



Руководство пользователя
Прикладное программное обеспечение
«Аргус-CASA»
для оценки морфологических, оптических и кинетиче-
ских параметров сперматозоидов домашней птицы
в микроскопических препаратах
методом компьютерного анализа изображений

Дата публикации: 2024 г.

Версия 1.1

Материалы, приведённые в данном документе, являются собственностью ООО «АргусСофт» и могут быть использованы исключительно для личных целей приобретателя продукта. Никакая часть данного документа не может быть воспроизведена или передана в какой бы то ни было форме, и какими бы то ни было средствами без письменного разрешения ООО «АргусСофт».

Настоящий документ содержит информацию, актуальную на момент его составления. ООО «АргусСофт» не гарантирует отсутствия ошибок в данном документе. ООО «АргусСофт» оставляет за собой право вносить изменения в документ без предварительного уведомления. Исправления неточностей, опечаток и орфографических ошибок будут учтены в последующих редакциях документа.

© ООО «АРГУССОФТ», 2024.

Данная версия руководства соответствует версии 1.6.2.2409 программы АРГУС-CASA

© ООО АРГУССОФТ 2024

196191, Санкт-Петербург, Г.Санкт-Петербург, Вн.тер.г. Муниципальный округ Новоизмайловское,
пр-кт Ленинский, Дом 168 литера А, Помещение 8-н, помещение 1, офис 300

www.argussoft.org

Техническая поддержка: sales@argussoft.org, тел.+7(812)448-88-80, +7 (931)586-86-46

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	7
ТЕРМИНЫ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ	7
ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ	8
ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОСКОПУ	8
ТРЕБОВАНИЯ К ВИДЕОКАМЕРЕ	8
ТРЕБОВАНИЯ К КОМПЬЮТЕРУ И ПРИНТЕРУ	9
ТРЕБОВАНИЯ К ИСТОЧНИКУ БЕСПЕРЕБОЙНОГО ПИТАНИЯ	9
СТРУКТУРА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГРАММЫ АРГУС–CASA	10
МЕТОДИКА ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY	10
МЕТОДИКА МОРФОЛОГИЯ	10
МЕТОДИКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ	10
МЕТОДИКА ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК	11
УСТАНОВКА ПРОГРАММЫ	11
СПЕЦИФИКАЦИЯ ПОСТАВКИ	11
УСТАНОВКА ПРОГРАММЫ	12
ОБНОВЛЕНИЕ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ АРГУС-CASA ROULTRY	14
УДАЛЕНИЕ ПРОГРАММЫ АРГУС-CASA ROULTRY	14
УСТАНОВКА ДРАЙВЕРА КАМЕРЫ	15
ЗАПУСК ПРОГРАММЫ	15
ОСНОВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ИНТЕРФЕЙСА ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ	16
ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ НАСТРОЙКИ ПРОГРАММЫ	20
ВЫБОР УСТРОЙСТВА ВВОДА	20
МЕСТО ЗАПИСИ ФАЙЛОВ С ПЕРВИЧНЫМИ ДАННЫМИ	20
Поля бланка	21
КАЛИБРОВКА СИСТЕМЫ ВВОДА	22
<i>Выбор калибровки</i>	22
<i>Проведение новой калибровки</i>	23
<i>Управление калибровками</i>	24
ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY	25
ВЫБОР МЕТОДИКИ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY	25
НАСТРОЙКИ МЕТОДИКИ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY	25
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РАБОТЫ В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY	26
<i>Заполнение первичных данных</i>	26
<i>Анализ видеороликов из файла</i>	27
<i>Анализ подвижности в режиме съемки с камеры</i>	29

<i>Работа с видеороликами после анализа</i>	31
Режим галерея – корректировка результатов анализа	32
Просмотр галереи в виде таблицы	34
ПРОСМОТР РЕЗУЛЬТАТА В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ POULTRY	34
ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ МОРФОЛОГИЯ	36
Выбор методики морфология.....	36
Настройки методики морфология.....	36
Последовательность работы в методике морфология.....	38
<i>Заполнение начальных данных</i>	38
<i>Анализ изображений, открытых с диска</i>	38
<i>Анализ изображений в режиме съемки с камеры</i>	39
<i>Работа с изображениями после анализа</i>	41
Морфология. Режим галерея – корректировка результатов анализа	43
Морфология. Просмотр галереи в виде таблицы	45
ПРОСМОТР РЕЗУЛЬТАТА В МЕТОДИКЕ МОРФОЛОГИЯ	45
ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ	50
Выбор методики жизнеспособность.....	50
Настройки методики жизнеспособность.....	50
Последовательность работы в методике жизнеспособность.....	51
<i>Заполнение начальных данных</i>	51
<i>Анализ изображений, открытых с диска</i>	51
<i>Анализ изображений в режиме съемки с камеры</i>	52
<i>Работа с изображениями после анализа</i>	54
Жизнеспособность. Режим галерея – корректировка результатов анализа.....	55
РЕЗУЛЬТАТ В МЕТОДИКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ	56
ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК	57
Выбор методики фрагментация ДНК.....	57
Настройки методики фрагментация ДНК.....	57
Последовательность работы в методике фрагментация ДНК.....	58
<i>Заполнение начальных данных</i>	58
<i>Анализ изображений, открытых с диска</i>	58
<i>Анализ изображений в режиме съемки с камеры</i>	59
<i>Работа с изображениями после анализа</i>	60
Разделение контактов и Слияние (объединение) объектов	61
Корректировка контуров с помощью кисти.....	61
Разделение крестообразных наложений по точкам.....	62
Режим галерея – корректировка результатов анализа	62

<i>Фрагментация ДНК. Просмотр галереи в виде таблицы</i>	63
<i>ПРОСМОТР РЕЗУЛЬТАТА В МЕТОДИКЕ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК</i>	64
ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ И СОХРАНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА	65
ПРОСМОТР ОТЧЕТОВ	65
ПЕЧАТЬ ОТЧЕТА.....	67
СОХРАНЕНИЕ ОТЧЕТА В ФОРМАТЕ XML	67
СОХРАНЕНИЕ ОТЧЕТОВ В СТАНДАРТНЫХ ФОРМАТАХ (PDF И XPS)	67
СОХРАНЕНИЕ ФАЙЛОВ С ПЕРВИЧНЫМИ ДАННЫМИ	67
СОХРАНЕНИЕ ДОКУМЕНТА	68
СОХРАНЕНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ	68
КОНСТРУКТОР БЛАНКА ОТЧЕТА	68
<i>Типы полей бланка отчета</i>	69
<i>Нанесение и удаление полей</i>	70
<i>Настройка свойств полей</i>	70
Общие поля	70
Поля результатов анализа	72
<i>Изменение стиля, расположения и размеров полей</i>	73
<i>Нанесение графических элементов</i>	74
<i>Управление шаблонами</i>	75
ЭКСПОРТ ТАБЛИЦЫ ГАЛЕРЕИ В ФАЙЛ ФОРМАТА CSV И ИМПОРТ ФАЙЛА CSV В MS EXCEL	76
<i>Версии Excel 2013, 2010, 2007 или 2003 и ранние.</i>	76
<i>Версия Microsoft® Excel® 365</i>	79
ОБУЧЕНИЕ КЛАССИФИКАТОРА	81
ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И СБОЕВ	82
ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ЭКСПЛУАТАЦИИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИИ	84
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ МЕТОДИКИ ПОДВИЖНОСТЬ	85
Подготовка эякулята для проведения анализа.....	85
<i>Камера Маклера</i>	86
Подготовка камеры	86
Заполнение камеры	86
<i>Камера Leja</i>	86
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ МЕТОДИКИ МОРФОЛОГИЯ	87
ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКА	87
ОКРАШИВАНИЕ МАЗКОВ	88
<i>Реагенты</i>	88
<i>Ход окраски:</i>	88
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ МЕТОДИКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ.	89

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ (ПО РЕКОМЕНДАЦИЯМ ВОЗ 2010).....	89
<i>Реагенты</i>	89
<i>Ход окраски</i>	89
ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ КРАСИТЕЛЕМ VITALSCREEN.....	89
<i>Реагенты:</i>	89
<i>Ход окраски</i>	90
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ ДЛЯ МЕТОДИКИ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК.....	91
ПРИЛОЖЕНИЕ 5. ПАРАМЕТРЫ, РАССЧИТЫВАЕМЫЕ В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ.....	92
ПРИЛОЖЕНИЕ 6. ПАРАМЕТРЫ, РАССЧИТЫВАЕМЫЕ В МЕТОДИКЕ МОРФОЛОГИЯ.....	93
ПРИЛОЖЕНИЕ 7. ИНДЕКСЫ МНОЖЕСТВЕННЫХ АНОМАЛИЙ СПЕРМЫ	93
ПРИЛОЖЕНИЕ 8. СПИСОК ГОРЯЧИХ КЛАВИШ	94
ПРИЛОЖЕНИЕ 9. НАСТРОЙКА ОСВЕЩЕНИЯ МИКРОСКОПА	95

ВВЕДЕНИЕ

Программное обеспечение **АРГУС–CASA** (Computer Assisted Sperm Analysis) предназначено для автоматизации микроскопического анализа спермы. Анализ проводится на изображениях, полученных с нативных и окрашенных препаратов эякулята.

Анализ эякулята самцов сельскохозяйственных птиц на изображениях, полученных с нативных или заморожено/оттаянных окрашенных препаратов эякулята в селекционно-генетических центрах и племенных хозяйствах по птицеводству.

Область применения: Научно-исследовательские организации, селекционно-генетические центры и племенные хозяйства по птицеводству, в которых проводится анализ спермы сельскохозяйственных птиц методами оптической микроскопии.

Функциональное назначение: анализ семени самцов сельскохозяйственных птиц с учётом морфологических особенностей строения их сперматозоидов методом компьютерного анализа изображений.

Использование программы **АРГУС–CASA** для проведения компьютерного анализа эякулята имеет ряд преимуществ перед ручным методом. Это получение достоверных и воспроизводимых данных при подсчёте концентрации, анализе критериев движения, морфологических и оптических параметров сперматозоидов. Кроме того, использование компьютерного анализа спермы позволяет стандартизировать исследования, а также оптимизировать проведение внутреннего контроля качества в лаборатории, выполняющей данное исследование.

Программа может поставляться, как в составе программно-аппаратного комплекса (**АПК**) **АРГУС–CASA**, так и, как автономное программное обеспечение, устанавливаемое на оборудование заказчика.

АПК АРГУС–CASA — это современный прибор для исследования эякулята, сочетающий традиционное визуальное наблюдение в микроскоп и автоматизированный анализ сперматозоидов.

ТЕРМИНЫ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

- **Программа АРГУС-CASA (сокр. ПО АС-CASA)** – программное обеспечение, разработанное ООО АргусСофт для получения и анализа изображений спермы человека и животных.
- **АПК АРГУС-CASA** – аппаратно-программный комплекс, состоящий из микроскопа, установленной на нем видеокамеры и компьютера с ПО АС-CASA.
- **Графический интерфейс пользователя** (англ. graphical user interface, GUI) — разновидность пользовательского интерфейса, в котором элементы интерфейса (меню, кнопки, значки, списки и т. п.), представленные пользователю на дисплее, исполнены в виде графических изображений.
- **Окно программы** — область экрана монитора, в которой отображается содержимое программы АРГУС-CASA;
- **Область анализа** - область внутри окна программы АРГУС-CASA, в котором отображаются видеоролики и изображения, галерея объектов, результаты обработки, бланки отчетов;
- **Документ** - совокупность изображений, видеороликов, галерей, таблиц измерений, результатов и отчетов, полученных в программе **АРГУС CASA**. Документ может быть сохранен в виде единого файла с расширением **cvf**.
- **Тулбар (= панель инструментов)** - совокупность кнопок для выбора методик, для вызова наиболее часто используемых функций программы;
- **Панель** — контейнер, содержащий в себе элементы управления (Панель Содержание, панель управления камерой, панель масштабирования и пр.);
- **Объект** - выделенные и измеренные участки изображения. На изображении объекты обведены цветными контурами;
- **Маска объекта** – область, соответствующая выделенному объекту, закрашенная однородным цветом;
- **Галерея** - форма представления в окне программы сводного списка объектов, рассортированных по классам с изображениями объектов.

- **Методика** – совокупность операций обработки изображений, выполняемая в заданной последовательности с целью получения результата по выбранному типу анализа;

ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ

Программно-аппаратный комплекс для анализа спермы (АПК) АРГУС–CASA имеет следующий состав:

- Микроскоп;
- Цифровая видеокамера, устанавливаемая на микроскоп;
- Персональный компьютер с периферией;
- Принтер;
- Источник бесперебойного питания;
- Электронный ключ защиты программного обеспечения;
- Программное обеспечение АРГУС–CASA;

Принцип работы аппаратно-программного комплекса следующий: изображение с микроскопа с помощью видеокамеры передаётся на компьютер, где оно анализируется с помощью программного обеспечения.

При поставке АПК как единого прибора компания ООО АргусСофт подбирает и тестирует все технические средства, входящие в состав комплекса с тем, чтобы обеспечить стабильную и комфортную для пользователя работу прибора.

*При установке программного обеспечения **АРГУС–CASA** на оборудование заказчика для корректной и бесперебойной работы оно должно удовлетворять определенным требованиям:*

ТРЕБОВАНИЯ К МИКРОСКОПУ

- Микроскоп прямой, позволяющий работать в светлом поле и фазовом контрасте;
- Класс прибора – рабочий, лабораторный, исследовательский;
- Осветитель галогенный (настройка по Келлеру) или LED (светодиодный);
- Набор объективов в зависимости от используемых методик: для методики Подвижность 10x Ph2 и 20xPh2 (LD) - длиннофокусный, для методики Жизнеспособность 40x, для методики Морфология - иммерсионный 100x, для методики Фрагментация ДНК 50x или 40x;
- Окуляры с увеличением 10x и полем зрения 20 или 23 мм;
- Наличие фото/видео выхода или микрофотонасадки, комплектация C-mount адаптером для подключения видеокамеры. Адаптер оптико-механический, кратность 1x;
- Освещение, настроенное равномерно по полю зрения;
- Отсутствие дефектов и загрязнения оптики, хроматических и геометрических аберраций;
- Микроскоп должен быть заземлен.

ТРЕБОВАНИЯ К ВИДЕОКАМЕРЕ

- Тип матрицы: CCD, CMOS;
- Цветная;
- Размер матрицы – не менее ½ дюйма;
- Разрешение (пиксели) - не менее 1024*768;
- Размер пикселя, мкм - не более 3,2 x 3,2;
- Частота обновления кадров в сек при разрешении не менее 640*480– не менее 45;
- Динамический диапазон, дБ – не менее 61;
- Отношение сигнал/шум – не менее 56;
- Матрица камеры не должна иметь загрязнений;

Требования к техническим средствам

- Оптическое крепление - C-mount.
- Поддержка API Direct Show.

Для камер производства Jenoptik ProgRes CT3 и камер EC Экспертс BR-3151LC-UF ввод в программу производится через прямой драйвер, который поставляется вместе с программой АРГУС–САСА.

ТРЕБОВАНИЯ К КОМПЬЮТЕРУ И ПРИНТЕРУ

- Процессор не ниже Core i3.
- Оперативная память не менее 8 Гб;
- Интегрированная или дискретная видеокарта с полной поддержкой Direct X 10.0 и выше;
- Жесткий диск не менее 1Тб или более;
- Привод DVD-RW;
- Установленная лицензионная копия WINDOWS 10 (64 бит) и WINDOWS 11 (64 бит) с установленными обновлениями и драйверами используемого оборудования.
- Наличие свободных (не менее 3) USB разъёмов для подключения камеры, установки электронного ключа защиты и подключения принтера. Один порт USB 3.0 (при комплектации камерой имеющей интерфейс USB 3.0);
- Блок питания, обеспечивающий качественное питание выше перечисленных комплектующих (700W и более);
- Монитор LCD 19" или больше с разрешением не менее 1280x1024 (рекомендуется использование широкоформатных мониторов);
- Периферия: клавиатура, мышь;
- Принтер лазерный/струйный, цветной/монохромный, USB – в зависимости от поставленных задач;
- Желательно наличие установленного программного обеспечения для печати отчётов в pdf;
- Желательно, чтобы компьютер имел доступ к сети Интернет.

Компьютер и все его периферийные устройства должны быть заземлены и подключены к одной фазе.

ТРЕБОВАНИЯ К ИСТОЧНИКУ БЕСПЕРЕБОЙНОГО ПИТАНИЯ

Рекомендуется подключить все элементы комплекса через источник бесперебойного питания (ИБП) мощностью не менее 700VA, так как это позволит избежать потери данных при аварийном отключении электричества.

СТРУКТУРА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГРАММЫ АРГУС–CASA

Программа построена по модульному принципу: для каждого типа анализа в программе предусмотрен свой набор функций, объединённый в МЕТОДИКУ. При этом общая последовательность работы во всех методиках одинакова, что облегчает освоение работы с программой.

Программа может поставляться с любым набором методик. Количество доступных методик определяется прошивкой в электронном ключе защиты. При необходимости дополнить набор доступных методик ключ может быть перекодирован дистанционно (он-лайн). Для перекодировки ключа нужно обратиться в компанию ООО АргусСофт или к дистрибьютеру, через которого была приобретена программа.

В состав программы **АРГУС–CASA** могут входить следующие методики:

МЕТОДИКА ПОДВИЖНОСТЬ POULTRY

Оценка концентрации и параметров движения сперматозоидов в нативном препарате.

Возможности методики:

- Съёмка видеороликов с препаратов эякулята в счётной камере (Маклера, Leja), воспроизведение и сохранение первичных данных в виде файлов;
- Построение и анализ траекторий движения сперматозоидов на захваченных видеороликах;
- Классификация и определение процентного соотношения сперматозоидов с различной подвижностью;
- Подсчёт концентрации сперматозоидов и круглых клеток (в млн/мл);
- Автоматический контроль достаточности набора данных;
- Формирование пользовательских отчётов для вывода на печать и передачу в лабораторные базы данных в стандартных форматах;
- Обучение пользовательского классификатора.

МЕТОДИКА МОРФОЛОГИЯ

Автоматическая оценка морфологических форм сперматозоидов в окрашенном мазке. Рекомендуется окраска по методу Diff-Quick.

Возможности методики:

- Съёмка серии изображений с окрашенных мазков, сохранение первичных данных в виде файлов;
- Автоматическое определение дефектов головок и шеек в соответствии с классификацией, рекомендованной в Руководстве ВОЗ по исследованию спермы человека в лабораторных условиях, 5 редакция, 2010 г;
- Расчёт процентного соотношения сперматозоидов, принадлежащих к классам Норма и Патология, процентного соотношения дефектов головы, шеи и хвоста, процентного соотношения других клеток (Эпителиальных и Незрелых клеток, Лейкоцитов, Изолированных хвостов и Головок);
- Автоматический расчёт индексов множественных аномалий MAI, TZI, SDI;
- Автоматический контроль достаточности набора данных;
- Возможность ручной корректировки дефектов (удаление «грязи», ручное назначение дефектов, корректировка контуров);
- Формирование пользовательских отчётов для вывода на печать и передачу в лабораторные базы данных в стандартных форматах;
- Возможность создания пользовательского классификатора.

МЕТОДИКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Подсчёт соотношения мёртвых и живых сперматозоидов в окрашенном мазке.

Возможности методики:

- Съёмка серии изображений с окрашенных мазков, сохранение первичных данных в виде файлов;
- Автоматическое выделение живых (неокрашенных) и мёртвых (окрашенных) сперматозоидов;
- Расчёт процентного соотношения сперматозоидов, принадлежащих к классам «живые» или «мёртвые»;
- Формирование пользовательских отчётов для вывода на печать и передачу в лабораторные базы данных в стандартных форматах;

МЕТОДИКА ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК

Методика ДНК POULTRY выполняет оценку степени фрагментации сперматозоидов сельскохозяйственных птиц в соответствии с требованиями документа ГОСТ 32277-2013 Межгосударственный стандарт Средства воспроизводства. Сперма. Методы испытаний физических свойств и биологического, биохимического, морфологического анализов и ГОСТ 27267-2017 Межгосударственный стандарт. Средства воспроизводства. Сперма петухов и индюков неразбавленная свежеполученная в нативном («живом») препарате эякулята.

Возможности методики:

- Съёмка серии изображений с окрашенных мазков, сохранение первичных данных в виде файлов;
- Автоматическое выделение контуров сперматозоидов;
- Классификация выделенных сперматозоидов на 3 класса:
 - С низкой яркостью (ярко окрашенные повреждённые фрагментированные).
 - С промежуточной яркостью между 1 и 2 (частично фрагментированные).
 - С высокой яркостью (слабоокрашенные –не фрагментированные);
- Подсчёт количества и расчёт процентного соотношения сперматозоидов с разной степенью фрагментации:
 - Количество и % Фрагментированных сперматозоидов;
 - Количество и % частично фрагментированных сперматозоидов;
 - Количество и % Не фрагментированных сперматозоидов (без ДНК фрагментации).
- Формирование пользовательских отчётов для вывода на печать и передачу в лабораторные базы данных в стандартных форматах.

УСТАНОВКА ПРОГРАММЫ

СПЕЦИФИКАЦИЯ ПОСТАВКИ

Поставка программного обеспечения АРГУС-CASA включает:

1. *Электронный носитель (USB-флеш-накопитель)*, на котором записаны все необходимые файлы для установки и работы с программой:
 - Папка INSTALL – инсталлятор для установки программы на компьютер;
 - Папка – DRIVERS – содержит папки с драйверами производителей камер ES Experts, Basler и DShowDriver.dll.
 - Папка ИЗОБРАЖЕНИЯ – демонстрационные изображения;
 - Руководство пользователя программы АРГУС-CASA в формате pdf;
2. Электронный ключ Guardant Stealth, с помощью которого программа АРГУС-CASA защищена от несанкционированного копирования. Каждый ключ имеет идентификационный номер, соответствующий Лицензионному номеру Программного продукта.

Электронный USB-ключ защиты закодирован на конфигурации (методики) ПО, которые указаны в Спецификации в договоре на поставку.

УСТАНОВКА ПРОГРАММЫ

1. Папка INSTALL содержит два каталога:
 - ru-RU (для установки программы на русском языке);
 - en-US (для установки программы на английском языке).
2. Откройте нужную папку и запустите файл CASA.exe.
3. Откроется диалоговое окно Мастера установки с лицензионным соглашением (см. Рис. 1). Для продолжения инсталляции Вам необходимо ознакомиться с лицензионным соглашением и отметить пункт (поставить «галочку») "Я согласен с лицензионным соглашением" и нажать кнопку *Установить*;

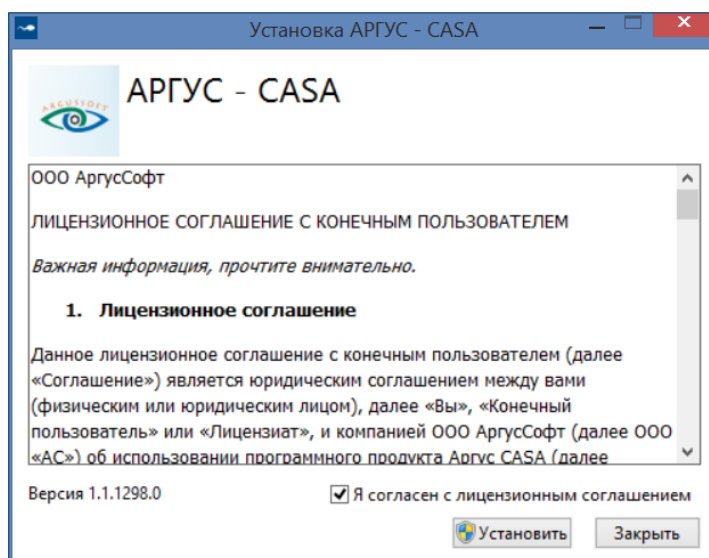


Рис. 1 Окно Мастера с Лицензионным соглашением

4. При первой установке программы на компьютер сначала автоматически установятся драйвер электронного ключа защиты Guardant и дополнительные компоненты операционной системы Windows, необходимые для работы программы АРГУС-CASA.
5. Следующий этап - установка программы АРГУС- CASA. В окне *Установка АРГУС- CASA* (см. Рис. 2) нажмите кнопку *Далее*.

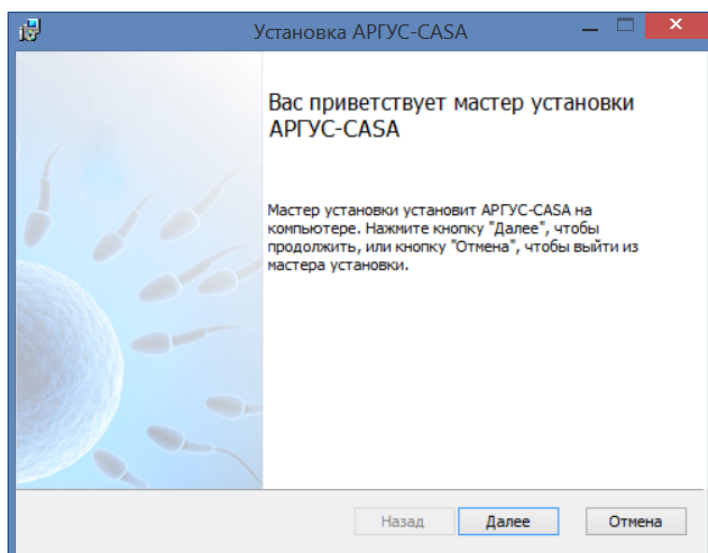


Рис. 2 Окно Мастера установки программы АРГУС-CASA

6. На следующей странице *Мастера* Вам предлагается выбрать директорию, в которую будет установлена программа (см. Рис. 3). Рекомендуется устанавливать программу в предлагаемую папку c:\Program Files\ArgusSoft\CASA. Нажмите *Далее*.

