).

Для обеспечения точности нужны примеры и «хороших» (зеленых), и «плохих» (белых) клеток; при редактировании классификатора убедитесь, что выполняются следующие условия.

- Зеленым флажком не отмечены изображения со скоплениями клеток или крупными/обильными фоновыми посторонними веществами.
- Белым флажком отмечены изображения материалов, отличных от клеток (фоновые посторонние вещества, отметки, атипичная интенсивность окрашивания, скопления, различные артефакты и т. д.).
- К классу белого цвета не относится ни одна подходящая для классификации клетка.

Распространенные ошибки при обучении классификатора.

1. Во время обучения классификатора не все изображения с белыми флажками были переведены в класс с синим флажком (удержание) перед выбором отдельных зеленых и белых клеток.
 - В классификаторе слишком много клеток, отмеченных белым флажком — более чем в два раза больше, чем клеток, отмеченных зеленым флажком.
 - Классификатор содержит подходящие для классификации клетки в классе белого цвета.
2. Во время обучения классификатора учитывались только «хорошие» клетки, а белых клеток добавлено не было.
 - В классификаторе есть только клетки с зеленым флажком, или их количество более чем вдвое превышает количество клеток с белым.
3. Клетки, выбранные для обучения как подходящие, не проверялись на наличие фоновых посторонних веществ в пределах «поля записи», отображаемого на эскизе. Все, что находится внутри установленной границы, добавляет свои показатели к данным клеток и может «разбавить» реальные значения интерфаз или метафаз из обучающих данных.
 - Зелеными флажками отмечены в том числе клетки с крайне высокой вариабельностью метафаз.
 - Зелеными флажками отмечены в том числе клетки с большими/темными ядрами в поле записи.

Примечание. Классификаторы метафаз более чувствительны к таким нюансам, чем классификаторы интерфаз.

Обучение классификаторов (добавление данных)

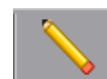
Для обновления или создания классификатора используйте отсканированные образцы с клетками, типичными для конкретного типа образца.



- Выполните сканирование, используя классификатор **Everything** (Все).
- Перейдите на экран **Review** (Просмотр), откройте задание и загрузите список метафаз.
- Выберите все клетки и отметьте их как неспецифичные (**синий флажок**), чтобы не добавить случайно в классификатор клетки с неподходящими характеристиками.
- Выберите 5–15 эскизов необходимого качества (подходящие для классификации клетки) и отметьте их **зеленым флажком**. Не следует добавлять большее количество клеток из одного образца, поскольку это может искусственно повлиять на классификатор.

- Выберите аналогичное количество изображений, которые будут использоваться в классификаторе в качестве примеров «плохих» клеток, и отметьте их как неклассифицированные (**белым флажком**). Речь идет об эскизах, не содержащих крупных/обильных фоновых посторонних веществ или подходящих клеток.
- Подтвердите, что только выбранные клетки входят в классы, отмеченные зеленым и белым флажком.
- Щелкните значок **Train** (Обучение) в виде стола.
 - Для создания нового классификатора выберите **New** (Новый) и введите название классификатора в поле **Current selection** (Выбранные).
 - Для обновления действующего классификатора выберите **Existing** (Имеющийся) и добавьте новые клетки в действующий классификатор. Не нажимайте **Overwrite** (Перезаписать), если только не хотите полностью заменить все данные старого классификатора, но сохранить его название.
- Нажмите кнопку **OK**. Классификатор будет создан, а на экране появится список эскизов для загруженного списка сканов.
- Повторяйте эти действия до тех пор, пока для каждого отдельного типа образцов стандартный классификатор не будет содержать 100–200 как зеленых, так и белых клеток.

Редактирование классификаторов



По сути классификатор представляет собой список сканов из разных заданий, которые содержат все отмеченные зелеными и белыми флажками клетки, которые использовались при создании и обучении данного классификатора. Чтобы обеспечить надлежащее количество и качество изображений, которые использовались для обучения данного классификатора, можно просмотреть и изменить его содержание.

- Щелкните значок **Edit** (Изменить).
- Выберите нужный классификатор. Станут активными кнопки **Delete** (Удалить) и **OK**.
- (Если нажать кнопку **Delete** (Удалить), откроется диалоговое окно с запросом подтверждения безвозвратного удаления классификатора и всех его данных.)
- Нажмите **OK**, чтобы загрузить эскизы изображений классификатора (если при этом открыт список активных предметных стекол, пользователю будет предложено сохранить этот список перед просмотром изображений классификатора).
- Просмотрите и при необходимости измените эскизы изображений.
- Нажмите кнопку **Save** (Сохранить), чтобы закрыть эскизы изображений и сохранить все изменения.

Классификатор можно редактировать так же, как любой *список сканов*, классификацию клеток можно менять на любой из четырех цветовых классов.

- Только категории с зелеными и белыми флажками используются для расчета параметров классификатора.
- Класс с синими флажками можно будет редактировать в будущем, но к работе классификатора он отношения не имеет.
- Все клетки, отмеченные красным флажком (за исключением клеток, сохраненных в результате автоматической записи), при сохранении классификатора будут удалены.

Сортировка для автоматической записи по ближайшему значению

Сортировка клеток в классификаторе позволяет использовать параметр определения приоритетности по ближайшему значению в шаблоне предметного стекла.

- Данный параметр предназначен для использования с образцами метафаз, см. **Указания по эксплуатации кариотайпера CytoVision DX**.

Автоматическая запись

Информацию о камере и конфигурации записи см. в разделе [Запись с помощью метода FISH \(ручная\)](#).

Автоматическая запись



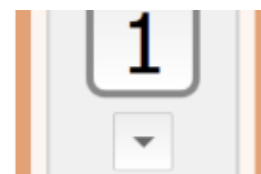
Автоматическая запись начинается после сканирования с 10-кратным увеличением и классификации клеток.

- Классифицированные клетки (отмеченные зеленым флажком) отображаются в области сканирования и затем используются для расчета того, какие клетки необходимо записать (режим **Probe** (Зонд)), или для выбора областей (кадров), содержащих клетки для записи (режимы **ProbeAuto** и **Spot Counting** (Подсчет количества точек)).
- Приложение автоматически переключается на экран записи, перемещается к первой клетке или кадру и запускает процесс записи. При этом отображается панель хода выполнения автоматической записи.
- После записи нужного количества клеток система переходит к следующему образцу.
- Кнопка **Pause** (Пауза) на панели хода выполнения автоматической записи может использоваться для ручного управления камерой или настройками фильтра (обычно в этом нет необходимости).
- При нажатии на паузу можно использовать кнопку **Next** (Далее) (для предметного стекла), если дальнейшая запись на текущем предметном стекле не требуется, или **Stop** (Стоп) (для партии), чтобы пропустить все оставшиеся предметные стекла.

Параметры автоматической записи

Режим автоматической записи **Probe** (Зонд) привязан к параметрам в шаблонах пользовательской настройки (**Post Capture Options** (Действия после записи)). Обычно используются следующие правила автоматической записи:

- автоматическая настройка камеры;
- автоматическая обработка по пороговым значениям;
- Нулевое пороговое значение
- Оптимизация контрастности
- сохранение необработанного изображения.



Отложенная запись вручную

Любое предметное стекло, для которого имеется *список сканов*, можно подвергнуть автоматической записи, запустив отложенную запись вручную.

- Откройте окно настройки сканирования и присвойте образцу имя задания.
- Нажмите стрелку выбора отложенной записи.
- В разделе **Capture** (Запись) будут отображаться образцы, у которых есть списки сканов и которые можно выбрать для операции автоматической записи.
 - Выберите список, соответствующий образцу, в GSL.
- (Необязательный этап) Нажмите кнопку **Set Offset** (Задать смещение), чтобы загрузить лоток с предметным стеклом и установить вручную значение смещения для отображения клеток с низким коэффициентом увеличения. Задав необходимые значения, закройте окно.
- Нажмите **Scan** (Сканирование), чтобы начать процесс автоматической записи, как описано выше.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для предметных стекол, которые были убраны с предметного столика после сканирования, нужно обязательно указать **Set Offset** (Значение смещения), поскольку крайне маловероятно, что предметное стекло будет расположено в лотке в том же положении, в каком оно находилось во время сканирования.

- Процедура ручной отложенной записи не предназначена для сканирования нескольких предметных стекол одновременно или для любого стандартного рабочего процесса флуоресцентного сканирования образцов.

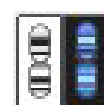
Запись с помощью зонда (изображения клеток)



Стандартный экран ручной записи содержит инструменты для взаимодействия с камерой, моторизованным аппаратным обеспечением микроскопа и настройками для просмотра и записи изображения зонда в папке клетки в инструменте «Навигатор».

В системе GSL необходимо использовать стандартный рабочий процесс ручной записи для подтверждения отклика аппаратного обеспечения, настройки оптимальных параметров программного обеспечения для качества изображения, создания списка флуорохромов и сохранения «Действий после записи» (шаблонов пользовательских настроек записи), используемых при автоматической записи.

По умолчанию экран записи запускается в том же режиме записи, который использовался в прошлый раз. Чтобы проверить или изменить режим записи, нажмите **Capture Mode** (Режим записи).

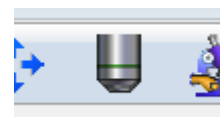


- **Probe** (Зонд) — настройка, тестирование и ручная запись изображений флуоресцентно-окрашенных предметных стекол с метафазами, интерфазами или клеточным материалом с использованием одного или нескольких каналов ДНК-зонда.
- **Spot Counting** (Подсчет количества точек) — ручная запись изображений флуоресцентно-окрашенных предметных стекол с интерфазами или клеточным материалом с использованием одного или нескольких каналов ДНК-зонда. Изображения сохраняются в виде списка кадров с возможностью автоматизированной обработки изображений посредством анализа точек.
- **M-FISH** — ручная запись флуоресцентно-окрашенных предметных стекол с клетками метафазы с использованием нескольких каналов ДНК-зонда в хромосом-специфичной комбинации для анализа кариотипирования.

Система *CytoVision DX* использует монохромную камеру для записи изображений. Для создания цветного изображения с помощью зонда отдельные флуорохромы на предметном стекле должны быть записаны, псевдоокрашены и наложены друг на друга, в результате чего получается многоканальное цветное комбинированное изображение.

- Каждый отдельный канал флуорохромов должен иметь предустановленные значения для цвета и фильтр микроскопа, которые задаются и сохраняются с помощью панели *Выбор флуорохромов*.

Управление объективом



При ручной записи приложение использует положение объектива микроскопа с панели «Объективы» для изменения степени увеличения.

При запуске приложения по умолчанию активизируется объектив, сконфигурированный в положении 1. В моторизованных системах микроскопа используется объектив с 10-кратным увеличением.

- Если для смены линз объектива используется сенсорная ЖК-панель микроскопа, ПО не сможет определить, что увеличение изменилось, и будет по-прежнему использовать значение положения 1.
- При выполнении любой процедуры ручной записи необходимо также/только сменить объектив перед записью с помощью панели *Objectives* (Объективы). Это важно, чтобы не ошибиться в данном значении.

- Если при запуске процедуры записи будет установлена незапланированная степень увеличения для объектива, на экране появится предупреждающее сообщение.

Запись с помощью зонда: обзор процедуры

- **New Cell** (Новая клетка). Создание в инструменте «Навигатор» новой клетки, готовой к записи.
 - **Live** (Интерактивный режим). Вывод изображения с камеры в главном окне изображения.
 - Автоматически переходит к фильтру микроскопа для выбранного флуорохрома.
 - Активирует затвор, отсекающий излучение флуоресценции, для освещения предметного стекла.
 - **Capture** (Запись). Запись изображения с микроскопа и, при необходимости, передача его для обработки по пороговым значениям.
1. Выберите задание и образец в инструменте «Навигатор» и нажмите кнопку **New Cell** (Новая клетка).
 2. Создайте или загрузите предварительно сохраненный **Fluorochrome List** (Список флуорохромов), подходящий для данного образца.
 3. Выберите область образца на предметном стекле микроскопа и нажмите **Live** (Интерактивный режим).
 4. Выполните автоматическую настройку камеры, проверьте вывод изображения на экран и нажмите **Capture** (Запись).
 5. (Необязательно) Используйте функцию **Threshold** (Определение пороговых значений) для удаления темного фона вокруг объектов изображения.
 6. Нажмите **Live** (Интерактивный режим) для перехода к следующему каналу флуорохромов на предметном стекле.
 7. Выполните автоматическую настройку камеры, проверьте вывод изображения на экран и нажмите **Capture** (Запись).
 8. Повторите описанные действия для всех оставшихся каналов флуорохромов.
 9. Нажмите **New Cell** (Новая клетка) для перехода к следующему изображению.

Не следует:

- перемещать объектив вручную, не используя панель **Objectives** (Объективы), чтобы подтвердить правильную степень увеличения объектива;
- изменять значение экспозиции вручную — оно должно вычисляться системой в рамках **автоматической настройки**;
- ... перемещать предметный столик или фокус до завершения работы со всеми каналами в *списке флуорохромов*.

Элементы управления записью

Главное окно экрана записи, в котором отображается изображение в интерактивном режиме. Под этим изображением располагаются кнопки для управления рабочим процессом записи.

- При выборе режима записи с помощью зонда открывается панель **Fluorochrome Selection** (Выбор флуорохромов) для выбора или создания списков записи.

- Для каждого флуорохрома панель **Capture Setup** (Настройка записи) позволяет получить доступ к управлению камерой, фильтром и флуоресцентной лампой.

Новая клетка и интерактивный режим

Кнопка **New Cell** (Новая клетка) создает в задании новую папку, где будет сохранено изображение.

После того как изображение обнаружено, кнопка **Live** (Интерактивный режим) отображает вид камеры в главном окне с использованием настроенных фильтров микроскопа и флуоресцентной лампы/затвора.

- При необходимости переместите предметный столик микроскопа таким образом, чтобы расположить образец по центру главного окна, и настройте фокусировку изображения.

Автоматическая настройка камеры

Стандартная запись должна выполняться с использованием функции **Auto Setup** (Автоматическая настройка) камеры, чтобы оптимизировать экспозицию камеры и диапазон контрастности на изображениях.

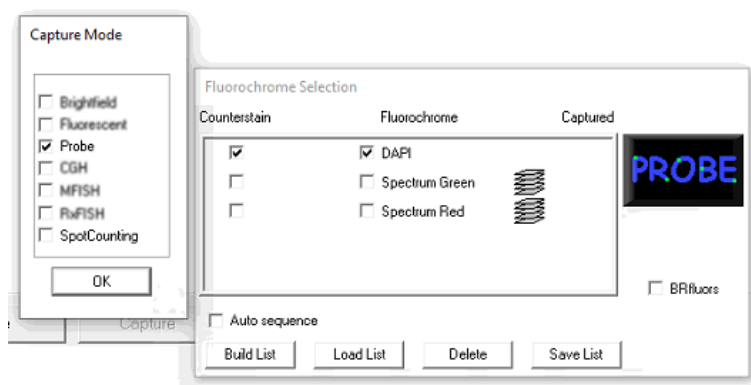
- Окончательные параметры изображения будут основаны на интенсивности флуоресценции, определяемой качеством образца, типом фильтра и источником флуоресцентного света.
- Если изображение отдает в красный или синий цвет, это указывает на насыщенность цветом. Для записи методом FISH рекомендуется добавить немного насыщенности красным цветом материалу образца (контрастный краситель или сигналы), при этом фон должен быть темным или с небольшим оттенком насыщенного синего цвета для улучшения контрастности.
- Насыщенность красным/синим цветом на интерактивном изображении можно изменить с помощью панели **Autosettings** (Автоматические настройки) в разделе настроек записи.

Эту функцию можно активировать вручную, установив соответствующий флажок рядом со шкалой контрастности или включив параметр пользовательской **автоматической настройки камеры**, при котором настройка камеры будет выполняться сразу после нажатия кнопки **Live** (Интерактивный режим).

- Все значения параметров, определенные в ходе **автоматической настройки**, применяются сразу же.
- **Автоматическая настройка** не сработает, если флуоресцентная лампа выключена или установлена на очень низкую интенсивность. Следует выполнить соответствующую проверку.
- **Автоматическая настройка** может не сработать, если сигнал флуоресценции для образца имеет низкую интенсивность или контрастность.

Списки записи

В режиме записи с помощью зонда открывается панель **Fluorochrome Selection** (Выбор флуорохромов), используемая при настройке и записи.

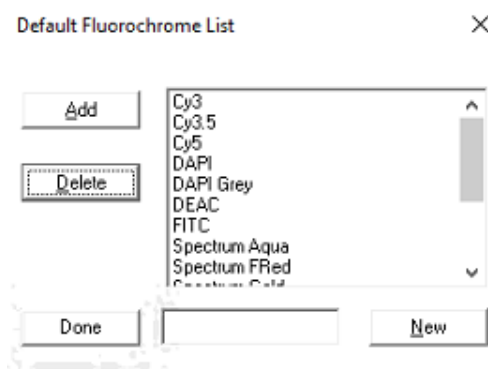


Здесь вы можете составить список флуорохромов на предметном стекле и выбрать контрастный краситель (*h-p*, DAPI), который используется приложением в процессе записи и последующего анализа.

Чтобы добавить новые флуорохромы в список записи, выберите команду **Build List** (Создать список). Появится окно меню, содержащее список доступных, предварительно запрограммированных флуорохромов.

Выберите флуорохромы, которые вы хотите добавить в свой список записи, и нажмите **Add** (Добавить) для добавления каждого из них.

- Создайте список в том порядке, в котором вы хотите записать клетку, вначале выбрав контрастный краситель.
- Отметьте флажком подходящий параметр **Counterstain** (Контрастный краситель).
- Для каждого названия флуорохрома проверьте и надлежащим образом измените настройки на панели *Запись и настройка флуорохромов*.
- Используйте функцию **Save List** (Сохранить список), чтобы создать список флуорохромов, который можно связать с шаблоном сканирования для режимов записи **Probe** (Зонд) и **ProbeAuto**.



Примечание. Если вы хотите сохранить все скорректированные значения настроек, необходимо нажимать **Save List** (Сохранить список) после внесения любых изменений.

