

Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives



*CytoVision** DX (9.0) Probe

*Enregistré au bureau des Brevets et Marques déposées US et dans d'autres juridictions de par le monde.

Instructions d'opération



CytoVision DX Version 9.0 est conçu pour le diagnostic in vitro.

Mode d'emploi de *CytoVision** DX Probe

Le présent manuel s'applique aux systèmes de numérisation et d'acquisition *CytoVision DX* et au logiciel-application *CytoVision DX* version 9.0.

Notice de copyright

© 2024 Leica Biosystems Richmond, Inc. Tous droits réservés.

LEICA et le logo Leica sont des marques déposées de Leica Microsystems IR GmbH.

CytoVision est la marque déposée de Leica Biosystems Richmond, Inc. Toutes les marques tierces sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

*Enregistré au bureau des Brevets et Marques déposées US et dans d'autres juridictions de par le monde.

Les informations contenues dans le présent document peuvent être modifiées sans préavis et ne constituent pas un engagement de la part de Leica Biosystems Richmond, Inc.

Aucune partie de ce manuel ne peut être copiée ou distribuée, transmise, transcrite, stockée dans un système d'extraction, ou traduite en langage humain ou informatique, sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit, électronique, mécanique, magnétique, manuel ou autre, ou divulguée à des tiers sans l'autorisation expresse de Leica Biosystems Richmond, Inc, 5205 Route 12, Richmond, IL 60071, États-Unis.

Les systèmes *CytoVision DX* sont produits et distribués par :



Leica Biosystems Richmond, Inc.
5205 Route 12



Richmond, IL 60071, États-Unis
États-Unis.

Tél. : 1 (800)-537-4669

Contact

Visiter www.LeicaBiosystems.com pour obtenir les coordonnées de votre revendeur et support technique Leica Biosystems le plus proche.

Table des matières

Avertissements et remarques	6
Introduction	7
Ressources	7
Identification des symboles	8
Mises en garde et précautions	8
Spécifications des échantillons et des lames	9
Présentation de CytoVision DX Probe	10
Numérisation de lames FISH	10
Acquisition & Affichage des images FISH	11
Affichage et analyse d'images FISH	11
Types d'images et de données FISH	12
Connexion de l'utilisateur & Démarrage du logiciel-application	14
Numérisation des lames en interphase	15
Procédure de démarrage rapide	15
Slide Templates (Modèles de lames)	15
Classificateurs	15
Options d'acquisition automatique (Auto Capture)	15
Charger les lames et les plateaux	16
Numériser un lot de lames (Interphase)	18
Configuration de la numérisation manuelle	19
Affectation des dossiers et des modèles	19
Procédure de configuration manuelle de la numérisation	20
Lecture de code-barres	22
Configuration de l'affectation des lames	22
Procédure de lecture de codes-barres	23
Modèle de lames (FISH)	24
Zone de numérisation	24
Pré-numérisation	25
Numérisation	25
AutoCapture (Acquisition automatique)	26
Affichage et réglage de l'image	29
Examen des listes d'interphase	30
Notes View (Affichage Notes) (Interphase)	31
Slide View (Affichage Lame) (Interphase)	32
Classificateurs de numérisation	33
Auto Capture (Acquisition automatique)	36
Auto Capture (Acquisition automatique)	36

Acquisition Probe (Probe Capture) (images des cellules)	38
Contrôle de l'objectif	38
Acquisition Probe : Présentation de la procédure	39
Commandes d'acquisition	39
Capture lists (Listes d'acquisition).....	40
Configuration de l'acquisition et des fluorochromes.....	41
Personnaliser l'acquisition.....	44
Seuil	46
Seuillage automatique	47
Re-seuillage des images brutes	47
Probe Capture (Acquisition Probe) (Framelist)	48
Commande des objectifs	49
Framelist Capture (Acquisition framelist) : Présentation de la procédure	49
Options de configuration de l'acquisition :	50
Ajout de canaux	50
Configuration d'un canal.....	50
Utilisation des listes d'acquisition (Capture Lists)	53
Acquisition d'images	53
Fin de l'acquisition	54
Affichage d'image Probe	55
Affichage à l'écran	55
Dépannage	58
Système d'acquisition	58
Erreurs de connexion au microscope.....	58
Effet de la qualité de la lumière du microscope.....	58
Système de numérisation GSL	58
Erreurs de connexion au GSL.....	58
Problèmes de mise au point de la numérisation en 10x.....	59
Problèmes relatifs à la classification de la numérisation 10x.....	59
Problèmes de mise au point de l'acquisition 63x	59
Problèmes d'acquisition des canaux de la sonde	60
Compatibilité des lames / plateaux.....	60
Exporter les journaux de diagnostic	61
Annexe : Spot Counting	61
Présentation du Spot Counting	61
Spot Counting Assay (Test de comptage des spots)	62
Modifier des tests pour l'acquisition des spots (Spot Capture)	64
Spot Scan and Capture (numérisation et acquisition des spots)	66
Modèle de lame (Paramètres de numérisation).....	66

Manual Capture (Acquisition manuelle).....	67
Acquisition et moniteur de classe.....	68
Arrêter l'acquisition automatique SPOT.....	68
Annexe : Tissue FISH	70
Présentation de Tissue FISH.....	70
Numérisation et acquisition de Tissue FISH.....	70
1) Numérisation automatique et acquisition automatique :	70
2) numérisation automatique et marquage manuel d'une région :	71
3) Sélection manuelle d'une région pour l'acquisition automatique :.....	71
Acquisition manuelle.....	71
Gravure des lames.....	72
Tissue FISH Markup (acquisition différée).....	73
Écran Markup Viewer	73
Annexe : M-FISH Capture	76
Introduction à la technique M-FISH	76
Aperçu de l'acquisition	77
Capture Setup (Configuration de l'acquisition)	77
Liste d'acquisition.....	77
Fluomap.....	78
Filtres et microscope.....	79
Acquisition d'images M-FISH.....	80
Seuillage manuel	82
Re-seuillage.....	82
Retraitement.....	83
Annexe : Exemples de procédures détaillées.....	84
Acquisition Probe standard	84
Image Frame Acquisition Probe manuelle	85
Acquisition manuelle Spot.....	86
GSL : Automatic Spot Counting (Comptage automatique des spots)	87

Avertissements et remarques

Bien que tous les efforts aient été déployés pour assurer l'exactitude des informations, des différences peuvent subsister entre certains détails et certaines illustrations et les différentes variantes des systèmes individuels.

Il est possible que toutes les catégories ne s'appliquent pas à la configuration de l'utilisateur final.

Spécifications et performances

Pour les caractéristiques du produit et des composants, veuillez consulter le document **Spécifications de CytoVision DX**.

Installation du matériel

Tous les composants matériels du système de numérisation et d'acquisition *CytoVision DX* sont fournis pour être installés uniquement par Leica Biosystems ou ses représentants agréés.

Installation du logiciel-application

Les stations de travail PC fournies par Leica Biosystems sont pré-installées avec le logiciel-application. Pour obtenir des instructions spécifiques sur l'installation de l'application sur un PC séparé, veuillez consulter le document **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

Formation

Le présent manuel ainsi que le **Guide d'utilisation de CytoVision DX** viennent compléter la formation de l'opérateur et les autres instructions avancées mises à disposition par Leica Biosystems ou ses représentants agréés.

Maintenance et dépannage

Pour obtenir plus d'informations sur la résolution des problèmes liés à la numérisation et à l'acquisition, consultez le chapitre **Dépannage**.

Pour obtenir plus d'informations sur la maintenance générale du système et les problèmes de dépannage, consultez le document **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

Réparation

Les réparations ne peuvent être effectuées que par un représentant agréé de Leica Biosystems. Après toute réparation, demandez au technicien d'effectuer les vérifications nécessaires pour s'assurer que l'appareil fonctionne comme prévu.

Cybersécurité

Veuillez noter que les stations de travail sont sensibles aux programmes malveillants, aux virus, à la corruption des données et aux violations de la confidentialité. Pour voir les directives de cybersécurité de l'utilisateur final, consultez le document **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

Travaillez avec votre administrateur informatique pour protéger les stations de travail en respectant les politiques de votre institution en matière de sécurité et de mot de passe. Pour des instructions spécifiques et des recommandations sur la protection de vos stations de travail et serveurs, voir le document **Spécifications de CytoVision DX** ; section *Administration du réseau*.

Sécurité

Les dispositifs de sécurité pourraient être compromis si cet appareil est utilisé de manière contraire aux spécifications du fabricant.

Pour plus d'informations sur le fonctionnement et la sécurité du système, consultez le document **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

Introduction

Le système **CytoVision DX** est un système qualitatif automatisé de création et de visualisation des lames numériques.

Le système CytoVision DX est conçu pour le diagnostic in vitro en tant qu'aide à un technicien qualifié pour examiner et interpréter les images numériques de chromosomes métaphasiques provenant du sang périphérique et de la moelle osseuse.

- Le système CytoVision DX aide à localiser les noyaux en interphase et en métaphase sur des lames de verre de microscope standard qui seraient autrement appropriées pour une visualisation manuelle en utilisant la microscopie conventionnelle à fond clair et en fluorescence.
- Il est de la responsabilité du technicien qualifié d'employer des procédures et des mesures de protection adéquates pour garantir la validité de l'interprétation des images obtenues à l'aide du système CytoVision DX.





Veillez à respecter les bonnes pratiques de laboratoire et autres politiques et procédures requises par votre établissement concernant la préparation, le traitement, le stockage et la purge des lames.

Cet appareil ne doit être utilisé qu'à cette fin et dans le strict respect des instructions données dans ce document et dans le **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

Ressources

Ressource	Description
Guide d'utilisation de CytoVision DX 23MAN9D03	Fournit des informations de référence et des instructions concernant l'étalonnage par l'utilisateur, la numérisation des lames, l'acquisition des images, l'affichage des images, la gestion de dossiers et de données, le dépannage et la maintenance.
Mode d'emploi de CytoVision DX Karyotyper 23MAN9D02	Contient des instructions concernant la numérisation des lames de métaphases, l'acquisition des images, l'affichage des images, l'analyse des chromosomes (caryotypage) et le dépannage de l'application.
Mode d'emploi de CytoVision DX Probe 23MAN9D01	(Le présent document) Contient des instructions concernant la numérisation de lames par fluorescence (FISH), l'acquisition des images, l'affichage des images, l'analyse des chromosomes (caryotypage) et le dépannage de l'application (le présent document).
Spécifications de CytoVision DX 23MAN9D03	Fournit des spécifications détaillées sur les options du produit <i>CytoVision DX</i> .

Identification des symboles

Symbole	Explication
	<p>AVERTISSEMENT, faisceau laser : protéger les yeux et la peau de toute exposition</p> <p>Rayonnement optique, ne jamais regarder droit dans le faisceau lumineux.</p>
	<p>ATTENTION : Danger de pincement : ne pas toucher les parties mobiles avec les doigts.</p>
	<p>Marquage CE de conformité</p>
	<p>Fabricant</p>

Mises en garde et précautions

Un système d'acquisition ou de numérisation fourni avec le microscope et les composants de numérisation motorisés est un instrument de précision qui doit être manipulé avec soin et ne doit être utilisé que par un personnel correctement formé. Il faut toujours éviter de soumettre le système à un impact soudain ou violent.

Pour en savoir plus, consultez le **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

Spécifications des échantillons et des lames

Caractéristique	Détails
Type d'échantillons	<p>La fonctionnalité <i>CytoVision DX Probe</i> est utilisée pour la détection et l'acquisition d'images de chromosomes métaphasiques, de noyaux cellulaires interphasiques et de tissus colorés par fluorescence.</p> <p>Les échantillons doivent être préparés à l'aide de techniques de culture et de préparation cellulaires reconnues et être présentés sur des lames de microscope en verre.</p>
Coloration des échantillons	<p>Le système est optimisé pour la coloration au DAPI des cellules en interphase.</p> <p>Les performances ne sont pas validées pour toutes les techniques possibles de coloration et de préparation des échantillons et sont directement liées à la qualité et à l'intensité de la coloration des échantillons et du bruit de fond sur la lame de microscope.</p> <p>Une intensité de coloration atypique ou un bruit fond élevé peuvent réduire l'efficacité de la recherche et de l'acquisition automatique des cellules et nécessiter une intervention supplémentaire de l'utilisateur.</p>
Spécifications des lames	<p>Type de lames : Lames de microscope en verre à bords carrés (verticaux).</p> <p>Dimensions des lames : Angles carrés à 90°, les dimensions comprises entre 75,1 et 76,1 mm de longueur ; 24,9 et 26,1 mm de largeur ; 0,9 et 1,2 mm d'épaisseur.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les lames dépassant ces dimensions peuvent ne pas s'adapter dans le plateau GSL et ne sont pas prises en charge par le système de numérisation. • Les lames de dimensions plus petites ou avec des coins à 45° (rognés) peuvent ne pas s'adapter dans le plateau GSL standard et doivent utiliser le plateau alternatif (biseauté) article 23GSL903XXX001 - ceci doit être spécifié lors de la commande du système. <p>L'utilisation de lames en matériau autre que le verre n'est pas recommandée, car elles risquent de ne pas s'adapter en toute sécurité dans le port d'insertion de la platine ou être soumises à des mouvements dans la platine, ce qui peut avoir une influence sur les performances du système et la qualité de l'image.</p>
Lamelle couvre-objet	<p>L'utilisation et le montage d'une lamelle en verre sont nécessaires pour l'imagerie en fluorescence.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Une épaisseur de la lamelle de 170 um (+/- 5 um) est optimale pour la précision optique avec des objectifs à immersion dans l'huile à fort grossissement. • La lamelle couvre-objet ne doit pas dépasser les bords de la lame de verre. La totalité de la lamelle couvre-objet et de l'étiquette doit être collée à la lame de verre. • Le milieu de montage des lamelles ne doit pas contenir de bulles d'air et doit pouvoir durcir avant d'être utilisé. <p>Le montage des lamelles ne doit pas empêcher les objectifs du microscope d'atteindre leurs positions focales par rapport à l'échantillon.</p>
Limites des lames	<p>Les lames colorées au DAPI doivent présenter une intensité de coloration brillante et à contraste élevé, visible par l'utilisateur lorsqu'il regarde à 10x à travers les oculaires du microscope, avec une protection contre la décoloration pour réduire le photoblanchiment.</p> <p>Une concentration ou une intensité réduite de la coloration DAPI sur la lame peut entraîner une diminution de la fiabilité de la mise au point de 10x et du fonctionnement de la numérisation ou des échecs de numérisation.</p>

Présentation de CytoVision DX Probe

Les instructions contenues dans ce Mode d'emploi traitent de la commande de l'application et des opérations spécifiques à la numérisation, à l'acquisition, à l'affichage et aux procédures de notation des lames FISH applicables aux systèmes CytoVision DX configurés pour le module logiciel sous licence **Probe**.

L'utilisateur doit se familiariser avec l'utilisation générale de l'application, les fonctions de l'écran, les commandes de l'interface matérielle, la gestion des dossiers, les fonctions d'affichage de l'écran et de l'image et les applications associées qui sont communes à tous les systèmes installés avec le logiciel-application *CytoVision DX*.

- Tout cela est détaillé dans le **Guide d'utilisation de CytoVision DX** :

Il est également fourni un Manuel d'utilisation supplémentaire contenant les instructions spécifiques à l'échantillon et au flux de travail concernant les procédures de numérisation, d'acquisition et de caryotypage des lames métaphasiques.

- Ces instructions sont détaillées le **Manuel d'utilisation de CytoVision DX Karyotyper** :

Toutes les décisions relatives à l'interprétation des images sont prises par l'utilisateur. Il n'y a pas d'exigence qualitative pour l'échantillon, cependant, les outils d'acquisition et d'affichage des images sont optimisés pour les images acquises à l'aide d'un objectif de microscope à immersion dans l'huile et à fort grossissement avec des échantillons colorés au DAPI affichant des sondes ADN colorées à l'aide d'ensembles de filtres de fluorescence à bande étroite adaptés à l'échantillon.

Numérisation de lames FISH

La numérisation et l'acquisition automatique des lames FISH utilisent les fonctions de recherche, de classification, de relocalisation et d'acquisition d'échantillons fluorescents du logiciel-application.

Avant toute numérisation automatisée et toute acquisition automatique ;

- Un **étalonnage de la numérisation en fluorescence** doit être effectuée pour l'intensité de la caméra et les décalages de mise au point entre les objectifs de numérisation et d'acquisition.
- Les modes *AutoCapture* (*acquisition automatique*) des modèles de lames utilisent les paramètres de fluorochromie et d'acquisition de l'écran **Capture Build List** (Créer une liste), **Save List** (Enregistrer une liste) ou **Customize Capture configuration** (Personnaliser la configuration d'acquisition). Ces paramètres doivent être définis et configurés avant toute numérisation automatisé et toute acquisition automatique.

Pour chaque type d'échantillon, il est recommandé d'utiliser le mode *Scan Finder* et *AutoCapture* (Détecteur de scan et Acquisition automatique) en fonction des exigences d'affichage prévues pour le type d'échantillon.

Type de lame	Pré-numérisation (1,25x)	Mode Finder (Fluorescence)	Mode AutoCapture	Formats d'image
FISH métaphase	S/O	Métaphase	Probe	Cell Folder
FISH interphase	S/O	Métaphase	Probe	Cell Folder
FISH interphase	S/O	Interphase	ProbeAuto / Spot Counting	Framelist
FISH des tissus	Etch detect	Tissus	ProbeAuto / Spot Counting	Framelist
M-FISH	S/O	Métaphase	S/O (Manuel uniquement)	Cell Folder

- Le mode *Tissue Finder* (Détecteur de tissu) nécessite le module sous licence **Tissue FISH**.
- L'acquisition *Spot Counting* (Comptage de spots) nécessite le module sous licence **Spot Counting** pour le traitement automatisé du signal des images FISH en interphase pendant l'acquisition des images.
- D'autres combinaisons de modes de numérisation et d'acquisition ne sont pas limitées pour l'utilisateur mais peuvent ne pas être optimales pour l'acquisition ou pour les exigences d'affichage ultérieures.

Un modèle de lames du système de numérisation GSL peut être défini avec plusieurs zones de numérisation se chevauchant sur la même lame - chaque zone de numérisation peut être définie pour un mode d'acquisition automatique en fluorescence différent - si l'affichage des images aux formats cell folder et framelist est nécessaire.

Acquisition & Affichage des images FISH

Les systèmes *CytoVision DX* utilisent 2 formats d'image dans lesquels les images FISH peuvent être sauvegardées pour un affichage ultérieur : **Cell folder** (dossier Cellule) et **Image Frame** (Fenêtre Image) (*Framelist*).

Type d'échantillons	AutoCapture (Acquisition auto)	Manual Capture (Acquisition manuelle)	Options d'acquisition
FISH métaphase	Probe	Probe (Cell)	Seuil
FISH interphase	Probe	Probe (Cellule)	Seuillage, Z-stack
FISH interphase	ProbeAuto	Probe (Frame)	Z-stack
FISH interphase	Spot Counting	Spot Counting*	Test ponctuel
MFISH (métaphase)	S/O	MFISH* (Cell)	S/O

* nécessite des modules logiciels sous licence supplémentaires

Affichage et analyse d'images FISH

Type d'images	Utilisation de l'analyse	Options d'analyse	Options d'affichage/sortie
Images Cell folder (Acquisition Probe standard ou M-FISH)			
Image brute	Re-seuillage	s/o	Exportation
Probe (FISH métaphase)	Affichage, création des métaphases*	Affichage Case View, Annotation	Exporter & Imprimer
Probe (MFISH*)	Affichage	Affichage Case View, Annotation	Exporter & Imprimer
Probe (FISH Interphase)	Affichage	Affichage Case View, Annotation	Exporter & Imprimer
Métaphase (MFISH*)	Segmentation & création d'un caryogramme*	Comptage et numérotation Case View. Annotation, affichage MFISH	Exporter & Imprimer

* Nécessite des modules logiciels supplémentaires sous licence (pour les options de caryogramme, voir le document **Mode d'emploi de Karyotyper**).

Images Framelist (Acquisition Probe-Auto ou Spot Counting)

Framelist	s/o	s/o	s/o
-----------	-----	-----	-----

Les images nécessitent l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'images distinct compatible avec le format « framelist ».

Types d'images et de données FISH

CytoVision DX utilise 2 formats d'image pour l'acquisition.

1. Les images des dossiers (cell folder) qui sont acquises à l'aide des options de l'écran d'acquisition standard.
2. Les lames Framelist qui sont acquises à l'aide des modes d'acquisition dédiés (Image Frame) Probe.

Avant de procéder à la numérisation ou à l'acquisition de lames FISH, il est important d'utiliser le mode d'acquisition le plus approprié pour déterminer les options d'affichage et d'analyse disponibles.

Probe (Cell folder).

Format cellulaire conçu pour les échantillons FISH en métaphase ou en interphase, avec affichage des images et interaction à l'aide des outils standard de l'écran de démarrage.

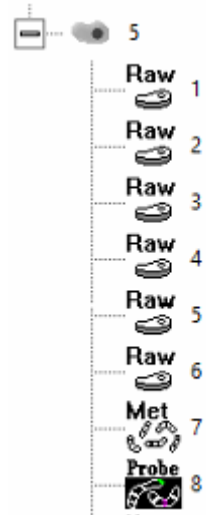
- Acquisition manuelle à l'aide du mode Probe de l'écran Capture.
- Acquisition automatique du système de numérisation à l'aide du mode d'acquisition Probe dans le modèle de lames.
- Les images brutes et en couleur sont sauvegardées dans des cellules individuelles au niveau de la lame dans le navigateur de dossiers.
- Options d'amélioration, d'annotation, d'impression et d'exportation des images.
- Les images peuvent être affichées dans la Case View.
- Le seuillage optionnel (suppression du bruit de fond) crée des objets qui peuvent être copiés dans des écrans flexibles « Flexible Screen » et combinés avec des objets images provenant d'autres modes d'acquisition standard ou d'autres dossiers.
- Les caryotypes Probe peuvent être créés à partir d'images FISH en métaphase sur un système dont le module logiciel sous licence Karyotype est activé.



M-FISH.

Format cellulaire conçu pour les échantillons FISH à marquage combinatoire (multicolore), avec affichage de l'image et interaction à l'aide des outils standard de l'écran de démarrage.

- Acquisition manuelle en utilisant le mode MFISH de l'écran Capture.
- L'acquisition automatique du système de numérisation n'est pas possible.
- Les images brutes et en couleur sont sauvegardées dans des cellules individuelles au niveau de la lame dans le navigateur de dossiers.
- Les caryotypes M-FISH peuvent être créés à partir d'images de métaphase sur un système dont le module logiciel sous licence *Karyotype* est activé.
- Options d'amélioration, d'annotation, d'impression et d'exportation des images.
- Les images peuvent être affichées dans la Case View.
- Les objets peuvent être copiés dans les écrans flexibles et combinés avec des objets images provenant d'autres modes d'acquisition cell folder ou d'autres dossiers.



Probe (Framelist).

Format d'image complet conçu pour les échantillons FISH en interphase ou de tissus, compatible avec un logiciel d'analyse d'image distinct pour l'affichage et l'interaction.

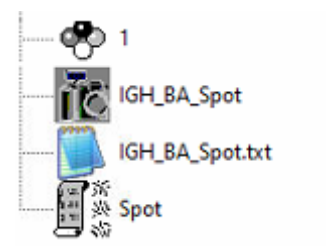
- Acquisition manuelle à l'aide de l'écran d'acquisition **Probe** (Image Frame).
- Acquisition automatique par le système de numérisation en utilisant le mode d'acquisition ProbeAuto dans le modèle de lame.
- Pas de seuil d'objet. Toutes les données d'images brutes et de couleur sont combinées en un seul *Framelist* au niveau de la lame.
- Les couches du Z-stack sont sauvegardées en tant qu'images individuelles avec la projection maximale.



Spot Counting.

Sur les systèmes équipés du module **Spot Counting**, des options supplémentaires sont disponibles ;

- Acquisition manuelle à l'aide du mode *Spot Counting* de l'écran d'acquisition standard (sauvegarde en tant que Framelist).
- Acquisition automatique par le système de numérisation en utilisant le mode d'acquisition *Spot Counting* dans le modèle de numérisation.
- Traitement automatique du signal à l'aide d'un test ponctuel (Spot Assay) configurable pour les paramètres d'acquisition et de numérisation.

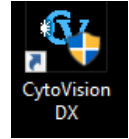


Pour déterminer quand utiliser les différentes options d'acquisition de Probe, il convient de prendre en compte les principales différences entre chaque type d'acquisition et les capacités d'analyse qui en découlent.

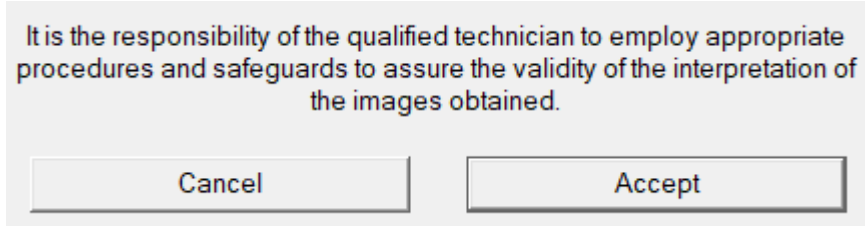
Les données Image Frame (Probe Framelist et Spot Counting) ne disposent pas d'option d'affichage ou d'analyse avec l'application *CytoVision DX* et nécessitent l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image séparé compatible avec le format « framelist ».

Connexion de l'utilisateur & Démarrage du logiciel-application

1. Allumez le moniteur (écran) de la station de travail et le PC, lorsque le système vous y invite, connectez-vous avec un nom d'utilisateur disposant des autorisations de sécurité appropriées pour l'application.
2. Allumez le GSL, le microscope et les contrôleurs de lampes fluorescentes selon les besoins de l'utilisation.
3. Démarrez le logiciel en double-cliquant sur l'icône du bureau ou en sélectionnant le raccourci depuis **Windows Démarrer (Tous les programmes) > CytoVision DX > CytoVision DX**



4. Une demande de confirmation de l'utilisateur final s'affiche.



5. Cliquez sur **Accept** (Accepter) pour confirmer l'utilisation et continuer avec l'application (ou sur **Cancel** (Annuler) pour fermer).

Numérisation des lames en interphase

Procédure de démarrage rapide

Ces instructions supposent qu'avant de commencer une numérisation complète avec recherche d'interphase en fluorescence et acquisition automatique d'images, le système a été correctement configuré et étalonné ;

1. Le système a été correctement configuré et étalonné (y compris l'**étalonnage de la numérisation en fluorescence**) selon les procédures standard de Leica Biosystems décrites dans le **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.
2. Un **classificateur** (Classifier) de cellules approprié est disponible.
3. Une acquisition manuelle a été réalisée avec la création de **listes fluorochromes** (Fluorochrome Lists) et d'**options de post-acquisition** (Post Capture Options) pour les modes Probe.
4. Un **modèle de lames** contenant des zones de numérisation appropriées et des règles de numérisation et d'acquisition a été créé.
5. Les lames ont été placées dans la cassette du plateau GSL en commençant par le plateau 1, position 1.

Slide Templates (Modèles de lames)

Chaque lame à numériser doit être attribuée à un modèle de numérisation qui contient tous les réglages nécessaires pour permettre au système de localiser les cellules, de les classer et les trier dans une séquence d'acquisition, puis de capturer automatiquement le nombre d'images requis.

- Pour plus de détails, veuillez vous référer à la section [Modèles de lames](#).

Classificateurs

Les classificateurs par défaut fournis avec le logiciel sont basés sur des échantillons d'interphase fluorescents représentatifs qui devraient permettre un fonctionnement initial sans modification significative.

- Ces classificateurs peuvent ne pas correspondre aux caractéristiques des échantillons de l'utilisateur en raison des variations normales et attendues dans la préparation des échantillons et des lames.
- Pour chacun des types d'échantillons à utiliser sur le système, les performances du classificateur choisi doivent être examinées afin de déterminer si une optimisation supplémentaire est nécessaire.
- Des images supplémentaires provenant de nouvelles numérisations peuvent être ajoutées aux classificateurs par défaut, ou de nouveaux classificateurs peuvent être créés.
- Pour plus de détails, veuillez vous référer à la section [Classificateurs > Entraînement et Modification](#).

Options d'acquisition automatique (Auto Capture)

Chacun des modes d'acquisition automatique disponibles après la recherche de cellules nécessite une configuration d'acquisition appropriée pour permettre l'utilisation de plusieurs sondes (fluorochromes).

Pour chaque test de la sonde, la combinaison de fluorochromes doit d'abord être capturée manuellement pour créer, modifier et enregistrer les listes de fluorochromes (**Fluorochrome Lists**) nécessaires ou les options de post-acquisition (**Post Capture Options**) dans le modèle de numérisation.

Ces options doivent être configurées lors de l'acquisition manuelle de lames FISH représentatives pour chaque type d'échantillon, kit de sondes ou test ponctuel qui sera utilisé ultérieurement pour la numérisation et l'acquisition.

