



NANO EYE DEVICE VIRUS DETECTION **NED-VD**

NANO EYE DEVICE VIRUS DETECTION DIGITAL LASER MICROSCOPE

**Modello
NED-VD**

Manuale Operativo



(220-240 VAC, 10 A, 50/60HZ)

Progettato e prodotto da:

NTP Nano Tech Projects
Via Circonvallazione 11/A
Sant'Angelo in Vado 61048 – PU, ITALY
&
Via Fortunato Zeni 8, corpo L, scala 2
Rovereto 38068 – TN, ITALY

Cerchiamo costantemente di migliorare i nostri strumenti e adattarli alle esigenze delle moderne tecniche di ricerca e dei metodi di analisi. Ciò può comportare modifiche alla struttura meccanica, alla progettazione ottica e all'architettura software dei nostri strumenti. Pertanto, tutte le descrizioni e le illustrazioni contenute in questo manuale utente, comprese tutte le specifiche, sono potenzialmente soggette a modifiche hardware o software senza preavviso. Il presente documento è stato redatto con la massima cura. Tuttavia, NTP rifiuta di assumersi qualsiasi responsabilità in caso di errori od omissioni. Lo stesso vale per qualsiasi danno derivante dall'uso improprio delle informazioni contenute in questo manuale.

NTP Nano Tech Projects
Via Circonvallazione 11/A
Sant'Angelo in Vado
61048 - PU
ITALY
+39 0722 88681
info@ntpsrl.biz
www.ntpsrl.biz
P. IVA: 02494970417



Hai appena acquistato uno dei migliori microscopi laser digitali da laboratorio disponibili sul mercato.
Con un'adeguata cura, manutenzione e procedure di laboratorio, questo strumento vi garantirà anni di servizio produttivo.
Leggere attentamente questo manuale per acquisire familiarità con l'installazione e il funzionamento corretto del microscopio digitale.
Altre informazioni sono disponibili sul nostro sito web, www.ntpsrl.biz.

GARANZIA

NTP Nano Tech Projects garantisce per Nano Eye Device – Virus Detection, modello NED-VD.

Le apparecchiature o gli accessori installati attivamente hanno una garanzia legale purchè qualsiasi parte dell'apparecchiatura non venga modificata o manomessa da parte degli utilizzatori.

SIMBOLI

Precauzioni di sicurezza sono presenti in tutto il manuale per indicare diversi livelli di rischio potenziale, come definiti di seguito:



Segnala la necessità di seguire le istruzioni per evitare danni alla strumentazione.



Indica che l'interruttore principale è inserito (ON)



Indica che l'interruttore principale è disinserito (OFF)



Indicazioni e Suggerimenti



Avvertenze. Segnala la necessità di seguire le istruzioni per evitare il pericolo di danni all'operatore e/o alla strumentazione.

REGISTRO MODIFICHE

Identificazione doc	Autore	Dipartimento	Data	Motivo
NTP-SC-20210315-01 rev.PA1-R	D.S. Adolfo Carloni	Area Scientifica	01/03/21	Draft
	Ph.D. Roberto Lo Savio		22/03/21	Correzioni
	Dr.ssa Sara Piselli		22/03/21	Correzioni
	Ing. Alessia Petrelli		24/03/21	Correzioni

INDICE GENERALE

1.	DESCRIZIONE GENERALE.....	7
2.	INFORMAZIONI D'INSTALLAZIONE.....	9
3.	AVVERTENZE DI SICUREZZA.....	10
3.1	Sistema.....	10
3.2	Installazione.....	10
3.3.	Cavo di alimentazione	11
3.4.	Aperture della struttura	11
4.	PANNELLO ANTERIORE.....	12
5.	PANNELLO POSTERIORE.....	13
6.	COLLEGAMENTO DEL CAVO DI ALIMENTAZIONE.....	14
7.	COLLEGAMENTI AI SISTEMI DI CONTROLLO	14
8.	ACCENSIONE.....	15
9.	SCHERMATA DI ACCESSO PROFILO UTENTE	16
10.	CONTROLLO NED-VD CON COLLEGAMENTO IN LOCALE	17
10.1	Parte Superiore con la barra funzioni	19
10.2	Parte Centrale a sinistra	21
10.3	Parte Laterale a destra	22
11.	PREPARAZIONE DEL VETRINO PER IL NED-VD.....	23
12.	CARICAMENTO VETRINO NEL NED-VD.....	24
13.	SALVATAGGIO AUTOMATICO DELLE IMMAGINI	25
14.	SAGGIO D'ESEMPIO E ACQUISIZIONE DI IMMAGINI	26
14.1	Saggio d'esempio.....	26
14.2	Acquisizione delle immagini.....	27
14.3	Suggerimenti per la cattura delle immagini	30
15.	CALCOLO D'INTENSITÀ CON "IMAGE ANALYZER"	32
16.	CONTEGGIO DELLE NANOPARTICELLE CON "NP COUNTER"	35
17.	PARAMETRI MOBILI.....	39
18.	BARRA DELLE FUNZIONI E LINGUA.....	40
19.	ESPORTAZIONE DEI DATI PER LA REFERTAZIONE.....	41
20.	MESSA A FUOCO, AUTOFOCUS E PREFOCUS	42
21.	CONFIGURAZIONE DEL SISTEMA.....	43
22.	CONTROLLO NED-VD CON ACCESSO DA REMOTO	46
23.	CURA E MANUTENZIONE	47
23.1	Pulizia	47
23.2	Pulizia degli obiettivi.....	47
23.3	Manutenzione preventiva	47
23.4	Smaltimento	47
23.5	Movimentazione dello strumento.....	47

23.6 Rischio Biologico	47
24. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	48
24.1 Sostituzione fusibili	48
25. SCELTA DEL CAVO DI ALIMENTAZIONE	49
26. NOTE SULLA GARANZIA.....	50
27. SPECIFICHE TECNICHE DELLO STRUMENTO	51

PREMESSA

NTP Nano Tech Projects srl progetta e sviluppa sistemi di rilevazione, acquisizione e trasmissione di immagini NED-DI (Nano-Eye Device - Digital Imaging).

Sono state sviluppate tre aree applicative che si distinguono per il loro utilizzo: osservazioni nanoscopiche, microscopiche e macroscopiche.

NED-NANO è la soluzione mirata ad osservazioni nanoscopiche di materiali sub-diffrattivi, ovvero materiali aventi dimensioni generalmente inferiori alle lunghezze d'onda tipiche della radiazione eletromagnetica del visibile (400-700 nm).

Pertanto, lo strumento permette di osservare, rilevare e conteggiare nanomateriali più piccoli di 200 nanometri, quali ad esempio nanoparticelle sferiche di dimensioni comprese tra i 20 e i 200 nm, purché essi siano dotati di proprietà diffuse sufficienti da essere rilevati dallo strumento.

La soluzione NED-NANO ha portato allo sviluppo di uno strumento dedicato alla rilevazione di diverse tipologie di virus in campioni biologici e pertanto la soluzione strumentale uscente è stata denominata Nano Eye Device - Virus Detector (di qui in poi NED-VD, fig. 1).

L'osservazione diretta dei virus o di nanoparticelle utilizzate come biomarcatori per brevi sequenze nucleotidiche (ad es. DNA) o amminoacidiche (ad es. proteine), avviene in maniera indiretta attraverso la cattura della luce diffusa dalle nanoparticelle stesse, utilizzando come sorgente di illuminazione una sorgente laser.

In particolare, lo strumento NED-VD è calibrato per la visione di nanoparticelle di oro con diametro pari a 100 nm, ma questo non preclude il fatto che possa essere utilizzato per rilevare altri tipi di nanomateriali inorganici (ad es. zinco, rame, ferro, alluminio, silice) o organici (polimeri, cellule, patogeni) purchè essi abbiano dimensione superiore ai 20 nm.

NED-VD, tramite acquisizione digitale dell'immagine, permette l'osservazione di nanoparticelle nel campo di vista sulla verticale dell'obiettivo, sia in soluzioni liquide, sia in aria, con una profondità di fuoco di alcune centinaia di nanometri.

NED-VD (fig. 1) è pertanto una workstation automatizzata sviluppata per l'osservazione di vetrini su cui sono depositate, ad esempio, soluzioni contenenti nanoparticelle, tipicamente legate a biomolecole quali sequenze di oligonucleotidi (DNA/RNA), o proteine (anticorpi e antigeni).

Per applicazioni specifiche potrebbero essere rilasciate delle parti aggiuntive di informazioni al presente documento (allegati).

Il presente manuale si applica per il prodotto NED-VD risulta essere completo di tutte le informazioni d'uso.



Figura 1

1. DESCRIZIONE GENERALE

NED-VD è un microscopio laser digitale destinato ad un uso diagnostico in vitro per analisi qualitative e quantitative. L'immagine viene visualizzata su uno schermo ad alta definizione in tempo reale.

I campioni analizzabili sono substrati trasparenti (tipicamente vetro borosilicato) con spessore pari a 0.17 mm (vetrino o coverslip), su cui vengono immobilizzati biorecettori atti alla cattura dell'analita biologico (o bioanalita) in esame.

NED-VD è sviluppato specificatamente per la rilevazione di bioanaliti aventi dimensioni nanometriche, come ad esempio sequenze di DNA o RNA, proteine, corpuscoli organici quali virioni ed esosomi.

Il bioanalita in esame viene osservato attraverso reazioni biochimiche che coinvolgono l'utilizzo di soluzioni nanoparticellari opportunamente coniugate con elementi in grado di legarsi al bioanalita stesso (biomarkers) rendendolo così rilevabile dallo strumento.

Grazie all'accoppiamento ottico tra una sorgente laser e il coverslip si genera un effetto di riflessione interna totale con la creazione di un campo di onda evanescente tale da illuminare solo i nanomateriali strettamente adiacenti alla superficie del coverslip, con una profondità di penetrazione di poche centinaia di nanometri.

Questo particolare accoppiamento ottico, brevettato da NTP, è in grado di illuminare il campo di vista sulla verticale dell'obiettivo, ovvero l'area dove avviene la reazione biochimica in esame, e di discriminare la presenza di nanomateriali sub-diffrattivi in scattering (luce riflessa).

La luce riflessa e diffusa dalle nanoparticelle presenti nell'onda evanescente permette la rilevazione delle nanoparticelle stesse attraverso un sistema di lenti-obiettivo accoppiate ad una telecamera in grado di catturare un'immagine.

NED-VD consente un funzionamento interattivo similare a quello di un personal computer con un microscopio ottico integrato. Lo strumento possiede infatti una scheda madre integrata, ed è del tutto similare, anche dimensionalmente, a un PC fisso.

Il sistema è dotato di sistema operativo Windows e contiene il software sviluppato da NTP per il controllo del microscopio ottico integrato nello strumento.

NED-VD è dotato di un software dedicato attraverso il quale è possibile accedere al controllo del microscopio in ogni sua parte e alle sue funzioni con i vantaggi concreti dettati dalla completa digitalizzazione del sistema, tra cui la visione del campione diretta su monitor, controllo delle movimentazioni, e possibilità di accesso per la visualizzazione e il controllo del microscopio da remoto.

La visione tramite monitor è possibile grazie ad un collegamento standard del tipo HDMI e il controllo dello strumento è possibile tramite tastiera e mouse standard.

Tramite software è possibile gestire in automatico l'accensione e l'intensità di illuminazione delle sorgenti LED e LASER, lo spostamento del vetrino negli assi X e Y, la messa a fuoco delle lenti in asse Z, il cambio dell'ingrandimento e l'allineamento del laser.

NED-VD permette l'inserimento del vetrino attraverso uno sportellino che presenta un alloggio per il vetrino stesso. Grazie ad un supporto porta obiettivi a sei posizioni (revolver) si possono scegliere i seguenti obiettivi: 2X; 4X; 10X; 20X; 40X; 60X. Tutti gli obiettivi sono di tipo "dry".

All'inserimento del vetrino, NED-VD mostra uno schema panoramico del vetrino, una mini-mappa, con un certo numero di aree di interesse (da 12 a 48 a seconda del supporto adattatore utilizzato) corrispondenti alle coordinate XY del vetrino.

Le mini-mappe consentono all'utente di spostare rapidamente il vetrino lungo gli assi X e Y tra i diversi pozetti di reazione del campione. Le coordinate in X e in Y sono preimpostate via software e centrate per ogni pozetto.

Diversamente da un normale microscopio ottico, il NED-VD dispone, oltre al sistema di illuminazione in onda evanescenze, anche di un software con capacità analitiche in esso implementate per una rapida quantificazione dei segnali. Immagini acquisite a basso ingrandimento (2X, 4X, 10X) forniscono un dato relativo all'intensità del segnale ottico; invece, immagini acquisite a medio o alto ingrandimento (20X, 40X, 60X) consentono di rilevare il numero di singole nanoparticelle presenti nell'immagine, fornendo un valore di densità reale dato dal numero di nanoparticelle per millimetro quadrato (NP/mm^2).

Destinazione d'uso

Il NED-VD, a cui si riferisce questo manuale utente, è progettato per applicazioni di routine diagnostica e di ricerca, sia in campo biochimico sia in campo industriale. Ciò include l'esame di campioni sintetici così come di campioni umani al fine di fornire informazioni su dati genomici e proteomici concernenti lo stato fisiopatologico o eventuali anomalie congenite per un monitoraggio biosensoristico dei parametri di interesse per un paziente sotto analisi.

La sua destinazione d'uso è mirata sia ad un utilizzo professionale da parte di medici in ospedali o di clinici in laboratori specializzati, ma anche da parte di ricercatori o professionisti operanti in genere in reparti di ricerca e sviluppo, e si presta anche per applicazioni didattiche in ambito universitario in discipline che coinvolgano la medicina, la fisica, la biochimica, e più in generale, nel settore dell'industria biomedicale.

NED-VD è conforme agli standard:

- EN 61010-2-101:2002 (Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use);
- EN 61326-2-6:2006 (Electrical equipment for measurement, control and laboratory use - EMC requirements - Part 2-6: Particular Requirements - In vitro diagnostic (IVD) medical equipment);

Essi soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diaognostici in vitro in materia di sicurezza elettrica e compatibilità elettromagnetica.

2. INFORMAZIONI D'INSTALLAZIONE

Per garantire il corretto funzionamento l'installazione del NED-VD deve essere effettuata solo da personale qualificato per l'assistenza.

Prima di mettere in funzione lo strumento NED-VD, leggere con attenzione il presente manuale operativo. Attenersi scrupolosamente a tutte le istruzioni.

E' necessario evitare un'esposizione prolungata a umidità e temperatura eccessive. Temperatura e umidità devono essere mantenute relativamente costanti per ottenere il massimo grado di stabilità operativa.

Posizionare lo strumento in un'area ben ventilata, evitando l'esposizione a vapori corrosivi, correnti d'aria dirette o temperature estreme. Evitare l'esposizione a raggi diretti del sole, la vicinanza a finestre aperte, lavandini, forni, fiamme vive, piastre calde, radiatori e bagni di ghiaccio secco.

Poiché NED-VD è uno strumento ottico di precisione, deve essere installato su un banco stabile e solido in cui non siano presenti strumentazioni che generano vibrazioni o urti quali centrifughe e agitatori che potrebbero influire sulla qualità di acquisizione delle immagini e lontano da apparecchiature a forte consumo di tensione o corrente, compresi grandi frigoriferi e forni.