Для установки программы в папку, отличную от предлагаемой по умолчанию, нужно предварительно удалить ранее установленный экземпляр программы АРГУС-CASA. В противном случае будет выполнено исправление установленной версии.

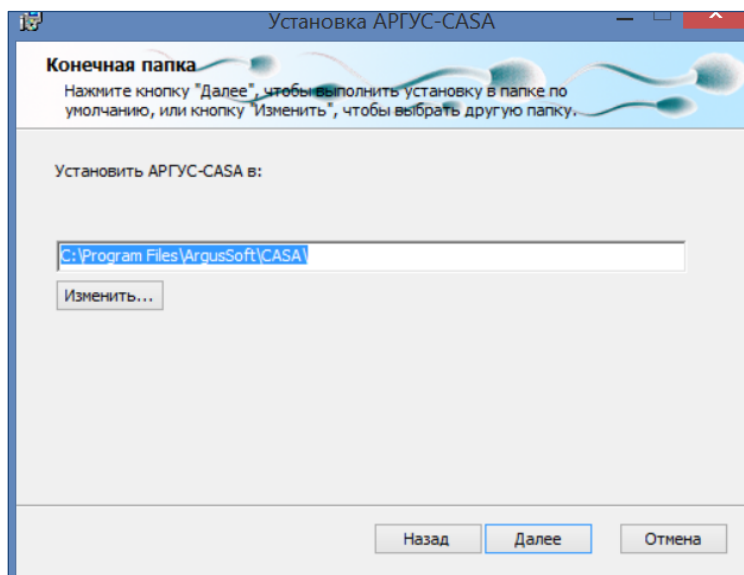


Рис. 3 Окно Мастера для выбора папки, куда будет установлена программа

7. Появится окно *Мастера* (см. Рис. 4), в котором нужно нажать кнопку *Установить*.

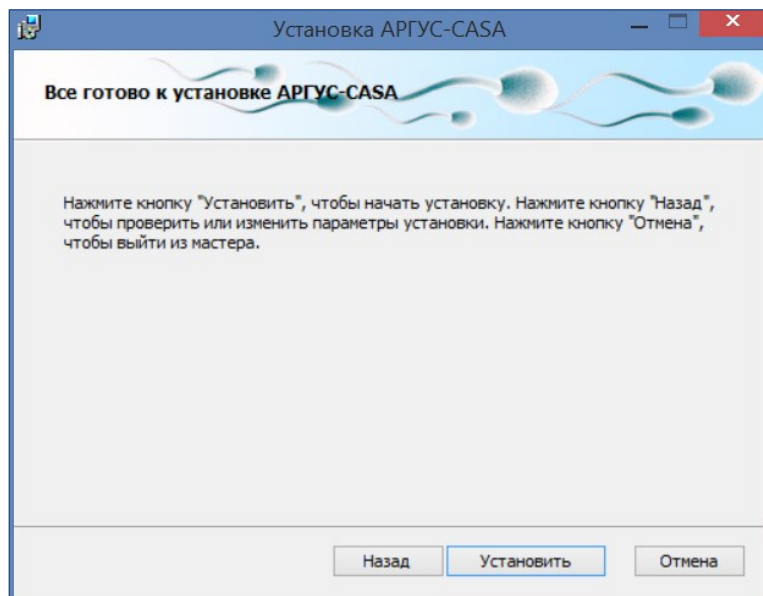


Рис. 4 Окно Мастера для запуска установки программы

8. После нажатия на кнопку *Установить* Вы увидите перед собой индикатор копирования файлов и регистрации компонентов.
9. После окончания процесса копирования и регистрации появится сообщение об успешном завершении установки программы (см. Рис. 5).

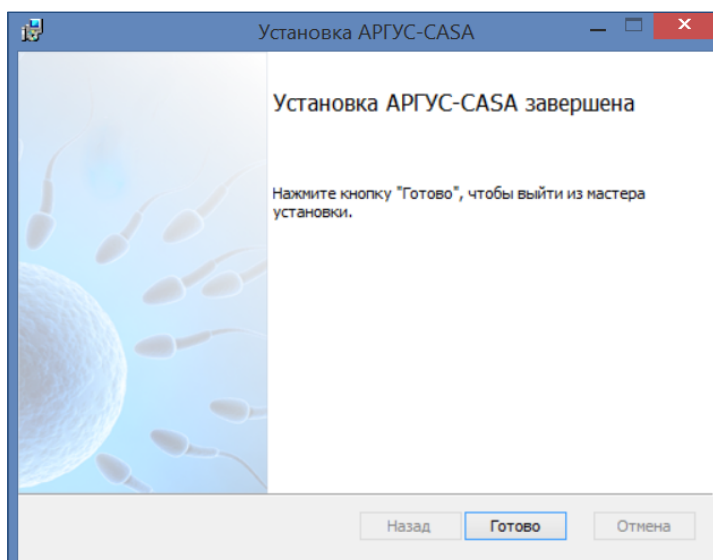


Рис. 5 Окно Мастера после успешной установки программы

ОБНОВЛЕНИЕ ВЕРСИИ ПРОГРАММЫ АРГУС-CASA POULTRY

Для замены установленной версии программы АРГУС-CASA на новую версию нужно:

1. Сохранить (экспортировать) все рабочие калибровки в виде отдельных файлов для того, чтобы их можно было восстановить после установки новой версии программы. Процедура сохранения калибровок описана в *Руководстве пользователя программного обеспечения АРГУС-CASA* в разделе *Управление калибровками* (см. *Управление калибровками*, стр.24).
2. Удалить (деинсталлировать) программу АРГУС- CASA стандартными средствами ОС Windows (Панель управления/Программы/Программы и Компоненты);
3. Удалить рабочий каталог программы с оставшимися после деинсталляции файлами.
4. Удалить файл конфигурации программы config.xml, который находится в папке c:\Users\Имя пользователя\AppData\Roaming\ArgusSoft\;
5. Установить новую версию программы.
6. Открыть программу;
7. Восстановить (Импортировать) сохранённые калибровки.

При деинсталляции программы НЕ удаляются пользовательские шаблоны бланков и классификаторы. При работе в программе она автоматически сохраняются в папках c:\Users\Имя пользователя\AppData\Roaming\ArgusSoft\CASA Poultry\Classifiers и c:\Users\Имя пользователя\AppData\Roaming\ArgusSoft\CASA Poultry\Templates, поэтому они будут доступны после установки новой версии программы.

УДАЛЕНИЕ ПРОГРАММЫ АРГУС-CASA POULTRY

Удаление программы АРГУС-CASA Poultry проводится стандартными средствами WINDOWS. Для удаления программы:

1. В *Панели управления* ОС WINDOWS выберите пункт *Программы и компоненты*;
2. В списке программ активизируйте строку *АРГУС-CASA Poultry* и выберите команду *Удалить*;
3. В окне *Установка АРГУС-CASA* нажмите кнопку *Удалить*. После завершения удаления появится окно с надписью: «Удаление успешно завершено».

УСТАНОВКА ДРАЙВЕРА КАМЕРЫ

Для работы в программе АРГУС-CASA Poultry с видеокамерой для захвата изображений после установки программы нужно установить на компьютер драйвер камеры, поставляемый производителем.

Программа АРГУС- CASA Poultry поддерживает ввод для камер:

- ЕС ЭКСПЕРТС BR-3151LC-UF;
- Basler ac A1300-200um;
- Камер, поддерживающих ввод изображений через протокол API Direct Show.

1. Для камер производства ЕС-Экспертс нужно запустить файл ESECAM_SETUP_170316_ru.exe из папки Drivers/ES EXPERTS.

При установке следуйте инструкциям в окнах *Мастера установки ПО для цифровых видеокамер*.

На странице с выбором компонентов рекомендуем отключить установку всех дополнительных компонентов, кроме драйверов (см. Рис. 6). Приложение Picture Show не нужно для работы в программе АРГУС-CASA, так как в ней есть встроенный модуль для захвата изображений.

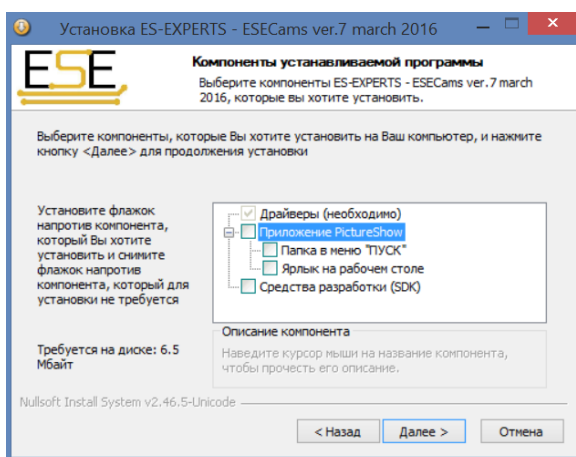


Рис. 6 Окно Мастера установки камеры ЕС-Экспертс. Отключена установка всех дополнительных компонентов.

2. При работе с камерой Basler acA1300-200um нужно установить файл pylon_USB_Camera_Driver.msi из папки Drivers/Basler.
3. Если для ввода изображений будет использоваться камера, поддерживающая API Direct Show, нужно после установки программы АРГУС-CASA скопировать файл DShowDriver.dll из папки DRIVERS на USB-флеш-накопителе во вложенную папку INPUT в каталоге с программой CASA (c:\Program Files\ArgusSoft\CASA Poultry \Input\).

ЗАПУСК ПРОГРАММЫ

После установки программы на ваш компьютер, ее название будет добавлено в список программ Windows в папку **ArgusSoft**, а на **Рабочий стол Windows** будет помещён **ярлык программы**:



- Ярлык для запуска программы АРГУС-CASA Poultry.

Перед запуском программы установите в USB порт компьютера электронный ключ защиты программы АРГУС-CASA Poultry!

Для успешной работы с программой рекомендуем прочитать *Руководство пользователя программного обеспечения АРГУС-CASA Poultry*.

Для **быстрого запуска программы** достаточно дважды нажать на него левой кнопкой мыши.

Также можно открыть программу, выбрав название из списка программ Windows.

После запуска появится окно программы с заставкой. Для начала работы в программе кликните мышью на любую часть окна.

Если программа не запускается, то установите бесплатное обновление библиотеки Windows Microsoft Visual C++ Redistributable Package (VCRedist) и NET uploader 6.0. Эти файлы записаны на USB-флеш-накопителе с инсталлятором программы или скачайте последние версии этих библиотек из Интернета.

ОСНОВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ИНТЕРФЕЙСА ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Рассмотрим кратко основные элементы окна программы (Рис. 7), которые будут упоминаться при описании порядка работы в методиках. Для всех методик вид окна и элементы управления подобны.

В данном разделе приведены основные сведения по организации окна программы. Особенности интерфейса при работе в разных методиках будут изложены в соответствующих разделах.

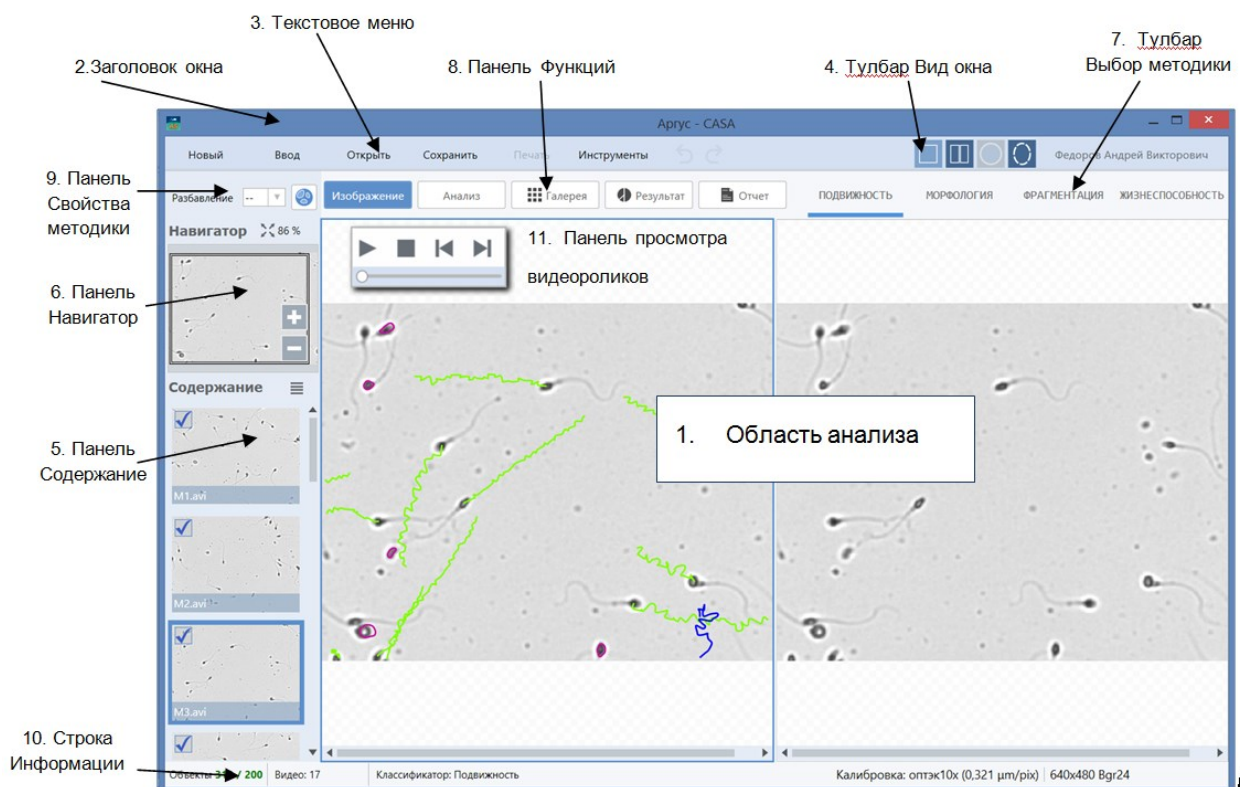







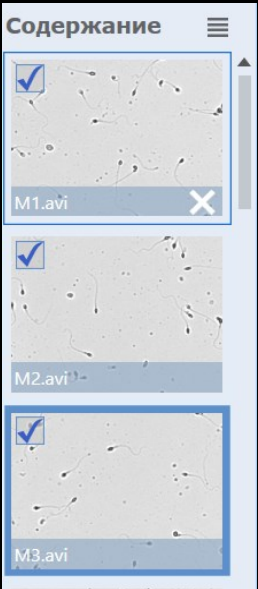









Рис. 7 Вид окна программы в методике Подвижность. Область анализа разделена на 2 части, слева - проанализированный видеоролик с треками, справа – исходный видеоролик. Обозначение числами на рисунке соответствует числам в таблице.

<p>Область анализа</p>	<p>Основная рабочая область внутри окна программы, в которой отображается живое видео при съёмке, захваченные видеоролики и изображения, галерея объектов, результаты анализа, отчёты. В области анализа отображаются различные элементы в зависимости от активной методики и этапа анализа. Более подробно это будет рассмотрено при пошаговом описании работы в каждой методике.</p>
<p>Заголовок окна программы</p>	<p>Содержит иконку с логотипом программы, название программы Аргус-CASA, кнопки минимизировать, свернуть/восстановить, закрыть.</p>
<p>Текстовое меню</p>	<p><u>Назначение:</u> вызов функций и инструментов, используемых во всех методиках, управление видом отображения области анализа, идентификация текущего анализа.</p>

	<p>Находится под заголовком окна программы и содержит пункты:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Новый</i> – начало нового анализа, внесение первичных данных; • <i>Ввод</i> – вызов окна живого видео для получения снимков видеороликов и изображений; • <i>Открыть</i> – открыть изображения и документы с диска; • <i>Сохранить</i> – сохранение изображения и документов на диске; • <i>Печать</i> – печать отчётов по результатам анализа. Команда доступна только в режиме <i>Отчёт</i>; • Кнопки  <i>Отменить</i> (Отмена предыдущей операции)/<i>Восстановить</i> (Восстановить отменённую операцию);
<p>Тулбар Вид окна</p> 	<p><u>Назначение</u>: изменение вида отображения окна документа.</p> <p>Находится в правой части области текстового меню. Доступен в режиме Изображение, Анализ, Галерея.</p> <p>Состоит из кнопок:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Одно окно</i>  - окно документа отображается без разделения на две части; • <i>Разделить и синхронизировать</i>  – окно документа делится на 2 части по вертикали. Вид каждой части окна зависит от методики и режима работы. • <i>Показать маски</i>  – отображение на изображении цветных масок объектов. Одновременно должна быть нажата кнопка <i>Показать объекты</i>. При отжатой кнопке маски не отображаются; • <i>Показать объекты</i>  – отображение на изображении цветных контуров и траекторий (для видеороликов) объектов. При отжатой кнопке контура и траектории не отображаются.
<p>Панель Содержание</p>	<p><u>Назначение</u>: Отображение всех захваченных с камеры или загруженных в документ видеороликов и изображений в уменьшенном виде (иконки). При нажатии на иконку в области анализа отображается соответствующее изображение (видеоролик).</p> <p>Под иконкой – название файла (при открытии с диска) или названия, присваиваемого автоматически при вводе с камеры (Видео1, видео2... или Изображение 1, Изображение 2...);</p> <p>На каждой иконке есть область для выбора изображений для анализа (синяя галочка в левом верхнем углу иконки) и область для удаления изображения из документа - белый крестик в правом нижнем углу, который появляется при наведении мышкой на иконку.</p> <p>В правой части заголовка панели находится кнопка вызова контекстного меню , которое содержит пункты:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Выбрать все</i> – все изображения в панели будут отмечены галочками и включены в анализ;

	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Снять выделение</i> – со всех изображений будут сняты галочки; • <i>Очистить</i> – удалить из документа все изображения для активной методики. <p>Панель закреплена в левой части окна программы без возможности отключения или переноса пользователем.</p>
<p>Панель Навигатор</p> 	<p><u>Назначение:</u> Просмотр и управление масштабом (увеличение и уменьшение) отображения изображений в области анализа.</p> <p>Панель отображает активное изображение. Если в области анализа поместилась только часть изображения (при большом увеличении), то в Навигаторе она будет обведена рамкой. Перемещая рамку при помощи мыши, можно просматривать различные участки изображения.</p> <p>Иконки  и  - пошаговое изменение масштаба. Значение установленного масштаба (в %) отображается в заголовке панели. Если изображение большое и не помещается в окно при выбранном масштабе, то оно будет выходить за рамки окна программы, и будут появляться полосы прокрутки.</p> <p>Кнопка  - <i>Вписать изображение</i> - развернуть изображение с сохранением пропорций на всю область анализа. Если размер изображения меньше области анализа, то при нажатии на эту кнопку его максимальное увеличение ограничивается 100%</p> <p>Панель закреплена в окне программы над панелью Содержание без возможности изменения размера, отключения или переноса пользователем.</p>
<p>Тулбар выбора методики</p> 	<p><u>Назначение:</u> выбор активной методики, которая будет выполняться по нажатию кнопки <i>Анализ</i>. Состав тулбара зависит от количества доступных методик.</p> <p>При нажатии на кнопку с названием методики автоматически загружаются все установки, которые были сделаны в методике при последнем сеансе работы, а именно:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Настройки камеры; • Настройки методики • Активная калибровка; • Настройки сегментации; • Содержимое панели Свойств методики.

	<p>Кнопка активной методики выделяется синим подчёркиванием.</p>
<p>Панель функций</p> 	<p><u>Назначение:</u> выбор функций, с помощью которых проводится анализ. Набор функций общий для всех методик Кнопки панели расположены в последовательности проведения анализа и работы с результатом:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Изображение</i> – просмотр видеороликов и изображений. • <i>Анализ</i> - запуск обработки методикой выбранных в панели <i>Содержание</i> видеороликов или изображений; • <i>Галерея</i> - отображение в области анализа всех проанализированных сперматозоидов в виде Галереи объектов; • <i>Результат</i> – просмотр результата анализа; • <i>Отчёт</i> - печать и сохранение отчётов.
<p>Панель Свойства методики</p>	<p><u>Назначение:</u> работа с функциями, которые используются только для активной методики. Для каждой методики наполнение этой панели разное.</p> <p>Подробно будет рассмотрено при описании пошаговой работе в каждой методике.</p>
<p>Строка информации</p>	<p>Находится в нижней части окна программы. В ней отображается следующая информация (см. Рис. 7, стр.16 слева направо):</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Количество</i> проанализированных методикой объектов/критерий достаточности (устанавливается в настройках методики). Цвет шрифта меняется на зелёный при достижении заданного количества достаточности; • Количество видеороликов и изображений в панели <i>Содержание</i>; • Название активного классификатора; • Название и коэффициент активной калибровки; • Разрешение активного изображения/видеоролика (ширина и высота в пикселях); • Цветовая модель активного изображения/видеоролика.
<p>Панель просмотра видеороликов</p> 	<p><u>Назначение:</u> непрерывный или пошаговый просмотр видеороликов.</p> <p>Доступна только в методике Подвижность Poultry.</p>

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ НАСТРОЙКИ ПРОГРАММЫ

Перед началом работы с программой следует произвести предварительные настройки, которые являются общими для всех методик. Как правило, эти настройки делаются один раз и запоминаются программой до их последующего изменения.

ВЫБОР УСТРОЙСТВА ВВОДА

С помощью этой настройки выбирается камера, которая будет использоваться во всех методиках для съёмки видеороликов и изображений.

Камера для ввода изображений и видеороликов должна быть подключена к ПК физически, и в системе должны быть установлены соответствующие драйвера производителя камеры. При поставке АПК драйвера камеры уже установлены на компьютере.

Для камер моделей Jenoptic ProgRes CT3, EC Экспертс BR-3151LC-U и Basler драйвера производителя поставляются вместе с программой АРГУС-CASA Poultry .

При подключении камер других моделей драйвера устанавливаются в соответствии с рекомендациями производителя камеры.

Для того чтобы выбрать устройство ввода используйте команду текстового меню **Инструменты** ➤ **Настройки**. В появившемся диалоговом окне **Настройки приложения** активизируете закладку **Устройства ввода** и выберите устройство (камеру), которую собираетесь использовать, и нажмите на кнопку **ОК** (см. Рис. 8).

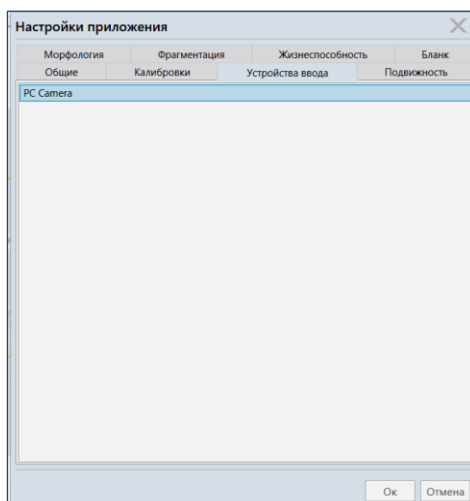


Рис. 8 Диалоговое окно Настройки приложения, активна закладка Устройства ввода

Нажмите **ОК** для сохранения настроек или **Отмена** для выхода из диалогового окна без сохранения.

МЕСТО ЗАПИСИ ФАЙЛОВ С ПЕРВИЧНЫМИ ДАННЫМИ

Программа может автоматически сохранять на диске не обработанные исходные видеоролики и изображения. Это может понадобиться в том случае, если в будущем возникнет необходимость просмотреть или заново проанализировать первичные данные.

Для того, чтобы включить эту возможность используйте команду текстового меню **Инструменты** ➤ **Настройки**. В появившемся диалоговом окне **Настройки приложения** активизируете закладку **Общие** и укажите путь для записи файлов (см. Рис. 9). Выбирайте диск с достаточным объёмом свободного места, т.к объём информации при постоянной записи будет большой.

Видеоролики в методике Подвижность записываются в формате avi. Изображения в методиках Морфология, Жизнеспособность и Фрагментация ДНК в формате png. Каждая серия изображений записывается в отдельную папку с названием методики и датой записи, которая формируется автоматически.

Для того, чтобы запись первичных данных автоматически не совершалась установите «галочку» около пункта *Удалять файлы после анализа*.

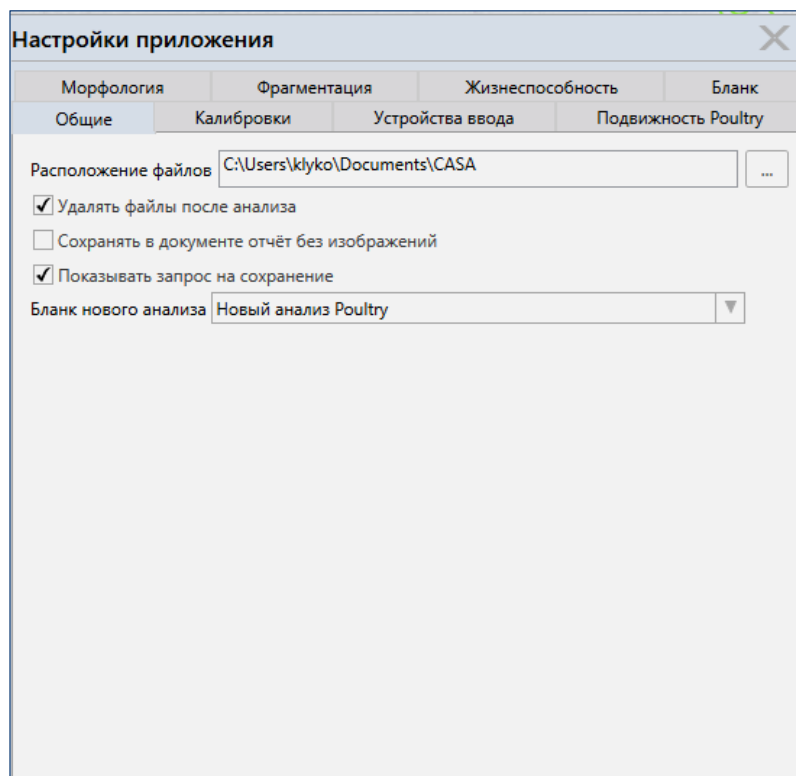


Рис. 9 Диалоговое окно Настройки приложения, активна закладка Общие.