- Capturez une image représentative en utilisant l'acquisition manuelle en mode **Probe**.
- Confirmez les paramètres de filtre et de couleur pour chaque nom de fluorochrome et enregistrez la combinaison de canaux de sonde en tant que « liste de fluorochromes » à utiliser avec l'acquisition automatique *Probe* et *ProbeAuto*.
- Le mode Probe nécessite également des options de post-acquisition (personnaliser le modèle d'acquisition).
- Le mode Spot Counting nécessite un test lié aux noms de fluorochromes par défaut.
- Pour plus de détails, veuillez vous reporter à la section relative à l'acquisition pour chaque mode.

Charger les lames et les plateaux

Ouvrez la porte et retirez la cassette de plateaux de l'empileur GSL.

- L'empileur doit être dans sa position la plus basse avant d'ouvrir le mécanisme de verrouillage de la porte puisse être ouvert et de pouvoir ajouter ou retirer des plateaux de la cassette.
- Le bouton **Débloquer la porte** (Unlock Door) est disponible dans la fenêtre **Paramètres de numérisation*** (Scan Setup) de l'écran Numériser (Scan screen) (Numériser des lots de lames) ou par un clic sur le bouton **Charger la lame** (Load Slide) de l'écran Capture. Ceci a pour effet d'abaisser la cassette et de déverrouiller le mécanisme.



Placez la/les lame(s) propre(s) dans le plateau GSL avec l'étiquette vers l'arrière.

- La lame 1 de chaque plateau se trouve à gauche. La lame doit être exempte de résidus d'huile et la lamelle/échantillon doit être orientée vers le haut.
- Assurez-vous que la lame est bien à plat dans l'insert et qu'elle est poussée vers le haut (vers l'arrière) et vers la gauche contre les bords de référence avant de relâcher la poignée à ressort qui la maintient en place.
- Une fois la poignée à ressort relâchée, assurez-vous qu'elle maintient la lame fermement et sans mouvement si vous touchez légèrement la lame.
- Répétez l'opération pour les autres lames et plateaux.



Sur les systèmes GSL120, une fois que chaque plateau est chargé de lames, il doit être réinséré dans la cassette du plateau avec l'aimant à l'intérieur et le trou sub-X vers l'extérieur.

- Le plateau 1 est la position la plus basse, le plateau 24 la plus haute.
- Assurez-vous que chaque plateau est inséré de niveau (horizontal) dans son propre emplacement et que le bord extérieur de chaque plateau est au même niveau que ses voisins.

Après avoir fermé la porte, avant de lancer une nouvelle numérisation ou une nouvelle acquisition automatique, le système numérise à nouveau la cassette pour les plateaux.

- Lors de la lecture de codes-barres, tous les plateaux détectés sont chargés et vérifiés par rapport aux lames contenant des codes-barres.
- Lors d'une numérisation manuelle, la position des plateaux correspond aux positions assignées manuellement avec un nom de dossier et de modèle dans l'écran *Paramètres de numérisation* (Scan Setup).



Lors de la numérisation et de l'acquisition automatique, la cassette s'élève pour verrouiller la porte pour des raisons de sécurité. Si l'ajout ou le retrait d'un plateau est nécessaire, il faut arrêter la numérisation ou l'acquisition en cours.

* Une vérification de l'utilisation de la mémoire est effectuée lorsqu'on sélectionne Paramètres de numérisation afin de déterminer si un lot complet de lames peut être numérisé. Si l'utilisation de la mémoire de l'application est supérieure à un seuil configuré.

- Un message d'avertissement s'affiche et la fenêtre *Paramètres de numérisation* ne s'ouvre pas.
- L'application doit être redémarrée avant toute activité de numérisation.

Numériser un lot de lames (Interphase)

1. Assurez-vous que le GSL et les composants du microscope sont sous tension et qu'il y a suffisamment d'huile dans le mécanisme de distribution d'huile.
2. Démarrez l'application *CytoVision DX* et passez à l'écran Numériser, pour permettre à l'application de se connecter et d'initialiser le matériel.
3. Cliquez sur l'icône « Scanner un lot de lames » (Scan batch of slides), ce qui ouvre la fenêtre [Paramètres de numérisation \(Scan Setup\)](#)
(Pour les lames à code-barres dont les codes-barres ont été associés à un nom de dossier et à un modèle de lames, passez directement à l'étape **12** après avoir placé les lames dans les plateaux et les cassettes).
4. Cliquez et mettez en évidence la lame 1 (position 1 de la platine)
5. Sélectionnez le dossier dans lequel les données d'image seront sauvegardées.
6. Sélectionnez le modèle de lame qui possède les règles de numérisation et d'acquisition automatique correctes pour la lame.
7. Cliquez sur l'étiquette dans l'extrémité givrée de l'affichage des lames pour donner un nom à la lame.
6. Placez la lame de l'échantillon correspondant au dossier sélectionné (et au nom de la lame) en position 1 sur le plateau. (Reportez-vous à la procédure [Charger les lames et les plateaux \(Slide & Tray Loading\)](#) pour plus d'informations).
7. Sélectionnez l'icône de la lame suivante et attribuez un dossier et un modèle de numérisation. Ajoutez la lame d'échantillon correspondante dans le plateau et vérifiez qu'elle est correctement placée.
8. Répétez l'opération pour les autres lames et positions à utiliser dans le premier plateau. Chargez le plateau 1 dans la première position (la plus basse) de l'empileur/cassette.
9. Répétez cette procédure pour toutes les lames et tous les plateaux restants et chargez la cassette dans l'unité d'empilage.
10. Placez la cassette dans l'empileur GSL et fermez la porte.
11. Cliquez sur le bouton Numériser (Scan) pour démarrer la numérisation.
[Pour les lames avec code-barres, sélectionnez l'icône Numériser les lames avec code-barres (*Scan Slides with Barcodes*)].
12. La première lame sera numérisée avec les options de numérisation définies dans le modèle.
- Numérisation (10x) : voir [Modèles de lames > Numériser \(Slide Templates > Scan\)](#)
13. Pour pouvoir lancer une numérisation 10x, le système doit réaliser une carte de mise au point sur plusieurs points de la zone de numérisation.
- Cela dépend d'un **étalonnage correct de la numérisation en fluorescence** (Fluorescent Scan Calibration) et
- le point focal de départ est proche de l'échantillon, défini lors de l'**étalonnage spatial** (Spatial Calibration) (modifié par tout décalage de mise au point enregistré dans le modèle de lame).
14. Pendant la numérisation 10x, le système examine les images de la caméra à chaque mouvement de la platine (frame) et compare tous les objets détectés au [classificateur](#) configuré dans le Modèle de lame. Cela permet de déterminer le nombre de cellules classées disponibles pour l'acquisition.
15. Une fois la numérisation 10x terminée, les cellules classées sont triées pour déterminer le rang d'acquisition avant de passer à la phase d'acquisition automatique (*AutoCapture* phase).
16. De l'huile est alors automatiquement ajoutée et l'objectif à fort grossissement est mis en position, effectuant une « danse de l'huile » pour répartir l'huile uniformément sur la surface de la lame.
17. Des images (trames) sont ensuite capturées à fort grossissement. Pour chaque image, le système effectue une mise au point automatique pour déterminer la position focale, puis capture en utilisant les paramètres spécifiques du modèle avant de passer à la cellule suivante.

18. Une fois que le nombre correct d'images a été capturé (comme configuré dans le modèle de numérisation ou le test ponctuel), l'acquisition se termine et *CytoVision DX* passe à la lame suivante, répétant la numérisation, la distribution d'huile et l'acquisition automatique jusqu'à ce que toutes les lames soient terminées.
19. L'application **Scan Monitor** enregistre l'activité et la durée de chaque phase de pré-numérisation, de numérisation et d'acquisition (PreScan, Scan and Capture) pour le lot de numérisation, et doit être consultée en cas de problème inattendu.

Pour plus d'informations sur les flux de travail étape par étape, voir [l'annexe](#) à la fin de ce manuel.

Configuration de la numérisation manuelle

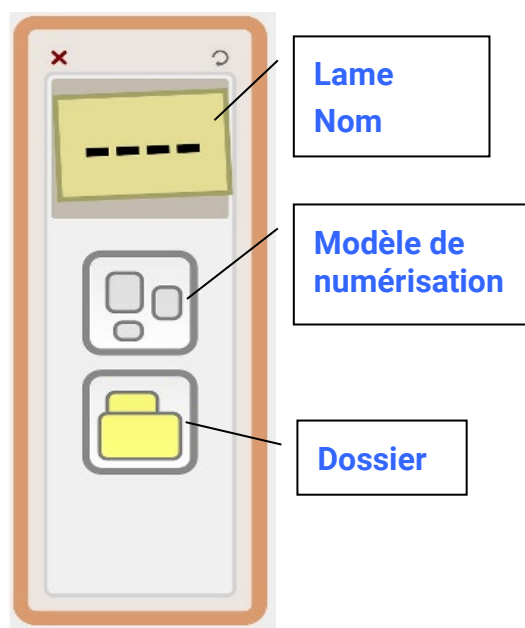


Pour toutes les configurations manuelles de lames et de la numérisation, il est important de vérifier que le dossier et les modèles sont appropriés aux lames réelles qui sont physiquement placées dans le système.

- Pour réduire les risques d'erreur, il est recommandé de faire un double contrôle des lames et des réglages, ou d'utiliser une fiche technique contenant les positions souhaitées des dossiers et des lames.
- L'utilisation de [Lecture de code-barres \(Barcode Scan\)](#) sur des lames étiquetées sur les systèmes GSL optimise l'efficacité de la numérisation et réduit le risque d'erreur dans la configuration de la numérisation.

Affectation des dossiers et des modèles

- Sur l'écran Numériser (Scan), sélectionner l'icône **Numériser un lot de lames** (Scan batch of slides) dans la barre d'outils principale. Une fenêtre s'ouvre affichant toutes les positions potentielles des lames qui peuvent être définies pour la numérisation.
- Attribuez un dossier et un modèle à chaque lame à numériser. Le nom de lame est facultatif ; si aucun nom n'est entré, le système utilise le prochain numéro disponible pour le dossier, avec un identifiant de la position de lame à la fin, par ex. Lame 1_1 (pour le plateau 1).
- Cliquez sur l'icône du dossier : une liste des dossiers présents sur le réseau apparaît. Sélectionnez un nom de la liste ou saisissez le nom d'un nouveau dossier.
- Quand un dossier a été sélectionné, il s'affiche du côté droit de l'écran de configuration, avec un numéro d'identification.
 - C'est ce nombre qui est visible sur l'affichage de la lame.
 - Chaque fois que l'application est redémarrée, cette liste est restaurée.
- Si vous numérisez plusieurs lames d'un même dossier, cliquez sur le nom du dossier dans cette liste pour attribuer rapidement le dossier au lieu de chercher dans le panneau des dossiers. Cliquez sur le sélecteur de modèle de numérisation pour sélectionner et attribuer un modèle à la lame.
 - Après la création des modèles, ils apparaissent également en haut à gauche de l'écran Paramètres de numérisation, pour une sélection rapide.



- Les noms des lames sont facultatifs. Si un nom spécifique est requis, cliquez dans la zone « Nom de lame » (Slide Name) et saisissez la description correcte.
- On peut sélectionner plusieurs lames en utilisant les touches Windows **Ctrl** ou **Maj** et en cliquant avec la souris.

Acquisition automatique différée

Quand tous les dossiers et modèles ont été attribués pour le lot de lames sur le microscope, une flèche de sélection apparaît sous chaque lame.



C'est la fenêtre **Deferred Auto-Capture** (Acquisition automatique différée) qui permet de ne pas tenir compte du modèle, afin de séparer les composants du scan et de l'acquisition automatique :

- **None (Aucun)**. (Par défaut). Le système procédera à la numérisation et à l'acquisition automatique (si elle est configurée) de la lame avant de passer à la suivante.
 - Paramètre standard pour la numérisation et l'acquisition GSL avec distribution automatique de l'huile.
- **Scan (Numériser)**. Sélectionnez cette option pour effectuer uniquement le composant Scan du modèle. Après chaque numérisation, le système passe à la lame suivante.
 - A utiliser sur un système GSL si l'on veut revoir manuellement les images miniatures de numérisation avant l'acquisition automatique (différée).
- **Capture (Acquisition)**. Sélectionnez cette option pour effectuer uniquement l'acquisition automatique (Auto-Capture). Cette option est sélectionnable s'il y a des cellules classées (caractérisées par un indicateur vert) dans la liste des lames. L'acquisition se fera selon les règles d'acquisition définies dans le modèle pour le nombre de cellules et les options de tri.

Remarque : Les options Numériser ou Capture (Scan and Capture) only sélectionnées manuellement ne sont pas typiques de la numérisation d'échantillons FISH pour les échantillons interphasiques, mais sont optionnelles pour la numérisation de métaphases.

Une fois que toutes les lames, les dossiers et les modèles ont été assignés et que les plateaux ont été chargés dans le GSL, appuyez sur le bouton **Numériser** (Scan) en bas de la page Paramètres de numérisation (Scan Setup) pour lancer le processus de numérisation. Le système fonctionne avec toutes les combinaisons de modèles et de configuration de lames.

Procédure de configuration manuelle de la numérisation

Pratiquement, ceci couvre 2 procédures principales :

1. Numérisation et acquisition automatique

Il s'agit de la procédure de routine pour les systèmes GSL utilisant les métaphases en fluorescence et la sélection de numérisation Interphase Finder.

Les lames sont définies dans Paramètres de numérisation (*Scan Setup*) et **Aucune** (None) n'est confirmé dans les options **Acquisition automatique différée** (Deferred Auto-Capture) ;

- La première lame est explorée à faible grossissement et traitée avec le classificateur sélectionné.
- Les cellules classifiées sont classées au moyen des règles de tri du modèle d'acquisition automatique.

- L'huile est automatiquement distribuée sur la lame et l'acquisition automatique à fort grossissement démarre. Les cellules font l'objet d'une mise au point automatique et sont capturées en utilisant les paramètres et le mode d'acquisition configurés.
- Après capture du nombre sélectionné de cellules, la platine passe à la lame ou au plateau suivant et commence la numérisation et l'acquisition automatique pour cette lame.
- Le processus se répète jusqu'à ce que le traitement de toutes les lames attribuées au lot soit terminé.

2. Numérisation avec acquisition automatique différée (Scan with Deferred Auto-Capture) (Métaphase)

Cette procédure est facultative pour les systèmes GSL utilisant la numérisation Fluorescent Metaphase Finder, où l'utilisateur doit examiner, ajouter ou supprimer des cellules classées avant de lancer l'acquisition automatique.

Les lames sont sélectionnées sur la page Paramètres de numérisation (Scan Setup) et l'option **Numériser uniquement** (Scan only) est choisi dans les options Acquisition automatique différée (Deferred Auto-Capture) :

- Toutes les lames sont numérisées à faible grossissement et traitées avec le classificateur sélectionné.
- Quand la numérisation est terminée, le système affiche à nouveau l'écran Numériser (Scan) et s'arrête.

L'opérateur a maintenant le choix de lancer immédiatement le processus d'acquisition automatique ou d'examiner d'abord n'importe laquelle des listes de métaphases afin de modifier les cellules classées pour l'acquisition, avant d'enregistrer et de revenir à l'écran **Numériser** (Scan) :

- Sélectionner l'icône *Numériser manuellement un lot de lames (Manually Scan Batch of Slides)* pour ouvrir la fenêtre Paramètres de numérisation (Scan Setup).
- Sélectionner le bouton **Différé** (Deferred) qui est maintenant visible en bas de la page. Toutes les lames qui ont été numérisées dans le lot précédent (et qui ont au moins une cellule marquée en vert dans leur liste) verront leur position sur le plateau et leur nom de dossier rechargés à l'écran avec l'affichage d'acquisition « C ».
- (Facultatif) Supprimer/Effacer (Delete/Clear) toute lame dont l'acquisition n'est pas nécessaire. Cela peut être utile après un examen manuel des listes de métaphases qui révèle que sur certaines lames, rien n'est de la qualité acceptable pour l'acquisition.
- Sélectionnez le bouton **Numériser** (Scan) pour démarrer le processus Auto-Offset (Décalage Auto) comparant les positions focales 10x.
- Les cellules classées sont catégorisées au moyen des règles de tri du modèle d'acquisition automatique.

En utilisant la commande *Acquisition différée (Deferred Capture)*, le système réalise une nouvelle cartographie de mise au point sur la lame et la compare aux images enregistrées de la numérisation d'origine, en appliquant un décalage automatique pour compenser tout mouvement mineur de la lame ou du plateau résultant du chargement et du déchargement des plateaux.

- L'huile est automatiquement distribuée sur la lame et l'acquisition automatique à fort grossissement démarre. Les cellules font l'objet d'une mise au point automatique et sont capturées en utilisant les des règles de *personnalisation de l'acquisition* des **Options post-acquisition** (Post Capture Options).
- Après l'acquisition du nombre sélectionné de cellules, la platine passe à la lame ou au plateau suivant et commence l'acquisition pour cette lame.
- L'acquisition automatique se répète sans qu'une autre interaction soit nécessaire jusqu'à ce que le traitement de toutes les lames attribuées au lot soit terminé.

Numérisation des lots mixtes

Tous les modes de numérisation et d'acquisition automatique FISH peuvent être exécutés dans un lot mixte sur le système GSL.

- Les lames « Scan » seulement complèteront le composant de numérisation 10x
- Les lames définies comme « None » (Aucun) subiront la recherche de cellules et les composantes d'acquisition automatique.
- À la fin du premier passage, les lames d'acquisition différée peuvent être rafraîchies dans l'écran des paramètres de numérisation en appuyant sur le bouton **Différé** (Deferred) pour charger les lames qui doivent encore être capturées.
- Cliquez à nouveau sur **Numériser** pour lancer l'acquisition automatique des lames restantes.

REMARQUE : Pour toutes les configurations manuelles de lames et de numérisation, il est important de vérifier que le dossier et les modèles correspondent correctement aux lames physiques qui sont placées dans la cassette du chargeur de lames.

- Pour réduire les risques d'erreur, il est recommandé de faire un double contrôle des lames et des réglages, ou de se référer à une fiche technique contenant les positions souhaitées des dossiers et des lames.
- L'utilisation de Lecture de code-barres (Barcode Scan) sur des lames étiquetées sur les systèmes GSL optimise l'efficacité de la numérisation et réduit le risque d'erreur dans la configuration de la numérisation.

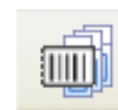
Lecture de code-barres



La lecture de codes-barres permet une utilisation optimale du système de numérisation GSL. L'attribution des dossiers et des modèles se fait avant la numérisation à l'aide de la fonction **Assign Slide Barcodes** (Attribuer les codes-barres aux lames) ou s'il existe une interface distincte pour le système de gestion des informations de laboratoire (LIS).

- L'application Barcode Manager (Gestionnaire de codes-barres) peut être utilisé pour afficher et mettre à jour les affectations de codes-barres.
- Pour obtenir plus de détails à ce sujet et des informations supplémentaires sur la prise en charge et les limitations des codes-barres, veuillez consulter le **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

Configuration de l'affectation des lames



Cliquer sur l'icône **Attribuer les codes-barres aux lames** (Assign Slide Barcodes) de l'écran Scan pour ouvrir la fenêtre de configuration.

1. **Sélectionner le modèle** : Les modèles de numérisation disponibles s'affichent à l'écran. Il est possible d'en créer de nouveaux ici, mais il ne s'agit pas d'une procédure typique.
2. **Détails des lames** (facultatif). Un modèle étant mis en évidence, il est possible d'y associer un modèle de lame enregistré s'il est nécessaire de consigner l'information spécifique à la lame avant une numérisation, en cliquant sur le bouton **Détails** (Details).
3. **Sélectionner le dossier**. Le dossier actuel s'affiche (on peut créer de nouveaux dossiers). La sélection d'un dossier valide active **Manually Enter Barcode** (saisir code-barres manuellement).
4. **Lire le code-barres de la lame**. Utilisez un lecteur de code-barres* portable pour lire le code-barres directement depuis la lame (les données du code-barres de la ligne peuvent être saisies manuellement).



Le code s'affiche à l'écran avec l'information sur le dossier et le modèle, pour contrôle. Tous les codes-barres en double sont mis en évidence en rouge. Cliquer sur le bouton **Saisir les codes-barres manuellement** (Manually Enter Barcode) si le lecteur de codes-barres portable n'est pas préprogrammé pour ouvrir automatiquement cette fenêtre.

* Un lecteur de codes-barres portable n'est pas fourni avec les systèmes de numérisation. Il est recommandé d'utiliser un lecteur capable de prendre en charge l'intégralité des codes-barres 2D, tel que le lecteur Motorola (Symbol) DS6707 ou équivalent.

Procédure de lecture de codes-barres

Le menu **Lecture de code-barres** (Barcode Scanning) au-dessus de la barre d'outils principale donne accès aux 3 commandes de numérisation et/ou d'acquisition.

Scan and Capture (numérisation et acquisition)

Ceci est équivalent à l'icône **Numériser des lames avec codes-barres** (Scan slides with Barcodes) de la barre d'outils principale.

- Chaque plateau de la cassette est chargé en séquence, en commençant par le plateau 1, et chacune des 5 positions du plateau est lue à la recherche de lames étiquetées avec un code-barres.
- Lorsqu'il détecte un code-barres valide dans la base de données, le système procède à la numérisation et à l'acquisition d'une lame à la fois, sur la base des règles contenues dans le modèle.

Numériser uniquement (Scan Only)

Ceci déclenche pour la lame porteuse du code-barres l'équivalent de l'acquisition automatique différée. Le système GSL charge chaque plateau l'un après l'autre et lit les détails du code-barres mais pour chaque lame, il effectuera uniquement le composant à faible grossissement du modèle de numérisation.

- Numériser uniquement (*Scan Only*) est prévu quand l'examen manuel des listes de métaphases est planifié, afin de contrôler les cellules classifiées pour la capture ou d'ajouter/enlever des cellules de la catégorie marquée par l'indicateur vert.
- *Numériser uniquement (Scan Only)* n'est pas compatible avec l'utilisation typique d'échantillons interphasiques.

Capture Only (capture uniquement)

Cette option ne doit être utilisée qu'immédiatement après une opération **Scan Only** (numérisation uniquement) de code-barres, dès que les listes de cellules ou les zones appropriées provenant de la numérisation ont été examinées ou modifiées. Le système numérise à nouveau les lames pourvues de code-barres dans la cassette et exécute les règles de l'acquisition automatique contenues dans le modèle de numérisation.

L'élément d'acquisition fonctionne de la même façon que l'**acquisition différée**, le système comparant les positions de la carte de mise au point 10x aux positions mémorisées provenant de la numérisation elle-même. Ceci permet d'appliquer un décalage automatique pour compenser tout mouvement mineur de la lame ou du plateau résultant du chargement et du déchargement des plateaux.

La fonction **Capture Only** (Acquisition seulement) du code-barres s'exécutera comme prévu, si :

- Aucune autre numérisation n'a été réalisé sur le système depuis que l'option **Scan Only** des code-barres a été sélectionnée.

- Les lames à capturer n'ont pas été enlevées ou replacées dans les plateaux depuis l'option **Scan Only** (lecture seule) des code-barres. Il est également recommandé de ne pas changer la position des plateaux dans la cassette avant l'exécution de **Capture Only**.

Remarque : Une vérification de l'utilisation de la mémoire est effectuée lorsque l'une des options de lecture de codes-barres est sélectionnée afin de déterminer si un lot complet de lames peut être numérisé.

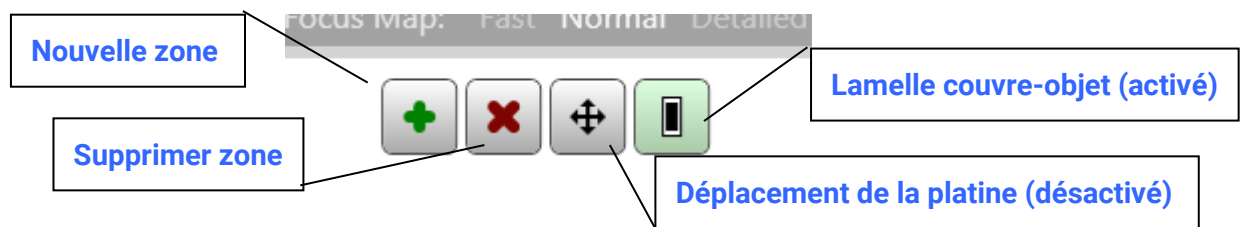
- Si l'utilisation de la mémoire de l'application est supérieure à un seuil configuré, un message d'avertissement s'affiche et la numérisation n'a pas lieu.
- L'application doit être redémarrée avant toute activité de numérisation.

Modèle de lames (FISH)

- Ouvrez la fenêtre de Paramètres de numérisation et sélectionnez l'icône Attribuer la numérisation (Modèle de lames) pour n'importe quelle position de lame afin d'afficher la fenêtre **Choisir un modèle de lame** (Choose a slide Template).
- Si aucun modèle n'est présent, cliquer sur le bouton **Create New Slide Template** (Créer nouveau modèle de lame) ; sinon, sélectionner **New** (Nouveau) pour faire un nouveau modèle ou **Edit** (Modifier) pour modifier un modèle existant.

Il convient d'utiliser un nom de modèle décrivant le type de numérisation qui sera effectué. Typiquement, il fera référence à l'échantillon ou au kit de sondes, telle que « FL-Blood » ou « DGO ».

Zone de numérisation

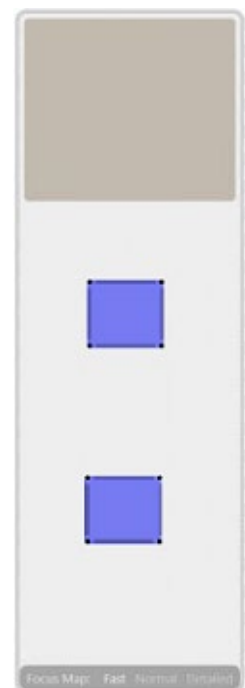


Cliquez sur le symbole plus (+) en vert pour ajouter une nouvelle zone de numérisation ou une zone de numérisation supplémentaire au modèle existant.

- Les zones multiples sont typiques pour la numérisation FISH, soit pour numériser la même zone de lame avec les modes de recherche de métaphases et d'interphase, soit pour permettre des zones positionnelles séparées de l'échantillon, chacune hybridée avec un kit de sondes différent.

Pour les lames FISH, assurez-vous que :

- Le réglage de la lamelle est activé pour toutes les zones, sinon le système ne calculera pas avec précision les positions de mise au point automatique de la numérisation ou d'acquisition.
- La zone de numérisation est ajustée pour être plus petite que l'emplacement de l'échantillon, car cela réduit le risque que les points de la carte de mise au point échouent s'il n'y a pas de matériel d'échantillon.
- Pour la numérisation des interphases, il est typique de ne définir qu'une petite zone de numérisation en raison de la forte densité attendue de cellules classées pendant la numérisation.



- Pour réduire la durée de la carte de mise au point et le risque de photoblanchiment, les zones plus petites utiliseront 1 ou 5 points de carte de mise au point, en fonction de leur taille et de la carte de mise au point (*Focus Map*) : *Normal* ou *Focus Map* : *Fast* est sélectionné.

Une fois qu'une zone de numérisation est définie dans le modèle, les 3 panneaux de numérisation et d'acquisition sont accessibles.

Pré-numérisation

La fonction Pré-numérisation (Pre-Scan) utilise l'objectif 1,25x pour identifier les caractéristiques de la lame sur fond clair.

- Les options standard de pré-numérisation sont désactivées pour les modes de numérisation en fluorescence.

Numérisation

Cette section contient les options de recherche de cellules nécessaires pour permettre une numérisation optimale des types d'échantillons ;

- **Mode de numérisation** : Fluorescent pour les lames FISH (nécessite la compatibilité avec le microscope et le filtre).
- **Finder Application** (Application de recherche) permet de sélectionner entre Metaphase Finder (détecteur de métaphases) et Interphase finder (détecteur d'interphases)
- **Classificateur** (Classifier) : sélectionner un classificateur approprié au type d'échantillon.
- **Objectif** : 10x par défaut.
- **Arrêter la numérisation après** : (Stop Scanning after) arrête la numérisation lorsqu'un nombre minimum de cellules classées (pourvues d'un indicateur vert) est atteint. Si cette fonction est désactivée, la numérisation se poursuit sur l'intégralité de la zone de numérisation sélectionnée.

Ceci n'est pas typique pour la numérisation FISH et ne devrait être utilisé qu'avec des classificateurs qui ont été optimisés pour les échantillons de l'utilisateur.

Numérisation > Configurer

Le panneau « Configure Finder Application » (Configurer l'application de recherche) donne accès à diverses options de configuration en fonction du type d'échantillon et de son utilisation.

- Le bouton « Reset to Defaults » (Rétablir les paramètres par défaut) montre les paramètres de **configuration** initiaux.
- Il s'agit uniquement de valeurs typiques qui peuvent être modifiées sur des échantillons réels.

Pour les numérisations de routine, les ajustements typiques sont les suivants :

1. Modifier les paramètres **Minimum** et **Maximum** de la zone de métaphase/interphase.
2. Définir un mode d'échantillonnage (détecteur de métaphase uniquement).

Zone d'interphase minimale/maximale

Les objets situés en dessous de la zone de pixels minimale ou au-dessus de la zone de pixels maximale ne seront pas traités pendant la numérisation pour être affichés ou classés dans la liste des lames.



