

Advancing Cancer Diagnostics
Improving Lives



CytoVision DX (9.0)* Sonde

*Reg. Durch Patente in den Vereinigten Staaten sowie durch Rechtsprechungen anderer Länder geschützt.

Bedienungsanleitung



CytoVision DX Version 9.0 ist zur In-vitro-Diagnostik bestimmt.

CytoVision* DX Bedienungsanleitung: Sonde

Dieses Handbuch gilt für die *CytoVision DX* Scan- und Erfassungssysteme und die *CytoVision DX* Anwendungssoftware Version 9.0.

Hinweis zum Urheberrecht

© 2024 Leica Biosystems Richmond, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

LEICA und das Leica Logo sind eingetragene Marken der Leica Microsystems IR GmbH.

CytoVision ist eine Marke der Firma Leica Biosystems Richmond Inc. Andere Marken sind das Eigentum der jeweiligen Inhaber.

*Reg. Durch Patente in den Vereinigten Staaten sowie durch Rechtsprechungen anderer Länder geschützt.

Die in diesem Dokument enthaltenen Informationen können ohne vorherige Ankündigung geändert werden und stellen keine Verpflichtung seitens Leica Biosystems Richmond, Inc dar.

Kein Teil dieses Handbuchs darf ohne ausdrückliche schriftliche Genehmigung durch Leica Biosystems Richmond, Inc, 5205 Route 12, Richmond, IL 60071, USA, in irgendeiner Form vervielfältigt, übermittelt, umgeschrieben, in einem Abfragesystem gespeichert oder in eine menschliche oder Computersprache übersetzt werden, sei es auf elektronischem, mechanischem oder magnetischem Wege, per Hand oder auf jegliche andere Weise.

CytoVision DX-Systeme werden hergestellt und vertrieben von:



Leica Biosystems Richmond, Inc.
5205 Route 12



Richmond, IL 60071
USA
Tel. (800)-537-4669

Kontaktinformationen

Auf der Seite www.leicabiosystems.com finden Sie Hinweise zu einer Vertriebs- und Kundendienst-Niederlassung von Leica Biosystems in Ihrer Nähe.

Inhalt

Vorsichtshinweise und Hinweise	6
Einleitung	7
Ressourcen	7
Symbolidentifizierung	8
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	8
Technische Daten für Probe und Objektträger	9
CytoVision DX Sonde Überblick	10
FISH-Objektträger-Scannen	10
FISH-Erfassung und -Anzeige	11
FISH-Bild-Anzeige und -Analyse	12
FISH-Bild- und Datenarten	12
Benutzeranmeldung und Start der Anwendungssoftware	14
Interphasen-Objektträger-Scannen	15
Schnellstart	15
Objektträgervorlagen	15
Klassifikationen	15
Automatische Erfassungsoptionen.....	15
Beladung mit Objektträger und Tablett	16
Objektträger-Stapel scannen (Interphase).....	17
Scan manuell konfigurieren	19
Fall- und Vorlagenzuweisung.....	19
Workflows der manuellen Scan-Konfiguration.....	20
Barcode-Scannen	22
Einrichten der Zuweisung von Objektträgern	22
Workflows für das Barcode-Scannen.....	23
Objektträgervorlagen (FISH)	24
Scanbereich.....	24
Vorläufiges Scannen.....	25
Scannen.....	25
AutoCapture	26
Bildanzeige und Anpassung	29
Überprüfen der Interphasenlisten	30
Ansicht Notizen (Interphase).....	31
Objektträgeransicht (Interphase).....	32
Scan-Klassifizierer	32
Automatische Erfassung	35
Automatische Erfassung	35

Sondenerfassung (Zellbilder)	37
Objektivsteuerung	37
Sondenerfassung: Verfahren im Überblick	38
Bedienelemente Erfassung	38
Erfassungslisten.....	39
Erfassungs- und Fluorochrom-Einrichtung	40
Erfassung anpassen.....	43
Thresholding	45
Automatisches Thresholding.....	46
Erneutes Thresholding für Rohbilder.....	46
Sondenerfassung (Framelist)	47
Objektivsteuerung	48
Framelist-Erfassung: Verfahren im Überblick	48
Optionen der Erfassungs-Konfiguration	49
Hinzufügen von Kanälen	49
Einrichten eines Kanals.....	49
Arbeiten mit Erfassungslisten	51
Erfassen von Bildern.....	52
Abschließen der Erfassung.....	53
Sondenbildanzeige	54
Bildschirmanzeige	54
Fehlersuche und -behebung	57
Erfassungssystem	57
Fehler bei der Verbindung mit dem Mikroskop.....	57
Auswirkung auf Mikroskop-Lichtqualität.....	57
GSL-Scansystem	57
Fehler bei der Verbindung mit dem GSL	57
Fokusprobleme beim 10x-Scan	58
Klassifizierungsprobleme bei 10x-Scan	58
Fokusprobleme bei 63x-Erfassung.....	58
Erfassungsprobleme beim Sondenkanal	59
Kompatibilität von Objektträger und Tablett.....	59
Exportieren von Diagnoseprotokollen	60
Anhang: Spot Counting	61
Spot Counting im Überblick	61
Spot-Counting-Assay	62
Assays für Spot-Erfassung bearbeiten.....	63
Spot-Scannen und -Erfassen	65
Objektträgervorlage (Scan konfigurieren).....	65

Manuelle Erfassung	67
Erfassung und Klassenüberwachung.....	67
Automatische SPOT-Erfassung stoppen	68
Anhang: Tissue FISH.....	69
Gewebe-FISH im Überblick	69
Gewebe-FISH-Scan und -Erfassung.....	69
1) Automatisches Scannen und automatische Erfassung:.....	69
2) Automatisches Scannen und manuelle Bereichsmarkierung:	70
3) Manuelle Bereichsauswahl für die automatische Erfassung:	70
Manuelle Erfassung	70
Objekträger-Ätzen.....	71
Gewebe-FISH-Markierung (zeitversetzte Erfassung)	72
Bildschirm „Markierungs-Viewer“	72
Anhang: M-FISH-Erfassung.....	75
Einführung in die M-FISH-Technik.....	75
Erfassung im Überblick	76
Erfassungs-Konfiguration	76
Erfassungsliste	76
Fluomap.....	77
Filter und Mikroskopie	78
Erfassen von M-FISH-Bildern	79
Manuelles Thresholding	81
Erneutes Thresholding	81
Erneut verarbeiten	82
Anhang: Schritt-für-Schritt-Beispielverfahren.....	83
Standard-Sondenerfassung.....	83
Manuelle Bildrahmen-Sondenerfassung.....	84
Manuelle Spot-Erfassung.....	85
GSL: Automatisches Spot Counting.....	86

Vorsichtshinweise und Hinweise

Obwohl größte Sorgfalt aufgewendet wurde, um die Richtigkeit der Informationen zu gewährleisten, weichen einige der Angaben und Abbildungen zwischen einzelnen Systemvarianten gegebenenfalls voneinander ab.

Möglicherweise gelten nicht alle Kategorien für die Konfiguration des Endbenutzers.

Technische Daten und Leistung

Technische Daten des Produkts und der Komponenten finden Sie in **CytoVision DX – Technische Daten**.

Hardwareinstallation

Hardwarekomponenten des *CytoVision DX*-Scan- und Erfassungssystems werden zur Installation ausschließlich von Leica Biosystems oder deren bevollmächtigten Vertretern geliefert.

Installation der Anwendersoftware

Auf den von Leica Biosystems gelieferten PC-Workstations ist die Anwendungssoftware vorinstalliert. Spezielle Anweisungen zur Installation der Anwendung auf einem separaten PC finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

Schulung

Dieses Handbuch und das **CytoVision DX Benutzerhandbuch** sind eine Ergänzung zur Bedienschulung und weiteren eingehenderen Einweisungen durch Leica Biosystems oder ihre autorisierten Vertreter.

Wartung und Fehlerbehebung

Informationen zur Fehlerbehebung bei Scan- und Erfassungsproblemen finden Sie im Kapitel **Fehlerbehebung**.

Informationen zur allgemeinen Wartung des Systems und zur Fehlerbehebung finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

Reparatur

Reparaturen dürfen nur von einer autorisierten Vertretung von Leica Biosystems durchgeführt werden. Bitten Sie den Techniker nach einer Reparatur, die Funktionstüchtigkeit des Geräts zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die erwarteten Betriebsbedingungen wiederhergestellt sind.

Cybersicherheit

Beachten Sie, dass Workstations anfällig für Malware, Viren, Datenbeschädigung und Datenschutzverletzungen sind. Richtlinien zur Cybersicherheit für Endanwender finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

Arbeiten Sie zum Schutz der Workstations mit Ihrem IT-Administrator zusammen, indem Sie die Kennwort- und Sicherheitsrichtlinien Ihrer Einrichtung befolgen. Spezifische Anweisungen und Empfehlungen zum Schutz Ihrer Workstations und Server finden Sie im Abschnitt **CytoVision DX – Technische Daten; Netzwerkverwaltung**.

Sicherheit

Der Sicherheitsschutz kann beeinträchtigt sein, wenn dieses Gerät auf eine nicht vom Hersteller angegebenen Weise eingesetzt wird.

Informationen zum Betrieb und zur Sicherheit des Systems finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

Einleitung

Das **CytoVision DX**-System ist ein qualitatives System zur automatisierten Erstellung und Anzeige von digitalen Objektträgern.

Das CytoVision DX-System ist für den Einsatz in der In-vitro-Diagnostik als Hilfsmittel für einen qualifizierten Techniker zur Überprüfung und Interpretation digitaler Bilder von Metaphasenchromosomen aus peripherem Blut und Knochenmark bestimmt.

- Das CytoVision DX-System hilft bei der Lokalisierung von Zellkernen in der Inter- und Metaphase auf standardmäßigen Mikroskopobjektträgern aus Glas, die sonst für die manuelle Visualisierung mittels herkömmlicher Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie geeignet wären.
- Es liegt in der Verantwortung des qualifizierten Technikers, geeignete Verfahren und Schutzvorkehrungen anzuwenden, um die Gültigkeit der Interpretation der Bilder zu gewährleisten, die mit dem CytoVision DX-System aufgenommen wurden.





Stellen Sie sicher, dass Sie entsprechende gute Laborpraktiken sowie die von Ihrer Einrichtung geforderten Richtlinien und Verfahren für die Präparation, Verarbeitung, Lagerung und Entsorgung der Objektträger einhalten.

Verwenden Sie dieses Gerät nur für diesen Zweck und nur auf die in diesem Dokument und im **CytoVision DX Benutzerhandbuch** beschriebene Weise.

Ressourcen

Ressource	Beschreibung
CytoVision DX Benutzerhandbuch 23MAN9D03	Enthält Referenzinformationen und Anleitungen für die Benutzerkalibrierung, das Scannen von Objektträgern, die Bilderfassung, die Bildanzeige, die Fall- und Datenverwaltung, die Fehlerbehebung und die Wartung
CytoVision DX Karyotyper-Bedienungsanleitung 23MAN9D02	Enthält Anleitungen für das Scannen von Metaphasen-Objektträgern, die Bilderfassung, die Bildanzeige, die Chromosomenanalysen (Karyotypisierung) und die Behebung von Fehlern der Anwendung
CytoVision DX Sonden-Bedienungsanleitung 23MAN9D01	(Dieses Dokument) Enthält Anleitungen für das Scannen von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung(FISH)-Objektträgern, die Bilderfassung, die Bildanzeige, die Chromosomenanalysen (Karyotypisierung) und die Behebung von Fehlern der Anwendung (dieses Dokument)
CytoVision DX – Technische Daten 23MAN9D03	Enthält detaillierte technische Daten für die <i>CytoVision DX</i> -Produktionen

Symbolidentifizierung

Symbol	Erklärung
	WARNUNG: Laserstrahl: Schützen Sie Augen und Haut vor einer Exposition. Optische Strahlung, blicken Sie niemals direkt in den Lichtstrahl.
	VORSICHT: Gefahr des Einklemmens: Halten Sie Ihre Finger von beweglichen Teilen fern.
	CE-Konformitätskennzeichnung
	Hersteller

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Ein mit Mikroskop oder motorisierten Scankomponenten geliefertes Erfassungs- oder Scansystem ist ein Präzisionsgerät, das mit Sorgfalt behandelt und nur von entsprechend ausgebildetem Personal bedient werden sollte. Es sollte stets vermieden werden, das System plötzlich auftretenden oder schweren Erschütterungen auszusetzen.

Weitere Informationen finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

Technische Daten für Probe und Objektträger

Merkm	Detail
Art der Probe	<p>Die Sonden-Funktionen von <i>CytoVision DX</i> werden für die Detektion und Bilderfassung von fluoreszierend gefärbten Metaphasenchromosomen, Interphasenzellkernen und Geweben verwendet.</p> <p>Die Proben sollten mithilfe akzeptierter Zellkulturen und Präparationstechniken erstellt und auf Mikroskopobjektträgern aus Glas präsentiert werden.</p>
Probenfärbung	<p>Das System ist für die DAPI-Färbung von Interphasenzellen optimiert.</p> <p>Die Leistung ist nicht für alle möglichen Probenfärbungs- und Präparationstechniken validiert und steht in direktem Zusammenhang mit der Qualität und Intensität der Probenfärbung sowie der Hintergrundablagerung auf dem Mikroskopobjektträger.</p> <p>Eine atypische Färbungsintensität oder ein starker Hintergrund kann die Zellsuche und Effizienz der automatischen Erfassung beeinträchtigen und zusätzliche Eingriffe des Benutzers erfordern.</p>
Technische Daten des Objektträgers	<p>Objektträger-Typ: Mikroskopobjektträger aus Glas mit eckigen Kanten (vertikal).</p> <p>Abmessungen des Objektträgers: Quadrat (90°-Ecken) im Bereich zwischen 75,1 und 76,1 mm Länge, 24,9 und 26,1 mm Breite und 0,9 und 1,2 mm Dicke</p> <ul style="list-style-type: none"> • Objektträger, welche diese Abmessungen überschreiten, passen möglicherweise nicht auf das GSL-Tablett und werden für den Betrieb des Scansystems nicht unterstützt. • Objektträger, die kleiner als diese Abmessungen sind oder (abgeschnittene) 45°-Ecken haben, passen möglicherweise nicht in das Standard-GSL-Tablett und sollten mit dem alternativen (abgeschrägten) Tablett 23GSL903XXX001 verwendet werden – dies muss bei der Systembestellung angegeben werden. <p>Die Verwendung von Objektträgern aus einem anderen Material als Glas wird nicht empfohlen, da diese möglicherweise nicht sicher in den Tischeinsatz passen oder sich im Tisch bewegen können, was sich auf die Systemleistung und Qualität der Bilder auswirken kann.</p>
Objektträgerdeckglas	<p>Für Fluoreszenzbildgebung ist die Verwendung und Installation eines Deckglases erforderlich.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Für eine optische Genauigkeit mit hochvergrößernden Ölimmersionsobjektivlinsen ist eine Deckglasdicke von 170 µm (+/- 5 µm) optimal. • Das Deckglas darf nicht über die Kante des Glas-Objektträgers hinausragen. Deckglas und Etikett müssen vollständig mit Klebstoff am Glas-Objektträger befestigt sein. • Das Eindeckmedium des Deckglases sollte frei von Luftblasen sein und sich vor der Verwendung absetzen können. <p>Durch das Anbringen des Deckglases sollte nicht verhindert werden, dass die Mikroskopobjektive ihre zentralen Positionen relativ zur Probe erreichen.</p>
Einschränkungen des Objektträgers	<p>DAPI-gefärbte Objektträger sollten eine helle, kontrastreiche Färbungsintensität aufweisen, die bei 10-facher Vergrößerung durch die Okulare des Mikroskops für den Anwender sichtbar ist, und mit Antifade geschützt sein, um Photobleichung zu verhindern.</p> <p>Eine verringerte Konzentration oder Intensität der DAPI-Färbung auf dem Objektträger kann zu einer verminderten Zuverlässigkeit des Fokus bei 10-facher Vergrößerung sowie des Scanvorgangs oder zu Scanausfällen führen.</p>

CytoVision DX Sonde Überblick

In der Bedienungsanleitung in diesem Dokument werden die Anwendungssteuerung und die spezifischen Abläufe beim Scannen, Erfassen, Anzeigen und Auswerten von FISH-Objektträgern für *CytoVision DX-Systeme* behandelt, die für das lizenzierte Softwaremodul der **Sonde** konfiguriert sind.

Der Anwender muss mit der allgemeinen Anwendungsnutzung, den Bildschirmfunktionen, den Bedienelementen der Hardwareschnittstelle, der Fallverwaltung, den Bildschirm- und Bildanzeigefunktionen und den damit verbundenen Anwendungen vertraut sein, die bei allen Systemen, auf denen die *CytoVision DX* Anwendungssoftware installiert ist, identisch sind.

- Diese sind im **CytoVision DX Benutzerhandbuch** ausführlich beschrieben:

Zusätzliche Bedienungsanleitungen enthalten proben- und arbeitsablaufspezifische Anweisungen zum Scannen, zur Erfassung und zu Karyotypisierungsverfahren von Metaphasen-Objektträgern.

- Diese sind in der **CytoVision DX Karyotyper-Bedienungsanleitung** ausführlich beschrieben:

Alle Entscheidungen zur Bildinterpretation trifft der Anwender. Es gibt keine qualitativen Anforderungen an die Probe, die Bilderfassungs- und Anzeigewerkzeuge sind jedoch für Bilder optimiert, die mit Ölimmersions-Mikroskopobjektivlinsen mit hoher Vergrößerung erfasst werden und bei denen das DAPI-gefärbte Probenmaterial mit probenangepassten, schmalbandigen Fluoreszenzfiltern farbige DNA-Sonden aufweist.

FISH-Objektträger-Scannen

Beim Scannen und automatischen Erfassen von FISH-Objektträgern werden die Funktionen der Anwendungssoftware zum Auffinden, Klassifizieren, Verschieben und Erfassen von Fluoreszenzproben genutzt.

Vor automatischen Scans und automatischer Erfassung:

- Für die Kameraintensitäts- und die Fokusbereichungen zwischen Scan- und Erfassungsobjektiven muss eine **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans** durchgeführt werden.
- Die Modi mit *automatischer Erfassung* für Objektträgervorlagen verwenden Fluorochrom und Erfassungseinstellungen aus den Konfigurationen *Liste erstellen*, *Liste speichern* oder *Erfassung anpassen* des **Erfassungsbildschirms**. Diese müssen vor dem automatischen Scan und der automatischen Erfassung eingerichtet und konfiguriert werden.

Für jeden Probentyp gibt es jeweils einen empfohlenen Scanmodus für *Finder* und *Automatische Erfassung*, der auf den erwarteten Anzeigeanforderungen des Probentyps basiert.

Objektträgertyp	Vor-Scan (1,25x)	Finder-Modus (Fluoreszenz)	Modus „Automatische Erfassung“	Bildformat
Metaphasen-FISH	K/A	Metaphase	Sonde	Zellen-Ordner
Interphasen-FISH	K/A	Metaphase	Sonde	Zellen-Ordner
Interphasen-FISH	K/A	Interphase	ProbeAuto/Spot Counting	Framelist
Gewebe-FISH	Erkennen von Ätzen	Gewebe	ProbeAuto/Spot Counting	Framelist
M-FISH	K/A	Metaphase	K/A (nur manuell)	Zellen-Ordner

- Der *Gewebefinder*-Modus erfordert das lizenzierte **Gewebe-FISH**-Modul.
- Die *Spot-Counting*-Erfassung erfordert das lizenzierte **Spot-Counting**-Modul für die automatische Signalverarbeitung von Interphasen-FISH-Bildern während der Bilderfassung.
- Alternative Scan- und Erfassungsmodus-Kombinationen sind für den Anwender nicht eingeschränkt, aber möglicherweise nicht optimal für das Erfassen oder die späteren Anzeigeanforderungen.

Eine GSL-Scansystem-Objektträgervorlage kann mit mehreren sich überlappenden Scanbereichen auf demselben Objektträger eingestellt werden – jeder Scanbereich kann für einen anderen automatischen Fluoreszenz-Erfassungsmodus eingestellt werden – wenn für die Anzeige Bilder sowohl im Zellen-Ordner- als auch im Framelist-Format erforderlich sind.

FISH-Erfassung und -Anzeige

CytoVision DX-Systeme verwenden zwei Bildformate, in denen FISH-Bilder für die spätere Bildanzeige gespeichert werden können: **Zellen-Ordner** und **Bildrahmen** (*Framelist*).

Art der Probe	AutoCapture	Manuelle Erfassung	Erfassungsoptionen
Metaphasen-FISH	Sonde	Sonde (Zelle)	Thresholding
Interphasen-FISH	Sonde	Sonde (Zelle)	Thresholding, Z-Stapel
Interphasen-FISH	ProbeAuto	Sonde (Frame)	z-Stapel
Interphasen-FISH	Spot Counting	Spot Counting*	Spot-Assay
M-FISH (Metaphase)	K/A	M-FISH* (Zelle)	K/A
* erfordert zusätzliche lizenzierte Softwaremodule			

FISH-Bild-Anzeige und -Analyse

Image Type (Bildtyp)	Analyseverwendung	Analyseoptionen	Anzeige-/Ausgabeoptionen
Zellen-Ordner-Bilder (Standard-Sonde oder M-FISH-Erfassung)			
Rohbild	Erneutes Thresholding	n/a	Exportieren
Sonde (Metaphasen-FISH)	Anzeige, Metaphase erstellen*	Fallansicht-Anzeige, Annotation	Exportieren und Drucken
Sonde (M-FISH)*	Anzeige	Fallansicht-Anzeige, Annotation	Exportieren und Drucken
Sonde (Interphasen-FISH)	Anzeige	Fallansicht-Anzeige, Annotation	Exportieren und Drucken
Metaphase (M-FISH)*	Segmentierung und Karyogramm erstellen*	Fallansicht-Zählung und -Nummer. Annotation, M-FISH-Anzeige	Exportieren und Drucken
* erfordert zusätzliche lizenzierte Softwaremodule (für Karyogrammoptionen siehe Karyotyper-Bedienungsanleitung).			
Framelist-Bilder (ProbeAuto- oder Spot-Counting-Erfassung)			
Framelist	n/a	n/a	n/a
<i>Bilder erfordern die Verwendung einer separaten Bildanalysesoftware, die mit dem „Framelist“-Format kompatibel ist.</i>			

FISH-Bild- und Datenarten

Es gibt zwei Bildformate, die von *CytoVision DX* für die Erfassung verwendet werden.

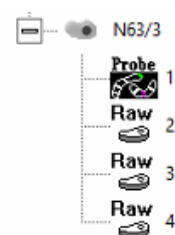
1. Fallbilder (Zellen-Ordner), die mit den Standard-Erfassungsbildschirmoptionen erfasst werden
2. Framelist-Objektträger, die mit den speziellen (Bildrahmen-)Sondenerfassungsmodi erfasst werden

Vor dem Scannen oder Erfassen von FISH-Objektträgern, ist es wichtig, dass der am besten geeignete Erfassungsmodus verwendet wird, um festzulegen, welche Anzeige- und Analyseoptionen zur Verfügung stehen.

Sonde (Zellen-Ordner)

Ein zellbasiertes Format für Metaphasen- oder Interphasen-FISH-Proben, mit Bildanzeige und Interaktion unter Verwendung von Standard-Werkzeugen des Startbildschirms

- Manuelle Erfassung im Erfassungsbildschirm-Modus *Sonde*
- Automatische Erfassung des Scansystems mit dem Erfassungsmodus *Sonde* in der Objektträgervorlage

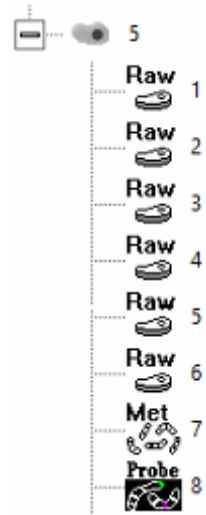


- Farb- und Rohbilder werden in einzelnen Zellen auf der Objektträger-Ebene im Fall-Navigator gespeichert.
- Optionen für Bildverbesserung, Anmerkungen, Drucken und Exportieren
- Bilder können in der Fallansicht angezeigt werden.
- Das optionale Thresholding (Hintergrundlöschung) erzeugt Objekte, die in flexible Bildschirme kopiert und mit Bildobjekten aus anderen Standard-Erfassungsmodi oder Fällen kombiniert werden können.
- Sonden-Karyotypen können auf einem System, auf dem das lizenzierte Karyotyp-Softwaremodul aktiviert ist, aus FISH-Metaphasen-Bildern erstellt werden.

M-FISH

Ein zellbasiertes Format für kombinatorisch markierte (mehrfarbige) FISH-Proben, mit Bildanzeige und Interaktion unter Verwendung von Standard-Werkzeugen des Startbildschirms

- Manuelle Erfassung im Erfassungsbildschirm-Modus *M-FISH*
- Eine automatische Erfassung durch das Scansystem ist nicht möglich.
- Farb- und Rohbilder werden in einzelnen Zellen auf der Objektträger-Ebene im Fall-Navigator gespeichert.
- M-FISH-Karyotypen können auf einem System, auf dem das lizenzierte *Karyotyp*-Softwaremodul aktiviert ist, aus Metaphasen-Bildern erstellt werden.
- Optionen für Bildverbesserung, Anmerkungen, Drucken und Exportieren
- Bilder können in der Fallansicht angezeigt werden.
- Objekte, die in flexible Bildschirme kopiert und mit Bildobjekten aus anderen Zellen-Ordner-Erfassungsmodi oder Fällen kombiniert werden können



Sonde (Framelist)

Ein Ganzbildformat für Interphasen- oder Gewebe-FISH-Proben, das mit einer separaten Bildanalysesoftware zur Anzeige und Interaktion kompatibel ist

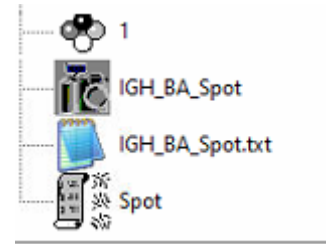


- Manuelle Erfassung mit dem Bildschirm Bildrahmen-**Sondenerfassung**
- Automatische Erfassung des Scansystems mit dem Erfassungsmodus *ProbeAuto* in der Objektträgerervorlage
- Kein Objekt-Thresholding. Alle Farb- und Rohbilddaten werden in einer einzigen *Framelist* auf der Objektträger-Ebene kombiniert.
- Z-Stapel-Schichten werden als Einzelbilder zusammen mit der maximalen Projektion gespeichert.

Spot Counting

Bei Systemen mit dem Modul **Spot Counting** sind zusätzliche Optionen verfügbar:

- Manuelle Erfassung mit dem Standard-Modus des Erfassungsbildschirms *Spot Counting* (gespeichert als Framelist)
- Automatische Erfassung des Scansystems mit dem Erfassungsmodus *Spot Counting* in der Scan-Vorlage
- Automatische Signalverarbeitung mit einem konfigurierbaren Spot-Assay für Erfassungs- und Scanparameter

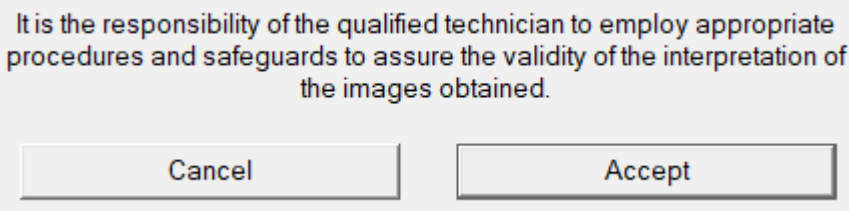
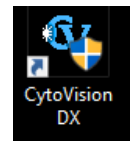


Bei der Auswahl der alternativen Sondenerfassungsoptionen müssen die wichtigsten Unterschiede zwischen den einzelnen Erfassungstypen und den anschließenden Analysemöglichkeiten berücksichtigt werden.

Bildrahmen-Daten (Sonden-Framelist und Spot Counting) haben bei der Verwendung der *CytoVision DX*-Anwendung keine Anzeige- oder Analyseoption und erfordern die Verwendung einer separaten Bildanalysesoftware, die mit dem „Framelist“-Format kompatibel ist.

Benutzeranmeldung und Start der Anwendungssoftware

1. Schalten Sie den Monitor der Workstation und den PC ein, und wenn Sie dazu aufgefordert werden, melden Sie sich mit einem Benutzernamen an, der laut Sicherheitseinstellungen über die erforderliche Berechtigung für die Anwendung verfügt.
2. Schalten Sie nach Bedarf die Steuerung für das GSL, das Mikroskop und die Fluoreszenzlampe ein.
3. Starten Sie die Anwendung durch Doppelklick auf das Desktop-Symbol oder über die Verknüpfung **Windows Start (Alle Programme) > CytoVision DX > CytoVision DX**.
4. Die Bestätigung durch den Endbenutzer wird angezeigt.



5. Klicken Sie auf **Akzeptieren**, um die Nutzung zu bestätigen und mit der Anwendung fortzufahren (oder auf **Abbrechen**, um das Programm zu schließen).

Interphasen-Objekträger-Scannen

Schnellstart

In dieser Anleitung wird davon ausgegangen, dass vor dem Start eines vollständigen Scans mit Fluoreszenz-Interphasen-Suche und automatischer Erfassung von Bildern folgende Punkte zutreffen:

1. Das System ist gemäß den Standardverfahren von Leica Biosystems, wie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch** beschrieben, korrekt konfiguriert und kalibriert worden (einschließlich **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans**).
2. Ein geeigneter Zell-**Klassifizierer** ist verfügbar.
3. Eine manuelle Erfassung mit der Erstellung von **Fluorochrom-Listen** und **Optionen nach Erfassung** für Sondenmodi wurde durchgeführt.
4. Eine **Objekträgervorlage** mit gültigem Scanbereich und Regeln für Scannen und Erfassung wurde erstellt.
5. Die Objektträger wurden in die GSL-Tablettkassette eingelegt, beginnend mit Tablett 1, Position 1.

Objekträgervorlagen

Jedem Objektträger, der gescannt werden soll, muss eine Scan-Vorlage mit allen erforderlichen Einstellungen zugeordnet werden, die es dem System ermöglicht, Zellen ausfindig zu machen, sie zu klassifizieren und in eine Erfassungsreihenfolge zu sortieren, um dann die benötigte Anzahl an Bildern automatisch zu erfassen.

- Weitere Einzelheiten finden Sie im Abschnitt [Objekträgervorlagen](#).

Klassifikationen

Die mit der Software zur Verfügung gestellten Standard-Klassifizierer basieren auf repräsentativen Fluoreszenz-Interphasen-Proben, die erwartungsgemäß einen anfänglichen Betrieb ohne wesentliche Änderungen ermöglichen.

- Diese Klassifizierer stimmen möglicherweise nicht mit den Merkmalen der Benutzerproben überein, was auf die erwarteten und normalen Abweichungen bei der Proben- und Objekträgervorbereitung zurückzuführen ist.
- Für jeden der Probentypen, die im System verwendet werden sollen, muss die Leistung des gewählten Klassifizierers überprüft werden, um festzustellen, ob eine weitere Optimierung erforderlich ist.
- Zusätzliche Bilder von neuen Scans können zu den Standard-Klassifizierern hinzugefügt werden, oder es können neue Klassifizierer erstellt werden.
- Weitere Einzelheiten finden Sie im Abschnitt [Klassifizierer > Training und Bearbeitung](#).

Automatische Erfassungsoptionen

Jeder der verfügbaren automatischen Erfassungs-Modi nach der Zellsuche erfordert eine geeignete Erfassungs-Konfiguration, um die Verwendung mehrerer Sonden (Fluorochrome) zu ermöglichen.

Für jeden Sondenassay muss die Kombination von Fluorochromen zunächst manuell erfasst werden, um die erforderlichen **Fluorochrom-Listen** oder **Optionen nach Erfassung** in der Scan-Vorlage zu erstellen, zu ändern und zu speichern.

Diese sollten während der manuellen Erfassung repräsentativer FISH-Objektträger für jeden Probentyp oder jedes Sonden-Kit oder jeden Spot-Assay eingerichtet werden, der bzw. das anschließend für Scan und Erfassung verwendet werden soll.