Запись и настройка флуорохромов

Окно настройки записи открывает окно управления камерой и аппаратным обеспечением. Установите флажок *Advanced* (Расширенные), чтобы получить доступ к значениям положений дихроичного фильтра и расширенным элементам управления дополнительной настройкой параметров камеры.

- **Color** (Цвет). Устанавливает цвет для флуорохрома, используемого в процессе записи.
- **Dichroic** (Дихроичный фильтр). Настраивает фильтр микроскопа, используемый при записи флуорохрома.



Оба данных параметра должны быть установлены и сохранены с помощью функции «Сохранить по умолчанию» перед любой операцией ручной или автоматической записи для каждого флуорохрома, чтобы затем применяться в списке записи или анализе точек.

Ползунки камеры

Усиление, смещение и экспозиция устанавливаются автоматически с помощью меню **Auto-setup** (Автоматическая настройка) или могут быть просмотрены и изменены вручную с помощью 3 ползунков.



Как правило, регулировать положение ползунков в окне **Capture Setup** (Настройка записи) вручную не требуется, за исключением случаев, когда не удастся выполнить автоматическую настройку или же когда изображение содержит чрезмерное количество фоновых объектов, вызывающих ухудшение контрастности клеток или сигналов.

Яркость (усиление камеры)

- При необходимости получить более (или менее) насыщенный красный цвет в одном изображении можно отрегулировать положение ползунка настройки яркости вручную.
- Любые красные области на интерактивном экране будут сохранены как белые на записанном изображении до применения псевдоокрашивания.
- Насыщение красным цветом сигналов зонда может привести к улучшенному, более «интенсивному» отображению цвета, что применимо для визуального отображения сигнала.
- Чрезмерная насыщенность приведет к потере любой относительной или количественной информации, применимой в последующем анализе (например, бэндинг DAPI в метафазных хромосомах).

Черный цвет (смещение камеры).

- При необходимости получить более (или менее) насыщенный синий цвет в одном изображении можно отрегулировать положение ползунка настройки черного цвета вручную.
- Любые синие области на интерактивном экране будут сохранены как черные на записанном изображении.
- Насыщенность синим цветом на темном фоне изображения повышает контрастность конечного изображения, но не должна распространяться на все изображение.

Экспозиция (интеграция камеры).

- Регулировать положение ползунка экспозиции вручную для стандартных операций записи не рекомендуется. Для получения оптимального значения экспозиции следует всегда использовать **автоматическую настройку**.
- Для образцов, исследуемых при флуоресцентной подсветке, максимальное значение экспозиции зависит от интенсивности, однако в любом случае должно составлять не менее 0,005 (5 мс).

Автоматическая настройка

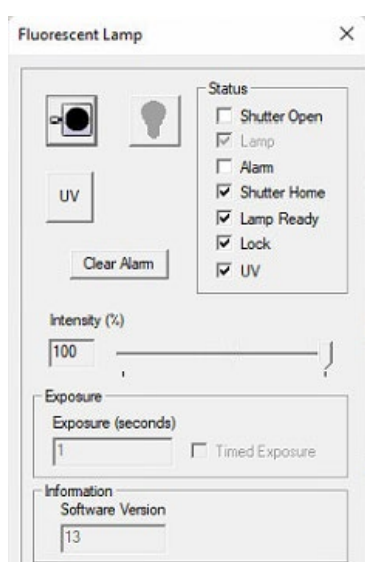
Функция автоматической настройки позволяет изменить параметры автоматической настройки камеры таким образом, чтобы увеличить насыщенность синего или красного цвета на итоговом изображении в интерактивном режиме. При необходимости возможна отдельная настройка определенных каналов флуорохромов.

Для повышения интенсивности отображения изображений FISH предлагаются следующие значения:

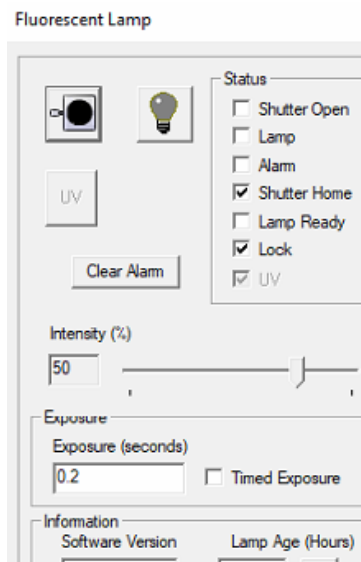
- Установите максимальное значение (красное) на уровне **(+) 3–5**, чтобы повысить интенсивность сигнала.
- Установите минимальное значение (синее) на уровне **(+) 0,5**, чтобы затемнить фоновые помехи.

Настройка флуоресцентной лампы

Панель управления флуоресцентной лампой Xylis/X-Cite можно открыть, нажав на значок лампы на панели настройки записи (для этого должен быть активен переключатель «Расширенные»).



Xylis LED



XCite PC120



Панель флуоресцентной лампы можно использовать для проверки работы лампы во время ручной записи.

- Кнопка затвора на данной панели действует как переключатель для открытия и закрытия затвора.
- Элементы управления экспозицией показывают интенсивность лампы и время экспозиции.
- Обычно эти значения применимы при 100 % интенсивности для стандартного сканирования и записи с помощью метода FISH
- Флажки *Статус* показывают, в каком состоянии находятся различные части лампы.

Система, использующая блок XCite PC 120, также снабжена функцией управления лампой.

- Кнопка «Лампа» включает или выключает лампу.
- Когда лампа включена и готова к работе, значок имеет желтый цвет.

- Если значок серого цвета, лампа выключена и находится в режиме ожидания (на панели светодиодов в передней части контроллера лампы это отображается как «лампа»). Лампа активируется автоматически во время сканирования, но для использования на экране записи ее нужно включить вручную.

Если вы выполняете автономное сканирование предметных стекол методом FISH и автоматическую запись партии, можно настроить приложение на автоматическое отключение лампы X-Cite в конце обработки партии.

- Перейдите на экран **Scan** (Сканирование) и выберите меню утилит.
- На экране будет показана настройка системы в данный момент: «Оставить флуоресцентную лампу включенной после обработки партии» или «Выключить флуоресцентную лампу после обработки партии».
- Если вы нажмете на текст, он изменится на альтернативную настройку (которая затем отобразится на экране).

Карта срезов по оси Z

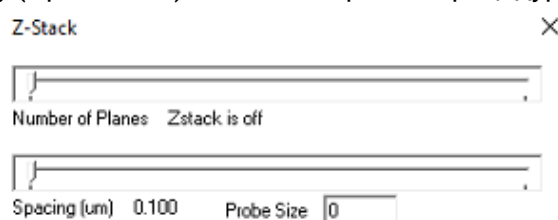
Z-Stack (Карта срезов по оси Z) используется для записи сигналов зонда в различных фокальных плоскостях.

Во время записи точка фокусировки контрастного красителя (DAPI) используется в качестве центра фокусного расстояния для каждой записи с использованием флуорохрома, при этом моторизованное устройство фокусировки перемещает расстояние между каждым стеклом.

- Финальное изображение сохраняется, объединяясь со стеклами в качестве максимальной проекции с единым слоем.
- Просмотреть отдельные изображения стека после записи невозможно. При необходимости изображения, полученные методом FISH, должны быть записаны в список кадров с помощью ручного подсчета количества точек или с помощью зонда с использованием *кадров изображений* для вывода на экран посредством отдельного ПО для анализа изображений, совместимого с форматом списка кадров.

Чтобы настроить флуорохром для записи карты срезов по оси Z, щелкните **Z-Stack** (Карта срезов по оси Z) в диалоговом окне *Capture and Fluorochrome Setup* (Запись и настройка флуорохромов).

- Откроется диалоговое окно карты срезов по оси Z.
- Выберите значения **Number of planes** (Количество плоскостей) и **Spacing** (Расстояние) между ними. Расстояние между плоскостями указано в микрометрах с шагом 0,1 мкм.
- Чтобы удалить карту срезов по оси Z, установите для параметра **Number of Planes** (Количество плоскостей) значение 0 (**Z-Stack is off** (Карта срезов по оси Z отключена)).
- Нажмите **Apply** (Применить), чтобы завершить процедуру.



Примечание. Для ручной записи с подсчетом количества точек настройки карты срезов по оси Z создаются на основе независимо сконфигурированных настроек анализа точек.

Запись с пользовательскими настройками



Поняв основы процедуры записи, можно применять функции пользовательской настройки, чтобы изменить степень вмешательства оператора, необходимую для работы системы.

Опции стандартной записи с помощью зонда.

Рекомендуемые настройки.

- **Auto-camera Setup (Автоматическая настройка камеры)** — включает функцию **автоматической настройки** при нажатой кнопке интерактивного режима.
- **Auto-Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям) позволяет отказаться от ручной обработки по пороговым значениям (удаления фоновых помех) и использовать настройки нулевых или прогнозируемых пороговых значений.
 - Данная функция должна быть включена для сохраненных шаблонов, используемых при автоматической записи с помощью зонда в GSL совместно с опцией **Save Raw Image** (Сохранение необработанного изображения).
- **Zero-Threshold** (Нулевое пороговое значение) — не удаляет фоновые помехи изображения вокруг данных интерактивного изображения, образуя единый блок изображения. Данная функция применяется автоматически при использовании функции **Auto-Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям) и является оптимальным вариантом для быстрой записи интерфаз методом FISH.
- **Probe Background Cut** (Фоновый срез зонда) улучшает вывод на экран сигналов интерфаз по сравнению с фоном при использовании метода FISH.
- **Contrast Stretch** (Расширение диапазона контрастности) нормализует финальное сохраненное изображение для улучшения вывода на экран. Данную функцию следует всегда использовать для изображений с обработкой по пороговым значениям, чтобы края оставшихся объектов не казались неестественно интенсивными.
- **Save Raw Image** (Сохранение необработанного изображения) создает отдельный файл с изображением для каждого записанного канала с флуоресцентной подсветкой.

Необработанное изображение сохраняется без применения функции удаления фоновых помех и прочих функций оптимизации изображения. Впоследствии его можно «повторно записывать» с помощью значка обработки по пороговым значениям на главной панели инструментов.

 - Такая повторная обработка по пороговым значениям может быть полезна для изображений метафаз и интерфаз, когда необходимо выделить отдельные объекты для оптимизации конкретного изображения или копирования на гибкий экран, либо для создания каритотипа с помощью зонда.
 - Сохранение необработанного изображения рекомендуется для записи с помощью зонда, особенно в случае использования функции **Auto-Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям).
 - Возможность доступа к данным необработанного изображения может быть одним из требований местной лаборатории.

Дополнительные настройки.

- **Auto Sequence** (Автоматическая последовательность) — после записи изображения с контрастным красителем (DAPI) запись продолжается без нажатия на кнопку Live (Интерактивный режим) или Capture (Запись) для оставшихся каналов зонда.
- **Predict Threshold** (Прогнозируемые пороговые значения) позволяет оценить подходящие пороговые значения для удаления фоновых помех вокруг объектов

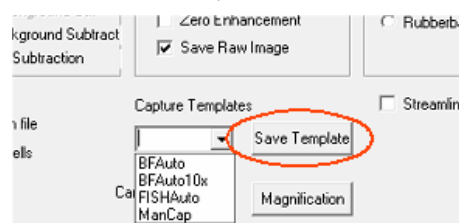
на изображении. Данная функция применяется автоматически при использовании функции **Auto-Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям) и является оптимальным вариантом для обработки метафазных хромосом, когда необходимо кариотипирование с помощью зонда.

- **Auto Register Images** (Автоматическая регистрация изображений) — записывает изображения зонда с регулируемым сдвигом по оси X/Y по сравнению с изображением, полученным посредством DAPI (контрастный краситель), чтобы компенсировать любое смещение оптической настроек или фильтра.
- При отсутствии проблем с оптической системой флуоресцентного куба или регулировкой хода луча света микроскопа использование данной функции не предполагается.
- **Auto Focus Offset** (Смещение автофокуса) — если данная функция включена, движения фокуса, вызываемые перемещением ползунка фокусировки во время ручной записи, фиксируются с учетом контрастного красителя и автоматически применяются к последующим снимкам. Значения смещения сохраняются в списке флуорохромов

Примечание: Не используется при автоматической записи с подсчетом количества точек в качестве элемента шаблона сканирования.

Оптимальные настройки зависят от типа образца. Нажмите **Save Template** (Сохранить шаблон), чтобы присвоить настройкам стандартные названия.

- В системе сканирования GSL они используются как **Post Capture Options** (Действия после записи) во время автоматической записи с помощью зонда.



Увеличение

Настройки **увеличения** необходимы для создания точного коэффициента масштабирования изображения при записи.

- **Объектив для записи** использует положение объектива микроскопа (для записи методом FISH предполагается 63-кратное увеличение).
- Значение **C-Mount** (Резьбовое крепление) должно быть установлено для разъема резьбового крепления на камере (1-кратное увеличение по умолчанию).

2 данных значения совместно участвуют в расчете масштабирования объекта и разрешения экрана, что применяется для расчета размеров объектов в рамках кариотипирования метафаз методом FISH, а также для расчета размеров сигналов *списка кадров*.

При ручной записи для изменения степени увеличения используется положение объектива микроскопа, установленное на панели **Objectives** (Объективы).



- Настройка выполняется в приложении **Microscope Calibration** (Калибровка микроскопа) с использованием модуля «Объективы».
- Микроскопы с моторизированной револьверной головкой объективов требуют конфигурирования для всех физических положений, доступных для микроскопа. (Стандарт для системы GSL).

Неправильные значения приведут к ошибкам классификации кариограммы или вывода на экран размера сигнала.

В случае попытки ручной записи с использованием объектива с низким коэффициентом увеличения при нажатии кнопки **Live** (Интерактивный режим) появится предупреждающее сообщение. Выберите **Continue** (Продолжить) и смените объектив на более подходящий с помощью программных средств управления, а затем нажмите **Capture** (Запись).

Такая ситуация может быть вызвана перемещением объектива микроскопа вручную (или с помощью сенсорной ЖК-панели) без использования элемента управления **Objectives** (Объективы) в приложении для настройки правильной степени увеличения.

- При запуске приложения по умолчанию активизируется объектив, сконфигурированный в положении 1.
- Если для смены линз объектива используется сенсорная ЖК-панель микроскопа, ПО не сможет определить, что увеличение изменилось, и будет по-прежнему использовать значение положения 1.
- При выполнении любой процедуры ручной записи необходимо также/только сменить объектив перед записью с помощью панели **Objectives** (Объективы). Это важно, чтобы не ошибиться в данном значении.

Примечание. Правильное положение объектива регулируется автоматически при выполнении процедуры автоматической записи с помощью **GSL**, а масштабирование объекта рассчитывается с помощью компонента масштабирования изображений в функции **Spatial Calibration** (Пространственная калибровка) для выбранного объектива.

Обработка по пороговым значениям

Обработка по пороговым значениям необязательна для записи с помощью зонда (и отключена для записи по точкам и метода **M-FISH**).

- После записи необработанные изображения могут быть подвергнуты повторной обработке по пороговым значениям, чтобы обновить изображения, полученные с помощью зонда.
- Если в параметрах **Customize** (Пользовательские настройки) выключена функция **Auto-Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям), при ручной записи откроется окно пороговых значений.

Обработка по пороговым значениям изображений, полученных с помощью зонда, аналогична обработке по пороговым значениям при записи метафаз по методу светлого поля. Разница заключается в том, что при обработке по пороговым значениям изображений, полученных с помощью зонда, к любой области, не покрытой маскирующим слоем синего цвета, применяется цвет, выбранный для данного флуорохрома.

Неточные пороговые значения могут привести к появлению значительных нерегулярных сигналов. Фоновые помехи и посторонние вещества также могут затруднить обработку по пороговым значениям, поэтому существуют дополнительные инструменты для такой обработки в процессе записи с помощью зонда.

- Функция **Counterstain Mask** (Маскирующий слой для контрастного красителя) удаляет все части изображения, которые не содержат контрастного красителя. Это хороший инструмент для использования при большом количестве фоновых помех.
- Функция **Region of Interest** (Область исследования) позволяет выявить одну или более областей обработки по пороговым значениям. Это хороший инструмент для выделения небольших сигналов из артефактов или посторонних веществ.

Примечание. Оптимизацию записи не предполагается использовать при ручной записи изображений с помощью зонда, за исключением изображений метафаз, где для интерпретации изображений или кариотипирования применяется бэндинг **DAPI**.

- Подробные сведения о стандартных параметрах обработки по пороговым значениям приведены в **Указаниях по эксплуатации кариотайпера** и в справочной системе приложения.

Автоматическая обработка по пороговым значениям

Если в параметрах пользовательских настроек включена функция **Auto-Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям), при записи интерактивного изображения окно обработки по пороговым значениям не откроется. Данная операция является стандартной для системы сканирования GSL.

- Для удаления фоновых помех система использует значение **Predict Threshold** (Прогнозируемые пороговые значения) или **Zero Threshold** (Нулевое пороговое значение). Обычно это применимо к флуоресцентным изображениям с низким уровнем фоновых помех.
- Оптимизация выполняется через настройки в сохраненном шаблоне записи. Вы также можете отключить оптимизацию записи с помощью опции **Zero Enhancements** (Без оптимизации) в пользовательских настройках записи.
- Изображение метафазы будет сохранено и отобразится в инструменте «Навигатор».
- Сохраненное необработанное изображение при необходимости можно использовать для повторной ручной обработки по пороговым значениям.

Повторная обработка необработанного изображения по пороговым значениям



Необработанные изображения можно повторно обработать, чтобы обновить изображение, полученное с помощью зонда, если первоначальные пороговые значения не были оптимальными.

Это может быть полезно, если при первоначальной записи использовалась опция **Zero Threshold (Нулевое пороговое значение)**, чтобы впоследствии создавать объекты для оптимизации, кариотипирования или копирования на гибкий экран.

- Загрузите необработанное изображение в главное окно экрана записи.
- Нажмите значок **Threshold** (Пороговые значения) в центре главной панели инструментов.
- Вручную выполните обработку изображения по пороговым значениям. После завершения обработки изображение будет удалено из главного окна изображений.

Запись с помощью зонда (Список кадров)



Запись с помощью зонда с использованием *кадров изображений* — это функция для обработки единичного изображения, предназначенная для ручной записи с помощью моторизованной головки фильтра и управления фокусом микроскопа.