Accertarsi che lo strumento si trovi vicino a una sorgente elettrica che soddisfi i requisiti elettrici specificati (tensione e amperaggio) sulla targhetta identificativa posta sul retro dello strumento.

La presa di corrente deve essere dotata di messa a terra (possibilmente una linea dedicata) e potenzialmente di un gruppo di continuità.

Nel caso di controllo da remoto, accertarsi che lo strumento si trovi vicino ad una presa di rete di tipo Ethernet.

Assicurarsi che il luogo di installazione selezionato fornisca spazio sufficiente per consentire l'utilizzo corretto dello strumento comprensivo di monitor, tastiera e mouse ed eventuali altri accessori forniti.

Modifiche non autorizzate al dispositivo o l'uso non conforme annullano i diritti su eventuali richieste di garanzia.



Il produttore non si assume alcuna responsabilità per danni causati da o per rischi derivanti dall'uso dei microscopi per scopi diversi da quelli per i quali sono stati destinati o non utilizzati nelle specifiche di NTP Nano Tech Projects srl. In tali casi la dichiarazione di conformità cessa di essere valida.



Non rimuovere o cambiare gli obiettivi. Gli obiettivi installati sono calibrati specificatamente per lo strumento. Non tentare di eseguire riparazioni o modifiche non autorizzate.



NED-VD funziona utilizzando tastiera, mouse dotato di rotella centrale e monitor con risoluzione minima di 1920×1200 pixel. Per l'utilizzo di questi accessori riferirsi allo specifico manuale d'uso.

3. AVVERTENZE DI SICUREZZA

3.1 Sistema

È costruito con componenti di alta precisione e pertanto deve essere maneggiato con cura evitando di esporlo ad urti improvvisi e violenti. Lo strumento è dotato di due incavi sotto la base per poter essere sollevato da una singola persona. Il peso dello strumento (fig. 2) è di circa 22 Kg.

3.2 Installazione

Installare lo strumento su un banco stabile e piano lontano da fonti di calore, forti campi elettromagnetici e agitatori da banco quali centrifughe e miscelatori.



Figura 2



Gli assi di movimento X e Y dello strumento sono protetti da fascette di tenuta che devono essere rimosse prima di accendere il dispositivo.

- ➔ È necessario pertanto, prima di eseguire qualsiasi altra operazione, aprire con la chiave in dotazione lo sportello e rimuovere le fascette di blocco dei movimenti.

Le fascette sono riconoscibili da un'etichetta di colore rosso simile a quella descritta nella Fig.3.

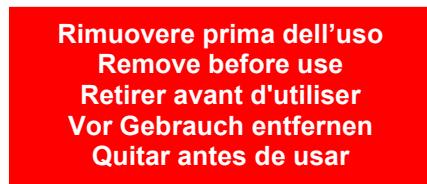


Figura 3

3.3. Cavo di alimentazione

Prima di collegare il cavo di alimentazione alla presa, assicurarsi che l'interruttore principale dello strumento sia su "O" (OFF).

Collegare il cavo di alimentazione assicurandosi che i terminali di messa a terra dell'alimentatore e della presa a muro siano collegati correttamente.

Se l'equipaggiamento non viene collegato a terra, NTP Nano Tech Projects non può garantire la sicurezza elettrica ed il corretto funzionamento dello strumento.

3.4. Aperture della struttura

Non aprire, smontare o modificare la struttura dello strumento. Non occludere le aperture di ventilazione poste sotto la base dello strumento.



Il dispositivo è incompatibile con atmosfere infiammabili ed esplosivi.



Non utilizzare il dispositivo se è stato danneggiato. Il dispositivo danneggiato va riparato esclusivamente da personale qualificato e autorizzato. Contattare il servizio assistenza (per conoscere i contatti del servizio assistenza consultare il paragrafo 24, RISOLUZIONE DEI PROBLEMI).

4. PANNELLO ANTERIORE

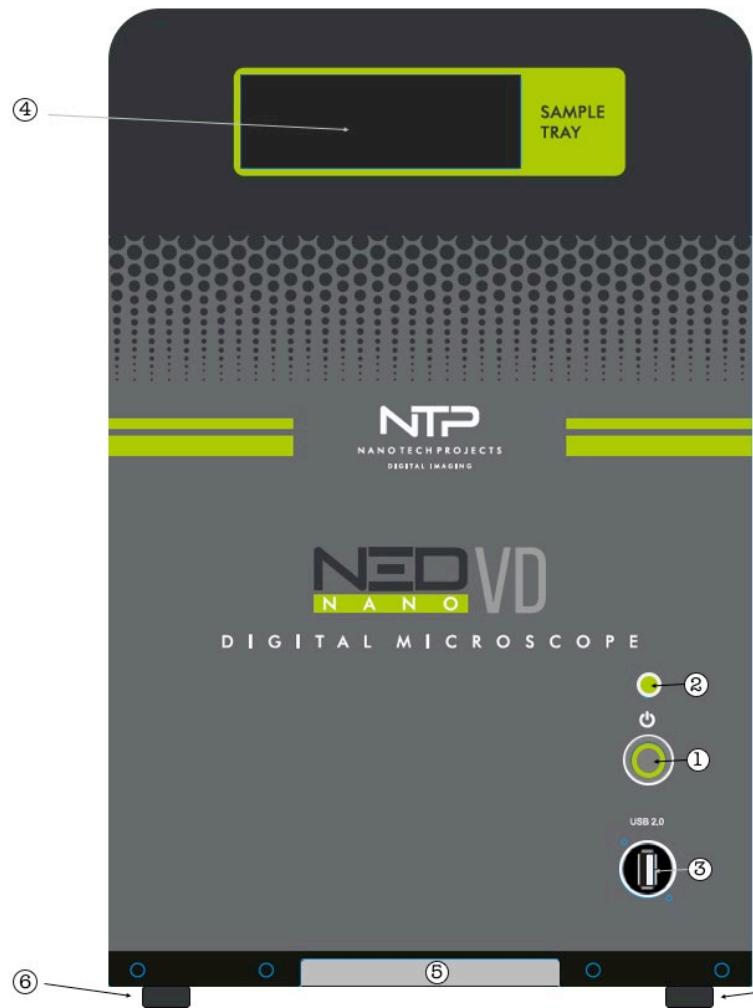
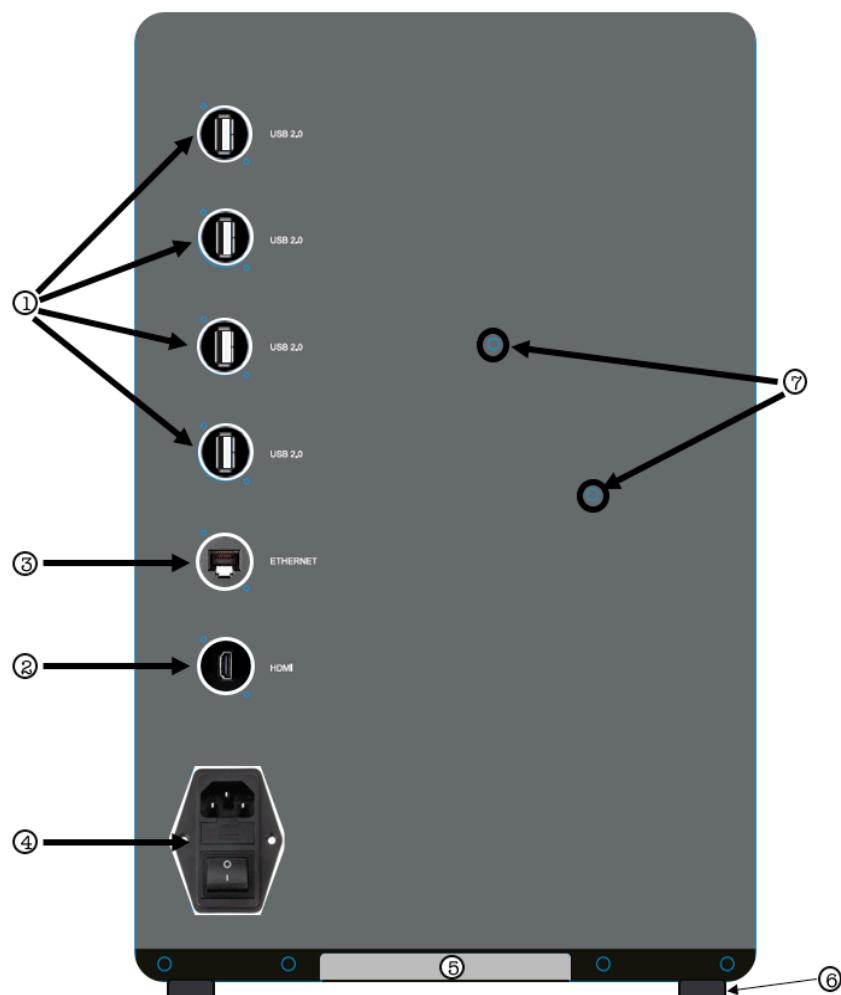


Figura 4

- ① Tasto di accensione (LED circolare in verde) o di standby (in rosso).
- ② LED puntuale verde spento indica che lo strumento è alimentato ma il software NED-VD è spento. Se il LED verde è acceso insieme al tasto ① (LED circolare in verde) lo strumento è acceso e il software NED-VD è in funzione; se il LED verde è acceso insieme al tasto ① (LED circolare in rosso) significa che lo strumento è in standby.
- ③ Presa dati USB 2.0
- ④ Sportello per l'inserimento del vetrino.
- ⑤ Maniglia incava per il sollevamento dello strumento.
- ⑥ Piedini di appoggio regolabili in altezza

5. PANNELLO POSTERIORE



① Presa USB 2.0.
Predisposte per l'utilizzo dei seguenti accessori:
a. Mouse e tastiera
b. Joystick (opzionale)
c. Webcam (opzionale)

② Presa HDMI per collegamento monitor. Il sistema è calibrato per un monitor 24" da 2 Mpx (1920x1200).

③ Presa di collegamento rete Ethernet RJ45.

④ Presa AC per il cavo di alimentazione con interruttore I/O per ON/OFF

⑤ Maniglia incava per il sollevare lo strumento.

⑥ Piedini di appoggio regolabili in altezza.

⑦ Fori di servizio per regolazione fine del modulo laser.

6. COLLEGAMENTO DEL CAVO DI ALIMENTAZIONE

Prima di collegare il cavo di alimentazione, assicurarsi che l'interruttore principale ④ Fig.5, sia su "O" (OFF).

Utilizzare sempre il cavo di alimentazione fornito in dotazione con lo strumento. Se il cavo di alimentazione non è compreso nella dotazione, sceglierne uno idoneo consultando la sezione "SCELTA DEL CAVO DI ALIMENTAZIONE" alla fine del presente manuale d'istruzione.



**Collegare la spina del cavo di alimentazione alla presa AC ④
Fig.5**



Inserire la spina del cavo di alimentazione nella presa di corrente disponibile.



Collegare il cavo di alimentazione ad una presa isolata a 3 conduttori ed assicurarsi che i terminali di messa a terra dell'alimentatore e della presa a muro siano collegati correttamente. Se lo strumento non viene collegato a terra, NTP Nano Tech Projects srl non può garantire la sicurezza elettrica ed il corretto funzionamento.

7. COLLEGAMENTI AI SISTEMI DI CONTROLLO

I sistemi di controllo delle funzioni di movimentazione del NED-VD sono tastiera e mouse.

Il sistema di visione è costituito da un monitor FULL HD da 24" (1920x1200) con connessione HDMI.

La tastiera, il mouse ed il joystick sono collegati alle porte USB 2.0 ① Fig.5, mentre il monitor alla presa HDMI ② Fig.5.

Il sistema è pilotabile anche da remoto se collegato a internet tramite cavo e presa ethernet ③ Fig.5.

8. ACCENSIONE



Prima di alimentare lo strumento, procedere allo sblocco delle movimentazioni e all'attivazione dei collegamenti come descritto nei paragrafi 3,6,7.

Il NED-VD dispone di due interruttori di alimentazione, uno posto sulla parte anteriore dello strumento (filtro di rete) e uno sulla parte posteriore (LED circolare)

Accendere prima l'interruttore generale sulla parte posteriore, all'altezza del cavo di alimentazione.

L'interruttore generale ④ (Fig.5) messo in posizione "I" permette l'immediata accensione dello strumento e accende automaticamente il LED circolare frontale, di colore verde (pulsante ① Fig.4).

Il pulsante ① Fig.4, se cliccato semplicemente una volta, permette di mettere il sistema in pausa (stand-by) il dispositivo.

Quando lo strumento è in pausa, il LED circolare emette una luce rossa. Se il pulsante viene cliccato nuovamente il sistema torna in funzione e il LED circolare torna di colore verde.

Per spegnere il sistema basta tenere premuto per qualche secondo lo stesso pulsante (① Fig.4).

Quando il pulsante ① Fig.4 (luce verde) ed il LED ② Fig.4 (luce verde) sono accesi, si può procedere ad utilizzare i controlli software del NED-VD.

Una volta che lo strumento è acceso, attendere circa 30 secondi per il caricamento del sistema operativo.

Sul monitor compare la schermata Desktop su cui sono presenti varie icone:



Cliccare sul Desktop due volte sull'icona "NTP.NED Nano v.3.1.1.0" per accedere alla schermata iniziale del software (Figura 6) Il codice "v.x.x.x.x" di versione potrebbe presentare un numero differente in funzione degli aggiornamenti)

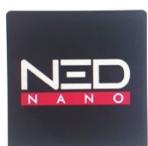


Figura 6



In questa fase si udirà un suono ("bip") provenire dall'interno dello strumento tipico della fase di attivazione delle parti elettroniche interne allo strumento.

9. SCHERMATA DI ACCESSO PROFILO UTENTE

Prima di accedere al software di utilizzo e controllo del NED-VD è necessario creare uno o più profili utente degli utilizzatori. Il sistema è generalmente accessibile alla schermata di accesso (Figura 7) digitando:

Username: admin

Password: admin



Figura 7

- La creazione del profilo utente consente di memorizzare alcuni parametri che rimarranno legati all'utente. Si consiglia quindi di effettuare questa attività in presenza dell'utente in modo da impostare le variabili desiderate.



Questo attività è consentita al solo personale autorizzato.

10. CONTROLLO NED-VD CON COLLEGAMENTO IN LOCALE

Il collegamento in "locale" permette all'utente di utilizzare il NED-VD posto a fianco dell'operatore senza che lo stesso sia connesso ad una rete dati, gestendo così le funzioni del sistema mediante collegamento diretto allo strumento.

La gestione del software in "locale" si differenzia dalla gestione da remoto in modalità "web" per la presenza di alcune funzioni.

Nei capitoli seguenti verranno descritte separatamente le due differenti gestioni (in "locale" e in "web") e le relative funzioni disponibili.

Dopo aver effettuato l'accensione dello strumento e raggiunto l'ambiente del sistema operativo Windows sul desktop sarà visibile l'icona che evidenzia la versione del software installato e permette di avviare l'applicazione software come già descritto in sezione 9.

Verrà quindi visualizzata la richiesta d'inserimento delle credenziali dell'utente, username e password in funzione del setup di profilazione come già descritto in sezione 10.