- Erfassen Sie ein repräsentatives Bild mit der manuellen Erfassung im Modus **Sonde**.
- Bestätigen Sie die Filter- und Farbeinstellungen für jeden Fluorochromnamen und speichern Sie die Kombination der Sondenkanäle als „Fluorochrom-Liste“ zur Verwendung mit *Sonde* und der automatischen Erfassung *ProbeAuto*.
- Der Sonden-Modus erfordert auch *Optionen nach der Erfassung* (Erfassungs-Vorlage anpassen).
- Der Modus „Spot Counting“ erfordert einen Assay, der mit Standard-Fluorochromnamen verknüpft ist.
- Weitere detaillierte Informationen finden Sie im Abschnitt zur Erfassung der einzelnen Modi.

Beladung mit Objektträger und Tablett

Öffnen Sie die Tür und nehmen Sie die Tablettkassette aus dem GSL-Stapler.

- Der Stapler muss sich in der untersten Position befinden, ehe der Verschlussmechanismus der Tür entriegelt und die Tablette in Kassetten eingesetzt bzw. aus diesen entnommen werden können.
- Auf die Schaltfläche **Tür entriegeln** können Sie über das Fenster **Scan konfigurieren*** des Scanbildschirms (Objektträger-Stapel scannen) oder nach Anklicken der Schaltfläche **Objektträger laden** im Erfassungsbildschirm zugreifen. Die Kassette wird abgesenkt und der Mechanismus entriegelt.



Legen Sie saubere Objektträger mit dem Etikett nach hinten in das GSL-Tablett.

- Objektträger 1 in jedem Tablett befindet sich auf der linken Seite. Der Objektträger muss frei von Ölrückständen sein, und das Deckglas/die Probe muss nach oben zeigen.
- Stellen Sie sicher, dass der Objektträger flach im Einsatz liegt und nach oben (hinten) und nach links gegen die Bezugskanten geschoben wird, bevor Sie den Federgriff lösen, um ihn zu fixieren.
- Sobald der Federgriff gelöst ist, vergewissern Sie sich, dass er den Objektträger fest hält und dieser sich nicht bewegt, wenn Sie den Objektträger leicht berühren.
- Wiederholen Sie den Vorgang für die restlichen Objektträger und Tablette.



Bei GSL120-Systemen sollte jedes Tablett, sobald es mit Objektträgern bestückt ist, mit der Magnetbefestigung nach innen und dem Sub-X-Loch nach außen in die Tablettkassette zurückgeschoben werden.

- Tablett 1 ist in der höchsten Position, Tablett 24 in der niedrigsten.
- Stellen Sie sicher, dass jedes Tablett waagrecht (horizontal) in seinen eigenen Platz eingesetzt ist und dass die nach außen gerichtete Kante jedes Tablett auf gleicher Höhe der danebenliegenden liegt.

Nach dem Schließen der Tür und ehe ein neuer Scan oder eine automatische Erfassung begonnen wird, scannt das System die Kassette erneut auf Tablett.

- Beim Scannen von Barcodes werden alle erkannten Tablett geladen und auf Objektträger mit Barcodes überprüft.
- Beim manuellen Scannen wird die Position des Tablett an die Positionen angepasst, denen im Bildschirm *Scan konfigurieren* manuell ein Fall- und ein Vorlagenname zugewiesen wurden.



Während des Scannens bzw. der automatischen Erfassung wird die Kassette aus Sicherheitsgründen angehoben, um die Tür zu verriegeln. Um ein Tablett einzusetzen oder zu entnehmen, muss der aktuelle Scan oder die aktuelle Erfassung gestoppt werden.

* Bei der Auswahl von *Scan konfigurieren* wird eine Überprüfung der Speichernutzung durchgeführt, um festzustellen, ob ein vollständiger Stapel von Objektträgern gescannt werden kann. Wenn die Speichernutzung der Anwendung über einem konfigurierten Schwellwert liegt:

- Eine Warnmeldung wird angezeigt, und das Fenster „Scan konfigurieren“ wird nicht geöffnet.
- Die Anwendung muss neu gestartet werden, bevor scanbezogene Aktivitäten möglich sind.

Objektträger-Stapel scannen (Interphase)

1. Stellen Sie sicher, dass GSL- und die Mikroskopkomponenten eingeschaltet sind und dass sich ausreichend Öl im Ölmechanismus befindet.
2. Starten Sie die *CytoVision DX*-Anwendung und navigieren Sie zum Scanbildschirm, damit die Anwendung eine Verbindung zur Hardware herstellen und diese in die Ausgangsposition bringen kann.
3. Klicken Sie auf das Symbol „Objektträger-Stapel scannen“, um das Fenster Scan manuell konfigurieren zu öffnen.
(Bei Barcode-Objektträgern, deren Barcodes mit einem Fallnamen und einer Objektträgervorlage verknüpft wurden, fahren Sie mit Schritt **12** fort, nachdem Sie die Objektträger in die Tablett und Kassetten gelegt haben).
4. Klicken Sie zum Hervorheben auf Objektträger 1 (Tischposition 1).
5. Wählen Sie den Fall, in dem die Bilddaten gespeichert werden sollen.
6. Wählen Sie die Objektträgervorlage aus, die die richtigen Regeln für den Scan und die automatische Erfassung für den Objektträger enthält.
7. Klicken Sie auf das Etikett am matten Ende der Objektträger-Anzeige, um dem Objektträger einen Namen zu geben.

6. Legen Sie den Objektträger, der dem ausgewählten Fall (und dem Objektträgernamen) entspricht, in Position 1 auf dem Tablett. (Weitere Informationen finden Sie unter [Beladung mit Objektträger und Tablett](#)).
7. Wählen Sie das nächste Objektträgersymbol und weisen Sie einen Fall und eine Scan-Vorlage zu. Legen Sie den passenden Proben-Objektträger in das Tablett und überprüfen Sie, ob er richtig platziert ist.
8. Wiederholen Sie diesen Vorgang für die übrigen Objektträger und Positionen, die im ersten Tablett verwendet werden sollen. Laden Sie Tablett 1 in die erste (unterste) Position im Stapler/in der Kassette.
9. Wiederholen Sie diesen Vorgang für alle übrigen Objektträger und Tablett und laden Sie die Kassette in die Stapler-Einheit.
10. Legen Sie die Kassette in den GSL-Stapler ein und schließen Sie die Tür.
11. Wählen Sie die Schaltfläche „Scan“, um mit dem Scannen zu beginnen. (Wählen Sie für Barcode-Objektträger das Symbol *Objektträger mit Barcodes scannen*.)
12. Der erste Objektträger wird mit den in der Vorlage eingestellten Scanoptionen gescannt.
- Scannen (10x): siehe [Objektträgervorlagen > Scannen](#)
13. Um einen Scan mit 10-facher Vergrößerung starten zu können, muss das System an mehreren Punkten innerhalb des Scanbereichs eine Fokuskarte erstellen.
- Dies hängt von der korrekten **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans** ab und
- davon, dass der Anfangsfokuspunkt nahe an der Probe liegt; eingestellt während der **räumlichen Kalibrierung** (modifiziert durch einen in der Objektträgervorlage gespeicherten Fokusversatz).
14. Während des Scans mit 10-facher Vergrößerung prüft das System die Bilder der Kamera bei jeder Tischbewegung (Einzelbild) und vergleicht alle erkannten Objekte mit dem [Klassifizierer](#), der in der Objektträgervorlage konfiguriert ist. So wird bestimmt, wie viele klassifizierte Zellen für die Erfassung zur Verfügung stehen.
15. Nach Abschluss des Scans mit 10-facher Vergrößerung werden die klassifizierte Zellen sortiert, um die Erfassungsrangfolge zu bestimmen, bevor die Phase der *automatischen Erfassung* eingeleitet wird.
16. Dann wird automatisch Öl hinzugefügt, und die hochvergrößernde Linse wird in Position gebracht, wobei eine Art „Öltanz“ durchgeführt wird, um das Öl gleichmäßig auf der Oberfläche des Objektträgers zu verteilen.
17. Die Bilder (Einzelbilder) werden dann mit hoher Vergrößerung erfasst. Für jedes Bild stellt das System automatisch den Fokus ein, um die Fokusposition zu bestimmen, und führt dann mit den vorlagenspezifischen Einstellungen die Erfassung durch, bevor es zur nächsten Zelle übergeht.
18. Sobald die korrekte Anzahl von Bildern erfasst wurde (wie in der Scan-Vorlage oder im Spot-Assay konfiguriert), wird die Erfassung beendet und *CytoVision DX* bewegt sich zum nächsten Objektträger weiter. Der Scan, das Ölen und die automatische Erfassung werden wiederholt, bis alle Objektträger vollständig erfasst sind.
19. Die Anwendung **Scan Monitor** zeichnet die Aktivitäten und Zeitabläufe für jede Vor-Scan-, Scan- und Erfassungs-Phase für den Scanstapel auf und sollte auf unerwartete Probleme überprüft werden.

Weitere schrittweise Arbeitsabläufe finden Sie im [Anhang](#) am Ende dieses Handbuchs.

Scan manuell konfigurieren

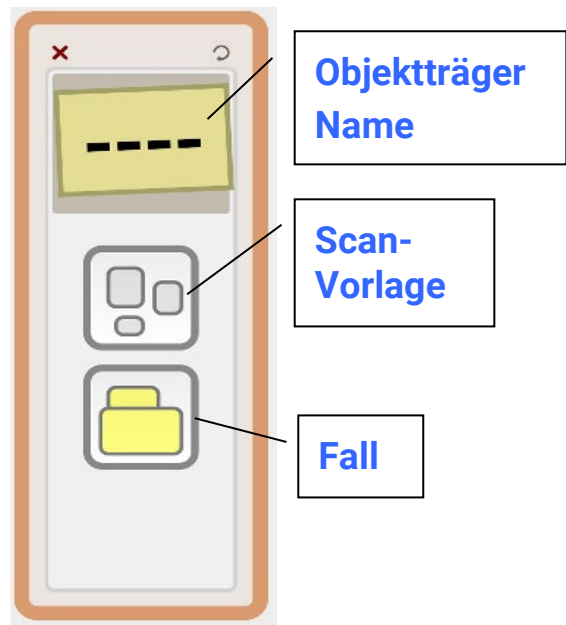


Bei jeder manuellen Konfiguration von Objektträgern und Scans muss unbedingt überprüft werden, ob Fall und Vorlagen mit den echten Objektträgern, die tatsächlich in das System eingesetzt werden, übereinstimmen.

- Um das Fehlerrisiko zu vermindern wird empfohlen, Objektträger und Einstellungen doppelt zu kontrollieren oder ein Datenblatt mit den gewünschten Fall- und Objektträgerpositionen zu verwenden.
- Auf GSL-Systemen kann die Verwendung von [Barcodescan](#) für mit Etiketten versehenen Objektträgern die Effizienz beim Scannen optimieren und die Gefahr eines Fehlers beim Konfigurieren des Scans verringern.

Fall- und Vorlagenzuweisung

- Wählen Sie im Scanbildschirm aus der Hauptsymbolleiste das Symbol **Objektträger-Stapel scannen** aus. Ein Fenster öffnet sich, in dem alle möglichen Objektträgerpositionen angezeigt werden, die für das Scannen eingestellt werden können.
- Weisen Sie jedem Objektträger, der gescannt werden soll, einen Fall und eine Vorlage zu. Wahlweise kann ein Name für den Objektträger vergeben werden; falls kein Name eingegeben wird, verwendet das System die jeweils nächstmögliche Nummer für den Fall und ergänzt am Ende einen Indikator für die Objektträgerposition, d. h. Objektträger 1_1 (für Tablett 1).
- Klicken Sie auf das Symbol Fallordner. Eine Liste der Fälle im Netzwerk wird angezeigt. Wählen Sie einen Fall aus dieser Liste oder geben Sie den Namen eines neu zu erstellenden Falls ein.
- Sobald ein Fall ausgewählt wurde, wird dieser rechts im Konfigurationsfenster mit einer Identifikationsnummer angezeigt.
 - Diese Nummer ist in der Objektträgeranzeige sichtbar.
 - Diese Liste wird bei jedem Neustart der Anwendung zurückgesetzt.
- Wenn Sie mehrere Objektträger für denselben Fall scannen, klicken Sie in dieser Liste auf den Fallnamen, um den Fall schnell zuzuweisen, anstatt den Order „Fall“ zu durchsuchen. Klicken Sie auf den Scan-Vorlagen-Selektor, um dem Objektträger eine Vorlage zuzuweisen.
 - Einmal erstellte Vorlagen erscheinen zur schnellen Auswahl auch oben links im Bildschirm „Scan konfigurieren“.
- Objektträgernamen sind optional. Wenn ein bestimmter Name benötigt wird, klicken Sie auf den Bereich „Objektträgername“ und geben die korrekte Bezeichnung ein.
- Über die Windows-Tasten **Strg** oder **Umschalt** und durch Mausklicks können mehrere Objektträger ausgewählt werden.



Automatische Erfassung aussetzen

Wurden dem Objektträgerstapel im Mikroskop alle Fälle und Vorlagen zugewiesen, wird unter jedem Objektträger ein Auswahlpfeil angezeigt.



Dies ist das Fenster **Automatische Erfassung aussetzen**, mit dem die Vorlage außer Kraft gesetzt wird und Komponenten von Scan und Auto-Capture voneinander getrennt werden können:

- **Keine.** (Standard). Das System scannt den Objektträger und führt (bei entsprechender Konfiguration) eine automatische Erfassung durch, ehe es sich zum nächsten Objektträger weiterbewegt.
- Standardeinstellung für GSL-Scan und Erfassung mit automatischer Ölung.
- **Scannen.** Hiermit können Sie sich auf die Scan-Komponente der Vorlage beschränken. Nach jedem Scannvorgang bewegt sich das System zum nächsten Objektträger weiter.
- Verwenden Sie diese Option auf einem GSL-System, wenn Sie die Miniaturansichten vor der (ausgesetzten) automatischen Erfassung manuell überprüfen.
- **Erfassung.** Wählen Sie diese Funktion aus, um nur die automatische Erfassung durchzuführen. Diese Option ist wählbar, wenn in der Objektträger-Liste klassifizierte Zellen (grünes Fähnchen) vorhanden sind. Die Erfassung folgt den hierfür definierten Regeln der Vorlage hinsichtlich Zellzahl und Sortieroptionen.

Hinweis: Manuell ausgewählte Optionen für das Scannen oder nur für die Erfassung sind nicht typisch für das Scannen von FISH-Proben für Interphasen-Proben, sind aber optional für Metaphasen-Scans.

Wenn alle Objektträger, Fälle und Vorlagen zugewiesen und die Tablett in das GSL geladen sind, drücken Sie die Schaltfläche **Scan** unten auf der Seite *Scan konfigurieren*, um den Scannvorgang zu starten. Das System verarbeitet nacheinander alle einzelnen Konfigurations- und Vorlagenkombinationen der Objektträger.

Workflows der manuellen Scan-Konfiguration

In der Praxis werden hierdurch 2 Haupt-Arbeitsabläufe abgedeckt:

1, Automatisches Scannen und Erfassen

Hierbei handelt es sich um das Routineverfahren für GSL-Systeme mit Fluoreszenz-Metaphasen- und Interphasen-Finder-Scan-Auswahl.

Objektträger werden unter *Scan konfigurieren* festgelegt, und in den Optionen für die **Zeitversetzte automatische Erfassung** wird **Keine** bestätigt.

- Der erste Objektträger wird in einem niedrigen Vergrößerungsbereich gescannt und entsprechend der ausgewählten Klassifikation verarbeitet.
- Klassifizierte Zellen werden nach den Auto-Capture-Sortierregeln der Vorlage in eine Rangfolge gebracht.
- Öl wird automatisch auf den Objektträger dispergiert und die automatische Erfassung mit hoher Vergrößerung beginnt. Zellen werden anhand des konfigurierten Erfassungsmodus und den Einstellungen automatisch fokussiert und erfasst.
- Sobald die ausgewählte Anzahl an Zellen erfasst wurde, bewegt sich der Tisch zum nächsten Objektträger oder Tablett weiter, um weitere Objektträger zu scannen und automatisch zu erfassen.
- Dieser Vorgang wird wiederholt, bis alle Objektträger dieses Stapels verarbeitet worden sind.

2, Scannen mit „Zeitversetzte automatische Erfassung“ (Metaphase)

Dieses Verfahren ist optional für GSL-Systeme mit Fluoreszenz-Metaphasen-Finder-Scans, bei denen der Benutzer die klassifizierten Zellen überprüfen, hinzufügen oder entfernen muss, bevor er die automatische Erfassung einleitet.

Objektträger werden über die Seite „Scan konfigurieren“ ausgewählt, wobei unter den Optionen für **Zeitversetzte automatische Erfassung Nur Scannen** gewählt wird:

- Alle Objektträger werden mit niedriger Vergrößerung gescannt und entsprechend des ausgewählten Klassifizierers verarbeitet.
- Nach Abschluss des Scan-Vorgangs kehrt das System wieder zum Scanbildschirm zurück und stoppt.

Der Bediener kann nun entscheiden, ob sofort die automatische Erfassung eingeleitet werden soll oder ob vor dem Speichern und der Rückkehr zum **Scanbildschirm** ein Teil der Metaphasenlisten überprüft werden soll, um klassifizierte Zellen für die Erfassung zu modifizieren:

- Wählen Sie zum Öffnen des Fensters „Scan konfigurieren“ das Symbol *Objektträger-Stapel manuell scannen*.
- Wählen Sie die Schaltfläche **Erfassung aussetzen**, die nun unten auf der Seite sichtbar wird.
Bei allen Objektträgern, die nur im vorherigen Stapel gescannt wurden (und mit mindestens einer grün markierten Zelle in ihrer Liste), werden die Tablett-Position und der Fallname erneut auf den Bildschirm geladen, wobei die Erfassungsanzeige auf „C“ eingestellt ist.
- (Optional) Löschen/Leeren Sie alle Objektträger, die Sie nicht erfassen möchten. Dies kann nach einer manuellen Überprüfung der Metaphasenlisten hilfreich sein, wenn festgestellt wurde, dass auf einigen Objektträgern keine Zellen in akzeptabler Qualität für die Erfassung vorhanden sind.
- Wählen Sie die Schaltfläche **Scan**, um den Auto-Offset-Vorgang zu starten, bei dem die Positionen mit Fokus 10x verglichen werden.
- Klassifizierte Zellen werden nach den Auto-Capture-Sortierregeln der Vorlage in eine Rangfolge gebracht.

Bei der Verwendung von *Zeitversetzte Erfassung* erstellt das System eine neue Fokuskarte auf dem Objektträger und vergleicht diese mit den gespeicherten Bildern des originalen Scans. Dabei wird ein automatischer Versatz angewendet, der auf minimale Objektträger- oder Tablettbewegungen reagiert, die beim Beladen oder Entladen der Tablett auftreten.

- Öl wird automatisch auf den Objektträger dispergiert und die automatische Erfassung mit hoher Vergrößerung beginnt. Zellen werden anhand der unter **Optionen nach Erfassung** definierten Regeln zur *Anpassung der Erfassung* automatisch fokussiert und erfasst.
- Sobald die ausgewählte Anzahl an Zellen erfasst wurde, bewegt sich der Tisch zum nächsten Objektträger oder Tablett weiter, um weitere Objektträger zu erfassen.
- Die automatische Erfassung wird fortgesetzt, bis alle Objektträger dieses Stapels verarbeitet worden sind, ohne dass ein Eingreifen erforderlich ist.

Gemischter Stapelscan

Alle FISH-Scan- und automatische Erfassungs-Modi können in einem gemischten Stapel auf dem GSL-System ausgeführt werden.

- Objektträger nur für das „Scannen“ durchlaufen den 10x-Scanteil.
- Objektträger mit der Einstellung „Keine“ durchlaufen sowohl den Zellerkennungsteil als auch den Teil der automatischen Erfassung.

- Am Ende des ersten Durchgangs können Objektträger mit *Zeitversetzter Erfassung* im Bildschirm „Scan konfigurieren“ durch Drücken der Schaltfläche **Zeitversetzt** aktualisiert werden, um die Objektträger zu laden, deren Erfassungskomponente noch nicht abgeschlossen ist.
- Klicken Sie erneut auf **Scan**, um die automatische Erfassung für die verbleibenden Objektträger zu starten.

HINWEIS: Bei jeder manuellen Konfiguration von Objektträgern und Scans muss unbedingt überprüft werden, ob Fall und Vorlagen mit den physischen Objektträgern, die in die Objektträgerladegerät-Kassette eingesetzt werden, übereinstimmen.

- Um das Fehlerrisiko zu vermindern wird empfohlen, Objektträger und Einstellungen doppelt zu kontrollieren oder ein Datenblatt mit den gewünschten Fall- und Objektträgerpositionen als Referenz zu verwenden.
- Auf GSL-Systemen kann die Verwendung von **BarcodeScan** für mit Etiketten versehenen Objektträgern die Effizienz beim Scannen optimieren und die Gefahr eines Fehlers beim Konfigurieren des Scans verringern.

Barcode-Scannen



Das Scannen von Barcodes ermöglicht die optimale Nutzung eines GSL-Scansystems. Die Zuweisung von Fällen und Vorlagen erfolgt vor dem Scannen mit der Funktion **Barcodes für Objektträger zuweisen** oder bei Vorhandensein einer separaten Schnittstelle zum Laborinformationsmanagementsystem (LIS).

- Die Anwendung „Barcode Manager“ kann verwendet werden, um Barcodezuweisungen aufzurufen und zu bearbeiten.
- Weitere Informationen hierzu und zur Unterstützung von Barcodes und deren Einschränkungen finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

Einrichten der Zuweisung von Objektträgern

Klicken Sie im Scan-Fenster auf **Barcodes für Objektträger zuweisen**, um das Konfigurationsfenster zu öffnen.



1. **Vorlage auswählen:** Die verfügbaren Scan-Vorlagen werden auf dem Bildschirm angezeigt. Neue können hier erstellt werden, doch dabei handelt es sich nicht um einen typischen Arbeitsablauf.
2. **Objektträger-Details** (Optional). Sobald eine Vorlage markiert ist, kann sie mit einer gespeicherten Objektträgerdaten-Vorlage verknüpft werden. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Details**, wenn vor dem Scan bestimmte Angaben zum Objektträger festgehalten werden müssen.
3. **Fall auswählen.** Die aktuelle Fallliste wird angezeigt (es kann jederzeit eine neue erstellt werden). Das Auswählen eines gültigen Falls aktiviert die Funktion **Barcode manuell eingeben**.
4. **Objektträger-Barcodes einscannen.** Sie können den Barcode mit einem tragbaren Barcodeleser* direkt vom Objektträger scannen (Linien-Barcodedaten können manuell eingegeben werden). Zur Kontrolle werden dann auf dem Bildschirm die Angaben zum Fall und zur Vorlage angezeigt. Eventuell doppelt vergebenen Barcodes werden rot markiert. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Barcode manuell eingeben**, wenn der tragbare Barcodeleser nicht dafür programmiert ist, dieses Fenster automatisch zu öffnen.

* Ein tragbarer Barcodeleser wird nicht mit Scansystemen geliefert. Es wird ein Lesegerät mit vollständiger 2D-Barcodeunterstützung empfohlen, z. B. „Symbol DS6707“ von Motorola oder ein äquivalentes System.

Workflows für das Barcode-Scannen

Über das Menü **Barcode-Scannen** oberhalb der Hauptsymboleiste werden 3 Scan- und Erfassungsbefehle angezeigt.

Scannen und Erfassen

Dieser Befehl entspricht dem Symbol **Objektträger mit Barcodes scannen** in der Hauptsymboleiste.

- Alle Tablett beginnend mit Tablett 1 werden nacheinander in die Kassette geladen und jede der 5 Tablettpositionen wird auf mit Barcodes versehene Objektträger überprüft.
- Sobald ein gültiger Barcode in der Datenbank erkannt wird, beginnt das System, nach den Regeln der Vorlage jeweils einen Objektträger zu scannen und zu erfassen.

Nur Scannen

Dies leitet die Entsprechung zu „Zeitversetzte automatische Erfassung“ über einen Barcode ein. Das GSL lädt jedes Tablett nacheinander und liest die Barcodedetails ein, allerdings führt es für jeden Objektträger nur die Scan-Komponente mit niedriger Vergrößerung der Vorlage durch.

- *Nur Scannen* ist für Situationen bestimmt, in denen eine manuelle Prüfung der Metaphasenlisten vorgesehen ist, um klassifizierte Zellen für die Erfassung zu kontrollieren oder um Zellen zur Kategorie mit grünen Fähnchen hinzuzufügen bzw. hieraus zu löschen.
- *Nur Scannen* ist nicht mit der typischen Verwendung von Interphasenproben kompatibel.

Nur Erfassen

Diese Funktion ist nur dafür bestimmt, unmittelbar nach dem barcodegesteuerten **Nur Scannen** verwendet zu werden, sobald die entsprechenden Zelllisten oder Bereiche nach dem Scan kontrolliert oder abgeändert wurden. Das System scannt die mit Barcodes versehenen Objektträger in der Kassette erneut und richtet sich dabei nach den Auto-Capture-Regeln der Scan-Vorlage.

Die Erfassungs-Komponente entspricht derjenigen wie unter **Erfassung aussetzen** beschrieben, d.h., das System vergleicht die Positionen des 10x Fokus-Mappings mit gespeicherten Bildern dieser Positionen aus dem eigentlichen Scan. Dies ermöglicht die Anwendung des automatische Versatzes, um kleinste Bewegungen von Objektträger oder Tablett zu kompensieren, die beim Be- und Entladen der Tablett aufgetreten sein können.

Barcode **Nur Erfassen** funktioniert wie geplant, wenn:

- Kein anderer Scan-Vorgang durchgeführt wurde, seit die Option Barcode **Nur Scannen** ausgewählt wurde.
- Keine zu erfassenden Objektträger nach Barcode **Nur Scannen** aus Tablett entfernt oder zusätzlich in diese eingesetzt wurden. Darüber hinaus wird empfohlen, die Tablett vor **Nur Erfassen** nicht auf andere Positionen in der Kassette zu verschieben.

Hinweis: Bei der Auswahl einer der Barcode-Scanoptionen wird eine Überprüfung der Speichernutzung durchgeführt, um festzustellen, ob ein vollständiger Stapel von Objektträgern gescannt werden kann.

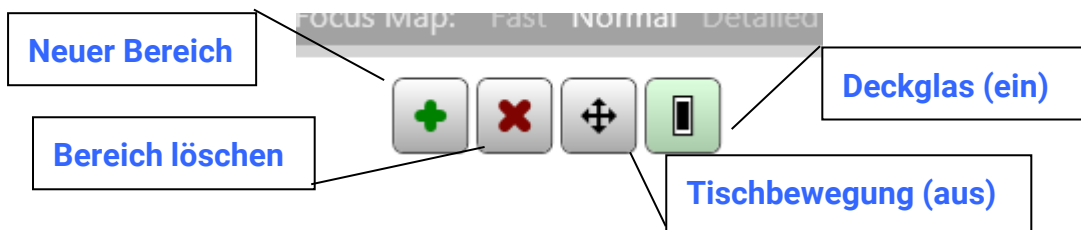
- Wenn die Speichernutzung der Anwendung über einem konfigurierten Schwellwert liegt, wird eine Warnmeldung angezeigt und der Scan nicht durchgeführt.
- Die Anwendung muss neu gestartet werden, bevor scanbezogene Aktivitäten möglich sind.

Objektträgervorlagen (FISH)

- Öffnen Sie das Fenster „Scan konfigurieren“ und wählen Sie das Symbol „Scan zuweisen“ (Objektträgervorlage) für eine der Objektträgerpositionen, um das Fenster **Objektträgervorlage auswählen** anzuzeigen.
- Wenn keine Vorlage vorhanden ist, klicken Sie auf die Schaltfläche **Vorlage erstellen**, andernfalls wählen Sie **Neu** für eine neue Vorlage oder **Bearbeiten**, um eine bereits vorhandene abzuändern.

Es sollte ein Vorlagenname verwendet werden, aus dem hervorgeht, welche Form des Scannens vorgesehen ist. In der Regel verweist dieser Name auf die Probe oder das Sonden-Kit, z. B. „FL-Blut“ oder „DGO“.

Scanbereich

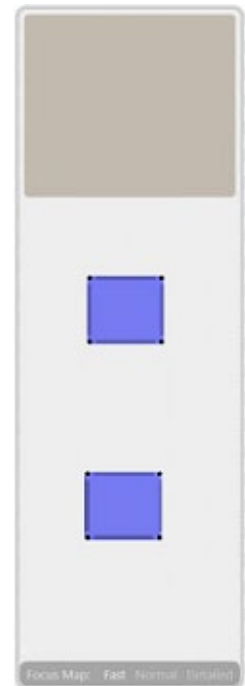


Klicken Sie auf das grüne Plus (+), um einer vorhandenen Vorlage einen neuen oder zusätzlichen Scanbereich hinzuzufügen.

- Mehrere Bereiche sind typisch für das FISH-Scannen, entweder um denselben Objektträgerbereich mit Metaphasen- und Interphasen-Suchmodi zu scannen oder um separate Positionsbereiche der Probe zu ermöglichen, die jeweils mit einem anderen Sonden-Kit hybridisiert werden.

Stellen Sie für FISH-Objektträger folgende Punkte sicher:

- Die Deckglaseinstellung ist für alle Bereiche aktiviert, da das System sonst die Scan- oder Erfassungs-Autofokuspositionen nicht genau berechnet.
- Der Scanbereich ist so eingestellt, dass er kleiner ist als die Probenposition, da so das Risiko verringert wird, dass Fokuskartenpunkte fehlschlagen, wenn kein Probenmaterial vorhanden ist.
- Für Interphasen-Scans ist es typisch, nur einen kleinen Scanbereich festzulegen, da während des Scans eine hohe Dichte an klassifizierten Zellen zu erwarten ist.
- Um die Zeiten für die Erstellung von Fokuskarten und das Risiko der Photobleichung zu verringern, werden für kleinere Bereiche 1 oder 5 Fokuskartenpunkte verwendet, abhängig von der Größe und davon, ob *Fokuskarte: Normal* oder *Fokuskarte: Schnell* ausgewählt wurde.



Sobald ein Scanbereich in der Vorlage festgelegt wurde, haben Sie Zugriff auf die Scan- und Erfassungsbereiche.

Vorläufiges Scannen

Vor-Scan verwendet die 1,25x-Objektivlinse, um Objektträgermerkmale unter Hellfeldlicht zu identifizieren.

- Die standardmäßigen Vor-Scan-Optionen sind für Fluoreszenz-Scan-Modi deaktiviert.

Scannen

Dieser Abschnitt enthält die Optionen für die Zellsuche, die für ein optimales Scannen von Probenotypen erforderlich sind:

The screenshot shows a 'Scan' configuration window with the following settings:

- Scan Mode: Fluorescent
- Finder Application: Interphase finder (with a 'Configure' button)
- Classifier: FInterphase
- Objective: 10X
- Stop scanning after: 0 good cells found (checkbox is checked)
- Focus Points button

- **Scanmodus:** Fluoreszenz für FISH-Objektträger (erfordert Kompatibilität von Mikroskop/Filter)
- **Finder-Anwendung:** Auswahl zwischen dem Metaphasen-Finder und dem Interphasen-Finder
- **Klassifizierer:** Auswahl eines für den Probenotyp geeigneten Klassifizierers
- **Objektiv:** 10x als Standard
- **Scan stoppen nach:** beendet das Scannen, sobald die Mindestanzahl der (mit einem grünen Fähnchen) klassifizierten Zellen erreicht wurde. Wird sie deaktiviert, so wird der Scenvorgang für den gesamten gewählten Scanbereich fortgesetzt. Dies ist nicht typisch für FISH-Scans und sollte nur mit Klassifizierern verwendet werden, die für Benutzerproben optimiert wurden.

Scan > Konfigurieren

Der Bereich „Finder-Anwendung konfigurieren“ ermöglicht je nach Probenotyp und Verwendung den Zugriff auf verschiedene Konfigurationsoptionen.

- Die Schaltfläche „Auf Standardwerte zurücksetzen“ zeigt die ursprünglichen Einstellungen von **Konfigurieren**.
- Dies sind nur Richtwerte, die für tatsächliche Proben möglicherweise abgeändert werden müssen.

Für Routine-Scans sind Anpassungen der folgenden Punkte typisch:

1. Ändern der Einstellungen für die **minimalen** und **maximalen** Metaphasen-/Interphasenbereiche
2. Einstellen eines Probenmodus (nur Metaphasen-Finder)

Minimaler/Maximaler Interphasenbereich

Objekte, die unterhalb des minimalen oder oberhalb des maximalen Pixelbereichs liegen, werden beim Scannen nicht für die Anzeige oder Klassifizierung in der Objektträgerliste verarbeitet.