Это интерактивная процедура, не требующая настроек или конфигурационных файлов, которые используются системой сканирования в рамках автоматической записи.

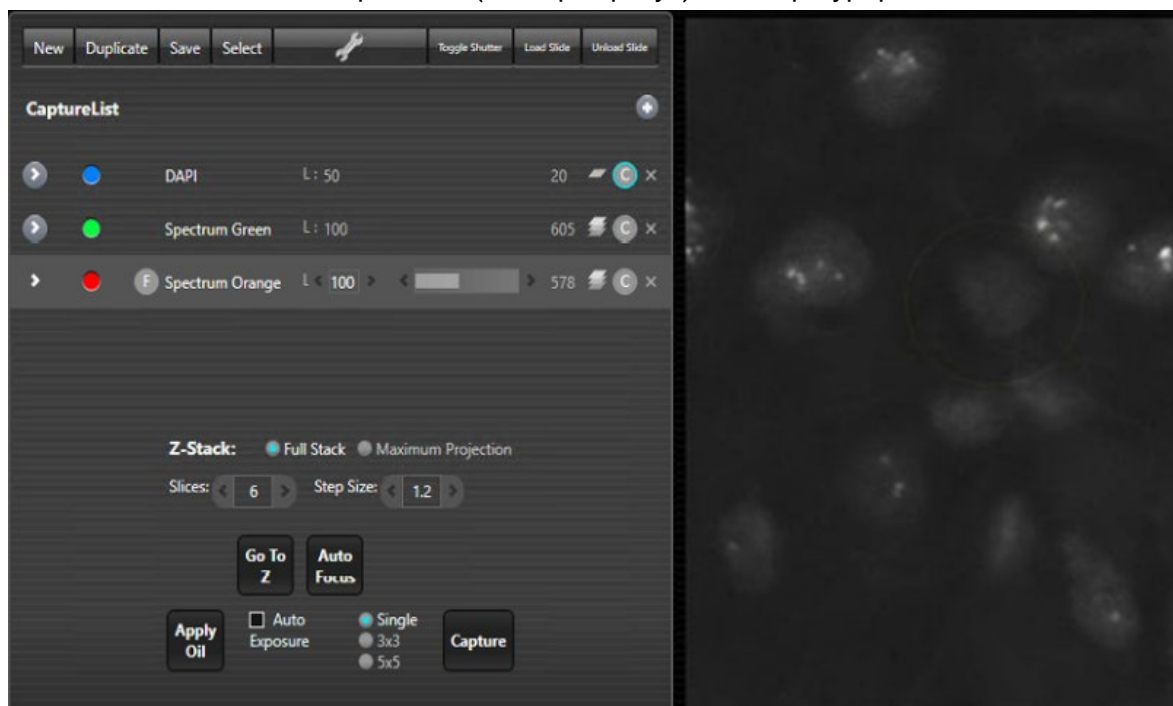
Ручная запись со *списком кадров* может использоваться для быстрой записи определенной вручную области предметного стекла для получения небольшого количества изображений из *списка кадров*.

Откройте задание и нажмите значок ручной записи с помощью зонда на главной панели инструментов начального экрана приложения.



В правой части экрана **Probe Capture** (Запись с помощью зонда) находится окно интерактивных изображений.

- Изображение всегда является интерактивным; используется экспозиция камеры для выбранного в списке флуорохрома.
- Элементы управления с левой стороны позволяют получить доступ к компонентам микроскопа (затвор и фокус) и сконфигурировать список записи.



После использования режима записи с помощью зонда вы увидите предметные стекла для вашего задания, отображаемые в верхней части экрана.

- Вы можете добавить предметное стекло с помощью кнопки New Slide (Новое предметное стекло) в правом верхнем углу окна.
- Доступно добавление каналов, конфигурация фильтра, цвета, настройки карты срезов по оси Z, а также сохранение списков записи.

- Запись изображений с ручной или автоматической настройкой экспозиции камеры.
- Запись одного кадра или более крупных прямоугольных сеток из 9 или 25 кадров (перемещение предметного столика GSL).
- Несколько записанных изображений могут быть связаны с одним предметным стеклом.

Управление объективом

При запуске приложения по умолчанию активизируется объектив, сконфигурированный в положении 1. В моторизованных системах микроскопа используется объектив с 10-кратным увеличением.

- Если для смены линз объектива используется сенсорная ЖК-панель микроскопа, ПО не сможет определить, что увеличение изменилось, и будет по-прежнему использовать значение положения 1.
- При выполнении любой процедуры ручной записи вы должны менять объектив перед записью только через интерфейс программного обеспечения. Это важно, чтобы не ошибиться в данном значении.

Ручная запись с помощью списка кадров имеет набор элементов управления аппаратным обеспечением, отличающийся от стандартного экрана записи (см. ниже).

- Клавиатура используется для переключения объективов микроскопа с помощью функциональных клавиш (F).
- Чтобы просмотреть (или скрыть) все доступные ярлыки аппаратного оборудования и настройки размера шага, нажмите **F10**.

Запись с помощью списка кадров: обзор процедуры

- **Просмотр интерактивного изображения.** Изображение с камеры всегда присутствует в главном окне экрана.
 - Опции каналов, настроек и записи можно просмотреть или изменить перед выполнением записи.
 - **Capture (Запись).** Запускает комплексную автоматическую запись всех отдельных клеток на всех каналах с использованием полного комплекта настроек их списка записи. Получает интерактивные изображения и сохраняет их в списке кадров предметных стекол в инструменте **Navigator** (Навигатор).
1. Выберите задание и предметное стекло в инструменте «Навигатор», а затем нажмите **Probe Capture** (Запись с помощью зонда).
 2. Создайте **новый** или **выберите** предварительно сохраненный список записи, подходящий для данного образца.
 3. Нажмите на канал контрастного красителя в списке записи (путем активации флуоресцентного фильтра/затвора).
 4. Выделите область образца на предметном стекле микроскопа, установите положение и фокус в окне экрана.
 5. Нажмите **Capture** (Запись), чтобы запустить последовательность автоматической записи.
 - Если функция «Автоматическая экспозиция» включена, то автоматическая настройка камеры выполняется для каждого канала.
 - Если функция «Автоматическая экспозиция» выключена, то запись каналов выполняется с использованием фиксированных значений экспозиции из списка записи.

6. Для каждого канала отображается статус, демонстрирующий все операции с экспозицией и картой срезов по оси Z.
7. Под панелью записи находится эскиз цветного изображения.
8. Повторяйте процедуру для всех последующих изображений.

Не следует:

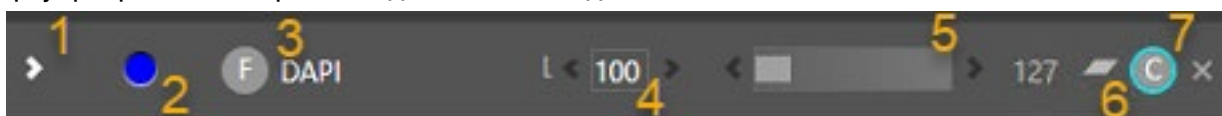
- ... переключаться между объективами с низким и высоким коэффициентом увеличения вручную. Используйте элементы управления клавиатуры (F1–F7) для смены объектива, чтобы подтвердить правильное значение коэффициента увеличения объектива.
- ... перемещать предметный столик или фокус вручную в процессе записи.

Параметры настройки записи

Чтобы получить доступ к элементам управления записью, необходимо добавить на экран хотя бы один канал.

Добавление каналов

Кнопка «+» добавляет канал в текущий список записи — совокупность каналов флуорохромов, которые ожидают записи в данный момент.



1. Выбор канала (>)
2. Конфигурация цвета канала
3. Конфигурация фильтра канала (F)
4. Интенсивность флуоресцентной лампы (L: Xylis/XCite)
5. Экспозиция камеры (ручная настройка)
6. Индикатор карты срезов по оси Z (выкл./вкл.)
7. Индикатор контрастного красителя (C)

Настройка канала

(2) Цвет отображения канала

Каждый канал записи имеет свой цвет отображения, который указан слева от строки канала. Это цвет, который будет использоваться для канала при просмотре всего изображения.



Цвет можно изменить, нажав на цветной круг, который открывает панель сетки **Basic Colors** (Базовые цвета) и позволяет установить желаемый цвет отображения.

(3) Фильтр микроскопа

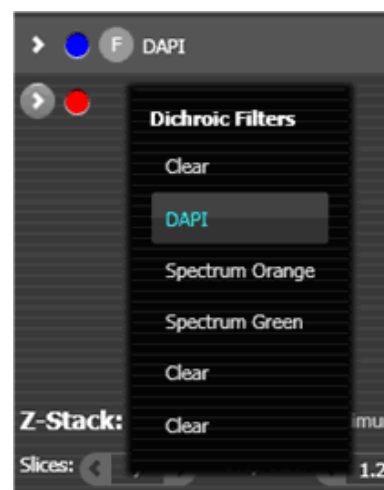
После выбора канала непосредственно перед его названием появляется кнопка фильтра, обозначенная буквой «F». Нажав на данную кнопку, вы увидите фильтры, сконфигурированные для вашего микроскопа.



Вы можете использовать только один фильтр или их комбинацию для каждого канала флуорохромов. После выбора фильтра он удаляется из последующей подборки.

Примечание. Название канала заимствуется из сконфигурированных в системе колес фильтров.

- Если вы используете два фильтра, например, дихроичный фильтр и фильтр возбуждения, будут представлены оба варианта.
- Если доступные фильтры выглядят неправильными, проверьте конфигурацию в приложении **Microscope Calibration** (Калибровка микроскопа).



(4) Интенсивность лампы

В системах с флуоресцентной лампой Xylis или X-Cite предусмотрена регулировка интенсивности, позволяющая изменять интенсивность лампы, используемой для каждого канала в процессе записи.

- Для стандартной записи с помощью канала зонда типичным является значение 100 %.
- Если контрастный краситель очень яркий, использование более низкой интенсивности позволит получить более контрастное изображение на экране.
- Более низкая интенсивность может также замедлить быстрое фотообесцвечивание, если контрастный краситель или защита от обесцвечивания на предметном стекле не стабильны.

(5) Экспозиция камеры

Каждый канал имеет свое собственное значение экспозиции (в миллисекундах), отображаемое справа от названия канала. Данное значение управляет объемом применяемой интеграции камеры.

- При выборе канала отображается ползунок экспозиции, который можно регулировать, перетаскивая его левой кнопкой мыши внутри полосы или нажимая на стрелки с обеих сторон.



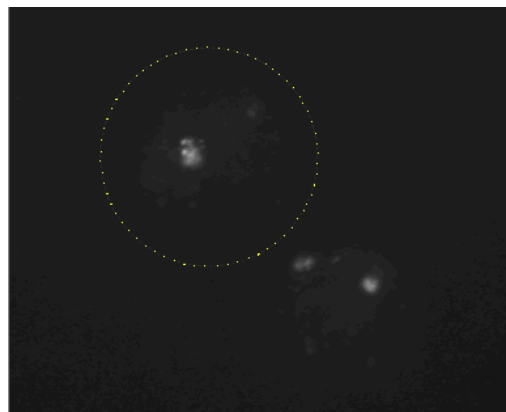
Если затвор, отсекающий излучение флуоресценции, открыт, на экран выводится интерактивное изображение, и можно непосредственно увидеть результат регулировки экспозиции.

В качестве альтернативы можно нажать мышью по интерактивному изображению. При этом на изображении появляется «целевой круг», и автоматическая экспозиция камеры рассчитывается только по данной области.

- Это отображается на изображении в виде пунктирного круга.

Таким образом вы можете произвести прицельную автоматическую настройку, используя область изображения с представляющим интерес материалом, и избегая областей, где могут присутствовать яркие артефакты, мешающие расчету экспозиции.

- **Нажмите левой кнопкой мыши** повторно на другой области изображения, чтобы применить другой круг для автоматической настройки.
- **Щелкните правой кнопкой мыши** по изображению, чтобы отменить автоматическую настройку или убрать выделение целевого круга.

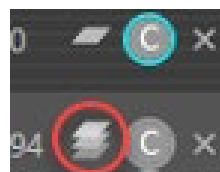


(6) Запись карты срезов по оси Z

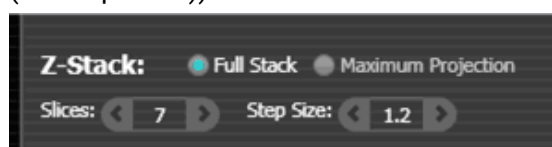
Карта срезов по оси Z представляет собой запись нескольких изображений одного и того же канала в разных фокальных плоскостях для выявления различий трехмерных сигналов.

Если щелкнуть график стека справа от настроек экспозиции, можно переключиться между одним изображением (карта срезов по оси Z отключена) и несколькими изображениями (карта срезов по оси Z включена).

- Запись стека для изображения контрастного красителя не является типичной процедурой.



После активации карты срезов по оси Z для канала над кнопкой записи появятся дополнительные параметры для настройки количества **Slices** (Срезы) в стеке и расстояния между стеками (**Step Size** (Размер шага)).



Вы можете выбрать для сохранения значение **Full Stack** (Весь стек) или только **Maximum Projection** (Максимальная проекция):

- функция **Максимальная проекция** позволяет выполнить запись стека изображений для создания только комбинированного изображения — изображения с *максимальной проекцией*.
- Отдельные изображения стека не сохраняются в финальном кадре изображения.
- При выборе функции **Full Stack** (Вся карта срезов) отдельные снимки записываются и сохраняются в карте срезов по оси Z вместе с объединенной *максимальной проекцией*.

(7) Контрастный краситель

Перед началом записи один из каналов в списке должен быть выбран в качестве контрастного красителя.



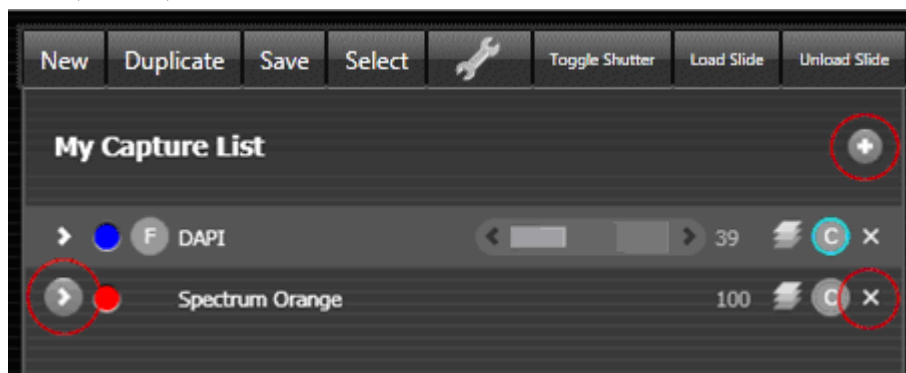
- Обычно это канал DAPI.
- Канал контрастного красителя служит контрольной точкой и центром фокусировки при записи карты срезов по оси Z (если только фокус не был вручную перенастроен на один из каналов зонда перед записью).

Работа со списками записи

Совокупность каналов представляет собой список записи. Элементы управления списками записи отображаются в верхней части панели записи: «Новый», «Дублировать», «Сохранить» и «Выбрать».



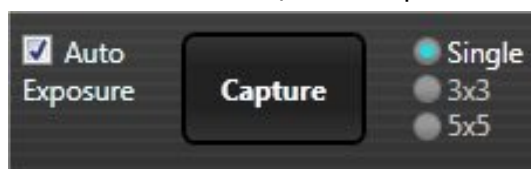
- Функция **New** (Новый) помогает создать новый список записи, содержащий только один канал. Он заменит все отображаемые в данный момент каналы.
- Функция **Duplicate** (Дублировать) создает копию текущего списка.
- При выборе **Save** (Сохранить) отображаемый в данный момент список записи сохраняется в окне **Select** (Выбор).
- Ранее сохраненные списки записи можно восстановить с помощью параметра **Select** (Выбор).



- Чтобы выбрать другой канал, нажмите кнопку «>» слева от названия канала; при выборе канала интерактивное изображение изменится в соответствии с настройками текущего канала.
- Каналы можно удалять с помощью кнопки «x», которая отображается в конце строки каждого канала, либо добавлять с помощью кнопки «+».

Запись изображений

После того как список записи создан и для каждого канала настроены подходящие параметры фильтра, цвета, контрастного красителя и карты срезов по оси Z, изображение может быть записано с рассчитанной экспозицией камеры.



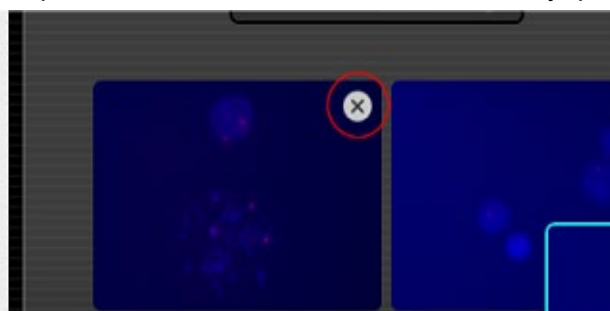
- Если функция **Auto Exposure** (Автоматическая экспозиция) включена, при выборе кнопки **Capture** (Запись) экспозиция камеры автоматически регулируется для каждого канала с помощью автоматической настройки, основанной на интенсивности изображения.
- Если вы указали целевой круг для автоматической настройки, каждый канал будет использовать только данную область изображения для расчета оптимальных значений экспозиции.

- Если вы не указали целевой круг, автоматическая настройка будет опираться на все изображение.
- Если функция **Auto Exposure** (Автоматическая экспозиция) отключена, при выборе кнопки **Capture** (Запись) каждый канал флуорохромов в списке записи будет последовательно записан с использованием значений экспозиции, которые в данный момент находятся в списке записи.
- Перед нажатием кнопки **Capture** (Запись) необходимо подтвердить требуемые значения экспозиции камеры.

После запуска процесс записи идет непрерывно по всем каналам.

- Паузы между переходами по каналам флуорохромов отсутствуют.
- Во время записи интерактивное изображение на экране не обновляется.

После записи каждое изображение появляется под элементами управления записью.