Нажмите **ОК** для сохранения настроек или **Отмена** для выхода из диалогового окна без сохранения.

ПОЛЯ БЛАНКА

Текстовое меню **Инструменты** > **Настройки** > **Закладка Бланк**.

Формирование списка полей общего типа, которые можно использовать для отображения на бланке отчёта с результатами анализа в режиме *Конструктор бланка* (см. Конструктор бланка отчета, стр.68).

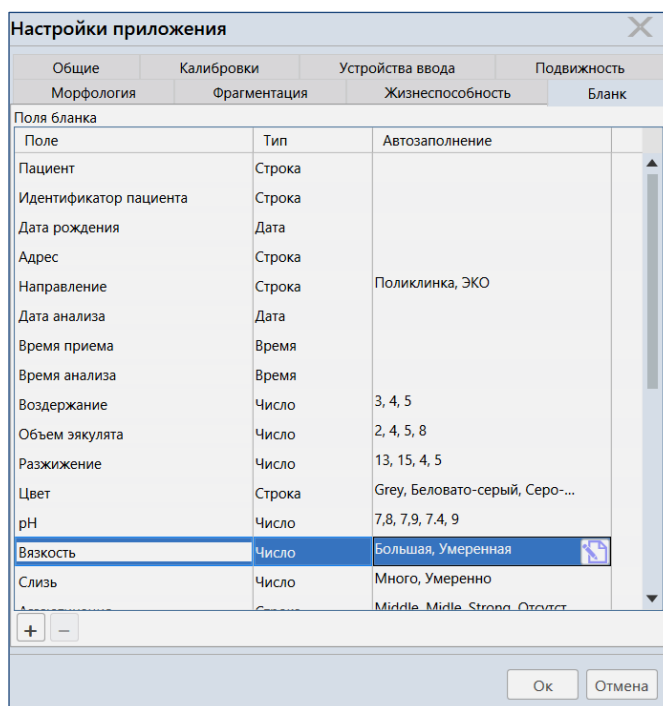



Рис. 10 Диалоговое окно Настройки приложения, активна закладка Бланк

В программу включён список полей, которые нанесены на предустановленные шаблоны бланка. Названия полей отображаются в колонке *Поле бланка*.

Рядом с названием отображается *Тип* поля:

- Строка – текстовое поле для заполнения данными в виде текста;
- Дата – поле для занесения даты;
- Число – поле для заполнения информацией в числовом виде;
- Время - поле для заполнения информацией в формате времени;
- Изображение – поле для отображения изображений;
- Результат – поле для отображения результата анализа.

Колонка *Автозаполнение* позволяет задать набор постоянных значений, которые при заполнении первичных данных и в бланке с результатами можно будет выбирать из выпадающего списка, что позволит экономить время. Эти значения можно занести непосредственно данным окне в колонке *Автозаполнение*.

Для ввода предустановленных значений в эту колонку активизируйте строку с названием поля и нажмите на иконку *Список постоянных значений*  (см. Рис. 10). Формируйте список путём добавления или удаления значений. Для добавления нового значения щёлкните мышью на пустой строке списка и введите значение с клавиатуры. Для удаления строки активизируйте ее и нажмите клавишу DEL или откройте на ней контекстное меню нажатием правой кнопки мыши и используйте команду *Удалить*.

Если в колонку Автозаполнение на закладке Бланк не были занесены значения, то они будут добавляться для каждого поля автоматически по мере ввода новых значений при заполнении начальных данных.

Для добавления нового поля нажмите кнопку **«+»**, и выберите из выпадающего списка необходимый тип поля, введите его название в колонке *Поле*.

Для удаления поля активизируйте его левой кнопкой мыши и нажмите кнопку **«-»**.

Предустановленные поля удалить нельзя!

Нажмите **ОК** для сохранения настроек или **Отмена** для выхода из диалогового окна без сохранения.

КАЛИБРОВКА СИСТЕМЫ ВВОДА

Калибровка – это процедура определения размера пикселя при рабочем увеличении системы в выбранных единицах измерения. Рабочее увеличение складывается из увеличения объектива микроскопа, увеличения адаптера и разрешения камеры.

Каждое изображение состоит из точек - пикселей (их можно увидеть, если сильно увеличить изображение на экране монитора). В процессе обработки изображений программа получает результаты измерений в пикселях. Калибровка проводится для получения результатов измерений не в пикселях, а в реальных единицах – в микронах. В процессе калибровки определяется *калибровочный коэффициент*, показывающий, сколько микрон содержится в одном пикселе при текущем увеличении системы.

ВЫБОР КАЛИБРОВКИ

При поставке АПК **АРГУС - CASA** процедура калибровки системы для всех рабочих увеличений осуществляется техническим специалистом, монтирующим систему. Каждой методике соответствуют разные калибровки, что связано с различным увеличением объективов, рекомендованных для анализа в разных методиках.

Калибровка для каждой методики должна выбираться в рамках выбранной методики, т.е. сначала нужно активизировать методику (тулбар *Выбор методики*), а затем выбрать соответствующую методике калиб-

ровку из списка калибровок (*Текстовое меню Инструменты > Калибровка > Список калибровок*). Информация об используемой в текущий момент калибровке (название и калибровочный коэффициент) отображается в строке **Информации**.

Программа запоминает выбранную в методике калибровку, и при дальнейшей работе переключение на нужную калибровку происходит автоматически при активизации соответствующей методики.

Вместе с программой поставляются предустановленные калибровки для работы с демонстрационными изображениями в каждой методике: Подвижность – Motility20x, Морфология – Morphology100x, Жизнеспособность – Vitality40x, Фрагментация ДНК – defragmentation_50x.

Предустановленные калибровки могут использоваться для анализа только тех изображений и видеороликов, которые поставляются с программой как демонстрационные!

ПРОВЕДЕНИЕ НОВОЙ КАЛИБРОВКИ

В случае самостоятельной установки программы пользователем, необходимо провести калибровку системы для каждой методики.

1. Активизируйте методику, для которой будет проводиться калибровка (тулбар **Выбор методики**);
2. Выберите на микроскопе рабочий объектив для активной методики;
3. Установите на предметный столик микроскопа объект-микрометр, получите его изображение в окне живого видео (*Текстовое меню Ввод*), выберите в окне управления камерой разрешение, при котором будете работать с методикой, и сделайте снимок.
4. В области анализа отобразится изображение или первый кадр видеоролика (для методики Подвижность Poultry);

*Для калибровки также могут быть использованы изображения объект-микрометра, загруженные с диска (*Текстовое меню Открыть*).*

5. Выберите команду текстового меню **Инструменты > Калибровка > Новая калибровка**.

*Если изображение отсутствует в программе, команда **Новая калибровка** неактивна.*

6. В нижней части окна программы под изображением появится панель калибровки (Рис. 11). Установите курсор мыши на первое деление объект-микрометра и щёлкните левой кнопкой. На изображении появится линия (зелёные линии на рисунке). Выровняйте линию параллельно делениям объект-микрометра и щёлкните левой кнопкой мыши ещё раз, чтобы зафиксировать линию;
7. Установите ещё одну параллельную линию на втором делении объект-микрометра;

Следует учитывать, чем больше расстояние, которое измеряется при проведении калибровки, тем выше будет точность калибровочного коэффициента.

8. Укажите название новой калибровки в поле **Имя**;
9. Введите измеренное расстояние в микронах в поле **Расстояние (µm)**;
10. В поле **Расстояние** (пиксели) отображается расстояние между линиями, измеренное в пикселях;
11. Справа от имени калибровки показана информация о калибровочном коэффициенте – сколько микрон содержится в одном пикселе.
12. Нажмите **ОК** для выхода из режима создания калибровки с сохранением результата.
13. Активная калибровка методики изменится на новую, что будет отображено в строке информации. Также новая калибровка добавится в список калибровок.
14. Для выхода из режима создания новой калибровки без сохранения результата нажмите кнопку **Отмена**.

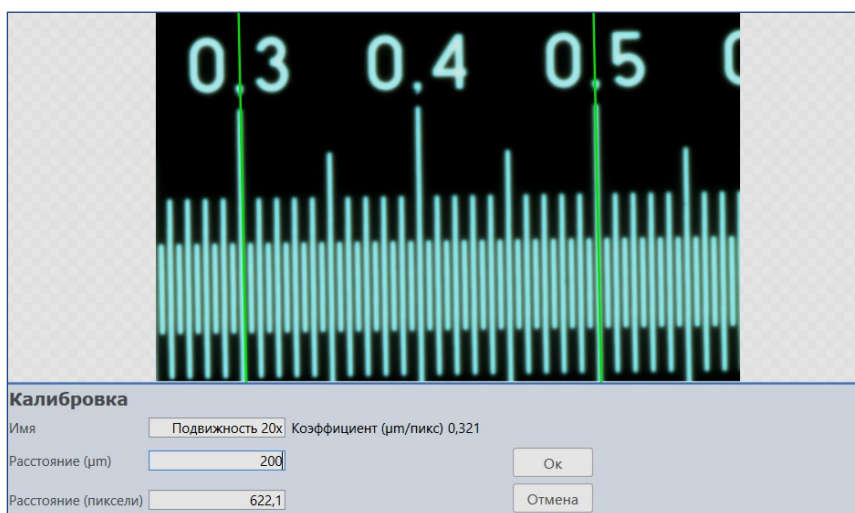


Рис. 11 Панель создания новой калибровки

Проведите подобным образом калибровки для всех методик.

Для удаления, сохранения и восстановления калибровок используйте команды в настройках программы (см. Управление калибровками, стр.24).

УПРАВЛЕНИЕ КАЛИБРОВКАМИ

Активизируйте команду текстового меню **Инструменты** ➤ **Настройки**. В появившемся диалоговом окне **Настройки приложения** активизируйте закладку **Калибровки** (Рис. 12).

Названия и коэффициенты калибровок, созданных в программе ранее, отображаются в списке. Текущая калибровка выделена цветной подсветкой.

Чтобы сменить текущую калибровку, выберите нужную из списка и нажмите кнопку **ОК**. Для выхода без сохранения изменений нажмите на кнопку **Отмена** или клавишу **Esc**.

Кнопка **Удалить** - Удаление выделенной калибровки.

Кнопка **Экспорт** – Сохранение выделенной калибровки в виде файла с расширением *.calibr*. В дальнейшем этот файл может быть использован для восстановления калибровок программы без проведения процедуры новой калибровки. Рекомендуется сохранить все рабочие калибровки на диске!

Кнопка **Импорт** - Загрузка (восстановление) калибровки из файла с расширением *.calibr*. Это может понадобиться при переустановке программы, например, при обновлении версии или переносе на другой компьютер.

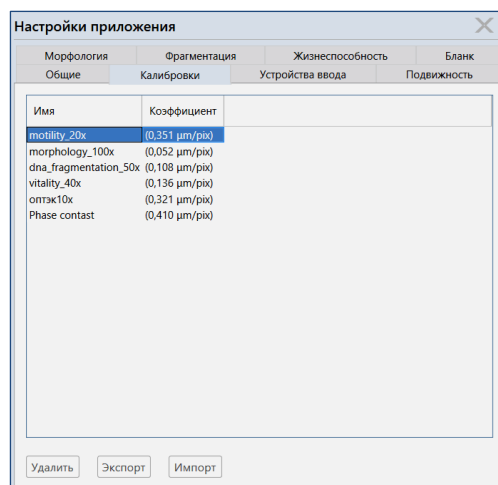


Рис. 12 Окно управление калибровками

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY

ВЫБОР МЕТОДИКИ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY

Нажмите на тулбаре *Выбор методики* кнопку *Подвижность Poultry* – она будет выделена синим подчёркиванием (см. Рис. 7, стр.16). При выборе методики автоматически загрузятся все настройки, с которыми Вы работали в этой методике в последний раз: настройки методики, активная калибровка, настройки камеры, шаблон отчёта и пр.

После инсталляции программы, в ней активны предустановленные настройки для работы с демонстрационными видеороликами, которые находятся на диске с инсталлятором программы в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/ПОДВИЖНОСТЬ/Video1-Video11. Для работы с пользовательскими видео их можно изменить, и методика автоматически запомнит сделанные изменения.

НАСТРОЙКИ МЕТОДИКИ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY

Как правило, настройки методики делаются один раз перед началом работы с образцами и запоминаются программой. Нет необходимости делать настройки каждый раз перед работой.

Активизируйте команду текстового меню **Инструменты** > **Настройки**. В появившемся диалоговом окне **Настройки приложения** активизируйте закладку >**Подвижность** (см. Рис. 13). На ней доступны следующие настройки:

Референтные значения		
Количество сперматозоидов (млн)	39	-
Количество прогрессивных (млн)	-	-
Количество непрогрессивных (млн)	-	-
Количество неподвижных (млн)	-	-
Концентрация сперматозоидов (млн/мл)	15	-
Концентрация прогрессивных (млн/мл)	-	-
Концентрация непрогрессивных (млн/мл)	-	-
Концентрация прогрессивных и непрогрессивных (млн/мл)	-	-
Концентрация неподвижных (млн/мл)	-	-
Концентрация круглых клеток (млн/мл)	-	-

Рис. 13 Настройки методики Подвижность

- **Глубина камеры** – выбор глубины счётной камеры, в которой производится оценка подвижности и концентрации. По умолчанию в программе установлена глубина камеры, равная 10 микронам. Такую глубину имеет камера Маклера, обычно применяемая для проведения анализа спермы. Если Вы используете другую камеру, измените значение глубины камеры. Для этого выберите нужное значение (20 или 100 мкм) из выпадающего списка;
- **Контроль достаточности** - установка количества сперматозоидов, которое необходимо обработать в ходе выполнения методики. Указанное в настройках количество объектов отображается в строке *Информации* в процессе анализа, и при достижении заданного количества цвет надписи

изменяется на зелёный. По умолчанию в программе установлено значение 200 – это минимальное количество по рекомендациям ВОЗ (редакция 5 2010г.) для анализа подвижности. Если Вы хотите увеличить контрольное значение, измените, число с клавиатуры или выберите нужное значение с помощью кнопок ▲▼;

- **Время записи** – установка времени записи видеоролика для каждого поля зрения. По умолчанию каждое видео записывается в течение 2 секунд. Для изменения времени записи выберите нужное значение (от 1 до 5 сек) с помощью кнопок ▲▼;
- **Классификатор** – выбор классификатора, который будет применяться для классификации сперматозоидов по подвижности. Предустановленный классификатор *Подвижность Poultry* предназначен для классификации сперматозоидов домашней птицы. По характеру подвижности сперматозоиды разделяются на три класса:
 - **Прогрессивная подвижность**: сперматозоид двигается активно, либо по линейной траектории, либо по большому кругу независимо от скорости;
 - **Непрогрессивная подвижность**: сохраняются все черты подвижных сперматозоидов, за исключением прогрессии, то есть сперматозоиды плавают малыми кругами, либо наблюдается только слабое движение (биение) хвоста сперматозоида без (или с незначительным) смещением головы;
 - **Неподвижность** характеризуется отсутствием движения.
- Также пользователь может создать свой классификатор, используя функцию *Обучить классификатор* (см. стр.81). В этом случае новый классификатор добавится в список и может быть выбран как активный;
- **Данные результата** - управление набором данных, которые будут отображаться в результате. Включая/выключая «галочки» около названия группы параметров, можно выводить в результате разное количество параметров. По умолчанию включён показ всех параметров;
- **Референтные значения** – для каждого параметра, выводимого в результате подвижности, можно задать референтные значения, т.е. значения нормы. По умолчанию заданы референтные значения в соответствии с рекомендациями ВОЗ для параметров *Количество сперматозоидов*, *Концентрация сперматозоидов*, *Процент прогрессивных*, *Процент прогрессивных+непрогрессивных*. Для задания референтных значений по другим параметрам введите значения нормы в ячейках рядом с названием параметра.

Если ввести значение только в левой ячейке, а в правой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «>», например, «>39»;

Если ввести значение только в правой ячейке, а в левой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «<», например, «<14»;

Если ввести значения в обеих ячейках, то в результате это будет показано, как интервал, например, 39-100.

Нажмите **ОК** для сохранения настроек или **Отмена** для выхода из диалогового окна без сохранения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РАБОТЫ В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ POULTRY

ЗАПОЛНЕНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

Любой анализ начинается с ввода первичных данных, которые необходимы для идентификации образца.


1. Активизируйте команду текстового меню **Новый** – появится диалоговое окно для ввода начальных данных (см. Рис. 14). Набор и расположение полей, которые отображаются в этом окне, определяются шаблоном отчёта, который указан в окне *Инструменты/Настройки/Общие/Бланк нового анализа* (см. Рис. 9, стр.21). В составе программы поставляется предустановленный начальный бланк отчёта *Новый анализ Poultry*. Если необходимо внести в состав начальных данных изменения, то нужно сделать это для данного бланка в режиме *Конструктор бланка отчета*, стр. 68.

Методика Подвижность Poultry

2. Если в документе остались данные от предыдущего анализа, откроется окно с сообщением *Сохранение изменений*. Выберите. **Да**, если хотите сохранить данные. Выберите. **Нет**, если не нужно сохранять содержимое документа. Панель **Содержание** будет очищена, и откроется окно ввода начальных данных. Выберите **Отмена**, чтобы закрыть окно без изменения документа.

Для того, чтобы окно с сообщением о сохранении изменений не появлялось, нужно снять «галочку» с чек-бокса **Показывать запрос на сохранение** в окне **Инструменты/Настройки/Общие** (см. Рис. 9, стр.21).

Заполните все поля начальными данными.

- **Текстовые поля.** Для того чтобы заполнить поле произвольным текстом, щёлкните мышью по полю редактирования и введите нужный текст с клавиатуры;
- **Текстовые поля с выпадающим списком.** Для полей с выпадающим списком выберите нужное значение (щёлкните левой кнопкой мыши по стрелке ▼) из списка или введите с клавиатуры. Состав выпадающего списка буде автоматически дополняться ранее введёнными значениями.
- **Числовые поля** заполняются так же, как текстовые.
- **Поля даты.** По умолчанию в любом поле даты стоит текущая дата. Для того чтобы изменить дату, выполните следующие действия: нажмите на иконку  рядом с датой. Появится календарь на текущий месяц. Текущее число в календаре будет выделено. При необходимости смените год, месяц и число.

3. После заполнения всех данных нажмите **ОК**.

Рис. 14 Окно для заполнения первичных данных.

Если эти данные уже были заполнены ранее при проведении другого анализа, то команду текстового меню **Новый** не нужно активизировать, а открыть с диска сохранённый файл с расширением *svf*, где эта информация уже занесена.

АНАЛИЗ ВИДЕОРОЛИКОВ ИЗ ФАЙЛА

В программе можно анализировать видеоролики непосредственно в режиме съёмки «живого видео» с препарата или предварительно записанные на диск видеоролики.

Рекомендуем сначала освоить работу в методике на примере анализа демонстрационных видеороликов, записанных на диске (USB-флеш-накопителе) с программой АРГУС-CASA в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/ПОДВИЖНОСТЬ/Video1-Video11.

Рассмотрим основные этапы работы в методике на примере анализа демонстрационных видеороликов.

1. Убедитесь, что калибровка, которая отображается в строке *Информации*, соответствует *motility20x*;
2. Откройте с диска (текстовое меню **Открыть**) демонстрационные видеоролики. Иконки открытых видеороликов отобразятся в панели **Содержание**, а активный видеоролик (он выделен в **Содержании** голубой рамкой)- в области анализа;
3. Вы можете проиграть видеоролики с помощью панели просмотра видео;

- Теперь нужно настроить порог сегментации. Это необходимо для того, чтобы программа правильно выделяла головки сперматозоидов, по перемещению которых она строит траектории. Для этого активизируйте команду текстового меню **Инструменты** > **Настройки сегментации**.

Область анализа разделится на две части и внизу откроется панель настройки порога выделения объектов (см. Рис. 15).

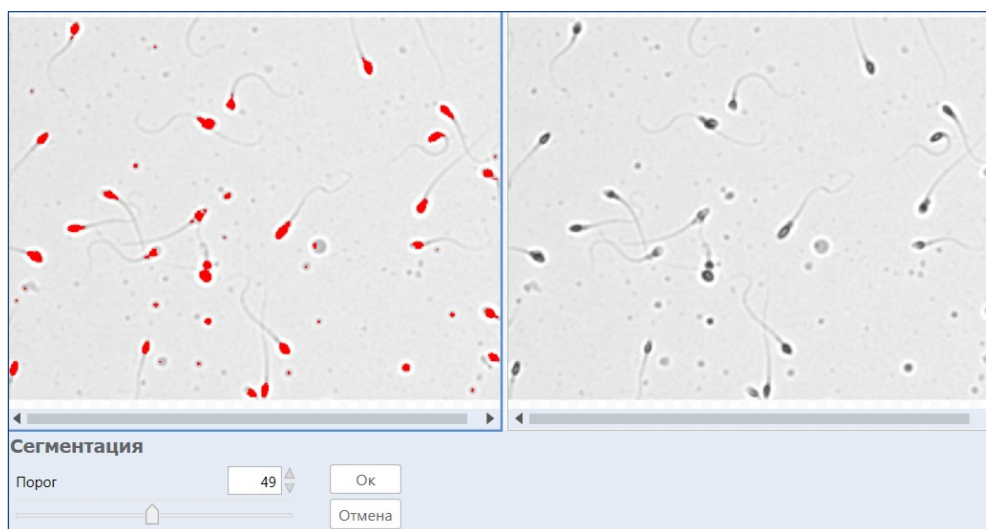



Рис. 15 Вид области анализа в режиме сегментации (выделения масок объектов). Слева – изображение с наложенными масками (красными), справа - исходное изображение.

Порог выделения сперматозоидов следует установить таким образом, чтобы на всем протяжении видеоролика (для возможно большего количества кадров) головки сперматозоидов выделялись верно, т.е. красная маска соответствовала головке сперматозоида. Установите нужное значение порога, используя ползунок, или введите в поле значение с клавиатуры. Для настройки выделения с минимальным шагом 1 нажмите на стрелки  справа от ползунка.

Если головки выделяются не полностью, увеличьте порог выделения. Если же выделяется область, большая по размеру, чем головки сперматозоидов, уменьшите порог выделения (см. Рис. 16).



Рис. 16 Сегментация с разными порогами выделения

Для демонстрационных видеороликов порог сегментации 49-50.

- Нажмите на панели функций на кнопку **Анализ**. - начнётся обработка методикой выбранных в панели **Содержание** видеороликов. Во время анализа отображается индикатор процесса.
- После окончания анализа на видеороликах отображаются цветные траектории движения сперматозоидов. Разные цвета траекторий обозначают разные классы подвижности (см. Рис. 18, стр. 31):
 - Зелёный цвет – прогрессивные;

Методика Подвижность Poultry

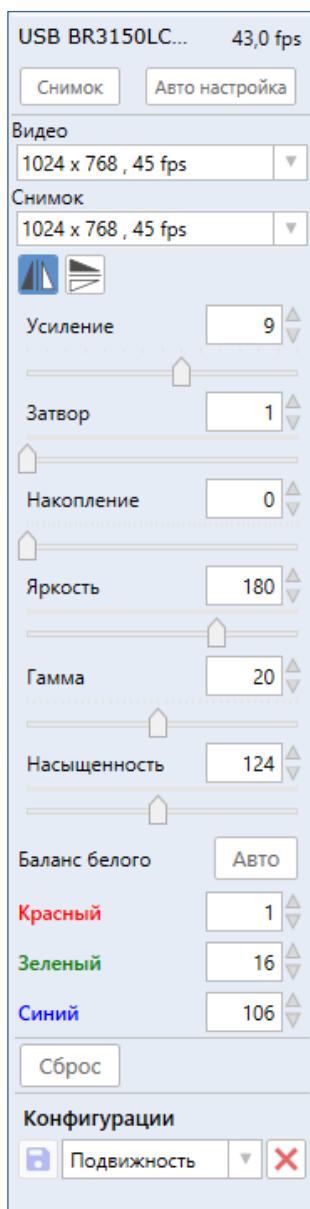
- Синий – непрогрессивные;
- Фиолетовый – неподвижные.
- Красным цветом выделены объекты, не распознанные программой как сперматозоиды (в программе они называются «артефакты»).

7. В строке информации отображается информация о количестве проанализированных объектов.

Для отображения названия класса объекта на видеоролике нажмите на изображении правую кнопку мыши и выберите в контекстном меню Показать подписи.

АНАЛИЗ ПОДВИЖНОСТИ В РЕЖИМЕ СЪЕМКИ С КАМЕРЫ

1. Приготовьте в счётной камере препарат в соответствии с описанием пробоподготовки для методики Подвижность (см. Приложение 1, стр. 85);
2. Установите счётную камеру на микроскоп и выберите участок без сетки. Сфокусируйтесь, чтобы видеть резкое изображение движущихся сперматозоидов. Для съёмки видеороликов рекомендуется использовать объектив 10x или 20x. Увеличение выбирается в зависимости от микроскопа и адаптера. При кратности адаптера 1x рекомендуется объектив 10x или 20x, при кратности 0.5-0.7x используйте объектив 20x. Оптимально, чтобы в кадре было 10-25 сперматозоидов. Если образец более густой, то требуется разведение;
3. Убедитесь, что калибровка, которая отображается в строке *Информации*, соответствует объективу (10x или 20x), с которым производится съёмка;
4. Откройте окно живого видео. Для этого нажмите в текстовом меню пункт *Ввод* (или клавишу F4). Кнопка *Ввод* будет выделена синим цветом. Это означает, что включён режим отображения «живого» видео;
5. Слева откроется панель управления камерой, а в окне программы будет отображаться живое видео с препарата. Вид панели будет зависеть от используемой камеры, но основные элементы и рекомендуемые настройки будут одинаковыми. Рассмотрим настройку на примере камеры ЕС Экспертс BR-3151LC-UF.