- Pour la numérisation en interphase, la zone minimale par défaut (40) est généralement inférieure aux besoins et peut être augmentée entre 80 et 100 sans modifier les cellules interphasiques utilisables.
- La réduction de la zone maximale (500 par défaut) réduira la classification des amas de cellules si ceux-ci ne sont pas utiles pour l'examen.

Upload Classified Only (Télécharger les images classées uniquement)

- Cette option permet d'enregistrer uniquement les images numérisées classées en fonction du classificateur utilisé.
- L'option Télécharger les images classées uniquement (*Upload Classified Only*) doit être décochée lors de la configuration et des tests initiaux du classificateur.
- Après l'optimisation du classificateur, il est recommandé d'activer cette option, en particulier si la numérisation de recherche interphase produit un grand nombre d'objets d'arrière-plan non classifiés, ce qui peut ralentir la numérisation, augmenter le temps de traitement et accroître la taille de la liste de numérisation enregistrée.

Repère de mise au point (validation des cellules)

Le panneau « Validation des cellules » (Cell Validation) est une fonction de traitement d'image pour la carte de mise au point (Focus Map) de la numérisation.

- Il est recommandé de **désactiver** la *Validation des cellules* pour les modèles de numérisation FISH de routine.
- Pour plus de détails à ce sujet et pour des informations supplémentaires sur l'option de numérisation de lames métaphasiques, veuillez vous référer au **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.

AutoCapture (Acquisition automatique)

Les options d'acquisition automatique (AutoCapture) définissent les règles pour le nombre et le type de cellules à acquérir après une numérisation, en utilisant les options de tri pour avoir une qualité de métaphases appropriée.

- Une acquisition automatique intégrale (Full AutoCapture) ne peut être configurée que si un classificateur est choisi dans le Modèle de numérisation (la valeur par défaut « Tout » (Everything) n'est pas un classificateur et affiche tous les objets numérisés comme non classifiés dans la liste des lames).

- L'acquisition automatique (AutoCapture) suit immédiatement une numérisation sur les systèmes GSL utilisant la distribution automatique de l'huile, sauf si le flux de travail de **Acquisition automatique différée** (Deferred AutoCapture) est utilisé.

À moins que toutes les cellules soient requises (généralement uniquement pour les lames en métaphase si un examen manuel a été effectué), l'utilisateur peut décocher l'option **Acquérir toutes les cellules** (Capture all cells) et choisir les règles adaptées au type d'échantillon.

Acquisition automatique en interphase

Pour les échantillons interphasiques, le nombre d'images à capturer est défini dans le panneau Acquisition automatique (AutoCapture).

Un classificateur d'interphase approprié doit être défini dans le panneau de numérisation du modèle de lame afin que les cellules classées et marquées en vert soient disponibles pour l'acquisition et que l'option **Effectuer l'acquisition automatique** (Perform AutoCapture) puisse être sélectionnée.

Il existe trois **modes d'acquisition** (Capture Modes) pour l'acquisition d'images FISH de routine sur les systèmes de numérisation *CytoVision DX* : **Probe**, **ProbeAuto** et **Spot Counting**.

1. Vous devez être familiarisé avec les procédures manuelles d'acquisition avec Probe (Probe Capture) et les fluorochromes.
2. L'option AutoCapture (Acquisition automatique) nécessite une liste de fluorochromes ou un Test ponctuel préalablement créé et sauvegardé. Cette liste renvoie aux noms des fluorochromes, aux paramètres d'empilement Z-stack, à la configuration des filtres et des couleurs.
3. Chaque mode dispose d'un paramètre **Objectif** : qui permet de sélectionner l'objectif à fort grossissement utilisé pour l'acquisition automatique, généralement 63x pour améliorer le champ de vision et les effets d'intensité.
4. Le statut **configurer la caméra automatique** (Autocamera setup) détermine la manière dont les images sont capturées à fort grossissement lors de l'acquisition automatique ;
 - **Actif** (coché) : Pour chaque canal à capturer, le système effectuera un réglage automatique de la caméra (exposition) en fonction de l'intensité de toute fluorescence présente dans le champ de vision.
 - **Inactif** (non coché) : Pour chaque canal à capturer, le système utilise les valeurs fixes de la caméra qui ont été enregistrées pour la dernière fois dans la *liste des fluorochromes* de l'écran Capture (Acquisition).

D'autres options d'affichage et de sélection sont disponibles en fonction du mode spécifique sélectionné.

Modes d'acquisition Probe :

Ce mode d'acquisition crée des images pour l'analyse via l'écran principal de démarrage de l'application.

- **Capturer toutes les cellules** (Capture all cells) ou **Capturer jusqu'à n cellules** (Capture up to n cells) : - L'utilisateur peut définir le nombre de cellules nécessaires à l'acquisition en fonction de critères de tri et de classement.
- **Liste des fluorochromes** : - Liens vers une liste d'acquisition de Probe précédemment créée et sauvegardée.
- **Options post-acquisition** : - utilise des modèles d'acquisition personnalisés afin que l'utilisateur puisse définir la manière dont il souhaite que les images soient capturées. Ces modèles doivent avoir été préconfigurés dans la fenêtre *Personnaliser* de l'écran Capture (Acquisition).

Modes d'acquisition ProbeAuto :

Ce mode d'acquisition crée des images au format *framelist*

Les **Options de post-acquisition** ne sont pas utilisées. Les options supplémentaires suivantes sont disponibles :

- **Setup on Counterstain** : Améliore le calcul de l'exposition de la **configuration de la caméra automatique** (Autocamera Setup) sur les canaux fluorochromes en travaillant uniquement sur les zones contenant un signal DAPI (masque de contre-coloration) et en étant moins affecté par les débris fluorescents à l'extérieur de la cellule.
- **Setup on Probe** : Améliore le calcul de l'exposition de la **configuration de la caméra automatique** (Autocamera Setup) sur les canaux fluorochromes en utilisant un calcul basé sur la taille afin d'être moins affecté par les débris brillants fluorescents à l'intérieur de la cellule.
- **Setup using Average (Configuration utilisant la moyenne)** : Capture les n premières images en utilisant le calcul d'exposition automatique standard pour obtenir une valeur d'intégration fluorochrome moyenne pour toutes les images restantes.

- **Save Z-stacks (Enregistrer l'empilement Z)** : Sauvegarde chaque image d'empilement de fluorochromes avec la projection maximale.

Mode d'acquisition Spot Counting :

Ce mode d'acquisition crée des images au format *framelist*.

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks

DGO Select Spot assay

Fluorochrome list:

Les paramètres sont les mêmes que pour **ProbeAuto** avec les changements supplémentaires ;

- **Select Spot assay** : ouvre le panneau Assay Selector (Sélecteur de test) pour choisir un test approprié qui contient les noms des fluorochromes utilisés pour construire la liste d'acquisition, les paramètres d'empilement Z et les paramètres d'arrêt de l'acquisition automatique.
- **Liste des fluorochromes** : n'est pas sélectionnable. Les paramètres de la liste d'acquisition et des fluorochromes sont définis dans le Test ponctuel (Spot Assay) et sont liés aux fluorochromes de la « Build List » (Créer une liste).

Remarque : S'il existe des noms de liste dans la **liste des fluorochromes** ou dans les panneaux d'**options de post-acquisition**, cela signifie que la zone de numérisation a déjà été définie pour le mode Probe ou Probe Auto, lorsque ces modes sont requis.

Il est recommandé de créer une nouvelle zone pour les opérations en mode d'acquisition Spot Counting et de laisser ces zones vierges.

Affichage et réglage de l'image

Sur la droite de l'écran est affichée une image Live avec des contrôles de la mise au point et des mouvements de la platine qui peuvent être utilisés pour vérifier la position de la zone de numérisation et pour confirmer les réglages de la caméra lors de la mise au point automatique (numérisation) 10x.

Il est conseillé de charger une lame standard avant d'utiliser le modèle pour la première fois afin de vérifier que les valeurs d'étalonnage de la caméra et des positions de la mise au point sont acceptables.



Remarque : Les réglages de la caméra utilisés pendant la numérisation sont déterminés pendant la cartographie de mise au point de la numérisation et il ne devrait pas être nécessaire d'ajuster régulièrement l'affichage de l'image en direct dans le modèle.

- L'intensité de l'image en direct et la position de mise au point sont déterminées à partir de l'étalonnage du système qui devrait afficher une image visible *proche* du plan focal de l'échantillon sans ajustement significatif pour les lames de routine.
- Si l'image est très sombre, lumineuse ou très éloignée de la mise au point, cela peut indiquer que l'étalonnage n'est pas correct et qu'il est nécessaire de le répéter.

Si les boutons **Auto Camera** ou **Record Z** ont un affichage **rouge**, cela signifie qu'ils utilisent les paramètres étalonnés du système - ceci est normal et attendu pour la numérisation de routine.



Si les boutons **Auto Camera** ou **Record Z** ont un affichage **vert**, cela signifie qu'ils ont été modifiés précédemment dans le modèle et qu'ils utilisent maintenant des valeurs enregistrées uniquement pour ce modèle.



Toute modification des valeurs de la caméra automatique contourneront les valeurs de l'**étalonnage de la numérisation en fluorescence** de la caméra et utiliseront les paramètres du modèle seulement pour les opérations courantes de cartographie de mise au point en 10x.

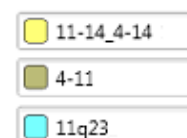
- Ceci est destiné à être utilisé lorsque l'on s'attend à ce que les valeurs des échantillons à utiliser avec ce modèle soient différentes de l'étalonnage standard, comme les échantillons en fluorescence avec une coloration DAPI atténuée ou faible.
- Les échantillons en fond clair ne sont pas censés nécessiter des valeurs de caméra spécifiques au modèle

Toute modification du Record Z (position de la mise au point) ne doit être réalisée que si le modèle doit être utilisé sur une lame ou un type d'échantillon spécifique où le plan focal de l'échantillon est susceptible d'être supérieur ou inférieur à celui d'une lame de type standard, par exemple en raison d'une différence physique de la lame, de la lamelle, du matériel ou de l'épaisseur de la préparation.

- La position de la mise au point n'affecte que la cartographie de la mise au point et la numérisation en 10x, elle n'a aucun effet sur les opérations courantes de mise au point de l'acquisition automatique à fort grossissement.

Après toute mise à jour de l'**étalonnage de la numérisation en fluorescence**, tous les modèles de numérisation qui ont modifié les valeurs de la caméra ou de la mise au point s'affichent avec un symbole d'avertissement dans l'écran de configuration du lot de numérisation, indiquant qu'ils utilisent peut-être des paramètres qui ne sont plus appropriés pour le système et qu'ils doivent être vérifiés ou « réinitialisés ».

Slide Templates



Examen des listes d'interphase

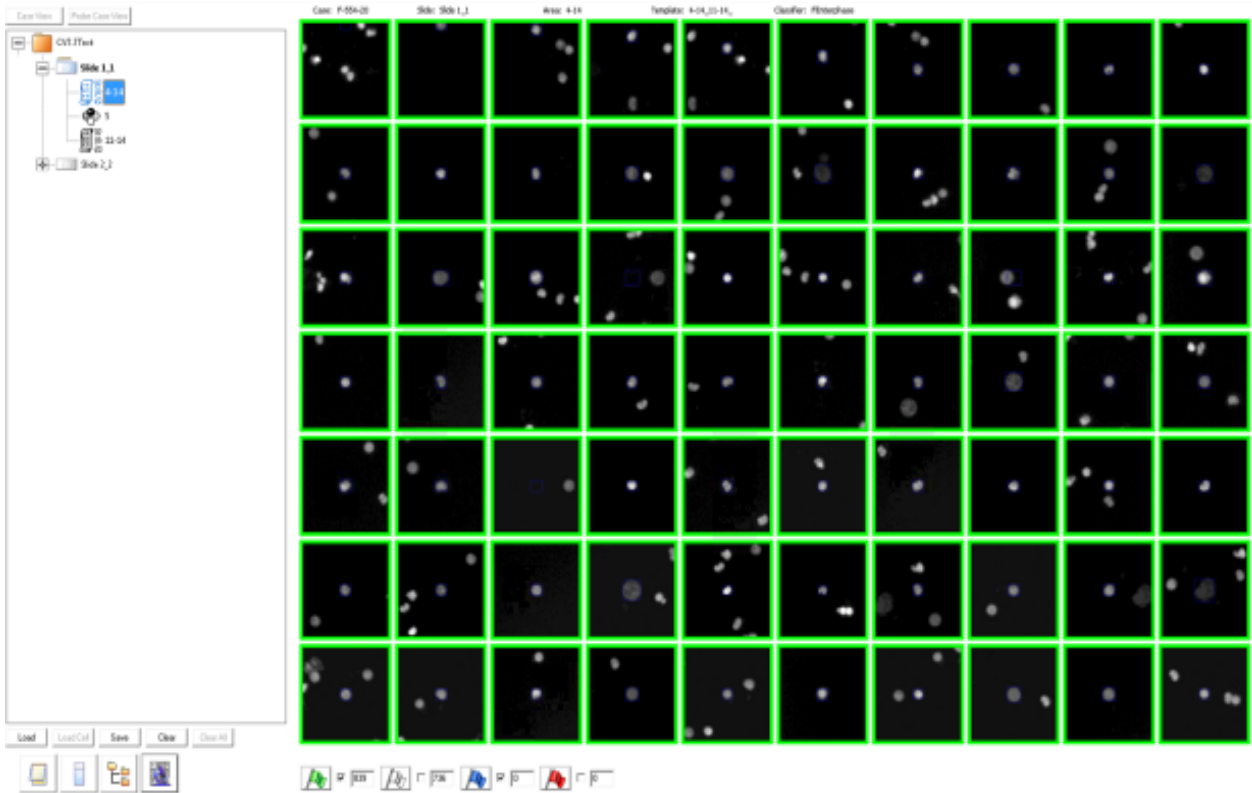


Les images de numérisation sont enregistrées dans une liste de lames affichée dans le navigateur, dans le dossier de la cellule (cell folder).

Les listes de lames ne peuvent être chargées et affichées que dans l'écran Review et sont utilisées

- Pour la création ou la modification des classificateurs (Classifiers) de numérisation.
- Reportez-vous au **Guide d'utilisation de CytoVision DX** pour obtenir des informations générales sur l'affichage et le contrôle de l'écran Review.

Pour la numérisation en fluorescence, cet écran n'est généralement utilisé que pour vérifier la précision des classificateurs de cellules.



Notes View (Affichage Notes) (Interphase)

Un clic sur l'icône **Notes** remplace l'affichage Navigator par un tableau de données contenant des informations et les mesures de chacune des miniatures affichées dans la fenêtre principale.

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

La plupart des colonnes du tableau contiennent des mesures calculées à partir du traitement de l'image effectué sur les miniatures.

- Chaque colonne peut être utilisée pour classer/trier les images miniatures affichées à l'écran et liée au modèle de lame en tant qu'ordre de classement pour l'acquisition automatique en mode Probe standard.
- Les mesures n'ont pas de corrélation directe avec la qualité des cellules et ne sont utiles que pour l'apprentissage des classificateurs.

Les colonnes les plus pertinentes pour l'utilisation en interphase sont :

- **Cell ID** (Identification des cellules). Chaque cellule est numérotée dans l'ordre de détection pendant la numérisation. Ce numéro devient le numéro d'identification unique de la cellule, qui ne peut pas être supprimé ou modifié, indépendamment du classement utilisé. Ce numéro fait partie du nom de la cellule pour toute créée à partir d'un mode acquisition automatique **Probe**.

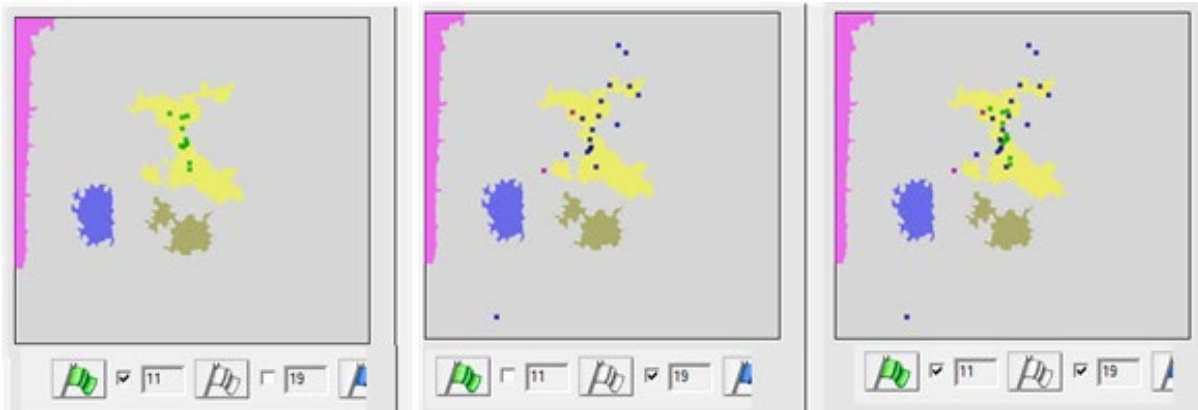
- **EF.** Affiche la position England Finder unique pour chaque cellule, tel qu'elle est utilisée pour les options d'acquisition automatique et les fonctions de conversion des coordonnées. Cette position est incluse dans le nom de la cellule pour toute image créée à partir d'un mode d'acquisition automatique **Probe** et enregistrée en tant que métadonnées dans un framelist **ProbeAuto** et affichée dans l'écran Frame View.
- **Surface.** Surface de la cellule en pixels. Utile pour déterminer si le réglage de la zone Min ou Max est nécessaire dans le modèle de numérisation.
- **Circ.** Circularité, une option de tri potentielle pour l'acquisition automatique **Probe** en interphase.



Slide View (Affichage Lame) (Interphase)

En cliquant sur l'icône **Slide (Lame)**, l'affichage Navigateur ou Notes est remplacée par un graphique de la lame montrant la zone de numérisation et une indication des cellules qui ont été identifiées au cours d'une numérisation.

En masquant ou en affichant les différentes images miniatures de la numérisation, les positions des cellules seront affichées en superposition sur le graphique de la lame.



Classificateurs de numérisation

Le logiciel-application comprend des classificateurs par défaut *FIMetaphase* et *FLInterphase* pour les échantillons fluorescents.



Les classificateurs sont affectés à un modèle de numérisation pour les numérisations de routine, créant une liste d'acquisition des cellules marquées avec un indicateur vert.

- Le système permet également l'application de classificateurs différents dans l'écran Review à tout moment, quel que soit le classificateur utilisé pour la numérisation d'origine.
- Cliquer sur Apply Classifier (Appliquer le classificateur) dans la barre d'outils principale. Une liste de classificateurs de l'utilisateur est présentée.
- Sélectionner le classificateur à utiliser et cliquer sur OK. Les miniatures de l'écran Review sont retraitées en utilisant les paramètres du nouveau classificateur, avec sélection automatique par indicateur vert des cellules qui correspondent le mieux aux images utilisées pour l'apprentissage du classificateur.
- De cette façon, une liste de numérisation peut être reclassifiée à tout moment sans avoir à refaire une numérisation de la lame. Ceci est particulièrement utile lors de l'apprentissage initial sur le système et l'évaluation d'un nouveau classificateur.

Il n'est normalement pas nécessaire de mettre à jour ou de former de nouveaux classificateurs pour la numérisation FISH, bien que cela soit facultatif pour tester ou prendre en compte la gamme attendue de variations d'échantillons rencontrées lors de la préparation des lames entre différents sites d'utilisateurs finaux.

- Il est recommandé d'ajouter (**Append**) au classificateur existant des images additionnelles provenant des numérisations effectuées après l'installation du système, afin d'optimiser davantage les classificateurs, ou de créer de nouveaux classificateurs en utilisant uniquement les données de numérisation des échantillons des utilisateurs.
- Pour les échantillons de métaphase FISH, ceci permet d'adapter l'éventail prévu de variation d'échantillon rencontré pendant la préparation des lames entre différents sites d'utilisateurs finaux.

Directives pour l'apprentissage et la modification des classificateurs



Lorsque vous « Formez » un classificateur à partir d'une liste de lames (numérisation), toutes les cellules actuellement dans les classes Vertes ou Blanches sont placées dans le classificateur sélectionné.

- Assurez-vous que seules les cellules que vous souhaitez et que vous avez examinées sont présentes dans les classes Vertes ou Blanches (l'ajout de zéro cellules dans la classe verte ou blanche est acceptable).
- Les cellules avec indicateur Bleu et Rouge d'une liste de numérisation ne sont pas ajoutées à un classificateur, mais vous pouvez déplacer les cellules en bleu ou en rouge lors de la modification ultérieure du classificateur afin d'éviter que leurs données ne soient utilisées.
- Les cellules bleues ne sont pas utilisées par le traitement de l'image. Vous pouvez donc y placer n'importe quelle cellule et la déplacer entre le vert et le blanc dans le cadre d'un test pour en voir les effets.
- Une fois qu'une cellule est placée dans la classe rouge, elle sera supprimée si le classificateur est sauvegardé (à moins qu'elle ne porte une icône de caméra, ce qui indique qu'elle a été capturée automatiquement avant d'être ajoutée au classificateur).

Des exemples de bonnes (vertes) et de mauvaises (blanches) cellules sont nécessaires pour la précision, pendant la modification d'un classificateur, vérifiez que ;

- L'indicateur vert ne contient pas d'images avec des amas de cellules ou des débris importants/intenses.
- L'indicateur blanc contient des images de « non-cellules » (débris, marques, intensité de coloration atypique, amas, artefacts, etc.)
- La classe blanche ne contient pas de « bonnes » cellules.

Erreurs courantes dans l'apprentissage des classificateurs.

1. Lors de l'apprentissage des classificateurs, toutes les images des indicateurs blancs n'ont pas été déplacées dans la classe d'indicateurs bleus (en attente) avant la sélection de cellules vertes et blanches spécifiques.
 - Le classificateur contient trop de cellules blanches, plus du double du nombre de cellules vertes.
 - Le classificateur a de bonnes cellules dans la classe des indicateurs blancs.
2. Lors de l'apprentissage des classificateurs, seules les bonnes cellules ont été prises en compte et aucune cellule blanche n'a été ajoutée.
 - Le classificateur n'a que des cellules à indicateur vert, ou plus du double du nombre de cellules à indicateur blanc.
3. Les cellules sélectionnées comme « bonnes » pour l'apprentissage n'ont pas été vérifiées pour la présence d'objets d'arrière-plan ou de débris dans la « boîte d'acquisition » affichée dans l'image miniature. Tout ce qui se trouve à l'intérieur de la limite ajoute ses mesures aux données cellulaires et peut diluer les valeurs réelles d'interphase ou de métaphase des données d'apprentissage.
 - L'indicateur vert contient des cellules présentant une variation extrême de la métaphase.
 - L'indicateur vert contient des images avec de gros noyaux sombres à l'intérieur de la boîte d'acquisition.

Remarque : Les classificateurs de métaphase sont plus sensibles à ces problèmes que les classificateurs d'interphase.

Apprentissage (ajout) des classificateurs

Pour mettre à jour ou créer un nouveau classificateur, utiliser des lames portant des cellules typiques du type d'échantillon.



- Effectuer une numérisation en utilisant le classificateur **Everything (Tout)**
- Accéder à l'écran **Review** et ouvrir le dossier, en chargeant la liste des métaphases.
- Sélectionner toutes les cellules avec **Select All** et les marquer comme **Nonspecific (indicateur bleu)**. Ceci empêche d'ajouter par inadvertance des cellules inappropriées au classificateur.
- Sélectionner 5 à 15 images miniatures de la qualité souhaitée (« bonnes » cellules) et les marquer avec un **indicateur vert**. Il ne faut pas en ajouter davantage en provenance d'une lame, car cela pourrait biaiser artificiellement le classificateur.
- Sélectionner un nombre équivalent d'images à utiliser comme exemples de « mauvaises » cellules dans le classificateur et les marquer avec un **indicateur blanc (Unclassified, ou non classées)**.
Il doit s'agir de vignettes qui ne contiennent pas de débris importants/intenses ni de bonnes cellules.
- Confirmer que seules les cellules que vous avez choisies se trouvent dans chacune des catégories verte et blanche.

- Cliquez sur **Train (icône du tableau)** ;
 - Pour créer un *nouveau* classificateur, sélectionnez **New** (Nouveau) et entrez un nom pour le classificateur dans le champ **Current selection** (Sélection actuelle).
 - Pour *mettre à jour* un classificateur actuel, sélectionnez **Existing** (Existant) et **ajoutez** les nouvelles cellules au classificateur actuel (**ne pas écraser**, sauf si vous souhaitez remplacer complètement les données de l'ancien classificateur tout en conservant son nom).
- Cliquer sur **OK**. Le classificateur est créé et le système affiche la liste de miniatures pour la liste de numérisation chargée.
- Répéter jusqu'à ce qu'il y ait 100 à 200 cellules vertes et blanches pour le fonctionnement de routine du classificateur, pour chaque type d'échantillon distinct.

Modification des classificateurs



Un classificateur est effectivement une liste de numérisation provenant de dossiers multiples, contenant toutes les images marquées en vert et en blanc qui ont été utilisées pour le créer et l'actualiser. Il est possible d'examiner et de modifier le contenu du classificateur pour garantir que le nombre et la qualité des images utilisées sont corrects.

- Cliquer sur l'icône **Edit** (Modifier).
- Sélectionner le classificateur souhaité : les boutons **Delete** (supprimer) et **OK** sont activés.
- (La sélection de **Delete** (Supprimer) affiche un message de confirmation indiquant que ceci supprimera le classificateur et toutes ses données de façon permanente)
- Sélectionner **OK** pour charger les images miniatures du classificateur (si une liste de lames active est ouverte, le système demandera de l'enregistrer avant de voir les images du classificateur)
- Examiner ou modifier les images miniatures, comme il convient.
- Sélectionner **Save** (Enregistrer) pour fermer l'affichage des miniatures et enregistrer les modifications effectuées.

Le classificateur peut être modifié de la même manière que n'importe quelle liste de numérisation, les cellules peuvent être reclassées pour n'importe laquelle des 4 classes de couleur,

- Seules les catégories avec indicateurs vert et blanc sont utilisées pour les paramètres du classificateur.
- La classe des indicateurs bleus sera disponible pour des modifications ultérieures mais ne sera pas utilisée dans le fonctionnement du classificateur.
- Les cellules marquées d'un indicateur rouge (à l'exception de celles qui ont été enregistrées en mode capture automatique) seront définitivement supprimées lors de l'enregistrement.

Tri par Nearest Neighbour pour l'acquisition automatique

Le tri des cellules dans un classificateur permet d'utiliser l'option de classement du plus proche voisin (*Nearest Neighbour*) dans le modèle de lame.

- Ceci est destiné à être utilisé avec des échantillons en métaphase, veuillez vous référer au **Mode d'emploi de CytoVision DX Karyotyper**.

Auto Capture (Acquisition automatique)

Pour plus d'informations sur la configuration de la caméra et de l'acquisition, reportez-vous à la section [FISH Capture \(Acquisition FISH\) \(Manual\)](#).

Auto Capture (Acquisition automatique)



L'acquisition automatique démarre après la numérisation en 10x et la classification des cellules.

- Les cellules classées (indicateur vert) sont cartographiées dans la zone de numérisation, puis utilisées pour calculer les cellules à capturer (mode **Probe**) ou pour sélectionner les zones (images) contenant les cellules à capturer (modes **ProbeAuto** et **SpotCounting**).
- L'application passe automatiquement à l'écran d'acquisition, se déplace vers la première cellule ou la première image et lance le processus d'acquisition, en affichant un panneau de progression de l'acquisition automatique.
- Une fois que le nombre correct de cellules a été capturé, le système passe à la lame suivante.
- Un bouton **Pause** dans le panneau de progression de l'acquisition automatique peut être utilisé pour permettre une interaction manuelle avec les paramètres de la caméra ou du filtre (ce qui n'est généralement pas nécessaire).
- En cas de pause, le bouton **Suivant** (lame) peut être utilisé si l'acquisition de la lame en cours n'est pas nécessaire, ou le bouton **Arrêter** (lot) peut être utilisé pour sauter toutes les lames restantes.

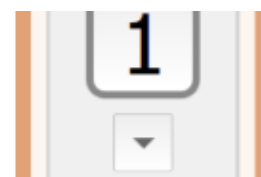
Options d'acquisition automatique (Auto-capture)

Le mode d'acquisition automatique **Probe** est lié aux options des modèles de personnalisation (**Options de post-acquisition**). Les règles typiques de l'acquisition automatique sont :

- Auto-camera setup (Configuration automatique de la caméra)
- Auto-Threshold (Seuil automatique)
- Zero Threshold (Seuil zéro)
- Contrast Stretch (Étendre le contraste)
- Save Raw Image (Sauver l'image brute)

Capture différée manuelle

Toute lame ayant une *liste de numérisation* peut être capturée automatiquement en lançant une « Acquisition manuelle différée » (Manual Deferred Capture) ;



- Ouvrir la fenêtre Scan Setup et attribuer le nom du dossier à la lame.
- Cliquer sur la flèche de sélection Deferred Capture (Capture différée).
- La section **Acquisition** (Capture) montre les lames du dossier ayant une liste de numérisation sélectionnable pour l'acquisition automatique. Sélectionner la liste adéquate pour la lame dans le système GSL.
- (Facultatif) Cliquer sur **Set Offset** (Décalage) pour charger le plateau et régler un décalage manuel pour les cellules faiblement agrandies qui seront affichées. Après le réglage, fermer la fenêtre.
- Cliquer sur **Scan** pour démarrer le processus d'acquisition automatique comme indiqué ci-dessus.