- При наведении курсора мыши на эскиз изображения отображается его увеличенная версия.
- Маленький крестик в правом верхнем углу можно использовать для удаления изображения, если это необходимо.

Примечание. Таким образом можно удалить только изображения из списка кадров, записанные вручную на данном экране. Изображения, записанные системой сканирования в режимах **ProbeAuto** или **Spot Counting** (Подсчет количества точек), удалению не подлежат.

Завершение записи

После завершения записи выйдите из экрана, нажав на крестик в правом верхнем углу, и вернитесь к начальному экрану функций управления заданиями.

Вывод изображений зонда

CytoVision DX включает различные инструменты вывода на экран и отображения изображений клеток, которые записываются с помощью стандартных зондов и метода M-FISH и могут быть загружены на начальный экран для вывода изображений, а также общей настройки цвета, контрастности, кариотипирования или комментирования, экспорта или печати.

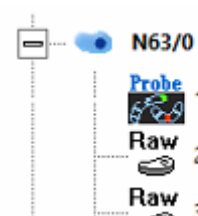
Данные кадров изображений невозможно выводить на экран в приложении *CytoVision DX*.

- Важно использовать наиболее подходящий режим записи в соответствии с вашими требованиями к выводу на экран изображений.
- Дополнительные сведения см. в [Таблице для записи и анализа](#).

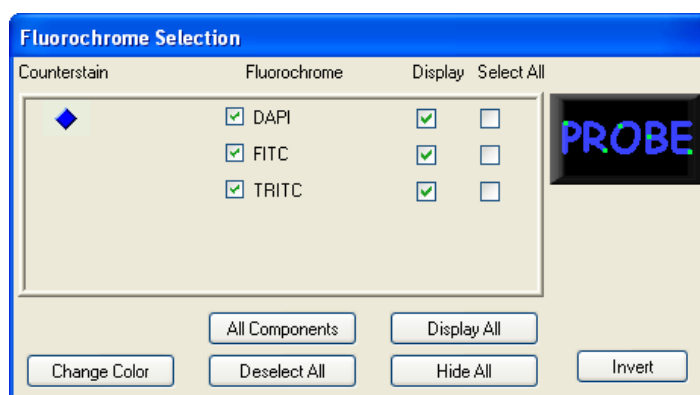
Вывод на экран

Все операции вывода на экран и загрузки изображений осуществляются через **начальный экран**.

- Загрузите изображение, дважды нажав на значок «Зонд» в инструменте «Навигатор», а затем перейдите на главное окно экрана.



Когда изображение, полученное с помощью зонда, загружается на главное окно анализа, в нижней части экрана появляется окно **Fluorochrome Selection Panel** (Панель выбора флуорохромов).



Это поле показывает, какие флуорохромы использовались при записи изображений, и позволяет выбрать компоненты объединенного изображения, полученного с помощью зонда, для вывода на экран.

- Каждое изображение, полученное с помощью зонда, содержит наложение 2 или более каналов *флуорохромов*.
- Каждый канал может содержать отдельные объекты, которые необходимо выбрать по отдельности, прежде чем выполнять какую-либо регулировку.
- Установите несколько флажков «Флуорохром», чтобы можно было выбрать несколько каналов одновременно.
- Некоторые функции анализа, такие как **Register** (Регистрация) или **Change Color** (Изменение цвета), допускают выбор только одного компонента.

Справа от флуорохрома также расположен флажок **Display** (Экран).

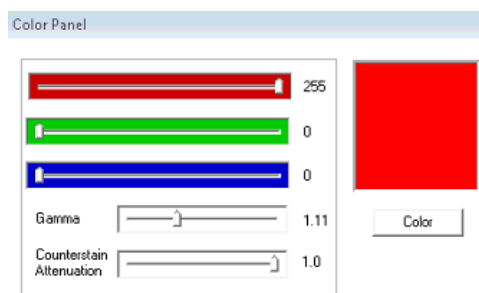
- При включении все объекты для данного канала будут выведены на экран.
- При выключении все объекты для данного канала будут скрыты.

Комбинации опций «Флуорохром» или «Экран» полезны при выборе объектов для операций улучшения, изменения цвета, регистрации изображений и создания комбинированных экранов.

Изменение цвета

Данная функция работает аналогично настройке цвета в окне настройки записи, посредством обновления цвета компонентов для одного сохраненного изображения. Это может быть использовано для улучшения визуального отображения наложенных сигналов и для помощи при печати.

- Нажмите кнопку команды **Change Color** (Изменение цвета), чтобы открыть панель цветов; изображение контрастного красителя будет выбрано автоматически.
- Отрегулируйте 3 ползунка, чтобы изменить цвет.
- Также можно нажать кнопку **Color** (Цвет), чтобы выбрать цвет из таблицы цветов.
- Нажмите на другой флуорохром, чтобы изменить его цвет.
- Команды **Gamma** (Гамма) и **Counterstain Attenuation** (Уменьшение контрастного красителя) функционируют так же, как и в окне настроек записи, но результат моментально отображается на изображении, полученном с помощью зонда. Регулировка значения *Гамма* влияет на изображение в целом, улучшая вывод на экран; однако при этом также увеличиваются фоновые помехи или неспецифический сигнал. Чтобы улучшить только отображение сигнала, выберите интересные вас объекты и воспользуйтесь параметром **Contrast** (Контрастность).



Нажмите ОК, чтобы закрыть панель изменения цвета.



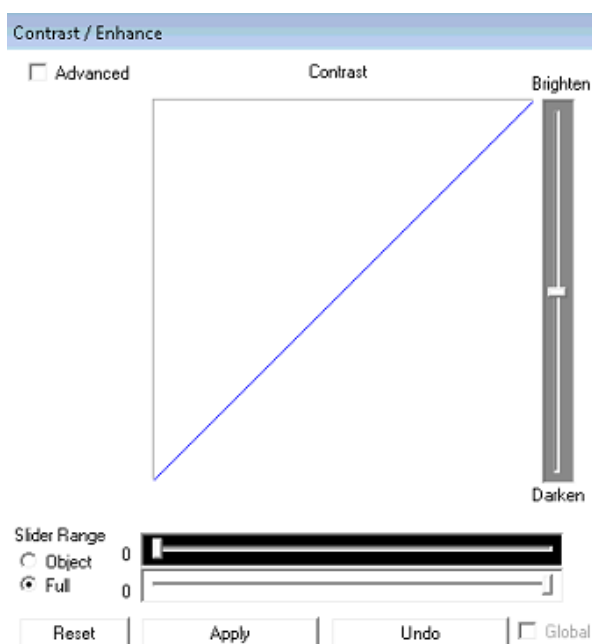
Контрастность

С помощью параметра «Контрастность» можно изменять яркость и контрастность изображения.

- Опция **Contrast** (Контрастность) должна использоваться в **Global** (Глобальный) или **Full** (Полный) по умолчанию.
- Убедитесь, что в пользовательских настройках выбран **Preview enhancements** (Предварительный просмотр улучшений).
- Убедитесь, что на панели выбора флуорохромов выделен правильный флуорохром, и нажмите на сигнал(ы), который(-е) вы хотите осветлить (вокруг них появится поле выбора).



режиме

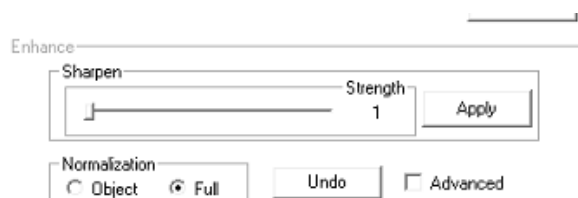


1. Чтобы **осветлить** сигнал, переместите ползунок справа от гистограммы по направлению вверх.
2. Чтобы **затемнить** сигнал, перетащите ползунок вниз.
3. Ползунки для «отсечения» цвета под гистограммой можно использовать для радикального изменения интенсивности.

Улучшение (повышение резкости)



Инструмент улучшения (повышения резкости) находится под окном регулировки контрастности.



Повышение резкости обычно используется только для канала контрастного красителя для повышения детализации краев или фона, а также при работе с метафазами, окрашенными методом DAPI, для усиления бэндинга.

Для вывода на экран или просмотра изображений, полученных с помощью зонда, не существует специальных инструментов анализа. К изображениям, полученным с помощью зонда, применимы те же параметры, что и к другим форматам изображения клеток.

- Изображения, полученные с помощью зонда, загружаются в стандартном режиме **Case View** (Просмотр задания) для вывода на экран структуры и использования комментариев с помощью Ctrl-B или Ctrl-K на экране **Analyze** (Анализ). См. **Руководство пользователя CytoVision DX**.
- К изображениям, полученным с помощью зонда, можно применять пороговые значения, чтобы создавать объекты для использования на гибком экране и формировать пару метафазы и кариотипа, полученных методом FISH, в рамках рабочего процесса анализа кариотипирования. См. **Указания по эксплуатации кариотайпера CytoVision DX**.

Поиск и устранение неполадок

Информация и проверки, приведенные в данном разделе, предназначены для начального уровня поиска и устранения неисправностей усилиями пользователей, знакомых с приложениями и аппаратным обеспечением системы.

- **Руководство пользователя CytoVision DX** содержит общие проверки и действия, которые также должны быть выполнены и подтверждены при обращении в компанию Leica Biosystems для получения поддержки.

Система записи

Ошибки при подключении к микроскопу

- Контроллер микроскопа выключен — перезагрузите контроллер.
- USB-кабель микроскопа отсоединен — проверьте кабель.
- USB-порт микроскопа или кабельное соединение изменилось (изменение USB-порта или процессы Windows) — подтвердите порт в диспетчере устройств и измените калибровку микроскопа (требуется доступ на уровне локального администратора).

Влияние качества света микроскопа

Необходимо регулярно проверять оптический микроскоп и следить за тем, чтобы в его конфигурацию не были внесены изменения, препятствующие получению изображений оптимального качества. В случае возникновения проблем с качеством записываемого изображения следует проверить также следующие факторы.

- Убедитесь, что фототубус микроскопа (светоделитель) направляет 100 % света на камеру.
- Убедитесь, что флуоресцентный световод установлен правильно, не поврежден/не погнут, не испорчен и не превышает пределов ожидаемого срока службы.
- Проверьте и очистите линзы объектива. Наличие старого затвердевшего масла на объективе снижает интенсивность света, освещение (равномерность) и контрастность изображения.
- Убедитесь, что линза конденсора выдвинута из хода луча света во время сканирования и записи, чтобы предотвратить отражение света (это делается автоматически в микроскопах с моторизованным конденсором).
- Визуально осмотрите флуоресцентные фильтры в головке микроскопа на наличие признаков повреждения под влиянием света или окружающей среды (затенение, гранулированная структура, неравномерность цвета).

Система сканирования GSL

Для сканирования с помощью GSL необходимо выполнить **дополнительные** проверки и следовать определенным процедурам.

Ошибки при подключении к GSL

- Базовый модуль GSL выключен — перезагрузите GSL, проверьте подключение внешнего источника питания.

- Сетевой кабель отсоединен — проверьте подключение кабеля между GSL и ПК.
- Конфигурация сетевого адаптера — подтвердите отсутствие недавних изменений в ИТ/сетевом администраторе.

Проблемы фокуса при сканировании с 10-кратным увеличением

- Предметные стекла чистые и не покрыты иммерсионным маслом? На предметных стеклах не должно быть иммерсионного масла, чтобы можно было произвести точную фокусировку.
- Во время автоматической фокусировки происходит пересечение фокальной плоскости изображения?
- Начальная точка автоматической фокусировки расположена на расстоянии от фокальной плоскости клетки (карта фокусировки с 10-кратным увеличением не проходит через фокальную плоскость образца): проблема с предметным стеклом в лотке, смещение фокуса шаблона, пространственная калибровка исходных точек отсеков (стук предметного столика).
- Карта фокусировки с 10-кратным увеличением проходит через фокальную плоскость, но не содержит четких точек фокусировки: контрастность ([влияние качества света](#), низкая интенсивность контрастного красителя).
- Неправильная настройка смещения фокуса в шаблоне сканирования приводит к сбоям карты фокусировки с 10-кратным увеличением
- Проверьте шаблоны сканирования на предмет смещения фокуса, настройки покровного стекла, параметры подтверждения фокуса
- Фокусировка меняется в зависимости от положения предметного столика лотка/отсека?
- Недостаток света в процессе настройки карты фокусировки с 10-кратным увеличением (влияние качества света, смещение камеры при обработке шаблона предметного стекла).
- Избыток света в процессе настройки карты фокусировки с 10-кратным увеличением (смена аппаратного обеспечения, смещение камеры при обработке шаблона предметного стекла, интенсивность контрастного красителя).
- Если интерактивное изображение слишком темное или светлое, проверьте светоделитель и шаблон предметного стекла на предмет смещения камеры, повторно воспользуйтесь функцией **Fluorescent Scan Calibration** (Калибровка флуоресцентного сканирования).

Проблемы при сканировании с 10-кратным увеличением

- Как выглядят интерактивные изображения во время сканирования, хорошо ли настроены фокус и контрастность?
- Это происходит на нескольких шаблонах предметного стекла? Запустите новый шаблон для проверки.
- Проверьте микроскоп на предмет проблем, связанных с [влиянием качества света](#).
- Проверьте предметное стекло с образцом на предмет концентрации и интенсивности окрашивания DAPI, а также защиты от обесцвечивания.
- Проверьте классификаторы на предмет ошибок в обучении.

Проблемы при записи с 63-кратным увеличением

- Начальная точка автофокуса находится на расстоянии от фокальной плоскости камеры. Проверьте линзу для записи на предмет блокировки (пружинный механизм типа «надави и поверни» на конце).
- Данная проблема наблюдается на нескольких предметных стеклах? При наличии несовпадений см. раздел [Совместимость предметного стекла и лотка](#).
- Как выглядят эскизы сканов списка метафаз, выполненные с 10-кратным увеличением, на экране просмотра: они находятся в фокусе?
- Для устранения систематических проблем с фокусировкой при автоматической записи повторно выполните **Калибровку флуоресцентного сканирования**.
- Убедитесь, что параметры покровного стекла сканирования настроены правильно.
- Недостаточное количество масла, пузырьки воздуха или другие проблемы, связанные с маслом, приводят к неоптимальной фокусировке. Убедитесь в наличии масла в резервуаре пипетки, в надежной фиксации соединительной трубки и наконечника устройства подачи масла, а также в отсутствии их блокировки.

Проблемы при записи с помощью канала зонда

- Использование неправильного фильтра для записи. Проверьте конфигурацию списка записи (название и положение дихроичного фильтра) в сохраненных списках и функции «Создать список» по умолчанию.
- Сигналы зонда находятся не в фокусе. Проверьте размер шага карты срезов по оси Z и количество слоев, проверьте расположение фильтра в револьверной головке объективов микроскопа.

Совместимость предметного стекла и лотка

Установка предметного стекла в держатель на предметном столике.

Предметные стекла необходимо размещать горизонтально в держателе предметных стекло, поверхностью с образцом или покровным стеклом вверх.

- Убедитесь, что во вкладке ничто не препятствует горизонтальному размещению предметного стекла, и что предметное стекло плотно контактирует с захватом предметного стекла для предотвращения его движения.

Правильность фиксации предметного стекла.

Проверьте, достаточно ли плотно пружинные зажимы удерживают предметное стекло.

- Если предметное стекло закреплено не надежно (шатается), проверьте плотность прилегания пружинных зажимов.
- Углы предметного стекла прямые или срезанные? Если углы срезаны, является ли степень «скошенности» лотка правильной?

Правильность фиксации лотка.

Проверьте надежность крепления лотка GSL к предметному столику при загрузке.

- В случае ослабленного крепления проверьте регулировку пластикового зажима на передней/левой части предметного столика GSL (винтовое крепление).

Установка покровного стекла.

Толстые/двойные покровные стекла препятствуют достижению плоскости фокусировки.

- Убедитесь, что метафазы попадают в фокус и могут быть записаны вручную на обычном экране записи.

Подготовка и окрашивание образцов.

Плотность клеток образца, интенсивность контрастного красителя и защита от обесцвечивания оказывают непосредственное влияние на надежность фокусировки системы, скорость и эффективность сканирования и автоматической записи.

- Не рекомендуется разбавлять контрастный краситель. Низкая интенсивность увеличивает экспозицию камеры и снижает контрастность, что приводит к сбоям фокусировки и увеличению времени сканирования и записи.
- Эффективность защиты от обесцвечивания снижается под влиянием срока и температуры хранения, а также света, что приводит к появлению красной вуали на предметном стекле и усилению обесцвечивания как зондов, так и DAPI. DAPI/защиту от обесцвечивания следует хранить при температуре 2–8 °C до момента применения и наносить на предметные стекла, пока материалы еще холодные.
- Храните предметные стекла в темноте при температуре 2–8 °C и помещайте на 30 минут в условия комнатной температуры перед сканированием. Старые предметные стекла следует повторно окрашивать свежим контрастным красителем и наносить защиту от обесцвечивания по мере необходимости.
- Низкая плотность клеток увеличивает время сканирования и записи, а также количество изображений, необходимых для оценки сигнала. По возможности регулируйте плотность клеток во время подготовки предметных стекол, чтобы на один кадр записи приходилось не менее 5 оцененных клеток (оптимально 10–20).

Экспорт журналов диагностики

Во время штатной работы система *CytoVision DX* генерирует скользящий пакет данных конфигурации системы, калибровки, процессов и аппаратных событий. В случае выполнения неожиданных действий, ошибок при сканировании или записи изображений, а также в случае сбоя приложения эти файлы журналов могут содержать важную информацию, которая будет полезна службе поддержки Leica при диагностировании причины неисправностей.

- Журналы содержат подробные диагностические данные за 7–10 дней, и в течение данного срока необходимо экспортировать данные в случае возникновения любой проблемы, о которой вы можете сообщить Leica Biosystems.
- Файлы журналов сохраняются с помощью функции **Export Logs** (Экспорт журналов) из меню **Case** (Задание) на панели инструментов. При этом все файлы объединяются в сжатую архивную папку формата .zip, которая сохраняется в указанном пользователем месте.
- Впоследствии архив можно будет скопировать на карту памяти или предоставить к нему общий доступ необходимой службе или персоналу техподдержки.