Una volta eseguito l'accesso apparirà una schermata (Figura 8) in cui è necessario attendere circa 40 secondi, tempo in cui il software verificherà che lo strumento sia correttamente collegato e che si trovi nelle condizioni adeguate di utilizzo. Inoltre, il sistema verificherà le condizioni dei componenti motorizzati, la presenza della telecamera, i componenti d'illuminazione ed i sensori di controllo. Il software determinerà il corretto posizionamento dei movimenti motorizzati negli assi X, Y, Z, la rotazione del revolver porta obiettivi e il modulo laser. In questa fase si udiranno alcuni movimenti interni allo strumento che sono tipici di questa fase di controllo.

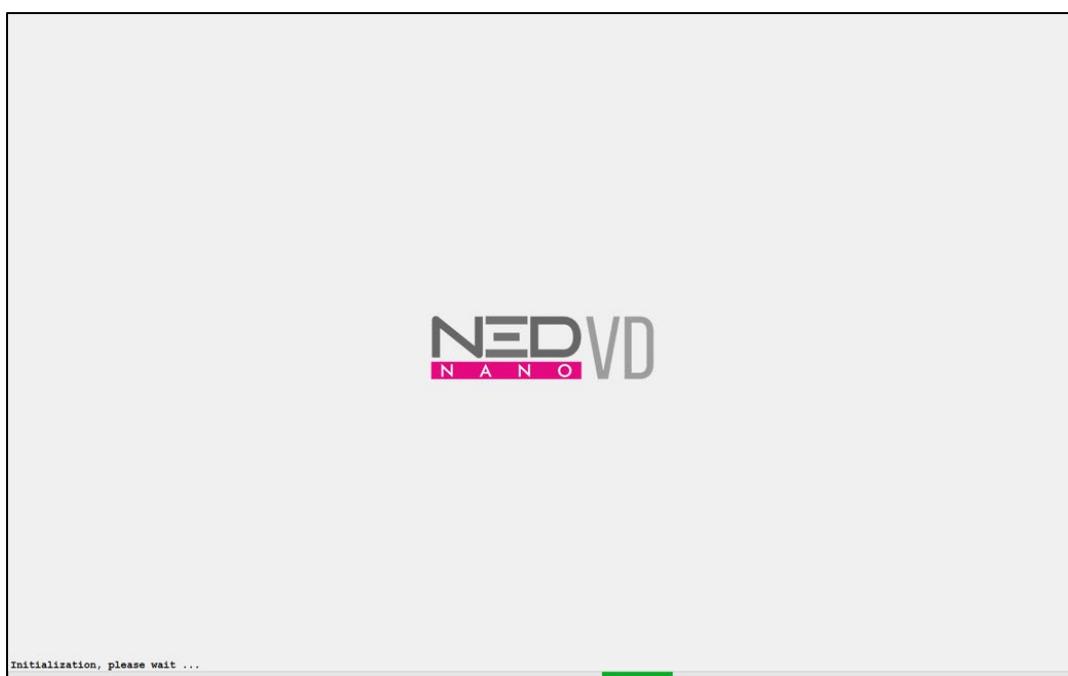


Figura 8



Non interrompere questo processo per non fermare la procedura di controllo dello strumento delle meccaniche e dei sensori interni.

Al termine di questi controlli sul monitor verrà visualizzata l'interfaccia software (Fig. 9) per l'utente con i comandi di gestione delle funzioni dello strumento.



Figura 9

L'interfaccia (Fig.9) è divisa in tre parti:

- Una superiore con la barra funzioni (File, Options, Camera, Tools) ①.
- Una parte centrale a sinistra dove si vede l'immagine del campione in esame ②.
- Una parte laterale a destra ③ dove sono presenti le funzioni di gestione dello strumento quali movimentazioni negli assi X e Y, regolazione del fuoco, selezione dell'obiettivo, visualizzazione della mini-mappa, controlli di luce, regolazione del fascio laser, analisi di immagine e altre funzioni disponibili e/o implementabili su richiesta.

10.1 Parte Superiore con la barra funzioni

Nella parte superiore è presente una barra delle funzioni con relative sottovoci (Fig.10):

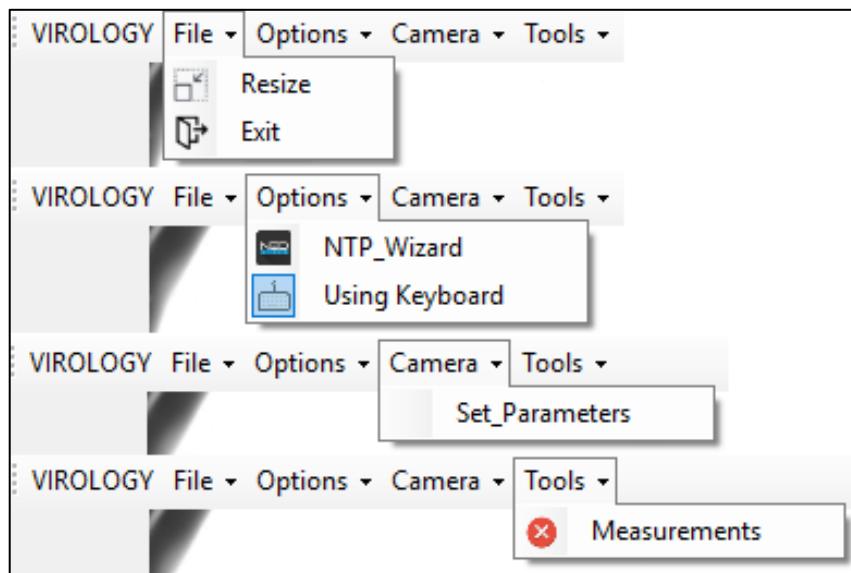


Figura 10

"File"

- Selezionare "Resize" per ridurre ad icona la schermata dell'interfaccia software e tornare sul Desktop per effettuare eventuali operazioni in parallelo su altre pagine, mantenendo il software sempre attivo. Ricliccando sull'icona NED (in basso a sx), si può ritornare alla schermata dell'interfaccia software.
- Selezionare "Exit" per uscire dal software.

"Options"

- Selezionare "NTP_Wizard" (operazione ammissibile solo da parte dell'amministratore informatico di NTP) per sottomettere un nuovo file ".ntp". Il file ".ntp" permette di generare un nuovo file di sistema in grado di modificare le funzioni di gestione dello strumento.
- Selezionare "Using Keyboard" permette di abilitare/disabilitare il controllo del microscopio tramite scorciatoie (o "shortcut") da tastiera: in particolare tramite tastiera abilitata, è possibile muovere il vetrino in XY attraverso l'utilizzo delle lettere "A" (sinistra), "D" (destra), "W" (alto) e "S" (basso). Inoltre, è possibile effettuare l'autofocus utilizzando la lettera "O" e si può selezionare l'obiettivo utilizzando i numeri da 1 a 6, dove il tasto "1" corrisponde all'obiettivo a più bassa magnificazione, a salire fino al tasto "6" che corrisponde all'obiettivo a più alta magnificazione.

"Camera"

- Selezionare "Set_Parameters" per modificare le impostazioni di default della telecamera. Pertanto, è possibile modificare il tempo di esposizione (Exposure Time, ET) e la frequenza dei fotogrammi (Framerate, F) e il guadagno (Gain, G).

Normalmente questi parametri sono impostati dall'amministratore per un'osservazione soddisfacente di oggetti nanometrici quali nanoparticelle d'oro di 100 nm; in particolare, i parametri impostati di default sono: G = 0, ET = 200ms, F = 5fps.

I parametri sono soggetti al tipo di nanomateriale da osservare e solitamente più diminuiscono le sue dimensioni, minore è la luce diffusa dallo stesso per cui è necessario ad esempio aumentare l'Exposure Time, ridurre il Framerate e aumentare il Gain della telecamera.

- **La funzione Guadagno introduce rumore di fondo nell'immagine. L'immagine potrebbe perdere di definizione. Usare solo se le condizioni d'intensità del LED o i tempi di Esposizione della fotocamera non consentono un reale miglioramento. Ripristinare il Guadagno al valore zero appena possibile.**

"Tools"

- Selezionare "Tools" per attivare la funzione "Measurements". Si apriranno una serie di icone in alto che permettono di attivare misurazioni di diversa tipologia. Partendo da sinistra:
 - 1) "Draw Ruler" permette di disegnare un righello da punto a punto con misurazione automatica della lunghezza.
 - 2) "Draw Circle" permette di disegnare un cerchio di dimensioni impostabili in funzione dell'esigenza (ad es. per circondare uno spot). Una volta disegnato il cerchio compaiono dei parametri che definiscono la dimensione dell'area del cerchio in mm² (es. A=1 mm²) e l'intensità media all'interno della stessa in un valore compreso tra 0 e 255 (es. I= 45).
 - 3) La terza icona "Undo" permette di annullare la precedente azione.
 - 4) La quarta icona "Clear" permette di ripulire l'intera schermata da tutte le azioni precedentemente effettuate.
 - 5) La quinta icona "ToolStripButton" permette di scegliere il colore del Ruler, del Circle e del testo.

10.2 Parte Centrale a sinistra

Mostra l'immagine in tempo reale che la telecamera sta riprendendo (fig. 11). La telecamera in dotazione ha una risoluzione di 2456×2054 pixel.

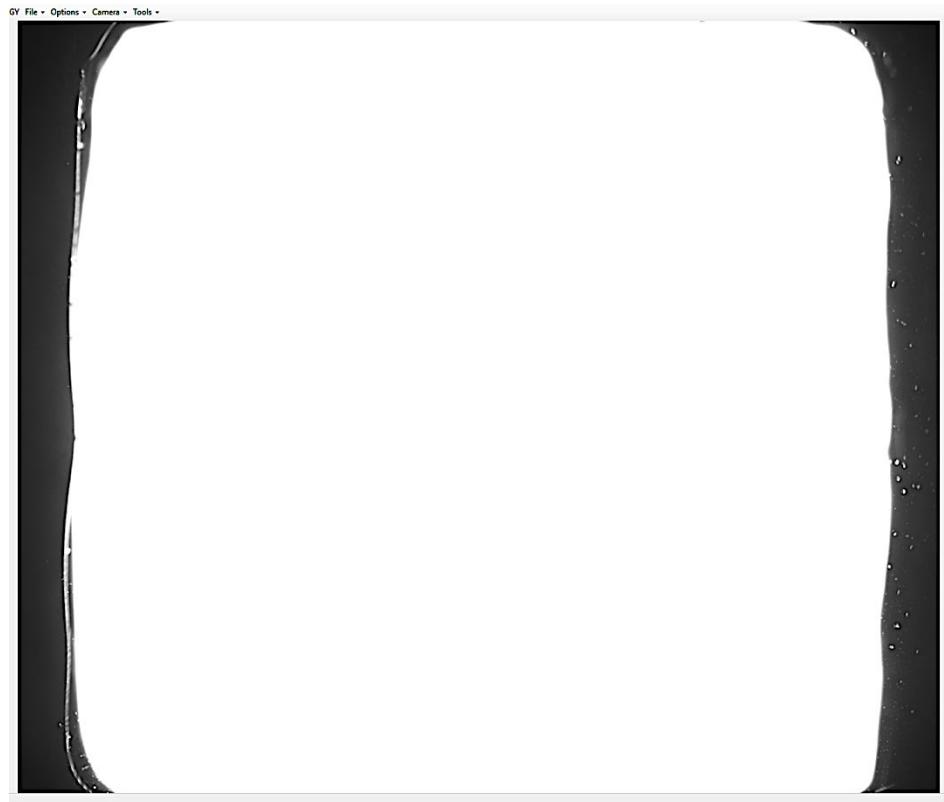


Figura 11

10.3 Parte Laterale a destra

In particolare, i riferimenti di interfaccia (fig. 12) per le funzioni di gestione dello strumento sono le seguenti:

- ① Visualizzazione del nome del vetrino.
- ② Pulsante di STOP (emergenza) e pulsante OPEN/CLOSE per il vetrino.
- ③ Mini-mappa del vetrino, suddivisa in 12 o 48 pozzi (in questo caso 12). Cliccando su ogni quadrato l'immagine si sposta alle coordinate XY corrispondenti. Cliccando sul quadratino più a sinistra è possibile inserire il nome del vetrino che comparirà in alto (①). Sul desktop verrà creata automaticamente una directory con il nome del vetrino per il salvataggio automatico delle immagini.
- ④ Pre-selezione della mini-mappa vetrino da 12 o 48 pazienti (in questo caso 12)
- ⑤ Selezione obiettivi.
- ⑥ Pulsanti per accensione e spegnimento luce LED e LASER. Barre per la regolazione dei livelli di intensità delle rispettive sorgenti.
- ⑦ Pulsanti per movimentazione del vetrino negli assi XY e dell'obiettivo in asse Z (fuoco) con barre di incremento. È possibile operare sulla messa a fuoco in Z anche grazie alla rotella posta tra i due tasti del mouse. È possibile movimentare in XY anche utilizzando gli shortcut da tastiera (tasti AWSD).
- ⑧ Pad per la regolazione dell'inclinazione del laser attraverso la rotella del mouse. Barra per incremento.
- ⑨ Funzioni per la cattura dell'immagine, la registrazione di un video e l'autofocus
- ⑩ Zoom digitale su immagine fissa (lente) o su immagine mobile (ROI pixel)
- ⑪ Griglie predefinite per microarray, colori.
- ⑫ Analisi di immagine

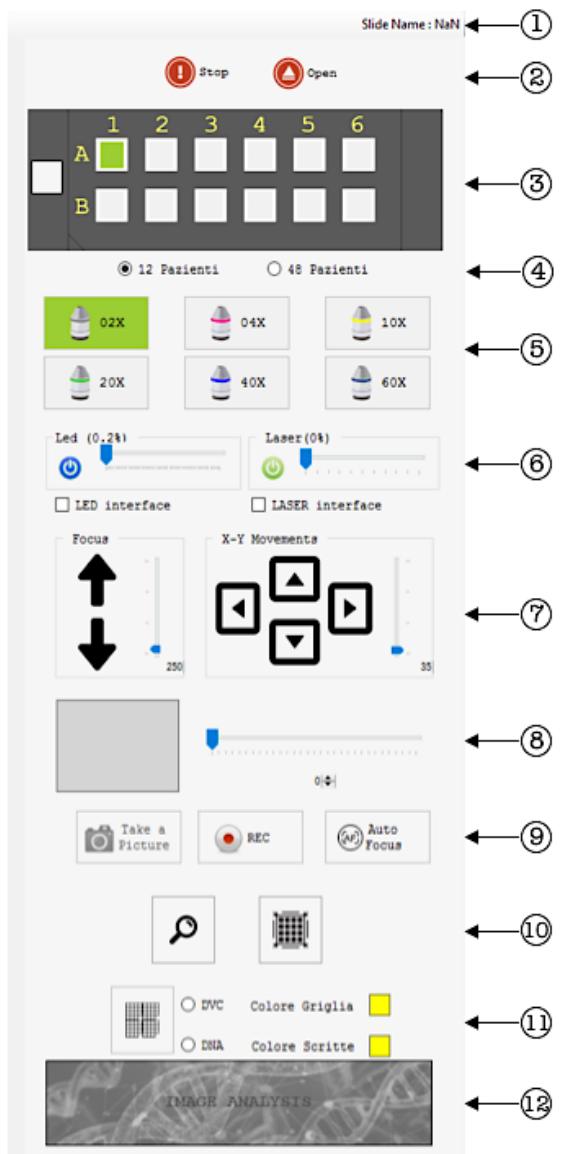


Figura 12

11. PREPARAZIONE DEL VETRINO PER IL NED-VD

NED-VD è un microscopio laser, lettore di nanoparticelle, pertanto richiede l'utilizzo di un vetrino copri-oggetto ("coverslip") di 0,17 mm di spessore per un'analisi ottimale del campione sotto esame sfruttando l'onda evanescente.

