

Leica

THUNDER Imager 3D Tissue

Scheda Tecnica



THUNDER Imager 3D Tissue

Caratteristiche tecniche e prestazionali del microscopio e del sistema di acquisizione e analisi d'immagine

Introduzione e caratteristiche generali

Microscopio diritto DM6 B da ricerca totalmente motorizzato dotato di illuminazione a luce trasmessa LED (equivalente e superiore ai tradizionali 100 watt alogeni) per poter effettuare metodi di contrasto in luce trasmessa.

L'illuminazione LED consente una maggiore vita della lampada (fino a 25.000 ore di autonomia) ed una sensibile riduzione dei costi di manutenzione.

La sorgente LED consente inoltre velocità di shutter superiori ed una più omogenea luminosità nell'intero campo visivo (sull'intero Field Of View – FOV).

Nel microscopio DM6 B la tradizionale illuminazione di Koehler (con regolazione automatica del Diaframma di apertura e di campo in relazione all'obiettivo in uso) è consentita fino ad obiettivo panoramico 1,25x (possibile integrazione dello stesso obiettivo successivamente all'acquisto dello strumento).

Condensatore totalmente motorizzato ed automatico.

Asse Z motorizzata, con messa a fuoco controllata sia manualmente, sia attraverso le manopole disposte sullo stativo, tramite Joystick satellitare, o via software.

Revolver portaobiettivi motorizzato a 7 posizioni.

Revolver a fluorescenza a 8 posizioni totalmente motorizzato.

Sistema di attenuazione per fluorescenza motorizzato senza filtri grigi o a densità neutra.

Sistema a fluorescenza dotato di diaframmi di campo motorizzati almeno 6 di forma rettangolare e 6 di forma circolare, questo sistema risulta particolarmente utile per applicazioni quali: ricostruzione MOSAICO di un vetrino e di una parte di esso.

TouchScreen di grandi dimensioni, posto in posizione ergonomica (sul piede dello strumento) per l'osservazione e la gestione di tutte le funzioni del microscopio (metodo di contrasto, obiettivo in uso, filtro a fluorescenza, diaframmi in fluorescenza, attenuazione).

Tasti integrati nello stativo per il controllo elettronico del diaframma di apertura, del diaframma di campo, dell'intensità della luce e per la selezione dei differenti metodi di contrasto.

Sistemi "Contrast Manager", "Illumination Manager", "Fluorescence Intensity Manager" e "Intelligent Automation" per memorizzazione e aggiustamento automatico dei parametri ottimali per l'acquisizione dell'immagine (es. diaframma di apertura, intensità di illuminazione).

Camera digitale Leica DFC9000 GT con sensore di ultima generazione sCMOS dedicata alla fluorescenza con sensore da 2048 x 2048 (4.2 MegaPixel), dimensione pixel 6,5 µm, 82% QE a 580nm, velocità di acquisizione a 50 fps. Possibilità di integrazione di una seconda camera a colori successivamente all'acquisto dello strumento, per acquisizione di immagini di campioni colorati (es. vetrini istologici) e in luce trasmessa (es. campo chiaro).

Tubo fotografico con indice di campo di 19 mm (velocità di acquisizione e rapide ricostruzioni mosaico, ridotto photobleaching del campione).

Software di controllo, gestione ed analisi mod. LAS X che consente acquisizioni multiparametriche su diverse dimensioni (xyzt). Il software è completo di modulo di analisi per colocalizzazione e algoritmo di Instant Computational Clearing (ICC), Small Volume Computational Clearing (SVCC) e Large Volume Computational Clearing (LVCC) progettato per rimuovere il contributo della luce proveniente dai piani fuori fuoco (background) in tempo reale, sia su campioni sottili sia su campioni spessi.