Приложение: Подсчет количества точек

Обзор функции подсчета количества точек

Функция **Spot Counting** (Подсчет количества точек) использует настройки раздела **Spot Assay** (Анализ точек), созданные перед записью, для генерирования данных изображений из списка кадров.

Списки кадров на основе точек записываются в рамках полностью автоматизированного рабочего процесса сканирования и автоматической записи с помощью GSL, используя режим записи с подсчетом количества точек в шаблоне предметного стекла для сканирования.

- Список кадров для подсчета количества точек можно также получить вручную на экране записи, используя режим записи «Подсчет количества точек», аналогичный стандартной записи с помощью зонда и основанный на тех же названиях флуорохромов из раздела Создать список.

Подсчет количества точек имеет некоторые различия по сравнению с данными изображений из списка кадров *ProbeAuto*.

- Анализы точек можно создавать и редактировать с помощью панели выбора анализов для каналов различных флуорохромов и настроек карты срезов по оси Z.
- Функция **Cell Classifier** (Классификатор клеток) используется для определения типа клеточного материала, обрабатываемого как «информативный» на изображении во время записи.
- Функция **AutoCapture** (Автоматическая запись) системы сканирования может быть настроена на максимальное количество информативных клеток или максимальное количество записанных кадров.
- Записанные данные обрабатываются с использованием параметров *анализа* для получения сведений об интенсивности сигнала зонда и размере, включая настройки для формы клеток с контрастным красителем и стоп-лимитах GSL.
- Исходные данные о клетках и обработке сигналов регулярно сохраняются в *списке кадров*.

Примечание. Списки кадров для подсчета количества точек содержат несколько файлов с большим общим размером, поэтому важно убедиться, что на сервере данных, где хранится Casebase, достаточно свободного места.

- Предметное стекло с 40 кадрами (записанными изображениями) будет иметь размер около 500 Мб, исходя из расчета 5 стеков на канал для образца, обработанного 2 зондами.
- Около 80 % этих данных будут составлять отдельные снимки карт срезов по оси Z.
- Данные кадров изображений невозможно выводить на экран в приложении *CytoVision DX*. Просмотр изображений требует использования отдельного программного обеспечения для анализа изображений, совместимого с форматом *списка кадров*.

Рабочий процесс подсчета количества точек включает 2 основных этапа.

1. **Выбор анализа:** анализ может быть выбран или создан, если в качестве режима записи шаблона предметного стекла для сканирования выбран подсчет количества точек или, при ручной записи, режим выбран в списке **Capture Mode** (Режим записи) на стандартном экране записи.

2. **Запись:** изображения из выбранной области предметного стекла фиксируются с помощью зонда в соответствии со стандартными процедурами записи. Данные изображения обрабатываются в реальном времени для определения границ клеток и сигналов зондов.

Перед выполнением записи клеток для автоматического подсчета количества точек:

- Необходимо ознакомиться с процедурами **записи с помощью зонда** и флуорохромами, поскольку при анализах в рамках подсчета количества точек используются названия флуорохромов и настройки по умолчанию из раздела **Создать список**.
- Необходимо создать и сконфигурировать анализы для флуорохромов, которые будут использоваться в качестве списка записи, с настраиваемыми картой срезов по оси Z, типом зонда и параметрами классификаторов клеток.
- Система сканирования должна иметь рабочее значение **Fluorescent Scan Calibration** (Калибровки флуоресцентного сканирования) для стандартной интенсивности контрастного красителя образца и смещения фокуса, которые будут использоваться в процессе записи.
Пользователи должны владеть процедурами калибровки сканирования, чтобы надлежащим образом обслуживать систему и компенсировать любые колебания интенсивности видимого контрастного красителя.
- Системе сканирования требуется **шаблон предметного стекла** с соответствующей областью сканирования, классификатором сканирования и анализом точек, назначенными для конкретного предметного стекла.

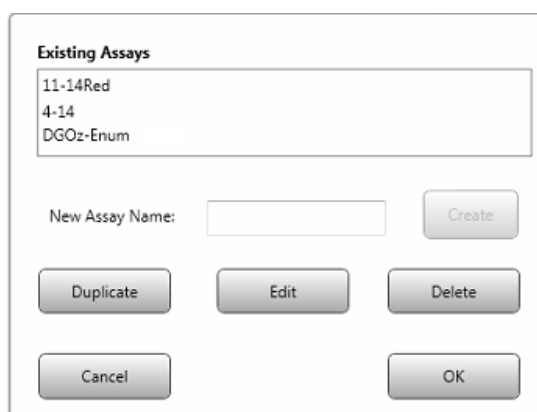
Анализ в рамках подсчета количества точек

Анализ точек включает следующие элементы:

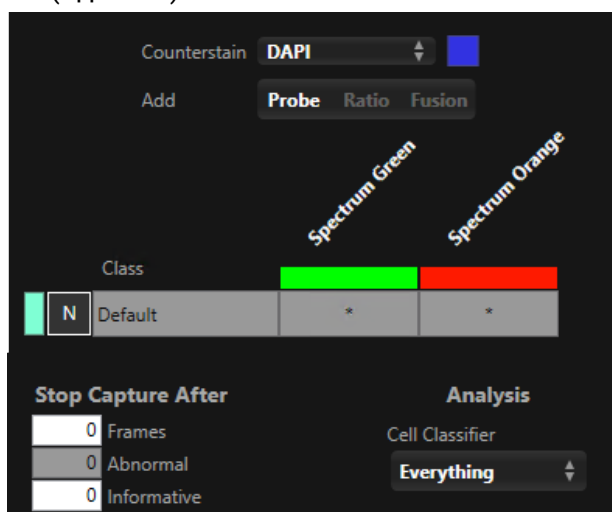
1. Список записи флуорохромов для контрастного красителя и зондов на предметном стекле.
2. Настройки карты срезов по оси Z по умолчанию для каждого канала зонда.
3. Максимальное количество кадров или клеток для автоматической записи с помощью системы сканирования: значения для опции **Stop Capture After** (Остановить запись после).
4. Параметры для выбора контрастного красителя в качестве классификатора клеток в целях определения клеток, которые будут классифицированы как информативные при обработке изображений.

Для использования функций сканирования и автоматической системы GSL перед записью необходимо выполнить анализ и сконфигурировать его с помощью окна **Spot Assay Selector** (Выбор анализа точек).

Окно **Выбор анализа точек** будет отображаться на стандартном экране записи (режим подсчета количества точек) или в составе шаблона сканируемого предметного стекла, если для режима автоматической записи установлен параметр *Подсчет количества точек*.



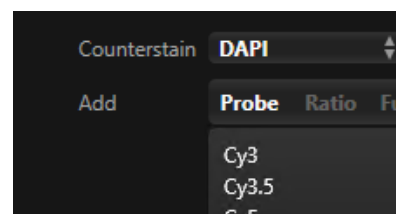
- **Создание нового анализа.** Введите новое название анализа и выберите **Create** (Создать). Откроется диалоговое окно **Spot Configuration (Конфигурация точек)**.
- **Копирование существующего анализа.** Выделите существующий анализ в списке. Нажмите **Duplicate** (Дублировать).
- **Редактирование существующего анализа.** Выделите существующий анализ в списке. Нажмите **Edit (Редактирование)**. Откроется диалоговое окно **Spot Configuration (Конфигурация точек)**.
- **Удаление существующего анализа.** Выделите существующий анализ в списке. Нажмите **Delete** (Удалить).



Редактирование анализов для записи по точкам

Выбор флуорохромов

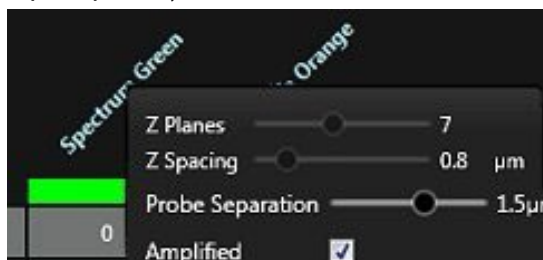
Выберите пункт **Counterstain** (Контрастный краситель) из выпадающего меню названий флуорохромов системы, затем нажмите кнопку **(Add) Probe** ((Добавить) зонд) и повторяйте описанные действия, пока не получите необходимое количество флуорохромов и их названия для комплекта зонда, используемого для обработки предметного стекла с образцом.



Список названий заимствован из функции зонда **Build List** (Создать список), которую необходимо сконфигурировать для отображения цвета и фильтров по умолчанию на стандартном [экране записи](#).

Нажимайте на название каждого зонда, чтобы настроить:

- **Z Planes** (Z-плоскости) и **Z Spacing** (Z-расстояние) (мкм) для записи карты срезов по оси Z.
Данные значения зависят от характеристик образца, но для препаратов интерфейсы стандартным начальным значением является общее фокусное расстояние около 5 мкм. Например, 7 плоскостей с расстоянием 0,8 мкм или 5 плоскостей с расстоянием 1,2 мкм (диапазон 4,8 мкм).
- Если флуорохром предназначен для теста амплификации, установите флажок **Amplified** (Амплифицирован).

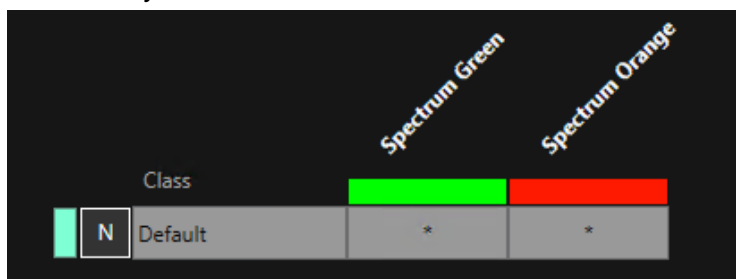


- **Probe Separation** (Разделение зондов) — это дополнительная настройка, которую можно оставить по умолчанию, поскольку она не имеет прямого отношения к процедурам записи CytoVision DX.

Таблица класса

После настройки списка записи создается таблица **класса**, в которой отображается название класса «По умолчанию», используемое для обработки информативных клеток во время записи изображения.

- Данная таблица не подлежит редактированию в процессе записи с использованием CytoVision DX.



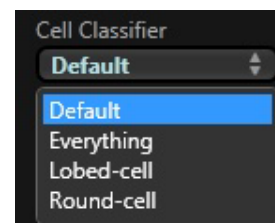
Классификатор клеток

Для нового анализа не задан классификатор (**Everything** (Все)):

- Все объекты в записанных кадрах, содержащие сигналы зонда, наложенные на контрастный краситель, будут классифицированы как «информативные» для отображения на экране остановки подсчета GSL и мониторинга класса во время записи.

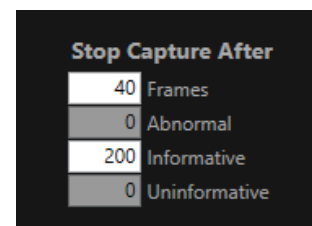
Использование классификатора клеток (DAPI) позволит отфильтровать «информативные» клетки на основании форм объектов (клеток) для контрастного красителя, и их можно будет выбрать из выпадающего списка меню.

- **По умолчанию.** Классификатор, обученный на смешанных типах образцов клеток, исключает мелкие или необычные по форме материалы DAPI и крупные скопления клеток.
- **Дольчатые клетки.** Классификатор, обученный на типах образцов многодольчатых клеток, исключает простые фоновые посторонние вещества, крупные неsegmentированные скопления и клетки, имеющие преимущественно круглую форму.
- **Круглые клетки.** Классификатор, обученный на типах образцов круглых клеток, исключает простые фоновые посторонние вещества, крупные неsegmentированные скопления и клетки, имеющие преимущественно дольчатую форму.



Остановить запись после (Остановка подсчета при автоматической записи)

Система сканирования GSL будет работать до тех пор, пока все кадры в области сканирования не будут автоматически записаны или пока не будет достигнут один из пределов остановки подсчета, установленных в анализе.



- **Кадры.** Устанавливает максимальное количество кадров для записи.
Используемое значение может быть установлено следующим образом:
 - в качестве «защиты от сбоев» при недостаточном количестве «информативных» объектов, выявляемых в процессе стандартной автоматической записи, для предотвращения чрезмерно длительного времени сканирования предметных стекол с малой плотностью клеток или неудачной гибридизацией;
 - для сканирования, когда требуется фиксированное количество записей в целях стандартизации или сравнения, например для проверки плотности клеток или качества зонда.
- **Информативность.** Данный параметр оценивается на основании общего количества всех объектов, прошедших отбор в соответствии с *классификатором клеток*.
 - Предполагается, что это стандартный критерий остановки подсчета, когда требуется фиксированное общее количество клеток в целях соответствия критериям последующего обзора или анализа.

Если в анализе заданы оба критерия остановки подсчета, автоматическая запись остановится при достижении первого из них; нулевое значение для любого параметра означает, что он не влияет на автоматическую запись.

- Остановка подсчета никоим образом не влияет на [ручную запись](#).

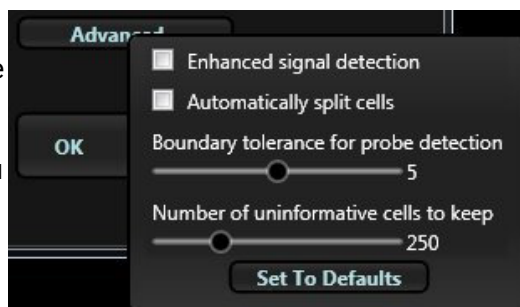
Дополнительно

Кнопка **Advanced** (Дополнительно) открывает диалоговое окно конфигурации дополнительных параметров для анализа.

- Функции **Boundary Tolerance for probe detection** (Граница толерантности для обнаружения зондом) и **Number of Uninformative cells to Keep** (Количество неинформативных клеток для сохранения) не используются для процедуры записи CytoVision DX.
- Потенциальное использование функций **Enhanced Signal Detection** (Оптимизированное обнаружение сигнала) и **Automatically Split Cells** (Автоматическое разделение клеток) приведет к увеличению числа объектов, классифицированных при обработке изображений; это может остановить автоматическую запись раньше при срабатывании остановки подсчета по достижении необходимого предела информативных клеток.

Оптимизированное обнаружение сигнала.

При включении данной функции меняются некоторые относительные шаблоны сравнения размера и интенсивности при обработке изображений, повышая вероятность того, что небольшие или слабые сигналы будут классифицированы как информативные.



Автоматическое разделение клеток.

При включении данная функция может разделить скопления объектов с контрастным красителем на два отдельных **информативных** объекта или более.

При использовании окна *выбора анализа* в рамках подсчета количества точек анализ сохраняется в списке системы по умолчанию при нажатии на **OK** для закрытия панели.

Сканирование и запись точек

Шаблон предметного стекла (Настройка сканирования)

Параметры создания шаблонов предметного стекла и сканирования аналогичны параметрам при обычном сканировании интерфаз.

- Подробную информацию см. в разделе [Шаблоны предметного стекла \(FISH\)](#).

Для образцов, полученных методом FISH, правила записи задаются на панели автоматической записи шаблонов предметного стекла путем выбора функции «Подсчет количества точек» в разделе **Capture Mode** (Режим записи), пункт «Список».

- **Объектив:** позволяет выбрать объектив, используемый для автоматической записи; для FISH оптимально 63-кратное увеличение (100-кратное увеличение не рекомендуется из-за уменьшенного поля обзора и сниженной интенсивности света).

AutoCapture

☒ Perform AutoCapture

Objective: 63X

Capture Mode: SpotCounting

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

Save Z-Stacks ☒

No SPOT assay selected

Select Spot assay

- Параметр **Autocamera setup** (Автоматическая настройка камеры) определяет, каким образом будут записываться изображения с высоким коэффициентом увеличения во время автоматической записи.
 - **Включено:** (Рекомендуется) Для каждого канала, предназначенного для записи, система выполняет автоматическую регулировку камеры (экспозиции), основываясь на интенсивности флуоресценции на изображении.
 - **Отключено:** Для каждого канала, предназначенного для записи, система использует фиксированные значения камеры из списка флуорохромов функции **Build List** (Создать список) («Сохранить по умолчанию» на панели настроек записи или с помощью отдельной утилиты **Fluorochrome Camera Calibration** (Калибровка камеры для записи флуорохромов) — не рекомендуется для стандартных процедур).

- **Настройка на основе контрастного красителя.** Улучшает расчет экспозиции в рамках функции **Autocamera Setup** (Автоматическая настройка камеры) для каналов флуорохромов, охватывая только области, содержащие флуоресценцию контрастного красителя (маскирующий слой DAPI), чтобы меньше подвергаться влиянию флуоресцирующих посторонних веществ за пределами клетки.
- **Настройка для зонда.** Улучшает расчет экспозиции в рамках функции **Autocamera Setup** (Автоматическая настройка камеры) с использованием расчета на основе размера каналов флуорохромов, чтобы меньше подвергаться влиянию ярких флуоресцирующих посторонних веществ.
- **Настройка с использованием среднего значения.** Записывает первые *n* кадров с использованием стандартного автоматического расчета экспозиции для получения среднего значения интегрирования флуорохрома для всех оставшихся кадров (не рекомендуется для стандартных процедур).
- **Сохранение карт срезов по оси Z.** Сохраняет каждое изображение стека флуорохрома вместе со слоем максимальной (комбинированной) проекции.
- Функция **Select Spot assay** (Выбор анализа точек) открывает панель выбора анализа для поиска подходящего анализа точек, который будет использоваться в качестве списка записи и инструмента для обработки изображений во время автоматической записи.
- **Список флуорохромов:** не доступен для выбора. Список записи и настройки флуорохромов задаются в разделе анализа точек и привязываются к функции *Создать список* флуорохромов по умолчанию.
- **Post Capture Options** (Действия после записи): не доступны для выбора. Подсчет количества точек создает данные изображений *списка кадров*, которые не используют функции обработки по пороговым значениям или пользовательские настройки.