Lo standard di vetrino copri-oggetto utilizzato ha dimensioni di 24 x 60 mm e uno spessore di $0,17 \pm 0,02$ mm.

La visualizzazione del vetrino copri-oggetto in esame è subordinata all'ausilio di un "supporto adattatore" fornito da NTP che permette il posizionamento del vetrino copri-oggetto in una cornice di dimensioni 25x76x1 mm.

Il vetrino copri-oggetto è posizionabile in due modi in funzione del "supporto adattatore" fornito:

- 1) centrato in XY rispetto al supporto nero n°1 e successivamente fissato utilizzando due pezzi di nastro adesivo ai lati non sovrapposti ai pozzetti di reazione (fig. 13).

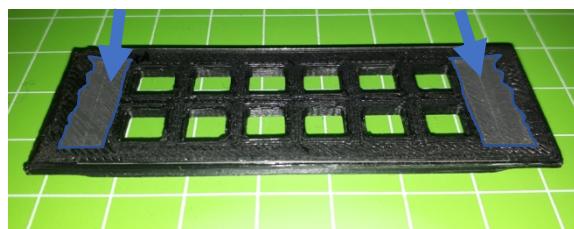


Figura 13

- 2) inserito per scorrimento nel supporto nero n°2, dotato di un apposito alloggio, prestando attenzione a non rompere il vetrino copri-oggetto (fig. 14).

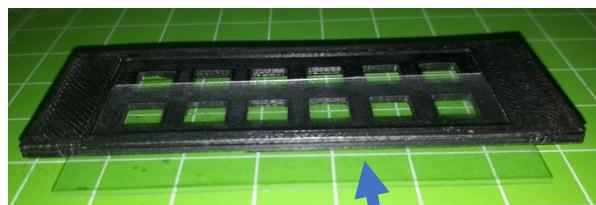


Figura 14

12. CARICAMENTO VETRINO NEL NED-VD

Per caricare i vetrini nel NED-VD l'operatore dovrà per prima cosa aprire lo sportello porta-vetrino cliccando sul software il tasto "Open" (tasto ② fig.12).

Lo sportello si aprirà all'altezza della scritta "SAMPLE TRAY" esponendo un alloggio per il vetrino (fig.15).

Il vetrino dovrà essere pertanto dotato del "supporto adattatore" descritto in precedenza (vedi paragrafo 11).

Il tasto "Open" si rinominerà in "Close" per effettuare la chiusura dello sportello.



Figura 15



Il vetrino dovrà essere inserito nel suo "supporto adattatore" esponendo il lato su cui è stato depositato il nano-materiale rivolta verso l'alto. Questa condizione è essenziale e necessaria per poter utilizzare nel modo corretto gli obiettivi ottici messi a disposizione. Altre condizioni potrebbero essere indicate per applicazioni differenti da quelle descritte in questo manuale.

13. SALVATAGGIO AUTOMATICO DELLE IMMAGINI

Quando l'operatore, cliccando sul quadratino bianco più a sinistra della mini-mappa, digiterà il nome del vetrino (fig. 16) verrà generata sul desktop una cartella con il medesimo nome; automaticamente, all'interno di essa, saranno create delle sottocartelle relative alle file (es. A e B), ciascuna contenenti anche le rispettive sottocartelle in riferimento ai numeri dei pozzetti (es. 1,2,3,4,5,6).

Ogni qualvolta nella mini-mappa verrà selezionato un pozzetto (ad esempio A1), le immagini che successivamente saranno catturate tramite la funzione "Take a Picture", verranno salvate automaticamente nella cartella corrispondente.

Questa procedura permette di accelerare la cattura delle immagini per più pazienti ed evitare errori di archiviazione delle stesse.

Pertanto, **è importante utilizzare sempre la mini-mappa per muoversi tra i vari pozzetti e salvare le immagini corrispondenti.**

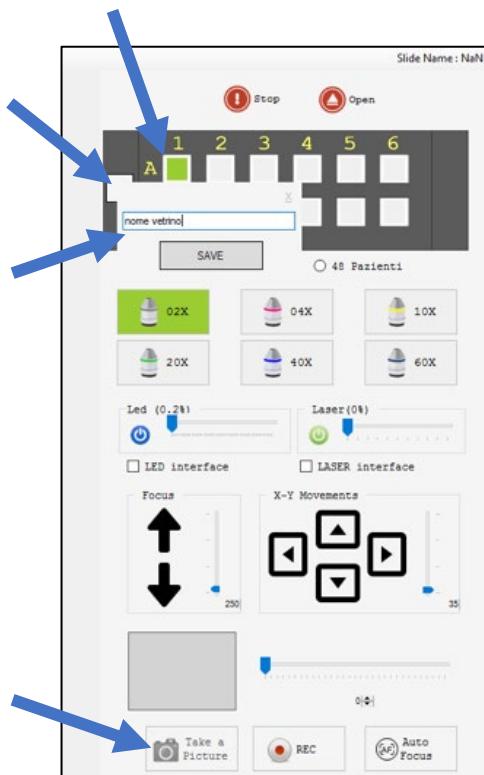


Figura 16

14. SAGGIO D'ESEMPIO E ACQUISIZIONE DI IMMAGINI

14.1 Saggio d'esempio

In fase di preparazione del vetrino copri-oggetto viene stampato sulla sua superficie il bio-recettore utile alla cattura dell'analita in esame (sequenze di DNA o proteine).

La stampa del bio-recettore avviene attraverso la deposizione di una goccia sul vetrino. La goccia può avere volume variabile e generare, una volta asciutta, un anello circolare, chiamato "spot".

Uno o più spot saranno stampati nei vari pozzetti.

In questo saggio d'esempio (fig. 17), viene stampata una soluzione contenente sequenze di DNA da 20 basi nucleotidiche.

Nel pozzetto viene successivamente inserita una soluzione di nanoparticelle d'oro che fungono da marcatori di reazione opportunamente funzionalizzate con sequenze di DNA da 20 basi nucleotidiche complementari a quelle stampate precedentemente su vetrino su vetrino (fig.17 in blu).

Il risultato della reazione sarà uno spot interamente ricoperto di nanoparticelle.

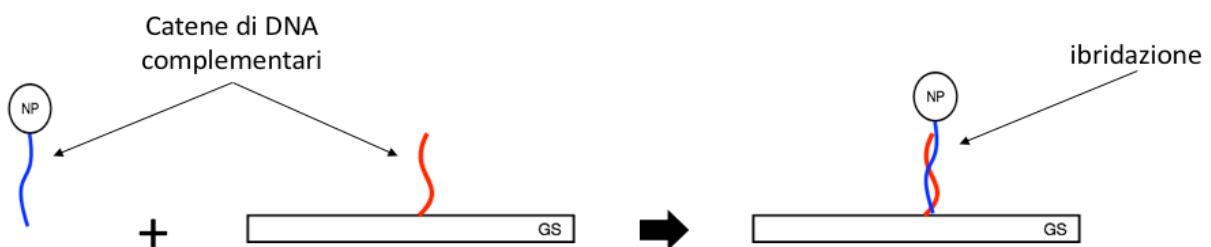


Figura 17

14.2 Acquisizione delle immagini

In questo paragrafo viene descritto il processo di acquisizione di immagini a diverso ingrandimento di uno spot con dimensioni di circa 2 mm (fig. 18).

Questa prima immagine, ottenuta utilizzando un obiettivo 2x, mostra come l'utilizzo contemporaneo del LED in trasmissione, è adatto per osservare il pozzetto quadrato in cui è stata effettuata la reazione, mentre invece l'onda evanescente generata dal laser mostra l'attracco delle nanoparticelle in corrispondenza dello spot dove è stata stampata la sequenza di DNA.

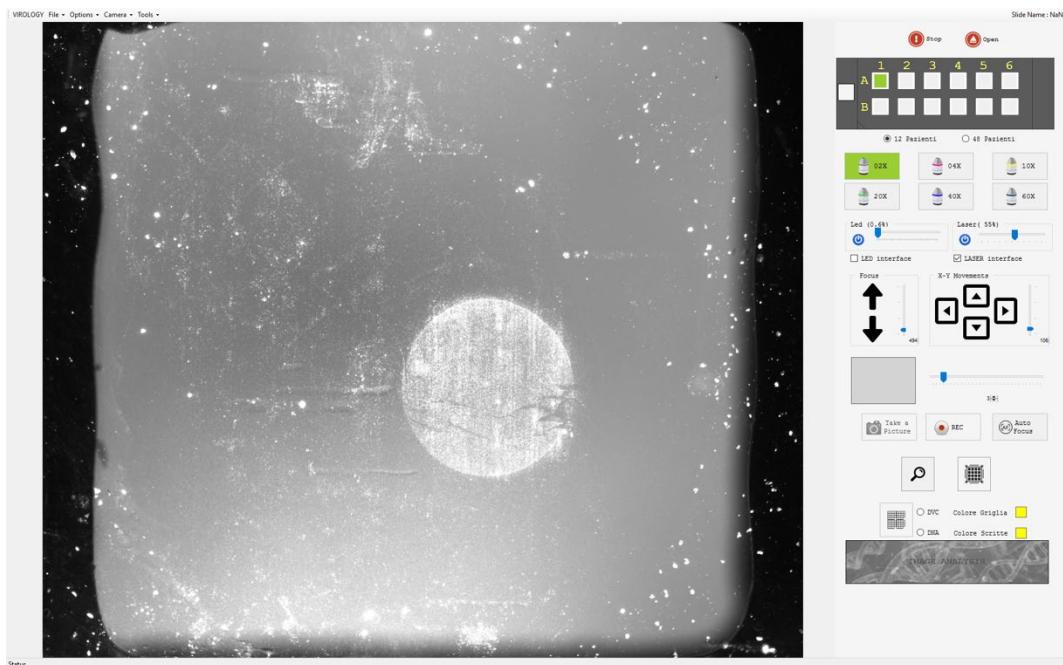


Figura 18

L'area dello spot è interamente ricoperta di nanoparticelle che hanno ibridato con le sequenze stampate all'interno del pozzetto.

Lo spegnimento della luce LED permette una visione completa dello spot circolare in una immagine in bianco e nero ben contrastata (fig.19).

In questa fase è conveniente ottimizzare l'effetto di onda evanescente generato dalla riflessione interna totale del fascio laser nel vetrino per ottenere un elevato rapporto segnale/rumore.

A tal fine è possibile, tramite il pad (tasto ⑧ in fig. 12) regolare l'inclinazione del fascio in modo che questo colpisca il bordo del vetrino generando così un segnale dello spot massimale, ovvero più bianco possibile, a fronte di un background minimo, ovvero il più nero possibile (vedi paragrafo 14.3).

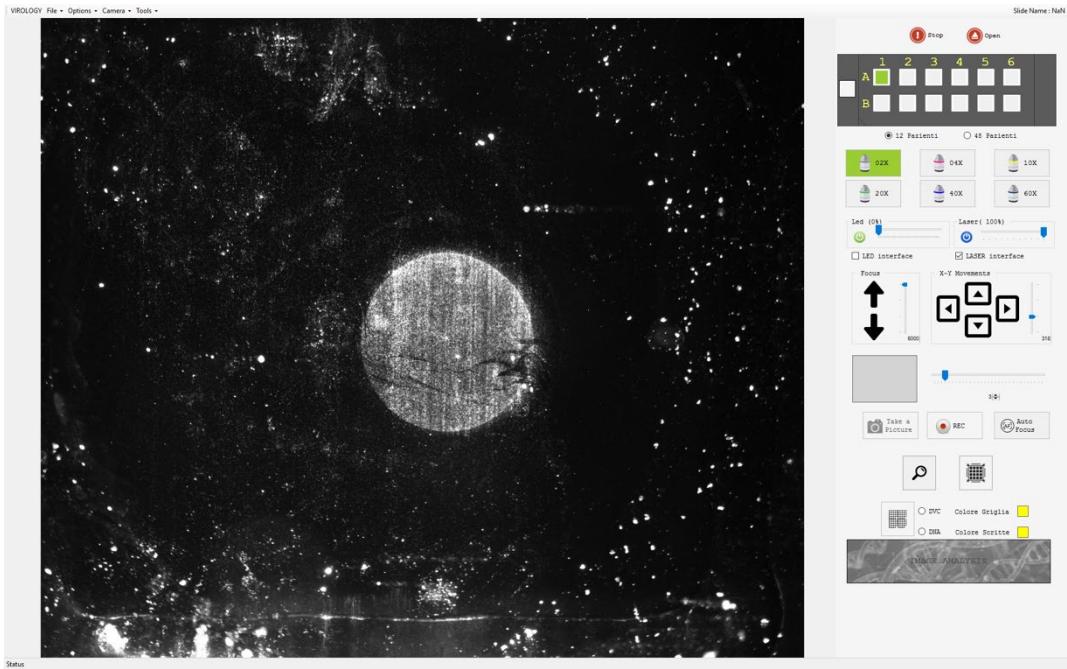


Figura 19

Cliccando sull'obiettivo 4X è possibile aumentare l'ingrandimento, consentendo un'osservazione più dettagliata (fig. 20). Durante il cambio di obiettivo si udirà una movimentazione interna allo strumento NED-VD tipica della rotazione della ruota obiettivi. Eseguito il cambio di obiettivo, è possibile che l'immagine non sia perfettamente a fuoco per cui basterà operare posizionando il cursore del mouse all'interno dell'immagine stessa e con la rotella del mouse ripristinare il fuoco stesso (vedi movimentazione in asse Z, fig. 12).

La stessa operazione può esser eseguita in modo automatico cliccando su autofocus selezionando l'area che si vuole mettere a fuoco.