1. *Specifiche dei singoli componenti del Sistema*

Sistema Leica THUNDER Imager 3D Tissue

Caratteristiche generali:

Il sistema Leica THUNDER Imager 3D Tissue, basato su microscopio DM6 B, è il risultato di anni di sviluppo tecnologico condotto da Leica Microsystems nell'ambito della microscopia da ricerca.

Le novità tecnologiche introdotte riguardano i più importanti componenti hardware e software del sistema e garantiscono il più alto livello di automazione e motorizzazione attualmente presenti sul mercato.

Il microscopio ed il software sono in grado di accoppiare una grande quantità di periferiche motorizzate esterne.

Tutte quelle integrate nel sistema quotato sono perfettamente compatibili e controllate dal software, tra cui: camera digitale, tavolino motorizzato, shutters (campo chiaro e fluorescenza), attenuatori di fluorescenza, diaframmi di campo in fluorescenza, diaframmi di campo in luce trasmessa, condensatore, revolver a fluorescenza, revolver portaobiettivi, controllo asse Z.

Via software è possibile salvare tutti i settaggi di impostazione del microscopio in profili personalizzati correlati ad applicazioni/campioni differenti richiamabili dall'operatore ogni qualvolta se ne presenti la necessità.

Caratteristiche tecniche (hardware):

- ✓ Il **corredo ottico** è costituito da obiettivi ad ingrandimento dedicato a ricostruzioni mosaico di campioni e vetrini di ampia dimensione, e da obiettivi apocromatici ad altissima apertura numerica, specificatamente progettati e realizzati per la visualizzazione e l'imaging di campioni in fluorescenza ad alta risoluzione.

- Obiettivo HC PL FLUOTAR 10x/0.32
- Obiettivo HC PL APO 20x/0.80
- Obiettivo HC PL APO 40x/0.95 CORR
- Obiettivo PL APO 63x/1.40-0.6 OIL

- ✓ Tutti i **filtri a fluorescenza** Leica sono brevettati con sistema: "Zero Pixel Shift". Tale brevetto consente il perfetto allineamento dell'immagine al cambio del filtro senza la necessità di dover ri-allineare l'immagine manualmente o attraverso algoritmi software.

Filtri a fluorescenza di cui è dotato il sistema:

Filter system DAPI ET, size "k"
Excitation: BP 350/50
Dichroic: LP 400
Emission: BP 460/50

Filter system GFP ET, size "k"
Excitation: BP 470/40
Dichroic: LP 495
Emission: BP 525/50

Filter system RHOD ET, size "k"
Excitation: BP 546/10

Dichroic: LP 560
Emission: BP 585/40

Filter system DsRed ET, size "k"
Excitation: BP 546/12
Dichroic: LP 560
Emission: BP 605/75

Filter System Y5 ET, size "k"
Excitation: BP 620/60
Dichroic: LP 660
Emission: BP 700/75

Percorso ottico della fluorescenza integrato nello stativo con revolver motorizzato portafiltri a: **8 posizioni**.

- ✓ **Sorgente a fluorescenza** Lumencor SOLA-SM-II: sistema di eccitazione e illuminazione LED allo stato solido in luce bianca, range di lunghezze d'onda da 380 a 680 nm, potenza all'uscita della fibra di 3.5 - 4 Watt.
L'accoppiamento con il microscopio attraverso fibra ottica non richiede allineamento, il sistema risulta pre-centrato anche dopo la sostituzione della lampada.
- ✓ **Coppia di oculari** 10x e 25 mm di indice di campo.
- ✓ **Tavolino motorizzato** ad alta precisione EK14, dotato di elevata risoluzione e riproducibilità di riposizionamento, con corsa di lavoro 76 x 52 mm.
- ✓ **Camera digitale monocromatica per fluorescenza** Leica DFC9000 GT ad alta risoluzione, sensibilità e velocità di acquisizione.