- В полях *Видео* и *Снимок* установите разрешение видеороликов, записываемых для методики **Подвижность -1024*768 45 fps**.
- Нажмите кнопку *Автонастройка*, дождитесь окончания операции. В процессе автонастройки программа сама подбирает параметры камеры: усиление, затвор, накопление и гамму.

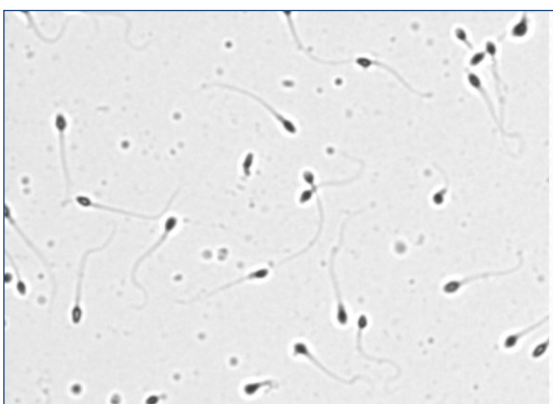
Оцените результат: Вы должны увидеть в окне «живого» видео контрастное изображение со светлым фоном, на котором хорошо видны тёмные сперматозоиды (см. Рис. 17А)

При необходимости подстройте резкость при помощи изменения фокусировки на микроскопе. Рекомендуется небольшая расфокусировка, чтобы головки сперматозоидов были тёмные без просветов внутри!

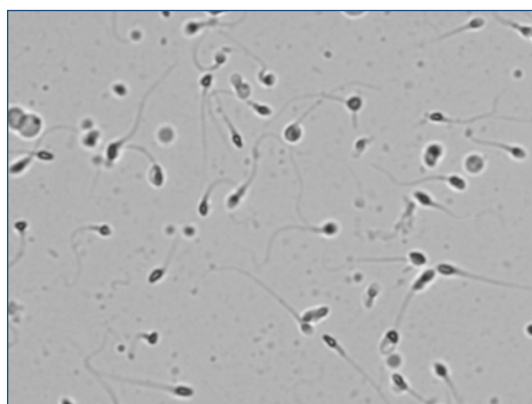
- Важно! Количество кадров в сек (fps, frames per second) должно быть 60-70 fps.

Если Автонастройка не завершилась успешно, а именно fps менее 60 или изображение темное (см. Рис. 17 Б), то нужно изменить регулировки микроскопа. Прибавьте накал лампы на микроскопе или приоткройте апертурную диафрагму. Снова проведите Автонастройку.

- Обратите внимание на то, что при увеличении *Накопления* может уменьшаться количество fps при захвате видеоролика. Необходимо использовать все возможности механической регулировки яркости с помощью микроскопа перед ручной настройкой параметров управления камеры: затвора., яркости и гаммы.
- Параметры *Насыщенность* и *Баланс белого* для съёмки видеороликов не используются.
- Сохраните сделанные настройки как отдельную конфигурацию под именем *Подвижность*. Методика запомнит эту конфигурацию и будет автоматически загружать эти настройки при дальнейшей работе с программой.



А



Б

Рис. 17 Вид изображения при разных настройках камеры: а – хорошее контрастное изображение.; фон светлый, сперматозоиды тёмные. Б – недостаточный контраст, тёмный фон.

Методика Подвижность Poultry

8. После того как сделана настройка, можно начинать анализ видеороликов. Для этого нажимайте на кнопку *Анализ* в панели функция или кнопку *F5* на клавиатуре. Перемещайте препарат, и анализируйте нужно число полей зрения. Необходимое количество анализируемых полей зрения (видеороликов) определяется в зависимости от концентрации образца. Обычно достаточно 8-10 видеороликов. При малом количестве сперматозоидов в поле зрения (до 10 шт.) следует увеличить количество захваченных видеороликов, пока не будет проанализировано нужное количество объектов.

*По нажатию кнопки **Анализ** программа захватывает и обрабатывает видеоролик. Время записи одного видеоролика определяется установкой в окне **Инструменты/Настройки/Подвижность** (см. Рис. 13, стр.25). В строке информации отображается общее количество проанализированных видеороликов и объектов. При достижении достаточности по заданному количеству индикатор меняет цвет на зелёный.*

9. Снятые видеоролики будут отображаться в Панели *Содержание*, а также они автоматически будут сохраняться на жёстком диске в формате avi в каталоге, указанном в настройках (см. место записи файлов с первичными данными, стр.20). Для каждого нового анализа будет автоматически создаваться отдельная папка. Для окончания съёмки отожмите кнопку *Ввод* в текстовом меню или нажмите на любое изображение в панели *Содержание*.

*Если сперматозоиды в образце быстро теряют подвижность, то рекомендуется сначала захватить все видеоролики, а потом их анализировать! Захват видеороликов без проведения анализа - нажатие на кнопку *Снимок* в панели управления камерой. После захвата всех видеороликов нажать на кнопку *Анализ* и дождаться окончания обработки.*


РАБОТА С ВИДЕОРОЛИКАМИ ПОСЛЕ АНАЛИЗА

Вне зависимости от того, как проводился анализ (с «живого видео» или с загруженных с диска видеороликов), дальнейшая последовательность работы в методике будет одинаковой.

Основное назначение этого этапа – проверка результатов классификации и нанесение круглых клеток (лейкоцитов, эпителиальных и незрелых клеток). Для каждого объекта на всех проанализированных видеороликах можно проверить результаты автоматической классификации и при необходимости внести изменения.

*Следует отметить, что результаты классификации проверить и корректировать можно будет и в режиме *Галерея*, а круглые клетки нужно наносить на этом этапе!*

Активизируйте видеоролик в *Содержании*, и он отобразится в *Области анализа*.

*Рекомендуется работать в режиме вида окна, когда область анализа разделена на 2 части по вертикали: слева отображается видеоролик с цветными траекториями, справа – исходное изображение (см. Рис. 18). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре **Вид окна** кнопку **Разделить и синхронизировать** .*

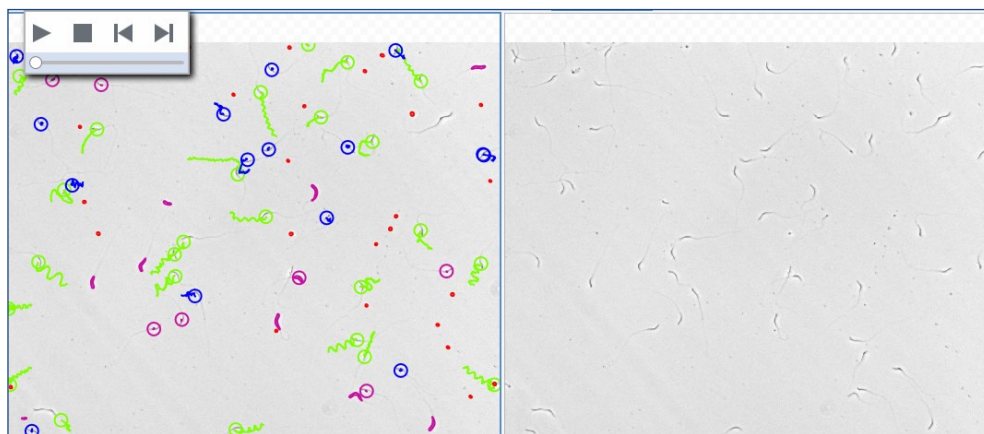


Рис. 18 Подвижность. Вид области анализа в режиме *Разделить и Синхронизировать*


Слева – изображение с траекториями, справа – исходный видеоролик

В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- Пройграть активный видеоролик с помощью *Панели просмотра видео*. Обе части окна будут изменяться синхронно. При этом просмотре хорошо видно, насколько построенные программой траектории соответствуют движению сперматозоидов;
- Увеличить/уменьшить масштаб с помощью панели *Навигатор* или *горячих клавиш «CTRL+» и «CTRL-»* для того, чтобы лучше разглядеть объекты. Обе части окна будут изменять масштаб синхронно;
- Удалить «грязь» - объекты, не являющиеся сперматозоидами. Для этого нажатием правой кнопки мыши на объекте откройте контекстное меню и выберите в нем команды *Удалить* (см. Рис. 19) или активизируйте объект левой кнопкой мыши и нажмите на клавиатуре клавишу *Del*;
- Переклассифицировать объект (назначить ему другой класс). Для этого нажатием правой кнопки мыши на траектории откройте контекстное меню и выберите нужный класс. Траектория автоматически изменит цвет (см. Рис. 19).



Рис. 19 Контекстное меню объекта в методике *Подвижность*

- Нанести круглые клетки на активный видеоролик. Для этого нажмите кнопку  *Круглая клетка* на панели свойств методики. Нанесите клетки на изображение щелчком левой кнопки мыши. Чтобы выйти из режима нанесения, нажмите ещё раз на *кнопку Круглая клетка*.

РЕЖИМ ГАЛЕРЕЯ – КОРРЕКТИРОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Режим просмотра в виде *Галереи* удобен для окончательной проверки и корректировки результатов классификации, т.к. он наглядно отображает все проанализированные объекты, рассортированные по классам подвижности, в виде таблицы изображений (см. Рис. 20). Каждый сперматозоид находится в отдельной ячейке. В заголовке каждого класса представлена информация о количестве объектов в данном классе.

Для перехода в режим просмотра объектов в виде галереи нажмите на панели функций кнопку *Галерея*.

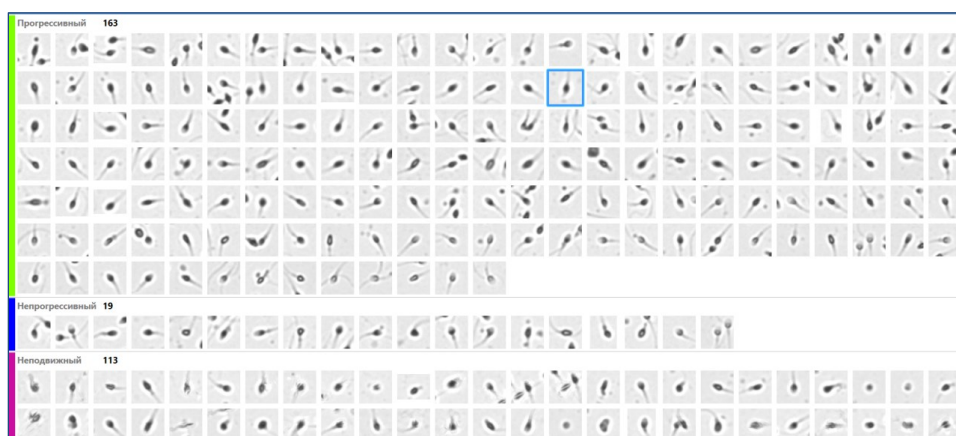



Рис. 20 Методика *Подвижность*. Режим *Галерея*. Ячейки с изображением сперматозоидов рассортированы по классам подвижности: *Прогрессивные, Непрогрессивные, Неподвижные, Артефакты*.

Для просмотра галереи вместе с изображением разделите область анализа на 2 части по вертикали: слева отображается видеоролик с цветными траекториями, справа – Галерея (см. Рис. 21). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать**  При активизации ячейки в галерее активизируется соответствующий объект (траектория) на изображении и наоборот – при активизации объекта на изображении активизируется соответствующая ячейка в Галерее.

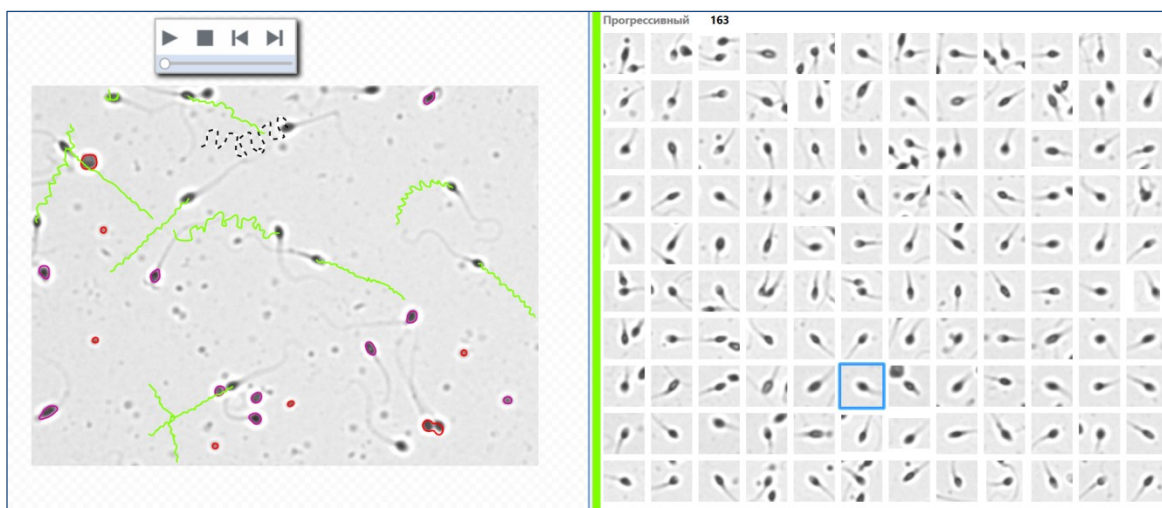


Рис. 21 Методика Подвижность Галерея в режиме Разделить и Синхронизировать слева Изображение с объектами, справа - Галерея. Объект, соответствующий активной ячейке в Галерее, выделен на изображении «бегающей» рамкой.

В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- **Увеличить активную ячейку** для лучшего просмотра. Для этого активизируйте ячейку левой кнопкой мыши и используйте клавишу «+» на клавиатуре или вызовите команду **Увеличить** из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши).
- **Удалить единственный объект**, не являющийся сперматозоидом. Это может быть клетка или грязь, имеющая такую же форму и размер как сперматозоид, и поэтому ошибочно определенная программой как сперматозоид. Для этого активизируйте ячейку галереи (она выделится голубой рамкой) и нажмите кнопку **Del** на клавиатуре или вызовите команду **Удалить** из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши);
- **Удалить одновременно несколько объектов**, ошибочно определенных, как сперматозоиды. Для этого сначала выделите нужные ячейки, щелкая на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг всех отмеченных ячеек появятся голубые рамки. Удалите их, нажав **Del** на клавиатуре или вызовите команду **Удалить** из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши).
- **Удалить все объекты в классе Артефакты**. Для этого вызовите команду **Удалить артефакты** из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши). При удалении артефактов в Галерее, они автоматически удалятся и со всех видеороликов;
- **Изменить класс объекта**. Для этого наведите курсор мыши на ячейку, нажмите левую кнопку и, удерживая ее, слегка переместите курсор – под курсором появится тулбар с названиями классов (см. Рис. 22). Щёлкните на нужной иконке, - объект будет перенесён в указанный класс.

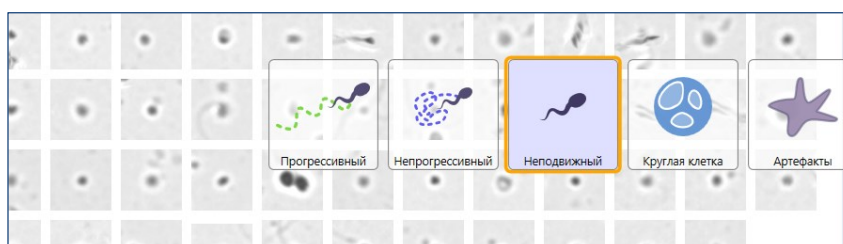


Рис. 22 Тулбар назначения класса в Галерее

Просмотр галереи в виде таблицы

Таблица – это вид представления галереи, где для каждого объекта приведены результаты измерений набора параметров.

Для показа таблицы вызовите команду **Таблица** из контекстного меню Галереи.

Для просмотра таблицы вместе с видеороликом разделите область анализа на 2 части по вертикали: слева отображается видеоролик с цветными траекториями, справа – Таблица (см. Рис. 23). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре **Вид окна** кнопку **Разделить и синхронизировать**. При активизации строки в таблице активизируется соответствующий объект (траектория) на изображении и наоборот – при активизации объекта на изображении активизируется соответствующая строка в Таблице. Для отображения слева Галереи активизируйте часть окна с изображением и нажмите на панели функций кнопку Галерея.

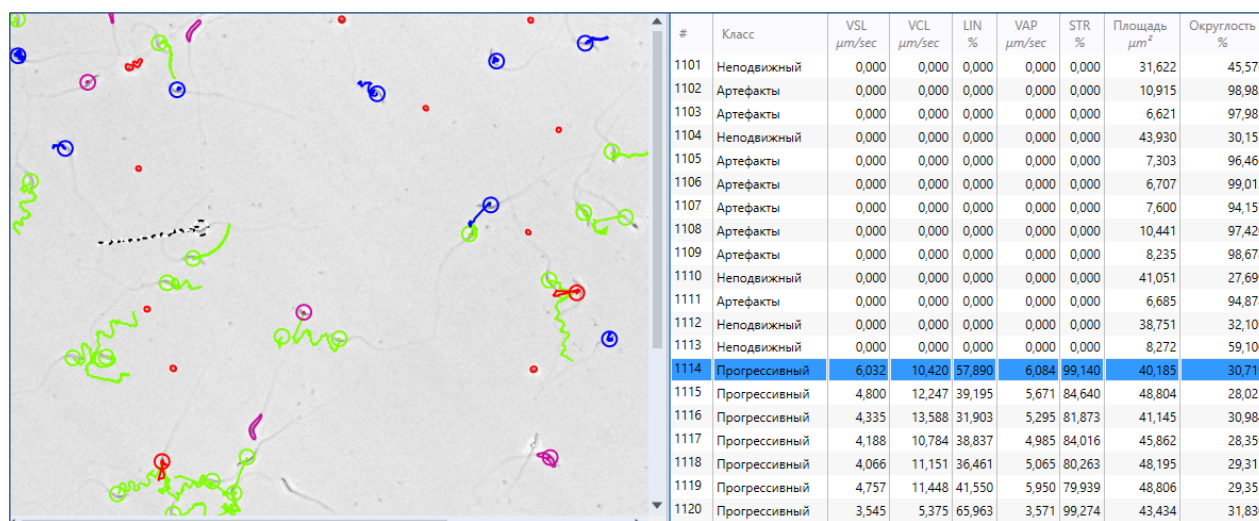


Рис. 23 Подвижность. Область анализа разделена на 2 части: слева изображение с объектами, справа – таблица.

Столбцы таблицы – измеренные параметры, Строки таблицы – это название класса подвижности и набор измеренных параметров для данного объекта. Описание измеренных параметров приведено в Приложение 5, стр. 92.

ПРОСМОТР РЕЗУЛЬТАТА В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ ROULTRY

После того, как проверены результаты автоматической классификации, можно перейти в режим просмотра результата анализа по всем обработанным видеороликам. Для этого нажмите на панели функций кнопку **Результат**.

Все данные разделены на несколько групп (см. Рис. 24).

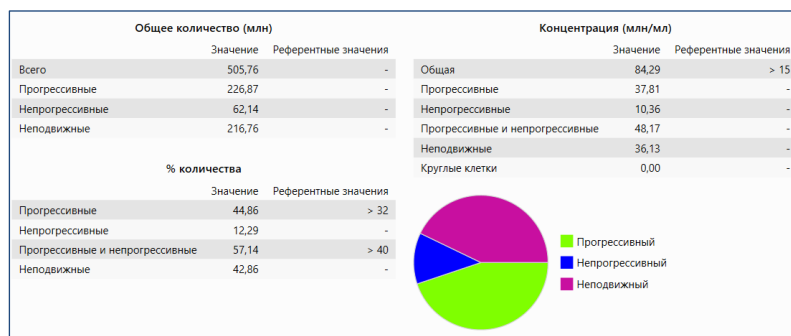


Рис. 24 Вид результата в методике Подвижность

Методика Подвижность Poultry

- **Общее количество** – общее количество сперматозоидов во всем объеме эякулята. Рассчитывается по формуле: количество в 1 мл (концентрация)*Объем эякулята (значение объема вводится в начальных данных). Данные приведены для всех сперматозоидов, а также для каждого класса в отдельности;
- **Процент (%) количества** – процентное содержание по количеству для каждого класса относительно всех проанализированных сперматозоидов;
- **Концентрация** – количество в 1 мл (млн/мл). Данные рассчитаны для общего количества, для каждого класса, для суммы прогрессивные + непрогрессивные, а также для круглых клеток;
- **Цветная диаграмма** – визуальное отображение процентного соотношения сперматозоидов разных классов подвижности.

*Для правильного расчёта концентрации нужно учитывать степень разбавления эякулята. Для пересчёта концентрации с учётом степени разбавления нужно выбрать в панели свойств методики из выпадающего списка **Разбавление** нужное значение. После этого результат по концентрации и общему количеству будет пересчитан с учётом указанного значения.*

Для каждого параметра рядом с результатом анализа отображается значение нормы (Столбец *Референтное значение*). По умолчанию приведены значения для нескольких параметров из рекомендаций ВОЗ 2010г. При необходимости изменить предустановленные референтные значения или добавить новые нужно открыть окно Настройки методики ПОДВИЖНОСТЬ, стр.25.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ МОРФОЛОГИЯ

ВЫБОР МЕТОДИКИ МОРФОЛОГИЯ

Нажмите на тулбаре *Выбор методики* кнопку Морфология (см. Рис. 7, стр.16), – она будет выделена синим подчёркиванием. При выборе методики автоматически загрузятся все настройки, с которыми Вы работали в этой методике в последний раз: настройки методики, активная калибровка, настройки камеры, шаблон отчёта и пр.

После инсталляции программы, в ней активны предустановленные настройки для работы с демонстрационными изображениями, которые находятся на диске с инсталлятором программы в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/МОРФОЛОГИЯ/М1-М9. Для работы с пользовательскими изображениями их можно изменить, и методика автоматически запомнит сделанные изменения.

НАСТРОЙКИ МЕТОДИКИ МОРФОЛОГИЯ

Как правило, настройки методики делаются один раз перед началом работы с препаратами и запоминаются программой. Нет необходимости делать настройки каждый раз перед работой.

Активизируйте команду текстового меню **Инструменты** ➤ **Настройки**. В появившемся диалоговом окне **Настройки приложения** активизируйте закладку ➤ **Морфология** (см. Рис. 25). На ней доступны следующие настройки:

Референтные значения		
Количество сперматозоидов	-	-
Процент нормальных	4	100
Процент паталогий	-	-
Процент дефектов головки	-	-
Процент дефектов шейки	-	-
Процент дефектов ERC	-	-
Процент дефектов хвост	-	-
Лейкоциты	-	-
Эпителиальные клетки	-	-
Незрелые клетки	-	-
Изолированные хвосты	-	-
Изолированные головки	-	-

Рис. 25 Настройки методики Морфология

- **Контроль достаточности** - установка количества сперматозоидов, которое необходимо обработать в ходе выполнения методики. Указанное в настройках количество объектов отображается в строке *Информации* в процессе анализа, и при достижении заданного количества цвет надписи изменяется на зелёный цвет. По умолчанию в программе установлено значение 200 – это минимальное количество по рекомендациям ВОЗ (редакция 5 2010г.) для анализа подвижности. Если Вы хотите увеличить контрольное значение, измените, число с клавиатуры или выберите нужное значение с помощью кнопки
- **Классификатор** – выбор классификатора, который будет применяться для классификации сперматозоидов по морфологическим формам. В программе есть два предустановленных классификатора

(Морфология и Diff-Quick), которые настроены для классификации морфологических форм сперматозоидов человека на мазках, приготовленных по рекомендуемой методике (см. Приложение 2. Пробоподготовка для методики Морфология, стр. 87), но обучены в разных лабораториях. Оба предустановленных классификатора автоматически классифицирует сперматозоиды на норму (если дефектов не обнаружено) и на патологию при наличии дефектов. Рекомендуется использовать тот, который наиболее точно проводит автоматическую классификацию на ваших препаратах.

- Автоматически определяются следующие дефекты:

Дефекты головки	
По форме	Коническая, Грушевидная, Круглая, Аморфная
По размеру	Большая, Маленькая
По доле акросомы	Без акросомы, меньше 40%
По наличию вакуолей	Больше 2 или Вакуоли в постакросомальной области
Дефекты шейки	
По расположению	Изогнутая, Ассиметричная
По размеру	Тонкая, Толстая
ERC	Цитоплазматическая капля
Дефекты хвоста	Назначаются пользователем вручную после проведения автоматического анализа!

- Также пользователь может создать свой классификатор, используя функцию *Обучить классификатор* см. стр.81). В этом случае новый классификатор добавится в список и может быть выбран как активный;
- **Данные результата** - управление набором данных, которые будут отображаться в результате. Включая/выключая «галочки» около названия группы параметров, можно выводить в результате разное количество параметров. По умолчанию включён показ всех параметров;
- **Референтные значения** – для каждого параметра, выводимого в результате морфологии, можно задать референтные значения, т.е. значения нормы. По умолчанию заданы референтные значения в соответствии с рекомендациями ВОЗ для параметров *Процент нормальных*. Для задания референтных значений по другим параметрам введите значения нормы в ячейках рядом с названием параметра.

Если ввести значение только в левой ячейке, а в правой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «>», например, «>39»;

Если ввести значение только в правой ячейке, а в левой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «<», например, «<14»;

Если ввести значения в обеих ячейках, то в результате это будет показано, как интервал, например, 39-100.

Нажмите **ОК** для сохранения настроек или **Отмена** для выхода из диалогового окна без сохранения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РАБОТЫ В МЕТОДИКЕ МОРФОЛОГИЯ

ЗАПОЛНЕНИЕ НАЧАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Если Вы продолжаете работу с образцом, для которого уже вводили первичные данные и выполнили какой-либо анализ, то ничего заполнять не нужно. Если анализ Морфологии делается для нового образца, то активизируйте команду текстового меню **Новый** – появится диалоговое окно для ввода начальных данных (см. Рис. 14, стр. 27). Введите первичные данные и нажмите кнопку ОК.

АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ОТКРЫТЫХ С ДИСКА

В программе можно анализировать изображения непосредственно в режиме съемки «живого видео» с препарата или снимки, предварительно записанные на диск.

Рекомендуем сначала освоить работу в методике на примере анализа демонстрационных изображений, записанных на диске (USB-флеш-накопителе) с программой APYCY-CASA в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/МОРФОЛОГИЯ /M1.jpg-M9.jpg.

Рассмотрим основные этапы работы в методике на примере анализа демонстрационных изображений.

- Убедитесь, что калибровка, которая отображается в строке *Информации*, соответствует предустановленной *morphology100x*;
- Откройте с диска (текстовое меню **Открыть**) демонстрационные изображения. Иконки открытых изображений отобразятся в панели **Содержание**, а активное изображение (оно выделено в **Содержании** голубой рамкой) - в области анализа;
- Теперь нужно настроить порог сегментации. Это необходимо для того, чтобы программа правильно выделяла головки и шейки сперматозоидов. Для этого активизируйте команду текстового меню **Инструменты** > **Настройки сегментации**.

Область анализа разделится на две части и внизу откроется панель настройки порога выделения объектов (см. Рис. 26).

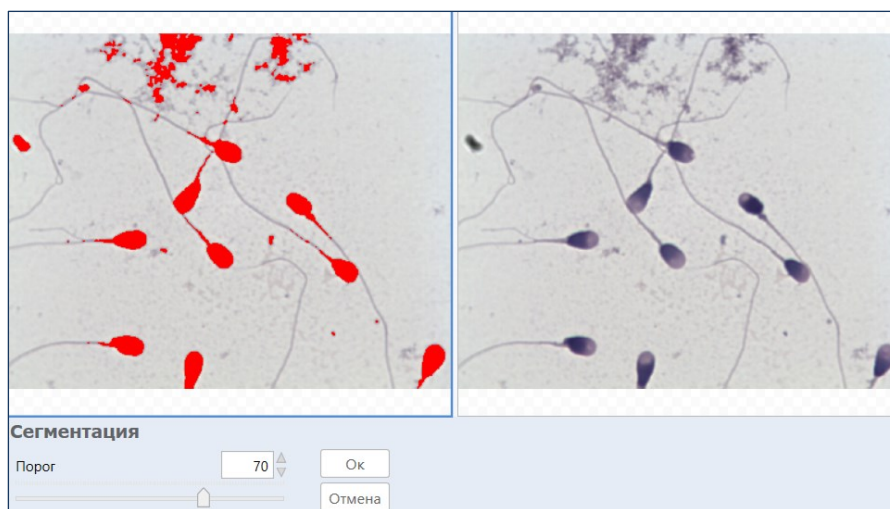

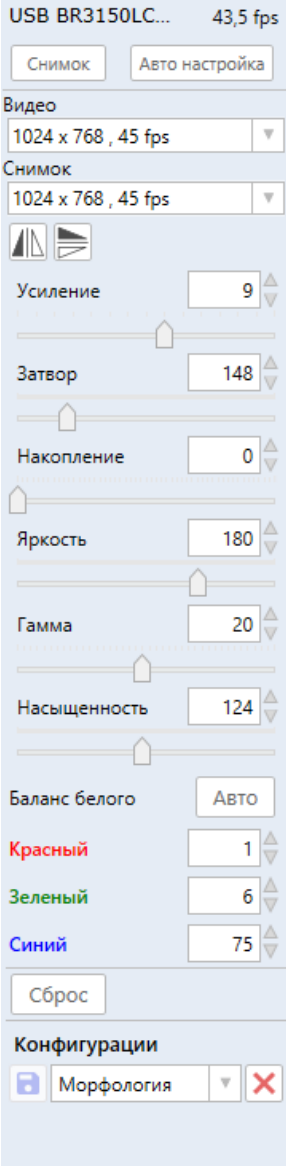


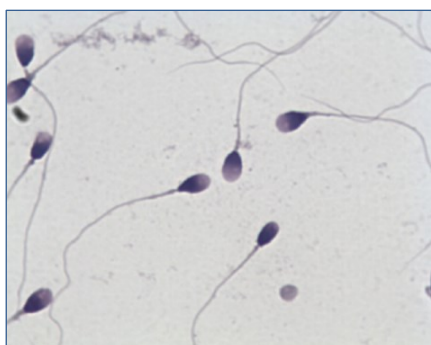
Рис. 26 Методика Морфология. Вид области анализа в режиме сегментации (выделения масок объектов). Слева – изображение с наложенными масками (красными), справа - исходное изображение

Порог выделения сперматозоидов следует установить таким образом, чтобы красная маска была наложена на головку и шейку сперматозоида. Установите нужное значение порога, используя ползунок, или введите в поле значение с клавиатуры. Для настройки выделения с минимальным шагом 1 нажмите на стрелки  справа от ползунка.

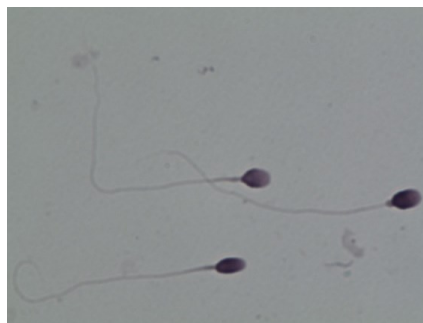
Если головки и шейки выделяются не полностью, увеличьте порог выделения. Если же выделяется область хвоста, уменьшите порог выделения (см. Рис. 16).

10. Слева откроется панель управления камерой, а в окне программы будет отображаться живое видео с препарата. Вид панели будет зависеть от используемой камеры, но основные элементы и рекомендуемые настройки будут одинаковыми. Рассмотрим настройку на примере камеры. ЕС Экспертс BR-3151LC-UF.

	<ul style="list-style-type: none"> - В полях <i>Видео</i> и <i>Снимок</i> установите разрешение изображений, записываемых для методики Морфология -. 1024*768 6 45 fps - Нажмите кнопку <i>Автонастройка</i>, дождитесь окончания операции. В процессе автонастройки программа сама подбирает параметры камеры: усиление, затвор, накопление и гамму - Оцените результат: Вы должны увидеть в окне «живого» видео цветное контрастное изображение со светлым фоном, на котором хорошо видны окрашенные сперматозоиды с акросомой. - При необходимости подстройте резкость при помощи изменения фокусировки на микроскопе. - Если Автонастройка не завершилась успешно, а именно изображение тёмное (см. Рис. 29 Б), то нужно изменить регулировки микроскопа. Прибавьте накал лампы на микроскопе или приоткройте апертурную диафрагму. Снова проведите <i>Автонастройку</i>. - Обратите внимание на то, что при увеличении <i>Накопления</i> может уменьшаться количество fps при захвате изображения. Для того, чтобы не было задержки отображения в окне живого видео при фокусировке, количество fps должно быть не менее 8 кадров в сек. Необходимо использовать все возможности механической регулировки яркости с помощью микроскопа перед настройкой <i>Накопления</i>. - Автоматический <i>Баланс белого</i> настраивает параметры цвета; - Изменяйте параметр <i>Насыщенность</i> и параметры по цветам (Красный, Зелёный, Синий) для ручной регулировки цветопередачи; - Сохраните сделанные настройки как отдельную конфигурацию под именем <i>Морфология</i>. Методика запомнит эту конфигурацию и будет автоматически загружать ее при дальнейшей работе с программой.
--	---



А



Б

Рис. 29 Вид изображения при разных настройках камеры: а – хорошее контрастное изображение, фон светлый, сперматозоиды тёмные. Б – недостаточный контраст, тёмный фон.

- После того как сделана настройка, можно начинать анализ. Для этого нажимайте на кнопку Анализ в Панели функций или кнопку F5 на клавиатуре. Перемещайте препарат, и анализируйте нужное число полей зрения. Необходимое количество изображений определяется в зависимости от концентрации сперматозоидов в одном поле зрения (по требованиям ВОЗ для достоверности анализа нужно набрать не менее 200 сперматозоидов).

По нажатию кнопки Анализ программа захватывает и обрабатывает изображение. В строке информации отображается количество проанализированных изображений и объектов. При достижении достаточности по заданному количеству индикатор меняет цвет на зелёный.

- После окончания анализа на изображениях отображаются цветные контуры объектов. (см. Рис. 28, стр. 39):
 - Зелёный цвет – нормальная форма, т.е. нет автоматически определенных программой дефектов головки и шейки;
 - Синий цвет – патологическая форма, т.е. в процессе автоматического анализа найдены дефекты головок и (или) шеек;
 - Красным цветом выделены объекты, не распознанные программой как сперматозоиды (в программе они называются «артефакты»).
- Снятые изображения будут отображаться в Панели Содержание, а также они автоматически будут сохраняться на жёстком диске в формате png в каталоге, указанном в настройках (см. место записи файлов с первичными данными, стр.20). Для каждого нового образца будет автоматически создаваться отдельная папка. Для окончания съёмки нажмите кнопку Ввод в текстовом меню или нажмите на любое изображение в панели Содержание.


РАБОТА С ИЗОБРАЖЕНИЯМИ ПОСЛЕ АНАЛИЗА

Вне зависимости от того, как проводился анализ (с «живого видео» или с загруженных с диска изображений), дальнейшая последовательность работы в методике будет одинаковой.

Основное назначение этого этапа – проверка результатов автоматической классификации, редактирование контуров, нанесение клеток, отличных от сперматозоидов, удаление «грязи». Для каждого объекта на всех проанализированных изображениях можно проверить результаты классификации и при необходимости внести изменения.

Проверить и корректировать результаты назначения дефектов и классификации удобнее режиме Галерея (см. стр.43), но клетки, отличные от сперматозоидов, нужно наносить на этом этапе!

Активизируйте изображение в *Содержании*, и оно отобразится в *Области анализа*.

*Рекомендуется работать в режиме вида окна, когда область анализа разделена на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными контурами, справа – исходное изображение (см. Рис. 30). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать** .*

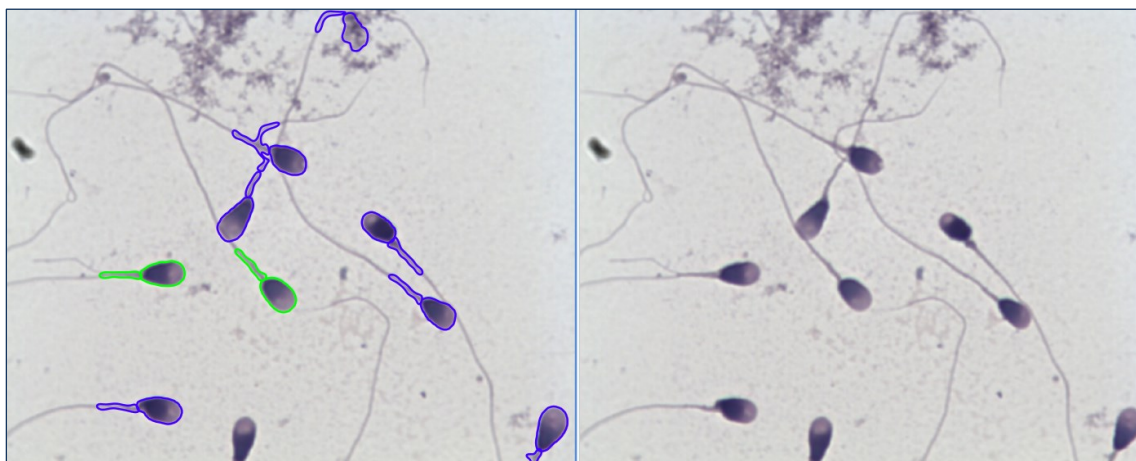



Рис. 30 Морфология. Вид области анализа в режиме Разделить и Синхронизировать

Слева – изображение с цветными контурами, справа – исходное изображение

В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- Увеличить/уменьшить масштаб с помощью панели *Навигатор* или *горячих клавиш «CTRL+» и «CTRL-»*, для того, чтобы лучше разглядеть объекты. Обе части окна будут изменять масштаб синхронно;
- Показать, как выделены акросомы для всех сперматозоидов. Для этого нажмите на тулбаре **Вид окна** кнопку *Показать маски*  или на клавиатуре комбинацию клавиш CTRL+M;
- Удалить «грязь» - объекты, не являющиеся сперматозоидами. Для этого нажатием правой кнопки мыши на объекте откройте контекстное меню и выберите в нем команды *Удалить* или активизируйте объект правой кнопкой мыши и нажмите на клавиатуре клавишу *Del*;
- Проверить и при необходимости изменить дефекты, назначенные при автоматической классификации. Для этого активизируйте на изображении сперматозоид нажатием *левой* кнопки мыши, - в правой части окна программы откроется панель *Дефекты* (см. Рис. 31). Используйте эту панель для переназначения дефектов головки и шейки и назначения дефектов хвоста и ERC.

	<p>На панели в виде «иконки» представлены все дефекты, которые нужно учитывать по требованиям ВОЗ 2010;</p> <p>Если для активного сперматозоида не было определено ни одного дефекта, то он классифицируется, как Норма, и на панели дефектов будет выделена «иконка» <i>Без дефектов</i>;</p> <p>Дефекты, обнаруженные для активного сперматозоида, выделены голубым цветом;</p> <p>Для назначения нового дефекта для активного сперматозоида нужно нажать на соответствующую «иконку», - она выделится голубым цветом;</p> <p>Для снятия дефекта нужно нажать на «иконку», и выделение с неё будет снято.</p>
--	---

Рис. 31 Морфология. Вид панели дефектов


- Нанести на изображения объекты, не относящиеся к сперматозоидам: *лейкоциты, незрелые клетки, эпителиальные клетки, изолированные головы, изолированные хвосты*. Для этого в панели свойств методики нажмите на кнопку  и выберите из выпадающего списка вид клеток (см.

Рис. 32). Выбранное название будет выделено голубым цветом. Нанесите клетки на изображение щелчком левой кнопки мыши. Каждый тип объекта будет выделен цветным контуром. Чтобы выйти из режима нанесения дополнительных объектов, нажмите на кнопку с названием клетки еще раз.

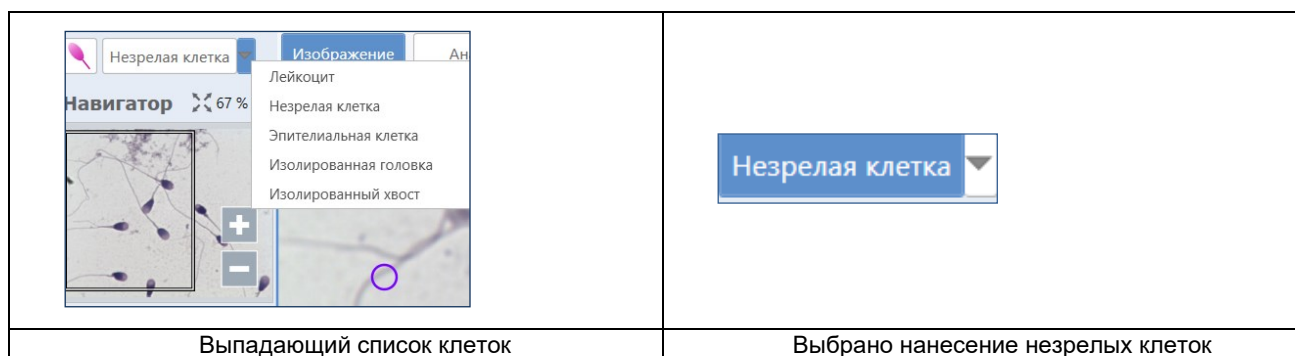



Рис. 32 Список выбора клеток на панели свойств

- **Редактирование контуров объектов.** Если контуры головок сперматозоидов, полученные после обработки изображений в методике **Морфология**, не соответствуют изображению, то в программе предусмотрена возможность их отредактировать. Для этого в панели свойств методики активизируйте кнопку **Редактировать объекты** . Нажмите левую кнопку мыши, и не отпуская ее, нанесите контур головки. Наносимый контур будет выделен пунктиром. Когда контур будет соответствовать головке, отпустите левую кнопку мыши.

При редактировании головки сперматозоида контуры шеи, полученные при первоначальном выделении, будут утеряны. Дефекты шеи, если они были назначены сперматозоиду, также пропадут. Назначьте необходимые дефекты с помощью панели дефектов.

Для выхода из режима редактирования отключите кнопку **Редактировать объекты** в панели свойств методики.

Морфология. Режим галерея – корректировка результатов анализа

Режим просмотра в виде *Галереи* удобен для проверки и корректировки результатов классификации, т.к. он наглядно отображает все проанализированные объекты, рассортированные на классы *Норма* и *Патология*, *Лейкоциты*, *Незрелые клетки*, *Эпителиальные клетки*, *Изолированные головы*, *Изолированные хвосты* в виде таблицы изображений (см. Рис. 33). Каждый объект находится в отдельной ячейке. В заголовке каждого класса представлена информация о количестве объектов в данном классе.

Для перехода в режим просмотра объектов в виде галереи нажмите на панели функций кнопку *Галерея*.

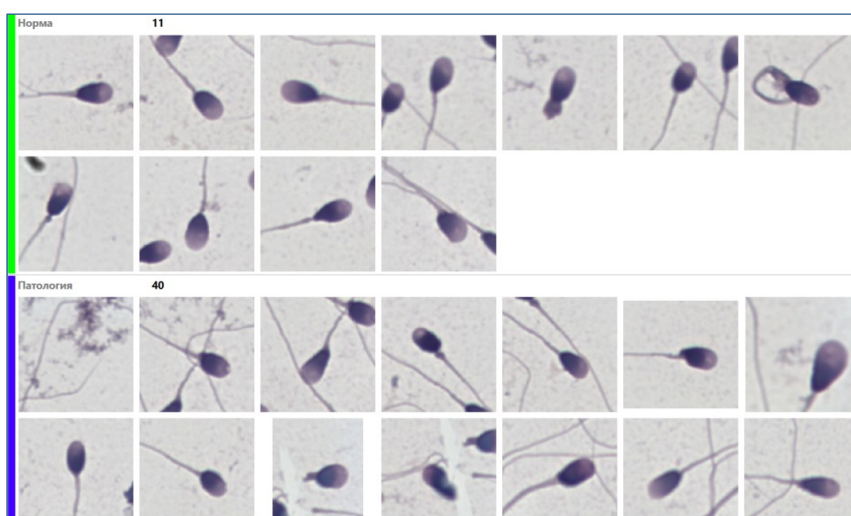



Рис. 33 Методика Морфология. Режим Галерея. Ячейки с изображением сперматозоидов рассортированы по классам *Норма*, *Патология*, *Артефакты*.

Для просмотра галереи вместе с изображением разделите область анализа на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными контурами объектов, справа – Галерея (см. Рис. 34). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать** . При активизации ячейки в галерее активизируется соответствующий объект на изображении и наоборот – при активизации объекта на изображении активизируется соответствующая ячейка в Галерее

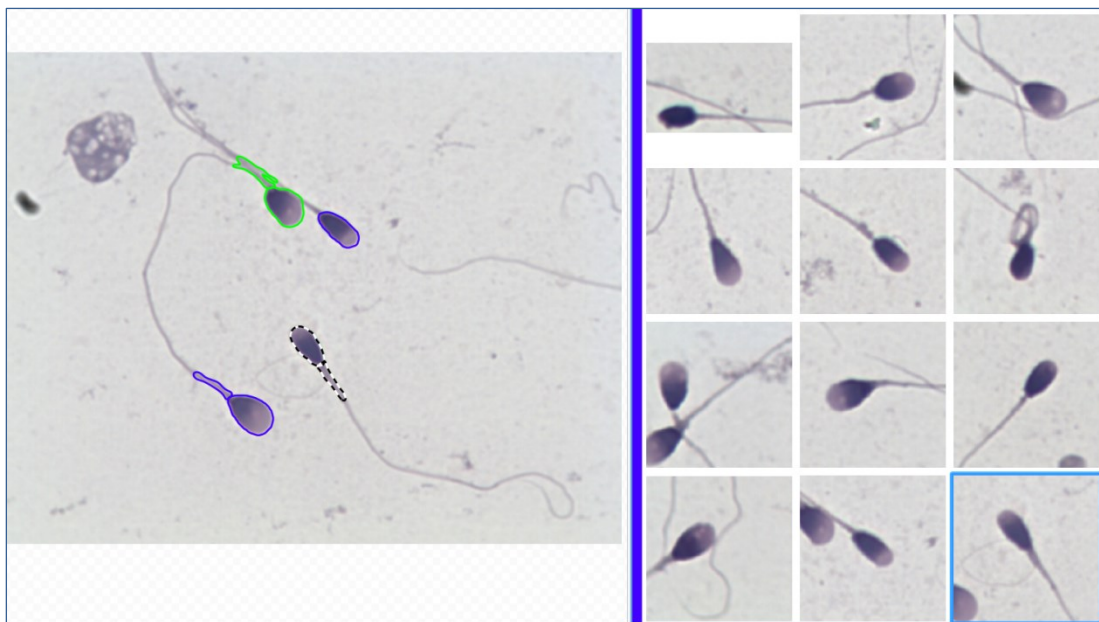


Рис. 34 Методика Морфология. Галерея в режиме Разделить и Синхронизировать слева Изображение с объектами, справа - Галерея. Объект, соответствующий активной ячейке в Галерее, выделен на изображении «бегающей» рамкой.

Просмотрите всю галерею и сделайте необходимые исправления результатов автоматической классификации. В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- **Увеличить активную ячейку** для лучшего просмотра. Для этого активизируйте ячейку левой кнопкой мыши и используйте клавишу «+» на клавиатуре или вызовите команду *Увеличить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши).
- **Удалить единственный объект**, который не должен учитываться в анализе. Это может быть клетка или грязь, имеющая такую же форму и размер как сперматозоид, и поэтому ошибочно определенная программой как сперматозоид. Для этого активизируйте ячейку галереи (она выделится голубой рамкой) и нажмите кнопку *Del* на клавиатуре или вызовите команду *Удалить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши);
- **Удалить одновременно несколько объектов**, ошибочно отнесённых к сперматозоидам. Для этого сначала выделите нужные ячейки, щелкая на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг всех отмеченных ячеек появятся голубые рамки. Удалите их, нажав *Del* на клавиатуре или вызовите команду *Удалить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши).
- **Назначить или удалить дефекты** для каждого сперматозоида. Для этого активизируйте нажатием левой мыши ячейку галереи, и на *Панели дефектов* активизируются иконки дефектов, определенные для активного сперматозоида. При необходимости вручную измените или удалите ранее назначенные дефекты, активизируя или снимая активность с «иконки» с соответствующим дефектом.

Если снять все дефекты (иконка «Без дефектов»), то сперматозоид автоматически будут перенесён в класс *Норма*.


- Удалить все объекты в классе Артефакты. Для этого вызовите команду Удалить артефакты из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши). При удалении артефактов в Галерее, автоматически удалятся контуры соответствующих объектов со всех изображений.

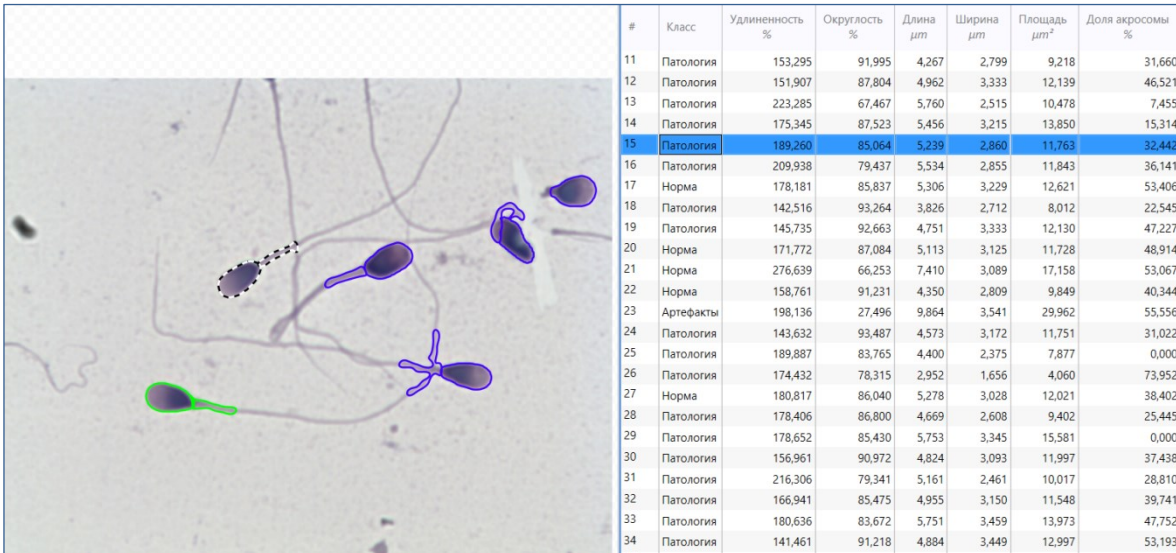
Морфология. Просмотр галереи в виде таблицы

Таблица – это вид представления галереи, где для каждого объекта приведены результаты измерений набора параметров.

Для показа таблицы вызовите команду **Таблица** из контекстного меню **Галереи**.

Для просмотра таблицы вместе с изображением разделите область анализа на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными контурами, справа – Таблица. (см. Рис. 35). Для

перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать**  При активизации строки в таблице активизируется соответствующий объект на изображении и наоборот – при активизации объекта на изображении активизируется соответствующая строка в Таблице. Для отображения слева Галереи активизируйте часть окна с изображением и нажмите на панели функций кнопку Галерея.