REMARQUE : les lames qui ont été enlevées de la platine après la numérisation nécessiteront un **Set Offset** (Décalage de configuration), car il est très peu probable que la lame occupe la même position sur le plateau que lorsqu'elle a été numérisée.

- « L'acquisition manuelle différée » (Manual Deferred Capture) n'est pas une procédure prévue pour plusieurs lames à la fois ou pour une utilisation de routine du flux de travail des échantillons fluorescents.

Acquisition Probe (Probe Capture) (images des cellules)



L'écran d'acquisition manuelle standard contient des outils permettant d'interagir avec la caméra, le matériel du microscope motorisé et les paramètres pour visualiser et capturer une image en mode Probe dans un dossier de cellules dans le Navigateur.

Sur un système GSL, il est nécessaire d'utiliser le flux de travail d'acquisition manuelle standard pour confirmer la réponse du matériel, configurer les paramètres logiciels optimaux pour la qualité de l'image, créer une liste de fluorochromes et enregistrer les « options de post-acquisition » (modèles de personnalisation de l'acquisition) utilisées dans l'acquisition automatique.

Au démarrage, l'écran Capture (Acquisition) passe par défaut au mode d'acquisition sélectionné en dernier. Pour vérifier ou changer ce réglage, utiliser le bouton **Mode d'acquisition** (Capture Mode).

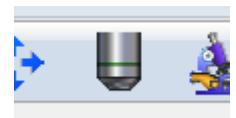


- **Probe** – pour la configuration, le test et l'acquisition manuelle d'images de lames de métaphases, d'interphases ou de cellules colorées par fluorescence avec un ou plusieurs canaux de sondes ADN.
- **Spot Counting** - pour l'acquisition manuelle d'images du matériel interphasique ou cellulaire coloré par fluorescence avec un ou plusieurs canaux de sonde ADN. Les images sont sauvegardées sous format framelist avec un traitement d'image automatisé à l'aide d'un Test ponctuel (Spot Assay).
- **M-FISH** - pour l'acquisition manuelle de cellules en métaphase sur lame colorée par fluorescence avec plusieurs canaux de sonde ADN dans une combinaison spécifique de chromosomes pour l'analyse du caryotype.

Les systèmes *CytoVision DX* utilisent une caméra monochrome pour acquérir les images. Pour créer l'affichage de l'image couleur de Probe, les différents fluorochromes de la lame doivent être capturés, pseudo-colorés et superposés les uns sur les autres, produisant ainsi une image composite couleur multi-canaux.

- Chaque canal de fluorochrome séparé doit avoir des valeurs prédéfinies pour la couleur et le filtre du microscope, qui sont définies et sauvegardées dans le panneau de sélection des fluorochromes (*Fluorochrome Selection*).

Contrôle de l'objectif



Lors de l'acquisition manuelle, l'application utilise la position de l'objectif du microscope à partir du panneau « Objectifs » pour mettre à jour le grossissement.

Lorsque l'application démarre, il utilise par défaut l'objectif configuré à la position 1. Sur les microscopes motorisés, il s'agit de l'objectif 10x.

- Si le pavé tactile de l'écran LCD du microscope est utilisé pour changer d'objectif, le logiciel n'identifiera pas que le grossissement a changé et utilisera toujours la valeur de la position 1.
- Pour tout travail d'acquisition manuelle, vous devez également/uniquement changer l'objectif à l'aide du panneau *Objectifs* avant l'acquisition. Ainsi, cette valeur ne sera pas mal interprétée.
- Un message d'avertissement apparaîtra à l'écran si un grossissement inattendu de l'objectif est encore défini lorsque la procédure d'acquisition est lancée.

Acquisition Probe : Présentation de la procédure

- **New Cell** (Nouvelle cellule). Crée une cellule vide dans le **Navigateur**, prête pour l'acquisition.
 - **Live** (en direct). Affiche l'image prise par la caméra dans la fenêtre d'affichage principale.
 - se déplace automatiquement vers le filtre du microscope pour le fluorochrome sélectionné
 - active l'obturateur fluorescent pour éclairer la lame.
 - **Capture**. Acquiert l'image en direct et l'envoie pour [Seuillage facultatif](#).
1. Sélectionner le dossier et la lame dans le navigateur et cliquer sur **New Cell (Nouvelle cellule)**.
 2. Créer ou charger une **liste de fluorochromes** préenregistrée correspondant à l'échantillon.
 3. Repérer la zone de l'échantillon sur la lame de microscope et cliquer sur **Live**
 4. Régler la caméra (Auto Setup), vérifier l'image affichée et cliquer sur **Capture**.
 5. (Facultatif) **Seuil** pour supprimer le fond sombre autour des images.
 6. Appuyer sur **Live** pour le canal fluorochrome suivant sur la lame.
 7. Régler la caméra (Auto Setup), vérifier l'image affichée et cliquer sur **Capture**.
 8. Répéter l'opération pour tous les canaux fluorochromes restants.
 9. Cliquez sur **New Cell** pour passer à l'image suivante.

Ne pas...

- ... déplacer l'objectif à la main sans utiliser le panneau **Objectifs** pour confirmer le grossissement correct de l'objectif d'acquisition.
- ... ajuster manuellement l'exposition - laisser le système la calculer avec la fonction **Auto-setup**.
- ... déplacer la platine ou faire la mise au point avant d'avoir terminé tous les canaux de la liste des fluorochromes.

Commandes d'acquisition

Le système présente l'image Live dans la fenêtre d'affichage principale de l'écran Capture. Les boutons de flux de travail des commandes d'acquisition sont situées sous cette image

- Lorsque le mode d'acquisition Probe est sélectionné, le panneau de **sélection des fluorochromes** s'ouvre pour sélectionner ou créer des listes d'acquisition.
- Pour chaque fluorochrome, le panneau Capture Setup (Configuration de l'acquisition) permet d'accéder aux commandes de la caméra, du filtre et de la lampe fluorescente.

New Cell (Nouvelle cellule) et Live

Le bouton New Cell (Nouvelle cellule) crée un nouveau dossier dans le dossier où l'image sera sauvegardée.

Une fois l'image localisée, le bouton **Live** affiche la caméra dans la fenêtre principale en utilisant les paramètres configurés du filtre du microscope et de la lampe/obturateur fluorescents.

- Si nécessaire, déplacer la platine du microscope pour positionner l'échantillon au centre de la fenêtre principale et s'assurer qu'il est net.

Camera Auto-Setup (Configuration automatique de la caméra)

L'acquisition de routine doit être effectuée à l'aide de la configuration automatique de la caméra afin d'optimiser l'exposition de la caméra et la plage de contraste affichée dans l'image.

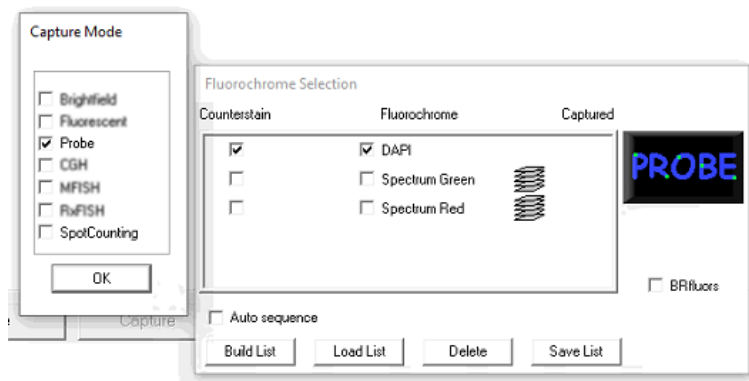
- Les valeurs finales de l'image seront basées sur l'intensité de la fluorescence, déterminée par la qualité de l'échantillon, le type de filtre et la source de lumière fluorescente.
- Tout badigeon rouge ou bleu visible sur l'image indique une saturation des couleurs. Pour l'acquisition FISH, il est recommandé d'avoir une légère saturation rouge dans le matériel de l'échantillon (contre-coloration ou signaux) avec le fond sombre ou avec juste une petite quantité de saturation bleue pour améliorer le contraste.
- La quantité de saturation rouge/bleue dans l'image en direct est modifiée à l'aide du panneau **Autosettings** (réglages automatiques) dans Capture Setup (configuration de l'acquisition).

L'activation peut être manuelle, en cochant la case adjacente à la barre du contraste, ou s'effectuer à l'aide de la fonction « Customize » (personnaliser) **Auto-camera setup** (Configuration automatique de la caméra), qui lance le réglage de la caméra dès que l'utilisateur appuie sur le bouton **Live**.

- L'application de toute valeur d'**Auto Settings** est immédiate.
- La configuration automatique (**Auto Setup**) échouera si la lumière de fluorescence est éteinte ou réglée sur une très faible intensité, ce qui doit être vérifié.
- La configuration automatique (**Auto Setup**) peut échouer si le signal de fluorescence sur l'échantillon a une faible intensité ou un faible contraste.

Capture lists (Listes d'acquisition)

Le mode d'acquisition Probe ouvre un panneau de **sélection des fluorochromes** utilisé pour la configuration et l'acquisition.

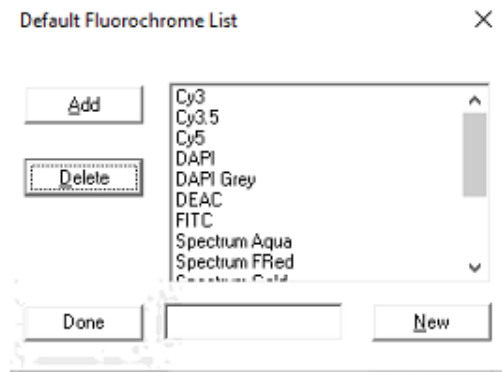


Vous pouvez y établir une liste des fluorochromes présents sur la lame et sélectionner le contre-colorant (par exemple, DAPI) requis par l'application pendant le processus d'acquisition et pour les travaux d'analyse ultérieurs.

Pour ajouter de nouveaux fluorochromes à la liste d'acquisition, sélectionnez la commande Créer une liste (**Build List**). Une boîte de menu contenant une liste de fluorochromes préprogrammés disponibles s'affiche.

Cliquer sur les fluorochromes que vous souhaitez ajouter à votre liste d'acquisition et sélectionner « **Ajouter** » pour chacun d'entre eux.

- Créez la liste dans l'ordre dans lequel vous souhaitez capturer la cellule, en commençant par le contre-teinture.
- Cocher la case correspondant au bon **contre-colorant**.
- Pour chaque nom de fluorochrome, vérifier et modifier les paramètres si nécessaire dans le panneau *Capture and Fluorochrome Setup* (Configuration de l'acquisition et des fluorochromes).
- Utilisez **Save List** (Enregistrer une liste) pour créer une liste de fluorochromes qui peut être liée à un modèle de numérisation pour les modes d'acquisition **Probe** et **ProbeAuto**.



Remarque : Si vous souhaitez conserver les valeurs de configuration ajustées, vous devrez utiliser **Enregistrer une liste** après les ajustements.

Configuration de l'acquisition et des fluorochromes



La configuration de l'acquisition ouvre une fenêtre des commandes de la caméra et du matériel. Cocher la case *Advanced* (Avancé) qui donne accès aux positions des filtres dichroïques et aux commandes avancées de la caméra afin de modifier les réglages.

- **Color (couleur)** : Définit la couleur de superposition pour le fluorochrome utilisé pendant l'acquisition.
- **Dichroic** (Dichroïque) : Configure le filtre de microscope utilisé pendant l'acquisition du fluorochrome.



Ces deux paramètres doivent être définis et enregistrés à l'aide de l'option « Save as Default » (Enregistrer par défaut) avant toute opération d'acquisition manuelle ou automatique pour chaque fluorochrome à utiliser dans une liste d'acquisition ou un Test ponctuel.

Curseurs de la caméra

Le gain, le décalage et l'exposition sont réglés automatiquement par la **Configuration automatique** ou peuvent être visualisés et modifiés manuellement à l'aide des trois barres de défilement.



Un ajustement manuel des curseurs (au moyen de la fenêtre **Capture Setup**) n'est normalement pas nécessaire, sauf en cas d'échec d'**Auto Setup** ou si l'image contient un excès d'objets en arrière-plan, qui peuvent faire disparaître le contraste de la cellule ou des signaux :

Luminosité (gain de la caméra).

- Si plus (ou moins) de saturation rouge est requise dans une image individuelle, on peut faire le réglage manuellement avec le curseur Bright (Clair).
- Toutes les zones rouges de l'affichage en direct seront sauvegardées en blanc dans l'image capturée avant l'application de la pseudo-couleur.

- La saturation en rouge des signaux de sonde peut améliorer l'affichage des couleurs et les rendre plus « intenses », ce qui est utile pour l'affichage visuel des signaux.
- Une saturation excessive entraînera la perte de toutes les informations relatives ou quantitatives utiles pour une analyse ultérieure (par exemple, les bandes de DAPI dans les chromosomes en métaphase).

Noir (décalage de la caméra).

- Si plus (ou moins) de saturation bleue est requise dans une image en particulier, on peut faire le réglage manuellement avec le curseur Black (Noir).
- Toutes les zones bleues de l'affichage en direct seront sauvegardées en noir dans l'image capturée.
- La saturation en bleu dans l'arrière-plan sombre de l'image améliorera le contraste de l'image finale, mais ne devrait pas s'étendre à l'ensemble de l'image.

Exposition (intégration de la caméra).

- Un ajustement manuel de la barre coulissante de l'exposition pour l'acquisition de routine n'est pas recommandé ; il faut toujours utiliser la **configuration automatique** pour trouver la meilleure exposition.
- Pour les échantillons en fluorescence, l'exposition maximale dépend de l'intensité, mais doit être supérieure à 0,005 (5ms).

Auto-Setting (Paramètres auto)

Auto-settings sert à modifier les résultats de l'**Auto-setup** (configuration auto) de la caméra afin d'exagérer la saturation bleue ou rouge de l'image en direct finale. Les canaux fluorochromes individuels peuvent être réglés séparément selon les besoins.

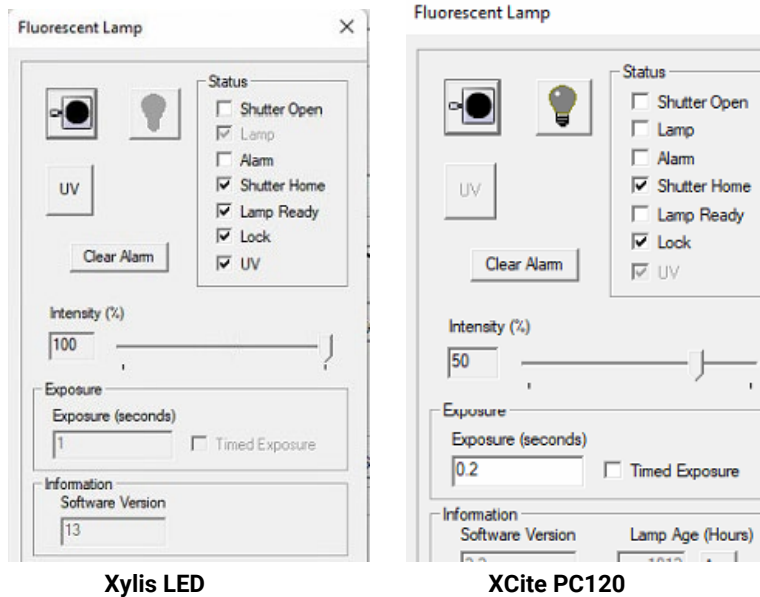
Pour améliorer l'affichage de l'intensité des images FISH, les valeurs suggérées sont les suivantes :

- Ajuster la valeur maximale de rouge Max (red) entre **(+) 3 - 5**, ce qui augmente l'intensité du signal.
- Ajuster la valeur minimale Min (bleu) à **(+) 0,5**, pour assombrir le bruit de fond.

Configuration de la lampe fluorescente

Le panneau de contrôle de la lampe fluorescente Xylis/X-Cite peut être ouvert en cliquant sur l'icône de la lampe dans le panneau de configuration de l'acquisition (l'option « Advanced » doit être activée pour voir ce panneau).





Xylis LED

XCite PC120

Le panneau de la lampe fluorescente peut être utilisé pour vérifier le fonctionnement de la lampe au cours d'une procédure d'acquisition manuelle.

- Le bouton d'obturation (Shutter button) sur ce panneau fonctionne comme une bascule pour ouvrir et fermer l'obturateur.
- Les commandes d'exposition indiquent l'intensité de la lampe et les temps d'exposition.
 - La lampe est généralement utilisée à une intensité de 100 % pour les travaux de routine de numérisation et d'acquisition FISH.
- Les cases à cocher *Status* indiquent l'état des différentes parties de la lampe.

Les systèmes utilisant une unité XCite PC 120 disposent également d'un contrôle de la lampe ;

- Le bouton Lampe permet d'allumer ou d'éteindre la lampe.
- L'icône est jaune lorsque la lampe est allumée et prête à être utilisée.
- Lorsque l'icône est grise, la lampe est éteinte et en « veille » (elle apparaît sous la forme d'une « ampoule » sur l'écran LCD situé à l'avant du contrôleur de lampe). Elle sera activée automatiquement lors d'une numérisation, mais devra être allumée manuellement pour être utilisée dans l'écran d'acquisition.

Si vous exécutez un lot de numérisation et d'acquisition automatique des lames FISH sans surveillance, vous pouvez configurer l'application pour qu'elle éteigne automatiquement la lampe XCite à la fin du lot ;

- Accédez à l'écran **Scan** (Numérisation) et sélectionnez le menu Utilities (Utilitaires).
- Les informations indiquent le réglage actuel du système ;
 - « Laisser la lampe fluorescente allumée après le lot » ou « Éteindre la lampe fluorescente après le lot ».
- Si vous cliquez sur le texte, il passera à l'autre réglage (qui s'affichera alors).

Z-stack

L'empilement en Z (**Z-Stack**) est utilisé pour capturer les signaux de la sonde dans différents plans focaux.

Pendant l'acquisition, le point focal de la contre-coloration (DAPI) est utilisé comme centre de la plage focale pour chaque capture de fluorochrome, le moteur de mise au point déplaçant la distance d'espacement entre chaque empilement.

- L'image finale est enregistrée avec les empilements fusionnés en une seule couche **Projection maximale**.
- Il n'est pas possible de revoir l'empilement des images individuelles après l'acquisition. Si cela est nécessaire, les images FISH doivent être capturées dans un framelist en utilisant le mode Spot Counting manuel ou le mode *Image Frame* Probe Capture pour être affichées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images distinct compatible avec le format « framelist ».

Pour configurer un fluorochrome pour l'acquisition Z-Stack, cliquez sur **Z-Stack** dans la boîte de dialogue Configuration de l'acquisition et des fluorochromes (*Capture and Fluorochrome Setup*).

- La boîte de dialogue Z-Stack s'ouvre.
- Choisissez le **nombre de plans** et l'**espacement** entre eux. L'espacement est donné en micromètres avec des incréments de 0,1µm.
- Pour supprimer un empilement Z, réglez le **nombre de plans** sur 0 (**l'empilement Z est désactivée**).
- Cliquez sur **Appliquer** pour terminer.



Remarque : Pour l'acquisition manuelle en mode Spot Counting, les paramètres de l'empilement Z sont créés à partir des paramètres du Test ponctuel configurés séparément.

Personnaliser l'acquisition



Quand la procédure d'acquisition de base est comprise, utilisez les options **Customize** (Personnaliser) pour modifier le niveau d'interaction requis de la part de l'utilisateur.

Options de routine d'acquisition Probe :

Réglages recommandés :

- **Auto-camera Setup (configuration caméra automatique)** - lance l'**Auto-Setup** de la caméra lorsque l'utilisateur sélectionne le bouton Live.
- **Auto-Threshold** (Seuil automatique) - Permet d'ignorer le seuillage manuel (suppression de l'arrière-plan) et d'utiliser les paramètres de **seuil zéro** ou de **prédiction (Zero- or Predict Threshold)**.
- Cette option doit être activée pour les modèles enregistrés utilisés dans l'acquisition automatique Probe du GSL et utilisés en même temps que l'option **Save Raw Image** (Enregistrer l'image brute).
- **Zero-Threshold (Seuil zéro)** – Ne supprime pas l'arrière-plan de l'image autour des données de l'image en direct, créant ainsi un seul bloc d'image. Cette fonction est appliquée automatiquement si l'option **Auto-Threshold** (Seuil automatique) est utilisée et est optimale pour l'acquisition rapide des FISH en interphase.
- **Probe Background Cut** (découpe d'arrière-plan de Probe) - améliore l'affichage des signaux FISH en interphase par rapport à l'arrière-plan.
- **Contrast Stretch (Étendre le contraste)** - normalise l'image finale enregistrée pour améliorer l'affichage. Cette option doit toujours être utilisée pour les images où le seuillage est utilisé, afin d'éviter que les bords des objets restants n'apparaissent artificiellement intenses.

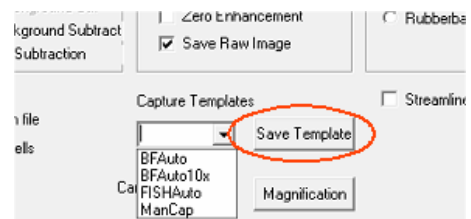
- **Save Raw Image** (Enregistrer l'image brute) - Crée un fichier image distinct pour chaque canal de fluorescence capturé.
L'image brute est dépourvue de suppression d'arrière-plan et d'amélioration et peut être « recapturée » au moyen de l'icône Threshold (Seuil) de la barre d'outils principale.
- Ce re-seuillage peut être utile pour les images de métaphase ou d'interphase lorsque vous souhaitez séparer des objets individuels pour améliorer l'image ou la copier sur un écran flexible, ou pour réaliser un caryotype avec Probe.
- Il est recommandé d'enregistrer l'image brute pour l'acquisition **Probe**, en particulier si **Auto-Threshold** (seuil automatique) est utilisé.
- L'accès aux données d'image non traitées peut également être une exigence du laboratoire local.

Réglages optionnels ;

- **Auto Sequence** (Séquence automatique) - Après l'acquisition de l'image de la contre-coloration (DAPI), l'acquisition se poursuit sans qu'il soit nécessaire d'appuyer sur « Live » ou « Capture » pour les autres canaux de sonde.
- **Predict Threshold** (Seuil prédictif) - Estime un seuil approprié pour supprimer l'arrière-plan autour des objets de l'image. Cette fonction est appliquée automatiquement si l'option **Auto-Threshold** (Seuil automatique) est utilisée et est optimale pour les chromosomes en métaphase lorsqu'un caryotypage par sonde est nécessaire.
- **Auto Register Images** (Enregistrement automatique des images) - Capture les images de la sonde avec un décalage X/Y réglable par rapport à l'image DAPI (contre-coloration), afin de compenser tout décalage optique ou de filtre.
- Cette fonction ne devrait pas être utilisée, sauf en cas de problème optique lié à un cube de filtre ou à l'alignement du trajet optique du microscope.
- **Auto Focus Offset** (Décalage de mise au point automatique) - Lorsque cette option est activée, les mouvements de mise au point que vous effectuez à l'aide de la barre de défilement de la mise au point lors d'une acquisition manuelle sont enregistrés par rapport à la contre-coloration et appliqués automatiquement aux acquisitions suivantes. Les décalages sont enregistrés dans la liste des fluorochromes
Note : Non utilisé par l'acquisition automatique Spot Counting dans le cadre d'un modèle de numérisation.

Les meilleurs réglages à utiliser dépendent du type d'échantillon. Utiliser le bouton **Save Template (Enregistrer modèle)** pour attribuer des noms de routine aux réglages ;

- Dans les systèmes de numérisation GSL, ils sont utilisés en tant qu'**options de post-acquisition** durant l'acquisition automatique de Probe.



Grossissement

Les paramètres de **grossissement** sont nécessaires pour créer un facteur d'échelle d'image précis lors de l'acquisition.

- L'**objectif d'acquisition** utilise la position de l'objectif du microscope (pour l'acquisition FISH, il devrait être de 63x).
- La valeur de la monture C (C-Mount) doit être définie pour qu'elle corresponde au connecteur de monture C présent sur la caméra (1x par défaut).

En combinaison, ces deux valeurs calculent l'échelle de l'objet et la résolution d'affichage, utilisées pour calculer la taille des objets utilisés dans le caryotypage en métaphase par FISH et la taille des signaux *framelist*.



L'acquisition manuelle utilise la position de l'objectif du microscope qui est définie dans le panneau **Objectifs** pour mettre à jour le grossissement.

- Cette position est configurée dans l'application **Microscope Calibration** (Étalonnage du microscope) par le module « Objectifs ».
- Les microscopes avec revolver à objectifs motorisé doivent être configurés pour toutes les positions physiques disponibles sur le microscope. (Standard sur les systèmes GSL).

Des valeurs incorrectes entraîneront des erreurs de classification du caryogramme ou d'affichage de la taille du signal ;

Si une acquisition manuelle est tentée avec un objectif d'acquisition à faible grossissement, un message d'avertissement s'affiche lorsque le bouton **Live** est enfoncé - sélectionnez « Continuer » et passez à l'objectif correct à l'aide des commandes du logiciel avant d'appuyer sur **Capture**.

Cela peut être causé par le déplacement manuel de l'objectif du microscope (ou par l'écran tactile LCD) sans utiliser la commande des **objectifs** de l'application pour régler le grossissement correct.

- Lorsque l'application démarre, il utilise par défaut l'objectif configuré à la position 1
- Si le pavé tactile de l'écran LCD du microscope est utilisé pour changer d'objectif, le logiciel n'identifiera pas que le grossissement a changé et utilisera toujours la valeur de la position 1.
- Pour tout travail d'acquisition manuelle, vous devez également/uniquement changer l'objectif à l'aide du panneau *Objectifs* avant l'acquisition. Ainsi, cette valeur ne sera pas mal interprétée.

Remarque : La position correcte de l'objectif sera ajustée automatiquement dans le cadre de l'acquisition automatique GSL et l'échelle de l'objet est calculée à l'aide de la composante « Échelles d'image » (Image Scales) de l'**étalonnage spatial** pour l'objectif sélectionné.

Seuil

Le seuillage est facultatif pour l'acquisition Probe (et est désactivé pour Spot Capture et M-FISH).

- Un nouveau seuillage peut être effectué sur les images brutes après l'acquisition pour mettre à jour l'image Probe.
- Si l'option **Auto-Threshold** (Seuil automatique) est inactive dans les paramètres **Customize** (Personnaliser), la fenêtre Threshold (Seuil) apparaît lors de l'acquisition (**Capture**) manuelle.

Le seuillage des images de sonde est similaire au seuillage des métaphases en fond clair. La différence est que lors du seuillage des sondes, toute zone non couverte par le masque bleu se verra appliquer la couleur choisie pour ce fluorochrome.

Des valeurs de seuil trop faibles peuvent entraîner des signaux irréguliers importants. Le bruit de fond et les débris peuvent également rendre le seuillage difficile, c'est pourquoi il existe des outils supplémentaires pour le seuillage lors de l'acquisition de la sonde.

- **Counterstain Mask** (masque de contre-coloration) élimine toutes les parties de l'image qui ne contiennent pas de contre-coloration. C'est un bon outil à utiliser si vous avez beaucoup de bruit de fond.
- **Region of Interest** (Région d'intérêt) vous permet de définir une ou plusieurs zones pour le seuillage. C'est un bon outil pour isoler les petits signaux des artefacts ou des débris.

Remarque : Les améliorations d'acquisition (Capture Enhancements) ne sont pas censées être utilisées lors de l'acquisition manuelle d'images Probe, sauf pour les images de métaphase où les bandes DAPI sont utiles pour l'interprétation de l'image ou le caryotypage.

- Pour plus de détails sur les options de seuillage manuel standard, veuillez vous référer au manuel **Mode d'emploi de Karyotyper** et consulter l'Aide de l'application.

Seuillage automatique

Si l'option **Auto-Threshold** (Seuil automatique) est active dans les paramètres Customize (Personnaliser), la fenêtre Threshold (Seuil) n'apparaît pas lorsque l'image en direct est capturée. C'est le fonctionnement attendu d'un système de numérisation GSL.

- Le système utilise la valeur de **Predict Threshold** (Prédire le seuil) ou de **Zero Threshold** (Seuil zéro) pour supprimer le fond. Cela fonctionne généralement pour les images de fluorescence avec un faible fond de lame.
- Les améliorations sont appliquées à l'aide des paramètres du modèle d'acquisition enregistré ou vous pouvez désactiver les améliorations d'acquisition à l'aide de l'option **Zero Enhancements** dans Customize Capture (Personnaliser l'acquisition).
- L'image de métaphase est sauvegardée et elle s'affiche dans le navigateur.
- Une image brute sauvegardée peut être utilisée pour un re-seuillage manuel si nécessaire.

Re-seuillage des images brutes



Les images brutes peuvent être retraitées pour mettre à jour l'image Probe si le seuil d'origine n'était pas optimal.