Sensore	sCMOS
Risoluzione	2048×2048
Dimensione Pixel	6.5×6.5µm
D-range	33000:1
Efficienza Quantica	82% (580nm)
Metodo di raffreddamento	Aria (0°C)
Velocità di acquisizione	~50 fps
Hardware Binning	2x2, 3x3, 4x4, 8x8
Bit Depth	12/16 bit
Interfaccia elettronica	USB 3.0

- ✓ **Computer** di gestione THUNDER Workstation 3D DCV e relativo software composto da:
 - a. S.O. Windows 10 Professional (64 bit)
 - b. Intel XEONW-2123 3.6 CPU (o equivalente)
 - c. 64 GByte RAM
 - d. Hard Disk da 2 TByte
 - e. Monitor da 38"
 - f. Software LAS X Premium package, che include LAS X Navigator, LAS X 3D Analysis, full LAS X Viewer Functionality - in grado di gestire le funzioni motorizzate del sistema, acquisizione multicanale, timelapse, visualizzazione rendering 3D, sistema per scansione mosaico, esperimenti multiparametrici compresi Z-stack, acquisizioni multi-

posizione e la combinazione di tutti questi esperimenti. Il modulo software di deconvoluzione è integrato nel software principale.

Caratteristiche tecniche (software):

Il sistema è completo di software di acquisizione, gestione, analisi e archiviazione orig. Leica mod. LAS X.

La piattaforma software e di integrazione hardware Leica LAS X rappresenta la soluzione ideale per tutte le applicazioni di microscopia in fluorescenza e di analisi di immagine come acquisizioni nelle dimensioni xyz, esperimenti di ricostruzione mosaico, di multi-positioning, di sezionamento ottico e di Computational Clearing.

La soluzione LAS X offre piena armonizzazione dei componenti hardware e software e combina la massima velocità, riproducibilità e semplicità nella creazione e standardizzazione di esperimenti complessi.

Il software dispone di una workstation dedicata di ultima generazione basata su processore Intel Xeon, scheda video dedicata e singolo monitor.

Il software LAS X, consente di effettuare misurazioni (live e su acquisito), overlay di fluorescenze e fluorescenza/campo chiaro ed effettuare analisi di intensità in specifiche aree di interesse (definite ROI) liberamente scelte dall'operatore.

Il software è progettato come una piattaforma modulare in grado di crescere secondo le specifiche esigenze dell'utilizzatore, e possono quindi essere aggiunti, anche successivamente all'acquisto del sistema, pacchetti applicativi che consentono analisi dedicate.

Nel caso specifico, **il modulo per colocalizzazione** consente di effettuare analisi di colocalizzazione di due o tre canali in fluorescenza, ottenere misurazioni delle particelle in colocalizzazione con valori assoluti o relativi in percentuale, calcolare i parametri di colocalizzazione come coefficiente di Pearson, coefficiente di overlapping, grado e area di colocalizzazione.

Ulteriori moduli inclusi nel software:

-**Multi Channel Acquisition:** consente la gestione e la sovrapposizione dei canali a fluorescenza disponibili (fino a 8 in contemporanea). Su ogni canale possono essere memorizzati parametri di acquisizione differenti (i.e. tempi di esposizione o intensità di fluorescenza).

-**Z control e SW Autofocus:** consente la gestione dell'asse Z motorizzato ed è completo di software autofocus per il mantenimento della posizione di fuoco nel tempo.

-**Mark and Find (Navigator):** definisce posizioni multiple di interesse e consente il riposizionamento consequenziale del tavolino motorizzato sulle regioni specifiche per massimizzare i tempi di acquisizione.

-**Stitching (Navigator):** modulo essenziale per le acquisizioni mosaico di tessuti e campioni di notevoli dimensioni xy, crea overview di un intero vetrino o ampio campo sommando diverse immagini singole e ricostruendole in una singola immagine.