- Beim Interphasen-Scannen ist der standardmäßige minimale Bereich (40) in der Regel niedriger als erforderlich und kann auf 80 bis 100 erhöht werden, ohne eine Veränderung der nutzbaren Interphasenzellen.
- Eine Verringerung des maximalen Bereichs (Standardwert 500) verringert die Klassifizierung von Zell-Clustern, wenn diese für die Überprüfung nicht nützlich sind.

Nur Klassifizierte hochladen

- Verwenden Sie diese Option, um nur klassifizierte Scan-Bilder auf der Grundlage des verwendeten Klassifizierers zu speichern.
- *Nur Klassifizierte hochladen* sollte bei der Ersteinrichtung und beim Testen des Klassifizierers nicht aktiviert sein.
- Nach der Optimierung des Klassifizierers ist es empfehlenswert, diese Option zu aktivieren, insbesondere wenn der Interphasen-Such-Scan viele nicht klassifizierte Hintergrundobjekte erzeugt, die das Scannen verlangsamen, die Verarbeitungszeit erhöhen und die gespeicherte *Scan-Liste* vergrößern können.

Fokuspunkte (Zellvalidierung)

Der Bereich „Zellvalidierung“ ist eine Bildbearbeitungsfunktion für die Scanfokuskarte.

- Es wird empfohlen, die Zellvalidierung für Routine-FISH-Scanvorlagen zu **deaktivieren**.
- Weitere Informationen hierzu und zur Metaphasen-Objektträger-Scanoption finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

AutoCapture

Die Optionen der automatischen Erfassung legen die Regeln für die Anzahl und Art der Bilder fest, die nach einem Scan erfasst werden sollen, wobei ein Sortierverfahren die angemessene Qualität der Bilder gewährleistet.

- Die vollständige automatische Erfassung kann nur dann konfiguriert werden, wenn in der Scan-Vorlage ein Klassifizierer ausgewählt wurde (der Standardwert „Alles“ ist kein Klassifizierer und damit werden alle gescannten Objekte in der Objektträger-Liste als nicht klassifiziert angezeigt).
- Die automatische Erfassung erfolgt auf GSL-Systemen mit automatischem Ölen unmittelbar nach einem Scan, es sei denn, der Workflow **Zeitversetzte automatische Erfassung** wird verwendet.

Sofern nicht alle Zellen benötigt werden (dies ist in der Regel für Metaphasen-Objektträger nur der Fall, wenn eine manuelle Prüfung durchgeführt wurde), deaktivieren Sie die Option **Alle Zellen erfassen** und legen Sie die Regeln für den Probenotyp fest.

Automatische Interphasen-Erfassung

Für Interphasen-Proben wird die Anzahl der zu erfassenden Bilder im Bereich „Automatische Erfassung“ festgelegt.

Im Scanbereich der Objektträgervorlage muss ein geeigneter Interphasen-Klassifizierer eingestellt werden, damit klassifizierte, grün markierte Zellen für die Erfassung zur Verfügung stehen und die Option **Automatische Erfassung durchführen** ausgewählt werden kann.

Es gibt drei **Erfassungsmodi** für die routinemäßige FISH-Bilderfassung auf *CytoVision DX*-Scansystemen: **Sonde**, **ProbeAuto** und **Spot Counting**.

1. Sie sollten mit den manuellen Sondenerfassungs-Verfahren und Fluorochromen vertraut sein.
2. Die automatische Erfassung erfordert eine *Fluorochromliste* oder einen Spot-Assay, die bzw. der zuvor erstellt und gespeichert wurde. Diese sind mit Fluorochromnamen, Z-Stapel-Einstellungen, Filter- und Farbkonfigurationen verknüpft.
3. Jeder Modus verfügt über eine Einstellung für **Objektiv**: zur Auswahl der Linse mit hoher Vergrößerung, die für die automatische Erfassung verwendet wird, in der Regel 63x, um das Sichtfeld und die Intensitätseffekte zu verbessern.
4. Der Status der **Auto-Kameraeinstellung** bestimmt, wie die Bilder bei hoher Vergrößerung während der automatischen Erfassung erfasst werden:
 - **Aktiv** (aktiviert): Für jeden zu erfassenden Kanal nimmt das System eine automatische Kameraeinstellung (Belichtung) auf der Grundlage der Intensität der im Sichtfeld vorhandenen Fluoreszenz vor.
 - **Inaktiv** (deaktiviert): Für jeden zu erfassenden Kanal verwendet das System feste Kamerawerte, die zuletzt in der Fluorochromliste im Erfassungsbildschirm gespeichert wurden.

Je nach ausgewähltem Modus stehen zusätzliche Anzeige- und Auswahloptionen zur Verfügung.

Sondenerfassungs-Modus:

In diesem Erfassungsmodus werden Bilder für die Analyse über den Hauptstartbildschirm der Anwendung erstellt.

- **Alle Zellen erfassen** oder **Erfassen von bis zu n Zellen**: - der Benutzer kann basierend auf Sortier- und Rangfolgekriterien festlegen, wie viele Zellen für die Erfassung erforderlich sind.
- **Fluorochromliste**: - Verknüpft mit einer zuvor erstellten und gespeicherten Sondenerfassungsliste.
- **Optionen nach Erfassung**: - verwendet „Erfassung anpassen“-Vorlagen, damit der Benutzer festlegen kann, wie die Bilder erfasst werden sollen. Diese Vorlagen müssen im Fenster *Anpassen* im Erfassungsbildschirm vorkonfiguriert sein.

ProbeAuto-Erfassungs-Modus:

In diesem Erfassungsmodus werden *Framelist*-Bilder erstellt.

Capture up to frames ordered on

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks

Fluorochrome list:

Post capture options:

Optionen nach Erfassung werden nicht verwendet. Folgende zusätzliche Optionen werden verfügbar:

- **Einstellung auf Gegenfärbung:** Verbessert die Belichtungsberechnung der **Auto-Kameraeinstellung** für Fluorochromkanäle, indem nur die Bereiche bearbeitet werden, die ein DAPI-Signal enthalten (Gegenfärbungs-Maske) und weniger von fluoreszierenden Zelltrümmern außerhalb der Zelle beeinträchtigt werden.
- **Einstellung auf Sonde:** Verbessert die Belichtungsberechnung der **Auto-Kameraeinstellung** für Fluorochromkanäle, indem eine größenbasierte Berechnung verwendet wird, damit sie weniger von hellen, fluoreszierenden Zelltrümmern innerhalb der Zelle beeinträchtigt werden.
- **Einstellung mit Mittelwert:** Erfasst die ersten n Einzelbilder mit der standardmäßigen automatischen Belichtungsberechnung, um einen durchschnittlichen Wert der Fluorochrom-Integration für alle verbleibenden Einzelbilder zu erhalten.
- **Speichern von Z-Stapeln:** Speichert jedes Fluorochrom-Stapelbild zusammen mit der maximalen Projektion.

Spot-Counting-Erfassungsmodus:

In diesem Erfassungsmodus werden Bilder im *Framelist*-Format erstellt.

Objective:

Capture Mode:

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

Save Z-Stacks

DGO

Fluorochrome list:

Die Einstellungen sind dieselben wie bei **ProbeAuto** mit den folgenden zusätzlichen Änderungen:

- **Spot-Assay auswählen:** Öffnet den Bereich für die Assay-Auswahl, um einen geeigneten Assay auszuwählen, der die Fluorochrom-Namen enthält, die zum Erstellen der Erfassungs-Liste, der Z-Stapel-Einstellungen und der Stopp-Parameter für die automatische Erfassung verwendet wurden.
- **Fluorochromliste:** ist nicht wählbar. Die Einstellungen für die Erfassungs-Liste und die Fluorochrome werden im Spot-Assay festgelegt und mit den Fluorochromen aus „Liste erstellen“ verknüpft.

Hinweis: Wenn Listennamen in den Bereichen **Fluorochromliste** oder **Optionen nach Erfassung** vorhanden sind, bedeutet dies, dass der Scanbereich zuvor für den Modus „Sonde“ oder „ProbeAuto“ eingestellt wurde, wo diese erforderlich sind.

Es wird empfohlen, einen neuen Bereich für Spot-Counting-Vorgänge zu erstellen, um diese Bereiche leer zu lassen.

Bildanzeige und Anpassung

Auf der rechten Bildschirmseite wird ein Livebild mit Tisch- und Fokussteuerung angezeigt, das zur Kontrolle der Position des Scanbereichs und zur Bestätigung der Kameraeinstellungen bei der automatische Fokussierung 10x (Scan) herangezogen werden kann.

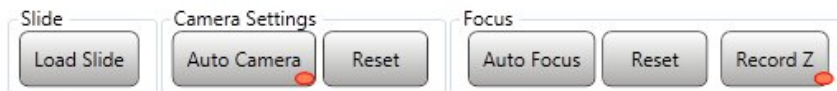
Es ist empfehlenswert, vor der erstmaligen Verwendung der Vorlage einen typischen Objekträger zu laden und an diesem zu überprüfen, ob die kalibrierten Werte für Kamera- und Fokusposition akzeptabel sind.



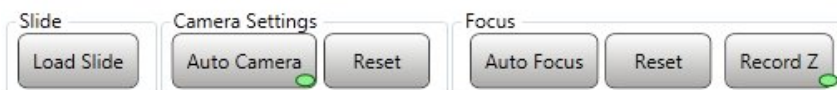
Hinweis: Die während des Scans verwendeten Kameraeinstellungen werden während der Erstellung der Scanfokuskarte festgelegt, und es sollte nicht notwendig sein, die Livebildanzeige in der Vorlage routinemäßig anzupassen.

- Die Intensität des Livebildes und die Fokusposition werden anhand der Systemkalibrierung bestimmt. Für diese wird bei Routine-Objekträgern ein sichtbares Bild *in der Nähe der Fokusebene* der Probe ohne erhebliche Anpassungen erwartet.
- Wenn das Bild deutlich zu dunkel, zu hell oder zu unscharf ist, kann dies darauf hinweisen, dass die Kalibrierung nicht korrekt ist und wiederholt werden muss.

Ein **roter** Punkt auf den Schaltflächen für **Auto-Kamera** oder **Aufnahme Z** zeigt an, dass die kalibrierten Systemeinstellungen verwendet werden – das ist normal und für Routine-Scans zu erwarten.



Ein **grüner** Punkt auf den Schaltflächen für **Auto-Kamera** oder **Aufnahme Z** zeigt an, dass diese bereits in der Vorlage verändert wurden und nun Werte verwenden, die nur für diese Vorlage gespeichert wurden.



Eine Änderung der automatischen Kamerawerte umgeht die Werte der **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans** und verwendet die Vorlageneinstellungen nur für 10x-Fokuskartenabläufe.

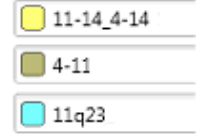
- Dies soll erwartungsgemäß verwendet werden, wenn Probenwerte, die mit dieser Vorlage verwendet werden sollen, sich erwartungsgemäß von der Standardkalibrierung unterscheiden, z. B. Fluoreszenzproben mit ausgebleichter oder schwacher DAPI-Färbung.
- Für Hellfeldproben werden keine vorlagenspezifischen Kamerawerte erwartet.

Eine Änderung von „Aufnahme Z“ (Fokusposition) sollte nur dann vorgenommen werden, wenn die Vorlage für einen spezifischen Objekträger- oder Probentyp verwendet werden soll, bei dem die Fokusebene der Probe, z. B. aufgrund von physikalischen Unterschieden bei Objekträger oder Deckglas, beim Material oder bei der Präparationsdicke, über oder unter derjenigen eines üblichen Objekträgertyps liegt.

- Die Fokusposition betrifft nur Scan und Fokus-Mapping von 10x; sie hat keinen Einfluss auf automatische Erfassungs-Fokusanwendungen mit hoher Vergrößerung.

Nach einer Aktualisierung der **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans** werden alle Scan-Vorlagen, durch die Kamera- oder Fokuswertänderungen verursacht wurden, mit einem Warnsymbol im Scanstapel-Einstellungsfenster angezeigt. So wird darauf hingewiesen, dass sie eventuell Einstellungen verwenden, die nicht mehr angemessen für das System sind und geprüft oder „zurückgesetzt“ werden müssen.

Slide Templates



Überprüfen der Interphasenlisten

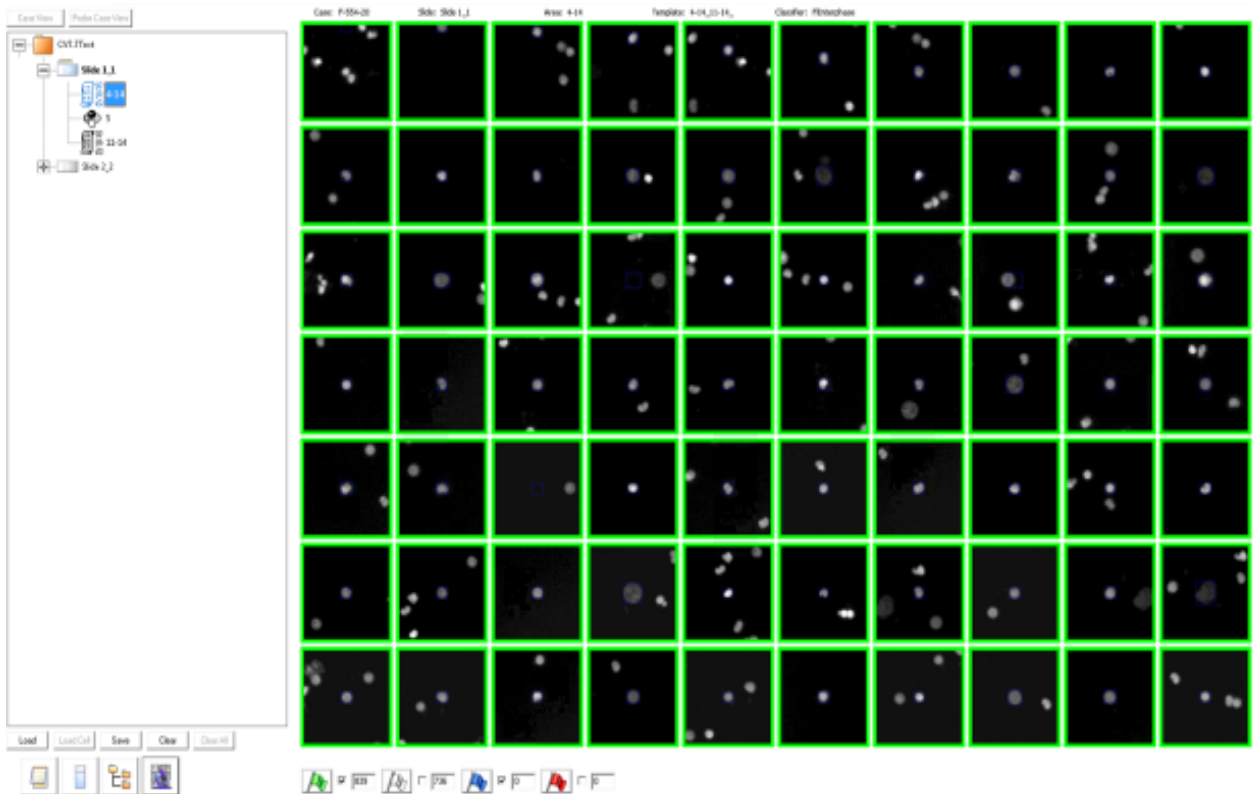


Gescannte Bilder werden in einer Objektträger-Liste gespeichert, die im Navigator im Zellen-Ordner angezeigt wird.

Objektträger-Listen können nur im Überprüfungsbildschirm geladen und angezeigt werden und werden verwendet bei

- Erstellung oder Bearbeitung von Scan-Klassifizieren.
- Allgemeine Informationen zur Anzeige und Steuerung des Überprüfungsbildschirms finden Sie im **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.

Beim Fluoreszenz-Scannen wird dies in der Regel nur zur Überprüfung der Genauigkeit der Zellklassifizierer verwendet.





Ansicht Notizen (Interphase)

Durch Klicken auf das Symbol **Notizen** wird die Navigator-Ansicht durch eine Datentabelle ersetzt, welche die Informationen und Messwerte jeder der im Hauptfenster dargestellten Miniaturansichten enthält.

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

Die meisten Spalten der Tabelle enthalten Messwerte, die anhand der Bildverarbeitung in den Miniaturansichten errechnet wurden.

- Jede Spalte kann verwendet werden, um die Bildminiaturansichten auf dem Bildschirm zu ordnen/sortieren, und mit der Objektträgervorlage als Rangfolge für die automatische Erfassung im Standard-Sonden-Modus verknüpft werden.
- Die Messwerte stehen nicht direkt im Zusammenhang mit der Zellqualität und sind nur für die Programmierung der Klassifizierer relevant.

Die für die Interphasen-Verwendung wichtigsten Spalten sind:

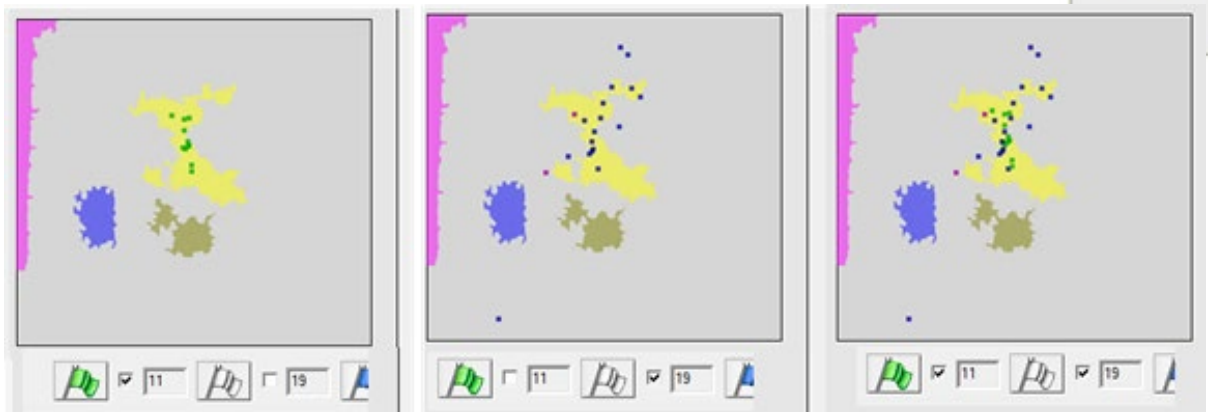
- **Zell-ID.** Alle Zellen werden in der Reihenfolge, in der sie bei einem Scan erkannt wurden, durchnummeriert. So wird eine unverwechselbare Identifikationsnummer der Zelle generiert, die unabhängig von der zugrunde gelegten Rangfolge weder gelöscht noch verändert werden kann. Diese Zahl wird jeder Zelle, die im Modus **Sonde** automatisch erfasst wurde, als Teil des Zellnamens hinzugefügt.
- **EF.** Gibt die unverwechselbare England Finder-Position für jede Zelle an, wie sie für die automatischen Erfassungsoptionen und die Funktionen zur Konvertierung von Koordinaten verwendet wird. Diese wird jedem Bild, das mit der **Sonde** automatisch erfasst wurde, als Teil des Zellnamens hinzugefügt und als Teil der Metadaten in einer **ProbeAuto**-Framelist gespeichert und in der Bildanzeige angezeigt.
- **Fläche.** Fläche der Zelle in Pixel. Nützlich, um festzustellen, ob eine Anpassung der Minimal- oder Maximalbereichseinstellung in der Scanvorlage erforderlich ist.
- **Kreis.** Zirkularität, eine mögliche Sortieroption für die automatische **Sonden**-Erfassung der Interphase.



Objektträgeransicht (Interphase)

Wenn Sie auf das **Objektträger**-Symbol klicken, wird die Navigator- oder Notizenansicht durch eine Darstellung des Objektträgers ersetzt, auf dem der Scanbereich und die während eines Scans identifizierte Zellen angezeigt werden.

Durch das Ein- und Ausblenden der verschiedenen Miniaturbild-Fähnchen für den Scan werden die Zellpositionen als Overlay auf der Darstellung des Objektträgers angezeigt.



Scan-Klassifizierer



Die Anwendungssoftware enthält die Standard-Klassifizierer *FIMetaphase* und *FLInterphase* für Fluoreszenzproben.

Klassifizierer werden einer Scan-Vorlage für Routine-Scans zugewiesen, um eine Erfassungsliste der Zellen mit grünen Fähnchen zu erstellen.

- Das System erlaubt unabhängig davon, welcher Klassifizierer für den ursprünglichen Scan verwendet wurde, auch jederzeit die Anwendung unterschiedlicher Klassifizierer auf dem Überprüfungsbildschirm.
- Klicken Sie in der Hauptsymbolleiste auf Klassifikation Anwenden. Eine Liste der vom Anwender definierten Klassifikationen erscheint.
- Wählen Sie den gewünschten Klassifizierer aus und klicken Sie auf OK. Die Miniaturansichten auf dem Überprüfungsbildschirm werden anhand der neuen Klassifizierer-Parameter erneut verarbeitet, wobei automatisch diejenigen Zellen mit grünen Fähnchen markiert werden, die den für das Trainieren des Klassifizierers verwendeten Bildern am ähnlichsten sind.
- Auf diese Weise kann eine *Scanliste* jederzeit neu klassifiziert werden, ohne den Objektträger erneut scannen zu müssen. Besonders hilfreich ist dies beim anfänglichen Training des Systems zur Bewertung eines neuen Klassifizierers.

In der Regel ist es nicht erforderlich, Klassifizierer für das FISH-Scannen zu aktualisieren oder neue zu trainieren. Optional ist dies jedoch möglich, um den zu erwartenden Bereich der Schwankungen der Proben zu testen oder abzudecken, die bei der Präparierung von Objektträgern bei unterschiedlichen Endbenutzern auftreten.

- Es ist empfehlenswert, den existierenden Klassifizierer um weitere Bilder von Scans, die nach der Systeminstallation aufgezeichnet wurden, zu ergänzen (**Anfügen**), um die Klassifizierer zu optimieren oder neue Klassifizierer nur mit Proben-Scandaten des Benutzers zu erstellen.

- Für FISH-Metaphasen-Proben wird dadurch der zu erwartende Bereich der Schwankungen der Proben abgedeckt, die bei der Präparierung von Objektträgern bei unterschiedlichen Endbenutzern auftreten.

Richtlinien für das Training und die Bearbeitung von Klassifizierern



Wenn Sie einen Klassifizierer aus einer Objektträger-(Scan-)Liste „trainieren“, werden alle Zellen, die derzeit grün oder weiß markiert sind, dem ausgewählten Klassifizierer hinzugefügt.

- Stellen Sie sicher, dass nur die von Ihnen gewünschten und überprüften Zellen mit grünen oder weißen Fähnchen markiert sind (es können auch keine Zellen als grün oder weiß markiert werden).
- Zellen aus einer Scanliste, die mit blauen und roten Fähnchen markiert sind, werden nicht zu einem Klassifizierer hinzugefügt. Sie können Zellen jedoch bei der späteren Bearbeitung des Klassifizierers blau oder rot markieren, um zu verhindern, dass ihre Daten verwendet werden.
- Die blauen Zellen werden von der Bildverarbeitung nicht verwendet. Sie können also Zellen blau markieren und sie im Rahmen von Tests mit grünen und weißen Fähnchen markieren, um die Auswirkungen zu sehen.
- Sobald eine Zelle in rot markiert wurde, wird sie gelöscht, wenn der Klassifizierer gespeichert wird (es sei denn, sie ist mit einem Kamerasymbol versehen, das anzeigt, dass sie automatisch erfasst wurde, bevor sie dem Klassifizierer hinzugefügt wurde).

Für genaue Ergebnisse sind Beispiele für gute (grün) und ungeeignete (weiß) Zellen erforderlich. Überprüfen Sie bei der Bearbeitung eines Klassifizierers folgende Punkte:

- Bei der grünen Markierung sind keine Bilder mit Zell-Clustern oder großen/starken Ablagerungen enthalten.
- Bei der weißen Markierung sind Bilder von „Nicht-Zellen“ (Ablagerungen, Flecken, atypische Färbungsintensität, Cluster, Artefakte usw.) enthalten.
- Bei der weißen Markierung sind keine „guten“ Zellen enthalten.

Häufige Fehler beim Training von Klassifizierern

1. Beim Training von Klassifizierern wurden alle mit weißem Fähnchen markierten Bilder nicht zuerst in die Klasse mit blauem Fähnchen (Warteklasse) verschoben, bevor die spezifischen grün und weiß markierten Zellen ausgewählt wurden.
 - Klassifizierer hat zu viele Zellen mit weißem Fähnchen – mehr als doppelt so viele wie mit grünem.
 - Klassifizierer hat gute Zellen in der Klasse mit weißem Fähnchen.
2. Beim Training des Klassifizierers wurden nur gute Zellen berücksichtigt und keine weiß markierten Zellen hinzugefügt.
 - Der Klassifizierer hat nur Zellen mit grünem Fähnchen, oder mehr als doppelt so viele wie mit weißem Fähnchen markierte Zellen.
3. Bei Zellen, die für das Training als „gut“ eingestuft wurden, wurde nicht auf Hintergrundobjekte/Ablagerungen innerhalb des in der Miniaturansicht angezeigten „Erfassungsfeldes“ geprüft. Für alles, was sich innerhalb der Grenze befindet, werden Messungen zu den Zelldaten hinzugefügt, und die Objekte können die echten Interphasen- oder Metaphasenwerte aus den Trainingsdaten schwächen.
 - Bei der grünen Markierung sind Zellen mit extremer Metaphasenvariation enthalten.
 - Bei der grünen Markierung sind Bilder mit großen/dunklen Kernen innerhalb des Erfassungsbereichs enthalten.

Hinweis: Metaphasen-Klassifizierer sind für diese Probleme anfälliger als Interphasen-Klassifizierer.

Trainieren (Anfügen) von Klassifizierern



Um eine Klassifizierung zu aktualisieren oder neu zu erstellen, verwenden Sie gescannte Objektträger mit Zellen, die für den Probenotyp typisch sind.

- Führen Sie einen Scan mit dem Klassifizierer **Alles** durch.
- Gehen Sie zum **Überprüfungsbildschirm**, öffnen Sie den Fall und laden Sie die Metaphasenliste.
- Wählen Sie **Alle Zellen** und markieren Sie sie als **Nicht spezifisch (Blaues Fähnchen)**, damit Sie nicht versehentlich ungeeignete Zellen zum Klassifizierer hinzufügen.
- Wählen Sie 5–15 Miniaturansichten in der gewünschten Qualität („gute“ Zellen) und markieren Sie diese mit **Grünen Fähnchen**. Fügen Sie nicht mehr als diese Anzahl von einem Objektträger hinzu, andernfalls könnte es zu einer künstlichen Verzerrung der Klassifikation kommen.
- Wählen Sie eine entsprechende Anzahl Bilder mit „ungeeigneten“ Zellen in der Klassifikation und markieren Sie diese mit **Weißes Fähnchen** als **(Nicht klassifiziert)**. Es sollte sich um Miniaturbilder handeln, die keine großen/starken Ablagerungen oder gute Zellen enthalten.
- Bestätigen Sie, dass sich nur die Zellen, die Sie ausgewählt haben, in den grünen und weißen Markierungsklassen befinden.
- Klicken Sie auf **Trainieren (Tischsymbol)**.
 - Um einen *neuen* Klassifizierer zu erstellen, wählen Sie **Neu** und geben Sie einen Namen für den Klassifizierer in das Feld **Aktuelle Auswahl** ein.
 - Um einen vorhandenen Klassifizierer zu *aktualisieren*, wählen Sie **Vorhanden** und **Anfügen**, um die neuen Zellen zum Klassifizierer hinzufügen (wählen Sie nur dann **Überschreiben**, wenn Sie zwar die Daten des alten Klassifizierers vollständig ersetzen, aber den Namen beibehalten möchten).
- Klicken Sie auf **OK**. Der Klassifizierer wird erstellt, und das System kehrt zur Liste der Miniaturansichten für die geladene Scanliste zurück.
- Wiederholen Sie diese Schritte, bis Sie für jeden einzelnen Probenotyp etwa 100-200 grüne & weiße Zellen für die routinemäßige Klassifizierung markiert haben.

Klassifizierer bearbeiten



Ein Klassifizierer ist im Grunde nichts anderes als eine *Scanliste* aus verschiedenen Fällen, die alle Bilder mit grünen und weißen Fähnchen enthält, die zu ihrer Erstellung und Aktualisierung herangezogen wurden. Daher ist es möglich, den Inhalt der Klassifikation zu überprüfen und zu modifizieren, damit sichergestellt ist, dass die richtige Anzahl von Bildern in geeigneter Qualität verwendet wurde.

- Klicken Sie auf das Symbol **Bearbeiten**.
- Sobald Sie den gewünschten Klassifizierer ausgewählt haben, werden die Schaltflächen **Löschen** und **OK** aktiv.
- (Bei der Wahl von **Löschen** werden Sie durch eine Bestätigungsmeldung darauf hingewiesen, dass hiermit der Klassifizierer und alle darin enthaltenen Daten gelöscht werden.)
- Wählen Sie **OK**, um die Miniaturansichten für den Klassifizierer zu laden (wenn eine aktive Objektträger-Liste geöffnet ist, werden Sie aufgefordert, diese zu speichern, ehe die Bilder des Klassifizierers angezeigt werden).
- Überprüfen oder modifizieren Sie die Miniaturansichten nach Bedarf.
- Wählen Sie **Speichern**, um die Anzeige der Miniaturansichten zu schließen und eventuelle Änderungen zu speichern.

Der Klassifizierer kann auf die gleiche Weise geändert werden wie eine beliebige *Scanliste*, d. h., es können Zellen anhand der 4 Farbklassen neu klassifiziert werden.

- Als Parameter für den Klassifizierer werden nur die Kategorien mit grünen und weißen Fähnchen verwendet.
- Die Klasse mit blauen Fähnchen steht zwar zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung, bleibt aber bei Verwendung des Klassifizierers unberücksichtigt.
- Mit roten Fähnchen markierte Zellen (abgesehen von denjenigen, die als automatisch erfasst gespeichert wurden) werden beim Speichern endgültig gelöscht.

Pixelwiederholung-Sortierung für die automatische Erfassung

Das Sortieren von Zellen in einem Klassifizierer ermöglicht die Verwendung der Sortier-Option *Pixelwiederholung* in der Objektträgervorlage.

- Diese ist für die Verwendung mit Metaphasen-Proben vorgesehen. Beachten Sie die **CytoVision DX Karyotyper-Bedienungsanleitung**.

Automatische Erfassung

Informationen zur Kamera- und Erfassungskonfiguration finden Sie im Abschnitt [FISH-Erfassung \(Manuell\)](#).

Automatische Erfassung



Die automatische Erfassung startet nach dem 10x-Scan und der Zellklassifizierung.

- Die klassifizierten Zellen (grünes Fähnchen) werden dem Scanbereich zugeordnet und dann zur Berechnung der zu erfassenden Zellen (Modus **Sonde**) oder zur Auswahl der Bereiche (Einzelbilder) mit den zu erfassenden Zellen (Modi **ProbeAutound Spot Counting**) verwendet.
- Die Anwendung wechselt automatisch zum Erfassungsbildschirm, geht zur ersten Zelle oder zum ersten Rahmen und startet den Erfassungsprozess. Dabei wird der Fortschritt der automatischen Erfassung angezeigt.
- Sobald die richtige Anzahl Zellen erfasst wurde, fährt das System mit dem nächsten Objektträger fort.
- Die Schaltfläche **Pause** im Fortschrittsfeld der automatischen Erfassung kann verwendet werden, um manuelle Eingriffe in die Kamera- oder Filtereinstellungen zu ermöglichen (normalerweise nicht erforderlich).
- Wenn das System pausiert, kann die Schaltfläche **Weiter** (Objektträger) verwendet werden, wenn keine weitere Erfassung des aktuellen Objektträgers benötigt wird, oder die Schaltfläche **Stopp** (Stapel), um alle verbleibenden Objektträger zu überspringen.