Cela peut être utile si le **Zero Threshold** (Seuil zéro) a été utilisé pour l'acquisition originale afin de créer ultérieurement des objets pour l'amélioration, le caryotypage ou la copie sur un écran flexible.

- Charger l'image brute dans la fenêtre d'affichage principale de l'écran Capture.
- Cliquer l'icône **Threshold** (Seuil) au centre de la barre d'outils principale.
- Faire le seuillage manuel de l'image ; lorsque c'est fait, l'image disparaît de la fenêtre principale d'image.

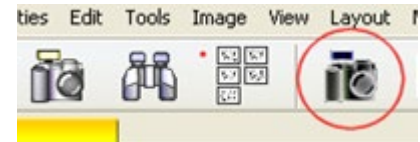
Probe Capture (Acquisition Probe) (Framelist)



Image Frame **Probe Capture** est une option d'acquisition d'image unique conçue pour l'utilisation de l'acquisition manuelle avec la tourelle de filtre motorisée et le contrôle de la mise au point du microscope. Il s'agit d'une procédure interactive sans paramètres ni fichiers de configuration qui sont utilisés par un système de numérisation dans le cadre de l'acquisition automatique.

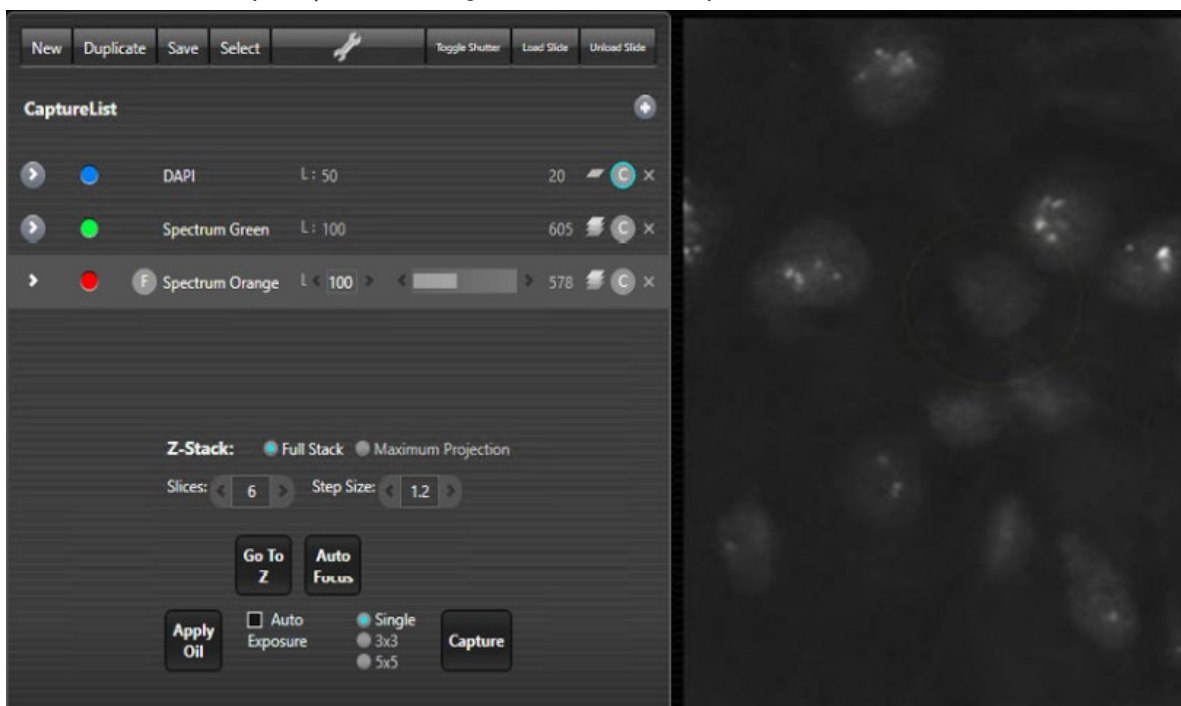
L'acquisition Framelist manuelle peut être utilisée pour capturer rapidement une zone de la lame localisée manuellement afin d'obtenir un petit nombre d'images *framelist*.

Ouvrez un dossier et cliquez sur l'icône Manual Probe Capture dans la barre d'outils principale de l'écran de démarrage de l'application.



L'écran d'acquisition **Probe Capture** se compose d'une fenêtre d'image en direct sur le côté droit.

- L'image est toujours « en direct » et utilise l'exposition de la caméra du nom du fluorochrome sélectionné dans la liste.
- Les commandes situées à gauche permettent d'interagir avec le microscope (obturateur et mise au point) et de configurer une liste d'acquisition.



Lorsque vous utilisez Probe Capture, les lames de votre dossier s'affichent en haut de l'écran.

- Vous pouvez ajouter des lames à l'aide du bouton Nouvelle lame en haut à droite de la fenêtre.
- Ajoutez des canaux, configurez le filtre, la couleur, les paramètres de l'empilement Z et enregistrez les listes d'acquisition.
- Capturez des images avec réglage manuel ou automatique de l'exposition de la caméra.
- Capturez une seule image ou des grilles rectangulaires plus grandes de 9 ou 25 images (mouvement de la platine GSL).
- Plusieurs images capturées sont associées à une seule lame.

Commande des objectifs

Lorsque l'application démarre, il utilise par défaut l'objectif configuré à la position 1. Sur les microscopes motorisés, il s'agit de l'objectif 10x.

- Si le pavé tactile de l'écran LCD du microscope est utilisé pour changer d'objectif, le logiciel n'identifiera pas que le grossissement a changé et utilisera toujours la valeur de la position 1.
- Pour tout travail d'acquisition manuelle, vous ne devez changer l'objectif que par l'intermédiaire de l'interface logicielle avant l'acquisition. Ainsi, cette valeur ne sera pas mal interprétée.

L'acquisition manuelle Framelist dispose d'un ensemble de commandes matérielles différentes de celles de l'écran d'acquisition standard, comme décrit ci-dessous.

- Le clavier est utilisé pour changer d'objectif de microscope à l'aide des touches de fonction (F).
- Pour afficher (ou masquer) tous les raccourcis matériels et les réglages de taille de pas disponibles, appuyez sur « **F10** ».

Framelist Capture (Acquisition framelist) : Présentation de la procédure

- Examen des images en direct : L'image de la caméra est « toujours affichée » dans la fenêtre d'affichage principale.
 - Les canaux, les paramètres et les options d'acquisition peuvent être examinés ou modifiés avant l'acquisition.
- **Capture.** Lance une acquisition automatique à cellule unique de tous les canaux en utilisant chacun des paramètres de la liste d'acquisition. Acquiert les images en direct et les enregistre dans la framelist des lames du **navigateur**.

1. Sélectionner le dossier et la lame dans le navigateur et cliquer sur **Probe Capture**.
2. **Sélectionner** une liste d'acquisition préenregistrée appropriée à l'échantillon ou Créer une **nouvelle**.
3. Cliquer sur le canal de contre-coloration dans la liste d'acquisition (activant le filtre/obturateur fluorescent).
4. Localiser une zone d'échantillon sur la lame de microscope, la positionner et faire la mise au point dans la fenêtre d'affichage.
5. Cliquer sur **Capture** pour démarrer la séquence d'acquisition automatique.
 - si l'option « Auto Exposure » (exposition automatique) est activée, la configuration automatique de la caméra est effectuée pour chaque canal.
 - si l'option « Auto Exposure » (exposition automatique) est désactivée, les canaux sont capturés en utilisant les valeurs d'exposition fixes de la liste d'acquisition.
6. Un état est affiché pour chaque canal, indiquant les opérations d'exposition et d'empilement Z.
7. Une vignette d'image couleur s'affiche sous le panneau d'acquisition.
8. Répétez le processus pour d'autres images.

Ne pas...

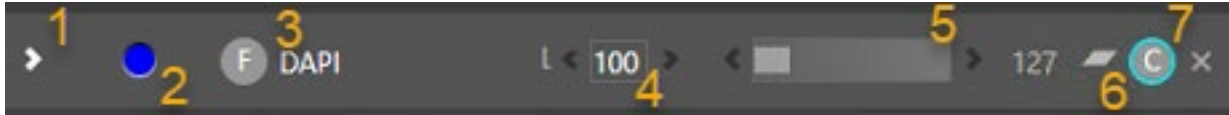
- ... passer manuellement d'un objectif à faible grossissement à un objectif à fort grossissement. Utilisez les commandes du clavier (F1 - F7) pour changer d'objectif et confirmer le grossissement correct de l'objectif d'acquisition.
- ... déplacer la platine ou faire la mise au point manuellement pendant l'acquisition.


Options de configuration de l'acquisition :

Vous devez ajouter au moins un canal à l'écran avant de pouvoir accéder aux commandes d'acquisition.

Ajout de canaux

Le bouton « + » ajoute un canal à votre liste d'acquisition (Capture List) actuelle, la collection de canaux fluorochromes en cours d'acquisition.



1. Sélectionner un canal (>)
2. Configurer la couleur du canal
3. Configurer le filtre du canal (F)
4. Intensité de la lampe fluorescente (L : Xylis/XCite)
5. Exposition de la caméra (réglage manuel)
6. Indicateur d'empilement en Z  (Désactivé/Activé)
7. Indicateur de contre-coloration (C)

Configuration d'un canal

(2) Couleur d'affichage du canal

Chaque canal capturé possède une couleur d'affichage, qui est indiquée à gauche de la ligne du canal. Il s'agit de la couleur qui sera utilisée pour le canal lors de la visualisation de l'ensemble de l'image.



La couleur peut être modifiée en cliquant sur le cercle coloré, ce qui ouvre un panneau de grille de **couleurs de base** et permet de définir n'importe quelle couleur d'affichage.

(3) Filtre du microscope

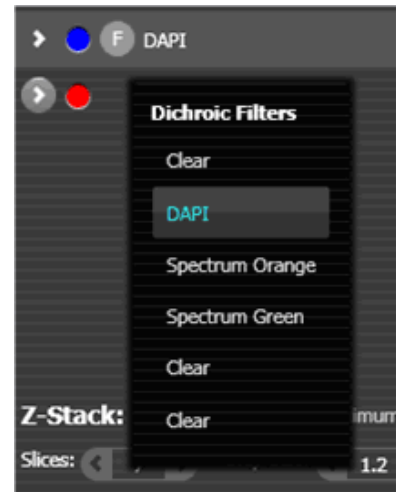
Une fois qu'un canal est sélectionné, un bouton de filtre, représenté par un « F », apparaît juste avant le nom du canal. En cliquant sur ce bouton, les filtres configurés pour votre microscope s'affichent.



Vous ne pouvez utiliser qu'un seul filtre configuré ou une seule combinaison pour chaque canal fluorochrome. Une fois que vous avez sélectionné un filtre, celui-ci est supprimé de la liste de sélection suivante.

Remarque : Le nom du canal est tiré des roues à filtres configurées sur le système.

- Si vous utilisez deux filtres, par exemple un filtre dichroïque et un filtre d'excitation, les deux options seront présentées.
- Si les filtres disponibles semblent incorrects, vérifiez la configuration dans l'application d'étalonnage du microscope (**Microscope Calibration**).



(4) Intensité de la lampe

Les systèmes équipés d'une lampe fluorescente Xylis ou X-Cite présentent un réglage d'intensité permettant de modifier l'intensité de la lampe utilisée pour chaque canal pendant l'acquisition.

- Pour une acquisition de canal de sonde de routine, l'intensité habituel est de 100 %.
- Si la contre-coloration est très brillante, l'utilisation d'une intensité plus faible peut permettre un meilleur affichage du contraste.
- Une intensité plus faible peut également réduire le photoblanchiment rapide si la contre-coloration ou l'anti-fade sur la lame n'est pas stable.

(5) Exposition de la caméra

Chaque canal a sa propre valeur d'exposition (en millisecondes) affichée à droite du nom du canal, qui contrôle la quantité d'intégration de la caméra utilisée.

- Lorsqu'un canal est sélectionné, une barre de défilement de l'exposition est visible et peut être ajustée en faisant glisser la souris gauche à l'intérieur de la barre ou en cliquant sur les flèches situées de part et d'autre.



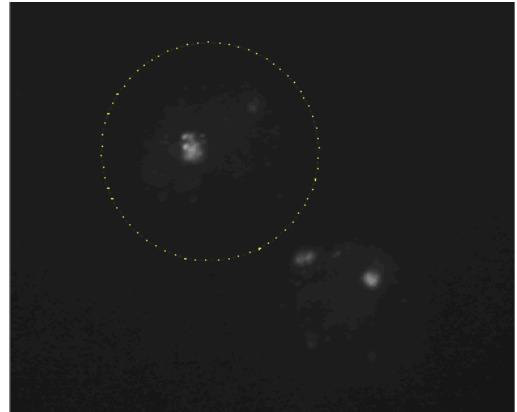
Si l'obturateur fluorescent est ouvert, l'image en direct est affichée à l'écran et les effets du réglage de l'exposition sont directement visibles.

Vous pouvez également cliquer directement sur l'image en direct à l'aide de la souris. Un « cercle cible » est alors défini sur l'image et l'exposition automatique de la caméra est calculée uniquement sur cette zone.

- Ce cercle s'affiche en pointillés sur l'image.

Cela vous permet de cibler la configuration automatique, en utilisant une zone de l'image qui contient du matériel intéressant, et en évitant les zones qui peuvent contenir des artefacts lumineux qui vont interférer avec les calculs d'exposition.

- Cliquez à nouveau avec le **bouton gauche de la souris** sur l'image dans une autre zone pour appliquer un autre cercle de configuration automatique.
- Cliquez avec le **bouton droit de la souris** sur l'image pour annuler une configuration automatique ou pour désélectionner un cercle cible.

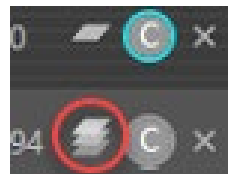


(6) Acquisition Z-Stack

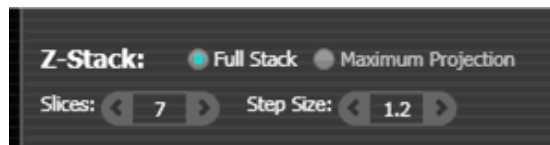
Z-Stack est l'acquisition de plusieurs images du même canal dans différents plans focaux afin d'identifier les différences de signal tridimensionnelles.

Un clic sur le graphique de l'empilement (Stack) à droite du paramètre d'exposition permet de basculer entre une image unique (Z-stack désactivée) et un empilement d'images multiples (Z-stack activée).

- Il n'est pas habituel de capturer un empilement pour l'image de contre-coloration



Lorsque la fonction Z-stack est activée pour un canal, des options supplémentaires s'affichent au-dessus du bouton Capture pour définir le nombre de **coupes** dans l'empilement et l'espacement, la **valeur du pas**, entre chaque empilement.



Vous pouvez choisir d'enregistrer l'empilement complète (**Full Stack**) ou la projection maximale (**Maximum Projection**) uniquement :

- La projection maximale (**Maximum Projection**) capture un empilement d'images afin de créer uniquement une image composite - l'image de *projection maximale*.
- Les images individuelles d'empilement ne sont pas enregistrées dans l'image finale.
- L'empilement complète (**Full Stack**) capture et stocke les captures individuelles dans l'empilement Z avec la *projection maximale* fusionnée.

(7) Contre-coloration

L'un des canaux de la liste doit être sélectionné en tant que contre-coloration avant que l'acquisition ne puisse être lancée.

- Il s'agit normalement du canal DAPI.
- Le canal de contre-coloration est un point de référence et un centre de mise au point pour l'acquisition de l'empilement Z (à moins que la mise au point ne soit réajustée manuellement sur l'un des canaux de la sonde avant l'acquisition).

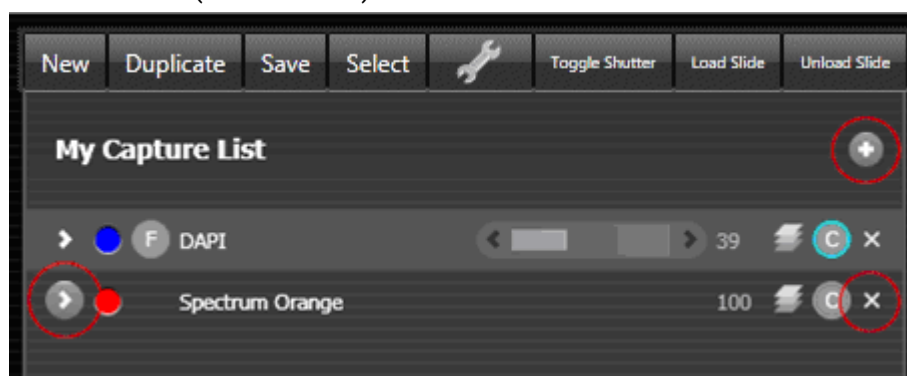


Utilisation des listes d'acquisition (Capture Lists)

Une collection de canaux est une liste d'acquisition. Les commandes pour les listes d'acquisition sont affichées en haut du panneau d'acquisition : Nouveau, Dupliquer, Enregistrer et Sélectionner.



- L'option **Nouveau** permet de créer une nouvelle liste d'acquisition contenant un seul canal. Cette liste remplacera tous les canaux actuellement affichés.
- **Dupliquer** fait une copie de la liste actuelle.
- **Enregistrer** enregistre la liste d'acquisition actuellement affichée dans la fenêtre **Sélectionner**.
- Les listes d'acquisition précédemment enregistrées peuvent être récupérées en utilisant la touche **Select (Sélectionner)**.



- Pour sélectionner un autre canal, appuyez sur le bouton « > » à gauche du nom du canal ; la sélection d'un canal modifie l'image en direct pour refléter les paramètres du canal actuel.
- Les canaux peuvent être supprimés à l'aide du bouton « x », affiché à la fin de chaque ligne de canal, et ajoutés à l'aide du bouton + .

Acquisition d'images

Une fois que la liste d'acquisition a été créée et que chaque canal a été configuré avec les paramètres de filtre, de couleur, de contre-coloration et d'empilement Z appropriés, une image peut être capturée sur la base d'un calcul d'exposition de la caméra.



- Si l'**exposition automatique** (Auto Exposure) est activée, la sélection du bouton **Capture** ajustera automatiquement l'exposition de la caméra pour chaque canal à l'aide d'un réglage automatique basé sur l'intensité de l'image.
 - Si vous avez placé un cercle cible pour le réglage automatique, chaque canal utilisera uniquement cette zone d'image pour calculer les valeurs d'exposition optimales.
 - Si vous n'avez pas placé de cercle cible, le réglage automatique sera basé sur l'ensemble de l'image.
- Si l'**exposition automatique** (Auto Exposure) est désactivée, la sélection du bouton **Capture** permet de capturer chaque canal fluorochrome de la liste d'acquisition en séquence en utilisant les valeurs d'exposition qui se trouvent actuellement dans la liste d'acquisition.
 - Vous devez confirmer les valeurs d'exposition de la caméra à utiliser avant d'appuyer sur **Capture**.

Une fois lancé, le processus d'acquisition est continu pour tous les canaux.

- Il n'y a pas de pause entre les passages dans les canaux fluorochromes.
- L'affichage de l'image en direct n'est pas mis à jour pendant l'acquisition.

Après l'acquisition, chaque image est affichée sous les commandes d'acquisition.



- Le fait de maintenir la souris sur une vignette affiche une version agrandie de l'image.
- La petite croix dans le coin supérieur droit permet de supprimer l'image si nécessaire.

Remarque : Seules les images framelist capturées manuellement dans cet écran peuvent être supprimées de cette manière. Les images capturées par les modes d'acquisition **ProbeAuto** ou **Spot Counting** du système de numérisation ne peuvent pas être supprimées.

Fin de l'acquisition

Lorsque vous avez terminé l'acquisition, quittez l'écran en cliquant sur la croix « Fermer la fenêtre » en haut à droite de l'écran, ce qui vous ramène à l'écran de démarrage des fonctions de gestion des dossiers.

Affichage d'image Probe

CytoVision DX comprend divers outils d'affichage et de sortie d'images basés sur Probe standard et la cellule M-FISH, qui peuvent être chargés dans l'écran de démarrage pour l'affichage de l'image et l'ajustement général de la couleur et du contraste, le caryotypage ou l'annotation, l'exportation ou l'impression.

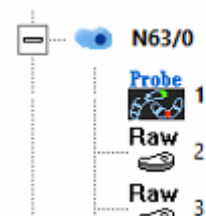
Les données Image Frame (trame d'image) ne peuvent pas être affichées dans l'application CytoVision DX.

- Il est important d'utiliser le mode d'acquisition le plus approprié à vos besoins d'affichage.
- Veuillez vous référer aux [Tableaux d'acquisition et d'analyse](#) pour plus d'informations.

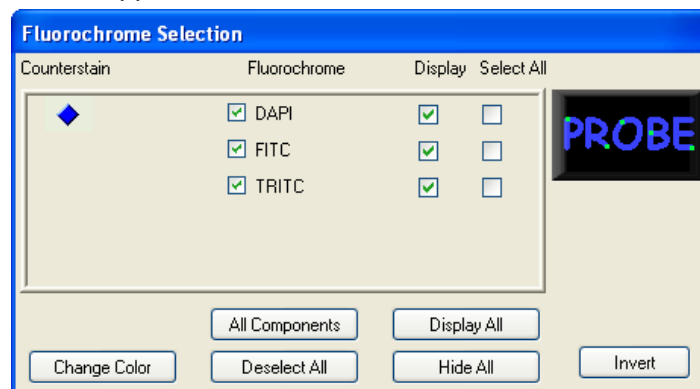
Affichage à l'écran

Tous les affichages et chargements d'images se font à partir de l'écran de démarrage.

- Pour charger une image, double-cliquez sur l'icône « Probe » dans le navigateur, puis cliquez sur la fenêtre d'affichage principale.



Lorsqu'une image de sonde est chargée dans la fenêtre d'analyse principale, la case **panneau de sélection des fluorochromes** apparaît en bas de l'écran.



Cette boîte indique les fluorochromes utilisés lors de l'acquisition de l'image et vous permet de choisir les composants de l'image de sonde fusionnée que vous souhaitez afficher ;

- Chaque image de sonde contient une superposition de 2 canaux de *fluorochromes* ou plus.
- Chaque canal peut contenir des objets distincts qui doivent être sélectionnés individuellement avant de procéder à des ajustements.
- Activez plusieurs cases à cocher « Fluorochrome » pour permettre la sélection de plusieurs canaux à la fois.
- Certaines fonctions d'analyse, telles que **Enregistrer** (Register) ou **Modifier la couleur** (Change color), nécessitent la sélection d'un seul composant.

Il existe également une case à cocher **Display** à droite de *Fluorochrome*.

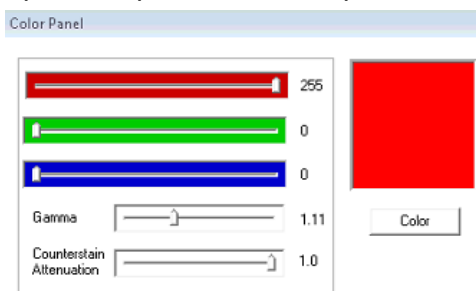
- Lorsque cette option est activée, tous les objets de ce canal sont affichés.
- Lorsque cette option est désactivée, tous les objets de ce canal sont masqués.

Les combinaisons des options « Fluorochrome » ou « Affichage » sont utiles pour décider quels objets sont disponibles pour la sélection en vue d'améliorations, de changements de couleur, d'enregistrements d'images et de la création d'écrans composites.

Modifier la couleur

Cette option fonctionne de la même manière que le paramètre Couleur dans Configuration de l'acquisition, en mettant à jour la couleur des composants dans l'image unique enregistrée. Cela peut être utile pour améliorer l'affichage visuel des signaux superposés et pour faciliter l'impression.

- Cliquez sur le bouton de commande **Change Color** (Modifier la couleur) pour ouvrir le panneau des couleurs, l'image de contre-coloration sera sélectionnée automatiquement.
- Ajustez les 3 barres de défilement pour modifier la couleur.
- Vous pouvez également cliquer sur le bouton **Color** pour sélectionner une charte de couleurs.
- Cliquer sur un autre fluorochrome pour en modifier la couleur.
- Les commandes **Gamma** et **Counterstain Attenuation** (Atténuation de la contre-coloration) fonctionnent de la même manière que dans la fenêtre Configuration de l'acquisition, mais leurs effets sont affichés instantanément sur l'image Probe. L'ajustement *Gamma* agit globalement sur l'image pour améliorer l'affichage ; cependant, le signal de fond ou non spécifique sera également augmenté. Pour améliorer l'affichage du signal uniquement, sélectionnez les objets d'intérêt et utilisez l'option **Contraste**.




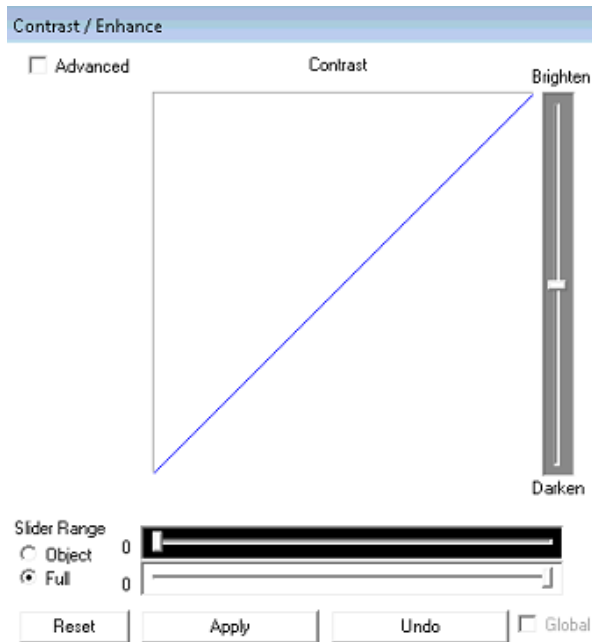
Cliquez sur OK pour fermer le panneau de modification des couleurs.



Contraste

Il est possible de modifier la luminosité et le contraste de l'image à l'aide de l'outil Contraste.

- **Contrast** doit être utilisé par défaut en mode **Global** ou « **Full** »  (Plein).
- Assurez-vous que l'option « **Preview enhancements** » (Prévisualisation des améliorations) est cochée dans le menu *Customize* (Personnaliser).
- Confirmez que le fluorochrome correct est sélectionné dans le *panneau de sélection des fluorochromes* et cliquez sur le ou les signaux que vous souhaitez éclaircir (une boîte de sélection apparaîtra autour d'eux).

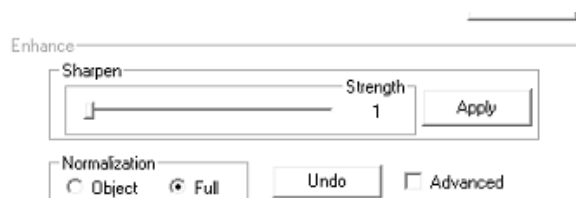


1. Pour **éclaircir** un signal, déplacez vers le haut la barre de défilement située à droite de l'histogramme.
2. Pour **assombrir** un signal, faites glisser la barre de défilement vers le bas.
3. Les curseurs de couleur « cut-off » situés sous l'histogramme peuvent être utilisés pour effectuer des changements d'intensité extrêmes.

Améliorer (accentuer)



L'outil Enhance/sharpen (Améliorer/accentuer) se trouve sous la fenêtre de contraste.



Sharpening (Accentuer) n'est généralement utilisée que sur le canal de contre-coloration pour améliorer les détails des bords ou de l'arrière-plan, ou si l'on travaille sur des métaphases colorées au DAPI pour améliorer les bandes.

Il n'existe pas d'outils d'analyse dédiés à l'affichage ou à la visualisation des images Probe. Les images Probe ont accès à des options similaires à celles des autres formats d'images cellulaires.

- Les images Probe se chargent dans la **Case View** standard pour l'affichage dans l'écran Organize et l'utilisation des commentaires Ctrl-B ou Ctrl-K dans l'écran **Analyze**. Consultez **Guide d'utilisation de CytoVision DX**.
- Un seuil peut être appliqué aux images Probe afin de créer des objets pour une utilisation de l'écran flexible et pour créer une paire de métaphases et de caryotypes FISH dans le cadre d'un flux de travail d'analyse de caryotypage. Consultez le **Mode d'emploi de CytoVision DX Karyotyper**.

Dépannage

Les informations et les vérifications énumérées dans cette section sont destinées à être effectuées dans le cadre d'un dépannage de premier niveau par les utilisateurs connaissant bien les applications et le matériel du système.

- Le **Guide d'utilisation de CytoVision DX** contient des vérifications et des mesures générales qui doivent également être effectuées et confirmées dans le cadre de tout contact avec Leica Biosystems pour une assistance supplémentaire.

Système d'acquisition

Erreurs de connexion au microscope

- Le contrôleur du microscope est éteint - redémarrer le contrôleur.
- Câble USB du microscope déconnecté - vérifier le câble.
- Le port USB du microscope ou la connexion du câble a changé (changement de port USB ou effet Windows) - vérifier le port dans le **Gestionnaire de périphériques** et le changement dans **Microscope calibration** (étalonnage du microscope) (nécessite l'accès de l'administrateur local).