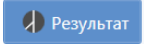


#	Класс	Удлиненность %	Округлость %	Длина мкм	Ширина мкм	Площадь мкм ²	Доля акросомы %
11	Патология	153,295	91,995	4,267	2,799	9,218	31,660
12	Патология	151,907	87,804	4,962	3,333	12,139	46,521
13	Патология	223,285	67,467	5,760	2,515	10,478	7,455
14	Патология	175,345	87,523	5,456	3,215	13,850	15,314
15	Патология	189,260	85,064	5,239	2,860	11,763	32,442
16	Патология	209,938	79,437	5,534	2,855	11,843	36,141
17	Норма	178,181	85,837	5,306	3,229	12,621	53,406
18	Патология	142,516	93,264	3,826	2,712	8,012	22,545
19	Патология	145,735	92,663	4,751	3,333	12,130	47,227
20	Норма	171,772	87,084	5,113	3,125	11,728	48,914
21	Норма	276,639	66,253	7,410	3,089	17,158	53,067
22	Норма	158,761	91,231	4,350	2,809	9,849	40,344
23	Артефакты	198,136	27,496	9,864	3,541	29,962	55,556
24	Патология	143,632	93,487	4,573	3,172	11,751	31,022
25	Патология	189,887	83,765	4,400	2,375	7,877	0,000
26	Патология	174,432	78,315	2,952	1,656	4,060	73,952
27	Норма	180,817	86,040	5,278	3,028	12,021	38,402
28	Патология	178,406	86,800	4,669	2,608	9,402	25,445
29	Патология	178,652	85,430	5,753	3,345	15,581	0,000
30	Патология	156,961	90,972	4,824	3,093	11,997	37,438
31	Патология	216,306	79,341	5,161	2,461	10,017	28,810
32	Патология	166,941	85,475	4,955	3,150	11,548	39,741
33	Патология	180,636	83,672	5,751	3,459	13,973	47,752
34	Патология	141,461	91,218	4,884	3,449	12,997	53,193

Рис. 35 Морфология. Область анализа разделена на 2 части: слева изображение с объектами, справа – таблица

Столбцы таблицы – измеренные параметры, Строки таблицы – это название класса и набор измеренных параметров для данного объекта. Описание параметров в таблице измерений приведено в Приложение 6, стр.93.

ПРОСМОТР РЕЗУЛЬТАТА В МЕТОДИКЕ МОРФОЛОГИЯ

После того, как Вы проверили и внесли исправления в **Галерею**, можно переходить к просмотру результата анализа по всем обработанным изображениям. Для этого нажмите на панели функций кнопку  **Результат**.

Все данные результата разделены на несколько групп (см. Рис. 36, стр. 46).

Общая статистика			Дефекты головки	
Кол-во	%	Референтные значения	Кол-во	%
Норма	3	5,26	4-100	-
Патология	54	94,74	-	-
С патологией головки	51	94,44	-	-
С патологией шейки	20	37,04	-	-
С патологией хвоста	2	3,70	-	-
ERC	8	14,81	-	-
Индексы аномалии			Дефекты шейки	
Индекс	Референтные значения		Кол-во	%
MAI (Индекс аномалий)	1,65	-	Изогнутая	3 15,00
TZI (Индекс тератозооспермии)	1,50	< 1,6	Ассиметричная	2 10,00
SDI (Индекс деформации)	1,70	< 1,6	Толстая	7 35,00
			Тонкая	0 0,00
			ERC	8 40,00
Другие клетки			Дефекты хвоста	
Кол-во на 100 сперматозоидов	Референтные значения		Кол-во	%
Лейкоциты	0,00	-	Изогнутый	0 0,00
Эпителиальные клетки	0,00	-	Короткий	0 0,00
Незрелые клетки	0,00	-	Скрученный	1 50,00
Изолированные головки	0,00	-	Петля	1 50,00
Изолированные хвосты	0,00	-		

Рис. 36 Вид результата в методике Морфология

Группа Общая статистика	
Норма	Количество и % количества нормальных сперматозоидов от всех проанализированных. Предустановленное референтное значение $\geq 4\%$ (по ВОЗ 2010г.)
Патология	Количество и % количества патологических сперматозоидов от всех проанализированных.
С патологией головки	Количество и % количества сперматозоидов с патологией головки. Расчёт % производится относительно всех проанализированных сперматозоидов. Если для сперматозоида назначено несколько дефектов головки, то учитывается только 1.
С патологией шеи	Количество и % количества сперматозоидов с патологией шейки. Расчёт % производится относительно всех проанализированных сперматозоидов. Если для сперматозоида назначено несколько дефектов шейки, то учитывается только 1.
С патологией хвоста	Количество и % количества сперматозоидов с патологией хвоста. Расчёт % производится относительно всех проанализированных сперматозоидов. Если для сперматозоида назначено несколько дефектов хвоста, то учитывается только 1.
ERC	Количество и % количества сперматозоидов с цитоплазматической каплей. Расчёт % производится относительно всех проанализированных сперматозоидов
Группа Дефекты головки	

Коническая	Количество и % количества головок, имеющих <i>коническую</i> форму. % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Грушевидная	Количество и % количества головок, имеющих <i>грушевидную</i> форму. % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Круглая	Количество и % количества головок, имеющих <i>круглую</i> форму. % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Аморфная (бесформенная)	Количество и % количества головок, имеющих <i>аморфную</i> форму. % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Плоская	Количество и % количества головок, имеющих <i>плоскую</i> форму. % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Малая	Количество и % количества головок <i>малого размера</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Большая	Количество и % количества головок <i>большого размера</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Нет акросомы	Количество и % количества головок <i>без акросомы</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Акросома < 40%	Количество и % количества головок, в которых <i>акросома занимает менее 40%</i> от площади головки. % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Акросома >70%	Количество и % количества головок, в которых <i>акросома занимает более 70%</i> от площади головки. % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Вакуоль > 2	Количество и % количества головок, в которых обнаружено <i>более двух вакуолей</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Вакуоль ПА	Количество и % количества головок, в которых обнаружены <i>вакуоли в постакросомальной области</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов головки.
Всего дефектов головки	Суммарное количество всех патологий головы. % кол-ва в сумме составляет 100%.
Группа Дефекты шейки	
Изогнутая	Количество и % количества <i>изогнутых шеек</i> (присоединение к головке под острым углом). % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов шейки.

Ассиметричная	Количество и % количества <i>шеек, имеющих ассиметричное присоединение к головке</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов шейки
Толстая	Количество и % количества <i>шеек с широким основанием</i> (место присоединения к головке). % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов шейки
Тонкая	Количество и % количества <i>тонких</i> <i>шеек</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов шейки
ERC	Количество и % количества <i>сперматозоидов с излишней остаточной цитоплазмой</i> (цитоплазматической каплей). % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов шейки.
Всего дефектов шейки	Суммарное количество всех патологий <i>шеек</i> . % кол-ва в сумме составляет 100%.
Группа Дефекты хвоста	
Короткий	Количество и % количества <i>сперматозоидов с разными типами дефектов хвоста</i> . % количества рассчитывается от суммарного числа всех обнаруженных дефектов хвоста.
Изогнутый	
Скрученный	
Двойной	
Всего дефектов хвоста	Суммарное количество всех патологий <i>хвоста</i> . % кол-ва в сумме составляет 100%.
Группа Другие клетки	
Лейкоциты	Количество клеток, отличных от <i>сперматозоидов</i> . Рассчитывается количество на 100 <i>сперматозоидов</i> .
Незрелые клетки	
Эпителиальные клетки	
Изолированные головы	
Изолированные хвосты.	
Группа Индексы аномалий	
MAI Индекс множественных аномалий	Суммарное количество <i>дефектов головок, шеек и хвостов</i> , разделённое на количество <i>патологических сперматозоидов</i> .

<p style="text-align: center;">TZI Индекс тератозооспермии</p>	<p>Похожий на MAI индекс, отличающийся от него тем, что в расчёт количества патологий принимаются по одному дефекту для головы, шеи, хвоста и ERC от каждого сперматозоида, а не все дефекты этого сперматозоида как при расчёте MAI. Количество посчитанных дефектов делится на число патологических сперматозоидов.</p>
<p style="text-align: center;">SDI Индекс деформации спермы</p>	<p>Общее количество патологий, делённое на общее количество сперматозоидов (патологических и нормальных). Общее количество патологий считается следующим образом: все патологии голов сперматозоидов суммируются, и к этой сумме прибавляется по одному дефекту от каждой шеи и от каждого хвоста.</p>
<p>Цветная диаграмма – визуальное отображение процентного соотношения сперматозоидов разных типов дефектов: патология головки, шейки, хвоста, ERC (построена по данным группы <i>Общая статистика</i>).</p>	

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

ВЫБОР МЕТОДИКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Нажмите на тулбаре *Выбор методики* (см. Рис. 7, стр.16) кнопку *Жизнеспособность*, – она будет выделена синим подчёркиванием. При выборе методики автоматически загрузятся все настройки, с которыми Вы работали в этой методике в последний раз: настройки методики, активная калибровка, настройки камеры, шаблон отчёта и пр.

После инсталляции программы, в ней активны предустановленные настройки для работы с демонстрационными изображениями, которые находятся на диске с инсталлятором программы в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ/Жзн1-Жзн5. Для работы с пользовательскими изображениями их можно изменить, и методика автоматически запомнит сделанные изменения.


НАСТРОЙКИ МЕТОДИКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Как правило, настройки методики делаются один раз перед началом работы с препаратами и запоминаются программой. Нет необходимости делать настройки каждый раз перед работой.

Активизируйте команду текстового меню **Инструменты** ➤ **Настройки**. В появившемся диалоговом окне **Настройки приложения** активизируйте закладку ➤ **Жизнеспособность** (см. Рис. 37). На ней доступны следующие настройки:

Общие	Калибровки	Устройства ввода	Подвижность
Морфология	Фрагментация	Жизнеспособность	Бланк
Контроль достаточности <input type="text" value="200"/>			
Данные результата			
<input checked="" type="checkbox"/> Статистика <input checked="" type="checkbox"/> Диаграмма			
Референтные значения			
Процент мёртвых	<input type="text" value="-"/>	-	<input type="text" value="-"/>
Процент живых	<input type="text" value="58"/>	-	<input type="text" value="-"/>

Рис. 37 Настройки методики Жизнеспособность

- **Контроль достаточности** - установка количества сперматозоидов, которое необходимо обработать в ходе выполнения методики. Указанное в настройках количество объектов отображается в строке *Информации* в процессе анализа, и при достижении заданного количества цвет надписи изменяется на зелёный. По умолчанию в программе установлено значение 200 – это минимальное количество по рекомендациям ВОЗ (редакция 5 2010г.) для анализа жизнеспособности. Если Вы хотите увеличить контрольное значение, измените, число с клавиатуры или выберите нужное значение с помощью кнопки .
- **Данные результата** - управление набором данных, которые будут отображаться в результате. Включая/выключая «галочки» около названия группы параметров, можно выводить в результате разное количество параметров. По умолчанию включён показ всех параметров;
- **Референтные значения** – для каждого параметра, выводимого в результате методики, можно задать референтные значения, т.е. значения нормы. По умолчанию заданы референтные значения в соответствии с рекомендациями ВОЗ для параметра *Процент живых*. Для задания референтных значений по другим параметрам введите значения нормы в ячейках рядом с названием параметра.

Если ввести значение только в левой ячейке, а в правой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «>», например, «>39»;

Если ввести значение только в правой ячейке, а в левой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «<», например, «<14»;

Если ввести значения в обеих ячейках, то в результате это будет показано, как интервал, например, 39-100.

Нажмите **ОК** для сохранения настроек или **Отмена** для выхода из диалогового окна без сохранения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РАБОТЫ В МЕТОДИКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

ЗАПОЛНЕНИЕ НАЧАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Если Вы продолжаете работу с образцом, для которого уже вводили первичные данные и выполнили какой-либо анализ, то ничего заполнять не нужно. Если анализ жизнеспособности делается для нового образца, то активизируйте команду текстового меню **Новый** – появится диалоговое окно для ввода начальных данных (см. Рис. 14, стр. 27). Введите первичные данные и нажмите кнопку ОК.

Если для образца ранее был сохранен файл документа с расширением *sfg*, содержащий начальные данные и результаты других анализов, то перед началом работы с методикой загрузите его с диска.

АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ОТКРЫТЫХ С ДИСКА

В программе можно анализировать изображения непосредственно в режиме съёмки «живого видео» с препарата или снимки, предварительно записанные на диск.

Рекомендуем сначала освоить работу в методике на примере анализа демонстрационных изображений, записанных на диске (USB-флеш-накопителе) с программой АРГУС-CASA в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ/Жзн1-Жзн5.

Рассмотрим основные этапы работы в методике на примере анализа демонстрационных изображений.

- Убедитесь, что калибровка, которая отображается в строке *Информации*, соответствует предустановленной *vitality40x*;
- Откройте с диска (текстовое меню **Открыть**) демонстрационные изображения. Иконки открытых изображений отобразятся в панели **Содержание**, а активное изображение (оно выделено в **Содержании** голубой рамкой) - в области анализа;
- Теперь нужно настроить параметры сегментации. Это необходимо для того, чтобы программа правильно выделяла сперматозоиды. Для этого активизируйте команду текстового меню **Инструменты** > **Настройки сегментации**.

Область анализа разделится на две части и внизу откроется панель настройки выделения объектов (см. Рис. 38).

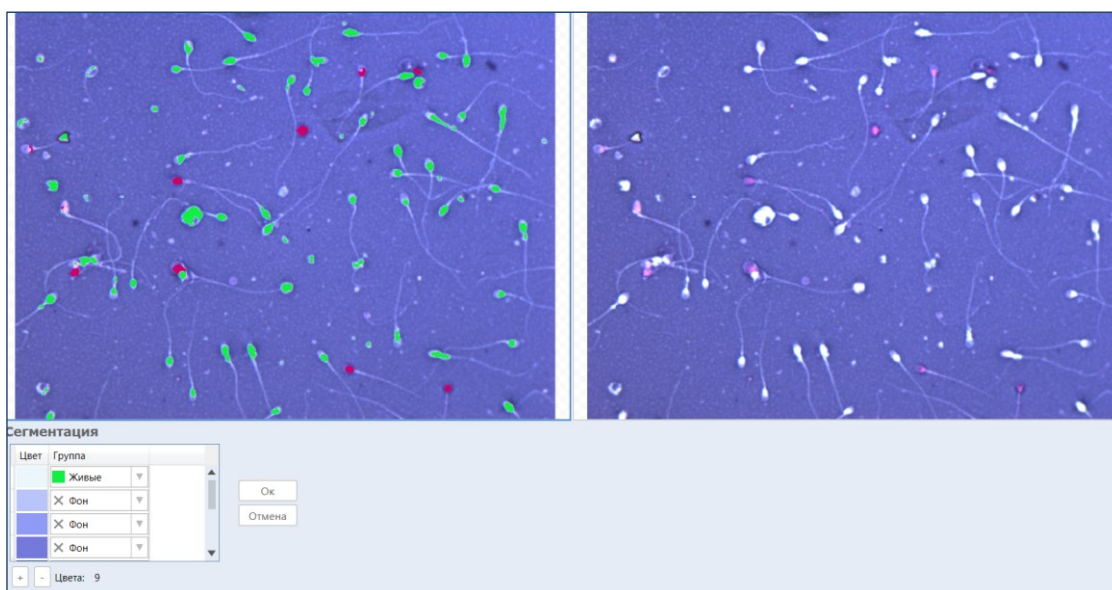


Рис. 38 Методика Жизнеспособность. Вид области анализа в режиме сегментации (выделения масок объектов). Слева – изображение с наложенными масками (красный цвет- мёртвые, зелёный – живые), справа - исходное изображение

В методике *Жизнеспособность* анализ проводится на мазках, где головки и шейки мёртвых сперматозоидов окрашены в красный или темно-розовый цвет, а цвет живых неокрашенных – белый.

Сегментация производится по цвету. Все цвета изображения автоматически разделяются на цветовые интервалы (отображаются в колонке *Цвет*). Чтобы указать, какие цвета на изображении относятся к группе *Живые*, *Мёртвые* или *Фон*, необходимо в выпадающем списке рядом с цветовым интервалом выбрать нужную группу (см. Рис. 38).

Настройки выделения сперматозоидов следует выбрать таким образом, чтобы красные и зелёные маски соответствовали головкам сперматозоидов.

На демонстрационных изображениях нужно установить разделение на 9 диапазонов, выбрать белый цвет для живых, для мёртвых – темно-розовый, для Фона – фиолетовые разного оттенка (см. Рис. 38).


- После настройки сегментации нажмите на кнопку на панели функций кнопку *Анализ*. - начнётся обработка методикой выбранных в панели Содержание изображений. Во время анализа отображается индикатор процесса.
- После окончания анализа на изображениях отображаются цветные контуры и маски объектов. (см. Рис. 39, стр.54):
 - Зелёный цвет – живые (неокрашенные);
 - Красный цвет – мёртвые (окрашенные);

В строке информации отображается информация о количестве проанализированных объектов.

*Для отображения названия класса объекта нажмите на изображении правую кнопку мыши и выберите в контекстном меню *Показать подписи*.*

АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ В РЕЖИМЕ СЪЕМКИ С КАМЕРЫ

- Приготовьте препарат в соответствии с описанием пробоподготовки для методики Жизнеспособность (см. Приложение 3, стр.89);
- Установите препарат на микроскоп, выберите объектив 40x (или 50x) и сфокусируйтесь.
- Убедитесь, что калибровка, которая отображается в строке Информации, соответствует объективу, с которым производится съёмка;
- Откройте окно живого видео. Для этого нажмите в текстовом меню пункт *Ввод* (или клавишу F4). Кнопка *Ввод* будет выделена синим цветом. Это означает, что включён режим отображения «живого» видео;
- Слева откроется панель управления камерой, а в окне программы будет отображаться живое видео с препарата. Вид панели будет зависеть от используемой камеры, но основные элементы и рекомендуемые настройки будут одинаковыми. Рассмотрим настройку на примере камеры Progres СТ3.

<p>11. </p>	<ul style="list-style-type: none"> – В полях <i>Видео</i> и <i>Снимок</i> установите разрешение изображений, записываемых для методики Жизнеспособность-1024x768 XGA. – Нажмите кнопку <i>Автонастройка</i>, дождитесь окончания операции. В процессе автонастройки программа сама подбирает параметры камеры: экспозицию, усиление и гамму. – Оцените результат: Вы должны увидеть в окне «живого» видео цветное контрастное изображение с темно фиолетовым фоном, на котором хорошо видны сперматозоиды. – При необходимости подстройте резкость при помощи изменения фокусировки на микроскопе. – Если Автонастройка не завершилась успешно, а именно изображение тёмное, то нужно изменить регулировки микроскопа. Прибавьте накал лампы на микроскопе или приоткройте апертурную диафрагму. Снова проведите <i>Автонастройку</i>. – Обратите внимание на то, что при увеличении Экспозиции может уменьшаться количество fps при захвате изображения. Для того, чтобы не было задержки отображения в окне живого видео, количество fps должно быть не менее 8 кадров в сек. Необходимо использовать все возможности механической регулировки яркости с помощью микроскопа перед настройкой Экспозиции. – Автоматический <i>Баланс белого</i> настраивает параметры цвета относительно фона. – Изменяйте параметр <i>Насыщенность</i> для регулировки цветопередачи; – Сохраните сделанные настройки как отдельную конфигурацию под именем <i>Жизнеспособность</i>. Методика запомнит эту конфигурацию и будет автоматически загружать ее при дальнейшей работе с программой.
---	--

- После того как сделана настройка, можно начинать анализ. Для этого нажимайте на кнопку **Анализ** в Панели функций или кнопку F5 на клавиатуре. Перемещайте препарат, и анализируйте нужное число полей зрения. Необходимое количество изображений определяется в зависимости от концентрации сперматозоидов в одном поле зрения (по требованиям ВОЗ для достоверности анализа нужно набрать не менее 200 сперматозоидов).

По нажатию кнопки Анализ программа захватывает и обрабатывает изображение. В строке информации отображается количество проанализированных изображений и объектов. При достижении достаточности по заданному количеству индикатор меняет цвет на зелёный.

- После окончания анализа на изображениях отображаются цветные контуры объектов и маски:
 - Зелёный цвет – живые (неокрашенные);
 - Красный цвет – мёртвые (окрашенные);
- Снятые изображения будут отображаться в панели *Содержание*, а также они автоматически будут сохраняться на жёстком диске в формате png в каталоге, указанном в настройках (см. место записи файлов с первичными данными, стр.20). Для каждого нового образца будет автоматически создаваться отдельная папка. Для окончания съёмки отождимте кнопку *Ввод* в текстовом меню или нажмите на любое изображение в панели *Содержание*.

РАБОТА С ИЗОБРАЖЕНИЯМИ ПОСЛЕ АНАЛИЗА

Вне зависимости от того, как проводился анализ (с «живого видео» или с загруженных с диска изображений), дальнейшая последовательность работы в методике будет одинаковой.

Основное назначение этого этапа – проверка результатов автоматической классификации и удаление посторонних элементов («грязи»).

Активизируйте изображение в *Содержании*, и оно отобразится в *Области анализа*.

*Рекомендуется работать в режиме вида окна, когда область анализа разделена на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными контурами, справа – исходное изображение (см. Рис. 39). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать***

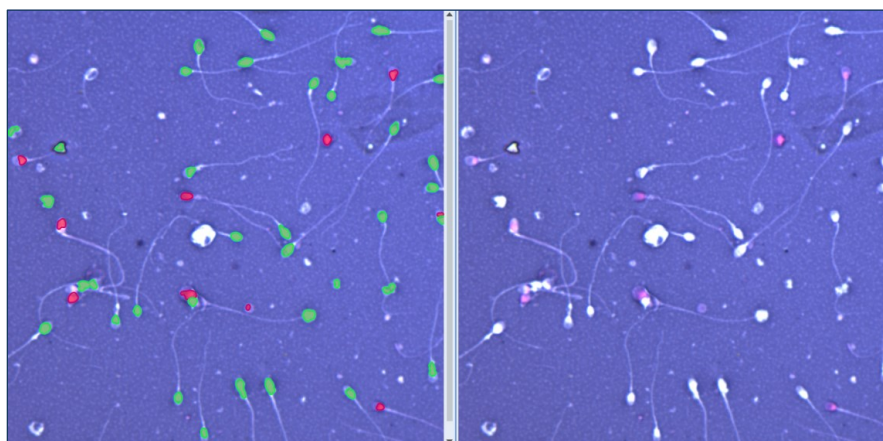


Рис. 39 Жизнеспособность. Вид области анализа в режиме Разделить и Синхронизировать
Слева – изображение с цветными контурами и масками, справа – исходное изображение

В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- Увеличить/уменьшить масштаб с помощью панели *Навигатор* или горячих клавиш «CTRL+» и «CTRL-», для того, чтобы лучше разглядеть объекты. Обе части окна будут изменять масштаб синхронно;
- Удалить «грязь» - объекты, не являющиеся сперматозоидами. Для этого нажатием правой кнопки мыши на объекте откройте контекстное меню и выберите в нем команды *Удалить* или активизируйте объект правой кнопкой мыши и нажмите на клавиатуре клавишу *Del*;
- Проверить и при необходимости изменить класс объекта (*Живые* или *Мёртвые*), назначенные при автоматической классификации. Для этого нажатием правой кнопки мыши на объекте откройте контекстное меню и выберите в нем нужный класс;
- Нанести на изображения сперматозоиды, которые были не выделены автоматически, или несколько контактирующих клеток выделены, как один объект. Для нанесения клетки в панели свойств методики (находится над *Навигатором*) нажмите на кнопку и выберите из выпадающего списка класс клеток - *Живые* или *Мёртвые* (см. Рис. 40). Выбранное название будет выделено голубым цветом. Наносите клетки на изображение щелчком левой кнопки мыши. Каждый тип объекта будет выделен цветным контуром. Для контактирующих сперматозоидов, выделенных как один объект, предварительно его удалите, а затем наносите клетки. Чтобы выйти из режима нанесения объектов, нажмите на кнопку с названием клетки ещё раз.

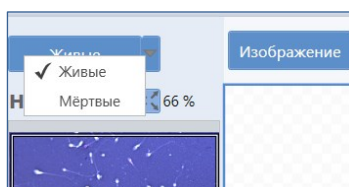


Рис. 40 Жизнеспособность. Список выбора клеток на панели свойств.

Жизнеспособность. Режим галерея – корректировка результатов анализа

Режим просмотра в виде *Галереи* удобен для проверки и корректировки результатов классификации, т.к. он наглядно отображает все проанализированные объекты, рассортированные на классы *Живые* и *Мёртвые* (см. Рис. 41). Каждый объект находится в отдельной ячейке. В заголовке каждого класса представлена информация о количестве объектов в данном классе.

Для перехода в режим просмотра объектов в виде галереи нажмите на панели функций кнопку *Галерея*.

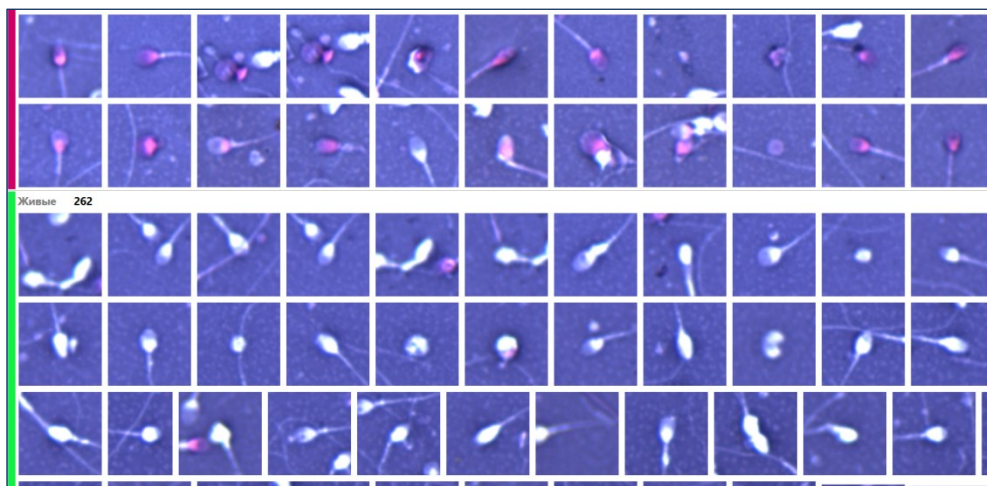



Рис. 41 Методика Жизнеспособность. Режим Галерея.