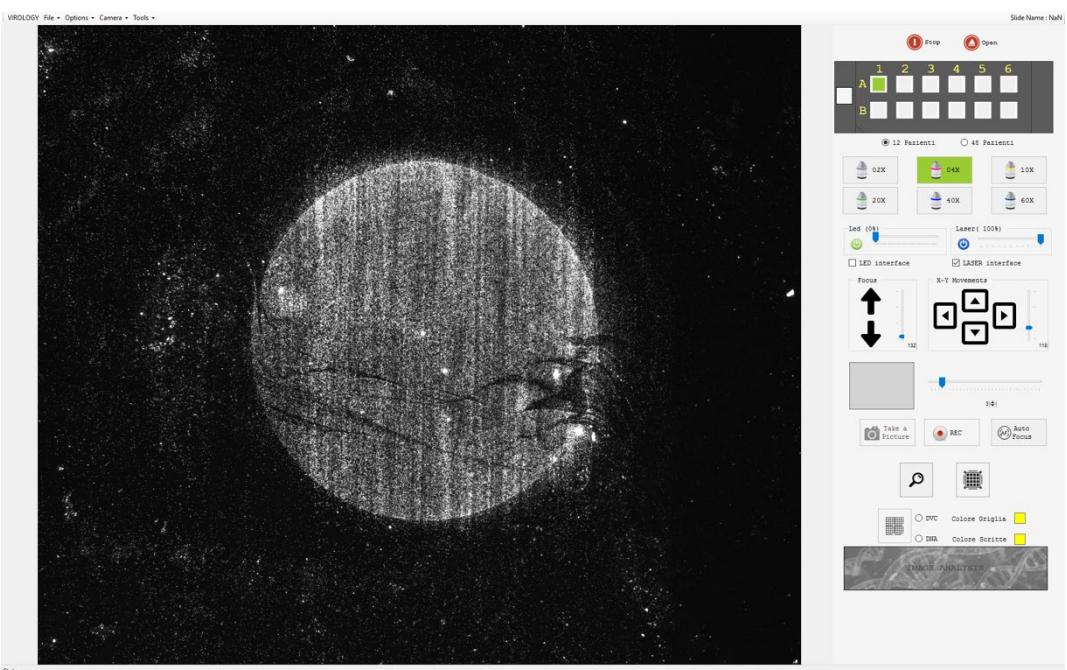


Figura 20

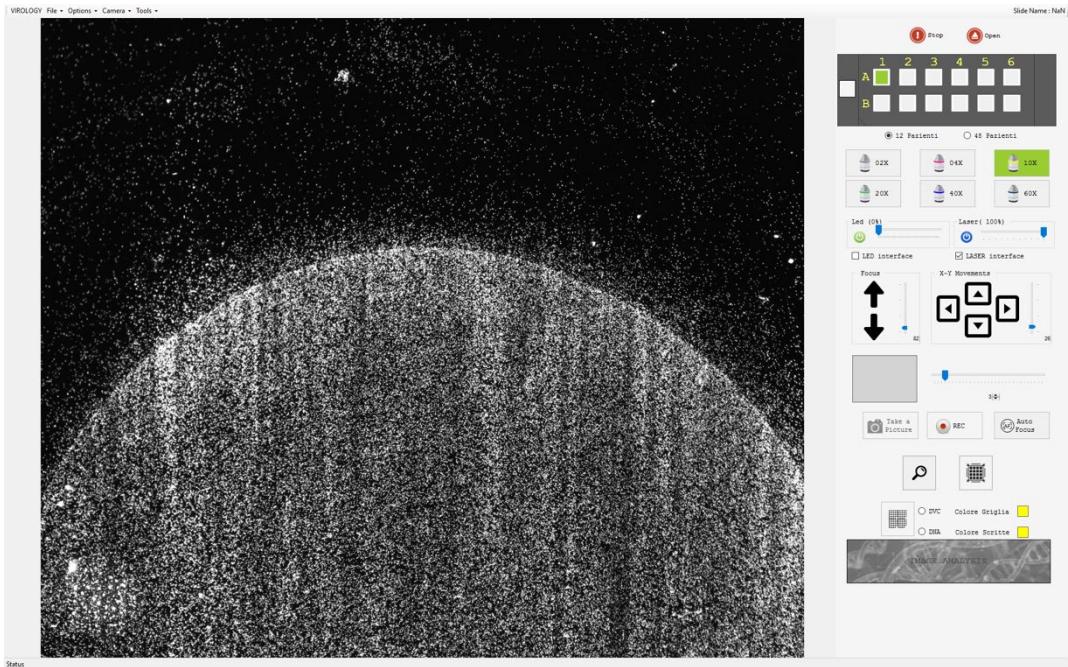


Figura 21

Selezionando l'icona 10X è possibile aumentare l'ingrandimento di 10 volte rispetto all'immagine originale: in questo caso comincia a essere evidente la natura puntiforme dello spot (fig. 21), dovuta alla presenza delle nanoparticelle d'oro da 100 nm.



Figura 22

Cliccando sull'obiettivo 40X l'ingrandimento aumenta consentendo una migliore separazione tra le nanoparticelle che costituiscono lo spot. A questo livello è possibile effettuare un vero e proprio conteggio del numero di nanoparticelle presenti sullo spot attraverso il software "NP counter" (vedi paragrafo 16). Tale numero fornisce una stima quantitativa del numero di nanoparticelle presenti nell'immagine in unità/mm². Trattandosi di immagini ad alto ingrandimento, è possibile che l'immagine non sia perfettamente a fuoco per cui basterà operare con la rotella del mouse per ripristinare il fuoco stesso (vedi movimentazione in asse Z, fig. 12).

14.3 Suggerimenti per la cattura delle immagini

La corretta visualizzazione di uno spot dipende molto dall'allineamento del fascio laser. È pertanto necessario prendere dimestichezza con il pad (fig.12) per l'allineamento del fascio.

Infatti, è possibile che una volta inserito il vetrino e acceso il fascio laser, l'immagine risulti buia, come se non fosse illuminata.

Questo significa che l'allineamento del fascio laser non sta adeguatamente colpendo il bordo del vetrino. Per ovviare a questa problematica basta selezionare, a fianco al pad (fig. 23), un valore intermedio (ad es. 10) e posizionarsi sul pad muovendo su e giù la rotella del mouse per muovere l'angolazione del laser avanti o indietro.

- **Se il cursore del mouse è sull'interfaccia immagine il movimento della rotella del mouse muoverà l'asse Z (il fuoco). Se invece il cursore del mouse è posizionato sul pad muoverà l'angolazione del laser.**

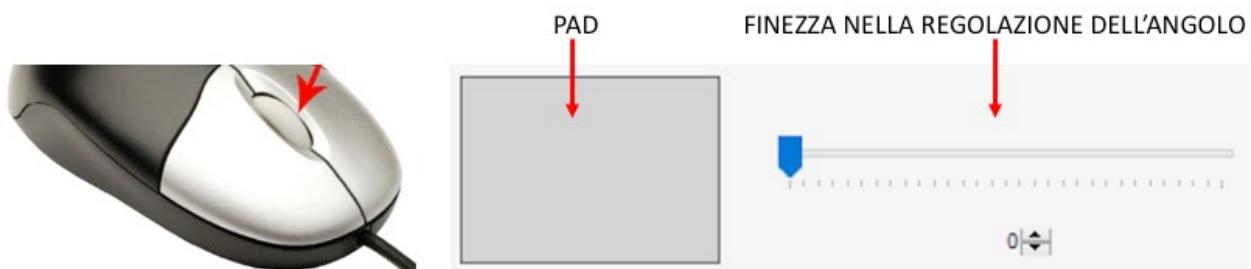


Figura 23

La funzione AUTOFOCUS, permette di selezionare una piccola area in base alla quale il sistema eseguirà una serie di operazioni della durata di qualche secondo.

Alla fine delle operazioni la macchina eseguirà un suono (un bip) atto a definire la fine di queste operazioni e il raggiungimento del fuoco dell'immagine.

Potrebbe verificarsi che alla fine del processo di autofocus, l'immagine non sia ancora a fuoco per motivi differenti quali: presenza di materiale diffusivo residuo di reazione (ad es. sali, cristalli) nella parte esterna del vetrino o nelle vicinanze dello spot e/o nell' area selezionata per l'autofocus, oppure per non uniformità di illuminazione (vedi quadrati rossi in figura 24).

Per evitare questo inconveniente è necessario selezionare un'area per l'autofocus che sia il più pulita e omogenea possibile (vedi quadrati gialli in figura 24).

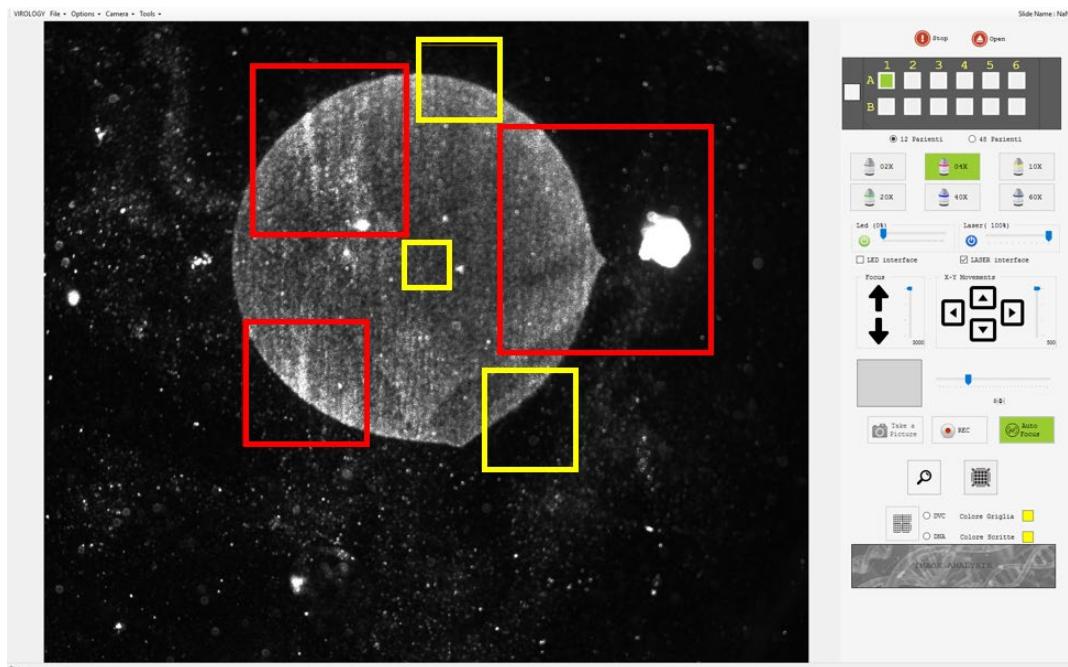


Figura 24

15. CALCOLO D'INTENSITÀ CON "IMAGE ANALYZER"

Per calcolare l'intensità di segnale di uno spot presente in un'immagine precedentemente acquisita dall'utente con il NED-VD si potrà utilizzare il software "Image Analyzer" (fig. 25).

In questa sezione sono riportati tutti i passi necessari per eseguire correttamente l'analisi.



Aprire il software **Image Analyzer** facendo doppio clic sull'icona

Figura 25

Dopo aver avviato il software apparirà la seguente schermata (fig. 26) dalla quale si potranno selezionare le diverse operazioni da eseguire sulle immagini:

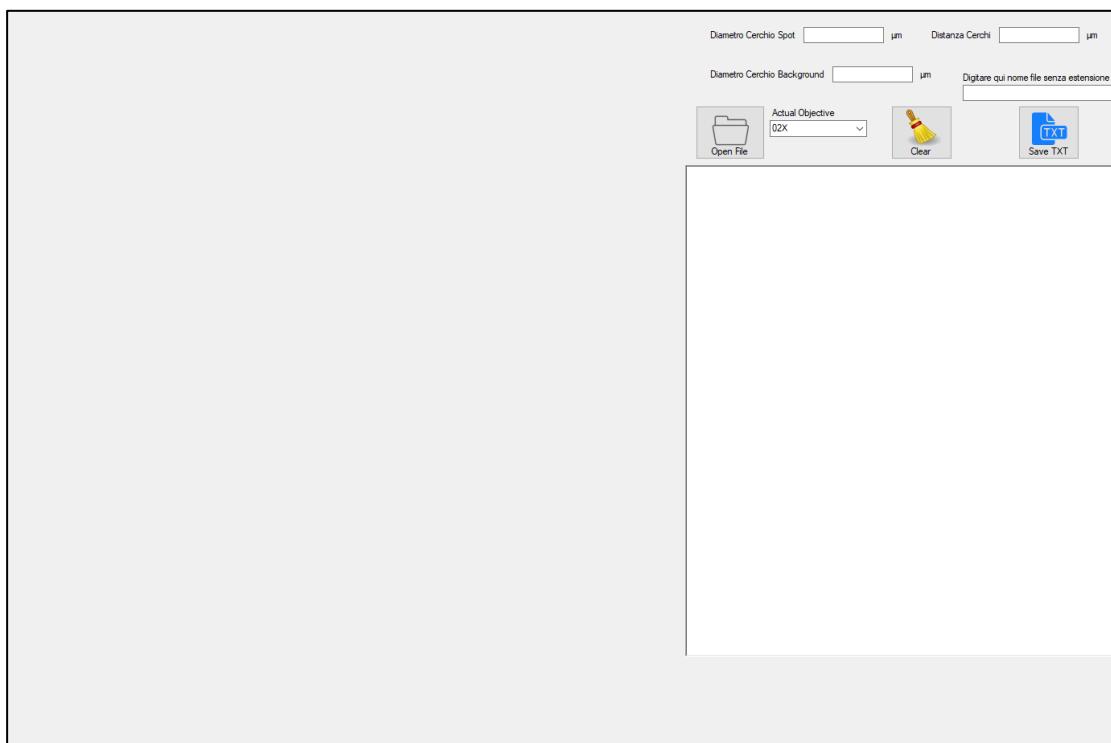


Figura 26

Cliccando sull' icona **Open file** (fig. 27) si potrà selezionare la cartella contenente le immagini da analizzare, precedentemente acquisite mediante il software di controllo del NED-VD.

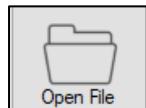


Figura 27

Il software fornisce un'anteprima delle immagini contenute all'interno della cartella, utilizzando la barra di scorrimento si potrà selezionare l'immagine su cui lavorare (fig. 28).

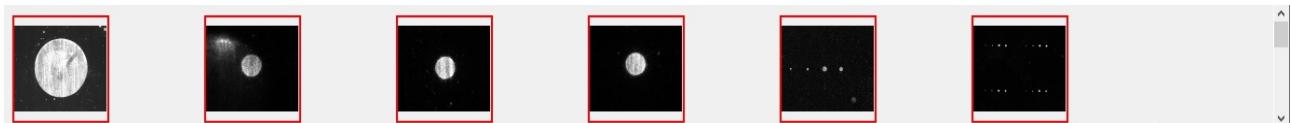


Figura 28

L'immagine selezionata per l'analisi viene evidenziata da una cornice gialla (fig. 29); successivamente l'utente potrà visualizzarla nella schermata iniziale del software.



Figura 29

Scelta l'immagine, si seleziona l'obiettivo con il quale è stata acquisita dall'apposito menù a tendina denominato *Actual Objective* (fig. 30).

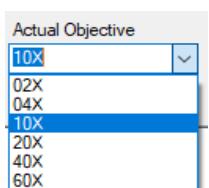


Figura 30

Per misurare l'intensità di segnale il software definisce otto aree circostanti il punto selezionato e calcola l'intensità media all'interno di ciascuna.

L'output fornito dal software corrisponde alla differenza tra il valore medio calcolato nello spot e l'intensità di background.

Prima di iniziare l'analisi è possibile (fig. 31) definire la dimensione del diametro del cerchio dello spot all'interno del quale si vuole calcolare l'intensità, il diametro del cerchio del background e la distanza tra i vari cerchi inserendo i valori scelti dall'utente negli appositi campi di inserimento.

Figura 31

Il calcolo dell'intensità dello spot (fig. 32) si ottiene cliccando con il tasto destro del mouse nel punto in cui si vuole analizzare l'immagine; è possibile spostare e ridefinire il punto selezionato utilizzando il tasto sinistro del mouse.

I punti selezionati dall'utente sono numerati in rosso e i risultati sono riportati nella schermata a destra dell'immagine (fig. 32).