Effet de la qualité de la lumière du microscope

Des contrôles de routine doivent être effectués sur le microscope optique pour confirmer qu'aucun changement de configuration n'est requis pour optimiser l'acquisition d'image. Dans l'éventualité où des problèmes de qualité d'image surviendraient lors de l'acquisition d'image, il conviendrait de contrôler aussi ces aspects.

- Confirmer que le phototube du microscope (séparateur de lumière) dirige 100 % de la lumière vers la caméra.
- Vérifiez que le guide de lumière fluorescente est correctement installé et qu'il n'est pas endommagé/plié, détérioré ou qu'il n'a pas dépassé sa durée de vie prévue.
- Vérifier et nettoyer les objectifs. Une huile ancienne et durcie sur la lentille d'acquisition réduit l'intensité de la lumière, l'éclairage (uniformité) et le contraste de l'image.
- Vérifiez que la lentille du condenseur est déplacée hors du trajet de la lumière pendant la numérisation et l'acquisition afin d'éviter toute réflexion de la lumière (cette opération est effectuée automatiquement sur les microscopes configurés avec un condenseur motorisé).
- Inspecter visuellement les filtres fluorescents dans la tourelle du microscope pour détecter tout signe de dommage dû à la lumière ou à l'environnement (ombrage, aspect moucheté, irrégularité de la couleur).

Système de numérisation GSL

Pour la numérisation GSL, il convient d'effectuer des vérifications et des procédures **supplémentaires**.

Erreurs de connexion au GSL

- L'unité de base du GSL est hors tension - mettre le GSL sous tension, vérifier la connexion de l'alimentation externe.

- Câble réseau déconnecté - vérifier le câble entre le GSL et le PC.
- Configuration de l'adaptateur réseau - vérifier qu'il n'y a pas eu de changement récent de l'administrateur informatique/réseau.

Problèmes de mise au point de la numérisation en 10x

- Les lames sont-elles propres et exemptes d'huile ? Les lames utilisées doivent être exemptes d'huile d'immersion pour permettre une mise au point précise.
- Le plan focal de l'image est-il traversé lors de la mise au point automatique ?
- Le point de départ de la mise au point automatique n'est pas proche du plan focal de la cellule (la carte de mise au point 10x ne passe pas par le plan focal de l'échantillon) : Problème de lame dans le plateau, décalage de la mise au point du modèle, points de référence de la baie d'étalonnage spatial (choc de la platine).
- La carte de mise au point 10x passe par le plan focal mais ne donne pas de points de mise au point nets : Contraste ([effet de la qualité de la lumière](#), faible intensité de la contre-coloration).
- Mauvais réglage du décalage de la mise au point dans le modèle de numérisation - provoque des échecs de la carte de mise au point en 10x.
- Vérifier les modèles de numérisation pour les décalages de mise au point, le réglage de la lamelle, le réglage de la validation de la mise au point.
- La mise au point varie-t-elle en fonction de la position de la platine du plateau/de la baie ?
- Lumière insuffisante pendant la carte de mise au point 10x (effet de la qualité de la lumière, décalage de la caméra du modèle de lame).
- Lumière excessive pendant la carte de mise au point 10x (changement de matériel, décalage de la caméra du modèle de lame, intensité de la contre-coloration).
- Si l'image en direct est trop sombre ou trop claire, vérifiez le séparateur de lumière et le modèle de lame pour tout décalage de caméra, répétez **l'étalonnage de la numérisation en fluorescence**.

Problèmes relatifs à la classification de la numérisation 10x

- A quoi ressemblent les images en direct pendant la numérisation, la mise au point et le contraste sont-ils corrects ?
- Ce problème se produit-il sur plusieurs modèles de lames ? Exécutez un nouveau modèle pour vérifier.
- Vérifiez que le microscope pour voir [l'effet sur la qualité de la lumière](#), ou d'autres problèmes.
- Vérifiez la concentration et l'intensité de la coloration DAPI sur la lame d'échantillon, ainsi que l'absence de décoloration.
- Vérifiez que les classificateurs ne sont pas mal entraînés.

Problèmes de mise au point de l'acquisition 63x

- Le point de départ de la mise au point automatique n'est pas proche du plan focal de la cellule. Vérifiez le verrouillage de l'objectif d'acquisition (mécanisme de poussée à ressort et de torsion à l'extrémité).
- Le problème est-il constant sur plusieurs lames ? S'il est variable, vérifiez la [compatibilité lame/plateau](#).

- À quoi ressemblent les vignettes de numérisation 10x de la liste des métaphases dans l'écran Review - sont-elles mises au point ?
- En cas de problèmes répétés de mise au point de l'acquisition automatique, effectuez un nouvel **étalonnage de la numérisation en fluorescence**.
- Confirmez que l'option de la lamelle du modèle de numérisation est correctement réglée.
- Une quantité insuffisante d'huile, des bulles d'air ou d'autres problèmes liés à l'huile entraînent une mise au point sous-optimale. confirmer la présence d'huile dans le réservoir de la seringue et que le tuyau du distributeur d'huile et l'embout de distribution sont bien fixés et non obstrués

Problèmes d'acquisition des canaux de la sonde

- Filtre incorrect utilisé pour l'acquisition. Vérifiez la configuration de la liste d'acquisition (nom et position du filtre dichroïque) dans les listes enregistrées et la Création de liste par défaut.
- Les signaux de la sonde ne sont pas nets. Vérifiez la taille du pas de l'empilement Z et le nombre de couches, vérifiez le montage du filtre dans la tourelle du microscope.

Compatibilité des lames / plateaux

Mise en place de la lame dans le porte-platine.

Les lames doivent être positionnées à plat dans le porte-lame, la surface de l'échantillon ou le couvre-objet étant sur le dessus.

- S'assurer qu'il n'y a dans l'insert aucune obstruction qui pourrait empêcher le positionnement à l'horizontale de la lame et que la lame est bien maintenue par le support de lame pour empêcher un déplacement.

Fermeté du maintien de la lame.

Vérifiez que les clips à ressort maintiennent la lame suffisamment serrée.

- Si la lame est lâche (vacillante), vérifiez que les pinces à ressort sont bien serrées.
- Les lames sont-elles à angles droits ou à angles recoupés ? Dans le cas d'angles recoupés, le plateau est-il correctement « biseauté » ?

Fermeté du maintien du plateau.

Vérifiez que le plateau GSL est maintenu fermement sur la platine lorsqu'il est chargé.

- En cas de relâchement, vérifiez le réglage du bras de poussée en plastique à l'avant/à gauche de la platine GSL (réglage par vis).

Montage de la lamelle

Une lamelle épaisse/double empêche d'atteindre le plan de mise au point.

- Confirmer qu'une métaphase peut être mise au point et capturée manuellement dans l'écran d'acquisition habituel.

Préparation et coloration de l'échantillon

La densité cellulaire de l'échantillon, l'intensité de la contre-coloration et l'effet anti-fade auront un effet direct sur la fiabilité de la mise au point du système, la vitesse et les performances de numérisation et d'acquisition automatique.

- La dilution du contre-colorant n'est pas conseillée. Une faible intensité augmente l'exposition de la caméra et diminue le contraste, ce qui entraîne une augmentation des échecs de mise au point et des temps de numérisation et d'acquisition plus longs.

- L'efficacité de l'antifade diminue avec l'âge, la température de stockage et l'exposition à la lumière, ce qui provoque un voile rouge sur la lame et une décoloration accrue des sondes et du DAPI. Le DAPI/antifade doit être conservé à 2-8 °C le plus longtemps possible et peut être appliqué sur les lames encore froides.
- Stocker les lames dans l'obscurité à 2-8 °C et les laisser 30 minutes à température ambiante avant de les numériser. Les anciennes lames doivent être recolorées avec un nouveau contre-colorant et un antifade si nécessaire.
- Une faible densité cellulaire augmente les temps de numérisation et d'acquisition et le nombre d'images capturées nécessaires à l'évaluation du signal. Dans la mesure du possible, ajuster la densité cellulaire lors de la préparation des lames afin d'obtenir un minimum de 5 cellules notées par image d'acquisition (10-20 optimal).

Exporter les journaux de diagnostic

CytoVision DX produit une série continue de données d'événements relatifs à la configuration du système, à l'étalonnage, au processus et à l'équipement matériel pendant les opérations de routine. En cas d'opération imprévue, d'erreurs de numérisation ou d'acquisition, ou de blocage de l'application, ces fichiers de journalisation peuvent contenir des informations utiles aux organismes d'assistance de Leica qui tentent de diagnostiquer l'erreur.

- Les journaux contiennent 7 à 10 jours d'informations de diagnostic détaillées, et une exportation doit être effectuée dans ce délai pour tout problème que vous pourriez soumettre à Leica Biosystems.
- Les fichiers de journalisation sont enregistrés en utilisant la fonction **Export Logs** (Exporter les journaux) de la barre d'outils du menu **Case** (Dossier). Cette fonction compresse tous les fichiers dans un fichier .zip et les enregistre à l'emplacement choisi par l'utilisateur.
- Ils peuvent ensuite être enregistrés sur une clé USB ou partagés avec le personnel de service et d'assistance compétent si nécessaire à une date ultérieure.

Annexe : Spot Counting

Présentation du Spot Counting

Le **Spot Counting** (comptage de spots) utilise les paramètres d'un Test ponctuel (**Spot Assay**) créé avant l'acquisition pour créer des données d'image au format *Framelist*.

Les Spot framelists sont capturées dans le cadre d'un flux de travail de numérisation GSL et d'acquisition automatique entièrement automatisé, en utilisant le mode d'acquisition SpotCounting dans un modèle de lame de numérisation.

- Une framelist de Spot Counting peut également être capturée manuellement dans l'écran Capture (Acquisition) à l'aide du mode d'acquisition « Spot Counting », similaire à l'acquisition Probe standard et basé sur les mêmes noms de fluorochromes de la « Build List » (Créer une liste).

Le Spot Counting (comptage de spots) présente quelques différences avec les données d'image de *ProbeAuto Framelist* ;

- Les Spot Assays (tests ponctuels) peuvent être créés et modifiés à l'aide du panneau Assay Selector (sélection des tests) pour différents canaux fluorochromes et réglages de l'empilement Z.
- Un classificateur de cellules (**Cell Classifier**) peut être utilisé pour déterminer le type de matériel cellulaire traité comme « informatif » dans l'image pendant l'acquisition.

- Le système de numérisation **AutoCapture** peut être réglé sur un nombre maximum de cellules informatives ou un nombre maximum d'images capturées.
- Les données de l'image capturée sont traitées à l'aide des paramètres de l'essai pour l'intensité du signal de la sonde et les informations sur la taille, y compris les paramètres pour la forme de la cellule de la contre-coloration et les limites d'arrêt de la GSL.
- Les données originales relatives au traitement des cellules et des signaux sont enregistrées de façon permanente dans la *Framelist*.

Remarque : Les *framelists* de Spot Counting contiennent plusieurs fichiers avec une taille totale de dossiers importante, il faut donc s'assurer qu'il y a suffisamment d'espace libre sur le serveur de données hébergeant la Casebase.

- Une lame contenant 40 images (images capturées) aura une taille d'environ 500 Mo, sur la base de 5 empilements par canal sur un échantillon à 2 sondes.
- Environ 80 % de ces données seront des captures d'empilements Z individuels.
- Les données Image Frame (trame d'image) ne peuvent pas être affichées dans l'application *CytoVision DX*. L'examen des images nécessite un logiciel d'analyse d'images distinct compatible avec le format *Framelist*.

Le flux de travail Spot comporte deux étapes principales.

1. **Assay selection (Sélection du test) :** Un test peut être sélectionné ou créé lorsque Spot Counting est sélectionné comme mode d'acquisition du modèle de lame de numérisation ou, pour une capture manuelle, lorsqu'il est sélectionné dans la liste des **modes d'acquisition** de l'écran d'acquisition standard.
2. **Capture (acquisition) :** Les images de la zone de la lame sélectionnée sont capturées à l'aide des procédures standard d'acquisition Probe. Les données d'image sont traitées en temps réel pour déterminer les limites des cellules et les signaux des sondes.

Avant de capturer des cellules pour Automatic Spot Counting (comptage automatique des spots).

- Vous devez être familiarisé avec les procédures [d'acquisition Probe \(Probe Capture\)](#) et les fluorochromes, car les tests de comptage de spots (Spot Counting Assays) utilisent les noms et paramètres des fluorochromes par défaut ([Build List](#)) (Créer une liste).
- Les tests doivent être créés et configurés pour que les fluorochromes soient utilisés comme liste d'acquisition, avec des options réglables de l'empilement Z, de type de sonde et de classificateur de cellules.
- Les systèmes de numérisation doivent disposer d'un **étalonnage de numérisation en fluorescence** fonctionnel pour l'intensité typique de la contre-coloration de l'échantillon et les décalages de mise au point qui seront utilisés lors de l'acquisition. Les utilisateurs doivent se familiariser avec les procédures d'étalonnage de la numérisation afin d'entretenir correctement le système et de compenser toute variation de l'intensité de la contre-coloration visible.
- Les systèmes de numérisation nécessitent un [modèle de lame](#) avec une zone de numérisation appropriée, un classificateur de numérisation et un test ponctuel assigné à la lame.

Spot Counting Assay (Test de comptage des spots)

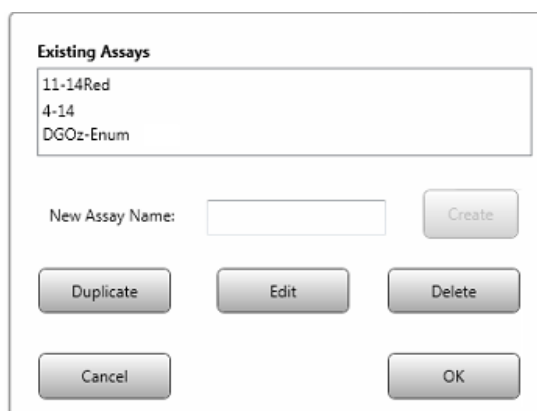
Un test ponctuel contient :

1. La liste d'acquisition des fluorochromes pour la contre-coloration et les sondes sur la lame.
2. Les paramètres Z-Stack par défaut pour chaque canal de sonde.

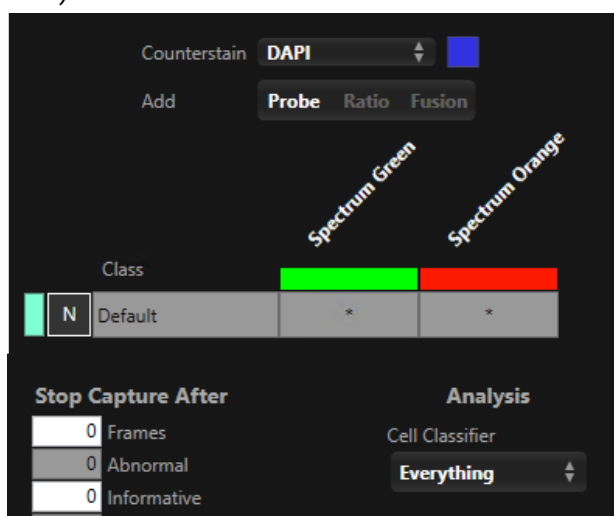
3. Le nombre maximum d'images ou de cellules à capturer automatiquement sur les systèmes de numérisation - l'option **Stop Capture After Counts** (Arrêter l'acquisition après le comptage).
4. Options de sélection d'une contre-coloration Cell Classifier (classificateur de cellules) pour déterminer quelles cellules sont classées comme informatives lors du traitement de l'image.

Pour utiliser les fonctions de numérisation et d'acquisition automatique du système GSL, un test doit être créé avant l'acquisition et configuré à l'aide de la fenêtre **Spot Assay Selector** (Sélecteur de test ponctuel).

La fenêtre **Spot Assay Selector** s'affiche dans l'écran d'acquisition standard (mode Spot Counting) ou dans le cadre d'un modèle de lame de numérisation lorsque *SpotCounting* est configuré pour AutoCapture.



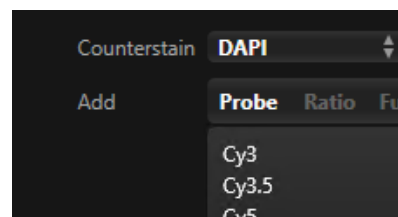
- **Création d'un nouveau test** : Saisissez un nouveau nom du test, puis sélectionnez **Create** (Créer). La boîte de dialogue **Spot Configuration** s'ouvre.
- **Copier un test existant** : Surligner un test existant dans la liste. Cliquer sur le bouton **Duplicate** (Dupliquer).
- **Modifier un test existant** : Surligner un test existant dans la liste. Cliquez sur le bouton **Edit** (Modifier). La boîte de dialogue **Spot Configuration** s'ouvre.
- **Supprimer un test existant** : Surligner un test existant dans la liste. Cliquez sur le bouton **Delete** (Supprimer).



Modifier des tests pour l'acquisition des spots (Spot Capture)

Sélection du fluorochrome

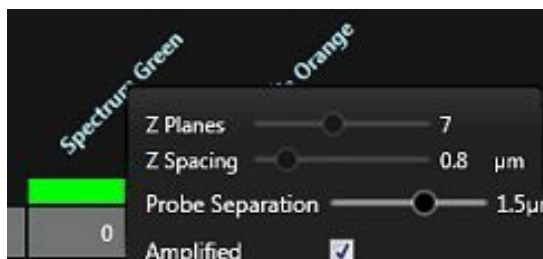
Sélectionnez un **contre-colorant** dans le menu déroulant des noms de fluorochromes du système, puis cliquez sur le bouton **(Add) Probe** et sélectionnez de la même manière jusqu'à ce que vous ayez le nombre et les noms de fluorochromes corrects pour le kit de sonde utilisé sur la lame d'échantillon.



La liste des noms est tirée de l'option **Build List** (Créer une liste) de Probe qui doit être configurée pour la couleur d'affichage et les valeurs par défaut des filtres dans [l'écran Capture \(Acquisition\)](#) standard.

Pour chaque sonde, cliquez sur le nom à configurer :

- Les **plans Z** et l'**espacement Z** (μm) pour l'acquisition de l'empilement Z. Les nombres varieront en fonction des caractéristiques de l'échantillon, mais pour les préparations d'interphases, une distance de focalisation totale d'environ 5 microns est une valeur de départ typique. Par exemple, 7 plans à 0,8 μm ou 5 plans à 1,2 μm (plage de 4,8 μm).
- Si le fluorochrome est destiné à un test d'amplification, cochez la case **Amplified** (Amplifié).

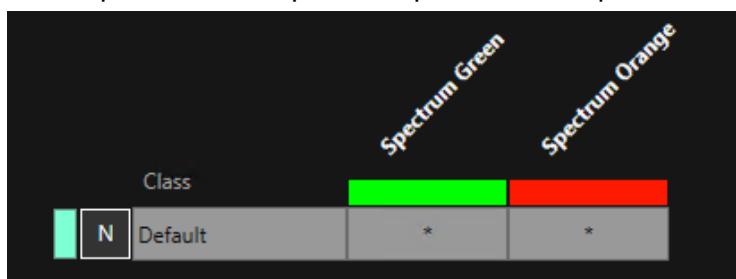


- **Probe Separation** est un réglage optionnel mais peut être laissée au réglage par défaut car elle n'a pas d'incidence directe sur le fonctionnement d'acquisition de CytoVision DX.

Tableau des classes

Une fois que la liste d'acquisition a été définie, un tableau de classe est créé et affiche un nom de classe « par défaut » qui est utilisé pour traiter les cellules informatives lors de l'acquisition d'image.

- Ce tableau n'est pas modifiable pour les opérations d'acquisition de CytoVision DX.



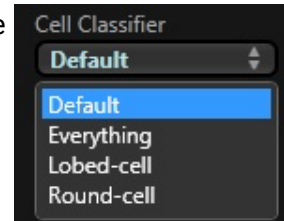
Classificateur de cellules

Un nouveau test n'a pas de classificateur défini (**Everything**) (Tout) :

- Tous les objets des images capturées contenant des signaux de sonde superposés au matériau de contre-coloration seront classés comme « informatifs » pour l'affichage GSL Stop Count et Class Monitor pendant l'acquisition.

L'utilisation d'un classificateur de cellules (DAPI) permettra de filtrer les cellules « informatives » en fonction de la forme des objets (cellules) de la contre-coloration, et ceux-ci peuvent être sélectionnés dans la liste du menu déroulant.

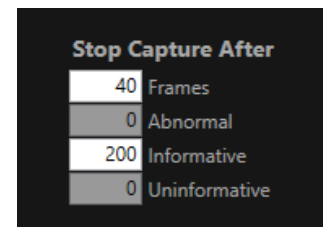
- **Default (Par défaut)** : Un classificateur formé sur un échantillon de cellules mixtes élimine les matériaux DAPI de petite taille ou de forme inhabituelle et les grands amas de cellules.
- **Lobed-cell (Cellule lobée)** : Un classificateur formé sur des échantillons de cellules multilobées élimine les débris de fond simples, les grands amas non segmentés et les cellules dont la forme est principalement circulaire.
- **Round-cell (Cellule ronde)** : Un classificateur entraîné sur des échantillons de cellules circulaires éliminant les débris de fond simples, les grands amas non segmentés et les cellules dont la forme est principalement lobée.



Arrêter l'acquisition après (AutoCapture Stop Counts)

Les systèmes de numérisation GSL continueront jusqu'à ce que toutes les images de la zone de numérisation aient été automatiquement capturées ou si l'un des comptes d'arrêt définis dans l'essai est atteint.

- **Frames** : Définit un nombre maximum d'images à capturer. La valeur utilisée peut être définie comme
 - une « sécurité intégrée » lorsque des objets « informatifs » insuffisants sont identifiés dans l'acquisition automatique de routine AutoCapture, afin d'éviter des durées de numérisation excessives sur des lames d'hybridation peu peuplées ou ayant échoué
 - pour les numérisations nécessitant un nombre fixe d'acquisitions à des fins de normalisation ou de comparaison, telles que les tests de densité cellulaire ou de qualité des sondes.
- **Informative** : Il s'agit du total de tous les objets qui passent la sélection du classificateur de cellules.
 - Il s'agit du critère d'arrêt de routine lorsqu'un nombre total fixe de cellules est nécessaire pour répondre aux attentes de l'examen ou de l'analyse en aval.



Si les deux comptes d'arrêt sont définis dans l'essai, l'acquisition automatique (AutoCapture) s'arrêtera lorsque le premier de ces comptes sera atteint ; une valeur de zéro pour l'une ou l'autre option signifie qu'elle n'affectera pas l'acquisition automatique.

- Les comptes d'arrêt n'ont pas d'effet sur [l'acquisition manuelle](#).

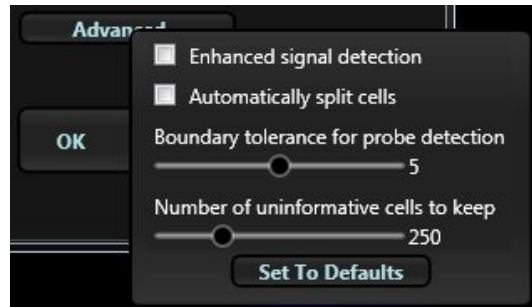
Avancé

Le bouton **Advanced** permet d'ouvrir la boîte de dialogue de configuration des paramètres supplémentaires du test.

- Les paramètres **Boundary Tolerance for probe detection** (Tolérance aux limites pour la détection des sondes) et **Number of Uninformative cells to Keep** (Nombre de cellules non informatives à garder) ne sont pas utilisés pour l'opération d'acquisition de CytoVision DX
- Les options **Enhanced Signal Detection** (Détection améliorée des signaux) et **Automatically Split Cells** (Séparation automatique des cellules) peuvent être utilisées et entraîneront une augmentation du nombre d'objets classés pendant le traitement de l'image - ce qui peut arrêter l'acquisition automatique plus tôt en fonction du compte d'arrêt **informatif** (informative stop count).

Enhanced signal detection (Détection améliorée des signaux) :

Si cette option est activée, elle modifie certaines comparaisons de taille et d'intensité relatives lors du traitement de l'image, ce qui augmente la probabilité que des signaux de faible intensité soient classés comme signaux informatifs.



Automatically Split Cells (Séparation automatique des cellules) :

Si cette option est activée, elle permet de séparer les amas d'objets de contre-coloration en deux ou plusieurs objets **informatifs** distincts.

Dans la fenêtre *Spot Counting Assay Selector*, le test est enregistré dans la liste par défaut du système lorsque l'option **OK** est utilisé pour fermer le panneau.

Spot Scan and Capture (numérisation et acquisition des spots)

Modèle de lame (Paramètres de numérisation)

La création du modèle de lame et les options de numérisation sont les mêmes que pour le numérisation de routine des interphases.

- Se référer aux [modèles de lames \(FISH\)](#) pour plus de détails.

Pour les échantillons FISH, les règles d'acquisition sont définies dans le panneau *AutoCapture* du modèle de lame (Slide Template) en sélectionnant « SpotCounting » dans la liste **Capture Mode** : (mode d'acquisition).

- **Objectif** : sélectionne l'objectif utilisé pour l'acquisition automatique, le 63x est optimal pour FISH (le 100x n'est pas recommandé en raison d'un champ de vision plus petit et d'une intensité lumineuse réduite).

AutoCapture

Perform AutoCapture

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks

No SPOT assay selected

Select Spot assay

- L'état de la configuration de la caméra automatique (**Autocamera setup**) détermine la manière dont les images sont capturées à fort grossissement pendant l'acquisition automatique ;
 - **Enabled** (Activé) : (Recommandé) Pour chaque canal à capturer, le système effectue un réglage automatique de l'exposition en fonction de l'intensité de la fluorescence présente dans l'image.
 - **Disabled** (Désactivé) : Pour chaque canal à capturer, le système utilise les valeurs fixes de la caméra à partir des fluorochromes de la **Build List** (Créer une liste) (« Save as Default ») (Enregistrer par défaut) dans le panneau de configuration de l'acquisition ou avec l'utilitaire séparé **Fluorochrome Camera Calibration** (Étalonnage de la caméra fluorochrome) - non recommandé pour une utilisation de routine).

- **Setup on Counterstain** : Améliore le calcul de l'exposition de la configuration de la caméra automatique (Autocamera Setup) sur les canaux fluorochromes en travaillant uniquement sur les zones contenant la fluorescence de la contre-coloration (masque DAPI) et en étant moins affecté par les débris fluorescents à l'extérieur de la cellule.
- **Setup on Probe** : Améliore le calcul de l'exposition de la configuration de la caméra automatique (**Autocamera Setup**) en utilisant un calcul basé sur la taille des canaux fluorochromes afin d'être moins affecté par les débris fluorescents brillants.
- **Setup using Average (Configuration utilisant la moyenne)** : Capture les n premières images en utilisant le calcul d'exposition automatique standard pour obtenir une valeur d'intégration fluorochrome moyenne pour toutes les images restantes (non recommandé pour une utilisation de routine).
- **Save Z-stacks (Enregistrer l'empilement Z)** : Sauvegarde chaque image d'empilement de fluorochromes avec la couche de projection maximale (fusionnée).
- **Select Spot assay** (Sélectionner le test ponctuel) ouvre le panneau Assay Selector (Sélecteur de test) pour choisir un test ponctuel approprié qui sera utilisé comme liste d'acquisition et pour le traitement de l'image pendant l'acquisition automatique.
- **Liste des fluorochromes** : n'est pas sélectionnable. La liste d'acquisition et les paramètres de fluorochromes sont définis dans le test ponctuel et liés aux fluorochromes de la *Build List* (Créer une liste) par défaut.
- **Post Capture options** (Options post-acquisition) : n'est pas sélectionnable. Le Spot Counting (comptage de spots) crée des données d'image framelist qui n'utilisent pas les fonctions de seuillage ou de personnalisation de l'acquisition.

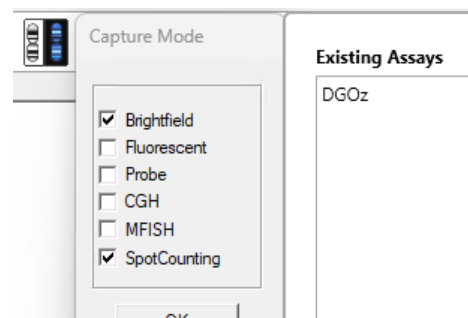
Remarque : S'il existe des noms de liste dans la **liste des fluorochromes** ou dans les panneaux **d'options de post-acquisition**, cela signifie que la zone de numérisation a déjà été définie pour le mode Probe ou Probe Auto, lorsque ces modes sont requis.

- Il est recommandé de créer une nouvelle zone pour le Spot Counting et de laisser ces zones vierges.

Manual Capture (Acquisition manuelle)

L'acquisition manuelle Spot Counting utilise l'écran d'acquisition standard.

1. Cliquez sur Capture Mode (Mode d'acquisition) et sélectionnez Spot Counting pour ouvrir la boîte de dialogue Assay Selector (Sélecteur de test).
2. Sélectionnez ou créez un Test ponctuel.
3. Lorsqu'un test est sélectionné, la liste d'acquisition est créée automatiquement à partir des fluorochromes de la Build List (Créer une liste) standard définis dans le test.
4. Confirmez que le panneau de sélection des fluorochromes affiche les fluorochromes corrects. Les paramètres de l'empilement Z seront hérités de l'essai mais peuvent être modifiés avant l'acquisition.
5. Confirmez que le panneau de personnalisation de l'acquisition est réglé sur l'option « Save Stacks » (Enregistrer les empilements) afin d'enregistrer les couches Z-stack en tant qu'images séparées dans la framelist finale.