Auto-Capture-Optionen

Der automatische Erfassungsmodus **Sonde** ist mit den Optionen in einer Vorlage *Anpassen* verknüpft (**Optionen nach Erfassung**). Typische Auto-Capture-Regeln sind:

- Automatische Kameraeinrichtung
- Automatischer Schwellenwert
- Kein Schwellenwert
- Kontrastdehnung
- Rohbild speichern



Erfassung manuell aussetzen

Jeder Objektträger mit einer *Scanliste* kann automatisch erfasst werden, indem „Manuelle zeitversetzte Erfassung“ gestartet wird.

- Öffnen Sie das Fenster „Scan konfigurieren“ und weisen Sie dem Objektträger einen Fallnamen zu.
- Klicken Sie auf den Auswahl-Pfeil für Erfassung aussetzen.
- Im Bereich **Erfassen** wird angezeigt, welche Objektträger in dem Fall eine *Scanliste* aufweisen, die für die automatische Erfassung ausgewählt werden kann.
 - Wählen Sie die richtige Liste für den Objektträger im GSL aus.
- Klicken Sie (optional) auf **Versatz einstellen**, um das Tablett zu laden, und legen Sie einen manuellen Versatz für die Zellen fest, die mit niedriger Vergrößerung angezeigt werden. Schließen Sie das Fenster.
- Klicken Sie auf **Scannen**, um die automatische Erfassung wie oben zu starten.

HINWEIS: Beachten Sie, dass für Objektträger, die nach dem Scannen vom Tisch genommen wurden, **Versatz einstellen** erforderlich ist, da es äußerst unwahrscheinlich ist, dass sich der Objektträger in derselben Position im Tablett befindet wie zu dem Zeitpunkt, als er gescannt wurde.

- Aus diesem Grund ist „Manuelle zeitversetzte Erfassung“ nicht für mehrere Objektträger oder für routinemäßige Fluoreszenz-Proben-Workflows vorgesehen.

Sondenerfassung (Zellbilder)



Der Standardbildschirm für die manuelle Erfassung enthält Werkzeuge zur Interaktion mit der Kamera, der motorisierten Mikroskop-Hardware und den Einstellungen zur Anzeige und Erfassung eines Sondenbildes in einem Zellen-Ordner im Navigator.

Auf einem GSL-System ist es erforderlich, den Standard-Workflow für manuelle Erfassungen zu verwenden, um die Reaktion der Hardware zu bestätigen, die optimalen Softwareeinstellungen für die Bildqualität zu konfigurieren, eine Fluorochromliste zu erstellen und die „Optionen nach Erfassung“ (Vorlagen Erfassung anpassen) zu speichern, die bei der automatischen Erfassung verwendet werden.

Der Erfassungsbildschirm übernimmt beim Hochfahren den zuletzt ausgewählten Erfassungsmodus als Standardeinstellung; bitte kontrollieren oder verändern Sie diesen ggf. über die Schaltfläche **Erfassungsmodus**.

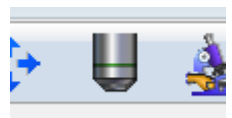


- **Sonde** – zum Einrichten, Testen und manuellen Erfassen von Objektträgern mit fluoreszenzgefärbtem Metaphasen-, Interphasen- oder zellulärem Material mit einem oder mehreren DNA-Sondenkanälen.
- **Spot Counting** – zum manuellen Erfassen von fluoreszenzgefärbtem Interphasen- oder zellulärem Material mit einem oder mehreren DNA-Sondenkanälen. Die Bilder werden als Framelist mit automatischer Bildverarbeitung unter Verwendung eines Spot-Assays gespeichert.
- **M-FISH** – zum manuellen Erfassen von Objektträgern mit fluoreszenzgefärbten Metaphasenzellen mit mehreren DNA-Sondenkanälen in einer chromosomenspezifischen Kombination für die Karyotypisierungsanalyse.

Die *CytoVision DX*-Systeme verwenden eine Monochromkamera zum Erfassen der Bilder. Zur Erstellung der farbigen Sondenbildanzeige müssen die einzelnen Fluorochrome auf dem Objektträger erfasst, pseudogefärbt und übereinander gelegt werden, wodurch ein mehrkanaliges Farb-Verbundbild entsteht.

- Für jeden separaten Fluorochrom-Kanal müssen voreingestellte Werte für die Farbe und den Mikroskopfilter festgelegt werden, die über den Bereich *Fluorochrom-Auswahl* eingestellt und gespeichert werden.

Objektivsteuerung



Bei der manuellen Erfassung verwendet die Anwendung die Position der Mikroskopobjektivlinse aus dem Bereich „Objektive“, um die Vergrößerung zu aktualisieren.

Beim Start verwendet die Anwendung standardmäßig die Linse, die in Position 1 konfiguriert ist. Bei motorisierten Mikroskopsystemen ist dies die Objektivlinse mit 10-facher Vergrößerung.

- Wenn das LCD-Touchpad des Mikroskops zum Wechseln der Objektivlinse verwendet wird, erkennt die Software nicht, dass sich die Vergrößerung geändert hat, und verwendet weiterhin den Wert für Position 1.
- Bei einer manuellen Erfassung müssen Sie das Objektiv vor der Erfassung ebenfalls bzw. ausschließlich über den Bereich *Objektive* ändern. Auf diese Weise wird der Wert nicht falsch gelesen.
- Wenn beim Start des Erfassungsvorgangs noch eine unerwartete Objektivvergrößerung eingestellt ist, wird eine Warnmeldung auf dem Bildschirm angezeigt.

Sondenerfassung: Verfahren im Überblick

- **Neue Zelle.** Erstellt im **Navigator** eine leere, zur Erfassung bereite Zelle.
 - **Live.** Gibt das Kamerabild im Hauptanzeigefenster wieder.
 - wechselt automatisch zum Mikroskopfilter für das gewählte Fluorochrom
 - aktiviert den Fluoreszenz-Shutter, um den Objektträger zu beleuchten
 - **Erfassung.** Erfasst das Livebild und leitet es für das optionale **Thresholding** weiter.
1. Wählen Sie den Fall und den Objektträger im Navigator aus und klicken Sie anschließend auf **Neue Zelle**.
 2. Laden Sie eine vordefinierte, für die Probe geeignete **Fluorochromliste** oder erstellen Sie eine neue.
 3. Lokalisieren Sie einen Probenbereich auf dem Objektträger und klicken Sie auf **Live**.
 4. Stellen Sie die Kameraeinrichtung ein (Auto-Setup), überprüfen Sie die Bildanzeige und führen Sie die **Erfassung** durch.
 5. (Optional) **Schwellwert**, um dunklen Hintergrund um die Bildobjekte zu entfernen.
 6. Drücken Sie **Live** für den nächsten Fluorochromkanal auf dem Objektträger.
 7. Stellen Sie die Kameraeinrichtung ein (Auto-Setup), überprüfen Sie die Bildanzeige und führen Sie die **Erfassung** durch.
 8. Wiederholen Sie diesen Vorgang für verbleibende Fluorochrom-Kanäle.
 9. Klicken Sie für das nächste Bild auf **Neue Zelle**.

Auf keinen Fall ...

- ... die Objektivlinse von Hand bewegen, ohne den Bereich **Objektive** zu verwenden, um die korrekte Vergrößerung der Erfassungslinse zu überprüfen.
- ... die Belichtung manuell einstellen - lassen Sie das System diese beim **automatischen Setup** berechnen.
- ... den Tisch bewegen oder fokussieren, bevor alle Kanäle in der *Fluorochrom-Liste* fertiggestellt sind.

Bedienelemente Erfassung

Das Livebild wird im Hauptanzeigefenster der Erfassungsansicht dargestellt. Unterhalb dieses Bildes befinden sich die Workflow-Schaltflächen der Bedienelemente.

- Wenn der Sondenerfassungsmodus ausgewählt ist, öffnet sich der Bereich **Fluorochrom-Auswahl** zur Auswahl oder Erstellung von Erfassungslisten.
- Für jedes Fluorochrom ermöglicht der Bereich **Erfassungs-Konfiguration** den Zugriff auf die Bedienelemente für die Kamera, Filter und die Fluoreszenzlampe.

Neue Zelle & Live

Mit der Schaltfläche **Neue Zelle** wird ein neuer Ordner im Fall angelegt, in dem das Bild gespeichert wird.

Sobald ein Bild gefunden wurde, zeigt die Schaltfläche **Live** im Hauptfenster die Kameraansicht mit den konfigurierten Mikroskopfilter- und Fluoreszenzlampen-/Shutter-Einstellungen an.

- Bewegen Sie den Tisch des Mikroskops bei Bedarf, sodass die Probe in der Mitte des Hauptfensters positioniert ist, und stellen Sie sicher, dass sie sich im Fokus befindet.

Automatische Kameraeinstellung

Routine-Erfassungen sollten mit der **Auto-Kameraeinstellung** durchgeführt werden, um die Belichtung der Kamera und dem im Bild angezeigten Kontrastbereich zu optimieren.

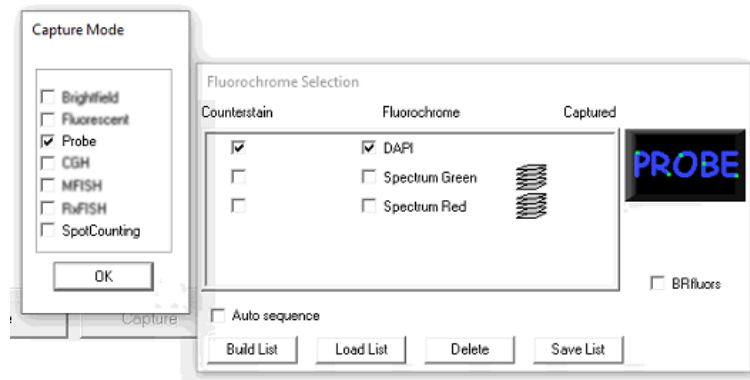
- Die endgültigen Bildwerte basieren auf der Fluoreszenzintensität, die durch die Probenqualität, den Filtertyp und die Fluoreszenzlichtquelle bestimmt wird.
- Jeder rötliche oder bläuliche Farbverlauf auf dem Bild ist ein Hinweis auf Farbsättigung. Für FISH-Erfassungen wird empfohlen, eine leichte Rotsättigung für das Probenmaterial (Gegenfärbung oder Signale) zu verwenden, während der Hintergrund dunkel ist oder eine leichte Blausättigung verwendet wird, um den Kontrast zu verbessern.
- Der Grad der Rot-/Blausättigung im Livebild wird über den Bereich **Automatische Einstellungen** in der Erfassungs-Konfiguration geändert.

Dieses kann manuell über das Kontrollkästchen neben der Kontrastleiste oder über die Funktion „Anpassen“ unter **Auto-Kameraeinstellung** erfolgen, welche die Kamerajustierung einleitet, sobald die Schaltfläche **Live** betätigt wird.

- Alle über **Autom. Einstellung** definierten Werte werden sofort angewandt.
- Das **Auto-Setup** schlägt fehl, wenn das Fluoreszenzlicht ausgeschaltet oder auf eine sehr niedrige Intensität eingestellt ist; dies muss überprüft werden.
- Das **Auto-Setup** kann fehlschlagen, wenn das Fluoreszenzsignal der Probe eine geringe Intensität oder einen geringen Kontrast aufweist.

Erfassungslisten

Im Modus „Sondenerfassung“ wird der Bereich **Fluorochrom-Auswahl** geöffnet, der bei der Einrichtung und Erfassung verwendet wird.

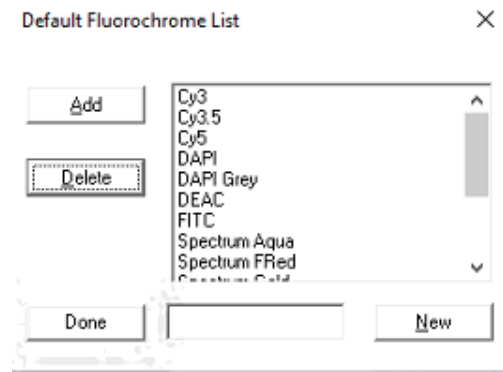


Hier können Sie eine Liste der Fluorochrome auf dem Objektträger erstellen und die Gegenfärbung (z. B. DAPI) auswählen, die von der Anwendung während des Erfassungsprozesses und für die spätere Analyse benötigt wird.

Um neue Fluorochrome zur Erfassungsliste hinzuzufügen, wählen Sie den Befehl **Liste erstellen**. Es erscheint ein Menü mit einer Liste der verfügbaren, vorprogrammierten Fluorochrome.

Klicken Sie auf diejenigen, die Sie in Ihrer Erfassungsliste verwenden möchten, und wählen Sie jeweils **Hinzufügen**.

- Erstellen Sie die Liste in der Reihenfolge, in der Sie die Zelle erfassen wollen, mit der Gegenfärbung zuerst.
- Aktivieren Sie das Kästchen für die richtige **Gegenfärbung**.
- Überprüfen und ändern Sie für jeden Fluorochromnamen die Einstellungen nach Bedarf über den Bereich *Erfassungs- und Fluorochrom-Einrichtung*.
- Verwenden Sie **Liste speichern**, um eine *Fluorochromliste* zu erstellen, die mit einer Scanvorlage für die Erfassungsmodi **Sonde** und **ProbeAuto** verknüpft werden kann.



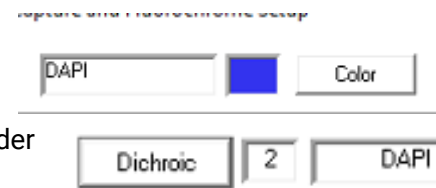
Hinweis: Wenn Sie die angepassten Werte der Einrichtung beibehalten möchten, müssen Sie nach Anpassungen **Liste speichern** auswählen.

Erfassungs- und Fluorochrom-Einrichtung



Mit „Erfassungs-Konfiguration“ wird ein Fenster zur Steuerung von Kamera und Hardware geöffnet. Klicken Sie auf das Kästchen *Erweitert*, um auf die Positionen der dichroitischen Filter und die erweiterten Bedienelemente der Kamera zur Modifizierung der Einstellungen zugreifen zu können.

- **Farbe:** Legt die Overlay-Farbe für das bei der Erfassung verwendete Fluorochrom fest.
- **Dichroitisch:** Konfiguriert den Mikroskopfilter, der bei der Erfassung des Fluorochroms verwendet wird.



Beide Einstellungen müssen vor jeder manuellen oder automatischen Erfassung für jedes Fluorochrom, das in einer Erfassungsliste oder einem Spot-Assay verwendet werden soll, eingestellt und mit der Option „Als Standard speichern“ gespeichert werden.

Kamera-Schieberegler

Verstärkung, Versatz und Belichtung werden automatisch durch **Auto-Setup** festgelegt oder können mit den drei Schieberegler manuell angezeigt und geändert werden.



Eine manuelle Anpassung der Schieberegler (über das Fenster **Erfassungs-Konfiguration**) ist normalerweise nur dann erforderlich, wenn **Auto-Setup** fehlschlägt oder das Bild übermäßige Hintergrundobjekte aufweist, die den Kontrast von den Zellen oder Signalen weg verschieben können.

Helligkeit (Kameraverstärkung)

- Wird bei einem Einzelbild eine stärkere (oder schwächere) Rotsättigung benötigt, kann diese über den Schieberegler Hell manuell eingestellt werden.
- Alle roten Bereiche in der Live-Anzeige werden im erfassten Bild als weiß gespeichert, bevor Pseudofarbe darauf angewendet wird.

- Die Rotsättigung von Sondensignalen kann zu einer verbesserten, „intensiveren“ Farbanzeige führen, die für die visuelle Signalanzeige nützlich ist.
- Eine übermäßige Sättigung führt zum Verlust von relativen oder quantitativen Informationen, die für eine spätere Analyse nützlich sind (z. B. DAPI-Bandierung in Metaphasenchromosomen).

Schwarz (Kameraversatz)

- Wird bei einem Einzelbild eine stärkere (oder schwächere) Blausättigung benötigt, kann diese über den Schieberegler Schwarz manuell eingestellt werden.
- Alle blauen Bereiche in der Live-Anzeige werden im erfassten Bild als schwarz gespeichert.
- Die Blausättigung im dunklen Bildhintergrund führt zu einem verbesserten Kontrast im endgültigen Bild, sollte aber nicht im gesamten Bild vorhanden sein.

Belichtung (Kameraintegration)

- Eine manuelle Justierung des Schiebereglers für Belichtung wird für die routinemäßige Erfassung nicht empfohlen, sondern es sollte immer **Auto-Setup** verwendet werden, um die optimale Belichtungszeit zu ermitteln.
- Bei Fluoreszenzproben hängt die maximale Belichtungsdauer von der Intensität ab, sie sollte aber immer mindestens 0,005 (5 ms) betragen.

Automatische Einstellung

Über **Autom. Einstellungen** können die Ergebnisse des **Auto-Setup** der Kamera modifiziert werden, um den Grad der Blau- oder Rotsättigung im endgültigen Livebild zu verstärken. Einzelne Fluorochromkanäle können bei Bedarf separat eingestellt werden.

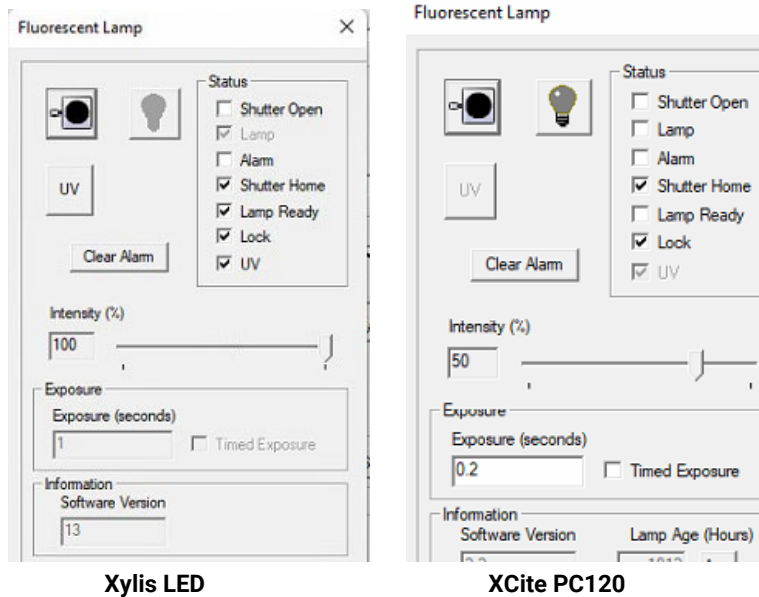
Zur Verbesserung der Intensitätsanzeige von FISH-Bildern werden folgende Werte empfohlen:

- Stellen Sie den maximalen (roten) Wert auf **(+) 3–5** ein, was die Intensität des Signals erhöht.
- Stellen Sie den minimalen (blauen) Wert auf **(+) 0,5** ein, um das Hintergrundrauschen abzdunkeln.

Einstellung der Fluoreszenzlampe

Der Bereich zur Steuerung der Xylis/X-Cite-Fluoreszenzlampe kann durch Anklicken des Lampensymbols im Bereich „Erfassungs-Konfiguration“ geöffnet werden (für die Anzeige muss der Schalter „Erweitert“ aktiviert sein).





Xylis LED

XCite PC120

Der Bereich für die Fluoreszenzlampen kann verwendet werden, um den Betrieb der Lampe während eines manuellen Erfassungsvorgangs zu überprüfen.

- Mit der Schaltfläche „Shutter“ in diesem Bereich kann der Shutter wie mit einem Schalter geöffnet und geschlossen werden.
- Die Belichtungssteuerung zeigt die Lampenintensität und die Belichtungszeiten an. - Es wird in der Regel eine Intensität von 100 % für routinemäßige FISH-Scans und Erfassungen verwendet.
- Die Kontrollkästchen *Status* zeigen an, in welchem Zustand sich die verschiedenen Teile der Lampe befinden.

Systeme mit einer XCite PC-120-Einheit verfügen auch über eine Lampensteuerung.

- Mit der Schaltfläche „Lampe“ wird die Lampe ein- und ausgeschaltet.
- Das Symbol ist gelb, wenn die Lampe eingeschaltet und einsatzbereit ist.
- Wenn das Symbol grau ist, ist die Lampe ausgeschaltet und befindet sich im „Standby“-Betrieb (dies wird auf dem LCD-Display an der Vorderseite der Lampensteuerung als „Birne“ angezeigt). Sie wird während eines Scans automatisch aktiviert, muss aber für die Verwendung im Erfassungsbildschirm manuell eingeschaltet werden.

Wenn Sie einen unbeaufsichtigten FISH-Objektträger-Scan und eine automatische Erfassung eines Stapels durchführen, können Sie die Anwendung so einstellen, dass die X-Cite-Lampe am Ende des Stapels automatisch ausgeschaltet wird.

- Navigieren Sie zum **Scan**bildschirm und wählen Sie das Menü „Dienstprogramme“.
- Die Informationen zeigen an, wie das System derzeit eingestellt ist: „Fluoreszenzlampe nach dem Stapel anlassen“ oder „Fluoreszenzlampe nach dem Stapel ausschalten“
- Wenn Sie auf den Text klicken, wechselt das System zur alternativen Einstellung (die dann angezeigt wird).

z-Stapel

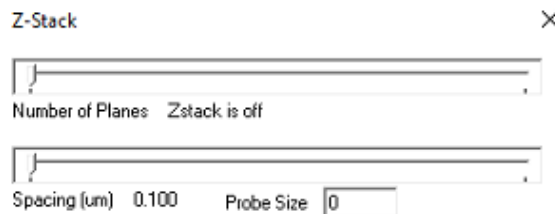
Z-Stapel wird verwendet, um SONDENSIGNALE in verschiedenen Fokusebenen zu erfassen.

Während der Erfassung wird der Fokuspunkt der Gegenfärbung (DAPI) als Zentrum des Fokusbereichs für jede Fluorochromerfassung verwendet, wobei der Fokusbereich den Abstand zwischen den einzelnen Stapeln bestimmt.

- Das endgültige Bild wird gespeichert, wobei die Stapel als eine einzelne Schicht „**Maximale Projektion**“ zusammengeführt werden.
- Nach der Erfassung können die einzelnen Stapelbilder nicht mehr überprüft werden. Wenn dies erforderlich ist, müssen die FISH-Bilder mit manuellem Spot Counting oder *Bildrahmen*-Sondenerfassung in einer Framelist erfasst und mit einer separaten, mit dem „Framelist“-Format kompatiblen Bildanalysesoftware angezeigt werden.

Um ein Fluorochrom für die Z-Stapel-Erfassung einzurichten, klicken Sie im Dialogfeld *Erfassungs- und Fluorochrom-Einrichtung* auf **Z-Stapel**.

- Das Dialogfeld „Z-Stapel“ wird geöffnet.
- Wählen Sie die **Anzahl der Ebenen** und den **Abstand** zwischen ihnen aus. Der Abstand wird in Mikrometern mit Schritten von 0,1 µm angegeben.
- Setzen Sie die **Anzahl der Ebenen** auf 0 (**Z-Stapel ist ausgeschaltet**), um den Z-Stapel zu entfernen.
- Klicken Sie abschließend auf **Anwenden**.



Hinweis: Für die Erfassung mit manuellem Spot Counting werden die Z-Stapel-Einstellungen aus den separat konfigurierten Spot-Assay-Einstellungen erstellt.

Erfassung anpassen



Sobald der grundlegende Erfassungsprozess verstanden wurde, verwenden Sie die Optionen unter **Anpassen** dazu, den Umfang der erforderlichen Anwenderinteraktion zu ändern.

Routinemäßige Sondenerfassungsoptionen:

Empfohlene Einstellungen:

- **Auto-Kameraeinstellung** - Leitet das **Autom. Setup** der Kamera ein, sobald die Schaltfläche Live ausgewählt wird.
- **Auto-Schwellwert** – überspringt das manuelle Thresholding (Hintergrundentfernung) und verwendet die Einstellungen **Kein Schwellwert** oder **Schwellwert vorhersagen**.
- Diese Option muss für gespeicherte Vorlagen, die in automatischer **GSL-Sonden**-Erfassung verwendet werden, aktiviert sein und zusammen mit **Rohbild speichern** verwendet werden.
- **Kein Schwellwert** – entfernt den Bildhintergrund um die Livebilddaten nicht, so dass ein einzelnes Blockbild entsteht. Diese Option wird automatisch angewendet, wenn **Auto-Schwellwert** verwendet wird, und ist optimal für die schnelle Erfassung von Interphasen-FISH.
- **Sondenhintergrund ausschneiden** – verbessert die Anzeige von Interphasen-FISH-Signalen vor dem Hintergrund.
- **Kontrastdehnung** – normalisiert das endgültig gespeicherte Bild, um die Anzeige zu verbessern. Diese Option sollte für Bilder, bei denen Thresholding verwendet wird, stets verwendet werden, um zu verhindern, dass die Kanten der verbleibenden Objekte künstlich intensiv erscheinen.
- **Rohbild speichern** – erstellt eine separate Bilddatei für jeden erfassten Fluoreszenz-Kanal.
Beim Rohbild wurde der Hintergrund noch nicht entfernt oder verstärkt und es kann über das Symbol „Schwellwert“ in der Hauptsymbolleiste „neu erfasst“ werden.

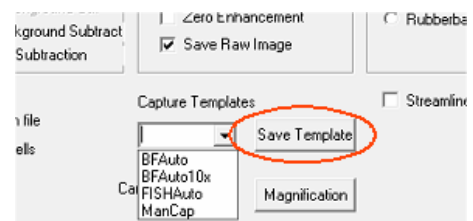
- Ein solches erneutes Thresholding kann bei Metaphasen- oder Interphasenbildern nützlich sein, wenn Sie einzelne Objekte für eine spezifische Bildverbesserung, für das Kopieren auf einen flexiblen Bildschirm oder für die Erstellung eines Sonden-Karyotyps heraustrennen möchten.
- „Rohbild speichern“ wird insbesondere bei der Verwendung von **Auto-Schwellwert** für die **Sondenerfassung** empfohlen.
- Der Zugriff auf die unverarbeiteten Bilddaten kann gleichfalls eine Anforderung lokaler Laboratorien sein.

Optionale Einstellungen

- **Auto-Sequenzieren** – Nach der Erfassung des Bildes mit Gegenfärbung (DAPI) wird die Erfassung fortgesetzt, ohne dass Sie für die verbleibenden Sondenkanäle auf „Live“ oder „Erfassen“ drücken müssen.
- **Schwellwert vorhersagen** – legt für das Löschen des Hintergrunds um Objekte im Bild einen angemessenen geschätzten Schwellwert fest. Diese Option wird automatisch angewendet, wenn **Auto-Schwellwert** verwendet wird, und ist optimal für Metaphasenchromosome, wenn Sonden-Karyotypisierung erforderlich ist.
- **Auto-Registrieren von Bildern** – erfasst die Sondenbilder mit einer einstellbaren X/Y-Verschiebung im Vergleich zum DAPI-Bild (Gegenfärbung), um optische oder Filterverschiebungen auszugleichen.
 - Es wird nicht erwartet, dass diese Option verwendet wird, es sei denn, es gibt ein optisches Problem mit einem Filterwürfel oder der Ausrichtung des Strahlengangs eines Mikroskops.
- **Automatischer Fokusversatz** – Wenn diese Funktion aktiviert ist, werden Fokusbewegungen, die Sie während einer manuellen Erfassung mit dem Schieberegler vornehmen, relativ zur Gegenfärbung aufgezeichnet und automatisch auf nachfolgende Erfassungen angewendet. Versätze werden in der Fluorochromliste gespeichert.
 - Hinweis:** Wird von der automatischen Erfassung mit Spot Counting im Rahmen einer Scanvorlage nicht verwendet.

Die optimalen Einstellungen hängen von der Art der Probe ab. Verwenden Sie die Schaltfläche **Vorlage speichern**, um Routine-Namen für Einstellungen zu vergeben:

- Bei GSL-Scansystemen werden diese als **Optionen nach der Erfassung** während der automatischen Sondenerfassung verwendet.



Vergrößerung

Einstellungen für die **Vergrößerung** sind erforderlich, um während der Erfassung einen genauen Bildskalierungsfaktor zu erstellen.

- Das **Erfassungs-Objektiv** verwendet die Position des Mikroskopobjektivs (für die FISH-Erfassung voraussichtlich 63x).
- Der Wert für das **C-Mount** sollte für den C-Mount-Konnektor der Kamera eingestellt werden (standardmäßig 1x).

In Kombination wird mit diesen beiden Werten eine Objektskalierung und eine Anzeigauflösung berechnet, die für die Berechnung von Objektgrößen bei der FISH-Metaphasenkaryotypisierung und von *Framelist*-Signalgrößen verwendet werden.



Bei der manuellen Erfassung wird die Position der Mikroskopobjektivlinse, die im Bereich **Objektive** eingestellt wurde, verwendet, um die Vergrößerung zu aktualisieren.

- Dies wird von dem Model „Objektive“ in der Anwendung für die **Mikroskopkalibrierung** konfiguriert.
- Mikroskope mit einem motorisierten Objektivrevolver müssen für alle physischen Positionen, die dem Mikroskop zur Verfügung stehen, konfiguriert werden. (Standard bei GSL-Systemen)

Falsche Werte führen zu Fehlern bei der Karyogramm-Klassifizierung oder der Anzeige der Signalgröße.

Wenn versucht wird, eine manuelle Erfassung mit einem Erfassungs-Objektiv mit geringer Vergrößerung durchzuführen, erscheint eine Warnmeldung, wenn die Schaltfläche **Live** gedrückt wird – wählen Sie „Weiter“ und wechseln Sie mit Hilfe der Software-Bedienelemente zum richtigen Objektiv, bevor Sie auf **Erfassen** drücken.

Dies kann dadurch verursacht werden, dass die Mikroskopobjektivlinse manuell (oder über das LCD-Touchpanel) bewegt wird, ohne dass die Anwendungssteuerung **Objektive** verwendet wird, um die richtige Vergrößerung einzustellen.

- Beim Start verwendet die Anwendung standardmäßig die Linse, die in Position 1 konfiguriert ist.
- Wenn das LCD-Touchpad des Mikroskops zum Wechseln der Objektivlinse verwendet wird, erkennt die Software nicht, dass sich die Vergrößerung geändert hat, und verwendet weiterhin den Wert für Position 1.
- Bei einer manuellen Erfassung müssen Sie das Objektiv vor der Erfassung ebenfalls bzw. ausschließlich über den Bereich **Objektive** ändern. Auf diese Weise wird der Wert nicht falsch gelesen.

Hinweis: Die korrekte Position des Objektivs wird automatisch im Rahmen der automatischen Erfassung mit dem GSL eingestellt, und die Objektskalierung wird mithilfe der Komponente „Abbildungsmaßstäbe“ der **räumlichen Kalibrierung** für die ausgewählte Objektivlinse berechnet.

Thresholding

Das Thresholding ist für die Sondenerfassung optional (und ist bei Spot-Erfassung und M-FISH deaktiviert).

- Ein erneutes Thresholding kann bei Rohbildern nach der Erfassung durchgeführt werden, um das Sondenbild zu aktualisieren.
- Falls **Auto-Schwellwert** in den Einstellungen von **Anpassen** deaktiviert ist, öffnet sich das Schwellwert-Fenster bei einer manuellen **Erfassung**.

Das Thresholding für Sondenbilder ist ähnlich wie das Thresholding für Hellfeld-Metaphasen. Der Unterschied besteht darin, dass beim Thresholding für Sonden jeder Bereich, der nicht von der blauen Maske abgedeckt wird, mit der für dieses Fluorochrom gewählten Farbe versehen wird.

Lose Schwellwerte können zu großen, unregelmäßigen Signalen führen. Hintergrundrauschen und Ablagerungen können das Thresholding ebenfalls erschweren, daher gibt es bei der Sondenerfassung zusätzliche Werkzeuge für das Thresholding.

- Mit der **Gegenfärbungs-Maske** werden alle Teile des Bildes eliminiert, die keine Gegenfärbung enthalten. Dies ist ein gutes Werkzeug, wenn viel Hintergrundrauschen vorhanden ist.
- Mit **Bildausschnitt** können Sie einen oder mehrere Bereiche für das Thresholding definieren. Dies ist ein gutes Werkzeug, um kleine Signale von Artefakten oder Ablagerungen zu isolieren.

Hinweis: Es wird nicht davon ausgegangen, dass bei der manuellen Erfassung von Sondenbildern Erfassungsoptimierungen verwendet werden, es sei denn, es handelt sich um Metaphasenbilder, bei denen die DAPI-Bandierung für die Bildinterpretation oder Karyotypisierung nützlich ist.