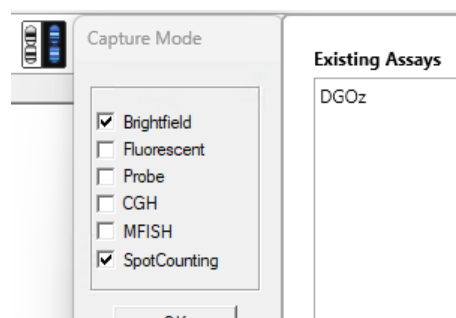
Примечание. Если на панелях **Fluorochrome list** (Список флуорохромов) или **Post Capture options** (Действия после записи) присутствуют какие-либо названия списков, это означает, что область сканирования ранее была настроена на режим Probe (Зонд) или ProbeAuto, для которых это необходимо.

- Рекомендуется создать новую область для процедуры подсчета количества точек, а не оставлять эти области пустыми.

Ручная запись

При ручном подсчете количества точек используется стандартный экран записи.

1. Нажмите на режим записи и выберите функцию подсчета количества точек, чтобы открыть диалоговое окно для выбора анализа.
2. Выберите или создайте анализ точек.
3. При выборе анализа список записи будет создан автоматически на основе стандартной функции *Создать список* для флуорохромов, определенных в ходе анализа.
4. Убедитесь, что на панели выбора флуорохромов указаны правильные флуорохромы. Настройки карт срезов по оси Z заимствуются из анализа, но могут быть изменены перед записью.
5. Убедитесь, что на панели записи *Customize* (Настройка) установлен параметр *Save Stacks* (Сохранение карт срезов), чтобы сохранять слои карты срезов по оси Z как отдельные изображения в финальном списке кадров.

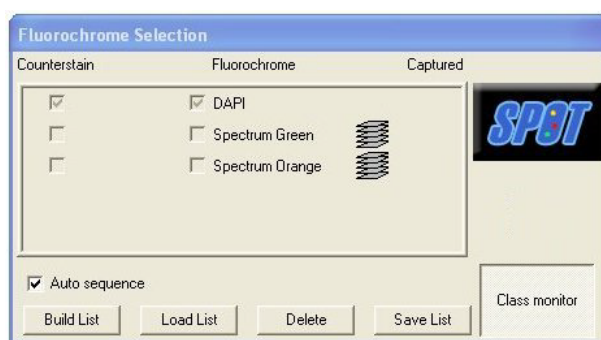


Выполняйте запись клеток в таком же порядке, как при стандартной [записи с помощью зонда](#).

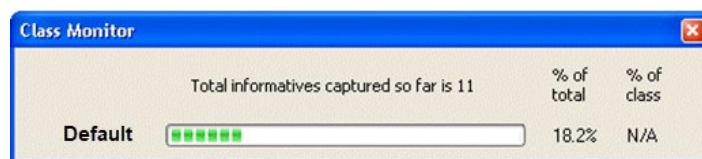
- Активируйте функции **Auto Sequence** (Автоматическая последовательность) и **Auto Camera Setup** (Автоматическая настройка камеры) и сделайте один или два снимка, чтобы получить правильные настройки камеры.
 - Тумблер **Auto Setup** (Автоматическая настройка) под изображением можно использовать для автоматического определения оптимальных настроек для предметного стекла.
 - После установки правильных настроек камеры включите функцию **Автоматическая последовательность**. Это более быстро, чем использовать функцию **Автоматическая настройка камеры** для каждого кадра.
- Изображения будут обрабатываться с помощью функции анализа по мере записи. Обработка по пороговым значениям отсутствует, необработанные данные используются для создания списка кадров в целях обработки изображений.
- По завершении записи переключитесь на экран анализа. Это завершит обработку клеток в списке кадров.

Запись и мониторинг класса

Когда начинается автоматическая или ручная запись по точкам, открывается панель **Fluorochrome Selection** (Выбор флуорохромов) для точек, на которой указаны названия флуорохромов, определенные в ходе анализа.



Нажмите значок **Class Monitor** (Мониторинг класса), чтобы открыть диалоговое окно мониторинга класса.



Общее количество информативных клеток, обработанных на данный момент, отображается в верхней части диалогового окна.

- Полоса показывает количество *информативных* клеток в процентах после остановки подсчета в соответствии с анализом.

Остановка автоматической записи ПО ТОЧКАМ

Автоматическая запись с помощью *CytoVision DX* GSL выполняется без необходимости настройки или вмешательства оператора.

Автоматическая запись остановится при выполнении одного из следующих условий:

- Достигнуто число **кадров** для активации функции «Остановить после...».
- Достигнуто число **информативных** клеток для активации функции «Остановить после...».
- Запись завершена для всех кадров в области сканирования.
- Кнопка **Стоп** нажата вручную.

Если не нажать кнопку **Стоп**, GSL перейдет к следующему предметному стеклу в партии и выполнит сканирование или автоматическую запись данного предметного стекла в соответствии с настройками.

См. [Примеры пошаговых процедур](#) для выполнения обработки предметного стекла с подсчетом количества точек в рамках [ручной записи](#) или полноценного [сканирования и автоматической записи](#).

Приложение: Tissue FISH

Обзор Tissue FISH

Функция Tissue FISH разработана для получения изображений предметных стекол Tissue FISH с помощью системы сканирования или аппаратного оборудования для записи с последующим просмотром или анализом изображений.

- Параметры сканирования позволяют вручную или автоматически выбирать области сканирования для записи.
- Данные списка кадров записываются с использованием режима автоматической записи *ProbeAuto* или приложения ручной записи с помощью зонда.

Запись с помощью списка кадров предназначена для использования с ДНК-зондами FISH, приложение не имеет функционала для работы с предметными стеклами с тканями ИГХ или иммунофлуоресцентными образцами.

- Функции лицензионного модуля *Tissue FISH* управляют доступом к дополнительным параметрам шаблонов предметного стекла в системе сканирования GSL и не предусматривают конфигураций для записи или анализа.
- Все функции записи представляют собой стандартные функции лицензионного программного обеспечения зонда.
- Специальных инструментов для вывода на экран, морфологии и анализа Tissue FISH не существует.

Сканирование и запись с помощью Tissue FISH

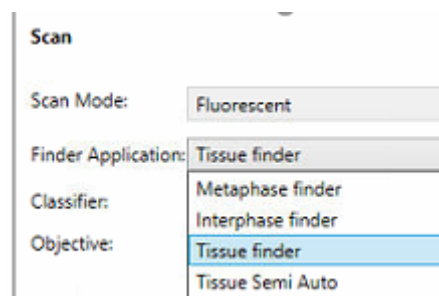
Существует 3 рабочих процесса конфигурации сканирования Tissue FISH, доступных через настройки на экране шаблона предметного стекла (см. ниже).

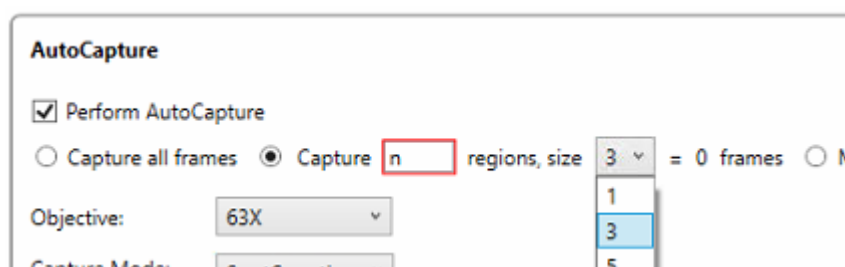
1. Автоматическое сканирование и автоматическая запись (режим Tissue Finder, автоматическая запись)
2. Автоматическое сканирование и ручная разметка областей (режим Tissue Finder, отложенная запись)
3. Выбор областей вручную (Tissue Semi Auto, отсутствие сканирования, автоматическая запись)

1) Автоматическое сканирование и автоматическая запись:

Использует приложение поиска **Tissue Finder** в составе шаблона предметного стекла.

- Дополнительное предварительное сканирование с 1,25-кратным увеличением по методу светлого поля для обнаружения травления области предметного стекла.
- Карта фокусировки с 10-кратным увеличением и сканирование кадров тканей, окрашенных DAPI.
- Автоматическая запись с помощью списка кадров для всех кадров или нескольких областей сетки в области сканирования/травления.

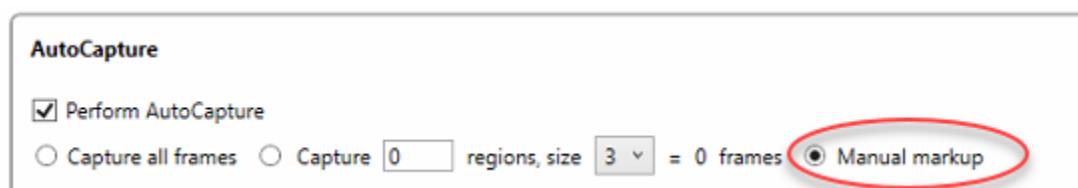
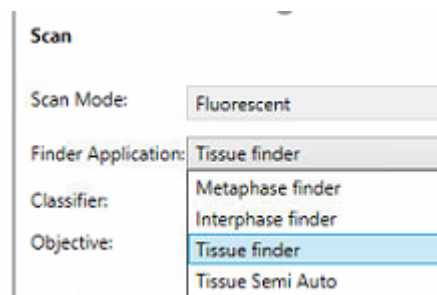




2) Автоматическое сканирование и ручная разметка областей:

Использует приложение поиска **Tissue Finder** в составе шаблона предметного стекла с отложенной автоматической записью на основе выбранных областей.

- Дополнительное предварительное сканирование с 1,25-кратным увеличением по методу светлого поля для обнаружения травления области предметного стекла.
- Карта фокусировки с 10-кратным увеличением и сканирование кадров тканей, окрашенных DAPI.
- Ручная разметка выбранных кадров или областей с использованием приложения [Tissue FISH Markup](#).
- Автоматическая запись с помощью списка кадров для всех кадров или нескольких областей сетки в области сканирования/травления.



Ручная разметка может быть использована только в шаблоне сканирования с единственной областью сканирования. При попытке создать несколько областей сканирования появится предупреждающее сообщение, и вы не сможете сохранить шаблон, пока не удалите дополнительные области.

3) Ручной выбор области для автоматической записи:

Используется приложение поиска **Tissue Semi Auto** в составе шаблона предметного стекла с процедурой индивидуальной разметки области (дополнительное предварительное сканирование по методу светлого поля для обнаружения травления области предметного стекла) в целях оценки и настройки областей для записи на основе *списка кадров* с помощью зонда ProbeAuto с высоким коэффициентом увеличения.

- Для данного рабочего процесса требуется подключить к системе USB-джойстик.
- Сканирование не выполняется, это интерактивный рабочий процесс, требующий просмотра предметного стекла под микроскопом или в формате интерактивного изображения в целях установки областей для последующей автоматической записи.

Ручная запись

Любая система *CytoVision DX* с конфигурацией зонда может использовать приложение ручной записи с помощью зонда для создания списка кадров.

- Ручная запись с помощью зонда может выполняться для отдельных изображений. Система сканирования использует опции автоматического создания кадров размером 3x3 и 5x5.

Травление предметного стекла

Сканирование предметных стекол Tissue FISH разработано для оптимальной обработки предметных стекол, размеченных маркером для травления/ручкой с алмазным наконечником, что позволяет автоматически определять область сканирования с помощью предварительного сканирования по методу светлого поля перед любыми процедурами сканирования и записи.

- Для достоверного обнаружения область травления предметного стекла должна быть четкой и непрерывной и располагаться на расстоянии от краев предметного или покровного стекла и любых излишков заливочной среды.
- Если в шаблоне предметного стекла настроено предварительное сканирование, а область травления не обнаружена, сканирование не будет продолжено.
- Если предметное стекло имеет несколько участков травления в области сканирования, они будут обнаружены и включены в список этапов автоматического сканирования и записи при предварительном сканировании.
- Также доступен параметр предварительного сканирования с использованием полуавтоматического сканирования (Semi-Auto), который применяется для ручного обнаружения областей и их вывода на экран предметных стекол.



Примечание. Маркер обычно не оставляет четкой темной контрастной линии и не рекомендуется для применения в целях достоверного и последовательного обнаружения.

При предварительном сканировании предметных стекол с травлением используется объектив с 1,25-кратным увеличением по методу светлого поля, поэтому для успешного выполнения данной процедуры требуется предварительная **Brightfield Scan Calibration** (Калибровка сканирования по методу светлого поля).

Tissue FISH Markup (Отложенная запись)

Разметка областей Tissue FISH — это функция ручного выбора области для использования в режиме сканирования Tissue Finder.

- Предметные стекла сканируются при 10-кратном увеличении согласно шаблону, установленному с помощью параметра «Ручная разметка» для автоматической записи.
- Сканы изображений доступны в приложении Tissue FISH Markup, которое предлагает комплексный обзор ткани с флуоресцентной подсветкой, позволяя пользователю создавать области для записи.
- Отложенная запись начинается с использованием стандартного режима *ProbeAuto* после того, как на всех предметных стеклах настроены области для автоматической записи.

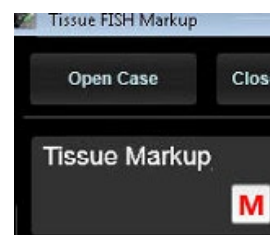


Приложение для просмотра **Tissue FISH Markup Viewer** используется при выборе областей для автоматической записи для предметных стекол, отсканированных с помощью функции автоматической записи Tissue Finder «Ручная разметка».

- Markup Viewer можно открыть непосредственно в системе сканирования, на экране настройки сканирования партии образцов: при этом предметное стекло, содержащее данные разметки, загружается в рамках рабочего процесса отложенной записи.
- Нажмите на красную букву «М» под предметным стеклом, чтобы перейти к экрану просмотра данного предметного стекла.

Markup Viewer можно открыть с помощью отдельного приложения, которое запускается на любой подключенной к сети системе *CytoVision DX*.

1. Чтобы открыть приложение, выберите **Start (Пуск) > All Programs (Все программы) > CytoVision DX > Tissue FISH Markup**.
2. На черном фоне появится кнопка «Открыть задание».
3. Нажмите на нее, чтобы открыть окно выбора заданий.
4. Найдите и откройте задание, достоверно содержащее сканы, используя функцию «Ручная разметка».
5. Все предметные стекла Tissue FISH Markup с данными сканирования с 10-кратным увеличением будут автоматически обновлены на экране — красная буква «М» означает, что области для автоматической записи не были настроены.
6. Нажмите на букву «М», чтобы открыть экран просмотра Tissue FISH Markup Viewer.

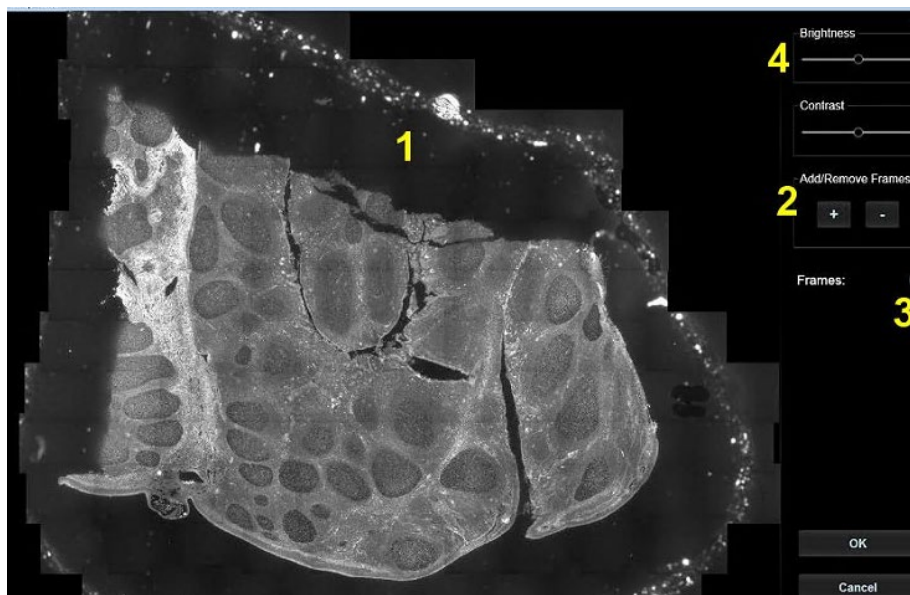


Если задание находится в процессе сканирования либо открыто в другой системе или в Markup Viewer, появится символ блокировки. Функцию мониторинга сканирования следует использовать для подтверждения завершения сканирования задания в активной партии сканирования, прежде чем приступить к процедуре разметки.

Экран Markup Viewer

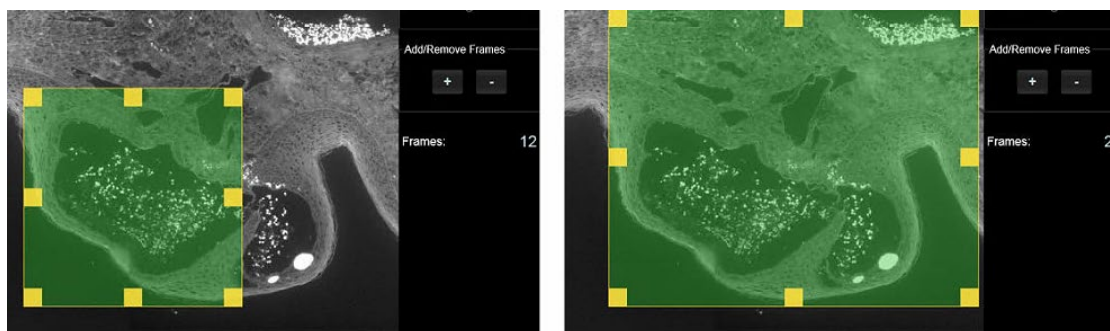
На экране Tissue FISH Markup Viewer отображается общий процесс сканирования Tissue Finder с 10-кратным увеличением с использованием инструментов добавления или удаления областей для автоматической записи.

1. **Scan Display** (Вывод на экран скана) составных изображений, полученных в результате флуоресцентного сканирования с 10-кратным увеличением.
 - Увеличение/уменьшение масштаба изображения с помощью колесика прокрутки мыши.
 - Перемещение вокруг увеличенного изображения путем перетаскивания с помощью любой из кнопок мыши.
2. **Добавление или удаление** областей для автоматической записи.
 - Выберите «+» и нажмите на изображение, чтобы установить область.
 - Выберите «+» и нажмите на существующую область, чтобы удалить ее.
3. **Вывод на экран кадров.**
 - После добавления области отображается номер кадра, указывающий ориентировочное число операций записи, заданных в рамках автоматической записи.
 - При изменении размера области на экране изображений это число будет увеличиваться или уменьшаться по мере того, как система выполнит повторный расчет положений для автоматической записи.
4. **Ползунки для улучшения изображения.**
 - Яркость и контрастность при необходимости регулируются для экрана просмотра при сканировании с 10-кратным увеличением, чтобы улучшить визуальную идентификацию областей для записи.