-**3D Visualization:** modulo per la generazione in tempo reale di immagini 3D con elaborazione basata su GPU, comprende:

- Movimento fluido e rapido di tutti i volumi 3D in tempo reale
- Brillante qualità delle immagini 3D da utilizzare nelle presentazioni
- Zoom, rotazioni e spostamenti di volumi 3D tramite mouse
- Impostazioni individuali per intensità, livello di rumore e opacità per ogni canale
- Possibile aumento del volume 3D attraverso l'uso del mouse
- Funzione di movimento "auto" per enfatizzare l'effetto spaziale del volume 3D
- Varie modalità di proiezione: trasparente, intensità massima e profondità
- Sovrapposizione dell'immagine visualizzata 3D e/o canale specifico con doppia visualizzazione 3D
- Selezione del colore di sfondo

- Generatore di film con le funzioni per l'anteprima, loop e yo-yo
- Possibilità di creare e visualizzare filmati con tempo di riproduzione selezionabile

Caratteristica unica del sistema THUNDER Imager 3D Tissue:

La modalità THUNDER contribuisce ad aumentare considerevolmente la qualità dell'immagine ed a migliorarne il contrasto, implementando due tecnologie di eliminazione del background e della luce proveniente dai piani non focalizzati:

- **Metodo Computazionale:** l'algoritmo di clearance computazionale proprietario esclusivo di Leica permette l'eliminazione del segnale al di fuori del piano di messa a fuoco in base alle caratteristiche intrinseche degli oggetti a fuoco e può essere applicato alle immagini acquisite sia su un singolo piano, sia su uno stack lungo l'asse Z. L'applicazione dell'algoritmo è istantanea e parallela all'acquisizione.

- **Deconvoluzione:** la deconvoluzione originale Leica può essere applicata sia su Z-stack di immagini sia su singoli piani focali (3D / 2D). Si utilizza un metodo ricorsivo per deconvolvere la PSF dall'immagine e operativamente si utilizza una maschera adattiva in grado di stabilire per ciascun pixel il numero di iterazioni da effettuare. Tale maschera adattiva, costruita sull'immagine in base al rapporto segnale-rumore, consente una velocità di processazione elevatissima.

È possibile scegliere tra due algoritmi diversi di deconvoluzione. Il primo basato su campioni sottili, e il secondo basato su campioni spessi (piccoli volumi, grandi volumi). Entrambi i metodi di elaborazione vengono eseguiti in parallelo sulla CPU del PC e sulla GPU della scheda grafica ottimizzando la velocità di elaborazione, che è immediata per immagini singole e viene fatta in tempo reale per esperimenti più complessi (time lapse, Z-stack multiposizione, o combinazioni di questi). Per questi esperimenti la processazione delle immagini inizia già nel momento in cui parte l'esperimento di acquisizione.

La velocità di processazione, la semplicità di utilizzo (selezione di un singolo "bottono" nel software), il mantenimento dei dati originali che possono poi essere processati in un secondo momento o analizzati "tal quali" e l'elevata qualità dell'immagine, rendono il sistema THUNDER Imager 3D Tissue unico ed esclusivo sul mercato.

2. *Caratteristiche Migliorative*

Le caratteristiche migliorative presenti sul sistema THUNDER Imager 3D Tissue vanno ad arricchire la già considerevole qualità tecnologica del sistema, in particolare in riferimento al possibile danneggiamento del campione o della fluorescenza (bleaching) per le analisi in fluorescenza:

Sistemi di attenuazione fluorescenza (Brevettati)

Entrambi i sistemi descritti qui di seguito, integrati nel microscopio e controllati sia da stativo che da software che da touch screen, risultano essere brevettati e apportano sostanziali migliorie tecniche al sistema per quanto concerne la visualizzazione e l'imaging in fluorescenza.

Nello specifico:

FLUORESCENCE INTENSITY MANAGER (FIM) – sistema Brevettato

Sistema di modulazione della fluorescenza motorizzato e controllabile da stativo, da software e da pannello touchscreen.