Ячейки с изображением сперматозоидов рассортированы по группам *Живые* и *Мертвые*.

Для просмотра галереи вместе с изображением разделите область анализа на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными траекториями, справа – Галерея (см. Рис. 34). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре **Вид окна** кнопку **Разделить и синхронизировать** . При активизации ячейки в галерее активизируется соответствующий объект на изображении и наоборот – при активизации объекта на изображении активизируется соответствующая ячейка в Галерее.

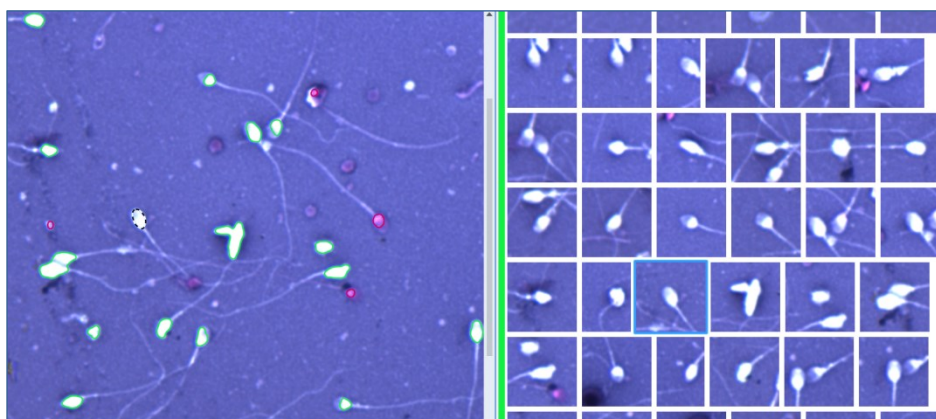


Рис. 42 Методика Жизнеспособность. Галерея в режиме *Разделить и Синхронизировать* слева Изображение с объектами, справа - Галерея. Объект, соответствующий активной ячейке в Галерее, выделен на изображении «бегающей» рамкой.

Просмотрите всю галерею и сделайте необходимые исправления результатов автоматической классификации. В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- *Увеличить активную ячейку* для лучшего просмотра. Для этого активизируйте ячейку левой кнопкой мыши и используйте клавишу «+» на клавиатуре или вызовите команду *Увеличить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши).
- *Удалить единственный объект*, который не должен учитываться в анализе. Это может быть клетка или грязь, имеющая такую же форму и размер как сперматозоид, и поэтому ошибочно определенная программой как сперматозоид. Для этого активизируйте ячейку галереи (она выделится голубой

рамкой) и нажмите кнопку *Del* на клавиатуре или вызовите команду *Удалить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши);

- *Удалить одновременно несколько объектов*, ошибочно отнесённых к сперматозоидам. Для этого сначала выделите нужные ячейки, щелкая на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг всех отмеченных ячеек появятся голубые рамки. Удалите их, нажав *Del* на клавиатуре или вызовите команду *Удалить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши);
- *Изменить класс объекта*. Для этого наведите курсор мыши на ячейку, нажмите левую кнопку и, удерживая ее, слегка переместите курсор – под курсором появится тулбар с названиями классов (см. Рис. 22). Нажмите на нужную иконку, - объект будет перенесён в указанный класс.

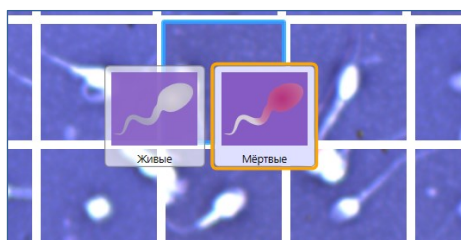



Рис. 43 Методика Жизнеспособность. Галерея в режиме изменения класса

РЕЗУЛЬТАТ В МЕТОДИКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

После того, как Вы проверили и внесли исправления в *Галерею*, можно переходить к просмотру результата анализа по всем обработанным изображениям. Для этого нажмите на панели функций кнопку  **Результат**.

Результат представлен в виде таблицы и цветной диаграммы, показывающей процентное соотношение живых и мёртвых сперматозоидов (см. Рис. 44). Нормальным считается эякулят, в котором более 58% живых сперматозоидов.

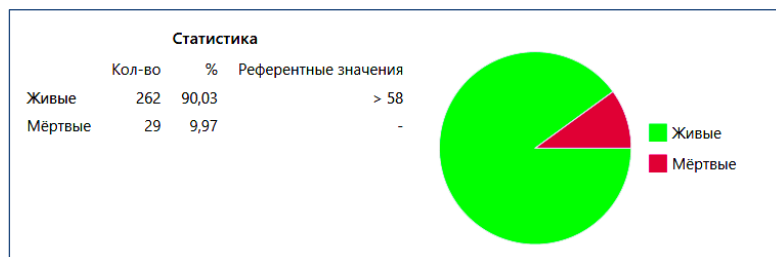


Рис. 44 Методика Жизнеспособность. Результат.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА В МЕТОДИКЕ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК

ВЫБОР МЕТОДИКИ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК

Нажмите на тулбаре *Выбор методики* (см. Рис. 7, стр.16) кнопку *Фрагментация*, – она будет выделена синим подчёркиванием. При выборе методики автоматически загрузятся все настройки, с которыми Вы работали в этой методике в последний раз: настройки методики, активная калибровка, настройки камеры, шаблон отчёта и пр.

После инсталляции программы, в ней активны предустановленные настройки для работы с демонстрационными изображениями, которые находятся на диске с инсталлятором программы в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/ДНК фрагментация/ДНК1-ДНК10. Для работы с пользовательскими изображениями их можно изменить, и методика автоматически запомнит сделанные изменения.


НАСТРОЙКИ МЕТОДИКИ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК

Как правило, настройки методики делаются один раз перед началом работы с препаратами и запоминаются программой. Нет необходимости делать настройки каждый раз перед работой.

Активизируйте команду текстового меню **Инструменты** ➤ **Настройки**. В появившемся диалоговом окне **Настройки приложения** активизируйте закладку ➤ **Фрагментация** (см. Рис. 45). На ней доступны следующие настройки:

Общие	Калибровки	Устройства ввода	Подвижность
Морфология	Фрагментация	Жизнеспособность	Бланк
Контроль достаточности		100	
Классификатор		Фрагментация	
Данные результата			
<input checked="" type="checkbox"/> Общая статистика		<input checked="" type="checkbox"/> Диаграмма	
<input checked="" type="checkbox"/> Распределение			
Референтные значения			
Процент с фрагментированной ДНК		-	-
Процент с нефрагментированной ДНК	19	-	-
Процент с большим ореолом		-	-
Процент со средним ореолом		-	-
Процент с маленьким ореолом		-	-
Процент без ореола		-	-
Процент вырожденных		-	-

Рис. 45 Настройки методики Фрагментация ДНК

- **Контроль достаточности** - установка количества сперматозоидов, которое необходимо обработать в ходе выполнения методики. Указанное в настройках количество объектов отображается в строке *Информации* в процессе анализа, и при достижении заданного количества цвет надписи изменяется на зелёный. По умолчанию в программе установлено значение 100. Для изменения контрольного значения, введите другое число с клавиатуры или выберите нужное значение с помощью кнопки .
- **Данные результата** - управление набором данных, которые будут отображаться в результате. Включая/выключая «галочки» около названия группы параметров, можно выводить в результате разное количество параметров. По умолчанию включён показ всех параметров;
- **Референтные значения** – для каждого параметра, выводимого в результате, можно задать референтные значения, т.е. значения нормы. По умолчанию задано референтные значения для параметра Процент с нефрагментированной ДНК более 19%. Вы можете изменить это значение, а также задать референтные значения для других параметров;

Если ввести значение только в левой ячейке, а в правой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «>», например, «>19»;

Если ввести значение только в правой ячейке, а в левой оставить «—», то в результате это будет отображено со значком «<», например, «<14»;

Если ввести значения в обеих ячейках, то в результате это будет показано, как интервал, например, 14-19.

Нажмите **ОК** для сохранения настроек или **Отмена** для выхода из диалогового окна без сохранения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РАБОТЫ В МЕТОДИКЕ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК

ЗАПОЛНЕНИЕ НАЧАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Если Вы продолжаете работу с образцом, для которого уже вводили первичные данные и выполнили какой-либо анализ, то ничего заполнять не нужно. Если анализ жизнеспособности делается для нового образца, то активизируйте команду текстового меню **Новый** – появится диалоговое окно для ввода начальных данных (см. Рис. 14, стр. 27). Введите первичные данные и нажмите кнопку ОК.

Если для образца ранее был сохранен файл документа с расширением sfg, содержащий начальные данные и результаты других анализов, то перед началом работы с методикой загрузите его с диска.


АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ОТКРЫТЫХ С ДИСКА

В программе можно анализировать изображения непосредственно в режиме съёмки «живого видео» с препарата или снимки, предварительно записанные на диск.

Рекомендуем сначала освоить работу в методике на примере анализа демонстрационных изображений, записанных на диске (USB-флеш-накопителе) с программой АРГУС-CASA в каталоге ИЗОБРАЖЕНИЯ/ДНК фрагментация/ДНК1-ДНК10.

Рассмотрим основные этапы работы в методике на примере анализа демонстрационных изображений.

- Убедитесь, что калибровка, которая отображается в строке **Информации**, соответствует калибровке для демонстрационных изображений 100x_1280_1024 (коэфф. 0.047);
- Откройте с диска (текстовое меню **Открыть**) демонстрационные изображения. Иконки открытых изображений отобразятся в панели **Содержание**, а активное изображение (оно выделено в **Содержании** голубой рамкой) - в области анализа;
- Теперь нужно настроить параметры сегментации. Это необходимо для того, чтобы программа правильно выделяла сперматозоиды. Для этого активизируйте команду текстового меню **Инструменты**
➤ **Настройки сегментации**.

Область анализа разделится на две части и внизу откроется панель настройки порога сегментации (выделения) объектов (см. Рис. 46). Сегментация производится по яркости. Порог выделения сперматозоидов следует установить таким образом, чтобы жёлтая маска полностью замещала сперматозоид. Установите нужное значение порога, используя ползунок, или введите в поле значение с клавиатуры. Для настройки выделения с минимальным шагом 1 нажмите на стрелки  справа от ползунка.

Если головки выделяются не полностью, увеличьте порог выделения. Если же выделяется область, большая по размеру, чем головки сперматозоидов, уменьшите порог выделения (см. Рис. 47, стр.59).

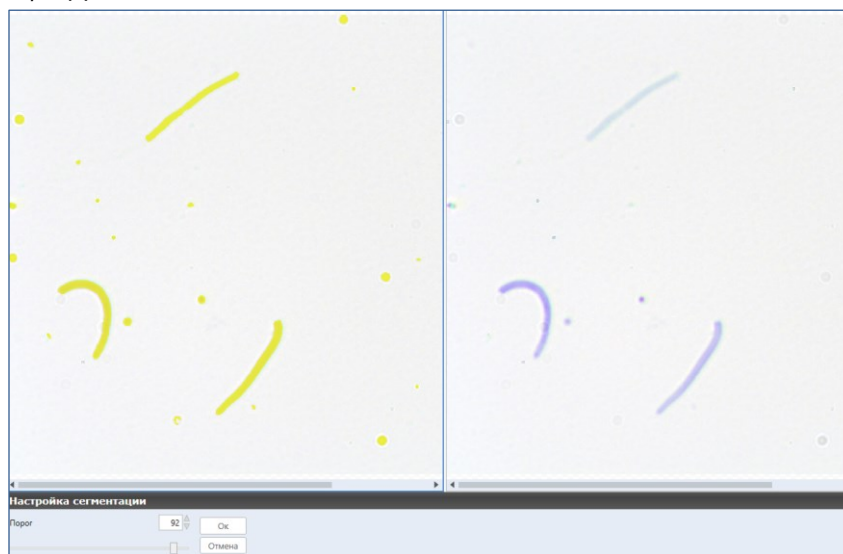


Рис. 46 Фрагментация ДНК. Вид области анализа в режиме сегментации (выделения масок объектов). Слева – изображение с наложенными масками (жёлтый цвет), справа - исходное изображение.

Для настройки порога сегментации рекомендуется выбрать изображение, где есть слабоокрашенные (нефрагментированные) сперматозоиды, чтобы убедиться, что они выделяются при данном пороге.



Рис. 47 Сегментация с разными порогами выделения

- После настройки сегментации нажмите на кнопку на панели функций кнопку *Анализ*. - начнётся обработка методикой выбранных в панели Содержание изображений. Во время анализа отображается индикатор процесса.
- После окончания анализа на изображениях отображаются цветные контуры и маски объектов. (см. Рис. 48, стр.61):

В строке информации отображается информация о количестве проанализированных объектов.

Для отображения названия класса объекта нажмите на изображении правую кнопку мыши и выберите в контекстном меню *Показать подписи*.

АНАЛИЗ ИЗОБРАЖЕНИЙ В РЕЖИМЕ СЪЕМКИ С КАМЕРЫ

- Приготовьте препарат в соответствии с описанием пробоподготовки для методики *Фрагментация ДНК* (см. Приложение 4 Приложение 2, стр.91);
- Установите препарат на микроскоп, выберите объектив 100x и сфокусируйтесь.

- Убедитесь, что калибровка, которая отображается в строке Информации, соответствует объективу, с которым производится съёмка;
- Откройте окно живого видео. Для этого нажмите в текстовом меню пункт *Ввод* (или клавишу F4). Кнопка *Ввод* будет выделена синим цветом. Это означает, что включён режим отображения «живого» видео;
- Слева откроется панель управления камерой, а в окне программы будет отображаться живое видео с препарата. Вид панели будет зависеть от используемой камеры, но основные элементы и рекомендуемые настройки будут одинаковые (см. Рис. 17 стр.30).
- После того как сделана настройка, можно начинать анализ. Для этого нажимайте на кнопку *Анализ* в Панели функций или кнопку F5 на клавиатуре. Перемещайте препарат, и анализируйте нужное число полей зрения. Необходимое количество изображений определяется в зависимости от концентрации сперматозоидов в одном поле зрения.

По нажатию кнопки Анализ программа захватывает и обрабатывает изображение. В строке информации отображается количество проанализированных изображений и объектов. При достижении достаточности по заданному количеству индикатор количества меняет цвет на зелёный.

- После окончания анализа на изображениях отображаются цветные контуры объектов:
 - Светло - Зелёный цвет – сперматозоиды с фрагментированной ДНК;
 - Темно - Зелёный цвет – сперматозоиды с частично фрагментированной ДНК;
 - Розовый цвет – сперматозоиды с не фрагментированной ДНК;
 - Красный цвет – артефакты.
- Снятые изображения будут отображаться в панели *Содержание*, а также они автоматически будут сохраняться на жёстком диске в формате png в каталоге, указанном в настройках (см. место записи файлов с первичными данными, стр.20). Для каждого нового образца будет автоматически создаваться отдельная папка. Для окончания съёмки отожмите кнопку *Ввод* в текстовом меню или нажмите на любое изображение в панели *Содержание*.

РАБОТА С ИЗОБРАЖЕНИЯМИ ПОСЛЕ АНАЛИЗА

Вне зависимости от того, как проводился анализ (с «живого видео» или с загруженных с диска изображений), дальнейшая последовательность работы в методике будет одинаковой.

Основное назначение этого этапа – проверка результатов автоматической классификации и удаление посторонних элементов («грязи») и редактирование контуров.

Активизируйте изображение в *Содержании*, и оно отобразится в *Области анализа*.


*Рекомендуется работать в режиме вида окна, когда область анализа разделена на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными контурами, справа – исходное изображение (см. Рис. 48). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать** .*



Рис. 48 Фрагментация ДНК. Вид области анализа в режиме Разделить и Синхронизировать


Слева – изображение с цветными контурами, справа – исходное изображение

В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- Увеличить/уменьшить масштаб с помощью панели *Навигатор* или *горячих клавиш* «CTRL+» и «CTRL—», для того, чтобы лучше разглядеть объекты. Обе части окна будут изменять масштаб синхронно;
- Удалить «грязь» - объекты, не являющиеся сперматозоидами, но по размеру и форме похожие на них. Для этого нажатием правой кнопки мыши на объекте откройте контекстное меню и выберите в нем команды *Удалить* или активизируйте объект правой кнопкой мыши и нажмите на клавиатуре клавишу *Del*;
- Проверить и при необходимости изменить класс объекта, назначенный при автоматической классификации. Для этого нажатием правой кнопки мыши на объекте откройте контекстное меню и выберите в нем нужный класс.
- *Редактирование контуров объектов*. Если контуры некоторых сперматозоидов, полученные после обработки изображений в методике, не соответствуют объекту, то в программе предусмотрена возможность их отредактировать. Для чего в программе предлагается набор инструментов



РАЗДЕЛЕНИЕ КОНТАКТОВ И СЛИЯНИЕ (ОБЪЕДИНЕНИЕ) ОБЪЕКТОВ

Совмещённый инструмент *Разрезание и Объединение*  позволяет разделить контактирующие сперматозоиды или объединить несколько объектов в один.

Для разделения контактирующих объектов нажмите левую кнопку мыши и, не отпуская, проведите разделительную линию по контакту. После того, как отпустите левую кнопку мыши, произойдёт отделение части сперматозоида. При этом отделённая часть будет восприниматься как самостоятельный объект.


Для объединения нескольких объектов в один нажмите SHIFT+левая кнопка мыши и проведите линию по фрагментам, которые нужно объединить. После того, как отпустите левую кнопку мыши, произойдёт слияние частей в один объект.

КОРРЕКТИРОВКА КОНТУРОВ С ПОМОЩЬЮ КИСТИ

Инструмент **Кисть** предназначен для того, что нарисовать (дорисовать) или стереть контур сперматозоида. В программе доступны 2 типа кисти, которые нужно использовать в зависимости от того, что нужно корректировать:


Кисть. Рисование со слиянием. Этот инструмент работает следующим образом: если в процессе рисования

будут задеты несколько объектов, то они объединятся в один объект. Это удобно, когда нужно добавить в контур объект или часть объекта, который плохо выделился. Также с помощью этой кисти можно *стирать* части контура или посторонние объекты, выделенные как сперматозоиды.

Нажмите кнопку Кисть . Справа появится шкала с ползунком для изменения размера кисти в пикселах, а курсор мыши изменит вид на жёлтый круг, меняющий свой размер в соответствии с установленным диаметром кисти. Рисуйте на изображении, удерживая левую кнопку мыши;

Для стирания контура или постороннего объекта рисуйте при нажатии *ALT+левая кнопка мыши*;

Т-кисть. Рисование без слияния. Контуры, наносимые этим инструментом, не объединяются в один объект, а рисуются как отдельные объекты. Этот тип кисти позволяет выделить наложенные и пересекающиеся сперматозоиды, как отдельные объекты.

В панели инструментов нажмите кнопку **Т-Кисть** . Справа появится шкала с ползунком для изменения размера кисти в пикселах, а курсор мыши изменит вид на жёлтый круг, меняющий свой размер в соответствии с установленным диаметром кисти. Рисуйте на изображении, удерживая левую кнопку мыши;

Для стирания контура или постороннего объекта рисуйте при нажатии *ALT+левая кнопка мыши*.

РАЗДЕЛЕНИЕ КРЕСТООБРАЗНЫХ НАЛОЖЕНИЙ ПО ТОЧКАМ

В программе имеется функция ручного разделения крестообразных наложений по точкам:

В панели инструментов нажмите кнопку **Пересечение по точкам**  ;

Поставьте левой кнопкой мыши последовательно по часовой стрелке или против часовой стрелки четыре точки в месте пересечения объектов для выделения общей области. За курсором потянется рамка, которая обозначит общую область редактируемых контуров. Процесс разделения начнётся автоматически после того, как будет поставлена последняя точка

РЕЖИМ ГАЛЕРЕЯ – КОРРЕКТИРОВКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Режим просмотра в виде *Галереи* удобен для проверки и корректировки результатов классификации, т.к. он наглядно отображает все проанализированные объекты, рассортированные на классы по размеру ореола (см. Рис. 49). Каждый объект находится в отдельной ячейке. В заголовке каждого класса представлена информация о количестве объектов в данном классе.


Для перехода в режим просмотра объектов в виде галереи нажмите на панели функций кнопку *Галерея*.



Рис. 49 Методика Фрагментация ДНК. Режим Галерея.

Ячейки с изображением сперматозоидов рассортированы по классам по степени фрагментации ДНК

Методика Фрагментация ДНК

Для просмотра галереи вместе с изображением разделите область анализа на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными контурами, справа – Галерея (см. Рис. 50). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать** . При активизации ячейки в галерее активизируется соответствующий объект на изображении и наоборот – при активизации объекта на изображении активизируется соответствующая ячейка в Галерее.

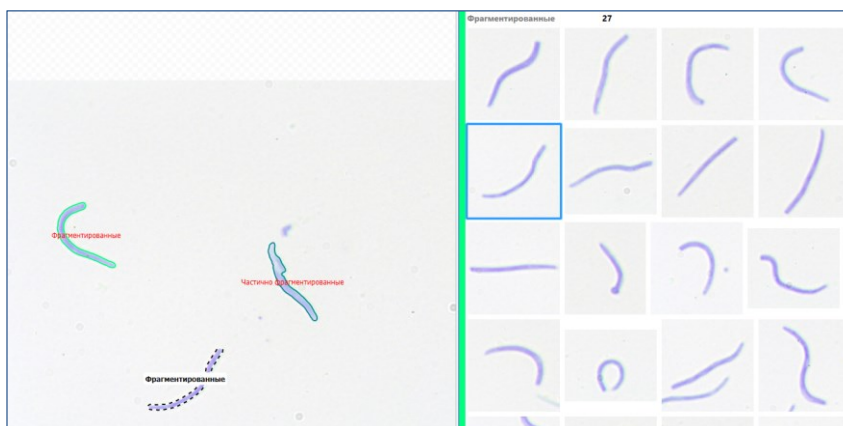


Рис. 50 Методика Фрагментация ДНК. Галерея в режиме Разделить и Синхронизировать слева Изображение с объектами, справа - Галерея. Объект, соответствующий активной ячейке в Галерее, выделен на изображении «бегающей» рамкой.

Просмотрите всю галерею и сделайте необходимые исправления результатов автоматической классификации. В этом режиме можно выполнить следующие действия:

- Увеличить активную ячейку для лучшего просмотра. Для этого активизируйте ячейку левой кнопкой мыши и используйте клавишу «+» на клавиатуре или вызовите команду *Увеличить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши).
- Удалить единственный объект, который не должен учитываться в анализе. Это может быть клетка или грязь, имеющая такую же форму и размер как сперматозоид, и поэтому ошибочно определённая программой как сперматозоид. Для этого активизируйте ячейку галереи (она выделится голубой рамкой) и нажмите кнопку *Del* на клавиатуре или вызовите команду *Удалить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши);
- Удалить одновременно несколько объектов, ошибочно отнесённых к сперматозоидам. Для этого сначала выделите нужные ячейки, щёлкая на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг всех отмеченных ячеек появятся голубые рамки. Удалите их, нажав *Del* на клавиатуре или вызовите команду *Удалить* из контекстного меню ячейки (вызывается правой кнопкой мыши);
- Изменить класс объекта. Для этого наведите курсор мыши на ячейку, нажмите левую кнопку и, удерживая ее, слегка переместите курсор – под курсором появится тулбар с названиями классов (см. Рис. 51). Щёлкните на нужной иконке, - объект будет перенесён в указанный класс.




Рис. 51 Методика Фрагментация ДНК. Галерея в режиме изменения класса

ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК. ПРОСМОТР ГАЛЕРЕИ В ВИДЕ ТАБЛИЦЫ

Таблица – это вид представления галереи, где для каждого объекта приведены результаты измерений набора параметров.

Для показа таблицы вызовите команду *Таблица* из контекстного меню *Галереи*.

Для просмотра таблицы вместе с изображением разделите область анализа на 2 части по вертикали: слева отображается изображение с цветными контурами, справа – Таблица. (см. Рис. 52). Для перехода в этот режим нажмите на тулбаре Вид окна кнопку **Разделить и синхронизировать**  При активизации строки в таблице активизируется соответствующий объект на изображении и наоборот – при активизации объекта на изображении активизируется соответствующая строка в Таблице. Для отображения слева Галереи активизируйте часть окна с изображением и нажмите на панели функций кнопку Галерея.

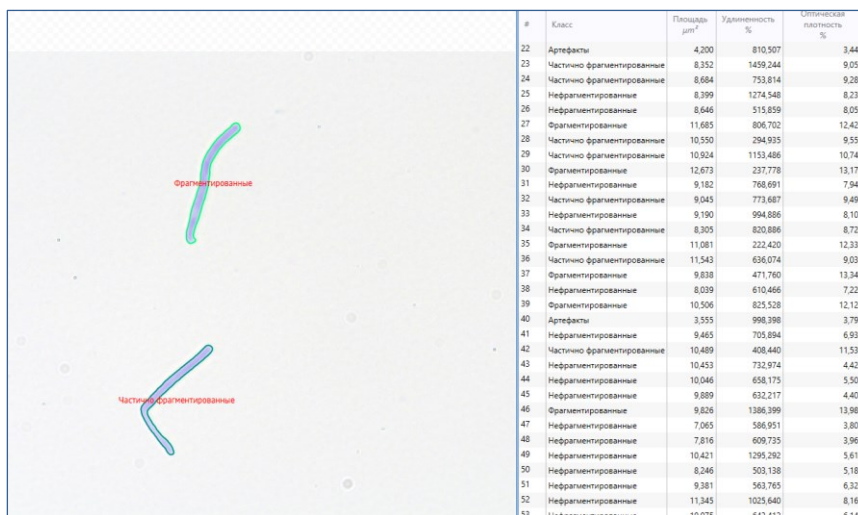



Рис. 52. Методика Фрагментация ДНК

Область анализа разделена на 2 части: слева изображение с объектами, справа – таблица

Столбцы таблицы – измеренные параметры: площадь, удлинённость, оптическая плотность. Строки таблицы – это название класса и набор измеренных параметров для данного объекта.