- Einzelheiten zu den standardmäßigen Optionen für das manuelle Thresholding finden Sie in der **Karyotyper-Bedienungsanleitung** und in der Anwendungs-Hilfe.

Automatisches Thresholding

Falls **Auto-Schwellwert** in den Einstellungen von „Anpassen“ aktiviert ist, öffnet sich das Schwellwert-Fenster bei der Erfassung des Livebilds nicht. Das ist der erwartete Vorgang bei einem GSL-Scansystem.

- Das System legt für die Hintergrundentfernung den Wert unter **Schwellwert vorhersagen** oder **Kein Schwellwert** zugrunde. Dies funktioniert bei Fluoreszenzbildern mit reflektionsarmem Hintergrund in der Regel problemlos.
- Optimierungen werden mit den in der Erfassungsvorlage gespeicherten Einstellungen angewendet, oder Sie können die Erfassungsoptimierung über die Option **Keine Optimierung** unter „Erfassung anpassen“ abschalten.
- Das Metaphasenbild wird gespeichert und im Navigator angezeigt.
- Ein gespeichertes Rohbild kann bei Bedarf für ein manuelles erneutes Thresholding verwendet werden.

Erneutes Thresholding für Rohbilder



Rohbilder können erneut verarbeitet werden, um das Sondenbild zu aktualisieren, wenn der ursprüngliche Schwellwert nicht optimal war.

Dies kann nützlich sein, wenn für die ursprüngliche Erfassung **Kein Schwellwert** verwendet wurde, um später Objekte für die Optimierung, die Karyotypisierung oder das Kopieren auf einen flexiblen Bildschirm zu erstellen.

- Laden Sie das Rohbild in das Hauptanzeigefenster des Erfassungsbildschirms.
- Klicken Sie auf das Symbol für den **Schwellenwert** in der Mitte der Hauptsymbolleiste.
- Bilden Sie manuell Schwellwerte für das Bild. Sobald der Vorgang abgeschlossen ist, wird das Bild aus dem Hauptbildfenster gelöscht.

Sondenerfassung (Framelist)

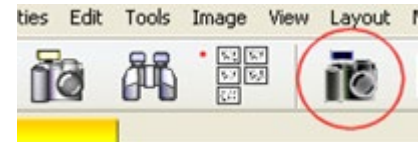


Bildrahmen-Sondenerfassung ist eine Option für die Erfassung von Einzelbildern für die manuelle Erfassung mit motorisiertem Filterrevolver und Fokussteuerung des Mikroskops.

Es handelt sich um ein interaktives Verfahren ohne Einstellungen oder Konfigurationsdateien, die von einem Scansystem als Teil der automatischen Erfassung verwendet werden.

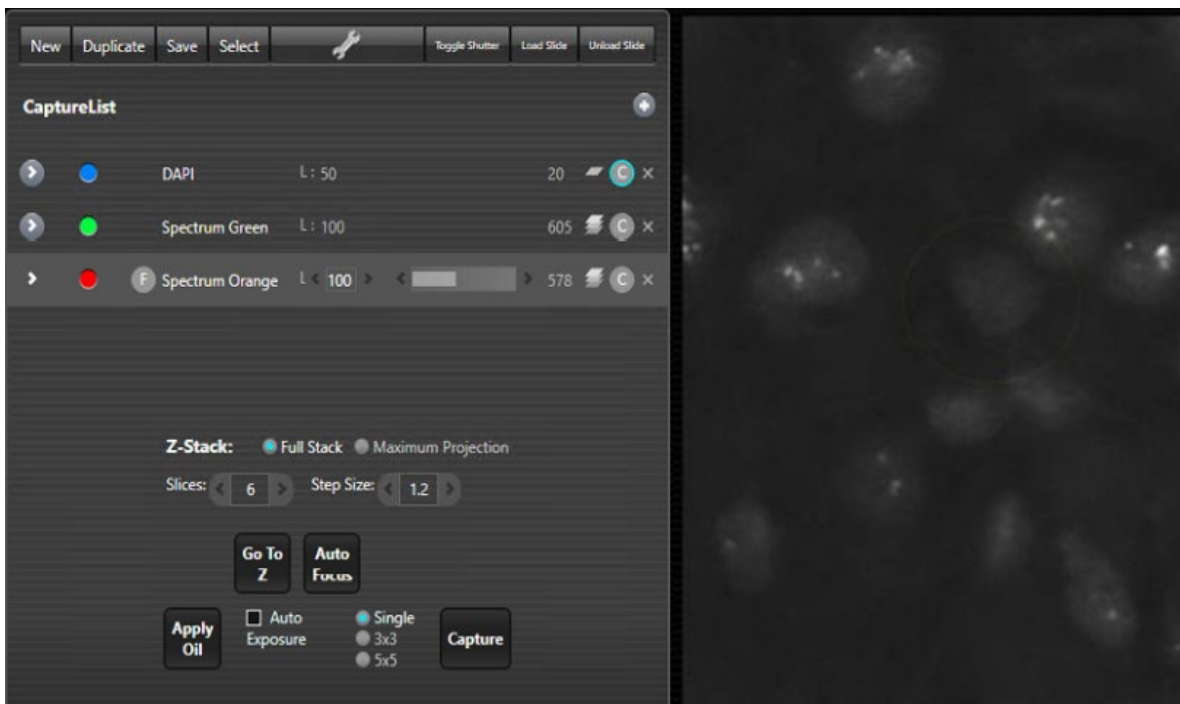
Die manuelle *Framelist*-Erfassung kann verwendet werden, um schnell einen manuell festgelegten Bereich eines Objektträgers zu erfassen und eine kleine Anzahl von *Framelist*-Bildern zu erhalten.

Öffnen Sie einen Fall und klicken Sie auf das Symbol für die manuelle Sondenerfassung in der Hauptsymbolleiste des Startbildschirms der Anwendung.



Im Bildschirm **Sondenerfassung** wird auf der rechten Seite ein Livebild-Fenster angezeigt.

- Das Bild ist immer „Live“ und es wird die Kamerabelichtung des in der Liste ausgewählten Fluorochromnamens verwendet.
- Die Bedienelemente auf der linken Seite ermöglichen die Interaktion mit dem Mikroskop (Shutter und Fokus) und die Konfiguration einer Erfassungsliste.



Sobald Sie die Sondenerfassung verwenden, werden die Objektträger für Ihren Fall oben auf dem Bildschirm angezeigt.

- Sie können Objektträger über die Schaltfläche „Neuer Objektträger“ oben rechts im Fenster hinzufügen.
- Sie können Kanäle hinzufügen, Filter-, Farb- und Z-Stapel-Einstellungen konfigurieren und Erfassungslisten speichern.
- Erfassen Sie Bilder mit manueller oder automatischer Belichtungseinstellung der Kamera.

- Erfassen Sie ein Einzelbild oder größere rechteckige Raster von 9 oder 25 Einzelbildern (GSL-Tischbewegung).
- Mehrere erfasste Bilder sind mit einem einzigen Objektträger verbunden.

Objektivsteuerung

Beim Start verwendet die Anwendung standardmäßig die Linse, die in Position 1 konfiguriert ist. Bei motorisierten Mikroskopsystemen ist dies die Objektivlinse mit 10-facher Vergrößerung.

- Wenn das LCD-Touchpad des Mikroskops zum Wechseln der Objektivlinse verwendet wird, erkennt die Software nicht, dass sich die Vergrößerung geändert hat, und verwendet weiterhin den Wert für Position 1.
- Bei einer manuellen Erfassung müssen Sie die Objektivlinse vor der Erfassung ausschließlich über die Softwareschnittstelle ändern. Auf diese Weise wird der Wert nicht falsch gelesen.

Die manuelle Framelist-Erfassung hat, wie unten beschrieben, eine andere Hardware-Steuerung als der Standard-Erfassungsbildschirm.

- Die Tastatur dient zum Wechseln zwischen den Mikroskopobjektiven mit Hilfe der Funktionstasten (F).
- Um alle verfügbaren Hardware-Kurzbefehle und Einstellungen der Schrittgröße anzuzeigen (oder auszublenden), drücken Sie „**F10**“.

Framelist-Erfassung: Verfahren im Überblick

- **Überprüfung des Livebildes.** Das Kamerabild ist im Hauptanzeigefenster „immer eingeschaltet“.
- Kanäle, Einstellungen und Erfassungsoptionen können vor der Erfassung überprüft oder geändert werden.
- **Erfassung.** Startet eine vollständige, automatische Einzelzellen-Erfassung aller Kanäle mit den jeweiligen Einstellungen der Erfassungsliste. Erfasst die Livebilder und speichert sie in der Objektträger-Framelist im **Navigator**.

1. Wählen Sie den Fall und den Objektträger im Navigator aus und klicken Sie anschließend auf **Sondenerfassung**.
2. Erstellen Sie eine **neue** oder **wählen** Sie eine für die Probe geeignete, bereits gespeicherte Erfassungsliste aus.
3. Klicken Sie auf den Gegenfärbungskanal in der Erfassungsliste (wodurch der Fluoreszenzfilter/Shutter aktiviert wird).
4. Lokalisieren Sie einen Probenbereich auf dem Mikroskop-Objektträger und führen Sie im Anzeigefenster eine Positionierung und Fokussierung durch.
5. Klicken Sie auf **Erfassen**, um die automatische Erfassungssequenz zu starten.
- Wenn „Automatische Belichtung“ aktiviert ist, wird die Kamera für jeden Kanal automatisch eingestellt.
- Wenn „Automatische Belichtung“ deaktiviert ist, werden die Kanäle mit den festgelegten Belichtungswerten aus der Erfassungsliste erfasst.
6. Für jeden Kanal wird ein Status angezeigt, der alle Belichtungs- und Z-Stapelvorgänge angibt.
7. Unter dem Erfassungsbereich wird eine Miniaturansicht des Farbbildes angezeigt.
8. Wiederholen Sie den Vorgang für alle weiteren Bilder.

Auf keinen Fall ...

- ... von Hand zwischen Objektiven mit niedriger und hoher Vergrößerung wechseln. Verwenden Sie die Tastatursteuerung (F1–F7), um die Objektive zu wechseln und die richtige Vergrößerung der Erfassungslinse zu bestätigen.
- ... während der Erfassung den Tisch bewegen oder manuell fokussieren.

Optionen der Erfassungs-Konfiguration

Sie müssen mindestens einen Kanal in den Bildschirm einfügen, bevor Sie auf die Bedienelemente für die Erfassung zugreifen können.

Hinzufügen von Kanälen

Mit der Schaltfläche „+“ wird einen Kanal zu Ihrer aktuellen Erfassungsliste hinzugefügt, der Sammlung von Fluorochromkanälen, die aktuell erfasst werden sollen.



1. Kanal auswählen (>)
2. Kanalfarbe konfigurieren
3. Kanalfilter konfigurieren (F)
4. Intensität der Fluoreszenzlampe (L: Xylis/XCite)
5. Kamera-Belichtung (manuelle Anpassung)
6. Z-Stapel-Anzeige (aus/ein)
7. Gegenfärbungs-Anzeige (C)



Einrichten eines Kanals

(2) Anzeigefarbe des Kanals

Jeder erfasste Kanal hat eine Anzeigefarbe, die links in der Kanalzeile angezeigt wird. Dies ist die Farbe, die beim Anzeigen des gesamten Bildes für den Kanal verwendet wird.



Die Farbe kann durch Klicken auf den farbigen Kreis geändert werden, wodurch ein Rasterbereich mit **Grundfarben** geöffnet wird und alle erforderlichen Anzeigefarben definiert werden können.

(3) Mikroskopfilter

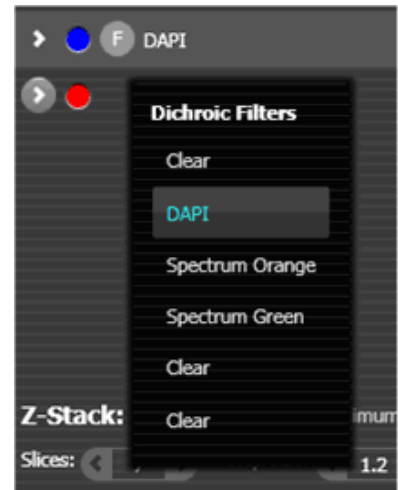
Sobald ein Kanal ausgewählt ist, erscheint direkt vor dem Kanalnamen eine Filterschaltfläche, die mit einem „F“ gekennzeichnet ist. Durch Klicken auf diese Schaltfläche werden die für Ihr Mikroskop konfigurierten Filter angezeigt.



Sie können für jeden Fluorochromkanal nur einen konfigurierten Filter oder eine Kombination verwenden. Nachdem Sie einen Filter ausgewählt haben, wird er aus der nächsten Auswahlliste entfernt.

Hinweis: Der Kanalname wird von den im System konfigurierten Filterrädern übernommen.

- Wenn Sie zwei Filter verwenden, zum Beispiel einen dichroitischen Filter und einen Anregungsfilter, werden beide Optionen angezeigt.
- Wenn die verfügbaren Filter falsch scheinen, prüfen Sie die Konfiguration in der Anwendung **Mikroskopkalibrierung**.



(4) Intensität der Lampe

Systeme mit einer Xylis- oder X-Cite-Fluoreszenzlampe verfügen über eine Intensitätseinstellung, mit der die für jeden Kanal während der Erfassung verwendete Lampenintensität geändert werden kann.

- Für die routinemäßige Erfassung von Sondenkanälen sind 100 % typisch.
- Wenn die Gegenfärbung sehr hell ist, kann eine geringere Intensität eine bessere Kontrastanzeige ermöglichen.
- Eine geringere Intensität kann auch die schnelle Photobleichung reduzieren, wenn die Gegenfärbung oder das Antifade auf dem Objektträger nicht stabil ist.

(5) Kamera-Belichtung

Jeder Kanal verfügt über einen eigenen Belichtungswert (in Millisekunden), der rechts neben dem Kanalnamen angezeigt wird und den Umfang der verwendeten Kameraintegration steuert.

- Wenn ein Kanal ausgewählt ist, wird ein Belichtungsschieberegler angezeigt, der eingestellt werden kann, indem mit der linken Maustaste innerhalb des Balkens gezogen oder auf die Pfeile auf beiden Seiten geklickt wird.



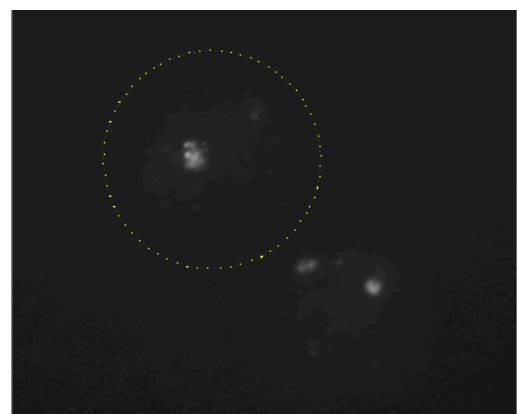
Wenn der Fluoreszenz-Shutter geöffnet ist, wird das Livebild auf dem Bildschirm angezeigt, und die Auswirkungen der Belichtungsanpassung können direkt gesehen werden.

Alternativ können Sie mit der Maus direkt auf das Livebild klicken. Dadurch wird ein „Zielkreis“ auf dem Bild festgelegt, und die automatische Belichtung der Kamera wird nur für diesen Bereich berechnet.

- Dies wird als Kreis mit gepunktetem Umriss auf dem Bild angezeigt.

Auf diese Weise können Sie „Auto-Setup“ auf einen Bereich des Bildes ausrichten, der interessantes Material enthält, und Bereiche mit hellen Artefakten vermeiden, die die Belichtungsberechnung stören würden.

- **Klicken Sie mit der linken Maustaste** in einem anderen Bereich erneut auf das Bild, um einen anderen Kreis für „Auto-Setup“ anzuwenden.

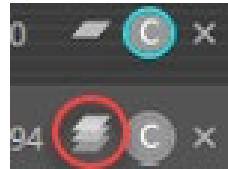


- **Klicken Sie mit der rechten Maustaste** auf das Bild, um „Auto-Setup“ abubrechen oder die Auswahl eines Zielkreises aufzuheben.

(6) Z-Stapel-Erfassung

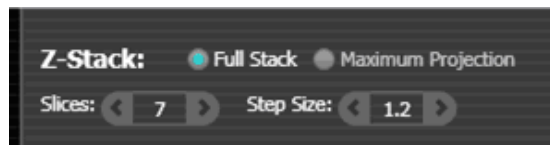
„Z-Stapel“ ist die Erfassung mehrerer Bilder desselben Kanals in verschiedenen Fokusebenen, um dreidimensionale Signalunterschiede zu identifizieren.

Durch Klicken auf die Stapelgrafik rechts neben der Belichtungseinstellung wird zwischen einem Einzelbild (Z-Stapel ausgeschaltet) und einem Stapel mehrerer Bilder (Z-Stapel eingeschaltet) umgeschaltet.



- Für das Gegenfärbungs-Bild ist es nicht üblich, einen Stapel zu erfassen.

Sobald „Z-Stapel“ für einen Kanal aktiviert ist, werden über der Schaltfläche „Erfassen“ zusätzliche Optionen angezeigt, mit denen Sie die Anzahl der **Schnitte** im Stapel und den Abstand, die **Schrittgröße**, zwischen den einzelnen Stapeln festlegen können.



Sie können zum Speichern zwischen den Optionen **Gesamter Stapel** oder nur **Maximale Projektion** wählen:

- Bei **Maximale Projektion** wird ein Stapel von Bildern erfasst, um nur ein Verbundbild zu erzeugen – das Bild *Maximale Projektion*.
- Die einzelnen Stapelbilder werden nicht im endgültigen Bildrahmen gespeichert.
- Bei **Gesamter Stapel** werden die einzelnen Bilder im Z-Stapel zusammen mit der zusammengeführten *Maximalen Projektion* erfasst und gespeichert.

(7) Gegenfärbung

Ein Kanal in der Liste muss als Gegenfärbung ausgewählt werden, bevor die Erfassung gestartet werden kann.



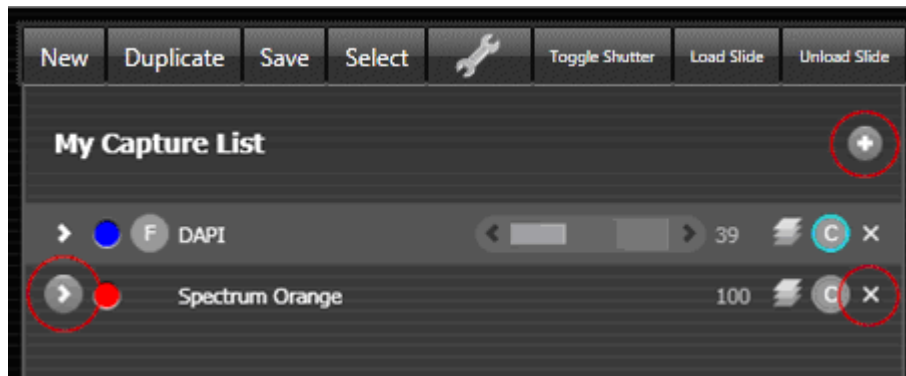
- Im Normalfall wäre das der DAPI-Kanal.
- Der Gegenfärbungskanal dient als Referenzpunkt und Fokuszentrum für die Z-Stapel-Erfassung (es sei denn, der Fokus wird vor der Erfassung manuell auf einem der Sondenkanäle erneut angepasst).

Arbeiten mit Erfassungslisten

Eine Sammlung von Kanälen ist eine Erfassungsliste. Die Bedienelemente für Erfassungslisten werden oben im Erfassungsbereich angezeigt: „Neu“, „Duplizieren“, „Speichern“ und „Auswählen“.



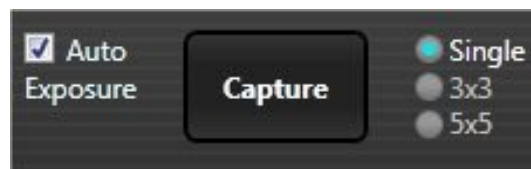
- Mit **Neu** erhalten Sie eine neue Erfassungsliste, die nur einen einzigen Kanal enthält. Dadurch werden alle derzeit angezeigten Kanäle ersetzt.
- Mit **Duplizieren** wird eine Kopie der aktuellen Liste erstellt.
- Mit **Speichern** wird die aktuell angezeigte Erfassungsliste im Fenster **Auswählen** gespeichert.
- Zuvor gespeicherte Erfassungslisten können mit **Auswählen** abgerufen werden.



- Um einen anderen Kanal auszuwählen, drücken Sie die Schaltfläche „>“ links neben dem Kanalnamen. Durch die Auswahl eines Kanals ändert sich das Livebild und gibt die Einstellungen des aktuellen Kanals wieder.
- Kanäle können mit der Schaltfläche „x“, die am Ende jeder Kanalzeile angezeigt wird, entfernt und mit der Schaltfläche + hinzugefügt werden.

Erfassen von Bildern

Sobald die Erfassungsliste erstellt wurde und für jeden Kanal geeignete Filter-, Farb-, Gegenfärbungs- und Z-Stapel-Einstellungen konfiguriert wurden, kann ein Bild basierend auf einer Kamerabelichtungsberechnung erfasst werden.



- Wenn **Automatische Belichtung** aktiviert ist, wird die Kamera-Belichtung für jeden Kanal mit einer automatischen Einstellung auf der Grundlage der Bildintensität automatisch angepasst, wenn Sie auf die Schaltfläche **Erfassen** klicken.
 - Wenn Sie einen Zielkreis für „Auto-Setup“ festgelegt haben, verwendet jeder Kanal nur diesen Bildbereich zur Berechnung der optimalen Belichtungswerte.
 - Wenn Sie keinen Zielkreis platziert haben, basiert „Auto-Setup“ auf dem gesamten Bild.
- Wenn **Automatische Belichtung** deaktiviert ist, wird durch Auswahl der Schaltfläche **Erfassen** jeder Fluorochromkanal in der Erfassungsliste nacheinander mit den aktuell in der Erfassungsliste enthaltenen Belichtungswerten erfasst.
 - Sie sollten die gewünschten Belichtungswerte der Kamera bestätigen, bevor Sie auf **Erfassen** drücken.

Nach dem Start läuft der Erfassungsprozess für alle Kanäle kontinuierlich ab.

- Zwischen den Fluorochromkanälen wird nicht pausiert.
- Die Livebild-Anzeige wird während der Erfassung nicht aktualisiert.

Nach der Erfassung wird jedes Bild unterhalb der Erfassungs-Bedienelemente angezeigt.



- Wenn Sie die Maus über eine Miniaturansicht halten, wird eine vergrößerte Version des Bildes angezeigt.
- Mit dem kleinen Kreuz in der oberen rechten Ecke können Sie das Bild bei Bedarf löschen.

Hinweis: Nur Framelist-Bilder, die manuell in diesem Bildschirm erfasst wurden, können auf diese Weise gelöscht werden. Bilder, die mit den Erfassungsmodi **ProbeAuto** oder **Spot Counting** des Scansystems erfasst wurden, können nicht gelöscht werden.

Abschließen der Erfassung

Wenn Sie die Erfassung abgeschlossen haben, verlassen Sie den Bildschirm über das Kreuz „Fenster schließen“ oben rechts auf dem Bildschirm, um zum Startbildschirm der Fallverwaltungsfunktionen zurückzukehren.

Sondenbildanzeige

CytoVision DX umfasst verschiedene Bildanzeige- und Ausgabewerkzeuge für standardmäßige Sonden- und M-FISH-Zellen, die in den Startbildschirm geladen werden können, um Bilder anzuzeigen und allgemeine Farb- und Kontrasteinstellungen, Karyotypisierungen oder Anmerkungen vorzunehmen. Außerdem kann exportiert oder gedruckt werden.

Bildrahmen-Daten können in der CytoVision DX-Anwendung nicht angezeigt werden.

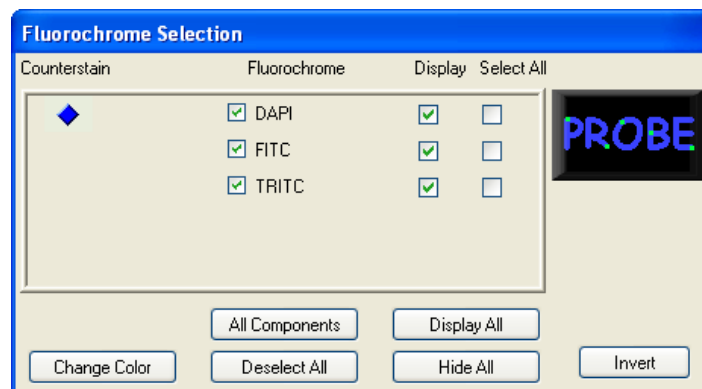
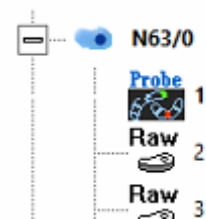
- Es ist wichtig, dass der am besten geeignete Erfassungsmodus für Ihre Anzeigeanforderungen verwendet wird.
- Weitere Informationen finden Sie in den [Erfassungs- und Analysetabellen](#).

Bildschirmanzeige

Das Anzeigen und Laden von Bildern erfolgt über den **Startbildschirm**.

- Laden Sie ein Bild durch einen Doppelklick auf das Symbol „Sonde“ im Navigator und klicken Sie dann auf das Hauptanzeigefenster.

Wenn ein Sondenbild in das Hauptanalysefenster geladen wird, erscheint am unteren Rand des Bildschirms der Bereich **Fluorochrom-Auswahl**.



In diesem Feld wird angezeigt, welche Fluorochrome bei der Erfassung des Bildes verwendet wurden, und Sie können auswählen, welche Komponenten des zusammengeführten Sondenbildes Sie anzeigen lassen möchten.

- Jedes Sondenbild enthält ein Overlay von zwei oder mehr *Fluorochromkanälen*.
- Jeder Kanal kann separate Objekte enthalten, die einzeln ausgewählt werden müssen, bevor eine Anpassung vorgenommen werden kann.
- Aktivieren Sie mehrere Kontrollkästchen für „Fluorochrom“, um die Auswahl von mehr als einem Kanal gleichzeitig zu ermöglichen.
- Bei einigen Analysefunktionen, wie z. B. **Registrieren** oder **Farbe ändern**, muss nur eine Komponente ausgewählt werden.

Es gibt auch ein Kontrollkästchen **Anzeige** rechts von den Optionen für *Fluorochrom*.

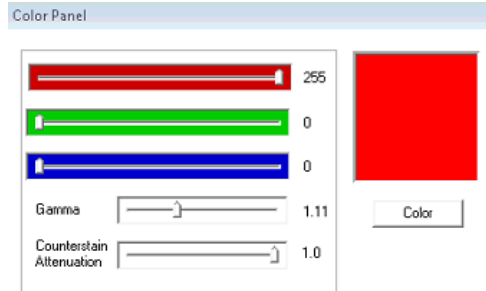
- Bei Aktivierung werden alle Objekte für diesen Kanal angezeigt.
- Bei Deaktivierung werden alle Objekte für diesen Kanal ausgeblendet.

Die Kombinationen der Optionen „Fluorochrom“ oder „Anzeige“ sind bei der Entscheidung nützlich, welche Objekte für Optimierungen, Farbänderungen, Bildregistrierungen und die Erstellung von Verbundbildschirmen verfügbar sind.

Farbe ändern

Diese Funktion funktioniert ähnlich wie die Farbeinstellung in der Erfassungs-Konfiguration durch die Aktualisierung der Farbe der Komponenten im einzelnen gespeicherten Bild. Dies kann nützlich sein, um die visuelle Anzeige der überlagerten Signale zu verbessern und das Drucken zu erleichtern.

- Klicken Sie auf die Befehlsschaltfläche **Farbe ändern**, um den Farbbereich zu öffnen. Das Gegenfärbungs-Bild wird automatisch ausgewählt.
- Passen Sie die 3 Schieberegler an, um die Farbe zu ändern.
- Alternativ können Sie auf die Schaltfläche **Farbe** klicken, um aus einer Farbtafel auszuwählen.
- Klicken Sie auf ein anderes Fluorochrom, um dessen Farbe zu ändern.
- Die Befehle **Gamma** und **Gegenfärbungsschwächung** funktionieren genauso wie im Fenster „Erfassungs-Konfiguration“, die Auswirkungen werden jedoch sofort auf dem Sondenbild angezeigt.
Die Anpassung von *Gamma* wirkt sich global auf das Bild aus, um die Anzeige zu verbessern. Allerdings wird auch das Hintergrund- oder unspezifische Signal verstärkt. Um nur die Signalanzeige zu verbessern, wählen Sie die gewünschten Objekte aus und verwenden Sie die Option **Kontrast**.



Klicken Sie auf „OK“, um den Bereich „Farbe ändern“ zu schließen.

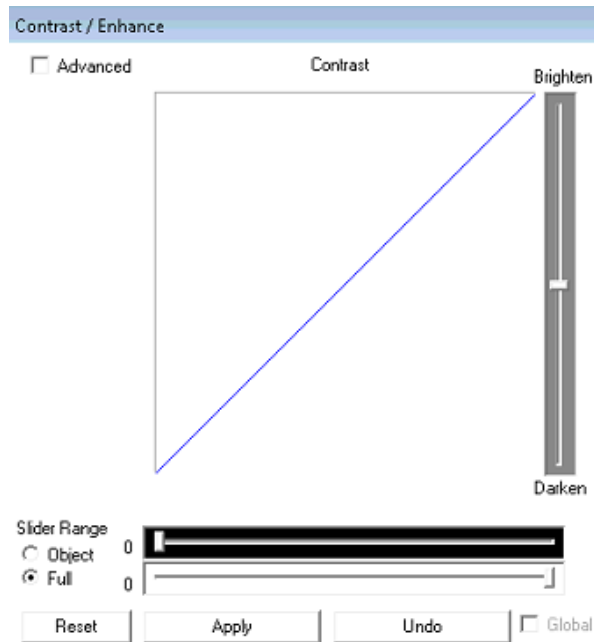


Kontrast

Die Helligkeit und der Kontrast des Bildes können mit dem Kontrastwerkzeug geändert werden.

- Die Option **Kontrast** sollte standardmäßig im Modus **Global** oder **Vollständig** verwendet werden.
- Stellen Sie sicher, dass das Kontrollkästchen **Vorschau Bildbearbeitung** unter *Anpassen* aktiviert ist.
- Vergewissern Sie sich, dass das richtige Fluorochrom im Bereich *Fluorochrom-Auswahl* ausgewählt ist, und klicken Sie auf das Signal oder die Signale, die Sie aufhellen möchten (um sie herum erscheint ein Auswahlfeld).





1. Schieben Sie den Schieberegler auf der rechten Seite des Histogramms für das **Aufhellen** eines Signals nach oben.
2. Ziehen Sie den Schieberegler für das **Abdunkeln** eines Signals nach unten.
3. Die Schieberegler für die „Trennwerte“ der Farbe unter dem Histogramm können verwendet werden, um extreme Intensitätsänderungen vorzunehmen.

Optimieren (Schärfen)



Das Werkzeug „Optimieren/Schärfen“ befindet sich unterhalb des Kontrastfensters.



Das **Schärfen** wird in der Regel nur im Gegenfärbungskanal verwendet, um Kanten- oder Hintergrunddetails zu optimieren, oder bei der Arbeit an einer DAPI-gefärbten Metaphase, um die Bandierung zu optimieren.

Es gibt keine speziellen Analysetools für die Anzeige oder Ansicht von Sondenbildern. Für Sondenbilder stehen ähnliche Optionen wie für andere Zellbildformate zur Verfügung.

- Die Sondenbilder werden in der Standard-**Fallansicht** geladen, damit sie im Bildschirm „Organisieren“ angezeigt und im Bildschirm **Analysieren** mit Strg-B oder Strg-K kommentiert werden können. Siehe **CytoVision DX Benutzerhandbuch**.
- Auf Sondenbilder kann ein Schwellwert angewandt werden, um Objekte für die Verwendung von flexiblen Bildschirmen zu erstellen und um ein FISH-Metaphasen- und Karyotyp-Paar als Teil eines Karyotypisierungs-Analyse-Workflows zu erstellen. Siehe **CytoVision DX Karyotyper-Bedienungsanleitung**.

Fehlersuche und -behebung

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Informationen und Überprüfungen sind als Teil der Fehlerbehebung im Rahmen des First Level Support durch Benutzer gedacht, die mit den Anwendungen und der Hardware des Systems vertraut sind.