Il sistema consente di associare specifiche e differenti intensità di fluorescenza ad ogni singolo fluorocromo (o cubo a fluorescenza).

Il FIM permette l'attenuazione continua dell'intensità della fluorescenza su 5 specifici livelli in maniera indipendente su tutti i filtri a fluorescenza presenti nel revolver.

Il sistema non agisce sulla sorgente (evitando fastidiosi quanto inevitabili cali di tensione) ma frappone una griglia metallica (dalle maglie più o meno fitte) sul percorso ottico.

Le griglie metalliche (brevettate anch'esse) sostituiscono i più tradizionali filtri grigi (ND – Neutral Density), mai otticamente neutri. Questi ultimi, infatti, con l'uso massiccio tendono a perdere le loro caratteristiche di attenuazione rendendo non ripetibili le condizioni di attenuazione.

Il sistema FIM essendo integrato totalmente nello stativo è in grado di memorizzare sulle eprom presenti nello stativo stesso, i vari livelli di attenuazione per ogni singolo filtro.

Questa caratteristica consente al sistema di lavorare in modo "intelligente" anche senza l'utilizzo di PC e software

L'attenuazione del FIM riduce in modo netto il photobleaching del campione.

DIAFRAMMI DI CAMPO IN FLUORESCENZA – sistema Brevettato

Il microscopio è dotato di 12 diaframmi di campo (6 circolari e 6 rettangolari) inseriti sul percorso della fluorescenza e gestibili via software o hardware.

Questa tecnologia ha diverse funzioni:

- 1) aumenta sensibilmente il rapporto segnale/rumore diminuendo l'intensità di fluorescenza proveniente dalle parti del campione non inquadrato dalla camera;
- 2) ha il compito di non bruciare (e quindi ridurre il bleaching) le parti del campione che vengono inquadrato dall'obiettivo (visibili all'oculare), ma non possono essere comprese nel campo inquadrato dalla camera digitale.

Va infatti sempre ricordato che, il sensore della camera digitale possiede una diagonale che descrive un rettangolo inscritto all'interno del campo oggetto dell'obiettivo (circolare) e visibile agli oculari, vedere figura sotto:

Questa caratteristica risulta di fondamentale importanza in qualunque microscopio, quando occorre analizzare aree sequenziali di tessuto, tipicamente quindi nelle ricostruzioni mosaico.

Formazione

Il corso di Istruzione e Formazione per gli utilizzatori del sistema sarà tenuto dal personale Leica qualificato dal punto di vista tecnico, scientifico ed applicativo, con lo scopo di preparare gli operatori all'utilizzo in autonomia del sistema installato.