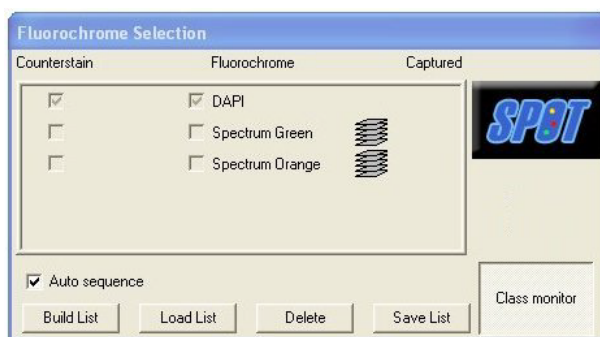
Capturez les cellules comme vous le feriez pour une **Acquisition Probe (Probe capture)** standard.

- Désactivez les options **Auto Sequence** (Séquence automatique) et **Auto Camera Setup** (Configuration automatique de la caméra) et effectuez une ou deux captures pour obtenir les bons réglages de la caméra.

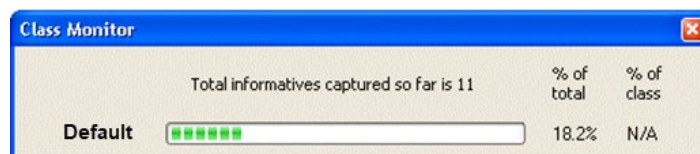
- Le commutateur de configuration automatique (**Auto Setup**) situé sous l'image peut toujours être utilisé pour déterminer automatiquement les meilleurs réglages pour la lame.
- Lorsque les réglages de la caméra sont corrects, activez la séquence automatique (**Auto Sequence**). Cela sera plus rapide que d'utiliser la configuration automatique de la caméra (**Auto Camera Setup**) pour chaque image.
- Les images sont traitées par le test au fur et à mesure qu'elles sont capturées. Il n'y a pas de seuillage, les données brutes sont utilisées pour créer une framelist pour le traitement des images.
- Lorsque l'acquisition est terminée, passez à l'écran Analysis (Analyse). Le traitement des cellules de la framelist est alors terminé.

Acquisition et moniteur de classe

Lorsque l'acquisition automatique ou manuelle des spots (Spot Capture) démarre, le panneau **Spot Fluorochrome Selection** s'affiche et indique les noms des fluorochromes définis dans le test.



Cliquez sur l'icône **Class Monitor** (moniteur de classe) pour afficher la boîte de dialogue Class Monitor.



Le nombre total de cellules informatives traitées jusqu'à présent est indiqué en haut de la boîte de dialogue.

- La barre indique le nombre de cellules informatives en pourcentage des comptes d'arrêts du test.

Arrêter l'acquisition automatique SPOT

L'acquisition automatique de *CytoVision DX* GSL est conçue pour fonctionner sans nécessiter de réglage ou d'interaction.

L'acquisition automatique s'arrête lorsque l'une des conditions suivantes est remplie :

- Le nombre d'arrêts après images (Stop After **Frames**) a été atteint.
- Le nombre d'arrêts après cellules informatives (Stop After **Informative** Cells) a été atteint.
- L'acquisition est terminée pour toutes les images de la zone de numérisation.
- Le bouton **Stop** est actionné manuellement.

Si le bouton **Stop** n'est pas actionné, le GSL passe à la lame suivante du lot et effectue une numérisation ou une acquisition automatique sur cette lame, selon les besoins.

Reportez-vous à [l'exemple de procédures étape par étape](#) pour l'exécution d'une lame de comptage de spots (Spot Counting) en vue d'une [acquisition manuelle](#) ou d'une [numérisation complète et d'une acquisition automatique](#).

Annexe : Tissue FISH

Présentation de Tissue FISH

La fonctionnalité Tissue FISH est conçue pour permettre l'imagerie de lames de FISH sur tissus à l'aide du matériel de numérisation ou d'acquisition du système, puis l'examen ou l'analyse des images.

- Les options de numérisation permettent de sélectionner manuellement ou automatiquement les zones de numérisation à capturer.
- Les données framelist sont capturées avec le mode d'acquisition automatique *ProbeAuto* ou à l'aide de l'application d'acquisition manuelle de Probe [Manual Probe capture](#).

L'acquisition Framelist (Framelist Capture) est destinée à être utilisée avec des sondes ADN FISH, l'application n'a pas de fonctionnalité destinée à fonctionner avec des lames d'échantillons de tissus d'IHC ou d'immunofluorescence.

- La fonctionnalité du module sous licence *Tissue FISH* contrôle l'accès à des options supplémentaires de modèles de lames sur les systèmes de numérisation GSL, il ne s'agit pas d'une configuration d'acquisition ou d'analyse.
- Toutes les fonctions d'acquisition sont des fonctions standard de la licence du logiciel Probe.
- Il n'existe pas d'outils d'affichage, de morphologie ou d'analyse dédiés au Tissue FISH.

Numérisation et acquisition de Tissue FISH

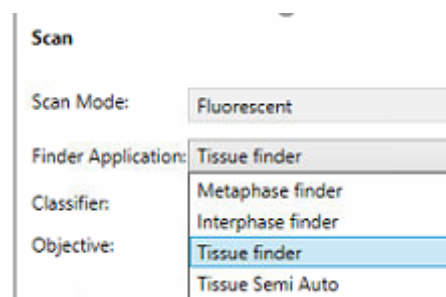
Il existe 3 flux de configuration de numérisation de Tissue FISH disponibles par le biais des paramètres de l'écran du modèle de lame et décrits ci-dessous.

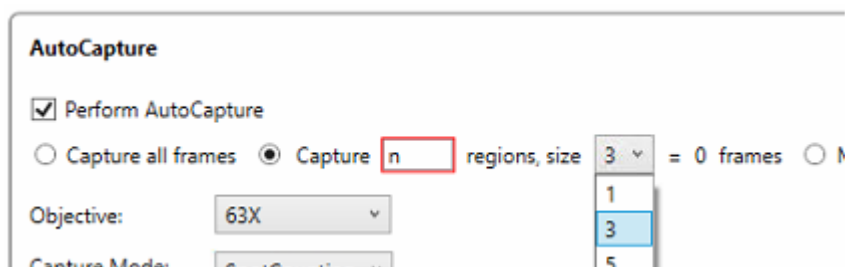
1. Numérisation automatique et acquisition automatique (mode Tissue Finder, acquisition automatique)
2. Numérisation automatique et marquage manuel de la région (mode Tissue Finder, acquisition différée)
3. Sélection manuelle d'une région (Tissue Semi Auto, pas de numérisation, acquisition automatique)

1) Numérisation automatique et acquisition automatique :

Utilise l'application de recherche **Tissue finder** dans le cadre d'un modèle de lame.

- Pré-numérisation en fond clair 1,25x facultatif pour détecter la gravure de la zone de la lame.
- Carte de mise au point 10x et détection d'images de tissus colorés au DAPI.
- Acquisition automatique framelist de toutes les images ou de plusieurs régions de la grille à l'intérieur de la zone de numérisation/gravure.

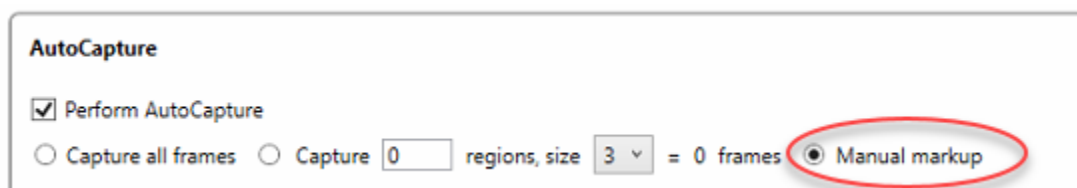
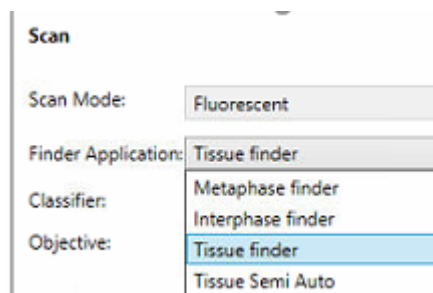




2) numérisation automatique et marquage manuel d'une région :

Utilise l'application de recherche **Tissue finder** dans le cadre d'un modèle de lame, avec une acquisition automatique différée basée sur des régions sélectionnées.

- Pré-numérisation en fond clair 1,25x facultatif pour détecter la gravure de la zone de la lame.
- Carte de mise au point 10x et détection d'images de tissus colorés au DAPI.
- Marquage manuel des images ou des régions sélectionnées à l'aide de l'application [Tissue FISH Markup](#).
- Acquisition automatique framelist de toutes les images ou de plusieurs régions de la grille à l'intérieur de la zone de numérisation/gravure.



Le marquage manuel ne peut être utilisé que sur un modèle de numérisation avec une seule zone de numérisation. Toute tentative de création de zones de numérisation multiples génèrera un message d'avertissement et vous ne pourrez pas enregistrer le modèle tant que les zones supplémentaires n'auront pas été supprimées.

3) Sélection manuelle d'une région pour l'acquisition automatique :

Utilise l'application de recherche **Tissue Semi Auto** dans le cadre d'un modèle de lame avec une procédure de marquage de région individuelle (pré-numérisation en fond clair facultatif pour détecter la gravure de la zone de la lame) afin d'évaluer et de définir les régions pour l'acquisition automatique ProbeAuto à fort grossissement d'une *framelist*.

- Ce flux de travail nécessite la connexion d'un joystick USB au système.
- Aucune numérisation n'est effectuée, il s'agit d'un flux de travail interactif qui nécessite la visualisation de la lame au microscope ou en direct afin de définir les zones pour l'acquisition automatique ultérieure.

Acquisition manuelle

Tout système *CytoVision DX* doté d'une configuration Probe peut utiliser l'application d'acquisition manuelle [Manual Probe capture](#) pour créer une framelist.

- Les images de l'application Manual Probe Capture peuvent être capturées individuellement. Les systèmes de numérisation peuvent utiliser les options d'images automatiques 3x3 et 5x5.

Gravure des lames

Le système de numérisation des lames Tissue FISH est conçu pour fonctionner de manière optimale sur des lames qui ont été marquées avec une gravure de lame/un stylo à pointe diamant, ce qui permet de déterminer automatiquement la zone de numérisation à l'aide d'une pré-numérisation en fond clair avant toute opération de numérisation et d'acquisition.

- Pour une détection fiable de la zone, la gravure de la lame doit être claire et ininterrompue, loin des bords de la lame ou de la lamelle et de tout débordement du liquide de montage de la lame.
- Si l'option Pre-Scan (pré-numérisation) est définie dans le modèle de lame et qu'une zone gravée n'est pas détectée, la numérisation ne se poursuivra pas.
- Si la lame comporte plusieurs zones gravées dans la zone de numérisation, l'option Pre-Scan (pré-numérisation) les détectera et les inclura dans les étapes de numérisation et d'acquisition automatisées.
- L'option Pre-Scan (pré-numérisation) est également disponible avec la numérisation semi-automatique pour faciliter l'identification manuelle des zones et pour l'affichage de l'aperçu des lames (Slide Overview).



Remarque : Le stylo marqueur ne donne généralement pas une ligne de contraste claire et sombre et n'est pas recommandé pour une détection fiable ou cohérente.

L'option Pre-Scan (pré-numérisation) pour les lames gravées utilise l'objectif 1,25x avec l'éclairage à fond clair, il est donc nécessaire d'effectuer un **étalonnage de la numérisation en fond clair** avant de pouvoir utiliser l'appareil avec succès.

Tissue FISH Markup (acquisition différée)

Tissue FISH Region Markup est une option de sélection manuelle de régions à utiliser avec le mode de numérisation Tissue Finder.

- Les lames sont numérisées à 10x en utilisant un modèle défini avec l'option d'acquisition automatique (AutoCapture) « Manual markup ».
- Les images numérisées sont disponibles dans une visionneuse Tissue FISH Markup Viewer affichant un aperçu des tissus fluorescents permettant à l'utilisateur de créer des régions d'acquisition.
- Une acquisition différée est lancée à l'aide du mode d'acquisition automatique standard de Probe (*Probe Auto Capture Mode*) une fois que toutes les lames ont défini des régions d'acquisition automatique.



L'application de visualisation **Tissue FISH Markup Viewer** est utilisée pour sélectionner les régions d'acquisition automatique pour les lames numérisées à l'aide de l'option d'acquisition automatique Tissue Finder AutoCapture « Manual markup ».

- Le Markup Viewer peut être ouvert directement sur un système de numérisation à partir de l'écran de configuration Scan Batch of Slides (Numériser un lot de lames), lorsqu'une lame contenant des données de marquage est chargée dans le cadre d'un flux de travail d'acquisition différée.
- Cliquez sur le « M » rouge sous l'affichage de la lame pour accéder à l'écran de visualisation de la lame.

Il est également possible d'ouvrir le Markup Viewer par le biais d'une application autonome qui peut être exécutée sur n'importe quel système *CytoVision DX* en réseau.

1. Ouvrez l'application à partir de **Démarrer > Tous les programmes > CytoVision DX > Tissue FISH Markup**.
2. Un bouton Open Case (Ouvrir un dossier) s'affiche sur un fond noir.
3. Sélectionnez Open Case (Ouvrir un dossier) pour afficher la fenêtre Select Cases (Sélectionner des dossiers).
4. Recherchez et ouvrez un dossier connu pour contenir des numérisations à l'aide de l'option de marquage manuel (Manual markup).
5. Toutes les lames Tissue FISH Markup contenant des données de numérisation 10x seront automatiquement mises à jour sur l'écran - un « M » rouge indique qu'aucune région d'acquisition automatique (AutoCapture) n'a été définie.
6. Cliquez sur le « M » pour ouvrir l'écran Tissue FISH Markup Viewer.



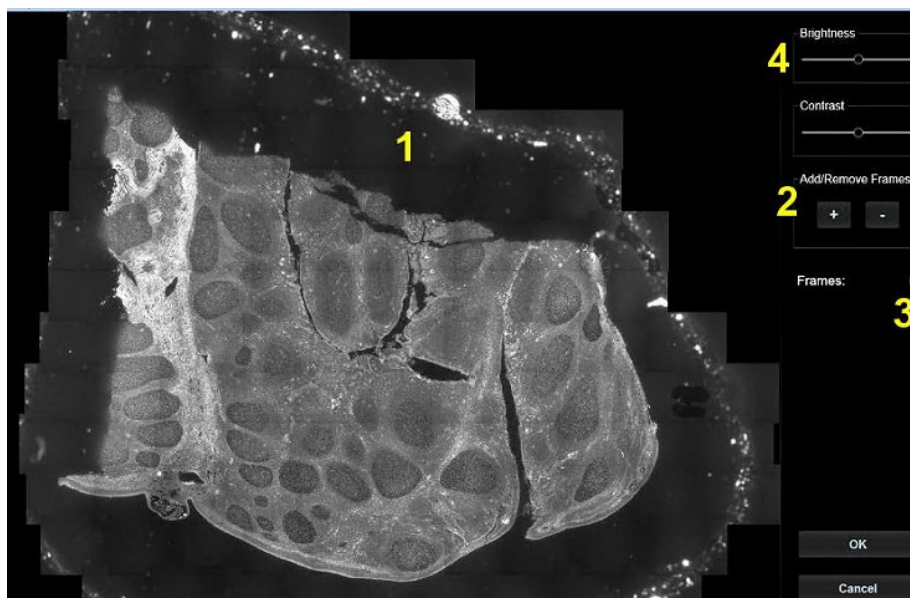
Si un cas est en cours de numérisation ou est ouvert sur un autre système ou sur Markup Viewer, un symbole de verrouillage s'affiche. Scan Monitor (Moniteur de numérisation) doit être utilisé pour confirmer que la numérisation est terminée pour un dossier dans un lot de numérisation actif avant de tenter la procédure de marquage.

Écran Markup Viewer

L'écran Tissue FISH Markup Viewer affiche un aperçu de la numérisation 10x Tissue Finder avec des outils permettant d'ajouter ou de supprimer des régions d'acquisition automatique.

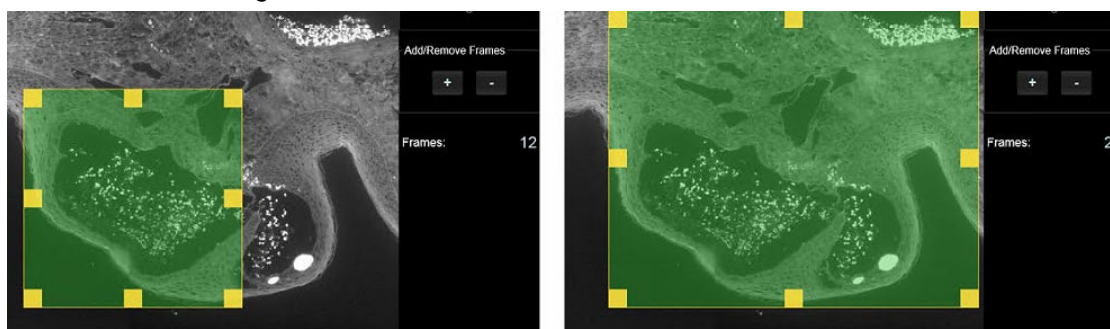
1. **Affichage de numérisation** des images de la numérisation fluorescente 10x assemblées.
 - Zoom avant/arrière à l'aide de la molette de la souris.
 - Effectuez un panoramique autour de l'image zoomée en la faisant glisser à l'aide d'un des boutons de la souris.

2. **Ajouter ou supprimer** des régions d'acquisition automatique (AutoCapture).
 - Sélectionnez le « + » et cliquez sur l'image pour déposer une région.
 - Sélectionnez le bouton « - » et cliquez sur une région existante pour la supprimer.
3. **Affichage des images.**
 - Une fois qu'une région est ajoutée, un numéro d'image s'affiche pour indiquer le nombre d'acquisitions prévues pour l'acquisition automatique.
 - La modification de la taille de la région dans l'affichage de l'image augmentera ou diminuera ce nombre au fur et à mesure que le système recalcule les positions de l'acquisition automatique.
4. **Curseurs d'amélioration des images.**
 - La fonction Luminosité et contraste permet d'ajuster l'affichage de l'aperçu de la numérisation 10x, si nécessaire, afin d'améliorer l'identification visuelle des zones à capturer.



Exemple de flux de travail

- Utilisez le défilement de la souris pour zoomer jusqu'au niveau de détail nécessaire pour déterminer les régions à capturer.
- Sélectionnez le « + » qui sera surligné en bleu.
- Cliquez avec le bouton gauche de la souris sur l'image pour déposer une boîte de région, qui est en vert ombragé.
- Faites un clic gauche sur la boîte pour la repositionner, et un clic gauche sur les bords de la boîte pour la redimensionner ;
 - Le système calcule le nombre de cadres complets et partiels de l'objectif d'acquisition à fort grossissement nécessaires pour inclure toute la zone de la région..
 - Le redimensionnement modifie l'affichage des images car le système recalcule le nombre d'images.



Plusieurs régions peuvent être ajoutées de la même manière

- Les régions proches ou se chevauchant ne permettront pas de capturer deux fois la même image. Le nombre d'images augmentera uniquement lorsque de nouvelles images complètes devront être capturées.
- Pour supprimer des régions, sélectionnez le « - », puis cliquez sur la région à supprimer.

Cliquez sur OK pour fermer la fenêtre de visualisation et revenir à l'écran Markup Case Open (Dossier de marquage ouvert) ou à l'écran Scan Batch of Slides (Numériser des lots de lames).

- Les lames mises à jour avec les régions d'acquisition s'affichent désormais avec un « M » vert.



Une fois qu'une numérisation différée est lancée, l'acquisition automatique (AutoCapture) se met en marche. Il est prévu que *Probe Auto* soit utilisé pour générer des images Framelist.

Annexe : M-FISH Capture

Les informations ci-dessous requièrent que le système *CytoVision DX* soit activé pour les modules sous licence *Probe* et *MFISH* afin de permettre les paramètres de configuration supplémentaires requis pour l'acquisition d'images M-FISH.

- Les images capturées doivent être analysées sur un système sur lequel le module sous licence *Karyotyper* est également activé.
- Pour l'analyse des images M-FISH et les procédures de caryotypage, veuillez vous référer au **Mode d'emploi de CytoVision DX Karyotyper**.

Introduction à la technique M-FISH

M-FISH est une abréviation acceptée de **Multi-color** or **Multiplex Fluorescence In-Situ Hybridization** et est utilisée pour définir le caryotypage en 24 couleurs de préparations chromosomiques (également connu sous le nom de *caryotypage spectral* ou *SKY*).

Il s'agit d'une technique FISH combinatoire dans laquelle le mélange de sondes contient un ensemble de peintures d'ADN de bibliothèque pour chaque chromosome de métaphase. Chaque ensemble de sondes chromosomiques est marqué par une combinaison unique de fluorochromes qui, lorsqu'ils sont observés sous une lumière fluorescente filtrée et traités à l'aide d'un système d'imagerie, produisent une « couleur » distincte.

Ceci peut être utilisé pour classer les chromosomes dans un caryotype et identifier le matériel chromosomique réarrangé.

- La M-FISH des chromosomes complets ne permet pas d'identifier les réarrangements internes des chromosomes tels que les inversions, les délétions ou les duplications.
- Les chromosomes dérivés ne donnent pas directement d'informations sur les bras p ou q.

La M-FISH est une technique expérimentale complexe à maîtriser, qui nécessite une bonne expérience de la FISH en laboratoire et une utilisation efficace des composants du microscope.

- Les filtres appropriés pour l'imagerie fluorescente et les objectifs Plan-Fluor ou Plan Apo équivalent sont aussi essentiels que le logiciel du système d'imagerie.

Les kits de sondes M-FISH disponibles dans le commerce utilisent un contre-colorant DAPI avec 5 étiquettes fluorochromes supplémentaires, ce qui permet 31 combinaisons possibles (2^5-1) - bien que seules 24 soient généralement utilisées.

- Les kits M-FISH Probe utilisent souvent des fluorochromes similaires, mais pas nécessairement les mêmes, et les filtres utilisés pour un ensemble peuvent ne pas être optimaux pour un autre.
- Il peut être nécessaire d'obtenir des filtres supplémentaires ou des versions modifiées de ceux utilisés pour les travaux de routine en FISH afin de réduire le risque d'un débordement de la lumière provenant des autres étiquettes sur la lame.
- Les filtres M-FISH doivent généralement être à bande étroite ou avec des maxima d'excitation ou d'émission conçus pour fonctionner avec les autres fluorochromes de l'échantillon et pas seulement pour être les plus efficaces pour un fluorochrome particulier.

Aperçu de l'acquisition

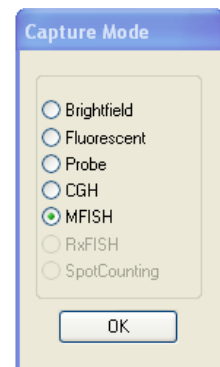
L'acquisition M-FISH est basée sur l'acquisition [Probe Capture](#) standard sans option de seuillage manuel - il y a un traitement automatique en arrière-plan des données brutes.

- Il est essentiel de se familiariser avec les commandes de l'écran et le flux de travail de l'acquisition avant d'essayer de configurer M-FISH et d'effectuer des opérations d'acquisition.
- La M-FISH est une technique d'acquisition manuelle et ne peut pas être utilisée dans le cadre d'une numérisation automatisé et d'un flux de travail d'acquisition automatique sur un système de numérisation CytoVision.
- L'acquisition manuelle sur un système de numérisation CytoVision DX est possible en utilisant la fonctionnalité de relocalisation des métaphases. Consultez le **Mode d'emploi de CytoVision DX Karyotyper**.

Capture Setup (Configuration de l'acquisition)

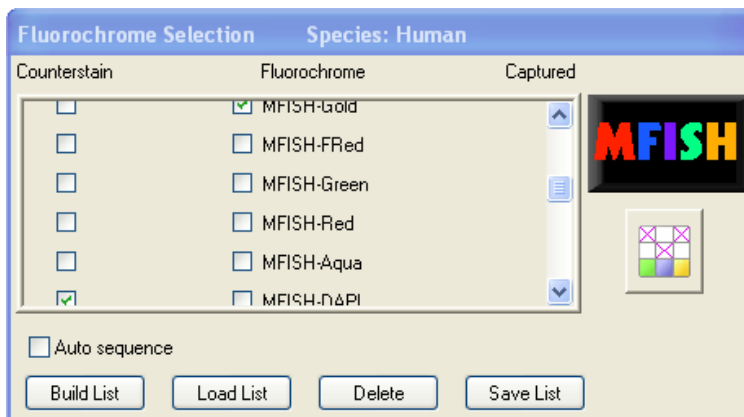
Cliquez sur l'icône **Capture Mode** dans l'écran d'acquisition standard et sélectionnez M-FISH.

- Le panneau de sélection des fluorochromes s'ouvre.
- Si vous avez déjà créé et enregistré une liste d'acquisition M-FISH, chargez-la, sinon créez une nouvelle liste à l'aide des options standard Probe Build List.



Liste d'acquisition

La liste d'acquisition dans le panneau de sélection des fluorochromes (**Fluorochrome Selection**) doit être créée dans l'ordre d'acquisition, avec le contre-colorant comme dernier canal.

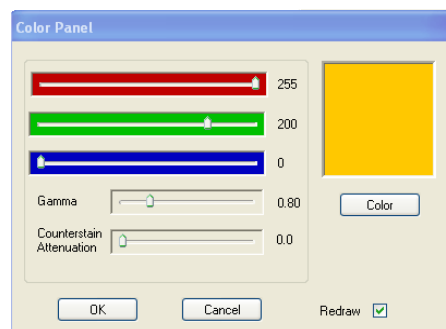


Il est recommandé d'utiliser des noms de fluorochromes M-FISH spécialement créés avec des paramètres de couleur spécifiques afin d'améliorer la superposition de couleurs visible dans Analysis (Analyse).

Les couleurs exactes des sondes peuvent être modifiées, mais les paramètres de couleur recommandés pour les fluorochromes sont les suivants :

Couleur \ Fluo	ROUGE	VERT	BLEU
DAPI	63	63	63
Aqua/DEAC	0	145	255
FITC/Green	0	220	0
Gold/Cy3	255	200	0
Rouge	255	0	0
FRed/Cy5	0	0	255
Cy5.5	0	145	255

Aqua/DEAC et Cy5.5 ne sont généralement pas utilisés ensemble

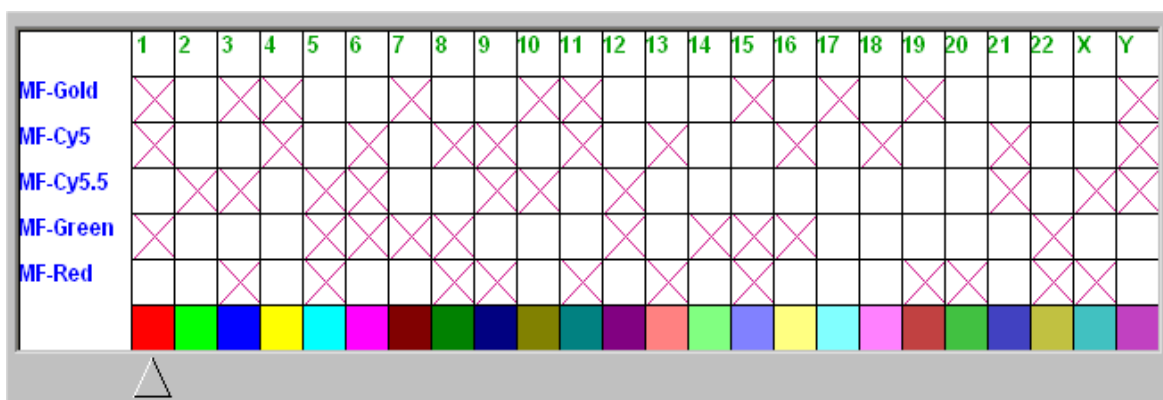


Fluomap

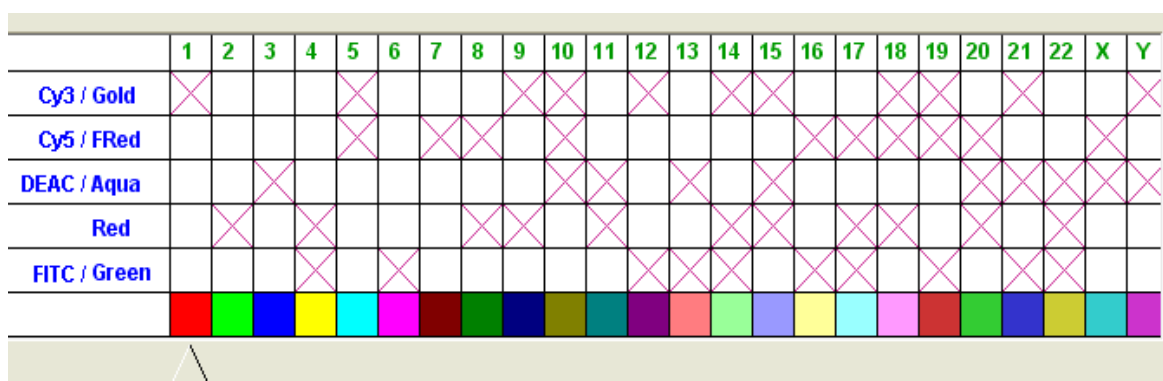
Une fois qu'une nouvelle liste d'acquisition est prête, la Fluomap doit être définie. Il s'agit des combinaisons uniques de fluorochromes qui se trouvent dans le kit de sondes utilisé et qui doivent être définies pour créer les classifications M-FISH nécessaires à l'identification des chromosomes et au caryotypage.