- Das **CytoVision DX Benutzerhandbuch** enthält allgemeine Überprüfungen und Maßnahmen, die auch im Rahmen einer Kontaktaufnahme mit Leica Biosystems zur weiteren Unterstützung durchgeführt und bestätigt werden sollten.

Erfassungssystem

Fehler bei der Verbindung mit dem Mikroskop

- Mikroskop-Steuerung ist ausgeschaltet – schalten Sie die Steuerung ein.
- Mikroskop-USB-Kabel getrennt – überprüfen Sie das Kabel.
- Der USB-Anschluss des Mikroskops oder die Kabelverbindung hat sich geändert (Änderung des USB-Anschlusses oder Windows-Effekt) – bestätigen Sie den Anschluss im Gerätemanager und ändern Sie ihn in der **Mikroskopkalibrierung** (erfordert lokalen Administrator-Zugriff).

Auswirkung auf Mikroskop-Lichtqualität

Am optischen Mikroskop sollten routinemäßige Kontrollen vorgenommen werden, um sicherzustellen, dass für eine optimale Bildaufnahme keine Änderungen an der Konfiguration erforderlich sind. Bei Probleme bei der Bildqualität während der Aufnahme sollten diese Aspekte ebenfalls überprüft werden.

- Vergewissern Sie sich, dass der Fototubus (Lichtspalter) des Mikroskops 100 % des Lichts auf die Kamera lenkt.
- Prüfen Sie, ob der Fluoreszenz-Lichtleiter richtig montiert und nicht beschädigt/verbogen ist, Abnutzungserscheinungen vorliegen oder seine erwartete Lebensdauer überschritten wurde.
- Prüfen und reinigen Sie die Objektivlinsen. Altes, gehärtetes Öl auf der Erfassungslinse verringert die Lichtintensität, die Lichtausleuchtung (Gleichmäßigkeit) und den Bildkontrast.
- Stellen Sie sicher, dass sich die Kondensorlinse während des Scannens und der Erfassung nicht im Lichtweg befindet, um Lichtreflexionen zu vermeiden (bei Mikroskopen mit motorisiertem Kondensator geschieht dies automatisch).
- Überprüfen Sie die Fluoreszenzfilter im Mikroskop-Revolver visuell auf Anzeichen von Licht- oder Umweltschäden (Schattierungen, gesprenkeltes Aussehen, Farbunregelmäßigkeiten).

GSL-Scansystem

Für das GSL-Scannen sollten die **zusätzlichen** Prüfungen und Vorgänge durchgeführt werden.

Fehler bei der Verbindung mit dem GSL

- Die GSL-Basiseinheit ist ausgeschaltet – schalten Sie den GSL ein und überprüfen Sie die Verbindung zur externen Stromversorgung.
- Netzkabel getrennt – überprüfen Sie das Kabel zwischen GSL und PC.
- Netzwerkkonfiguration – vergewissern Sie sich, dass der IT-/Netzwerkadministrator keine Änderungen vorgenommen hat.

Fokusprobleme beim 10x-Scan

- Sind die Objektträger sauber und fettfrei? Die verwendeten Objektträger müssen zur genauen Fokussierung frei von Immersionsöl sein.
- Wird die Fokusebene des Bildes bei der Autofokussierung durchfahren?
- Der Startpunkt des Autofokus liegt nicht in der Nähe der Fokusebene der Zelle (10x-Fokuskarte durchläuft die Fokusebene der Probe nicht): Problem bei Objektträger im Tablett, Vorlagen-Fokusversatz, Bay-Referenzpunkt der räumlichen Kalibrierung (Tischstoß).
- Die 10x-Fokuskarte durchläuft die Fokusebene, liefert aber keine scharfen Fokuspunkte: Kontrast ([Auswirkung der Lichtqualität](#), geringe Intensität der Gegenfärbung).
- Falsch eingestellter Fokusversatz in der Scanvorlage – führt zu Fokuskartenfehlern bei 10-facher Vergrößerung
- Überprüfen Sie die Scanvorlagen auf Fokusversatz und Einstellungen für Deckglas und Fokusvalidierung.
- Ist der Fokus je nach Position des Tablett/Bay-Tisches unterschiedlich?
- Unzureichendes Licht bei 10x-Fokuskarte (Auswirkung der Lichtqualität, Kamera-Versatz der Objektträgervorlage)
- Übermäßiges Licht bei 10x-Fokuskarte (Veränderung der Hardware, Kamera-Versatz der Objektträgervorlage, Intensität der Gegenfärbung)
- Wenn das Livebild zu dunkel oder zu hell ist, überprüfen Sie den Lichtspalter und die Objektträgervorlage auf Kamera-Versatz und führen Sie die **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans** erneut durch.

Klassifizierungsprobleme bei 10x-Scan

- Wie sehen die Livebilder beim Scannen aus, sind sie scharf und haben guten Kontrast?
- Tritt dieses Problem bei mehreren Objektträgervorlagen auf? Führen Sie zur Überprüfung eine neue Vorlage aus.
- Überprüfen Sie das Mikroskop auf [Auswirkungen der Lichtqualität](#) und Probleme.
- Prüfen Sie den Proben-Objektträger auf die Konzentration und Intensität der DAPI-Färbung und auf Antifade.
- Prüfen Sie die Klassifizierer auf falsches Training.

Fokusprobleme bei 63x-Erfassung

- Der Startpunkt des Autofokus liegt nicht in der Nähe der Fokusebene der Zelle. Überprüfen Sie die Erfassungslinse auf Arretierung der Linse (Federdruck und Drehmechanismus am Ende).
- Ist das Problem bei mehreren Objektträgern gleich? Wenn es unterschiedlich ist, prüfen Sie die [Kompatibilität von Objektträger und Tablett](#).
- Wie sehen die Miniaturansichten der 10x-Scans auf der Metaphasenliste im Überprüfungsbildschirm aus – sind sie scharf?
- Führen Sie bei wiederholbaren Fokusproblemen bei der automatischen Erfassung eine neue **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans** durch.
- Stellen Sie sicher, dass die Option für das Deckglas in der Scanvorlage richtig eingestellt ist.
- Unzureichendes Öl, Luftblasen oder andere ölbedingte Probleme führen zu einer suboptimalen Fokussierung. Stellen Sie sicher, dass Öl im Spritzenbehälter vorhanden ist und dass die Leitungen und die Verteilspitze des Ölers sicher befestigt und nicht blockiert sind.

Erfassungsprobleme beim Sondenkanal

- Es wird der falsche Filter für die Erfassung verwendet. Überprüfen Sie die Konfiguration der Erfassungsliste (Name und Position des dichroitischen Filters) in den gespeicherten Listen und in der standardmäßigen Option „Liste erstellen“.
- Sondensignale sind nicht scharf. Überprüfen Sie die Z-Stapel-Schrittgröße und die Anzahl der Schichten. Überprüfen Sie die Filterbefestigung im Mikroskop-Revolver.

Kompatibilität von Objektträger und Tablett

Anbringen des Objektträgers im Tischhalter.

Die Objektträger sollten flach im Objektträgerhalter angebracht werden, hierbei sollte die Probenoberfläche oder das Deckglas nach oben weisen.

- Stellen Sie sicher, dass im Einsatz keine Verstopfungen vorhanden sind, die die Positionierung der Objektträger verhindern könnten, und dass der Objektträgergriff zur Verhinderung von Bewegungen einen stabilen Kontakt zum Objektträger aufweist.

Konsistenz der Objektträger-Halterung

Prüfen Sie, ob die Federklammern den Objektträger fest genug halten.

- Wenn der Objektträger locker ist (Wackeln), prüfen Sie, ob die Federklammern fest sitzen.
- Sind die Objektträger rechteckig oder haben sie abgeschnittene Ecken? Wenn die Ecke abgeschnitten ist, hat das Tablett das richtige „abgeschrägte“ Design?

Konsistenz der Tablett-Halterung

Prüfen Sie, ob das geladene GSL-Tablett fest auf dem Tisch gehalten wird.

- Wenn es locker ist, überprüfen Sie die Einstellung des Kunststoff-Drückarms vorne/links am GSL-Tisch (Schraubeneinstellung).

Eindecken des Deckglases

Ein dickes/doppeltes Deckglas verhindert das Erreichen der Fokusebene.

- Stellen Sie sicher, dass eine Metaphase im normalen Erfassungsbildschirm manuell fokussiert und erfasst werden kann.

Vorbereitung und Färbung der Proben

Die Dichte der Probenzellen, die Intensität der Gegenfärbung und die Auswirkung von Antifade wirken sich direkt auf die Zuverlässigkeit der Systemfokussierung, die Geschwindigkeit des Scans und der automatischen Erfassung sowie auf die Leistung aus.

- Eine Verdünnung der Gegenfärbung wird nicht empfohlen. Eine niedrige Intensität erhöht die Belichtungszeit der Kamera und verringert den Kontrast, was zu vermehrten Fokusfehlern und längeren Scan- und Erfassungszeiten führt.
- Die Wirksamkeit von Antifade nimmt mit dem Alter, der Lagertemperatur und der Lichteinwirkung ab, was zu einem roten Schleier auf dem Objektträger und einem verstärkten Verblässen sowohl der Sonden als auch von DAPI führt. DAPI/Antifade sollte so lange wie möglich bei 2–8 °C gelagert werden und kann noch im kalten Zustand auf die Objektträger aufgetragen werden.
- Lagern Sie die Objektträger im Dunkeln bei 2–8 °C und lassen Sie sie vor dem Scannen 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Alte Objektträger sollten bei Bedarf mit neuer Gegenfärbung und Antifade nachgefärbt werden.
- Eine geringe Zelldichte verlängert die Scan- und Erfassungszeit und erhöht die Anzahl der Bilder, die für die Signalauswertung erforderlich ist. Passen Sie die Zelldichte während der Präparation der Objektträger nach Möglichkeit so an, dass mindestens 5 ausgewertete Zellen pro Erfassungsbild vorhanden sind (ideal sind 10–20).

Exportieren von Diagnoseprotokollen

CytoVision DX erzeugt beim Routinebetrieb einen Rollsatz an Systemkonfigurationen, Kalibrierungen, Prozess- und Hardwareereignisdaten. Bei unerwarteten Abläufen, Fehlern beim Scannen oder bei der Aufnahme oder bei Anwendungsabstürzen enthalten diese Protokolldateien relevante Informationen, die für die Supportorganisation von Leica hilfreich sind, die versucht einen Fehler zu diagnostizieren.

- Die Protokolle enthalten detaillierte Diagnoseinformationen von 7–10 Tagen. Innerhalb dieses Zeitrahmens sollte ein Export für jedes Problem erfolgen, das Sie weiter an Leica Biosystems eskalieren möchten.
- Die Protokolldateien werden mit der Funktion **Protokolle exportieren** in der Werkzeugleiste des **Fall**menüs gespeichert. Dadurch werden alle Dateien in einer Zip-Datei komprimiert und an einem vom Benutzer ausgewählten Speicherort gespeichert.
- Diese Dateien können anschließend auf einem Memory-Stick gespeichert oder zu einem späteren Zeitpunkt bei Bedarf für das entsprechende Wartungs- und Supportpersonal freigegeben werden.

Anhang: Spot Counting

Spot Counting im Überblick

Die Option **Spot Counting** verwendet die Einstellungen in einem vor der Erfassung erstellten **Spot-Assay**, um *Framelist*- Bilddaten zu erstellen.

Spot-Framelisten werden im Rahmen eines vollautomatisierten Workflows für GSL-Scans und automatische Erfassungen unter Verwendung des Erfassungsmodus „Spot Counting“ in einer Objektträgervorlage für das Scannen erfasst.

- Eine Spot-Counting-Framelist kann im Erfassungsbildschirm auch manuell mit dem Erfassungsmodus „Spot Counting“ erfasst werden, ähnlich wie bei der Standard-Sondenerfassung und basierend auf denselben Fluorochromnamen der Funktion Liste erstellen.

Zwischen Spot Counting und *ProbeAuto*-Framelist-Bilddaten liegen einige Unterschiede vor:

- Spot-Assays können über den Bereich „Assay-Auswahl“ für verschiedene Fluorochromkanäle und Z-Stapel-Einstellungen erstellt und bearbeitet werden.
- Ein **Zell-Klassifizierer** kann verwendet werden, um die Art des Zellmaterials zu bestimmen, das während der Erfassung im Bild als „Informativ“ verarbeitet wird.
- Die **automatische Erfassung** des Scansystems kann auf eine maximale Anzahl von informativen Zellen oder eine maximale Anzahl von erfassten Einzelbildern eingestellt werden.
- Die erfassten Bilddaten werden mit Assay-Parametern für die Sondersignalintensität und Größeninformationen verarbeitet, einschließlich Einstellungen für die Gegenfärbung der Zellform und GSL-Stoppgrenzen.
- Die ursprünglichen Zellen- und Signalverarbeitungsdaten werden dauerhaft in der *Framelist* gespeichert.

Hinweis: Spot-Counting-Framelisten enthalten mehrere Dateien mit einer großen Gesamtfallgröße. Stellen Sie daher sicher, dass auf dem Datenserver, der die Falldatenbank hostet, ausreichend freier Speicherplatz vorhanden ist.

- Ein Objektträger mit 40 Einzelbildern hat eine Größe von ca. 500 MB, wenn man von 5 Stapeln pro Kanal bei einer Probe mit 2 Sonden ausgeht.
- Etwa 80 % dieser Daten sind die einzelnen Z-Stapel-Erfassungen.
- Bildrahmen-Daten können in der *CytoVision DX*-Anwendung nicht angezeigt werden. Die Bildüberprüfung erfordert eine separate Bildanalysesoftware, die mit dem *Framelist*-Format kompatibel ist.

Der Spot-Workflow besteht aus 2 Hauptschritten.

1. **Assay-Auswahl:** Ein Assay kann ausgewählt oder erstellt werden, wenn Spot Counting als Erfassungsmodus für die Scan-Objektträgervorlage oder, für die manuelle Erfassung, in der Liste **Erfassungsmodus** des Standard-Erfassungsbildschirms ausgewählt wird.
2. **Erfassung:** Die Bilder des ausgewählten Objektträgerbereichs werden mit den standardmäßigen Sondenerfassungs-Verfahren erfasst. Die Bilddaten werden in Echtzeit verarbeitet, um Zellgrenzen und Sondersignale zu bestimmen.

Vor der Erfassung von Zellen für das automatische Spot Counting

- Sie sollten mit den **Sondenerfassungs**-Verfahren und Fluorochromen vertraut sein, da sie Spot-Counting-Assays die Standard-Namen und -Einstellungen (**Liste erstellen**) für Fluorochrome verwenden.
- Assays müssen für die Fluorochrome, die als Erfassungs-Liste verwendet werden sollen, erstellt und konfiguriert werden, wobei die Optionen „Z-Stapel“, „Sondentyp“ und „Zellklassifizierer“ einstellbar sind.
- Die Scansysteme müssen über eine funktionierende **Kalibrierung von Fluoreszenz-Scans** für die typische Intensität der Probengegenfärbung und den typischen Fokusversatz verfügen, die während der Erfassung verwendet werden. Die Benutzer sollten mit den Scan-Kalibrierungsverfahren vertraut sein, um das System ordnungsgemäß zu warten und etwaige Schwankungen in der Intensität der sichtbaren Gegenfärbung auszugleichen.
- Die Scansysteme benötigen eine **Objektträgervorlage** mit einem geeigneten Scanbereich, einem Scan-Klassifizierer und einem Spot-Assay, die dem Objektträger zugewiesen sind.

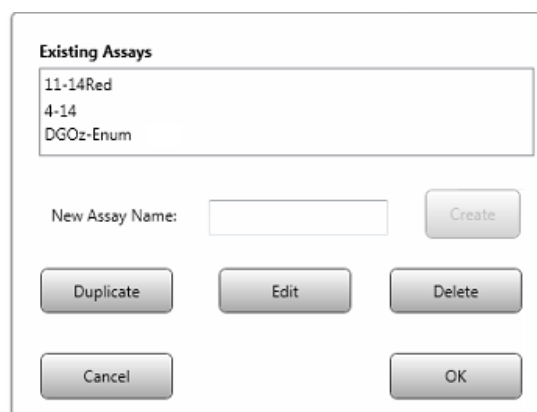
Spot-Counting-Assay

Ein Spot-Assay umfasst Folgendes:

1. Die Fluorochrom-Erfassungs-Liste für die Gegenfärbung und Sonden auf dem Objektträger
2. Die Standard-Z-Stapel-Einstellungen für jeden Sondenkanal
3. Die maximale Anzahl von Einzelbildern oder Zellen für die automatische Erfassung auf Scansystemen – die Zählung **Erfassung anhalten nach**.
4. Optionen zur Auswahl eines Gegenfärbung-Zellklassifizierers, um zu bestimmen, welche Zellen bei der Bildverarbeitung als informativ eingestuft werden

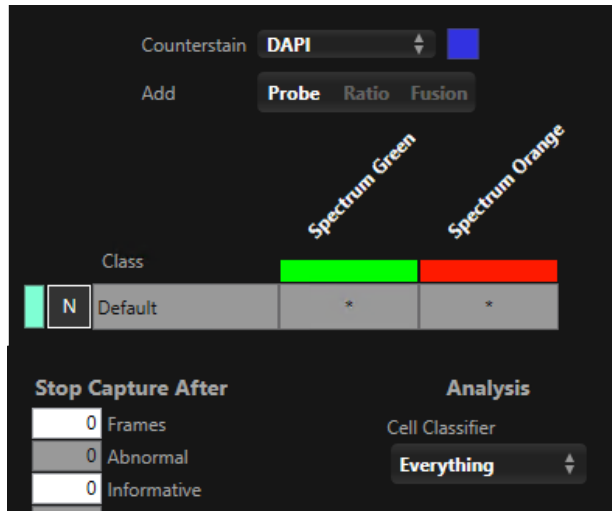
Um die Funktionen für das Scannen und die automatische Erfassung des GSL-Systems nutzen zu können, muss vor der Erfassung ein Assay erstellt und über das Fenster **Spot-Assay-Auswahl** konfiguriert werden.

Die **Spot-Assay-Auswahl** wird im Standard-Erfassungsbildschirm (Spot-Counting-Modus) oder als Teil einer Scan-Objektträgervorlage angezeigt, wenn *Spot Counting* für die automatische Erfassung eingestellt ist.



- **Neuen Assay erstellen:** Geben Sie einen neuen Assaynamen ein und wählen Sie anschließend **Erstellen**. Das Dialogfeld **Spot-Konfiguration** wird geöffnet.
- **Vorhandenen Assay kopieren:** Markieren Sie einen vorhandenen Assay in der Liste. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Duplizieren**.
- **Vorhandenen Assay bearbeiten:** Markieren Sie einen vorhandenen Assay in der Liste. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Bearbeiten**. Das Dialogfeld **Spot-Konfiguration** wird geöffnet.

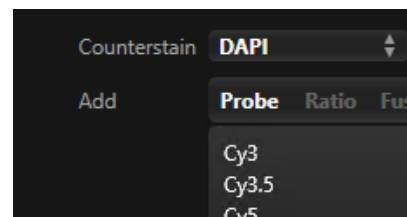
- **Vorhandenen Assay löschen:** Markieren Sie einen vorhandenen Assay in der Liste. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Löschen**.



Assays für Spot-Erfassung bearbeiten

Fluorochrom-Auswahl

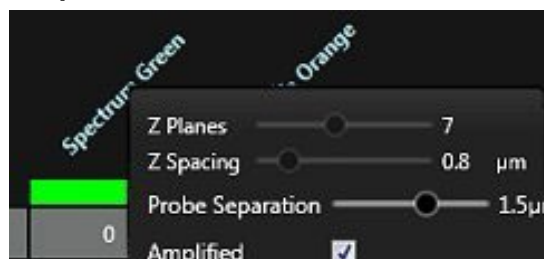
Wählen Sie eine **Gegenfärbung** aus einem Dropdown-Menü der Namen der Systemfluorochrome aus. Klicken Sie dann auf die Schaltfläche **(Hinzufügen) Sonde**. Wiederholen Sie diese Schritte, bis Sie die richtige Anzahl und die richtigen Fluorochromnamen für das für den Proben-Objekträger verwendete Sonden-Kit haben.



Die Liste der Namen wird aus der Option **Liste erstellen** für Sonden entnommen, die für die Anzeigefarbe und die standardmäßigen Filter im Standard-[Erfassungsbildschirm](#) konfiguriert werden müssen.

Klicken Sie für jede Sonde auf den Namen, um sie zu konfigurieren:

- Die **Z-Ebenen** und der **Z-Abstand** (μm) für die Z-Stapel-Erfassung. Die Zahlen variieren je nach den Eigenschaften der Probe, aber für Interphasenpräparate ist ein Gesamtfokusabstand von etwa $5 \mu\text{m}$ ein typischer Ausgangswert, z. B. 7 Ebenen mit je $0,8 \mu\text{m}$ oder 5 Ebenen mit je $1,2 \mu\text{m}$ (Bereich von $4,8 \mu\text{m}$).
- Wenn das Fluorochrom für einen Amplifikationstest bestimmt ist, aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Amplifiziert**.

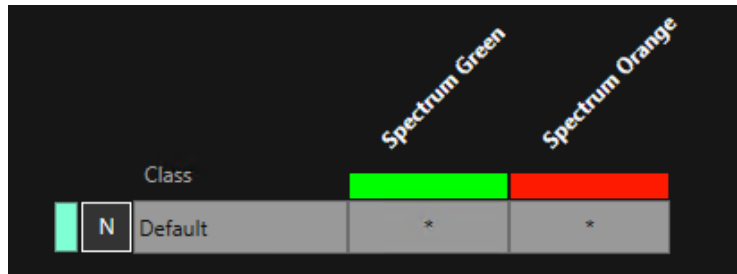


- Die **Sondentrennung** ist eine optionale Einstellung, für die jedoch der Standardwert beibehalten werden kann, da sie für die CytoVision DX-Erfassung keine direkte Bedeutung hat.

Klassentabelle

Sobald die Erfassungsliste festgelegt ist, wird eine Tabelle **Klasse** erstellt, die einen „Standard“-Klassennamen anzeigt, der für die Verarbeitung informativer Zellen während der Bilderfassung verwendet wird.

- Für die CytoVision DX-Erfassung kann er nicht bearbeitet werden.



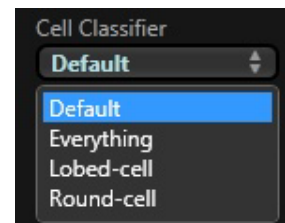
Zell-Klassifizierer

Für einen neuen Assay ist kein Klassifizierer eingestellt (**Alles**):

- Alle Objekte in den erfassten Einzelbildern, die Sondersignale enthalten, die das Gegenfärbungs-Material überlagern, werden für die Anzeige von „GSL-Stopp-Zählung“ und „Klassenüberwachung“ während der Erfassung als „informativ“ eingestuft.

Die Verwendung eines Zell-Klassifizierers (DAPI) ermöglicht das Filtern „informativer“ Zellen auf der Grundlage der Formen des Gegenfärbungs-Objekts (Zelle), die aus dem Pulldown-Menü ausgewählt werden können.

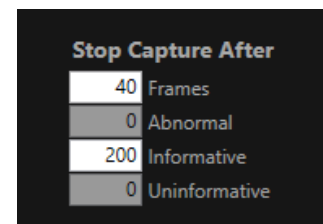
- **Standard:** Ein Klassifizierer, der mit gemischten Zellprobenotypen trainiert wurde und kleines oder ungewöhnlich geformtes DAPI-Material sowie große Zell-Cluster eliminiert
- **Gelappte Zellen:** Ein Klassifizierer, der mit mehrfach gelappten Zelltypen trainiert wurde und einfache Hintergrundablagerungen, große, nicht segmentierte Cluster und Zellen, die hauptsächlich kreisförmig sind, eliminiert
- **Rundzellen:** Ein Klassifizierer, der mit kreisförmigen Zelltypen trainiert wurde und einfache Hintergrundablagerungen, große, nicht segmentierte Cluster und Zellen, die hauptsächlich gelappt sind, eliminiert



Erfassung stoppen nach (Stopp-Zählungen für automatische Erfassung)

GSL-Scansysteme fahren so lange mit der Erfassung fort, bis alle Einzelbilder innerhalb des Scanbereichs automatisch erfasst wurden oder eine der im Assay festgelegten Stopp-Zählungen erreicht ist.

- **Einzelbilder:** Legt die maximale Anzahl der zu erfassenden Einzelbilder fest.
Der verwendete Wert als eine der beiden folgenden Optionen eingestellt werden:
 - ein „Fail-safe“ bei unzureichenden „informativen“ Objekten in der routinemäßigen automatischen Erfassung, um übermäßige Scanzeiten bei dünn besiedelten oder fehlgeschlagenen Hybridisierungs-Objekträgern zu vermeiden
 - für Scans, bei denen eine feste Anzahl von Erfassungen zu Standardisierungs- oder Vergleichszwecken erforderlich ist, wie z. B. Zelldichte- oder Sondenqualitätstests
- **Informativ:** Hierbei wird die Gesamtzahl aller Objekte berücksichtigt, die die Auswahl des Zell-Klassifizierers erfolgreich durchlaufen.
 - Diese Option ist erwartungsgemäß das routinemäßige Stopp-Kriterium, wenn eine bestimmte Gesamtzahl von Zellen benötigt wird, um die Anforderungen einer nachgelagerten Prüfung oder Analyse zu erfüllen.



Wenn beide Stopp-Zählungen im Assay eingestellt sind, stoppt die automatische Erfassung, wenn die erste dieser Zählungen erreicht ist; ein Wert von Null für eine der beiden Optionen bedeutet, dass sie keine Auswirkungen auf die automatische Erfassung hat.

- Stopp-Zählungen haben keine Auswirkung auf die [manuelle Erfassung](#).

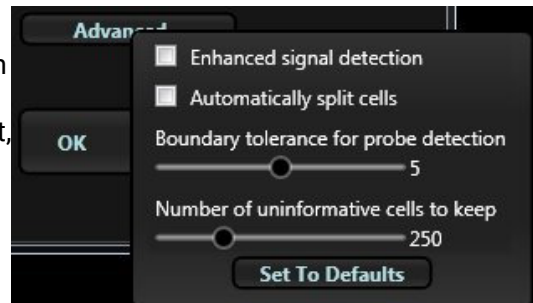
Erweitert

Über die Schaltfläche **Erweitert** wird das Dialogfeld „Konfiguration“ für zusätzliche Assayparameter aufgerufen.

- **Grenztoleranz für die Sondenerkennung** und **Anzahl der nicht informativen Zellen, die beibehalten werden sollen**, werden für die CytoVision DX-Erfassung nicht verwendet.
- **Erweiterte Signaldetektion** und **Automatische Zellteilung** können verwendet werden und führen zu einer höheren Anzahl von Objekten, die während der Bildverarbeitung klassifiziert werden – dies kann dazu führen, dass die automatische Erfassung auf der Grundlage der Stopp-Zählung **Informativ** früher beendet wird.

Erweiterte Signaldetektion:

Wenn diese Option aktiviert ist, werden einige der relativen Größen- und Intensitätsvergleiche während der Bildverarbeitung geändert, so dass es wahrscheinlicher ist, dass kleine oder schwache Signalintensitäten als informative Signale eingestuft werden.



Automatische Zellteilung:

Wenn diese Option aktiviert ist, können Cluster von Gegenfärbungs-Objekten in zwei oder mehr separate **informative** Objekte aufgeteilt werden.

Im Spot-Counting-Fenster *Assay-Auswahl* wird der Assay in der Standardliste des Systems gespeichert, wenn Sie den Bereich mit **OK** schließen.

Spot-Scannen und -Erfassen

Objektträgervorlage (Scan konfigurieren)

Die Optionen zur Erstellung von Objektträgervorlagen und zum Scannen sind dieselben wie beim routinemäßigen Interphasen-Scannen.

- Weitere Informationen finden Sie unter [Objektträgervorlagen \(FISH\)](#).

Für FISH-Proben werden die Erfassungsregeln im Bereich *Automatische Erfassung* der Objektträgervorlage durch Auswahl von „Spot Counting“ aus der Liste **Erfassungsmodus**: definiert.

- **Objektiv**: wählt die für die automatische Erfassung verwendete Linse aus; 63x ist ideal für FISH (100x wird aufgrund des kleineren Sichtfelds und der geringeren Lichtintensität nicht empfohlen).

AutoCapture Perform AutoCaptureObjective: Capture Mode: Autocamera Setup Setup on counterstain Setup on probe Setup using Average FramesSave Z-Stacks

No SPOT assay selected

- Der Status der **Auto-Kameraeinstellung** bestimmt, wie die Bilder bei hoher Vergrößerung während der automatischen Erfassung erfasst werden:
 - **Aktiviert:** (Empfohlen) Für jeden zu erfassenden Kanal nimmt das System eine automatische Belichtungsanpassung auf der Grundlage der Intensität der im Bild vorhandenen Fluoreszenz vor.
 - **Deaktiviert:** Für jeden zu erfassenden Kanal verwendet das System feste Kamerawerte der Fluorochrome der Option **Liste erstellen** („Als Standard speichern“ im Bereich „Erfassungs-Konfiguration“ oder mit dem separaten Dienstprogramm zur **Fluorochrom-Kamerakalibrierung** – nicht für den Routineeinsatz empfohlen).
- **Einstellung auf Gegenfärbung:** Verbessert die Belichtungsberechnung der **Auto-Kameraeinstellung** für Fluorochromkanäle, indem nur die Bereiche bearbeitet werden, die Gegenfärbungs-Fluoreszenz enthalten (DAPI-Maske) und weniger von fluoreszierenden Zelltrümmern außerhalb der Zelle beeinträchtigt werden.
- **Einstellung auf Sonde:** Verbessert die Belichtungsberechnung der **Auto-Kameraeinstellung**, indem eine größenbasierte Berechnung für Fluorochromkanäle verwendet wird, damit sie weniger von hellen, fluoreszierenden Zelltrümmern beeinträchtigt werden.
- **Einstellung mit Mittelwert:** Erfasst die ersten n Einzelbilder mit der standardmäßigen automatischen Belichtungsberechnung, um einen durchschnittlichen Wert der Fluorochrom-Integration für alle verbleibenden Einzelbilder zu erhalten (nicht für den Routineeinsatz empfohlen).
- **Speichern von Z-Stapeln:** Speichert jedes Fluorochrom-Stapelbild zusammen mit der (zusammengeführten) Schicht der maximalen Projektion.
- **Spot-Assay auswählen** öffnet den Bereich für die Assay-Auswahl, um einen geeigneten Spot-Assay auszuwählen, der als Erfassungs-Liste und für die Bildverarbeitung während der automatischen Erfassung verwendet wird.
- **Fluorochromliste:** ist nicht wählbar. Die Einstellungen für die Erfassungs-Liste und die Fluorochrome werden im Spot-Assay festgelegt und mit den Standard-Fluorochromen aus *Liste erstellen* verknüpft.
- **Optionen nach Erfassung:** ist nicht wählbar. Spot Counting erzeugt *Framelist*- Bilddaten, die kein Thresholding oder keine „Erfassung anpassen“-Funktionen verwenden.

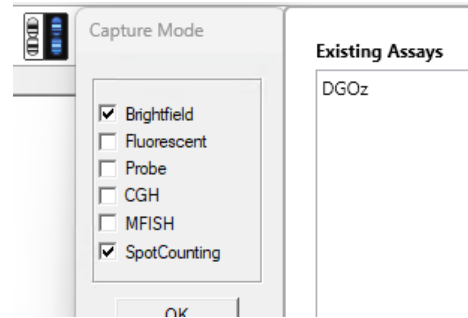
Hinweis: Wenn Listennamen in den Bereichen **Fluorochromliste** oder **Optionen nach Erfassung** vorhanden sind, bedeutet dies, dass der Scanbereich zuvor für den Modus „Sonde“ oder „ProbeAuto“ eingestellt wurde, wo diese erforderlich sind.

- Es wird empfohlen, einen neuen Bereich für Spot Counting zu erstellen, um diese Bereiche leer zu lassen.

Manuelle Erfassung

Für die manuelle Erfassung mit Spot Counting wird der Standard-Erfassungsbildschirm verwendet.