Il software restituirà la seguente schermata:

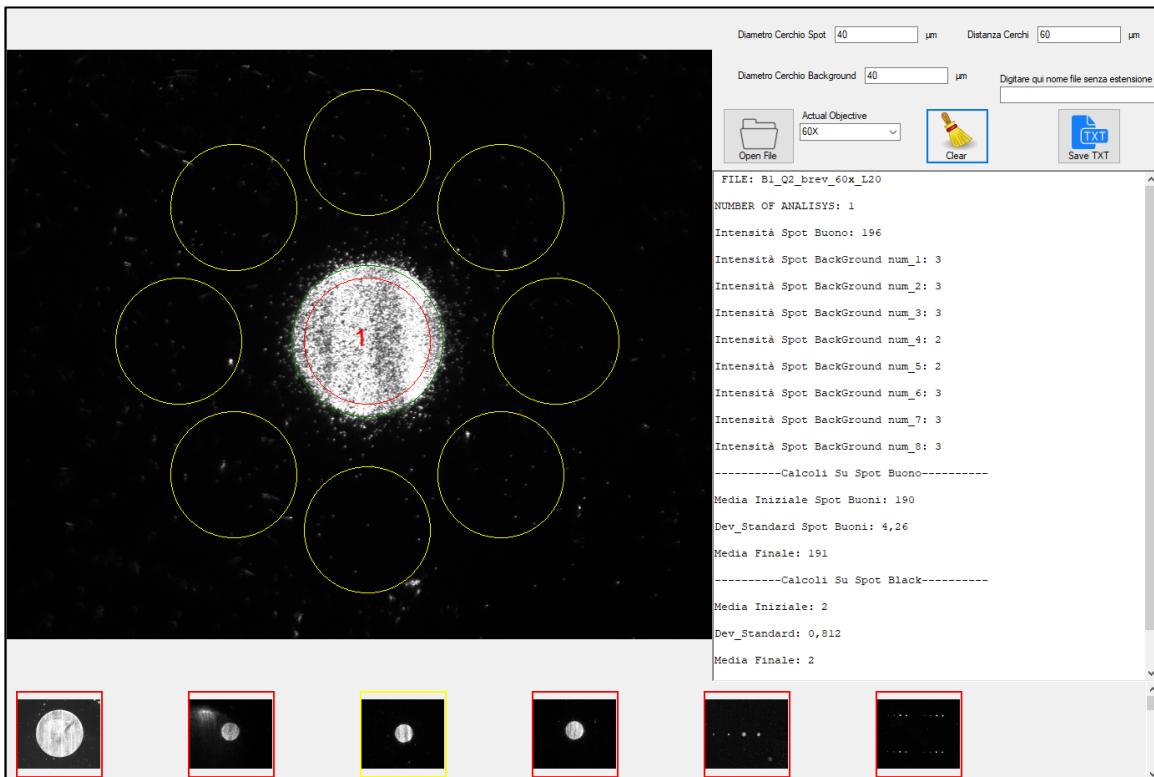


Figura 32

La figura numero 32 rappresenta un esempio di analisi di immagine: nella text box è riportato in alto il nome del file che si sta analizzando; i punti analizzati elencati in ordine numerico (*number of analysis: 1*); le intensità di segnale su ogni spot; il calcolo della media finale e la deviazione standard per i vari punti analizzati.

È possibile eliminare i calcoli appena effettuati selezionando l'icona *Clear* (fig. 33).



Figura 33

L'analisi può essere salvata digitando il nome con il quale si vuole denominare il file nell'apposita casella di inserimento ("Digitare qui nome file senza estensione") e cliccando sull'icona *Save Txt* (fig. 34). I file relativi all'analisi saranno salvati direttamente nella cartella contenente il software (desktop).



Figura 34

Prima di passare alla successiva analisi il software restituisce un messaggio di avviso per l'utente (fig. 35) per ricordare che in caso di mancato salvataggio i dati calcolati andranno persi. Selezionando "Si" l'utente potrà procedere con l'analisi dell'immagine successiva, cliccando sul tasto "No" invece potrà continuare ad utilizzare la sessione corrente.

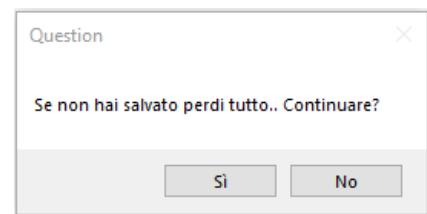


Figura 35

16. CONTEGGIO DELLE NANOPARTICELLE CON “NP COUNTER”

- ➔ In questo paragrafo useremo il termine “nanoparticelle” per indicare in generale gli elementi puntiformi presenti all’interno dell’immagine da analizzare; in generale il software può essere utilizzato per contare altre tipologie di elementi puntiformi con dimensioni inferiori o confrontabili con il limite di diffrazione dello strumento (altri bio-marcatori, virioni, ecc.).
- ➔ Il software *NP Counter.exe* è contenuto di default nella cartella *NP counter*. La cartella contenente il software può essere spostata in qualunque posizione all’interno dell’hard-disk ma deve necessariamente contenere i file *AForge.dll*, *AForge.Imaging.dll*, *AForge.Math.dll*, necessari per il suo funzionamento. Sia il software che la cartella possono essere rinominati a piacere.

Aprire il software (fig. 36) **NP Counter** cliccando sull’icona:



Figura 36

La schermata principale del software è suddivisa in tre aree distinte (fig. 37).

- Immagine: area dove viene visualizzata l’immagine da analizzare.
- Comandi: area dove sono indicate le operazioni che possono essere svolte dall’utente.
- Output: area dove vengono mostrati gli output generati dall’utilizzo del software.

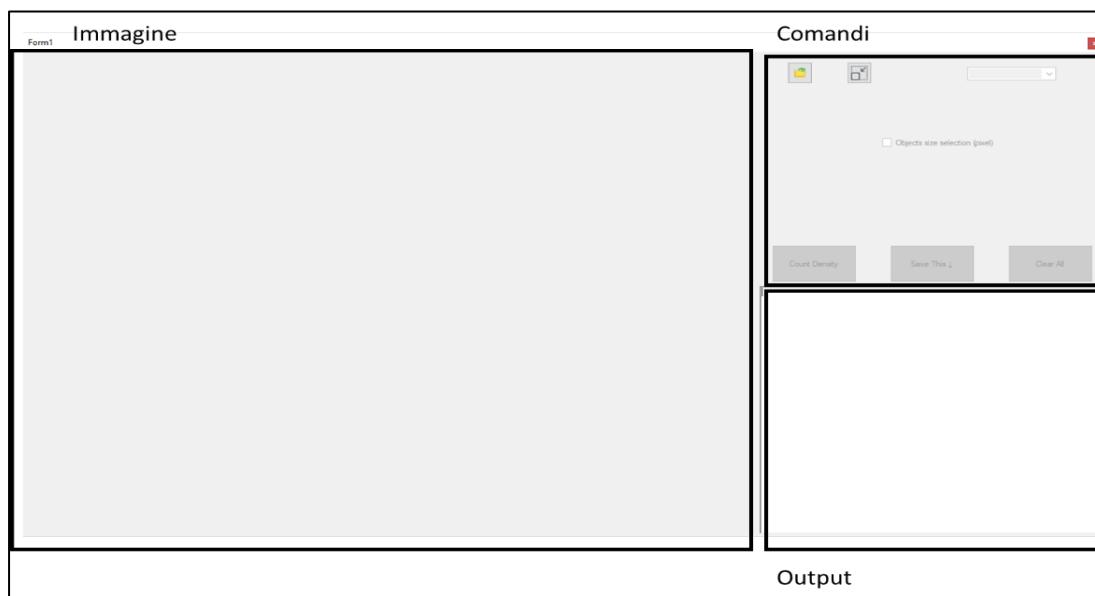


Figura 37

La lista dei comandi (fig. 38):

1. Comando di selezione immagine
2. Comando di selezione area
3. Menu a tendina per la selezione dell'obiettivo
4. Comando di selezione dell'intervallo di dimensioni
5. Comando per il conteggio del numero di nanoparticelle
6. Comando di salvataggio della finestra di output
7. Comando di pulizia della finestra di output

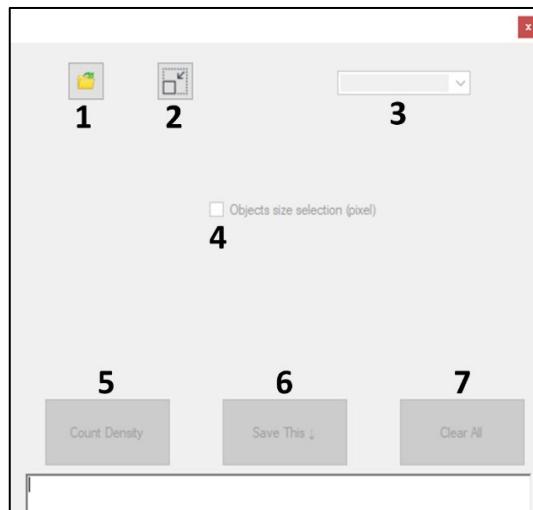


Figura 38

Nel seguito sono indicate in sequenza le operazioni principali per il conteggio delle nanoparticelle presenti all'interno di un'immagine acquisita con il NED-VD. Selezionare l'immagine da analizzare tramite il comando 1 o trascinando direttamente il file all'interno della finestra del software.

L'immagine selezionata viene mostrata nell'area corrispondente; nell'area output vengono visualizzati i dati relativi al file e alle dimensioni in pixel (fig. 39).



Figura 39

Per un risultato più accurato è necessario che l'intera immagine sia perfettamente a fuoco, mostri una distribuzione uniforme di elementi puntuali, e che non siano presenti elementi di disturbo quali impurezze e/o residui di lavorazione del biochip. Nel caso in cui l'immagine di partenza non soddisfi queste caratteristiche è possibile selezionare un'area specifica cliccando sul comando 2 (fig. 38) e selezionando la regione di interesse (fig. 40). La selezione dell'area è effettuata a partire dal vertice in alto a sinistra.

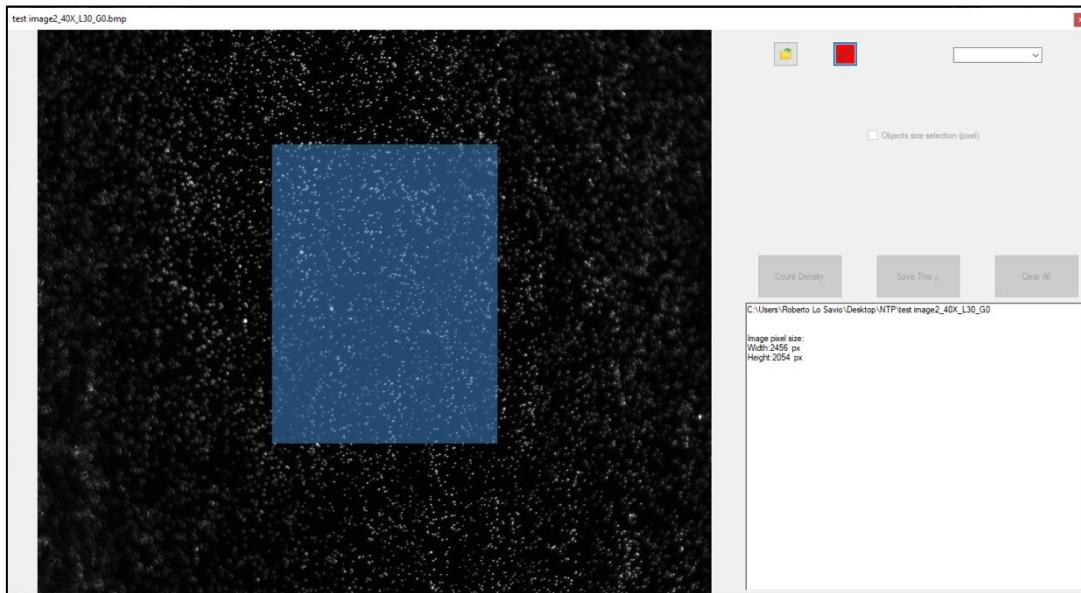


Figura 40

Nella schermata immagine viene mostrata solo l'area selezionata; contestualmente viene creato un file nella stessa cartella dell'immagine originale, automaticamente rinominato “*nome file_cut*”. Selezionare l'obiettivo utilizzato per l'acquisizione dell'immagine tramite il comando 3 (vedi nome del file). Dopo aver selezionato l'obiettivo, nella finestra di output compaiono le informazioni relative alle dimensioni reali dell'area mostrata nell'immagine (fig. 41).

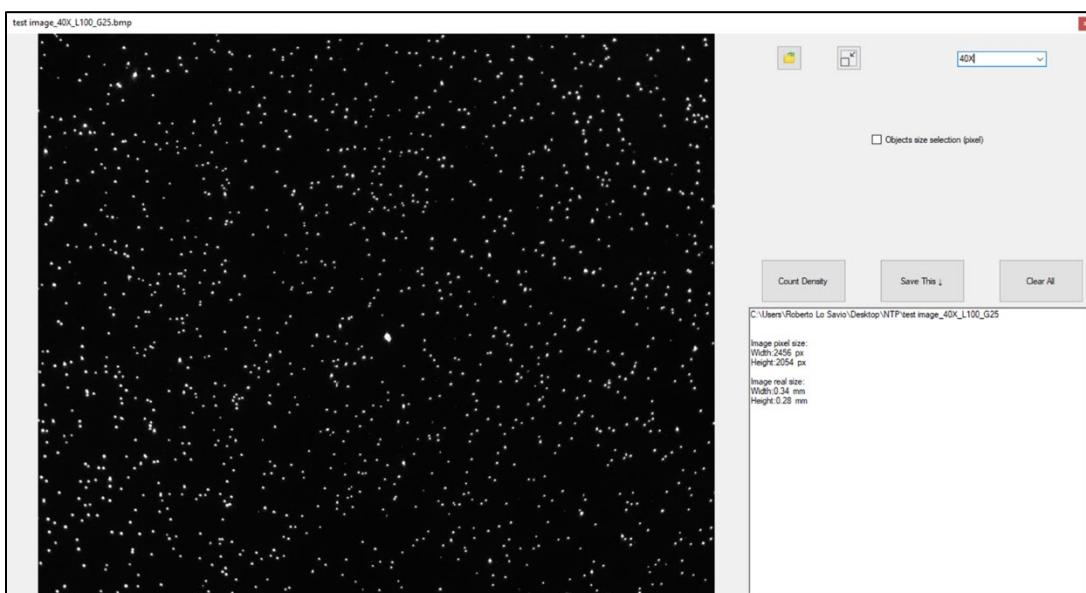


Figura 41

Per ottenere l'informazione relativa al numero e alla densità degli elementi cliccare sul comando 4 (*Count Density*). Nella finestra di output compaiono i dati relativi al numero di elementi presenti nell'immagine (Counts: xxxx NP) e alla corrispondente densità reale, espressa in unità per mm² (Density: xxxx NP/mm²) (fig. 42).

Il numero di nanoparticelle riportato nella finestra di output non corrisponde necessariamente al numero di elementi visibili nell'immagine: il software contiene infatti un algoritmo che tiene conto di eventuali sovrapposizioni di elementi troppo vicini tra loro. Il valore di output ha un errore massimo del 10% nel caso in cui si utilizzino immagini con ingrandimento di 10x e 40x, e del 20% nei rimanenti casi.

L'errore nella stima della densità cresce nei seguenti casi: a) densità di nanoparticelle troppo alta, b) immagine non perfettamente a fuoco, c) presenza di impurezze, d) disomogeneità spaziale nella distribuzione delle nanoparticelle.

Nel caso in cui la densità di nanoparticelle sia troppo alta non è possibile determinarne il numero in maniera precisa; in questo caso compare un messaggio di errore ("This image cannot be processed; nanoparticle density is too high").