Пример рабочего процесса

- Используйте колесико прокрутки мыши, чтобы увеличить масштаб детализации до уровня, необходимого для определения областей для записи.
- Выберите значок «+», который будет выделен синим цветом.
- Нажмите левой кнопкой мыши на изображение, чтобы указать поле области, которая будет затенена зеленым цветом.
- Для изменения положения поля перетащите его в левую сторону, для изменения размера поля потяните его края влево.
 - Система рассчитывает количество полных и частичных кадров, полученных с помощью объектива с высоким коэффициентом увеличения и необходимых для охвата всей области.
 - Изменение размера приведет к изменению вывода кадров на экран, поскольку система выполнит повторный расчет.

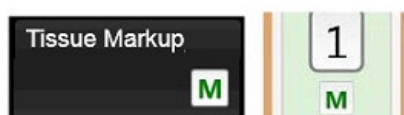


Аналогичным способом можно добавить несколько областей.

- Близкое расположение или перекрывание областей не позволит записать один и тот же кадр дважды, число кадров увеличится только в том случае, если потребуется записать новые полные кадры.
- Чтобы удалить область, выберите значок «-», а затем нажмите на область, которую необходимо удалить.

Нажмите ОК, чтобы закрыть окно приложения просмотра и вернуться к экрану Markup «Открыть задание» или экрану «Сканирование партии предметных стекол».

- Предметные стекла с измененными областями для записи теперь будут отмечены зеленой буквой «М».



Сразу после запуска отложенного сканирования начнется автоматическая запись. Предполагается, что для изображений из списка кадров будет использоваться режим *ProbeAuto*.

Приложение: Запись с помощью M-FISH

В соответствии с нижеприведенной информацией система *CytoVision DX* должна включать лицензионные модули *Probe* и *MFISH*, предусматривающие дополнительные настройки конфигурации для записи изображений методом M-FISH.

- Полученные изображения должны анализироваться системой, в которую также включен лицензионный модуль *Karyotype*.
- Процедуры анализа изображений M-FISH и кариотипирования см. в **Указаниях по эксплуатации *CytoVision DX* Karyotype**.

Введение в технику M-FISH

M-FISH представляет собой принятое сокращение термина **Multi-color** или **Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization** (многоцветная или мультиплексная флуоресцентная гибридизация *in situ*). Данная техника используется для 24-цветного кариотипирования хромосомных препаратов (также известного как *спектральное кариотипирование*, или *SKY*).

Это комбинаторная техника FISH, при которой смесь для зонда содержит комплект красителей из библиотеки ДНК для каждой хромосомы в метафазе. Каждый комплект зондов для обнаружения хромосом маркируется уникальной комбинацией флуорохромов, которая при просмотре с фильтром при флуоресцентном освещении и обработке с помощью системы визуализации формирует отчетливый «цвет».

Данную технику можно использовать для классификации хромосом в рамках кариотипа и обнаружения перестроек хромосом.

- Нельзя использовать полный хромосомный набор M-FISH для выявления внутренних хромосомных перестроек, таких как инверсии, делеции или дупликации.
- Производные хромосомы не передают информацию о p- или q-плечах напрямую.

M-FISH — это сложная экспериментальная техника, требующая обширного лабораторного опыта использования FISH и уверенного владения компонентами микроскопа.

- Правильные фильтры для флуоресцентной визуализации и объективы Plan-Fluor или Plan Apo либо эквивалентные так же важны, как и программное обеспечение системы визуализации.

В имеющихся в продаже комплектах зондов M-FISH используется контрастный краситель DAPI с 5 дополнительными флуорохромными метками, что позволяет получить 31 возможную комбинацию ($2^5 - 1$), при том, что обычно их используется всего 24.

- В комплектах зондов M-FISH часто применяются сходные, но не обязательно одинаковые флуорохромы. Кроме того, фильтры, используемые для одного комплекта, могут оказаться неоптимальными для другого.
- Возможно, потребуется приобрести дополнительные фильтры или модифицированные версии фильтров, используемых в стандартной работе с FISH, чтобы снизить риск проникновения света с других этикеток на предметном стекле.
- Фильтры для M-FISH обычно должны быть узкополосными либо с максимальным возбуждением или эмиссией, рассчитанными на работу с другими флуорохромами образца, а не просто наиболее эффективными для конкретного флуорохрома.

Обзор процедуры записи

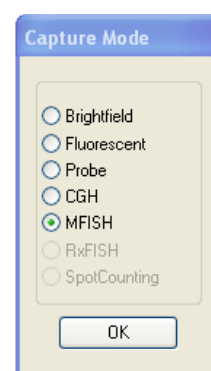
Запись M-FISH основана на стандартной процедуре записи с помощью зонда без применения функции ручной обработки по пороговым значениям; при этом выполняется автоматическая фоновая обработка необработанных данных.

- Прежде чем приступить к настройке и записи методом M-FISH, необходимо ознакомиться с элементами управления экраном и операциями записи.
- M-FISH представляет собой ручную технику записи, и ее нельзя использовать в рамках автоматизированного рабочего процесса сканирования и автоматической записи в системе сканирования CytoVision.
- Ручная запись системой сканирования *CytoVision DX* возможна с помощью функции перемещения метафаз. См. **Указания по эксплуатации кариотайпера CytoVision DX**.

Настройка записи

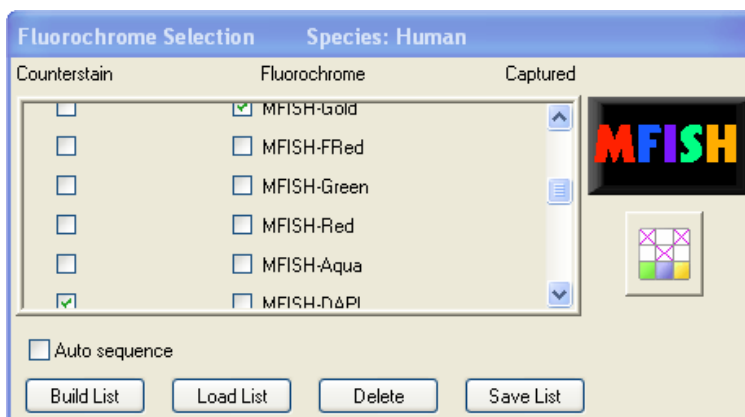
Щелкните значок **Capture Mode** (Режим записи) на стандартном экране записи и выберите M-FISH.

- Откроется панель выбора флуорохромов.
- Если вы ранее создали и сохранили список записи M-FISH, загрузите его, в противном случае создайте новый список, используя стандартные функции создания списка для зонда.



Список записи

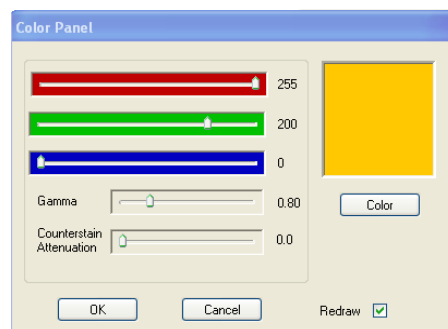
Список записи на панели **Fluorochrome Selection** (Выбор флуорохромов) должен быть создан в соответствии с порядком записи, причем последним каналом должен стать контрастный краситель.



Рекомендуется использовать специально созданные для M-FISH названия флуорохромов с определенными настройками цвета, чтобы улучшить наложение цветов в анализе.

Точные цвета зонда могут быть изменены, однако рекомендованы следующие настройки цвета для флуорохромов:

Цвет Fluo	КРАСНЫЙ	ЗЕЛЕНый	СИНИЙ
DAPI	63	63	63
Aqua/DEAC	0	145	255
FITC/Green	0	220	0
Gold/Cy3	255	200	0
Red	255	0	0
FRed/Cy5	0	0	255
Cy5.5	0	145	255
Aqua/DEAC и Cy5.5 обычно не используются вместе			



Fluomap

После подготовки нового списка записи необходимо настроить Fluomap. Это уникальные комбинации флуорохромов, содержащиеся в используемом комплекте зондов и настраиваемые для создания классификаций M-FISH в целях идентификации хромосом и кариотипирования.



- Нажмите на соответствующие поля под каждым классом хромосом, чтобы задать комбинации зондов. При этом появятся крестики.
- Функция Fluomap должна соответствовать конкретному комплекту зонда, с которым вы работаете.
- Примеры ниже приведены только для справочных целей и содержат предыдущие комбинации зонда M-FISH, которые могли использоваться в определенный момент.

	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 (Поддержка прекращена)

	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 – Поддержка прекращена)

	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	X
MFISH-Red			X					X		X			X	X	X			X		X	X		X	X
MFISH-DEAC		X					X			X			X	X		X			X	X	X		X	X
	Red	Green	Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Gold	Teal	Purple	Red	Light Green	Light Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Gold	Teal	Purple

24XCyte Вариация-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	X
MFISH-Red			X					X		X			X	X	X			X		X	X		X	X
MFISH-DEAC		X					X			X			X	X		X			X	X	X		X	X
	Red	Green	Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Gold	Teal	Purple	Red	Light Green	Light Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Gold	Teal	Purple

24XCyte Вариация-2

После создания Fluомар нажмите **Done** (Готово), а затем сохраните Fluомар вместе со списком записи, используя функцию **Save list** (Сохранить список) в окне выбора флуорохромов.

Хотя названия флуорохромов в разных комплектах зондов отличаются, их спектральные свойства эквивалентны. Стандартный комплект узкополосных фильтров для M-FISH может быть следующим:

- DAPI (стандартный)
- Спектральный фильтр Aqua (для Aqua или DEAC)
- Спектральный зеленый фильтр для цвета Green, FITCand
- Спектральный золотой (желтый) фильтр для цвета Gold, Orange, Cy3, TRITC.
- Спектральный красный фильтр для цвета Red, Texas Red или Cy3.5
- Спектральный фильтр FRed для цвета Far Red или Cy5

Фильтры и микроскопия

Если вы используете уже имеющиеся фильтры для микроскопа, убедитесь, что речь идет об узкополосных фильтрах, предотвращающих утечку сигнала, особенно для близких по цвету этикеток зонда, таких как Orange (Cy3) и Red.

- Комплекты зондов, использующие в комбинации Cy3/Orange и Texas Red/Cy3.5, должны быть снабжены фильтрами для этих 2 схожих цветовых каналов. Узкополосный спектральный фильтр золотого цвета следует использовать вместо широкополосного спектрального фильтра оранжевого цвета или комплекта фильтров TRITC.
- Не используйте базовые «зеленые», «оранжевые» или «красные» фильтры, которые можно приобрести у различных поставщиков фильтров: они повышают риск «утечки» цвета, что может препятствовать правильной обработке и классификации.

- В случае сомнений обратитесь к представителю службы поддержки Leica для проверки технических характеристик фильтров и зондов.

Во время работы с микроскопом рекомендуется максимально сократить воздействие более вредного ультрафиолетового света (используемого для контрастного красителя DAPI), поскольку ультрафиолетовый свет является универсальным возбудителем всех флуорохромов на предметном стекле, особенно Cy5/Far Red, которые могут быть подвержены обесцвечиванию.

- Как правило, один из других компонентов зонда (н-р, спектральный золотой/оранжевый фильтр) демонстрирует достаточную интенсивность сигнала для обнаружения клеток при низком коэффициенте увеличения для 1-го канала записи.
- После этого вы фиксируете сигнал наименьшей интенсивности Spectrum FRed (Cy5), затем (в произвольном порядке) Green, Red, Aqua и, наконец, контрастный краситель DAPI.
- По возможности следует использовать программное обеспечение для управления источником флуоресцентного света (Xylis/X-Cite 120 PC), чтобы снизить интенсивность света, попадающего на предметное стекло, и свести к минимуму любое фотообесцвечивание.

Запись изображений методом M-FISH

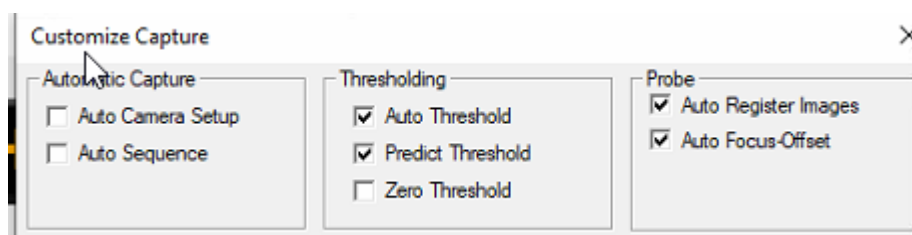
Пример процедуры, основанной на ручном просмотре с помощью микроскопа для идентификации клеток для записи.

Цель процедуры заключается в том, чтобы записать каждое изображение максимально эффективно, сократив все факторы, которые вызывают задержку процесса или удерживают флуоресцентный свет (особенно UV/DAPI) на предметном стекле дольше, чем это необходимо.

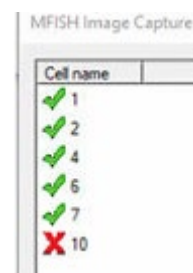
- По возможности следует использовать один из самых ярких каналов зонда, например, спектральный золотой, чтобы определить метафазы для записи.
- Far Red (Cy5) не виден для глаза, поэтому для определения экспозиции и фокусировки необходимо использовать интерактивное изображение, полученное с помощью камеры. Избегайте использования автоматической настройки для данного канала из-за длинных экспозиций.
- Если вместо этого используется DAPI, не направляйте свет на предметное стекло дольше, чем это необходимо для поиска и записи изображения, чтобы уменьшить фотообесцвечивание каналов зонда.
- Сканирование предметных стекол методом M-FISH с 10-кратным увеличением для создания списка предметных стекол в целях перемещения метафаз требует использования DAPI, поскольку ни один другой канал не обеспечивает достаточной интенсивности и детализации объектов для системы сканирования.

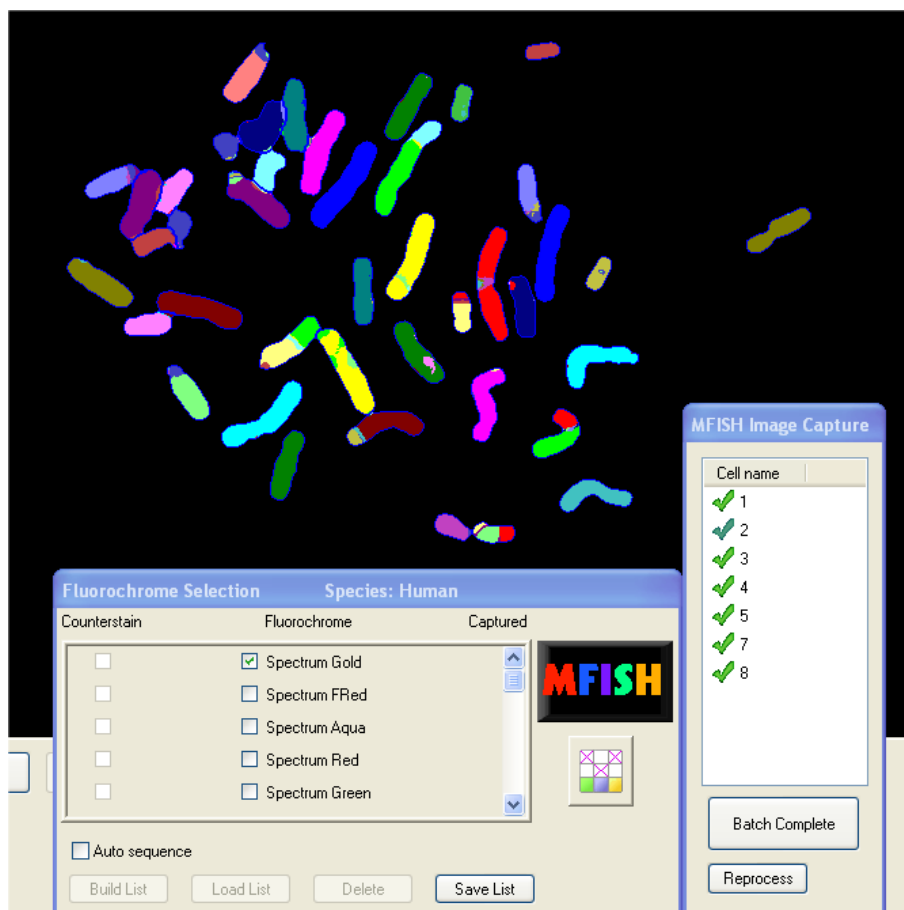
Параметры пользовательских настроек записи

- Автоматическая обработка по пороговым значениям должна быть включена; автоматическая настройка камеры должна быть отключена.
- При первой ручной записи необходимо определить необходимую экспозицию камеры с помощью функции «Автоматическая настройка» в главном окне изображения для каждого канала. Данное значение должно сохраняться при последующей записи. Использование автоматической настройки для канала Far-Red приведет к ненужным задержкам при расчете длинной экспозиции во время каждой процедуры записи.



1. Откройте или создайте задание в системе и перейдите на экран записи.
2. Визуально локализируйте клетки при низком увеличении с помощью **фильтра Gold**.
3. Переключитесь на 63- или 100-кратное увеличение и сделайте первую запись с фильтром Gold. Система автоматически выполнит обработку по пороговым значениям, и на экране появится сохраненное необработанное изображение.
4. После этого выполните запись канала Far Red/Cy5. Данный канал обычно имеет самую длинную экспозицию и может потребовать небольшого смещения фокуса между другими каналами.
5. Завершите запись остальных каналов и DAPI, как при обычной процедуре получения изображений с помощью зонда.
6. После записи последнего канала приложение начинает обработку клетки, а параметр «Новая клетка/Интерактивный режим» применяется к следующей клетке, готовой к повторной записи.
7. Через несколько секунд на панели *записи изображений методом MFISH* появится либо зеленая галочка, либо красный крестик.
- Красный крестик указывает на ошибку при обработке, как правило, возникающую из-за низкой или слабой флуоресценции или плохой контрастности. В этом случае выполните процедуру повторной обработки по пороговым значениям, описанную ниже, или повторно произведите запись клетки.
8. Когда все клетки будут обработаны, нажмите «Партия завершена» или перейдите на начальный экран, чтобы завершить обработку и создать изображения метафаз в целях анализа.