1. Klicken Sie auf „Erfassungsmodus“ und wählen Sie „Spot Counting“, um das Dialogfeld „Assay-Auswahl“ zu öffnen.
2. Wählen oder erstellen Sie einen Spot-Assay.
3. Wenn ein Assay ausgewählt wird, wird die Erfassungsliste automatisch aus den im Assay definierten Standard-Fluorochromen aus *Liste erstellen* erstellt.
4. Vergewissern Sie sich, dass im Bereich „Fluorochromauswahl“ die richtigen Fluorochrome angezeigt werden.
Die Z-Stapel-Einstellungen werden vom Assay übernommen, können jedoch vor der Erfassung geändert werden.
5. Vergewissern Sie sich, dass im Erfassungsbereich *Anpassen* die Option „Stapel speichern“ eingestellt ist, um die Z-Stapel-Schichten in der endgültigen Framelist als separate Bilder zu speichern.

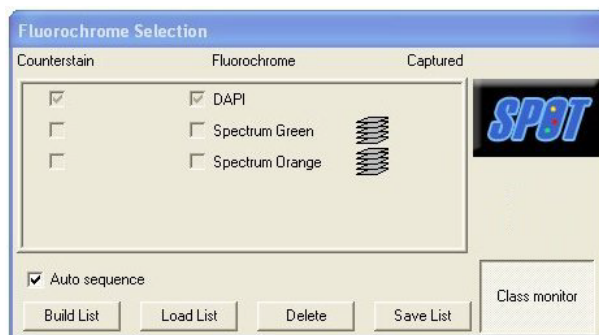


Erfassen Sie die Zellen wie bei der standardmäßigen [Sondenerfassung](#).

- Schalten Sie **Auto-Sequenzieren** und **Auto-Kameraeinstellung** aus und führen Sie eine oder zwei Erfassungen durch, um die richtigen Kameraeinstellungen zu finden.
 - Der Schalter **Auto-Setup** unterhalb des Bildes kann weiterhin verwendet werden, um automatisch die besten Einstellungen für den Objektträger zu ermitteln.
 - Wenn die Kameraeinstellungen richtig sind, schalten Sie **Auto-Sequenzieren** ein. Das ist schneller als **Auto-Kameraeinstellung** für jedes Einzelbild zu verwenden.
- Die Bilder werden von dem Assay verarbeitet, sobald sie erfasst werden. Es gibt kein Thresholding, die Rohdaten werden zur Erstellung einer Framelist für die Bildverarbeitung verwendet.
- Wenn Sie mit der Erfassung fertig sind, navigieren Sie zum Analysebildschirm. So wird die Verarbeitung der Zellen in der Framelist abgeschlossen.

Erfassung und Klassenüberwachung

Wenn die automatische oder manuelle Spot-Erfassung startet, wird der Spot-Bereich **Fluorochrom-Auswahl** mit den im Assay definierten Fluorochrom-Namen angezeigt.



Klicken Sie auf das Symbol **Klassenüberwachung**, um das Dialogfenster „Klassenüberwachung“ anzuzeigen.



Die Gesamtzahl der bisher verarbeiteten informativen Zellen wird im oberen Bereich des Dialogfensters angezeigt.

- Der Balken zeigt die Anzahl der Zellen, die *informativ* sind, als Prozentsatz der Stopp-Zählung des Assays.

Automatische SPOT-Erfassung stoppen

Die automatische Erfassung mit dem *CytoVision DX-GSL* ist so konzipiert, dass sie ohne weitere Einstellungen oder Eingriffe funktioniert.

Die automatische Erfassung wird beendet, wenn eine der folgenden Bedingungen eintritt:

- Die Anzahl der **Einzelbilder** für „Stoppen nach“ wurde erreicht.
- Die Anzahl der Zellen, die **Informativ** sind, für „Stoppen nach“ wurde erreicht.
- Die Erfassung ist für alle Einzelbilder im Scanbereich abgeschlossen.
- Die Schaltfläche **Stopp** wird gedrückt.

Solange die Schaltfläche **Stopp** nicht gedrückt wird, geht der GSL zum nächsten Objektträger im Stapel über und führt je nach Bedarf einen Scan oder eine automatische Erfassung für diesen Objektträger durch.

Siehe die [Schritt-für-Schritt-Beispielverfahren](#) für die Ausführung einer [manuellen Erfassung](#) oder eines vollständigen [Scans und einer vollständigen automatischen Erfassung](#) für einen Spot-Counting-Objektträger.

Anhang: Tissue FISH

Gewebe-FISH im Überblick

Die Gewebe-FISH-Funktionalität ermöglicht die Bildgebung von Gewebe-FISH-Objektträgern mithilfe der Scan- oder Erfassungshardware des Systems und die anschließende Überprüfung oder Analyse der Bilder.

- Die Scanoptionen ermöglichen die manuelle oder automatische Auswahl von Scanbereichen für die Erfassung.
- Framelist-Daten werden mit dem automatischen Erfassungsmodus *ProbeAuto* oder mit der Anwendung Manuelle Sondenerfassung erfasst.

Die Framelist-Erfassung ist für die Verwendung mit DNA-FISH-Sonden vorgesehen. Die Anwendung verfügt über keine Funktionen, die für die Arbeit mit Gewebe-IHC- oder Immunfluoreszenz-Proben-Objektträgern vorgesehen sind.

- Das lizenzierte Modul *Gewebe-FISH* steuert den Zugriff auf zusätzliche Optionen für Objektträgervorlagen auf GSL-Scansystemen; es handelt sich nicht um eine Erfassungs- oder Analysekonfiguration.
- Alle Erfassungsfunktionen gehören zu den Standardfunktionen der lizenzierten Sonden-Software.
- Es gibt keine speziellen Gewebe-FISH-Anzeige-, -Morphologie- oder -Analyse-Werkzeuge.

Gewebe-FISH-Scan und -Erfassung

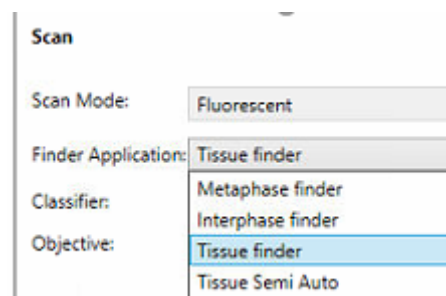
Es gibt drei Einstellungs-Workflows für den Gewebe-FISH-Scan, die über die Einstellungen im Bildschirm „Objektträgervorlage“ verfügbar sind und im Folgenden beschrieben werden.

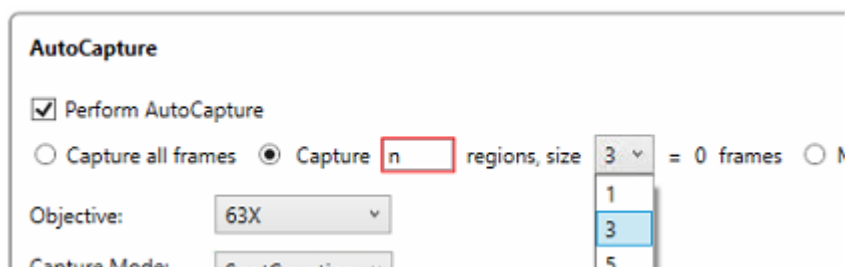
1. Automatisches Scannen und automatische Erfassung (Gewebefinder-Modus, automatische Erfassung)
2. Automatisches Scannen und manuelle Bereichsmarkierung (Gewebefinder-Modus, zeitversetzte Erfassung)
3. Manuelle Bereichsauswahl (Gewebe halbautomatisch, kein Scan, automatische Erfassung)

1) Automatisches Scannen und automatische Erfassung:

Verwendet die Finder-Anwendung **Gewebefinder** im Rahmen einer Objektträgervorlage.

- Optionaler Hellfeld-Vor-Scan mit 1,25-facher Vergrößerung zur Erkennung von Ätzungen im Objektträgerbereich.
- 10x-Fokuskarte und Scan zur Erkennung von DAPI-gefärbten Gewebebildern.
- Automatische Framelist-Erfassung aller Einzelbilder oder mehrerer Rasterbereiche innerhalb des Scan-/Ätzungs-Bereichs.

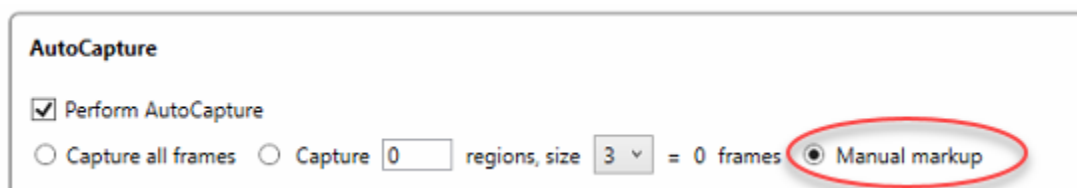
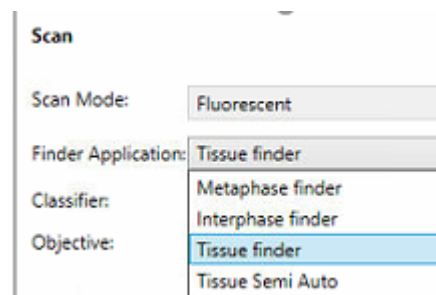




2) Automatisches Scannen und manuelle Bereichsmarkierung:

Verwendet die Finder-Anwendung **Gewebefinder** mit einer zeitversetzten automatischen Erfassung, die auf den ausgewählten Bereichen basiert, im Rahmen einer Objektträgervorlage.

- Optionaler Hellfeld-Vor-Scan mit 1,25-facher Vergrößerung zur Erkennung von Ätzungen im Objektträgerbereich.
- 10x-Fokuskarte und Scan zur Erkennung von DAPI-gefärbten Gewebebildern.
- Manuelle Markierung ausgewählter Einzelbilder oder Bereiche mit der Anwendung [Gewebe-FISH-Markierung](#).
- Automatische Framelist-Erfassung aller Einzelbilder oder mehrerer Rasterbereiche innerhalb des Scan-/Ätzungs-Bereichs.



Die manuelle Markierung kann nur für eine Scanvorlage mit einem einzigen Scanbereich verwendet werden. Der Versuch, mehrere Scanbereiche zu erstellen, führt zu einer Warnmeldung, und Sie können die Vorlage erst speichern, nachdem die zusätzlichen Bereiche gelöscht wurden.

3) Manuelle Bereichsauswahl für die automatische Erfassung:

Verwendet die Finder-Anwendung **Gewebe halbautomatisch** im Rahmen einer Objektträgervorlage mit individuellem Bereichsmarkierungs-Verfahren (optionaler Hellfeld-Vor-Scan zur Erkennung von Ätzungen im Objektträgerbereich), um Bereiche für eine hochvergrößernde ProbeAuto-Erfassung einer *Framelist* zu bewerten und festzulegen.

- Für diesen Arbeitsablauf muss ein USB-Joystick an das System angeschlossen werden.
- Es wird kein Scan durchgeführt, sondern ein interaktiver Arbeitsablauf, bei dem der Objektträger unter dem Mikroskop oder im Livebild betrachtet werden muss, um Bereiche für die anschließende automatische Erfassung festzulegen.

Manuelle Erfassung

Jedes *CytoVision DX*-System mit Sondenkonfiguration kann mit der Anwendung [Manuelle Sondenerfassung](#) eine Framelist erstellen.

- Bilder können mit der manuellen Sondenerfassung einzeln erfasst werden. Scansysteme können die automatischen Bildoptionen 3x3 und 5x5 verwenden.

Objektträger-Ätzen

Das Scannen von Gewebe-FISH-Objektträgern funktioniert optimal für Objektträger, die mit einem Objektträger-Ätzstift/Diamantstift markiert wurden, so dass der Scanbereich vor dem Scannen und Erfassen automatisch mit einem Hellfeld-Vor-Scan bestimmt werden kann.

- Für eine zuverlässige Bereichserkennung sollte die Ätzung des Objektträgers frei und ununterbrochen sein, nicht in der Nähe der Kanten des Objektträgers oder des Deckglases und nicht in der Nähe von überschüssigem Eindeckmedium.
- Wenn in der Objektträgervorlage ein Vor-Scan eingestellt ist und ein geätzter Bereich nicht erkannt wird, wird der Scan nicht fortgesetzt.
- Wenn beim Objektträger mehrere geätzte Bereiche innerhalb des Scanbereichs liegen, werden diese vom Vor-Scan erkannt und in die automatischen Scan- und Erfassungsschritte aufgenommen.
- Die Vor-Scan-Option ist auch mit halbautomatischem Scannen verfügbar, um die manuelle Identifizierung von Bereichen und die Anzeige der Objektträgerübersicht zu unterstützen.



Hinweis: Ein Marker-Stift ergibt in der Regel keine klare, dunkle Kontrastlinie und wird für eine zuverlässige und konsistente Erkennung nicht empfohlen.

Beim Vor-Scan für geätzte Objektträger wird die 1,25x-Linse mit Hellfeldlicht verwendet, daher ist vor dem erfolgreichen Vorgang eine **Kalibrierung von Hellfeld-Scans** erforderlich.

Gewebe-FISH-Markierung (zeitversetzte Erfassung)

Die Gewebe-FISH-Bereichsmarkierung ist eine Option zur manuellen Bereichsauswahl für den Scan-Modus „Gewebefinder“.

- Objektträger werden mit 10-facher Vergrößerung gescannt, wobei eine Vorlage mit der automatischen Erfassungsoption „Manuelle Markierung“ verwendet wird.
- Die gescannten Bilder werden in einem Gewebe-FISH-Markierungs-Viewer zur Verfügung gestellt, der eine zusammengesetzte Übersicht des fluoreszierenden Gewebes anzeigt und es dem Benutzer ermöglicht, Erfassungsbereiche zu erstellen.
- Eine zeitversetzte Erfassung wird mit dem standardmäßigen Erfassungsmodus *ProbeAuto* gestartet, sobald für alle Objektträger Bereiche für die automatische Erfassung festgelegt wurden.

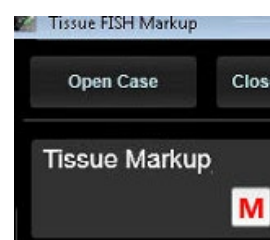


Der **Gewebe-FISH-Markierungs-Viewer** dient zur Auswahl von Bereichen für die automatische Erfassung für Objektträger, die mit der Gewebefinderoption „Manuelle Markierung“ für die automatische Erfassung gescannt wurden.

- Der Markierungs-Viewer kann direkt auf einem Scansystem aus dem Einrichtungsbildschirm „Objektträger-Stapel scannen“ geöffnet werden, wenn ein Objektträger mit Markierungsdaten als Teil einer zeitversetzten Erfassung geladen wird.
- Klicken Sie auf das rote „M“ unter der Objektträgeranzeige, um zum Anzegebildschirm für den Objektträger zu gelangen.

Alternativ kann der Markierungs-Viewer auch über eine eigenständige Anwendung geöffnet werden, die auf jedem vernetzten *CytoVision DX*-System ausgeführt werden kann.

1. Öffnen Sie die Anwendung über **Start > Alle Programme > CytoVision DX > Gewebe-FISH-Markierung**.
2. Vor einem schwarzen Hintergrund wird die Schaltfläche „Fall öffnen“ dargestellt.
3. Wählen Sie „Fall öffnen“, um ein Fenster zur Auswahl von Fällen anzuzeigen.
4. Suchen und öffnen Sie einen Fall, von dem bekannt ist, dass er Scans enthält, bei denen die Option „Manuelle Markierung“ verwendet wurde.
5. Alle Gewebe-FISH-Markierungs-Objektträger mit 10x-Scandaten werden automatisch auf dem Bildschirm aktualisiert – ein rotes „M“ zeigt an, dass keine Bereiche für die automatische Erfassung festgelegt wurden.
6. Klicken Sie auf das „M“, um den Bildschirm „Gewebe-FISH-Markierungs-Viewer“ zu öffnen.

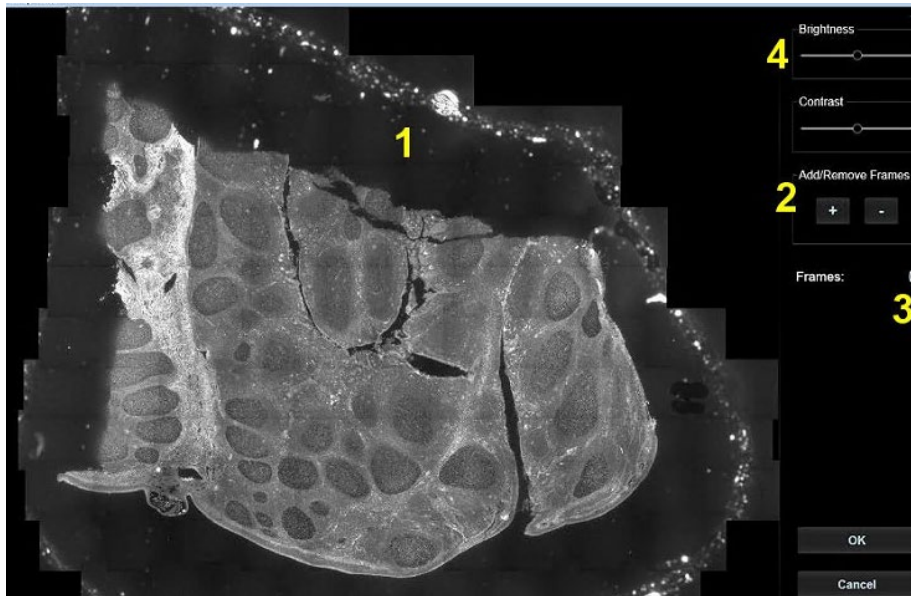


Wenn ein Fall gerade gescannt wird oder auf einem anderen System oder im Markierungs-Viewer geöffnet ist, wird ein Schlosssymbol angezeigt. Der Scan Monitor sollte verwendet werden, um zu prüfen, ob das Scannen für einen Fall in einem aktiven Scanstapel abgeschlossen ist, bevor das Markierungs-Verfahren durchgeführt wird.

Bildschirm „Markierungs-Viewer“

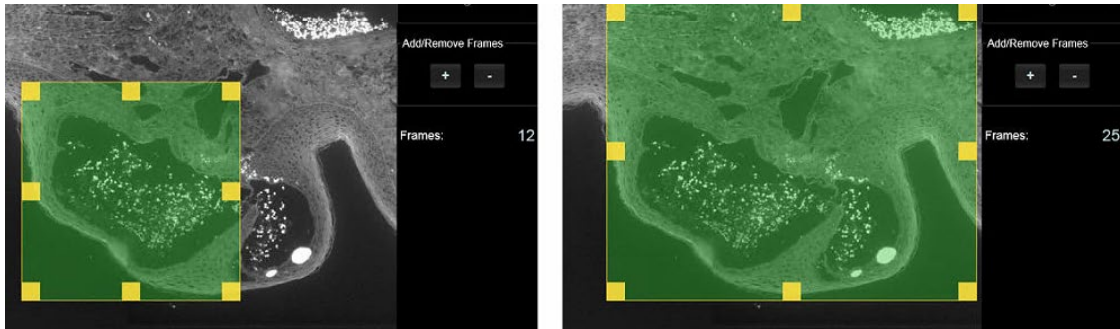
Der Bildschirm „Gewebe-FISH-Markierungs-Viewer“ zeigt einen Überblick über den Gewebefinder-Scan mit 10-facher Vergrößerung mit Werkzeugen zum Hinzufügen oder Entfernen von Bereichen für die automatische Erfassung.

1. **Scan-Anzeige** der zusammengeführten 10x-Fluoreszenz-Scanbilder
 - Vergrößern/Verkleinern Sie das Bild mit dem Scrollrad der Maus
 - Verschieben Sie das vergrößerte Bild durch Ziehen mit einer der Maustasten.
2. **Hinzufügen oder entfernen** von Bereichen für die automatische Erfassung
 - Wählen Sie das „+“ und klicken Sie auf das Bild, um einen Bereich hinzuzufügen.
 - Wählen Sie das „-“ und klicken Sie auf einen vorhandenen Bereich, um ihn zu entfernen.
3. **Einzelbild-Anzeige**
 - Sobald ein Bereich hinzugefügt wurde, wird eine Bildnummer angezeigt, die angibt, wie viele Erfassungen für die automatische Erfassung erwartet werden.
 - Wenn Sie die Größe des Bereichs in der Bildanzeige ändern, wird diese Zahl größer oder kleiner, während das System die Positionen für die automatische Erfassung neu berechnet.
4. **Schieberegler zur Bildoptimierung**
 - Mit „Helligkeit“ und „Kontrast“ kann die 10x-Scan-Übersichtsanzeige bei Bedarf angepasst werden, um die visuelle Identifizierung der zu erfassenden Bereiche zu verbessern.



Beispiel-Arbeitsablauf

- Verwenden Sie das Scrollrad der Maus, um so zu vergrößern, dass die für die Bestimmung der Erfassungsbereiche erforderlichen Details sichtbar sind.
- Wählen Sie das „+“, das blau hervorgehoben wird.
- Klicken Sie mit der linken Maustaste auf das Bild, um ein Bereichsfeld zu erstellen, das grün schattiert ist.
- Ziehen Sie das Feld mit der linken Maustaste, um es neu zu positionieren, ziehen Sie die Ränder des Feldes mit der linken Maustaste, um die Größe zu ändern.
 - Das System berechnet die Anzahl der vollständigen und teilweisen Einzelbilder, die mit der hochvergrößernden Erfassungslinse erforderlich sind, um den gesamten Bereich zu erfassen.
 - Durch eine Größenänderung ändert sich die Einzelbild-Anzeige, da das System den Wert neu berechnet.



Es können mehrere Bereiche auf die gleiche Art und Weise hinzugefügt werden.

- Bei nah beieinander liegenden oder sich überlappenden Bereichen kann dasselbe Bild nicht zweimal erfasst werden. Die Anzahl der Einzelbilder erhöht sich nur, wenn neue vollständige Einzelbilder erfasst werden müssen.
- Um Bereiche zu entfernen, wählen Sie das „-“ und klicken Sie dann auf den Bereich, der gelöscht werden soll.

Klicken Sie auf „OK“, um das Viewer-Fenster zu schließen und zum Bildschirm „Markierungsfall öffnen“ oder zum Bildschirm „Objektträger-Stapel scannen“ zurückzukehren.

- Objektträger, deren Erfassungsbereiche aktualisiert wurden, werden nun mit einem grünen „M“ angezeigt.



Sobald ein zeitversetzter Scan gestartet wurde, wird die automatische Erfassung begonnen. Es wird davon ausgegangen, dass *ProbeAuto* zur Erstellung von Framelist-Bildern verwendet wird.

Anhang: M-FISH-Erfassung

Die nachstehenden Informationen setzen voraus, dass bei dem *CytoVision DX*-System die beiden lizenzierten Module *Sonde* und *M-FISH* aktiviert sind, um die für die M-FISH-Bilderfassung erforderlichen zusätzlichen Konfigurationseinstellungen zu ermöglichen.

- Die erfassten Bilder müssen auf einem System analysiert werden, auf dem auch das lizenzierte Modul *Karyotyp* aktiviert ist.
- Die Verfahren für die M-FISH-Bildanalyse und -Karyotypisierung finden Sie in der ***CytoVision DX* Karyotyper-Bedienungsanleitung**.

Einführung in die M-FISH-Technik

M-FISH ist eine anerkannte Abkürzung für **Multicolor-** oder **Multiplex-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung** und wird zur Definition der 24-Farben-Karyotypisierung von Chromosomenpräparaten (auch bekannt als *Spektral-Karyotypisierung* oder *SKY*) verwendet.

Dabei handelt es sich um eine kombinatorische FISH-Technik, bei der die Sondenmischung für jedes Chromosom in einer Metaphase einen Satz von DNA-Farben aus der Bibliothek enthält. Jede Chromosomensonde ist mit einer einzigartigen Kombination von Fluorochromen markiert, die bei der Betrachtung unter filterbasiertem Fluoreszenzlicht und der Verarbeitung mit einem Bildgebungssystem eine eindeutige „Farbe“ ergeben.

So können Chromosomen einem Karyotyp zugeordnet werden und umgelagertes Chromosomenmaterial kann identifiziert werden.

- M-FISH mit vollständigen Chromosomen kann nicht verwendet werden, um interne Umlagerungen der Chromosomen wie Inversionen, Deletionen oder Duplikationen zu identifizieren.
- Derivatchromosomen geben keine direkte Information über den p- oder q-Arm.

M-FISH ist ein komplexes experimentelles Verfahren, das Erfahrungen mit FISH im Labor und eine effiziente Nutzung der Mikroskopkomponenten erfordert.

- Die richtigen Filter für die Fluoreszenzbildgebung und Objektive, die mit Plan Fluor oder Plan Apo äquivalent sind, sind ebenso wichtig wie die Software des Bildgebungssystems.

Die im Handel erhältlichen M-FISH-Sondenkits verwenden eine DAPI-Gegenfärbung mit 5 zusätzlichen Fluorochrom-Markierungen, so dass 31 Kombinationen möglich sind (2^5-1), obwohl in der Regel nur 24 verwendet werden.

- M-FISH-Sondenkits verwenden häufig ähnliche, aber nicht unbedingt dieselben Fluorochrome, und die für ein Set verwendeten Filter sind für ein anderes möglicherweise nicht ideal.
- Es können zusätzliche Filter oder modifizierte Versionen der beim routinemäßigen FISH-Arbeitsablauf verwendeten Filter erforderlich sein, um das Risiko des Crosstalks von Licht von den anderen Markierungen auf dem Objektträger zu verringern.
- M-FISH-Filter sollten in der Regel schmalbandig sein oder Anregungs- bzw. Emissionsmaxima aufweisen, die mit den anderen Fluorochromen in der Probe funktionieren, und nicht nur mit dem effizientesten für ein bestimmtes Fluorochrom.

Erfassung im Überblick

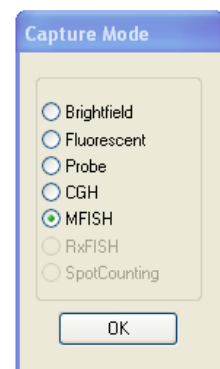
Die M-FISH-Erfassung basiert auf der standardmäßigen **Sondenerfassung** ohne Option zum manuellen Thresholding– es erfolgt eine automatische Hintergrundverarbeitung der Rohdaten.

- Der Anwender muss unbedingt mit den Bildschirm-Bedienelementen und dem Arbeitsablauf der Erfassung vertraut sein, bevor er mit der Einrichtung von M-FISH und mit Erfassungen beginnt.
- M-FISH ist eine manuelle Erfassungstechnik und kann nicht im Rahmen eines automatisierten Arbeitsablaufs für das Scannen und die automatische Erfassung auf einem CytoVision-Scansystem verwendet werden.
- Die manuelle Erfassung auf einem *CytoVision DX*-Scansystem ist mit der Funktion der Metaphasenverschiebung möglich. Siehe ***CytoVision DX* Karyotyper-Bedienungsanleitung**.

Erfassungs-Konfiguration

Klicken Sie auf das Symbol **Erfassungsmodus** im Standard-Erfassungsbildschirm und wählen Sie „M-FISH“.

- Der Bereich „Fluorochrom-Auswahl“ wird geöffnet.
- Wenn Sie bereits eine M-FISH-Erfassungsliste erstellt und gespeichert haben, laden Sie diese. Erstellen Sie andernfalls eine neue Liste mit den Standardoptionen für „Liste erstellen“ für Sonden.



Erfassungsliste

Die Erfassungsliste im Bereich **Fluorochrom-Auswahl** sollte in der Erfassungsreihenfolge erstellt werden, wobei die Gegenfärbung der letzte Kanal ist.

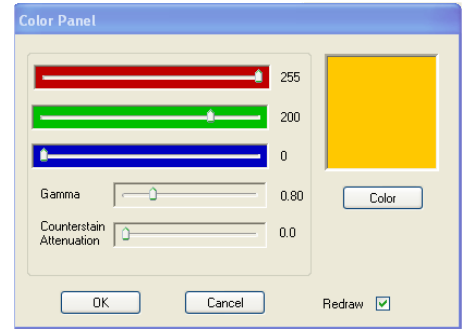


Es wird empfohlen, speziell erstellte M-FISH-Fluorochromnamen mit spezifischen Farbeinstellungen zu verwenden, um das Farb-Overlay in der Analyse zu verbessern.

Die genauen Sondenfarben können geändert werden, doch die empfohlenen Farbeinstellungen für die Fluorochrome lauten folgendermaßen:

Fluo \ Farbe	ROT	GRÜN	BLAU
DAPI	63	63	63
Aqua/DEAC	0	145	255
FITC/Grün	0	220	0
Gold/Cy3	255	200	0
Rot	255	0	0
FRed/Cy5	0	0	255
Cy5.5	0	145	255

Aqua/DEAC und Cy5.5 werden normalerweise nicht zusammen verwendet.

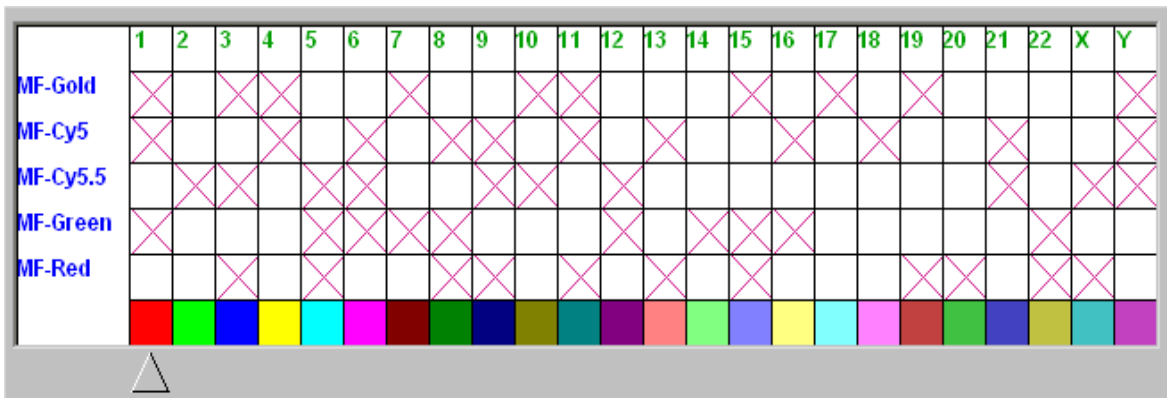


Fluomap

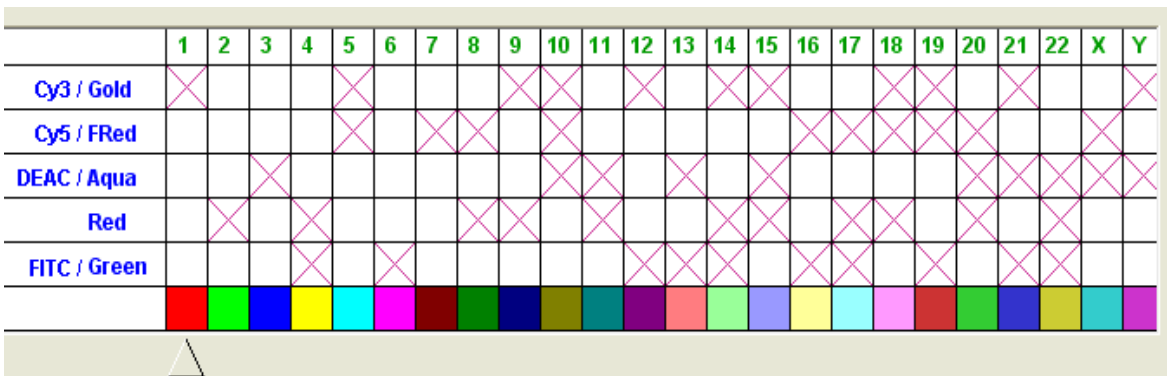
Wenn eine neue Erfassungsliste fertig ist, muss die Fluomap eingestellt werden. Hierbei handelt es sich um die eindeutigen Fluorochromkombinationen im verwendeten Sonden-Kit. Sie müssen eingestellt werden, um die für die Chromosomenidentifizierung und Karyotypisierung erforderlichen M-FISH-Klassifikationen zu erstellen.



- Klicken Sie in die entsprechenden Kästchen unter jeder Chromosomenklasse, um die Sondenkombinationen einzustellen. Es werden Kreuzchen angezeigt.
- Die Fluomap muss an das spezifische Sonden-Kit, mit dem Sie arbeiten, angepasst sein.
- Die nachstehenden Beispiele dienen nur zu Referenzzwecken und zeigen frühere M-FISH-Sondenkombinationen, die möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt verwendet wurden.