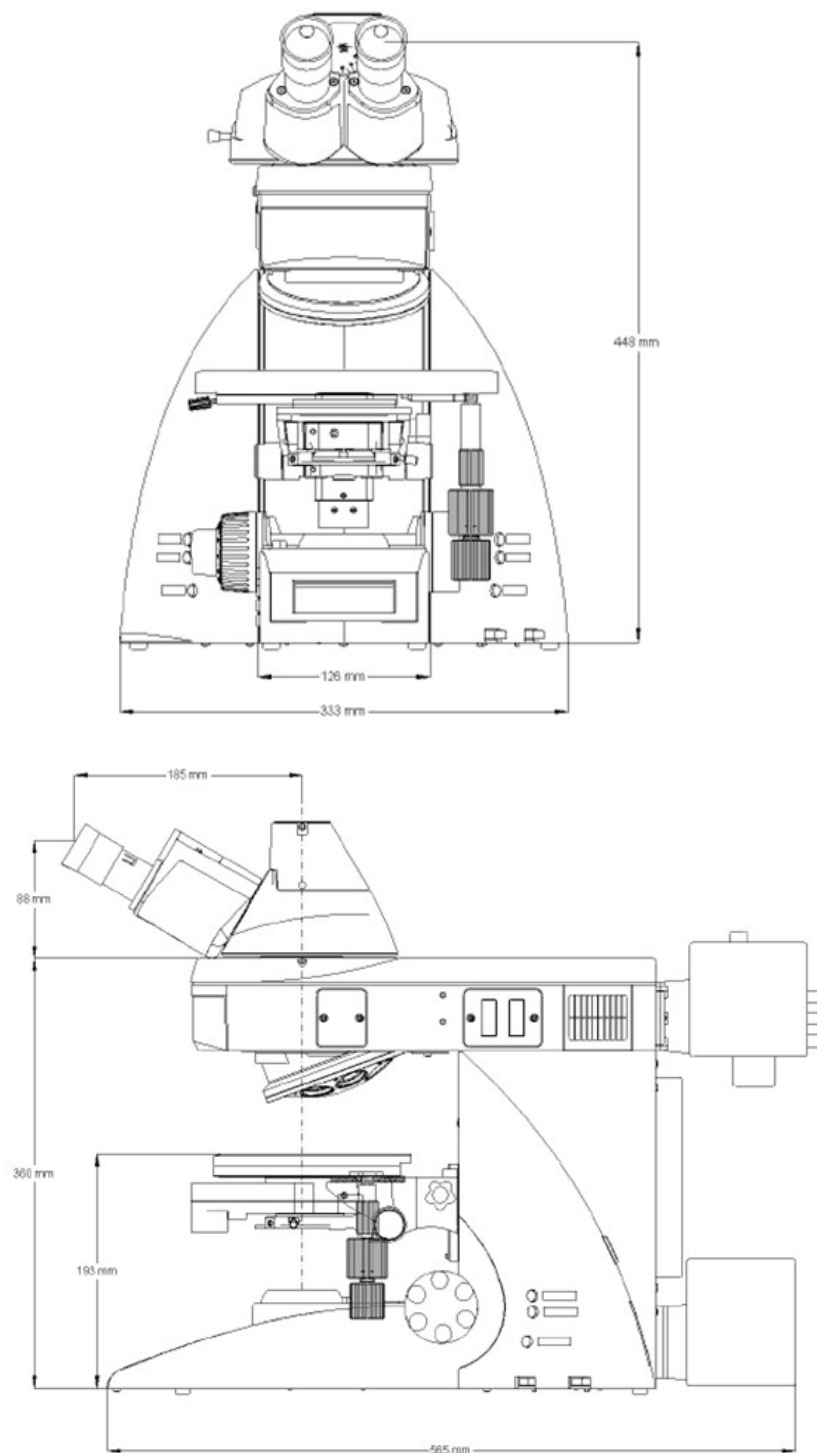
Il corso avverrà presso il luogo di installazione del sistema.

Nel dettaglio il programma del corso prevede:

- Descrizione delle componenti hardware del sistema
- Procedura corretta di accensione del Sistema
- Descrizione delle funzionalità del software
- Descrizione delle differenti modalità e procedure di acquisizione
- Descrizione della procedura per l'analisi delle immagini
- Descrizione della procedura per l'utilizzo dei pacchetti software compresi in fornitura
- Descrizione procedura di utilizzo del software in modalità Computational Clearing
- Descrizione procedura di acquisizione di immagini mosaico
- Descrizione procedura di salvataggio dei profili

Nella fasi successive all'utilizzo da parte del personale istruito, e ogni volta si renderà necessario, Leica si impegna a fornire tutte le informazioni e/o supporto affinché la strumentazione sia utilizzata al massimo della sua potenzialità e senza alcuna interruzione.

3. Dimensioni e Layout



Specifiche del microscopio:

Voltaggio: 90-250 V

Frequenza: 50/60 Hz

Consumo massimo: 180 W

Temperatura di esercizio: 10-36°C

Umidità relativa: 0-80% a 30°C