- Cliquez sur les cases appropriées sous chaque classe de chromosomes pour définir les combinaisons de sondes, des croisements apparaîtront.
- La FluoMap doit correspondre au kit de sondes spécifique avec lequel vous travaillez.
- Les exemples ci-dessous sont donnés à titre de référence uniquement et montrent des combinaisons de sondes M-FISH antérieures qui ont pu être utilisées à un moment donné.



Cambio M-FISH (Arrêté)



SpectraVysion (Abbott/Vysis - Arrêté)

	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	X
MFISH-Cy5	X					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	X
MFISH-Red			X				X	X	X			X		X	X			X		X	X	X	X	X
MFISH-DEAC		X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Red	Green	Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Olive	Teal	Purple	Light Green	Light Blue	Yellow	Cyan	Magenta	Brown	Dark Green	Dark Blue	Olive	Teal	Purple	

24XCyte Variation-1

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

24XCyte Variation-2

Une fois la fluomap créée, cliquez sur '**Done**' (Terminé) puis enregistrez-la avec la liste d'acquisition en utilisant la fonction '**Save list**' (enregistrer la liste) dans la fenêtre de sélection des fluorochromes.

Bien que les noms des fluorochromes soient différents d'un kit de sonde à l'autre, leurs propriétés spectrales sont équivalentes. Un kit de filtre M-FISH standard à bande étroite serait le suivant :

- DAPI (standard)
- Filtre Spectrum Aqua (pour Aqua ou DEAC)
- Filtre Spectrum Green pour Green, FITCand
- Filtre Spectrum Gold (Yellow) pour Gold, Orange, Cy3, TRITC.
- Filtre Spectrum Red pour le rouge, Texas Red ou Cy3.5
- Filtre Spectrum FRed pour Far Red ou Cy5

Filtres et microscope

Si vous utilisez des filtres de microscope préexistants, assurez-vous qu'il s'agit de filtres à bande étroite qui empêchent la perte de signal, en particulier pour les étiquettes de sondes proches telles que Orange (Cy3) et Red.

- Les kits de sondes qui utilisent les combinaisons Cy3/Orange et Texas Red/Cy3.5 doivent être imagés avec des filtres de ces deux canaux de couleur similaires. Il convient d'utiliser un Spectrum Gold à bande étroite au lieu d'un Spectrum Orange à large bande ou d'un ensemble de filtres TRITC.
- N'utilisez pas les filtres génériques « vert », « orange » ou « rouge » disponibles chez de nombreux fournisseurs de filtres, car ils augmentent le risque de débordement de couleur, ce qui pourrait interférer avec un traitement et une classification corrects.
- En cas de doute, veuillez contacter votre représentant du service d'assistance Leica pour vérifier les spécifications des filtres et des sondes.

Pendant l'utilisation du microscope, il est recommandé de réduire autant que possible l'exposition à la lumière ultraviolette (utilisée pour le contre-colorant DAPI), plus nocive, car la lumière ultraviolette est un excitateur générique de tous les fluorochromes présents sur la lame, en particulier le Cy5/Far Red, qui peut être sujet à la décoloration.

- Généralement, l'un des autres composants de la sonde (par exemple, Spectrum Gold/Orange) présente une intensité de signal suffisante pour trouver les cellules à faible grossissement et pour le premier canal d'acquisition.
- Ensuite, vous capturez le signal Spectrum FRed (Cy5) de plus faible intensité, suivi (sans ordre particulier) du vert, du rouge, de l'aqua et enfin du contre-colorant DAPI.
- Si possible, utilisez le contrôle logiciel d'une source de lumière fluorescente (Xylis/X-Cite 120 PC) pour réduire l'intensité de la lumière atteignant la lame, réduisant ainsi au minimum tout photoblanchiment.

Acquisition d'images M-FISH

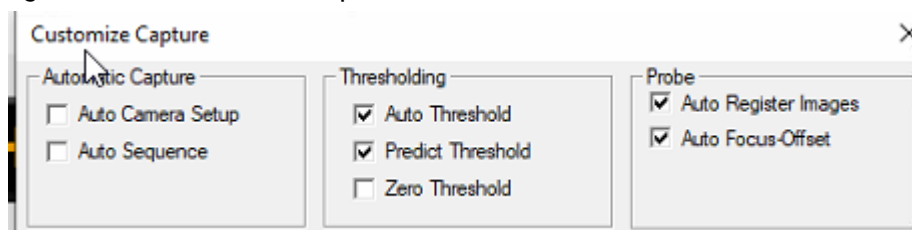
Exemple de procédure basée sur l'observation manuelle au microscope pour identifier les cellules à capturer.

L'objectif est d'acquérir chaque image aussi efficacement que possible, en réduisant tout ce qui peut retarder le processus ou maintenir la lumière fluorescente (en particulier UV/DAPI) sur la lame plus longtemps que nécessaire.

- Si possible, utilisez l'un des canaux de sonde les plus brillants - comme Spectrum Gold - pour identifier les métaphases à acquérir.
- Le Far Red (Cy5) n'est pas visible à l'œil, pour déterminer l'exposition et la mise au point de l'acquisition, vous devez utiliser l'image de la caméra en direct. Évitez d'utiliser la fonction Auto-Setup pour ce canal en raison des longues expositions.
- Si le DAPI doit être utilisé à la place, ne laissez pas la lumière sur la lame plus longtemps que nécessaire pour trouver et capturer l'image afin de réduire le photoblanchiment des canaux de la sonde.
- La numérisation des lames M-FISH à 10x pour créer une liste de lames pour la relocalisation en métaphase nécessiterait l'utilisation de DAPI car aucun autre canal ne devrait montrer suffisamment d'intensité et de détails d'objets pour un système de numérisation.

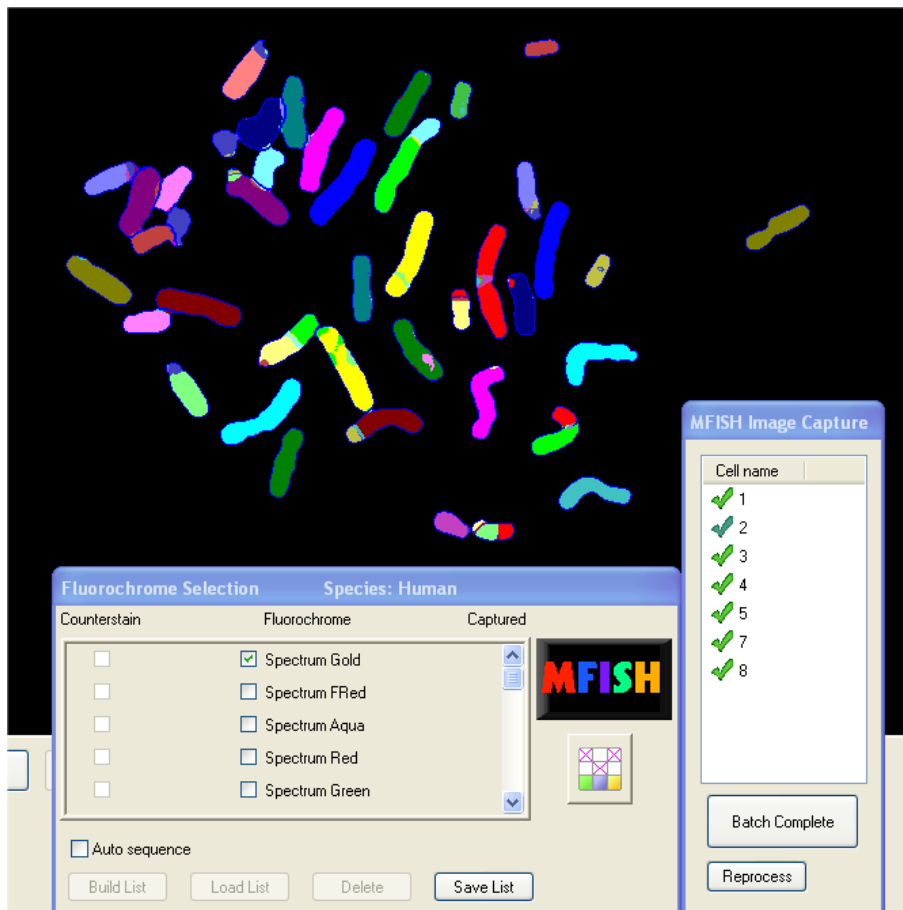
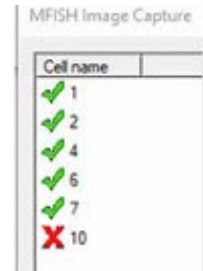
Personnaliser les options d'acquisition

- Le seuil automatique (Auto Threshold) doit être activé ; la configuration automatique de la caméra doit être désactivée.
- La première acquisition manuelle doit identifier l'exposition appropriée de la caméra en utilisant la fonction « AutoSetup » sous la fenêtre principale de l'image pour chaque canal qui doit être conservé pour les acquisitions suivantes - l'utilisation de l'auto-setup pour le canal Far-Red introduira des retards inutiles pendant que les calculs de l'exposition longue sont effectués à chaque fois.



1. **Ouvrir** ou **Créer** un dossier sur le système et passer à l'**écran Capture** (Acquisition).
2. Recherchez visuellement les cellules à faible grossissement à l'aide du **filtre Gold**.

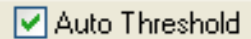
3. Passez à un filtre 63x ou 100x et capturez d'abord le Gold. Le système effectue automatiquement un seuillage et l'image brute enregistrée s'affiche à l'écran.
4. Capturez ensuite le canal Far Red/Cy5. Ce canal a généralement la plus longue durée d'exposition et peut nécessiter un petit décalage de mise au point entre les autres canaux.
5. Terminez l'acquisition des autres canaux et du DAPI comme vous le feriez pour une image de sonde normale.
6. Une fois le dernier canal capturé, l'application commence à traiter la cellule et l'option New Cell/Live passe à la cellule suivante, prête à être capturée à nouveau.
7. Après quelques secondes, le panneau d'acquisition d'image MFISH (*MFISH Image Capture*) affiche une coche verte ou une croix rouge.
 - Une croix rouge indique une erreur de traitement, généralement due à une fluorescence faible ou médiocre ou à un mauvais contraste. Dans ce cas, suivez la procédure de re-seuillage décrite ci-dessous ou faites une nouvelle capture de la cellule.
8. Une fois que toutes les cellules ont été traitées, sélectionnez « Batch Complete » (Lot terminé) ou passez à l'écran de démarrage pour terminer le traitement et créer les images de métaphase prêtes à être analysées.



Remarque : Il n'est pas possible de capturer des cellules à l'aide d'autres modes d'acquisition dans une lame M-FISH.

Seuillage manuel

Lors d'une acquisition M-FISH de routine, le paramètre *Auto Threshold* est censé permettre une acquisition efficace de tous les canaux et la sauvegarde de chaque image brute de canal de sonde qui est traitée pour créer la métaphase pour l'analyse.



Ce paramètre peut être désactivé dans le panneau Customize Capture (Personnaliser l'acquisition) pour permettre un seuillage manuel du canal du contre-colorant pendant la procédure d'acquisition en direct.

- Pendant l'acquisition du canal du contre-colorant (DAPI), le panneau de seuillage.
- Effectuez une soustraction de l'arrière-plan (**background subtraction**) sur l'image, un réglage entre 15 et 25 est recommandé en fonction de la taille des chromosomes.
- Après cela, effectuez un seuillage normal - seul le canal de la contre-coloration présente les options de seuillage manuel, les canaux de la sonde sont toujours traités automatiquement.

Cette fonction peut être utilisée pour éviter que des chromosomes petits ou pâles ne soient perdus ou supprimés lors de l'étape de seuillage automatique, mais elle n'est pas recommandée pour les acquisitions de routine car elle retarde le processus d'acquisition.

Re-seuillage

Le re-seuillage de l'image de contre-coloration peut être effectué à l'aide du panneau de traitement M-FISH une fois l'acquisition terminée.

Dans deux cas, il peut être nécessaire de refaire manuellement le seuillage de la cellule après le traitement :

- Si une cellule échoue le traitement automatique (une croix rouge n'apparaît généralement que lorsque l'enregistrement de l'image a échoué, généralement en raison d'un ou plusieurs composants faibles ou d'un DAPI mal contrasté).
- Si le traitement automatique a entraîné la suppression de petits chromosomes ou de chromosomes situés à côté des noyaux. Cela se produit plus fréquemment si l'image de contre-coloration DAPI est de mauvaise qualité, car le système ne peut pas obtenir correctement un masque complet pour tous les chromosomes de la métaphase.



Procédure

1. Sélectionnez la cellule dans la fenêtre d'acquisition de l'image M-FISH (**M-FISH Image capture**) (si le traitement a échoué, un message d'erreur s'affiche).
2. Cliquez sur le bouton **Threshold** dans la barre d'outils principale de l'écran. Une fenêtre Threshold standard apparaît.
3. Effectuez une soustraction de l'arrière-plan (**background subtraction**) sur l'image, un réglage entre 15 et 25 est recommandé en fonction de la taille des chromosomes.
4. Après cela, effectuez un seuillage normal et acceptez, le système traitera à nouveau l'image à l'aide de votre nouveau masque DAPI.

Remarque : Après le retraitement d'une seule cellule, il peut être impossible de charger la métaphase à partir de la dernière cellule de la lame. Dans ce cas, redémarrer le logiciel-application et rouvrir le dossier avant de continuer.

Retraitement

Reprocess (Retraitement) peut être utilisé à tout moment après l'acquisition M-FISH pour réinitialiser toutes les cellules de la lame, en supprimant toutes les images de métaphase ou de caryotype existantes, et en répétant le traitement de l'image brute.

- La fenêtre Fluomap s'ouvre pour permettre la modification de n'importe quelle combinaison de sondes (si une erreur a été commise lors de la création initiale de la carte et n'a été identifiée qu'après l'acquisition).

Annexe : Exemples de procédures détaillées




Pour toutes les procédures d'exemple, assurez-vous que la lampe fluorescente et les composants du microscope sont sous tension, et pour les systèmes de numérisation, mettez le GSL sous tension et vérifiez qu'il y a suffisamment d'huile dans le mécanisme de distribution de l'huile.

- Pour passer d'un objectif à faible grossissement à un objectif à fort grossissement, utilisez toujours les commandes du logiciel (panneau des objectifs ou touches de fonction).

Acquisition Probe standard



Exemple de procédure pour l'acquisition manuelle d'images FISH après le chargement manuel de la lame et l'identification des cellules.

1. Accédez à l'écran d'acquisition standard en sélectionnant l'icône Capture Screen dans la barre d'outils principale.
2. Ouvrez ou créez un dossier et sélectionnez une lame dans le Navigateur. Si vous devez créer une lame, cliquez avec le bouton droit de la souris sur le dossier et choisissez Nouvelle lame (**New Slide**) dans le menu.
3. Cliquez sur **Mode d'acquisition** (Capture Mode) et choisissez **Probe**.
4. Configurez les fluorochromes que vous utiliserez pour l'acquisition dans le panneau Sélection du fluorochrome (charger une liste préenregistrée). 
5. Sélectionnez les options que vous souhaitez utiliser dans **Personnaliser** (Charger un modèle). 
6. Cliquez sur **New Cell** (Nouvelle cellule).
7. Cliquez sur **Live**.
8. Faire la mise au point et le centrage de l'image.
9. (Facultatif) Si vous avez une forte intensité du contre-colorant, ouvrez le panneau d'interface de la lampe fluorescente et réglez le % d'intensité de la lampe à une valeur inférieure pour réduire le photoblanchiment du filtre U.V. DAPI. Filtre DAPI. 
10. Cliquez sur **Auto Setup** (Configuration automatique). Les paramètres de la caméra optimisent le contraste de l'image pour tout changement de mise au point ou de position. 
11. S'il est difficile d'obtenir un bon contraste, ouvrez la fenêtre **Capture Setup** (Configuration de l'acquisition) pour l'ajuster ;
 - les curseurs (avancés) *Autosettings*, qui contrôlent l'affichage de la configuration automatique de la caméra
 - les curseurs **Black** et **Bright** jusqu'à ce que le contraste de l'image soit amélioré. L'arrière-plan doit avoir un aspect lisse et sombre. Si l'image a un aspect plat et gris clair, il se peut que vous ayez trop de lumière, réduisez le niveau d'exposition.
12. **Capturez** une fois que l'image est mise au point et poursuivez le processus de seuillage.
13. Si le seuil automatique (**Auto Threshold**) est activé, l'image sera traitée et l'acquisition se poursuivra.
 - Si ce n'est pas le cas, l'écran de seuillage s'affiche.
 - Ajustez le seuil pour éliminer tout arrière-plan indésirable.
14. Si l'option **Auto Sequence** (Séquence automatique) est activée, le système passe au fluorochrome suivant après le seuillage.
 - Sinon, cliquez sur **Live** pour capturer le fluorochrome suivant.

15. Répéter les étapes 7 à 12 jusqu'à ce que tous les fluorochromes aient été capturés.
 - Si les options **Configuration automatique de la caméra**, **Séquence automatique** et **Seuil automatique** (Auto Camera Setup, Auto Sequence et Auto Threshold) sont activées, le système continuera à capturer le reste des fluorochromes.

Image Frame Acquisition Probe manuelle



Exemple de procédure pour l'acquisition manuelle d'images FISH après le chargement manuel de la lame et l'identification des cellules.

1. Ouvrez ou créez un dossier et sélectionnez une lame dans le Navigateur. Si vous devez créer une lame, cliquez avec le bouton droit de la souris sur le dossier et choisissez Nouvelle lame (**New Slide**) dans le menu.
2. Accédez à l'écran Manual Probe Capture en sélectionnant l'icône noire de la caméra dans la barre d'outils principale ; cette option n'est disponible que dans l'écran de démarrage.
3. Configurez ou chargez la liste d'acquisition des fluorochromes que vous utiliserez pour l'acquisition.
4. Confirmez que le contre-colorant est défini, que chaque canal a la couleur correcte, l'affectation du filtre et les paramètres de l'empilement Z, le cas échéant.
5. Sélectionnez le composant de contre-coloration ; lorsque l'obturateur fluorescent est ouvert, la barre de défilement de l'exposition peut être ajustée si nécessaire pour visualiser l'image en direct.
6. Effectuer la mise au point et positionner l'image selon les besoins.
7. Confirmer que l'**exposition automatique (Auto Exposure)** est cochée et cliquer sur **Capture**.
 - L'exposition optimale de la caméra est calculée pour le contre-colorant et capture automatiquement l'image.
 - Une fois les filtres déplacés, l'exposition optimale de la caméra est automatiquement calculée pour le premier canal de la sonde et l'image est capturée.
 - Les autres canaux sont automatiquement capturés en séquence.
8. Répétez les étapes 5 à 7 pour chaque nouvelle image.

Autre méthode : **Capture** avec réglage automatique de l'exposition sur la base d'une zone sélectionnée.

9. Sélectionnez le composant de contre-coloration, cliquez sur une zone de l'image en direct pour ajuster automatiquement l'exposition de la caméra en utilisant les informations de cette zone uniquement.
10. Effectuer la mise au point et positionner l'image selon les besoins.
11. Cliquez sur **Capture**
 - L'exposition optimale de la caméra est recalculée pour le contre-colorant en fonction de la zone sélectionnée et capture automatiquement l'image.
 - Une fois les filtres déplacés, l'exposition optimale de la caméra pour la zone sélectionnée est automatiquement calculée pour le premier canal de la sonde et l'image est capturée.
 - Les autres canaux sont automatiquement capturés en séquence.
12. Répétez les étapes 9 à 11 pour chaque nouvelle image.

Autre méthode : **Capture** (sans configuration automatique)



13. Sélectionnez le composant de contre-coloration, si nécessaire, ajustez la barre de défilement de l'exposition manuellement ou en cliquant sur une zone sélectionnée de l'image en direct.
14. Effectuer la mise au point et positionner l'image selon les besoins.

15. Sélectionnez le canal suivant et, après avoir déplacé le filtre, réglez la barre de défilement de l'exposition manuellement ou en cliquant sur une zone sélectionnée de l'image en direct.
16. Répétez l'opération pour les canaux restants, en veillant à ce qu'une exposition optimale de l'image en direct soit prédéfinie pour chaque composant de la liste d'acquisition.
17. Confirmez que **Auto Exposure** (exposition automatique) n'est pas cochée et cliquez sur Capture
 - l'image de contre-coloration est immédiatement capturée et, une fois les filtres déplacés, chaque canal fluorochrome sans ajuster l'exposition de la caméra.
18. Répétez les étapes 13 à 17 pour chaque nouvelle image (en réajustant l'exposition aux étapes 15 et 16 sur d'autres images si nécessaire).

Acquisition manuelle Spot



Exemple de procédure pour l'acquisition d'images de comptage de spots sur un système d'acquisition.

1. Accédez à l'écran d'acquisition standard en sélectionnant l'icône Capture Screen (écran d'acquisition) dans la barre d'outils principale.
2. Ouvrez ou créez un dossier et sélectionnez une lame dans le Navigateur. Si vous devez créer une lame, cliquez avec le bouton droit de la souris sur le dossier et choisissez Nouvelle lame (New Slide) dans le menu.
3. Cliquez sur **Capture Mode** (Mode d'acquisition) et choisissez *Spot Counting* (Comptage de spots). 
4. La fenêtre **Existing Assays** (Tests existants) s'ouvre, sélectionnez un Test approprié à la lame et au kit de sonde à utiliser et cliquez sur OK pour l'affecter à la lame.
5. Confirmez que les paramètres du fluorochrome dans le panneau de sélection du fluorochrome (**Fluorochrome Selection Panel**) sont corrects pour la lame et les sondes à capturer.
6. Confirmez que les options **Auto Camera Setup** (Configuration automatique de la caméra) et **Save stacks** (Enregistrer les empilements) sont sélectionnées dans la fenêtre Capture **Customize**.
7. Utilisez la touche de raccourci du clavier (numéro) pour vous déplacer vers le filtre de contre-coloration correct et ouvrir l'obturateur fluorescent.
8. Trouvez manuellement une zone contenant du matériel cellulaire et passez à l'objectif d'acquisition à fort grossissement à l'aide du panneau *Objectifs*. Faites la mise au point et transférez toute la lumière vers la caméra.
9. Cliquez sur **New Cell** (Nouvelle cellule)
10. Cliquez sur **Live***. L'image s'affiche à l'écran et l'exposition de la caméra est réglée pour un contraste optimal.
11. (Facultatif) Si vous avez une forte intensité du contre-colorant, ouvrez le panneau d'interface de la lampe fluorescente et réglez le % d'intensité de la lampe à une valeur inférieure pour réduire le photoblanchiment du filtre U.V. DAPI. Filtre DAPI. 
12. Refaire la mise au point et positionner les cellules dans l'image en direct. La configuration automatique (*Auto Setup*) peut être sélectionnée si cela modifie le contraste ou la saturation. Si nécessaire, ouvrez la fenêtre **Capture & Fluorochrome Setup** pour ajuster ;
 - les curseurs Black et Bright jusqu'à ce que le contraste de l'image soit amélioré
 - les curseurs de **Autosettings** (réglages automatiques) (avancés) peuvent être modifiés pour améliorer le contraste de la *configuration automatique*.
13. Vérifiez à nouveau la mise au point de l'image et cliquez sur **Capture**. L'image sera enregistrée.

14. Si **Auto Sequence** (séquence automatique) est activée, le système capturera les fluorochromes restants en séquence*, en ajustant automatiquement l'exposition de la caméra et en capturant les multiples plans de l'empilement Z configurés dans l'essai.
15. Si **Auto Sequence** est désactivée, cliquez sur **Live*** pour capturer le fluorochrome suivant et répétez les étapes 10 à 13 jusqu'à ce que tous les fluorochromes aient été capturés.
16. Cliquez sur le bouton **Class Monitor** en bas de la fenêtre Fluorochrome Selection pour voir combien de cellules ont été traitées et notées à partir de l'acquisition.
17. Répétez les étapes 9 - 12 (13) pour capturer d'autres images sur différentes zones de la lame jusqu'à ce que le **Class Monitor** « Total informatives... » soit suffisant pour votre analyse.







18. Passez à l'écran Analysis (Analyse) pour terminer l'acquisition et le traitement.

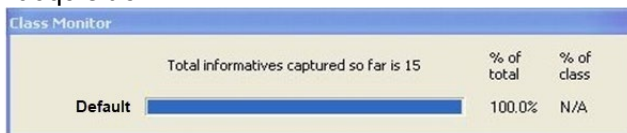
* Vous serez invité à changer de filtre si vous n'avez pas d'interface active avec la tourelle dichroïque du microscope.

GSL : Automatic Spot Counting (Comptage automatique des spots)

Exemple de procédure de numérisation et d'acquisition automatique d'images de comptage des spots FISH en interphase sur un système de numérisation GSL sans étiquettes à code-barres.

1. Passez à l'écran **Numériser** (Scan), ce qui permet à l'application de se connecter et de démarrer le matériel. 
2. (Facultatif) Chargez une lame sur la platine et utilisez la procédure d'acquisition Spot manuelle [Manual Spot Capture procedure](#) pour plusieurs images afin de confirmer les valeurs de la caméra, du filtre et de l'empilement Z.
 - Cela créera une image Frame où les paramètres du test peuvent être évalués sur un ensemble contrôlé d'images. 
 - Déchargez le plateau lorsque vous avez terminé et nettoyez la lame de toute trace d'huile si elle doit être réutilisée pour la numérisation.
3. Dans l'écran de numérisation, sélectionnez l'icône **Numériser un lot de lames**.
4. Cliquez sur l'icône de la lame 1 (position 1, plateau 1) et mettez-la en surbrillance ;
 - Sélectionnez le dossier dans lequel les données d'image seront enregistrées. 
 - Sélectionnez un modèle de numérisation approprié pour la lame. 
5. (Facultatif) Vous pouvez nommer chaque lame en cliquant sur l'étiquette dans l'extrémité dépolie de l'affichage des lames.
6. Modifiez le modèle, en confirmant qu'il est configuré pour la recherche de fluorescence et d'interphase (*Fluorescent and Interphase Finding*) et que le mode d'acquisition est réglé sur **SpotCounting**.
7. Cliquez sur le bouton **Select SPOT Assay** (Sélectionner le test SPOT) pour ouvrir la boîte de dialogue **Existing Assay** (Essai existant).
 - Sélectionnez un test dans la liste ou créez un nouveau test adapté à la lame.
 - Confirmez les paramètres du test et cliquez sur **OK** pour attribuer le test sélectionné.
8. Le modèle de numérisation est prêt à être utilisé, cliquez sur **OK** pour l'affecter à la lame sélectionnée.

9. Placez la lame d'échantillon correcte (correspondant au dossier sélectionné à l'étape 5) en position 1 sur le plateau.
10. Sélectionnez l'icône de la lame suivante et attribuez un dossier et un modèle de numérisation. Ajoutez la lame d'échantillon correspondante dans le plateau et vérifiez qu'elle est correctement placée.
11. Répétez l'opération pour toutes les autres lames et positions à utiliser dans le premier plateau. Chargez le plateau dans la première position (la plus basse) de l'empileur/cassette.
12. Répétez l'étape pour un maximum de 5 lames dans le plateau 2, en chargeant le plateau dans la position suivante (la plus basse) de l'empileur/cassette. Les touches **Ctrl** ou **Shift** vous permettent de sélectionner plusieurs lames à l'aide de la souris et de leur attribuer le même dossier ou modèle.
 - Sur les systèmes GSL 120, répétez cette procédure pour toutes les lames et tous les plateaux restants à utiliser, puis placez la cassette dans l'unité d'empilage et fermez la porte.
13. Sélectionnez **Scan** : la première lame sera numérisée à 10x pour trouver les cellules, l'huile est automatiquement ajoutée et ensuite capturée à fort grossissement.
14. Pendant l'acquisition, l'écran d'acquisition standard s'affiche en mode **Spot Counting** (voir [Acquisition Spot automatique \(Spot Auto Capture\)](#) pour plus de détails).
15. (*Facultatif*) Cliquez sur le bouton Moniteur de classe en bas de la fenêtre Sélection des fluorochromes pour voir combien de cellules ont été traitées et notées à partir de l'acquisition.



16. Lorsque le premier des comptes d'arrêt du test est atteint, l'acquisition se termine et passe à la lame suivante, en répétant la numérisation, l'ajout de l'huile et l'acquisition automatique jusqu'à ce que toutes les lames soient terminées.



www.LeicaBiosystems.com