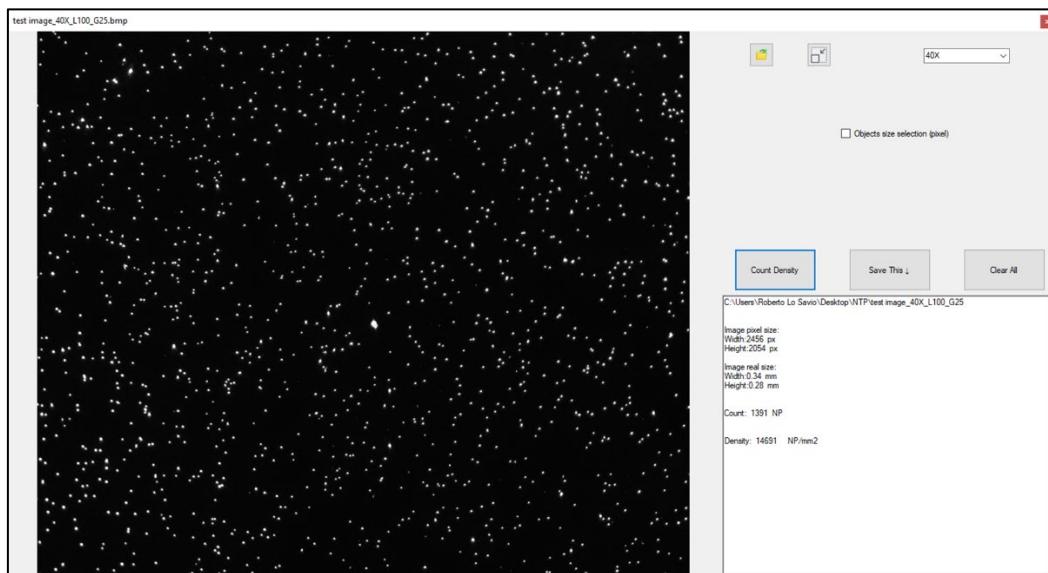


Figura 42

È possibile salvare il contenuto della finestra di output utilizzando il comando 6 ("Save this ↓"): viene generato automaticamente un file in formato ".Txt" nella cartella di origine dell'immagine.

In alternativa è possibile cancellare la finestra di output tramite il comando 7 ("Clear all").

17. PARAMETRI MOBILI

In funzione dell'ingrandimento adottato, del tipo di analisi che si vuole effettuare, e del tipo di nanomateriale sotto analisi, è possibile modificare tramite le barre ad incremento i parametri relativi a:

- Intensità LED (fig. 12 tasto ⑥)
- Intensità LASER (fig. 12 tasto ⑥)
- Inclinazione LASER (fig. 12 tasto ⑧)
- Velocità di spostamento asse X e Y (fig. 12 tasto ⑦)
- Velocità di movimento asse Z per messa a fuoco (fig. 12 tasto ⑦)
- Tempo di esposizione: barra funzioni>>camera>>Set_P (fig. 10)
- Velocità di frame: barra funzioni>>camera>>Set_P (fig. 10)
- Guadagno: barra funzioni>>camera>>Set_P (fig. 10)

Per una migliore fruizione dello strumento sono stati preimpostati alcuni livelli delle barre incremento in modo da rendere lo strumento più fruibile (ad esempio movimenti XY e Z più fini ad alto ingrandimento, oppure intensità del LED più bassa a basso ingrandimento ecc.).

In qualità di amministratore è comunque sempre possibile impostare altri parametri più convenienti in funzione del campione da visionare.

- **Ogni dispositivo è stato sottoposto ad una serie di test da cui derivano i settaggi di fabbrica che sono ottimizzati per ogni singola macchina in funzione dell'applicazione o uso relativo. È pertanto necessario essere amministratori dello strumento per modificare tali parametri per un uso differente da quello del presente manuale. I parametri di fabbrica sono infatti modificabili solo dal profilo Administrator ed è possibile accedervi solo tramite esso.**
- **Alcune impostazioni definiscono le modalità di utilizzo del sistema che non potranno essere modificate dagli utenti USER. Si consiglia di definire e concordare in anticipo quali funzioni attivare rispetto al processo di gestione preferito.**

18. BARRA DELLE FUNZIONI E LINGUA

È possibile, previa accordi con l'azienda proponente, scegliere tra diverse lingue:

Italiano

Inglese

Tedesco

Francese

Spagnolo

In generale è richiedibile da parte del cliente qualsiasi altra lingua di cui si abbia necessità, nei limiti del possibile.

19. ESPORTAZIONE DEI DATI PER LA REFERTAZIONE

Tutte le misure realizzate in una sessione (vetrino) potranno poi esser raggruppate in un singolo schema (fig. 43) che suddivide le tipologie di misura e indica i dati relativi alle singole misure: coordinata dello spot (A1, B2, C1 ecc.), classificazione del biorecettore stampato, diametro/area dello spot in mm², intensità dello spot (0-255), numero di nanoparticelle nello spot in unità/mm², ed infine eventuali altri dati statistici di interesse, tipo standard deviation o altro, previa concordato con l'utente.

SPOT	BIORECETTORE	SPOT			
		DIAMETRO (mm)	AREA (mm ²)	INTENSITA' (0-255)	N° NP (unità/mm ²)
A1	proteina ANTISPIKE	1,96	3,01719264	214	204506
A2	proteina ANTISPIKE	2,07	3,36536046	185	167354
A3	proteina ANTISPIKE	2,03	3,23655486	126	100345
A4	proteina ANTISPIKE	1,98	3,07908216	78	67549
A5	proteina ANTISPIKE	1,99	3,11026254	43	31485
A6	proteina ANTISPIKE	2,05	3,3006435	21	15609
SPOT	BIORECETTORE	SPOT			
		DIAMETRO (mm)	AREA (mm ²)	INTENSITA' (0-255)	N° NP (unità/mm ²)
B1	proteina ACE2	1,13	1,00287726	228	218413
B2	proteina ACE2	1,11	0,96769134	175	149589
B3	proteina ACE2	1,112	0,971181658	146	121457
B4	proteina ACE2	1,12	0,98520576	87	68520
B5	proteina ACE2	1,15	1,0386915	35	27589
B6	proteina ACE2	1,13	1,00287726	12	9521

Figura 43

Il report sarà quindi esportabile in formato ".xcl" e integrabile sul referto medico ospedaliero con i dati del paziente e l'esito della diagnosi effettuata.

20. MESSA A FUOCO, AUTOFOCUS E PREFOCUS

Ogni singolo obiettivo è stato preimpostato sul valore specifico di messa a fuoco nominale.

Al cambio di obiettivo il sistema di messa a fuoco si posiziona automaticamente rispetto al valore caratteristico dell'obiettivo selezionato.

→ **Questa funzione definita "Prefocus" consente di avere un'immagine già in condizioni di fuoco ottimale. Condizioni diverse di campioni, vetrino e copri-oggetto, potrebbero influenzare il funzionamento del Prefocus.**

Dalla posizione di Prefocus è quindi possibile intervenire con la messa a fuoco soggettiva utilizzando la rotella del mouse.

La rotazione in avanti avvicina l'obiettivo al preparato mentre la rotazione all'indietro lo allontana. Il valore per singolo obiettivo di velocità di macro e micrometrica sono impostazioni di fabbrica. Questi valori sono comunque personalizzabili attraverso una barra di incremento posta sulla destra dei tasti.

Alla rotazione dell'obiettivo la barra d'incremento sarà sempre in posizione massima e questo corrisponderà alla velocità massima in asse Z per quello specifico obiettivo. Riducendo il valore della barra si ridurrà anche la velocità stessa in asse Z rendendo più fine la movimentazione.

Questa operazione è particolarmente necessaria per la cattura di immagini a medio-alto ingrandimento (da 20X in su), in cui la profondità di campo è più piccola e non permette la messa a fuoco su più piani contemporaneamente.

Infatti, le dimensioni di nanoparticelle da 100 nm permettono di distinguere l'esatto piano di fuoco, piano in cui la visione delle stesse risulta essere di natura puntiforme, come ad esempio è possibile notare in fig. 22.

Il sistema Autofocus lavora identificando le zone di maggiore contrasto e definisce la posizione di messa a fuoco media sull'area inquadrata in conformità al sistema di rilevazione impostato.

Il sistema Autofocus lavora identificando le zone di maggiore contrasto e definisce la posizione di messa a fuoco media sull'area inquadrata in conformità al sistema di rilevazione impostato.

21. CONFIGURAZIONE DEL SISTEMA

L'utilizzo in questo caso è indipendentemente da una connessione di rete. I sistemi di controllo, tastiera, mouse (joystick opzionale), monitor HD HDMI 24", saranno collegati direttamente al NED-VD.

La configurazione può presentarsi come in fig. 44 (immagine a solo scopo illustrativo).



Figura 44

Il NED-VD è stato progettato anche per il trasferimento delle immagini in tempo reale e per il controllo di tutte le sue funzioni da remoto tramite connessione Internet/Intranet.

La configurazione del sistema in questo caso assume una struttura come quella presentata in fig. 45 (immagine a solo scopo illustrativo).

Nella configurazione rappresentata in fig. 45, il NED-VD oltre alle sue funzioni specifiche di microscopio laser digitale funge come SERVER per la connessione di CLIENT da remoto.

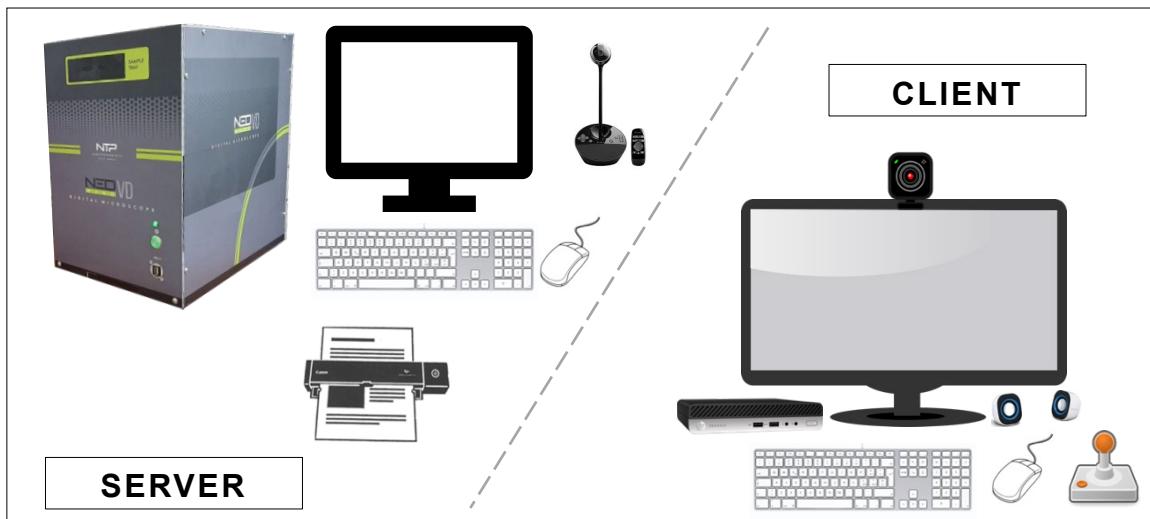


Figura 45

In questo caso una possibile configurazione (Fig. 45) potrebbe comprendere monitor HDMI (anche di tipo HD se richiesto), tastiera e mouse. Webcam e scanner (optional) per la postazione SERVER, mentre per la postazione CLIENT è preferibile usare un monitor HD 24", tastiera e mouse. Webcam, joystick e casse audio optionali. La stazione CLIENT può essere dotata di PC per la connessione alla rete. A scopo informativo in fig. 46 è rappresentato ad esempio un network in cui diversi client accedono ad un NED-VD server via LAN, Intranet, VPN, Internet e condividono i file in un cloud comune e accessibile ai soli operatori.

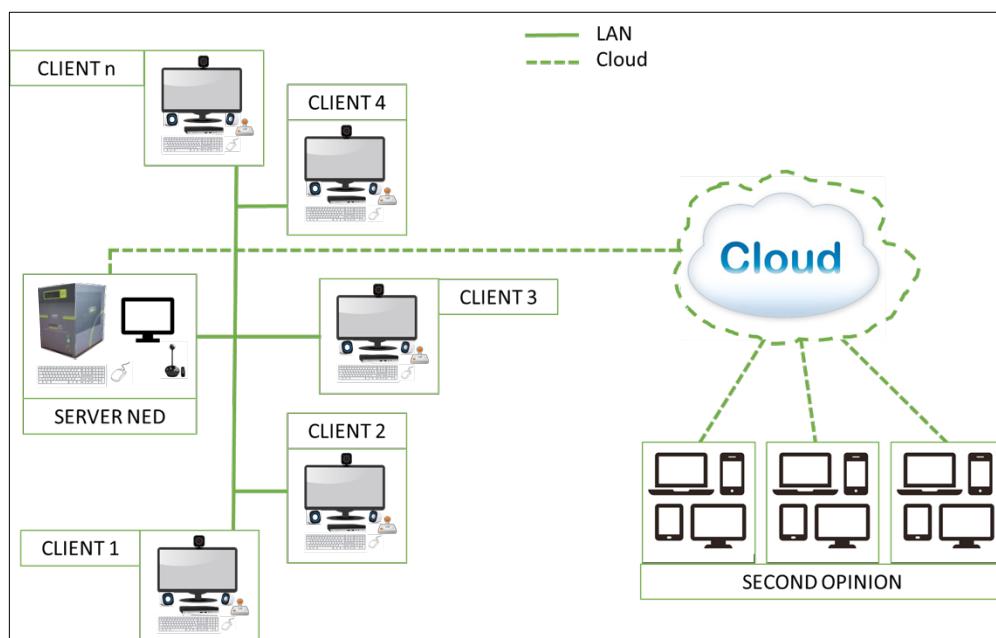


Figura 46

Il numero di CLIENT disponibili è in funzione delle richieste di installazione del sistema.

Tra tutti i CLIENT solo uno potrà assumere la funzione MASTER, mentre gli altri potranno assumere la funzione di VIEWER se abilitati come attività di SECOND OPINION (vedi capitolo dedicato alle funzioni di gestione da remoto).

In questo caso sarà possibile utilizzare oltre a PC anche tablet o smartphone.

Le funzioni tablet e smartphone sono attualmente in fase di sviluppo e non ancora disponibili alla data di rilascio di questo manuale.

→ **Per il miglior funzionamento del sistema è richiesto browser Chrome®**

Analogamente a quanto descritto in fig. 46, è possibile anche avere un numero maggiore di SERVER con uno o più CLIENT (fig. 47).