Примечание. Запись клеток с помощью других режимов записи на предметном стекле M-FISH невозможна.

Ручная обработка по пороговым значениям

При стандартной записи методом M-FISH настройка *автоматической обработки по пороговым значениям* предназначена для эффективной записи всех каналов и сохранения необработанных изображений каждого канала зонда, которые обрабатываются для создания метафаз в целях анализа.

☒ Auto Threshold

Данную настройку можно отключить на панели пользовательских настроек записи, чтобы разрешить ручную обработку по пороговым значениям для канала контрастного красителя во время процедуры записи в интерактивном режиме.

- Панель обработки по пороговым значениям во время записи канала контрастного красителя (DAPI).
- Выполните **удаление фона** на изображении: рекомендуется установить значение от 15 до 25 в зависимости от размера хромосом.
- После этого запустите обработку по пороговым значениям в обычном режиме — только для канала контрастного красителя доступны опции ручной обработки по пороговым значениям; каналы зондов по-прежнему обрабатываются автоматически.

Такой подход может быть использован для предотвращения потери или удаления мелких или светлых хромосом на этапе обработки по пороговым значениям, однако он не рекомендуется для стандартной записи, поскольку увеличивает задержки в ходе процесса.

Повторная обработка по пороговым значениям

Повторную обработку по пороговым значениям изображения с контрастным красителем можно выполнить с помощью панели обработки M-FISH после завершения записи.

Существует два случая, когда может потребоваться повторная ручная обработка клеток по пороговым значениям после выполнения обработки.

- Если клетка не прошла автоматическую обработку (красный крестик обычно появляется только при неудачной регистрации изображения, как правило, из-за одного или нескольких слабых компонентов или недостаточно контрастного DAPI).
- Если в результате автоматической обработки мелкие хромосомы или хромосомы, расположенные рядом с ядрами, подлежат удалению. Чаще всего это происходит при низком качестве изображения с контрастным красителем DAPI, поскольку система не может правильно получить полный маскирующий слой для всех хромосом в метафазе.



Процедура

1. Выберите клетку в окне **M-FISH Image capture** (Запись изображения методом M-FISH) (если обработка прошла неудачно, появится сообщение об ошибке).
2. Нажмите кнопку **Threshold** (Обработка по пороговым значениям) на главной панели инструментов на экране. Откроется стандартное окно обработки по пороговым значениям.
3. Выполните **удаление фона** на изображении: рекомендуется установить значение от 15 до 25 в зависимости от размера хромосом.
4. После этого выполните обработку по пороговым значениям в обычном режиме и нажмите Ассерпт (Принять). Система повторно обработает изображение, используя новый маскирующий слой DAPI.

Примечание. После повторной обработки одиночных клеток может оказаться невозможным загрузить метафазу из последней клетки на нужном предметном стекле. В таком случае перезапустите прикладное ПО и откройте задание заново, чтобы продолжить.

Повторная обработка

Функция повторной обработки может быть использована в любой момент после завершения записи методом M-FISH, чтобы сбросить все клетки на предметном стекле, удалив все имеющиеся изображения метафаз или кариотипа, и повторно обработать необработанные изображения.

- Откроется окно Fluomar, позволяющее изменить любую из комбинаций зондов (если первоначально при создании карты допущена ошибка, которая не была обнаружена до завершения записи).

Приложение: Примеры пошаговых процедур

Для всех примеров процедур убедитесь, что люминесцентная лампа и компоненты микроскопа активированы; включите GSL в системе сканирования и убедитесь, что в механизме подачи масла достаточно жидкости.

- При переключении между объективами с низким и высоким коэффициентом увеличения всегда используйте программные средства управления (панель объективов или функциональные клавиши).

Стандартная запись с помощью зонда



Пример процедуры ручной записи изображений методом FISH после ручной загрузки предметных стекол и идентификации клеток.

1. Откройте стандартный экран записи, выбрав значок экрана записи на главной панели инструментов.
2. Откройте или создайте задание и выберите предметное стекло в инструменте «Навигатор». Если вам нужно создать предметное стекло, щелкните правой кнопкой мыши по заданию и выберите в меню пункт **New Slide** (Новое предметное стекло).
3. Нажмите **Capture Mode** (Режим записи) и выберите **Probe** (Зонд). 
4. Настройте флуорохромы, которые вы будете использовать для записи, на панели выбора флуорохромов (Загрузить предварительно сохраненный список). 
5. Выберите параметры, которые вы хотите использовать, в разделе **Customize** (Пользовательские настройки) (Загрузить шаблон).
6. Нажмите **New Cell** (Новая клетка).
7. Нажмите **Live** (Интерактивный режим).
8. Сфокусируйте и центрируйте изображение.
9. (Необязательно) При наличии сильного контрастного красителя откройте панель интерфейса люминесцентной лампы и отрегулируйте процент интенсивности лампы на более низкое значение, чтобы уменьшить фотообесцвечивание под влиянием ультрафиолета. Фильтр DAPI. 
10. Нажмите **Auto Setup** (Автоматическая настройка). Настройки камеры оптимизируют контрастность изображения с учетом любых изменений фокуса или положения. 
11. Если не удастся настроить хорошую контрастность, откройте окно **Capture Setup** (Настройка записи) для выполнения регулировки:
 - ползунки (расширенных) автоматических настроек управляют выводом на экран автоматических настроек камеры;
 - ползунки **Black** (Черный) и **Bright** (Яркий) помогают улучшить контрастность изображения.
 Фон должен быть темным и равномерным. Если изображение выглядит плоским и светло-серым, возможно, подается слишком много света, нужно уменьшить уровень экспозиции.
12. Выполните **запись** изображения после настройки фокуса и продолжите процесс обработки по пороговым значениям.
13. Если включена функция **Auto Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям), изображение будет обработано, и запись продолжится.
 - В противном случае появится экран обработки по пороговым значениям.
 - Отрегулируйте обработку по пороговым значениям, чтобы устранить нежелательные фоновые помехи.

14. Если включена функция **Auto Sequence** (Автоматическая последовательность), система перейдет к следующему флуорохрому после обработки по пороговым значениям.
- В противном случае нажмите **Live** (Интерактивный режим), чтобы записать следующий флуорохром.
15. Повторяйте этапы 7–12, пока не будут записаны все флуорохромы.
- Если включены функции **Auto Camera Setup** (Автоматическая настройка камеры), **Auto Sequence** (Автоматическая последовательность) и **Auto Threshold** (Автоматическая обработка по пороговым значениям), система продолжит запись остальных флуорохромов.

Ручная запись с помощью зонда с использованием кадров изображений



Пример процедуры ручной записи изображений методом FISH после ручной загрузки предметных стекол и идентификации клеток.

1. Откройте или создайте задание и выберите предметное стекло в инструменте «Навигатор». Если вам нужно создать предметное стекло, щелкните правой кнопкой мыши по заданию и выберите в меню пункт **New Slide** (Новое предметное стекло).
2. Откройте экран ручной записи с помощью зонда, выбрав черный значок камеры на главной панели инструментов, который доступен только на начальном экране.
3. Настройте или загрузите список флуорохромов, которые вы будете использовать для записи.
4. Убедитесь, что контрастный краситель установлен, что каждый канал имеет правильный цвет, а назначение фильтра и настройки карты срезов по оси Z выбраны правильно.
5. Выберите компонент контрастного красителя; при открытом затворе, отсекающем излучение флуоресценции, ползунок экспозиции может быть отрегулирован, если это необходимо для просмотра интерактивного изображения.
6. Настройте фокус и расположите изображение необходимым образом.
7. Убедитесь, что установлен флажок **Auto Exposure** (Автоматическая экспозиция), и нажмите кнопку **Capture** (Запись)
 - Оптимальная экспозиция камеры рассчитывается для контрастного красителя, и выполняется автоматическая запись изображения.
 - После перемещения фильтров оптимальная экспозиция камеры автоматически рассчитывается для первого канала зонда, и выполняется запись изображения.
 - Оставшиеся каналы автоматически записываются в определенной последовательности.
8. Повторите этапы 5–7 для каждого нового изображения.

Альтернатива: **Запись** с автоматической настройкой экспозиции на основе выбранной области.

9. Выберите компонент контрастного красителя, нажмите на область интерактивного изображения, чтобы автоматически настроить экспозицию камеры, используя информацию только в данной области.
10. Настройте фокус и расположите изображение необходимым образом.
11. Нажмите кнопку **Capture** (Запись)
 - Оптимальная экспозиция камеры заново рассчитывается для контрастного красителя на основании выбранной области, и выполняется автоматическая запись изображения.

- После перемещения фильтров оптимальная экспозиция камеры в выбранной области автоматически рассчитывается для первого канала зонда, и выполняется запись изображения.
- Оставшиеся каналы автоматически записываются в определенной последовательности.

12. Повторите этапы 9–11 для каждого нового изображения.

Альтернатива: Функция **Запись** (без автоматической настройки)

13. Выберите компонент контрастного красителя, при необходимости отрегулируйте ползунок экспозиции вручную или нажав на выбранную область интерактивного изображения.
14. Настройте фокус и расположите изображение необходимым образом.
15. Выберите следующий канал и после перемещения фильтра отрегулируйте ползунок экспозиции вручную или нажав на выбранную область интерактивного изображения.
16. Повторите для оставшихся каналов, выполнив предварительную настройку оптимальной экспозиции интерактивного изображения для каждого компонента в списке записи.
17. Убедитесь, что установлен флажок **Auto Exposure** (Автоматическая экспозиция), и нажмите кнопку **Capture** (Запись)
 - Изображение контрастного красителя будет записано немедленно, а после перемещения фильтров — каждый канал флуорохромов без регулировки экспозиции камеры.
18. Повторяйте этапы 13–17 для каждого нового изображения (при необходимости повторно регулируйте экспозицию на этапах 15 и 16 для последующих изображений).

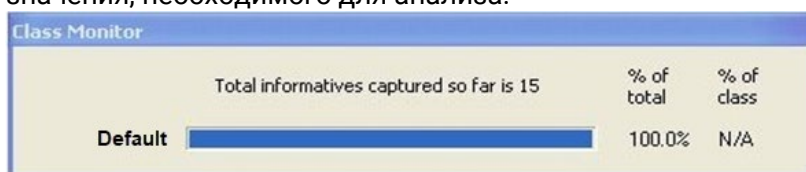
Ручная запись по точкам



Пример процедуры записи изображений с подсчетом количества точек.

1. Откройте стандартный экран записи, выбрав значок экрана записи на главной панели инструментов.
2. Откройте или создайте задание и выберите предметное стекло в инструменте «Навигатор». Если вам нужно создать предметное стекло, щелкните правой кнопкой мыши по заданию и выберите в меню пункт New Slide (Новое предметное стекло).
3. Нажмите **Capture Mode** (Режим записи) и выберите *Spot Counting* (Подсчет количества точек). 
4. Откроется окно **Existing Assays** (Имеющиеся анализы). Выберите анализ, подходящий для предметного стекла, и комплект зонда, и нажмите ОК, чтобы назначить его для данного предметного стекла.
5. Убедитесь, что настройки флуорохрома на **Fluorochrome Selection Panel** (Панель выбора флуорохромов) соответствуют предметному стеклу и зондам для записи.
6. Убедитесь, что в окне **Customize** (Пользовательские настройки) выбраны опции **Auto Camera Setup** (Автоматическая настройка камеры) и **Save stacks** (Сохранять стеки).
7. С помощью горячей клавиши клавиатуры (цифра) перейдите к нужному фильтру контрастного красителя и откройте затвор, отсекающий излучение флуоресценции.
8. Вручную найдите область, содержащую клеточный материал, и выберите объектив для записи с высоким коэффициентом увеличения, используя панель *Объективы*. Настройте фокус камеры и направьте максимум света.
9. Нажмите **New Cell** (Новая клетка).
10. Нажмите кнопку **Live*** (Интерактивный режим). Изображение выводится на экран, а экспозиция камеры регулируется для оптимальной контрастности.

11. (Необязательно) При наличии сильного контрастного красителя откройте панель интерфейса люминесцентной лампы и отрегулируйте процент интенсивности лампы на более низкое значение, чтобы уменьшить фотообесцвечивание под влиянием ультрафиолета. Фильтр DAPI. 
12. Отрегулируйте фокус и расположение клеток на интерактивном изображении. Функция автоматической настройки может использоваться, если при этом меняется контрастность или насыщенность. При необходимости откройте окно **Capture & Fluorochrome Setup** (Запись и настройка флуорохромов) и проведите регулировку:
 - ползунки Black (Черный) и Bright (Яркий) помогают улучшить контрастность изображения;
 - ползунки (расширенных) автоматических настроек можно перемещать, если необходимо улучшить контрастность при автоматической настройке.
13. Повторно проверьте фокусировку изображения и нажмите **Capture (Запись)**. Изображение будет сохранено.
14. Если функция **Auto Sequence** (Автоматическая последовательность) включена, система будет последовательно* записывать оставшиеся флуорохромы, автоматически регулируя экспозицию камеры и фиксируя плоскости карты срезов по оси Z, настроенные в рамках анализа.
15. Если функция **Auto Sequence** (Автоматическая последовательность) отключена, нажмите кнопку **Live*** (Интерактивный режим) для записи следующего флуорохрома и повторяйте шаги 10–13, пока не будут зафиксированы все флуорохромы.
16. Выберите **Class Monitor** (Мониторинг класса) в нижней части окна выбора флуорохромов, чтобы увидеть, сколько клеток было обработано и оценено в результате записи.
17. Повторяйте шаги 9–12 (13) для записи последующих изображений в разных областях предметного стекла до тех пор, пока показатель «Total informatives...» («Всего информативных...») функции **Class Monitor** (Мониторинг класса) не достигнет значения, необходимого для анализа.



18. Перейдите на экран **Analysis** (Анализ), чтобы завершить запись и обработку.

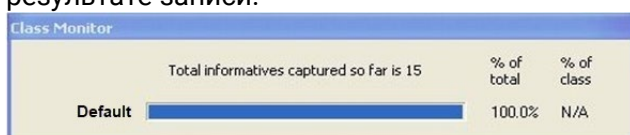
* Вам будет предложено сменить фильтры, если у вас нет активного интерфейса с дихроичной головкой микроскопа.

GSL: Автоматический подсчет количества точек

Пример процедуры сканирования и автоматической записи изображений интерфейсом методом FISH с подсчетом количества точек, выполняемой системой сканирования GSL без этикеток со штрихкодом.

1. Перейдите на экран **Scan** (Сканирование), чтобы приложение могло подключиться и переместить оборудование в исходное положение. 
2. (Необязательно) Загрузите предметное стекло на предметный столик и выполните процедуру ручной записи по точкам для нескольких изображений, чтобы подтвердить значения камеры, фильтра и карты срезов по оси Z.
 - Это создаст кадр изображения, который позволяет оценить параметры анализа на контролируемом наборе изображений. 
 - По завершении процедуры выгрузите лоток и очистите от масла предметное стекло, если оно будет повторно использоваться для сканирования.

3. На экране сканирования выберите значок **Scan batch of slides** (Сканировать партию образцов).
4. Нажмите и выделите значок предметного стекла 1 (позиция 1, лоток 1).
 - Выберите задание, в котором будут сохранены данные изображений.
 - Выберите подходящий шаблон сканирования для предметного стекла.
5. (Необязательно) Вы можете дать название каждому предметному стеклу, нажав на этикетку на его матированном крае.
6. Отредактируйте шаблон, убедившись, что он настроен на значения «Флуоресцентный» и «Поиск интерфейсов» и что выбран режим записи **Spot Counting** (Подсчет количества точек).
7. Нажмите кнопку **Select SPOT Assay** (Выбрать анализ точек), чтобы открыть диалоговое окно **Existing Assay** (Имеющийся анализ).
 - Выберите анализ из списка или создайте новый анализ, подходящий для данного предметного стекла.
 - Подтвердите настройки анализа и нажмите **OK**, чтобы назначить выбранный анализ.
8. Шаблон сканирования готов к использованию, нажмите **OK**, чтобы назначить его для выбранного предметного стекла.
9. Поместите предметное стекло с правильным образцом (соответствующим заданию, выбранному на этапе 5) в положение 1 на лотке.
10. Выберите значок следующего предметного стекла и назначьте ему задание и шаблон сканирования. Добавьте соответствующее предметное стекло с образцом в лоток и проверьте, правильно ли оно размещено.
11. Повторите этапы для оставшихся предметных стекол и положений, которые будут использоваться для первого лотка. Загрузите лоток в первое (самое нижнее) положение в укладчике/кассете.
12. Повторите данный этап для максимум 5 предметных стекол в лотке 2, загружая лоток в следующее (самое нижнее) положение в укладчике/кассете. Клавиша **Ctrl** или **Shift** позволяет выбрать несколько предметных стекол с помощью мыши и назначить для них одно и то же задание или шаблон.
 - При использовании системы GSL 120 повторите данную процедуру для всех оставшихся предметных стекол и лотков, которые будут использоваться, затем поместите кассету в укладчик и закройте дверцу.
13. Выберите функцию **Scan** (Сканирование): при этом начнется сканирование первого предметного стекла с 10-кратным увеличением для поиска клеток, будет автоматически подано масло, а затем выполнена запись с высоким коэффициентом увеличения.
14. Во время записи на экране будет отображаться стандартный экран записи в режиме **Spot Counting** (Подсчет количества точек) (подробные сведения см. в разделе [Автоматическая запись по точкам](#)).
15. (Дополнительно) Нажмите кнопку мониторинга класса в нижней части окна выбора флуорохромов, чтобы увидеть, сколько клеток было обработано и оценено в результате записи.



16. Когда будет достигнута первая остановка подсчета в соответствии с анализом, запись завершится. Система перейдет к следующему предметному стеклу, повторяя процедуры сканирования, подачи масла и автоматической записи до тех пор, пока обработка всех предметных стекол не будет завершена.