Cambio M-FISH (ausgelaufen)



SpectraVysion (Abbott/Vysis – ausgelaufen)

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

24XCyte Variation-1

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

24XCyte Variation-2

Wenn Sie die Fluomap erstellt haben, klicken Sie auf **Fertig** und speichern Sie sie zusammen mit der Erfassungsliste mit der Funktion **Liste speichern** im Fenster „Fluorochrom-Auswahl“.

Obwohl sich die Fluorochromnamen der verschiedenen Sonden-Kits unterscheiden, sind ihre spektralen Eigenschaften gleich. Standardmäßige, schmalbandige M-FISH-Filter-Kits wären folgende:

- DAPI (Standard)
- Filter Spectrum Aqua (für Aqua oder DEAC)
- Filter Spectrum Green für Grün, FITCand
- Filter Spectrum Gold (Gelb) für Gold, Orange, Cy3, TRITC
- Filter Spectrum Red für Rot, Texas Red oder Cy3.5
- Filter Spectrum FRed für Far Red oder Cy5

Filter und Mikroskopie

Wenn Sie bereits vorhandene Mikroskopfilter verwenden, achten Sie darauf, dass es sich um Schmalbandfilter handelt, die Crosstalk des Signals verhindern, insbesondere bei ähnlichen Sondenmarkierungen wie Orange (Cy3) und Rot.

- Sonden-Kits mit Cy3/Orange und Texas Red/Cy3.5 in Kombination müssen Bilder mit Filtern dieser beiden ähnlichen Farbkanäle sein. Der schmalbandige Spectrum Gold sollte anstelle eines breitbandigen Spectrum Orange oder TRITC-Filtersets verwendet werden.
- Verwenden Sie keine generischen „grünen“, „orangefarbenen“ oder „roten“ Filter, die von vielen Filterherstellern angeboten werden, da diese das Risiko eines Crosstalks von Farben erhöhen, der die korrekte Verarbeitung und Klassifizierung verhindern könnte.
- Im Zweifelsfall wenden Sie sich bitte an Ihren Leica Supportvertreter, um die Filter- und Sondenpezifikationen zu überprüfen.

Es wird empfohlen, die Exposition gegenüber dem schädlicheren ultravioletten Licht (das für die DAPI-Gegenfärbung verwendet wird) bei der Verwendung des Mikroskops so weit wie möglich zu reduzieren, da das UV-Licht alle Fluorochrome auf dem Objektträger anregt, insbesondere Cy5/Far Red, das für Verblässen anfällig sein kann.

- In der Regel weist eine der anderen Sondenkomponenten (z. B. Spectrum Gold/Orange) eine ausreichende Signalintensität auf, um Zellen bei geringer Vergrößerung und für den ersten Erfassungskanal zu finden.
- Danach erfassen Sie das Signal von Spektrum FRed (Cy5) mit der geringsten Intensität, gefolgt von (in keiner bestimmten Reihenfolge) Grün, Rot, Aqua und schließlich der DAPI-Gegenfärbung.
- Verwenden Sie, wenn möglich, die Softwaresteuerung einer Fluoreszenzlichtquelle (Xylis/X-Cite 120 PC), um die Intensität des Lichts, das auf den Objektträger trifft, zu verringern und so die Photobleichung auf ein Minimum zu reduzieren.

Erfassen von M-FISH-Bildern

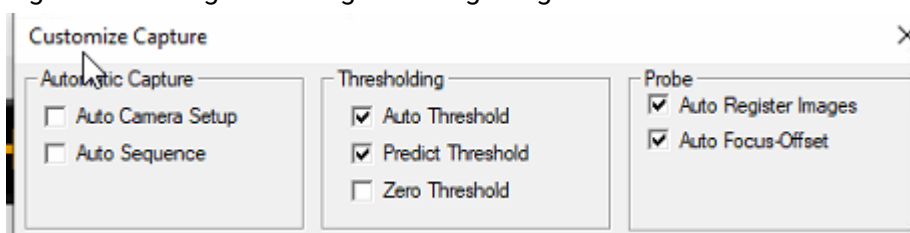
Beispielverfahren, das auf der manuellen Betrachtung unter dem Mikroskop basiert, um Zellen für die Erfassung zu identifizieren.

Das Ziel besteht darin, jedes Bild so effizient wie möglich zu erfassen und alle möglichen Verzögerungen des Prozesses und Punkte, durch die das Fluoreszenzlicht (insbesondere UV/DAPI) länger als nötig auf dem Objektträger bleiben könnte, zu reduzieren.

- Verwenden Sie nach Möglichkeit einen der hellsten Sondenkanäle, z. B. Spectrum Gold, um Metaphasen für die Erfassung zu identifizieren.
- Far Red (Cy5) ist für das Auge nicht sichtbar. Um die Belichtung und den Fokus der Erfassung zu bestimmen, müssen Sie das Live-Kamerabild verwenden. Vermeiden Sie die Verwendung von „Auto-Setup“ für diesen Kanal wegen der langen Belichtungszeiten.
- Wenn stattdessen DAPI verwendet werden muss, darf das Licht nicht länger auf dem Objektträger verbleiben, als zum Finden und Erfassen des Bildes erforderlich ist, um eine Photobleichung der Sondenkanäle zu reduzieren.
- Das Scannen von M-FISH-Objektträgern bei 10-facher Vergrößerung zur Erstellung einer Objektträgerliste für die Metaphasenverschiebung würde die Verwendung von DAPI erfordern, da erwartungsgemäß kein anderer Kanal genügend Intensität und Objektdetails für ein Scansystem aufweist.

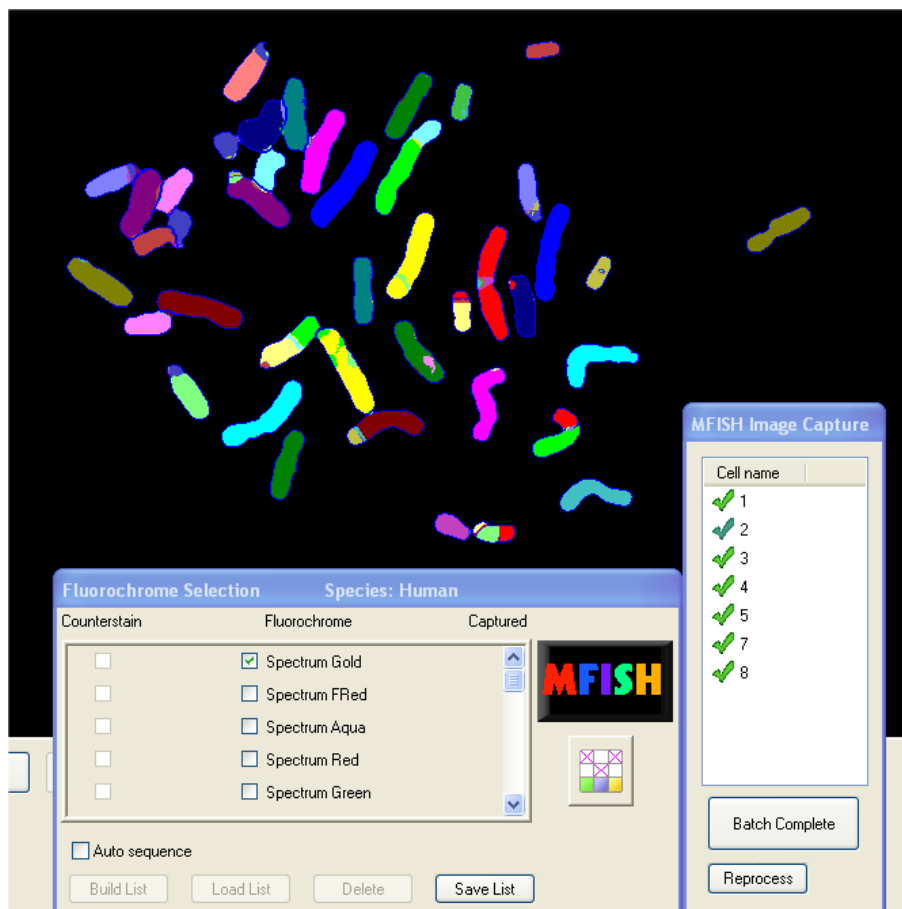
Erfassungsoptionen anpassen

- Der Auto-Schwellwert sollte aktiviert sein; die automatische Kameraeinstellung sollte deaktiviert sein.
- Bei der ersten manuellen Erfassung sollte mit „Auto-Setup“ unter dem Hauptbildfenster für jeden Kanal eine geeignete Kamerabelichtung ermittelt werden, die für die nachfolgenden Erfassungen beibehalten werden sollte. Die Verwendung der automatischen Einstellung für den Far-Red-Kanal führt bei jeder Berechnung der Langzeitbelichtung zu unnötigen Verzögerungen.



1. **Öffnen** oder **Erstellen** Sie einen Fall auf dem System und navigieren Sie zum **Erfassungsbildschirm**.
2. Suchen Sie die Zellen bei geringer Vergrößerung visuell mit dem **Goldfilter**.
3. Wechseln Sie zu einer 63- oder 100-fachen Vergrößerung und erfassen Sie „Gold“ zuerst. Das Thresholding wird vom System automatisch durchgeführt und das gespeicherte Rohbild wird auf dem Bildschirm angezeigt.
4. Erfassen Sie als nächstes den Kanal „Far Red/Cy5“. Dieser Kanal erfordert in der Regel die längste Belichtung und kann eine kleine Fokusverschiebung zwischen den anderen Kanälen erfordern.
5. Schließen Sie die Erfassung der anderen Kanäle und DAPI ab wie bei einem normalen Sondenbild.
6. Sobald der letzte Kanal erfasst ist, beginnt die Anwendung mit der Verarbeitung der Zelle, und die Option „Neue Zelle/Live“ wechselt zur nächsten Zelle, sodass die Erfassung erneut durchgeführt werden kann.
7. Nach ein paar Sekunden zeigt der Bereich *M-FISH-Bilderfassung* entweder ein grünes Häkchen oder ein rotes Kreuz an.
 - Ein rotes Kreuz weist auf einen Fehler bei der Verarbeitung hin, der in der Regel auf eine geringe oder schlechte Fluoreszenz oder einen schlechten Kontrast zurückzuführen ist. Wird ein Kreuz angezeigt, führen Sie das unten beschriebene Verfahren zum erneuten Thresholding durch oder erfassen Sie die Zelle erneut.
8. Sobald alle Zellen abgeschlossen sind, wählen Sie „Stapel abgeschlossen“ oder navigieren Sie zum Startbildschirm, um die Verarbeitung abzuschließen und die Metaphasenbilder für die Analyse zu erstellen.

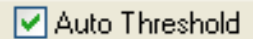
Cell name	Status
1	✓
2	✓
4	✓
6	✓
7	✓
10	✗



Hinweis: Es ist nicht möglich, Zellen mit anderen Erfassungsmodi auf einem M-FISH-Objektträger zu erfassen.

Manuelles Thresholding

Bei der routinemäßigen M-FISH-Erfassung wird für eine effiziente Erfassung aller Kanäle und das Speichern der Rohbilder der einzelnen Sondenkanäle, die zur Erstellung der Metaphase für die Analyse verarbeitet werden, die Einstellung *Auto-Schwellwert* vorausgesetzt.



Diese Einstellung kann im Bereich „Erfassung anpassen“ deaktiviert werden, um ein manuelles Thresholding für den Gegenfärbungskanal während der Live-Erfassung zu ermöglichen.

- Verwenden Sie während der Erfassung der Gegenfärbung (DAPI) den Bereich „Thresholding“.
- Führen Sie eine **Hintergrundsubtraktion** für das Bild durch. Je nach Größe der Chromosomen wird eine Einstellung zwischen 15 und 25 empfohlen.
- Bilden Sie den Schwellwert anschließend wie üblich – nur für den Gegenfärbungskanal stehen die Optionen für das manuelle Thresholding zur Verfügung, die Sondenkanäle werden weiterhin automatisch verarbeitet.

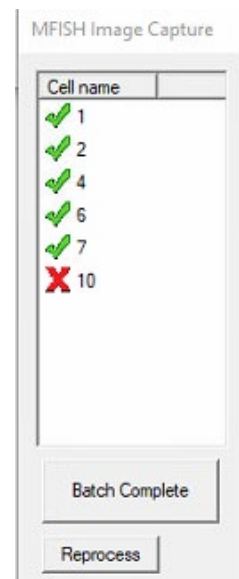
Diese Funktion kann verwendet werden, um zu verhindern, dass kleine oder helle Chromosomen während des automatischen Thresholding verloren gehen oder gelöscht werden, wird jedoch nicht für die Routineerfassung empfohlen, da sie den Erfassungsprozess verzögert.

Erneutes Thresholding

Nach der Erfassung kann für das Gegenfärbungsbild mit dem M-FISH-Bearbeitungsbereich ein erneutes Thresholding durchgeführt werden.

Es gibt zwei Fälle, in denen nach der Verarbeitung ein manuelles erneutes Thresholding für eine Zelle erforderlich sein kann:

- Wenn die automatische Verarbeitung einer Zelle fehlschlägt (ein rotes Kreuz erscheint in der Regel nur, wenn die Bildregistrierung fehlgeschlagen ist – normalerweise aufgrund mindestens einer schwachen Komponente oder einer DAPI-Gegenfärbung mit schlechtem Kontrast)
- Wenn die automatische Verarbeitung dazu geführt hat, dass kleine Chromosomen oder Chromosomen neben den Zellkernen gelöscht wurden. Dieser Fall tritt häufiger auf, wenn das DAPI-Gegenfärbungsbild schlecht ist, da das System nicht in der Lage ist, eine vollständige Maske für alle Chromosomen in der Metaphase zu erstellen.



Vorgehensweise

1. Wählen Sie die Zelle im Fenster **M-FISH-Bilderfassung** aus (wenn die Verarbeitung fehlgeschlagen ist, wird eine Fehlermeldung angezeigt).
2. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Schwellwert** in der Hauptsymbolleiste des Bildschirms. Es erscheint ein Standard-Schwellwert-Fenster.
3. Führen Sie eine **Hintergrundsubtraktion** für das Bild durch. Je nach Größe der Chromosomen wird eine Einstellung zwischen 15 und 25 empfohlen.
4. Bilden Sie den Schwellwert anschließend wie üblich und akzeptieren Sie ihn. Das System verarbeitet das Bild mit der neuen DAPI-Maske erneut.

Hinweis: Nach der erneuten Verarbeitung einer einzelnen Zelle kann es sein, dass die Metaphase der letzten fälligen Zelle auf dem Objektträger nicht geladen werden kann. Sollte dies der Fall sein, starten Sie die Anwendungssoftware neu und öffnen Sie den Fall erneut, bevor Sie fortfahren.

Erneut verarbeiten

Die Funktion „Erneut verarbeiten“ kann jederzeit nach Abschluss der M-FISH-Erfassung verwendet werden, um alle Zellen auf dem Objektträger zurückzusetzen, alle vorhandenen Metaphasen- oder Karyotyp-Bilder zu löschen und die Rohbildverarbeitung zu wiederholen.

- Das Fluomap-Fenster wird geöffnet und ermöglicht die Änderung einer beliebigen Sondenkombination (falls bei der ursprünglichen Erstellung der Karte ein Fehler unterlaufen ist, der erst nach der Erfassung erkannt wurde).

Anhang: Schritt-für-Schritt-Beispielverfahren





Stellen Sie bei allen Beispielverfahren sicher, dass die Komponenten der Fluoreszenzlampe und des Mikroskops eingeschaltet sind. Schalte Sie für Scansysteme das GSL ein und stellen Sie sicher, dass sich ausreichend Öl im Ölmechanismus befindet.

- Verwenden Sie beim Wechsel zwischen Objektiven mit geringer und hoher Vergrößerung immer die Software-Steuerung (Bereich „Objektive“ oder Funktionstasten).

Standard-Sondenerfassung



Beispielverfahren für die manuelle Erfassung von FISH-Bildern nach dem manuellen Laden des Objektträgers und der manuellen Zellidentifizierung

1. Rufen Sie den Standard-Erfassungsbildschirm auf, indem Sie das Symbol „Erfassungsbildschirm“ in der Hauptsymbolleiste auswählen.
2. Öffnen oder erstellen Sie einen Fall und wählen Sie einen Objektträger im Navigator. Wenn Sie einen Objektträger erstellen müssen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Fall und wählen Sie im Menü **Neuer Objektträger**.
3. Klicken Sie auf **Erfassungsmodus** und wählen Sie **Sonde**. 
4. Legen Sie im Bereich „Fluorochrom-Auswahl“ die Fluorochrome, die Sie für die Erfassung verwenden möchten, fest (Laden Sie eine zuvor gespeicherte Liste). 
5. Wählen Sie aus **Anpassen** die Optionen aus, die Sie verwenden möchten (Laden Sie eine Vorlage).
6. Klicken Sie auf **Neue Zelle**.
7. Klicken Sie auf **Live**.
8. Fokussieren und zentrieren Sie das Bild.
9. (Optional) Wenn die Gegenfärbungsintensität hoch ist, öffnen Sie das Bedienfeld der Fluoreszenzlampe und reduzieren Sie die prozentuale Lampenintensität, um eine Photobleichung durch den UV-DAPI-Filter zu verringern. 
10. Klicken Sie auf **Auto-Setup**. Die Kameraeinstellungen optimieren den Bildkontrast für alle Änderungen des Fokus oder der Position.
11. Wenn ein guter Kontrast nur schwer zu erreichen ist, öffnen Sie das Fenster **Erfassungs-Konfiguration**, um folgende Punkte anzupassen: 
 - Schieberegler für (erweiterte) *Automatische Einstellungen*, die die Auto-Kameraeinstellungs-Anzeige steuern
 - Schieberegler für **Schwarz** und **Hell**, bis ein besserer Bildkontrast erreicht ist
Der Hintergrund sollte „glatt“ und dunkel aussehen. Wenn das Bild flach und hellgrau aussieht, ist möglicherweise zu viel Licht vorhanden. Verringern Sie die Belichtungsstufe.
12. **Erfassen** Sie das Bild, sobald es fokussiert ist, und fahren Sie mit dem Thresholding fort.
13. Wenn **Auto-Schwellwert** aktiviert ist, wird das Bild verarbeitet und die Erfassung fortgesetzt.
 - Ist dies nicht der Fall, wird der Bildschirm für das Thresholding angezeigt.
 - Passen Sie den Schwellwert an, um unerwünschte Hintergrundinformationen zu löschen.
14. Wenn **Auto-Sequenzieren** aktiviert ist, fährt das System nach dem Thresholding mit dem nächsten Fluorochrom fort.
 - Ist dies nicht der Fall, klicken Sie auf **Live**, um das nächste Fluorochrom zu erfassen.
15. Wiederholen Sie die Schritte 7–12, bis alle Fluorochrome erfasst worden sind.
 - Wenn **Auto-Kameraeinstellung**, **Auto-Sequenzieren** und **Auto-Schwellwert** aktiviert sind, fährt das System mit der Erfassung der restlichen Fluorochrome fort.

Manuelle Bildrahmen-Sondenerfassung



Beispielverfahren für die manuelle Erfassung von FISH-Bildern nach dem manuellen Laden des Objektträgers und der manuellen Zellidentifizierung

1. Öffnen oder erstellen Sie einen Fall und wählen Sie einen Objektträger im Navigator. Wenn Sie einen Objektträger erstellen müssen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Fall und wählen Sie im Menü **Neuer Objektträger**.
2. Rufen Sie den Bildschirm „Manuelle Sondenerfassung“ auf, indem Sie das schwarze Kamera-Symbol in der Hauptsymbolleiste auswählen. Es ist nur auf dem Startbildschirm verfügbar.
3. Erstellen oder laden Sie die Fluorochrom-Erfassungsliste, die Sie für die Erfassung verwenden möchten.
4. Vergewissern Sie sich, dass die Gegenfärbung eingestellt ist und dass jeder Kanal die richtige Farbe, Filterzuweisung und Z-Stapel-Einstellungen hat.
5. Wählen Sie die Gegenfärbungskomponente aus. Wenn der Fluoreszenz-Shutter geöffnet ist, kann der Belichtungsschieberegler bei Bedarf angepasst werden, um das Livebild anzuzeigen.
6. Fokussieren und positionieren Sie das Bild nach Bedarf.
7. Stellen Sie sicher, dass **Automatische Belichtung** aktiviert ist, und klicken Sie auf **Erfassen**
 - Die optimale Kamerabelichtung für die Gegenfärbung wird berechnet und das Bild wird automatisch erfasst.
 - Sobald die Filter verschoben sind, wird automatisch die optimale Kamerabelichtung für den ersten Sondenkanal berechnet und das Bild erfasst.
 - Die verbleibenden Kanäle werden automatisch der Reihe nach erfasst.
8. Wiederholen Sie die Schritte 5–7 für alle neuen Bilder.

Alternativ: **Erfassen** mit „Auto-Setup“ der Belichtung auf der Grundlage eines ausgewählten Bereichs

9. Wählen Sie die Gegenfärbungskomponente aus. Klicken Sie auf einen Bereich des Livebildes, um die Belichtung der Kamera automatisch nur anhand der Informationen in diesem Bereich anzupassen.
10. Fokussieren und positionieren Sie das Bild nach Bedarf.
11. Klicken Sie auf **Erfassen**.
 - Die optimale Kamerabelichtung für die Gegenfärbung wird anhand des ausgewählten Bereichs erneut berechnet und das Bild wird automatisch erfasst.
 - Sobald die Filter verschoben sind, wird automatisch die optimale Kamerabelichtung für den ausgewählten Bereich für den ersten Sondenkanal berechnet und das Bild erfasst.
 - Die verbleibenden Kanäle werden automatisch der Reihe nach erfasst.
12. Wiederholen Sie die Schritte 9–11 für alle neuen Bilder.

Alternativ: **Erfassen** (ohne „Auto-Setup“)

13. Wählen Sie die Gegenfärbungskomponente aus, passen Sie gegebenenfalls den Belichtungsschieberegler manuell an oder klicken Sie auf einen ausgewählten Bereich des Livebildes.
14. Fokussieren und positionieren Sie das Bild nach Bedarf.
15. Wählen Sie den nächsten Kanal aus und passen Sie nach dem Verschieben der Filter gegebenenfalls den Belichtungsschieberegler manuell an oder klicken Sie auf einen ausgewählten Bereich des Livebildes.
16. Wiederholen Sie diesen Vorgang für die übrigen Kanäle und stellen Sie dabei sicher, dass für jede Komponente in der Erfassungsliste eine optimale Livebild-Belichtung voreingestellt ist.

17. Vergewissern Sie sich, dass **Automatische Belichtung** nicht aktiviert ist, und klicken Sie auf **Erfassen**.
- Das Gegenfärbungsbild wird sofort erfasst und, sobald die Filter verschoben wurden, wird jeder Fluorochromkanal erfasst, ohne dass die Kamerabelichtung angepasst wird.
18. Wiederholen Sie die Schritte 13–17 für jedes neue Bild (Passen Sie bei Bedarf die Belichtung in den Schritten 15 und 16 für weitere Bilder erneut an).

Manuelle Spot-Erfassung

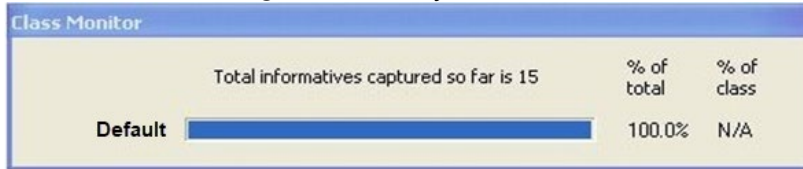


Beispielverfahren für die Erfassung von Spot-Counting-Bildern mit einem Erfassungssystem

1. Rufen Sie den Standard-Erfassungsbildschirm auf, indem Sie das Symbol „Erfassungsbildschirm“ in der Hauptsymboleiste auswählen.
2. Öffnen oder erstellen Sie einen Fall und wählen Sie einen Objektträger im Navigator. Wenn Sie einen Objektträger erstellen müssen, klicken Sie mit der rechten Maustaste auf den Fall und wählen Sie im Menü Neuer Objektträger.
3. Klicken Sie auf **Erfassungsmodus** und wählen Sie *Spot Counting*.
4. Das Fenster **Vorhandene Assays** wird geöffnet. Wählen Sie einen für den Objektträger und das zu verwendende Sonden-Kit geeigneten Assay aus und klicken Sie auf „OK“, um ihn dem Objektträger zuzuweisen.
5. Vergewissern Sie sich, dass die Fluorochromeinstellungen im Bereich **Fluorochrom-Auswahl** für den Objektträger und die zu erfassenden Sonden korrekt sind.
6. Vergewissern Sie sich, dass **Auto-Kameraeinstellung** und **Stapel speichern** im Fenster **Erfassung anpassen** aktiviert sind.
7. Verwenden Sie den Tastatur-Hotkey (Nummer), um zum richtigen Gegenfärbungsfilter zu navigieren und den Fluoreszenz-Shutter zu öffnen.
8. Suchen Sie manuell einen Bereich, der Zellmaterial enthält, und wechseln Sie über den Bereich *Objektive* zum Erfassungsobjektiv mit hoher Vergrößerung. Fokussieren Sie und übertragen Sie das gesamte Licht auf die Kamera.
9. Klicken Sie auf **Neue Zelle**.
10. Klicken Sie auf **Live***. Das Bild wird auf dem Bildschirm angezeigt und die Kamerabelichtung wird für einen optimalen Kontrast angepasst.
11. (Optional) Wenn die Gegenfärbungsintensität hoch ist, öffnen Sie das Bedienfeld der Fluoreszenzlampe und reduzieren Sie die prozentuale Lampenintensität, um eine Photobleichung durch den UV-DAPI-Filter zu verringern.
12. Fokussieren Sie neu und positionieren Sie die Zellen im Livebild. Wenn dadurch der Kontrast oder die Sättigung verändert wird, kann *Auto-Setup* ausgewählt werden. Öffnen Sie gegebenenfalls das Fenster **Erfassungs- und Fluorochrom-Einrichtung**, um folgende Punkte anzupassen:
 - Schieberegler für „Schwarz“ und „Hell“, bis ein besserer Bildkontrast erreicht ist
 - Die Schieberegler für (erweiterte) **Automatische Einstellungen** können geändert werden, um den Kontrast aus *Auto-Setup* zu verbessern.
13. Überprüfen Sie erneut die Bildschärfe und klicken Sie auf **Erfassen**. Das Bild wird gespeichert.
14. Wenn **Auto-Sequenzieren** aktiviert ist, erfasst das System nacheinander die verbleibenden Fluorochrome*, passt die Kamerabelichtung automatisch an und erfasst die im Assay konfigurierten Z-Stapel-Ebenen.
15. Wenn **Auto-Sequenzieren** deaktiviert ist, klicken Sie auf **Live***, um das nächste Fluorochrom zu erfassen, und wiederholen Sie die Schritte 10–13, bis alle Fluorochrome erfasst wurden.



16. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Klassenüberwachung** am unteren Rand des Fensters „Fluorochrom-Auswahl“, um zu sehen, wie viele Zellen aus der Erfassung verarbeitet und bewertet wurden.
17. Wiederholen Sie die Schritte 9–12 (13), um weitere Bilder von verschiedenen Bereichen des Objektträgers zu erfassen, bis der Wert für „Gesamte informative Zellen...“ in der **Klassenüberwachung** für Ihre Analyse ausreicht.







18. Wechseln Sie zum Bildschirm **Analyse**, um die Erfassung und Verarbeitung abzuschließen.

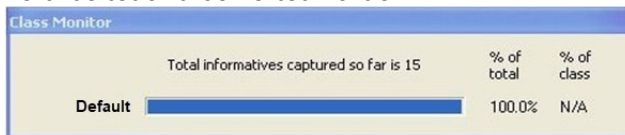
* Sie werden aufgefordert, die Filter zu wechseln, wenn Sie keine aktive Schnittstelle zum dichroitischen Revolver des Mikroskops haben.

GSL: Automatisches Spot Counting

Beispiel für einen Arbeitsablauf zum Scannen und automatischen Erfassen von Interphasen-FISH-Spot-Counting-Bildern auf einem GSL-Scansystem ohne Barcode-Etiketten

1. Navigieren Sie zum **Scan**-Bildschirm, damit die Anwendung eine Verbindung zur Hardware herstellen und diese in die Ausgangsposition bringen kann. 
2. (Optional) Laden Sie einen Objektträger auf den Tisch und verwenden Sie **Manuelle Spot-Erfassung** für mehrere Bilder, um die Werte für Kamera, Filter und Z-Stapel zu bestätigen.
 - Dadurch wird ein Bildrahmen erstellt, in dem die Assay-Parameter anhand einer kontrollierten Reihe von Bildern bewertet werden können.
 - Entladen Sie das Tablett, wenn Sie fertig sind, und entfernen Sie jegliches Öl vom Objektträger, wenn er wieder zum Scannen verwendet werden soll.
3. Wählen Sie im Scanbildschirm das Symbol **Objektträger-Stapel scannen**.
4. Klicken Sie zum Hervorheben auf das Objektträgersymbol 1 (Position 1, Tablett 1).
 - Wählen Sie den Fall, in dem die Bilddaten gespeichert werden sollen.
 - Wählen Sie eine geeignete Scan-Vorlage für den Objektträger aus.

5. (Optional) Sie können jedem Objektträger einen Namen geben, indem Sie auf das Etikett am matten Ende der Objektträger-Anzeige klicken.
6. Bearbeiten Sie die Vorlage und vergewissern Sie sich, dass sie für **Fluoreszenz- und Interphasen-Suche** konfiguriert ist und der Erfassungsmodus auf **Spot Counting** eingestellt ist.
7. Klicken Sie auf die Schaltfläche **Spot-Assay auswählen**, um das Dialogfenster **Vorhandener Assay** zu öffnen.
 - Wählen Sie einen Assay aus der Liste aus oder erstellen Sie einen neuen, für den Objektträger geeigneten Assay.
 - Bestätigen Sie die Assay-Einstellungen und klicken Sie auf **OK**, um den ausgewählten Assay zuzuweisen.
8. Die Scan-Vorlage kann verwendet werden. Klicken Sie auf **OK**, um die Scan-Vorlage dem ausgewählten Objektträger zuzuweisen.
9. Legen Sie den richtigen Proben-Objektträger (passend zu dem in Schritt 5 ausgewählten Fall) in Position 1 auf das Tablett.

10. Wählen Sie das nächste Objektträgersymbol und weisen Sie einen Fall und eine Scan-Vorlage zu. Legen Sie den passenden Proben-Objektträger in das Tablett und überprüfen Sie, ob er richtig platziert ist.
11. Wiederholen Sie diesen Vorgang für alle übrigen Objektträger und Positionen, die im ersten Tablett verwendet werden sollen. Laden Sie das Tablett in die erste (unterste) Position im Stapler/in der Kassette.
12. Wiederholen Sie den Schritt für bis zu 5 Objektträger in Tablett 2 und laden Sie das Tablett in die nächste (unterste) Position im Stapler/in der Kassette. Mit den Tasten **Strg** oder **Umschalt** können Sie mehrere Objektträger mit der Maus auswählen und ihnen denselben Fall oder dieselbe Vorlage zuweisen.
Wiederholen Sie diesen Vorgang auf GSL-120-Systemen für alle übrigen Objektträger, die verwendet werden sollen. Platzieren Sie die Kassette anschließend in der Stapler-Einheit und schließen Sie die Tür.
13. Wählen Sie **Scan**: Der erste Objektträger wird mit 10-facher Vergrößerung gescannt, um Zellen zu finden, Öl wird automatisch hinzugefügt und dann eine Erfassung mit hoher Vergrößerung durchgeführt.
14. Während der Erfassung zeigt die Anzeige den Standard-Erfassungsbildschirm im Modus **Spot Counting** an (weitere Einzelheiten siehe [Automatische Spot-Erfassung](#)).
15. (Optional) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Klassenüberwachung“ am unteren Rand des Fensters „Fluorochrom-Auswahl“, um zu sehen, wie viele Zellen aus der Erfassung verarbeitet und bewertet wurden.



16. Wenn die erste der Stopp-Zählungen des Assays erreicht ist, wird die Erfassung beendet und mit dem nächsten Objektträger fortgesetzt. Der Scan, das Ölen und die automatische Erfassung werden wiederholt, bis alle Objektträger vollständig erfasst sind.



www.LeicaBiosystems.com