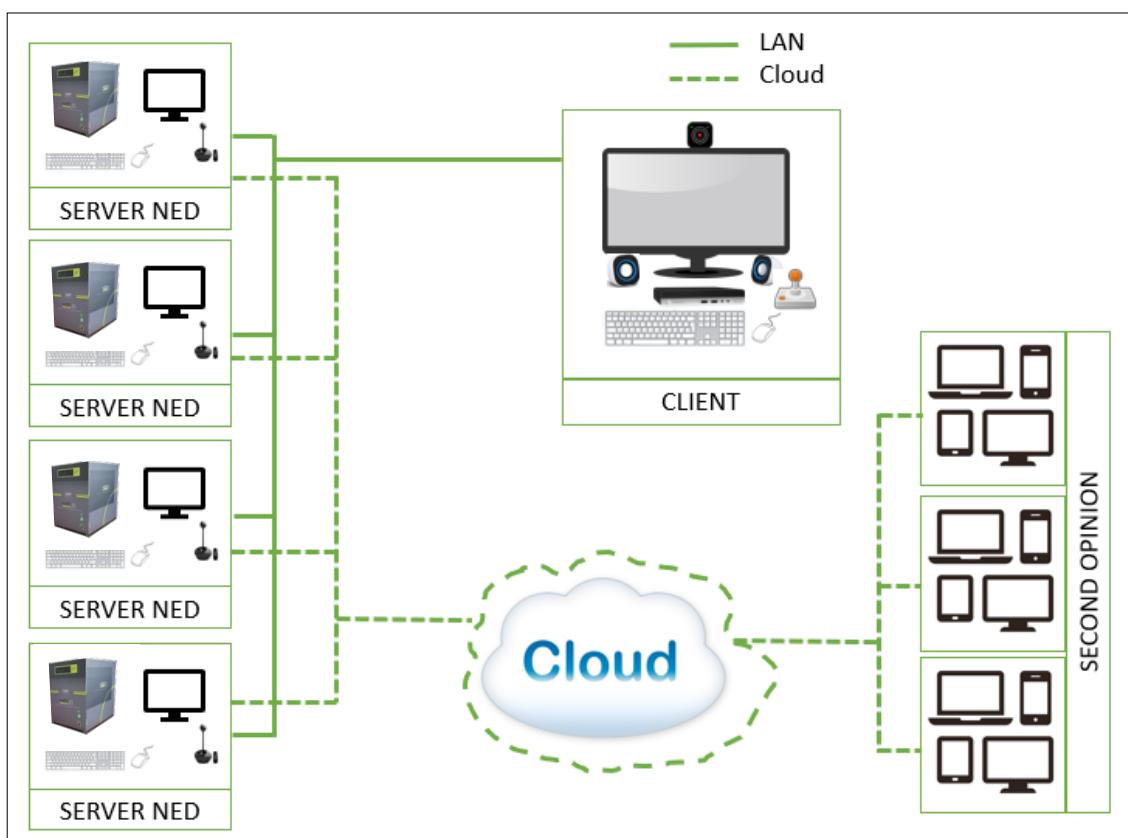


Figura 47

Nella Fig. 47 è rappresentata una possibile rete con NED-VD SERVER superiori ad una unità e uno o più CLIENT. Le caratteristiche si riferiscono a quanto descritto per lo schema di fig. 46.

→ **Le prestazioni del sistema, il trasferimento delle immagini in tempo reale e la movimentazione del NED-VD sono influenzate dalle prestazioni di velocità della rete a cui è collegato il sistema. Analogamente per quanto concerne le prestazioni di tipo mobile. In generale il sistema funziona con un delay inferiore al secondo sotto rete 4G.**

22. CONTROLLO NED-VD CON ACCESSO DA REMOTO

Il NED-VD è progettato per essere collegato ad una rete internet e/o intranet per essere gestito nelle sue movimentazioni e ottenere così delle immagini in real-time osservabili da qualsiasi postazione collegata alla rete come già spiegato nel paragrafo 21.

Le postazioni remote saranno opportunamente predisposte dal personale specializzato e autorizzato per poter accedere al NED-VD che assumerà la funzione di SERVICE e sarà quindi gestito per il caricamento dei vetrini da tecnici di laboratorio opportunamente formati.

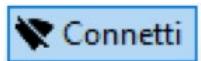
- **Alcune delle funzioni presenti nell'interfaccia utente con collegamento in locale sono disabilitate quando si è collegati da remoto. Altre funzioni si presentano con caratteristiche differenti. Queste lievi differenze sono dovute alle diverse impostazioni che il sistema deve gestire quando è collegato ad un WEB SERVER.**

Nei prossimi capitoli verranno spiegate le funzioni di accesso per gli utenti registrati e le funzioni di gestione del NED-VD.

Quando il NED-VD è connesso in locale prima di poter accedere da remoto si dovrà attivare il software Teamviewer® presente sul desktop e concesso "in free license for non commercial use". Lo stesso software dovrà essere attivato nel PC che controllerà il NED-VD da remoto. In entrambi i casi inserendo l'opportuno partner ID e la password generata per il collegamento, sarà possibile quindi accedere all'utilizzo della macchina da remoto.



Successivamente, in fase pre-commerciale, nello strumento verrà implementata una funzione proprietaria di NTP, per una connessione diretta tramite il tasto sulla barra funzioni "Connetti" posto in alto al centro all'interno del software NED-VD.



- **Dopo aver effettuato questa attivazione tutte le funzioni di movimentazione e di gestione del NED-VD, saranno disponibili solo da remoto (MASTER), ma comunque osservabili dall'utente in locale (VIEWER).**

Dal desktop dell'utente remoto attraverso l'icona di accesso corrispondente, sia essa tramite Teamviewer® o tramite il tasto "Connetti" si potrà accedere ai menu di ingresso per la connessione da remoto.

- **Le procedure si differenziano per le funzioni di MASTER e VIEWER. Il primo oltre a potere disporre del controllo del sistema nelle sue funzioni principali, definirà nella procedura di accesso chi potrà accedere alla sessione di lavoro come VIEWER con la sola possibilità di osservare il campione in funzione delle operazioni scelte ed eseguite dal MASTER.**

23. CURA E MANUTENZIONE



Scollegare l'alimentazione elettrica prima di eseguire qualsiasi tipo di lavoro, di pulizia, di manutenzione o di controllo degli elementi interni di movimentazione. L'apertura dello strumento, i controlli interni, la manutenzione e qualsiasi tipo di lavoro deve essere effettuato solo da personale autorizzato.

23.1 Pulizia

La polvere e le particelle di sporco possono essere rimosse con una spazzola morbida o un panno di cotone privo di lanugine.

Lo sporco aderente può essere pulito con soluzioni acquose e detergenti poco aggressivi. Per la pulizia delle parti rivestite, utilizzare un lino o panno morbido inumidito con una di queste sostanze o anche solventi a base alcolica.

Provare soluzioni detergenti di composizione sconosciuta prima su un'area meno visibile dell'unità.

23.2 Pulizia degli obiettivi

Gli obiettivi e i sistemi ottici che compongono lo strumento devono essere controllati e puliti da personale specializzato e autorizzato. In caso di problemi relativi a sporcizia sugli obiettivi, contattare il personale di assistenza tecnica.

23.3 Manutenzione preventiva

Al fine di garantire un perfetto funzionamento dello strumento nel tempo, si consiglia di fare intervenire personale specializzato per effettuare almeno una manutenzione di tipo preventivo.

A seconda dell'uso del sistema, può essere necessario realizzare le procedure di manutenzione periodica più frequentemente rispetto a quanto consigliato.

23.4 Smaltimento

L'imballo dello strumento composto da cartone e plastiche va smaltito in modo differenziato secondo la normativa in vigore.



Per lo smaltimento dello strumento vanno seguite le normative in merito agli apparati elettrici che sono evidenziati dal simbolo posto anche in etichetta.

23.5 Movimentazione dello strumento

Lo strumento va movimentato solo da personale autorizzato e preventivamente formato.

23.6 Rischio Biologico

Lo strumento, se non viene posizionato all'interno di luoghi di rischio (stanze di biosicurezza a livello 3 o BSL3) non è a rischio biologico come indicato nel documento analisi dei rischi.

Qualora dovesse essere posto in locali BSL3 va trattato secondo le normative di riferimento (ad es. sterilizzazione tramite luce UV) o eventualmente tenuto per un certo periodo di tempo (ad es. un paio di settimane) non a contatto con personale.

24. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

La seguente guida alla risoluzione dei problemi contiene informazioni relative a problemi generali che si possono verificare durante l'uso del dispositivo NED-VD. In determinate condizioni le prestazioni del sistema NED-VD possono essere diminuite da fattori che non sono difetti. Nel caso in cui dovessero verificarsi, fate riferimento alla seguente tabella per rimediare al problema occorso. Se il problema persiste contattare l'assistenza tecnica riferita al vostro contratto di acquisto. In alternativa consultate l'elenco dei distributori autorizzati all'indirizzo www.ntpsrl.biz

Problema	Causa	Rimedio	Pag.
Lo strumento non si accende	L'interruttore generale è su OFF (O) Interruttore su ON (I)	Posizionare l'interruttore su ON (I) Verificare integrità del fusibile	15
Lo strumento è acceso ma il LED di illuminazione è spento	Il valore dell'intensità del LED è a zero	Impostare un valore diverso da zero	22
Il LASER è acceso ma non si vede l'immagine	intensità del LASER è a zero, il laser è disallineato, non è impostato il setting predefinito dei parametri della fotocamera, oppure l'immagine è completamente fuori fuoco.	Allineare il laser Selezionare setting predefinito della telecamera. Mettere a fuoco (asse Z).	30 42
L'immagine live non è omogeneamente a fuoco	Vetrino non inserito correttamente o non perfettamente preparato	Controllare la posizione corretta del vetrino nel suo supporto, verificare l'inserimento nello slot portavetrino	24
Il monitor è acceso ma non si visualizza nulla	Cavo video HDMI non collegato correttamente	Verificare la connessione del cavo HDMI	14
Tastiera e/o mouse non funzionano	Connessione USB non collegata	Verificare le connessioni USB. Controllare le pile	14
Impossibile acquisire immagini	Fotocamera danneggiata	Contattare l'Assistenza Tecnica	
Lo strumento non si collega alla rete dati	Cavo ethernet scollegato	Collegare il cavo ethernet	13
Lo strumento non si collega alla rete dati	Mancanza di segnale	Contattare i responsabili della rete dati	
Lo strumento non è perfettamente stabile	I piedini di appoggio non sono regolati correttamente	Regolare avvitamento dei piedini di appoggio	12 13

Tab.1 Guida alla risoluzione dei problemi

24.1 Sostituzione fusibili



Prima di sostituire il/i fusibile accertarsi che lo strumento sia spento OFF (O) e che il cavo di alimentazione sia scollegato



Figura 48

Utilizzare fusibili tipo T1,25°

Con un cacciavite a taglio aprire lo sportello che contiene i fusibili (fig. 48).

Estrarre il supporto dei fusibili e procedere alla sostituzione (fig. 49).

Reinserire il supporto nella sede e ricollegare il cavo di alimentazione



Figura 49

25. SCELTA DEL CAVO DI ALIMENTAZIONE

Un cavo di alimentazione deve essere certificato da uno degli enti elencati in Fig. 99, comprensivo di cablaggio con il marchio ed essere munito di almeno uno dei marchi di approvazione di un ente autorizzato.

Se nel paese di utilizzo non è reperibile il cavo di alimentazione approvato da uno degli enti indicati, si dovranno utilizzare ricambi approvati da un altro ente equipollente ed autorizzato del paese di utilizzo (fig. 50).

Paese	Ente	Marchio di certificazione	Paese	Ente	Marchio di certificazione
Argentina	IRAM		Irlanda	NSAI	
Australia	SAA		Italia	IMQ	
Austria	ÖVE		Norvegia	NEMKO	
Belgio	CEBEC		Paesi Bassi	KEMA	
Canada	CSA		Regno Unito	ASTA BSI	
Danimarca	DEMKO		Spagna	AEE	
Finlandia	FEI		Svezia	SEMKO	
Francia	UTE		Svizzera	SEV	
Germania	VDE		U.S.A.	UL	
Giappone	JET, JQA, TÜV, UL-APEX / MITI				

Figura 50

26. NOTE SULLA GARANZIA

Per i contratti di assistenza tecnica che possono mantenere il vostro strumento in ottime condizioni per lungo tempo, si prega di chiedere a un rappresentante di NTP Nano Tech Projects srl.

Le disposizioni di garanzia possono variare nel rispetto delle differenti legislazioni nazionali. Maggiori dettagli possono essere trovati nella documentazione di consegna o dal vostro rivenditore o rappresentante. Ulteriori informazioni riguardanti la garanzia sono disponibili a pag. 1.

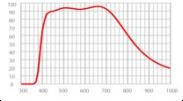
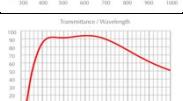
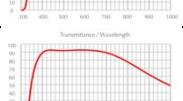
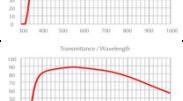
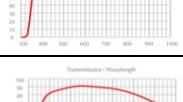
→ **Si prega di notare che la garanzia può essere invalidata se:**

- **Questo strumento è stato modificato in qualsiasi modo.**
- **Sono utilizzati accessori e reagenti che non sono stati approvati dal costruttore.**
- **Se lo strumento non viene utilizzato o sottoposto a manutenzione in conformità con le istruzioni del Manuale Utente.**

27. SPECIFICHE TECNICHE DELLO STRUMENTO

Oggetto	Specifiche tecniche
Sistema ottico	Ottica con correzione all'infinito
Illuminazione	LED Bianco: 18.000 cd/m2 to 35.000 cd/m2; durata media circa 100.000 ore. LASER Verde: classe 3B DIN EN 60825, potenza 48 mW, 520 nm.
Revolver obiettivi	Revolver a sei posizioni
Ingrandimento obiettivi	2X; 4X; 10X; 20X; 40X; 60x.
Alimentazione e fusibili	110-230Vac / 50-60 Hz PWR: 250W - Fusibili 2X T1,25A
Dimensioni e peso	Larghezza 30 cm; Altezza 42 cm; Profondità 42 cm - Peso: 22Kg
Condizioni ambientali di utilizzo per uso interno	Umidità relativa massima 75% per temperature fino a 31°C, decrescenti linearmente a 50% per temperature fino a 40°C. Temperatura ambiente 15 / 40° C. Oscillazione di tensione ±10%

Tab.2 Specifiche Tecniche

Obiettivo	Ingrandimento	AN	WD (mm)	CS	FN (mm)	RIS (nm)	TW
PLAPON	2X	0.08	6.2	0.17	26.5	3965	
UPLFLN	4X	0.13	17	0.17	26.5	2440	
UPLFLN	10X	0.30	10	0.17	26.5	1057	
UPLFLN	20X	0.50	2.1	0.17	26.5	634	
UPLFLN	40X Dry	0.75	0.51	0.17	26.5	423	
UPLFLN	60X Dry	0.90	0.2	0.17	26.5	352	

Tab.3 Specifiche Ottiche

- AN Apertura Numerica è un indice di prestazione. La risoluzione ottica è proporzionale al valore di A.N.
- WD Working distance. La distanza tra la superficie del vetrino copri oggetto e la lente frontale dell'obiettivo.
- CS. Coverslip, spessore copri oggetto.
- FN Field number. Definisce la dimensione in cui sono corrette le aberrazioni ottiche.
- RIS Risoluzione. Distanza minima di separazione tra due punti dell'oggetto che si possono distinguere illuminando in riflessione interna totale con il laser verde a 520 nm.
- TW Transmission Wavelength. Lunghezza d'onda in trasmissione del LED.

Note aggiuntive

Tutti i diritti riservati



www.ntpsrl.biz

📍 Via Circonvallazione n.11/A,
Sant'Angelo in Vado (PU), Italia

📍 Via Fortunato Zeni 8, Corpo L, Scala 2,
Rovereto (TN), Italia



info@ntpsrl.biz



+39 0722 88681