ПРОСМОТР РЕЗУЛЬТАТА В МЕТОДИКЕ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК

После того, как проверены и внесены исправления в Галерею, можно переходить к просмотру результата анализа по всем обработанным изображениям. Для этого нажмите на панели функций кнопку  **Результат**.

Результат представлен в виде таблиц и цветной диаграммы, показывающей количество и процентное соотношение сперматозоидов с фрагментированной ДНК, частично фрагментированной ДНК и сперматозоидов без фрагментации ДНК (см. Рис. 53).




Рис. 53 Методика Фрагментация ДНК Результат.

ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ И СОХРАНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

ПРОСМОТР ОТЧЕТОВ

Завершающим этапом анализа является выдача бланка с результатом. В программе АРГУС-CASA бланк отчёта формируется автоматически в соответствии с активным шаблоном.

Шаблон – один из вариантов визуального представления полей и дополнительных средств оформления в режиме **Отчёт**. Шаблон может включать текстовые и числовые поля, логотип организации, начальные данные, результаты анализа, изображения, графические элементы оформления. Вместе с программой АРГУС-CASA поставляются предустановленные шаблоны: *Подвижность, Морфология, Подвижность и Морфология, Все анализы*

Просмотр и печать бланков с результатами анализа производится в режиме **Отчёт**. Для активизации этого режима нажмите на панели функций кнопку 

При переходе в этот режим в окне программы отобразится бланка отчёта, автоматически заполненный ранее введенными начальными данными и результатами анализа. Бланк отображается в том виде, в котором он будет напечатан. Вид бланка зависит от активного шаблона печати (Рис. 54, Рис. 55).

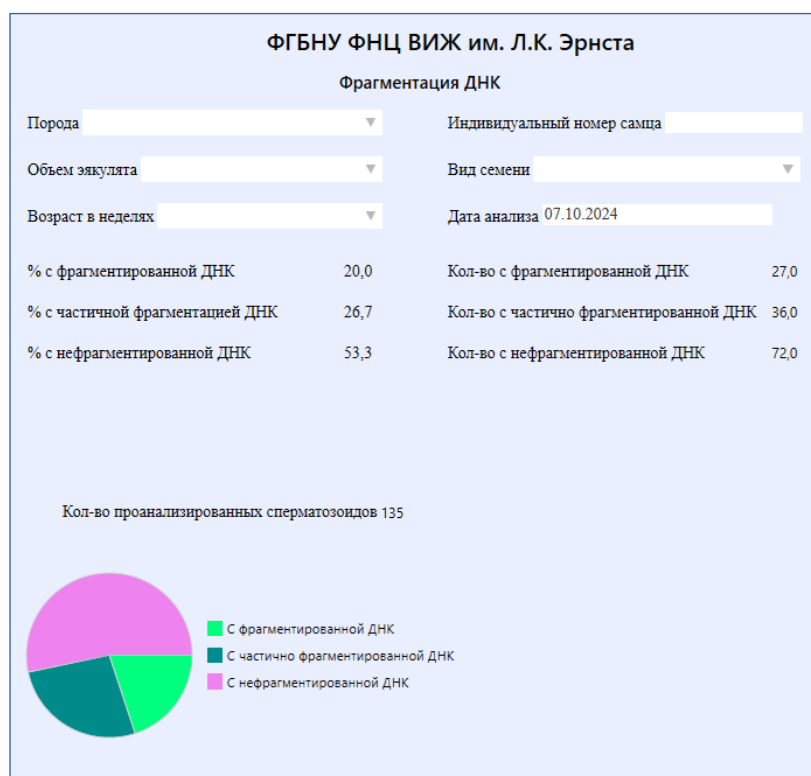


Рис. 54 Вид отчёта с результатом анализа Фрагментация ДНК (активен шаблон ДНК Poultry)



Рис. 55 Вид отчёта с результатом подвижности (активен шаблон Подвижность)

В режиме просмотра отчёта возможны следующие действия:

- Изменение и дополнения данных в текстовых, числовых и полях даты. Это может понадобиться, если на этапе заполнения первичных данных информация была введена не полностью или с ошибками. Вы можете редактировать соответствующие поля путём ввода текста и чисел с клавиатуры или выбора из выпадающих списков.

Данные в поле Результат не могут быть изменены!

- Выбор другого шаблона. Для переключения между шаблонами нажатием правой кнопки мыши на бланке вызовите контекстное меню и выберите из списка нужный шаблон;
- Добавление пользовательского шаблона на основе предустановленного или создание нового «с нуля». Для этого нужно активизировать режим Конструктор (см. Конструктор бланка отчета, стр.68).

ПЕЧАТЬ ОТЧЕТА

В режиме просмотра *Отчёта* в текстовом меню программы или в контекстном меню бланка выберите пункт *Печать*. Откроется окно Печать. В списке подключённых к компьютеру принтеров выберите нужный принтер, сделайте необходимые настройки и нажмите кнопку Печать.

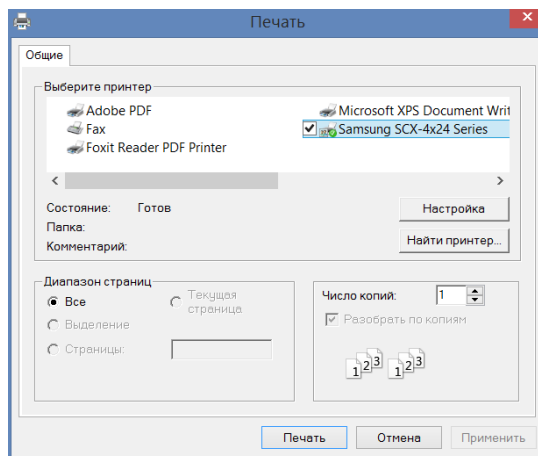


Рис. 56 Окно печати отчётов

СОХРАНЕНИЕ ОТЧЕТА В ФОРМАТЕ XML

Сформированные отчёты можно сохранить в текстовом файле формата xml. Для этого откройте щелчком правой кнопки мыши контекстное меню отчёта и выберите команду *Сохранить*. В открывшемся окне *Сохранить* укажите имя и местоположение сохраняемого файла.

Файл в формате xml в виде отчёта может быть загружен в программу АРГУС-CASA (команда Загрузить в контекстном меню отчёта) или открыт для просмотра или редактирования с помощью обычного текстового редактора, например notepad, notepad+, AkeiPad. Можно также воспользоваться интернет-браузером, например Google Chrome и Mozilla Firefox - интернет браузер.

СОХРАНЕНИЕ ОТЧЕТОВ В СТАНДАРТНЫХ ФОРМАТАХ (PDF И XPS)

Программа АРГУС-CASA дает возможность сохранять отчёты в стандартных форматах (pdf и xps) для того, чтобы их можно было просматривать в других программах или передавать в лабораторные базы данных.

Сохранение в стандартных форматах производится с помощью функции *Печать в файл*.

Предварительно на компьютер должны быть установлены программы, позволяющие сохранять файлы в pdf формате (Adobe pdf, Foxit Reader PDF Printer, Microsoft Print To Pdf) и xps формате (Microsoft XPS Document Writer).

В режиме просмотра *Отчёта* в текстовом меню программы или в контекстном меню бланка выберите пункт *Печать*. В окне Печать (см. Рис. 56, стр.67) выберите соответствующий виртуальный принтер и сохраните файл.

СОХРАНЕНИЕ ФАЙЛОВ С ПЕРВИЧНЫМИ ДАННЫМИ

При необходимости сохранять все первичные данные (видеоролики и изображения), по которым проводился анализ, нужно воспользоваться функцией *Сохранить данные* в текстовом меню программы. При вызове этой функции открывается диалоговое окно (см. Рис. 57), в котором нужно указать местоположение папки, куда будут сохранены файлы. Имя папке присваивается автоматически (текущая дата), но можно его изменить в поле Folder name.

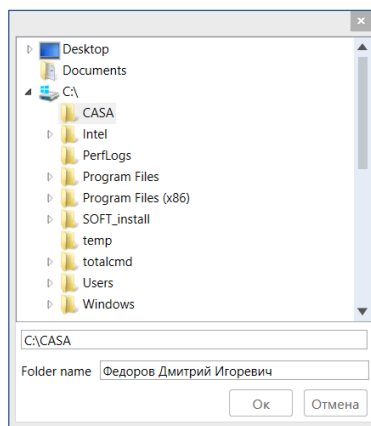


Рис. 57 Окно сохранения данных

По нажатию кнопки *ОК* начнётся процесс сохранения, который может занять некоторое время, что будет видно по индикатору процесса.

После сохранения в указанной папке образуются подкаталоги с именами методик, для которых в документе есть первичные данные: папка *Motility* – видеоролики из методики *Подвижность*, папка *Morphology* – изображения из методики *Морфология*, папка *Vitality* - изображения из методики *Жизнеспособность*, папка *DNAFragmentation* - изображения из методики *ДНК фрагментация*. Видеоролики сохраняются в формате *avi*, а изображения в формате *png*.

СОХРАНЕНИЕ ДОКУМЕНТА

Документ целиком (все видеоролики, изображения, галереи, результаты, таблицы измерений, отчёты) могут быть сохранены в виде одного файла с расширением *cfg*.

*Файл с расширением *cfg* может быть открыт только в программе АРГУС CASA!*

Для этого воспользуйтесь командой *Сохранить* из текстового меню программы. В окне *Сохранить* выберете тип файла *Документ (cfg)*, укажите его имя и местоположение.

Если нет необходимости сохранять в файле все видеоролики и изображения, то можно сохранить только отчёт с результатами анализа. Для этого в окне *Настройки/Общие* нужно поставить «галочку» на чек-боксе *Сохранять в документе отчёт без изображений* (см. Рис. 9, стр.21).

СОХРАНЕНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Для сохранения единичного изображения в одном из стандартных графических форматов (*bmp*, *tiff*, *jpg*, *png*) активизируйте изображение в панели *Содержание* и выберете команду *Сохранить* из текстового меню программы. В окне *Сохранить* выберете нужный тип файла, укажите его имя и местоположение.

КОНСТРУКТОР БЛАНКА ОТЧЕТА

Программа АРГУС-CASA включает предустановленные шаблоны бланков отчёта для представления результатов анализа: *Подвижность*, *Морфология*, *Подвижность*, *Подвижность и Морфология*, *Все анализы*. При необходимости сформировать другой шаблон бланка в соответствии с требованиями Вашей организации (изменить название, адрес, логотип, добавить или удалить поля и пр.) нужно войти в режим *Конструктора бланка*. Для этого нажмите на бланке правую кнопку мыши и выберете в контекстном меню пункт *Конструктор бланка*.

Под конструированием бланка понимается следующее:

- нанесение и удаление полей;

- настройка свойств полей;
- изменение расположения и размеров нанесённых полей;
- оформление бланка графическими элементами.

На Рис. 58 изображён вид окна программы в режиме конструктора на примере предустановленного шаблона *Подвижность*. В правой части находится *Панель инструментов* конструктора, с помощью которой производятся операции редактирования шаблонов бланков.

Рекомендуется не создавать собственный шаблон с «0», а внести необходимые изменения в предустановленные шаблоны и сохранить их с новыми именами.

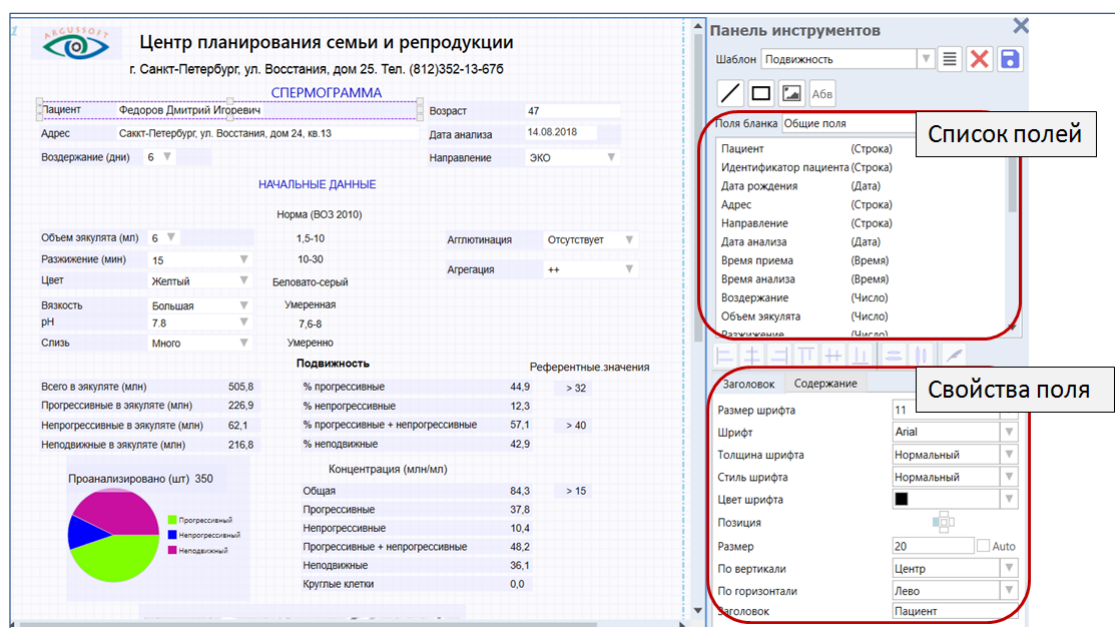


Рис. 58 Бланк отчёта в режиме *Конструктор бланка*. Справа – *Панель инструментов* для работы с шаблоном.

В выпадающем списке полей выбран пункт *Общие поля*.

ТИПЫ ПОЛЕЙ БЛАНКА ОТЧЕТА

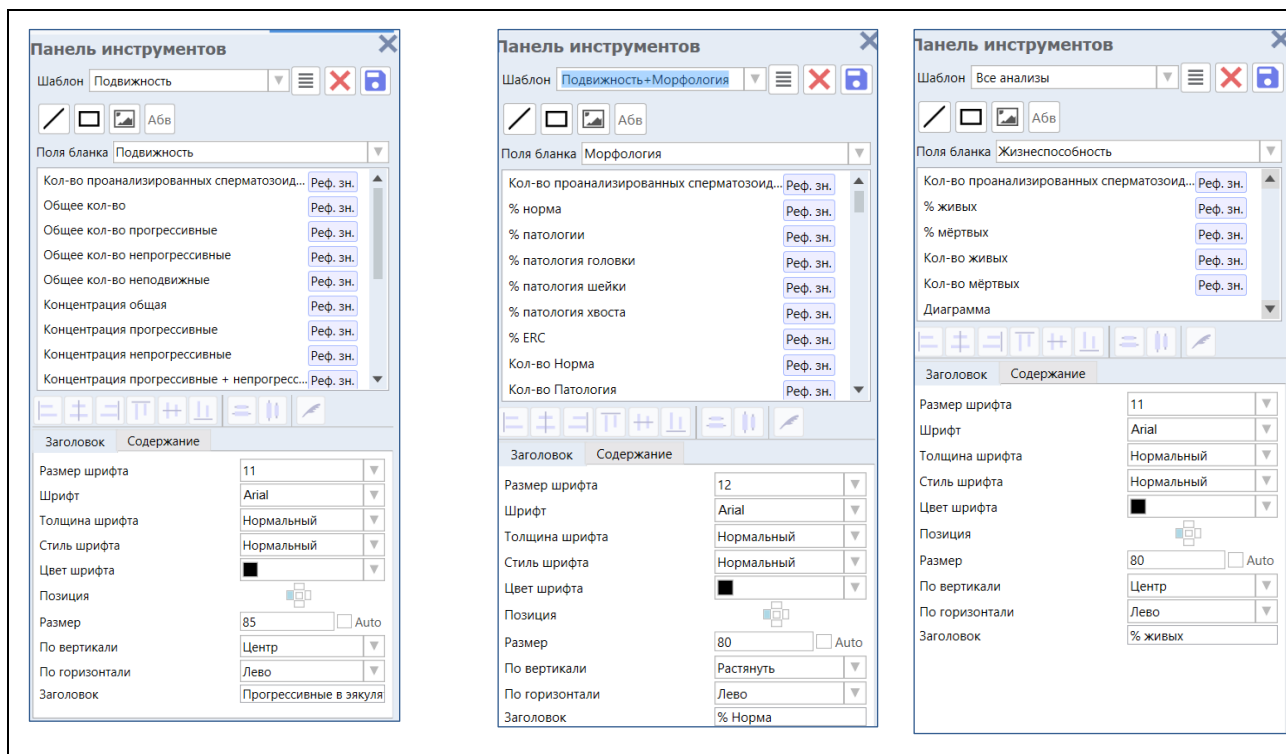
Бланк отчета в программе АРГУС-CASA содержит два типа полей:

- **Поля общего типа**, состав которых формируется в настройках программы на закладке *Бланк* (см. Поля бланка, стр.21). Эти поля предназначены для отображения в отчёте начальных данных, а также начальных данных об исследуемом образце (объем, цвет, вязкость и пр.). Заголовок и содержание этих полей могут быть изменены пользователем;

Если в имеющемся списке общих полей конструктора нет нужного поля, то его необходимо добавить в боксе настроек (см. Поля бланка, стр. 21).

- **Поля результатов анализа**. Все параметры результатов по каждой методике могут быть нанесены на бланк отчёта, как отдельные поля. Таким образом, пользователь может сформировать отчёт с любым набором полей результатов анализа. Для удобства выбора возможные наборы полей результатов по каждой методике сгруппированы в блоки с названием методики. *Панель инструментов* в режиме *Конструктор бланка* содержит выпадающий список, состав которого зависит от набора методик, прописанных в ключе защиты, т.е. если методика не прописана в ключе, то, соответственно ее нет в списке. Таким образом, максимальный состав списка содержит: *Общие поля, Подвиж-*

ность, Морфология, Жизнеспособность, Фрагментация ДНК. При выборе названия методики в списке полей отображаются все результаты анализа для данной методики, которые могут быть нанесены на бланк отчёта (см. Рис. 59, стр.70).



В списке полей бланка выбрана методика *Подвижность*.

В списке полей бланка выбрана методика *Морфология*.

В списке полей бланка выбрана методика *Жизнеспособность*.

Рис. 59 Виды панели инструментов Конструктора бланка с набором полей для разных методик

НАНЕСЕНИЕ И УДАЛЕНИЕ ПОЛЕЙ

- Для **добавления поля** на бланк нажатием левой кнопки мыши выделите его в *Списке полей* (см. Рис. 58) и, не отпуская левую кнопку мыши, перетащите его на бланк (Drag and drop). Отпустите кнопку мыши, – поле зафиксировано на бланке;

Для полей результатов анализа отдельно добавляется часть с результатом и часть с референтным значением (она выделена в списке полей голубым цветом).

- Для **удаления поля** с бланка выберите поле, которое хотите удалить, и щёлкните на нем левой кнопкой мыши. Вокруг выбранного поля появится цветная рамка. Выберите пункт *Удалить* из контекстного меню поля.

НАСТРОЙКА СВОЙСТВ ПОЛЕЙ

ОБЩИЕ ПОЛЯ

Каждое поле бланка блока *Общие поля* состоит из *Заголовка* и *Содержания*.

Заголовок – это неизменяемая в процессе анализа часть поля. Его название задаётся в шаблоне бланка и может быть изменено только в режиме *Конструктора бланка*.

Содержание заносится на бланк вручную при вводе начальных данных, в режиме просмотра отчёта, а также автоматически при формировании отчёта по результатам анализа.

Объем эякулята (мл) 2 ▾

Объем эякулята (мл) – это заголовок поля, 2 - Содержание

В состав блока *Общие поля* входят поля с результатами анализа по каждой методике, которые могут быть нанесены на бланк в виде неизменяемых изображений: *Результат подвижности*, *Результат морфологии*, *Результат жизнеспособности*, *Результат ДНК*. Следует иметь в виду, что при вставке на бланк результата в виде изображения, набор параметров результата не может быть изменён и соответствует виду результата на закладке *Результат*.

При активизации поля в режиме *Конструктор бланка* на нем появляется цветная рамка (см. Рис. 60), а в *Панели инструментов* отображаются его свойства. Панель свойств имеет две вкладки: одна для задания свойств *Заголовка*, а другая - свойств *Содержания* (см. Рис. 61).

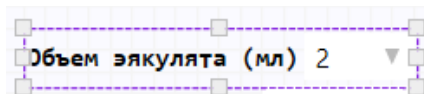


Рис. 60 Конструктор бланка. Активное поле выделено цветной рамкой, на углах и сторонах отображаются активные зоны для изменения размеров поля.

Редактируйте настройки заголовка и содержания активного поля.

Заголовок	Содержание
Размер шрифта	11 ▾
Шрифт	Arial ▾
Толщина шрифта	Нормальный ▾
Стиль шрифта	Нормальный ▾
Цвет шрифта	■ ▾
Позиция	
Размер	50 <input type="checkbox"/> Auto
По вертикали	Центр ▾
По горизонтали	Лево ▾
Заголовок	Объем эякулята (мл)

Группа *Заголовок* - задание имени и оформления заголовка поля: размер, тип, толщина, стиль, цвет шрифта, а также способ выравнивания текста по горизонтали и вертикали относительно границ поля.

Позиция - расположение заголовка поля относительно Содержания (слева, справа, сверху, снизу);

Размер – величина заголовка в % относительно длины всего поля. При отключённом чек-боксе *Авто*, значение ширины заголовка можно ввести вручную с клавиатуры. Установка размера заголовка полезна для выравнивания содержимого полей;

Для изменения текста заголовка, щёлкните мышью в поле *Заголовок*, удалите при помощи клавиатуры стоящий там текст и введите новый.

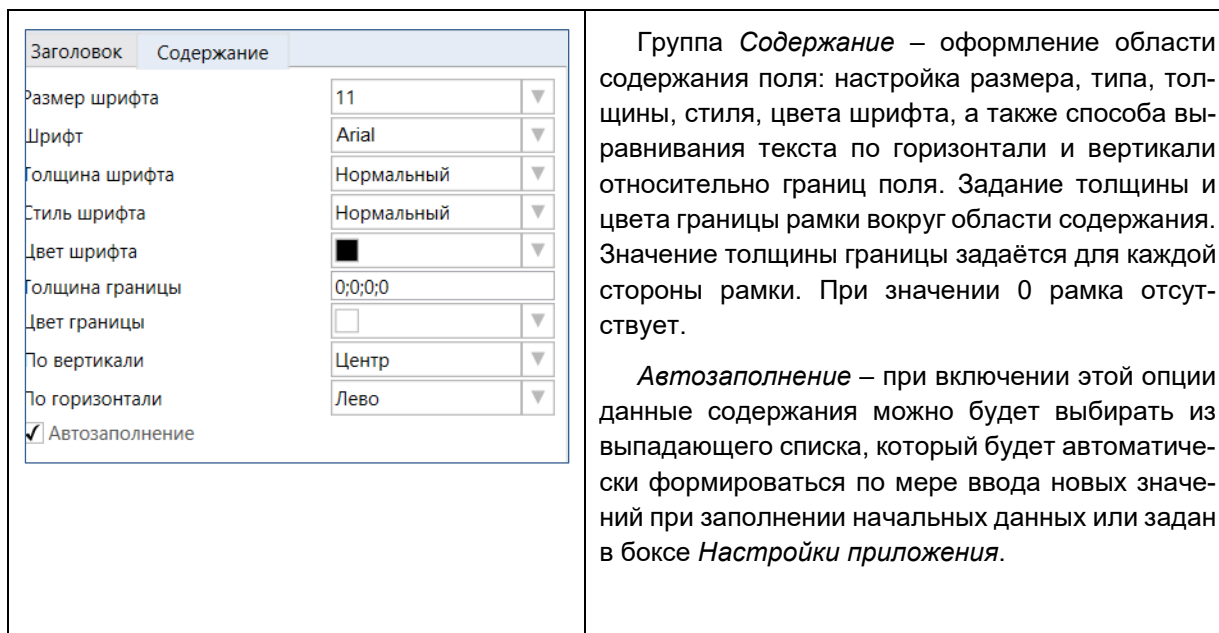


Рис. 61 Свойства поля блока *Общие поля*

ПОЛЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Каждое поле блоков *Результаты анализа* состоит из неизменяемой части *Содержание* – это полученный результат анализа в методике (его пользователь не может изменить) и *Заголовка*, изменяемого в режиме *Конструктора бланка*.

% прогрессивные	44,9
-----------------	------

% прогрессивные – это Заголовок поля, **44,9**- Содержание

В состав блоков входят результаты анализа по каждой методике, которые могут быть нанесены на бланк в виде отдельных полей

При активизации поля в режиме *Конструктор бланка* на нем появляется цветная рамка (см. Рис. 62), а в *Панели инструментов* отображаются его свойства. Панель свойств имеет две вкладки: одна для задания свойств *Заголовка*, а другая - свойств *Содержания* (см. Рис. 63, стр. 73).



Рис. 62 *Конструктор бланка*. Активное поле выделено цветной рамкой, на углах и сторонах отображаются активные зоны для изменения размеров поля.

Редактируйте настройки заголовка и содержания активного поля.

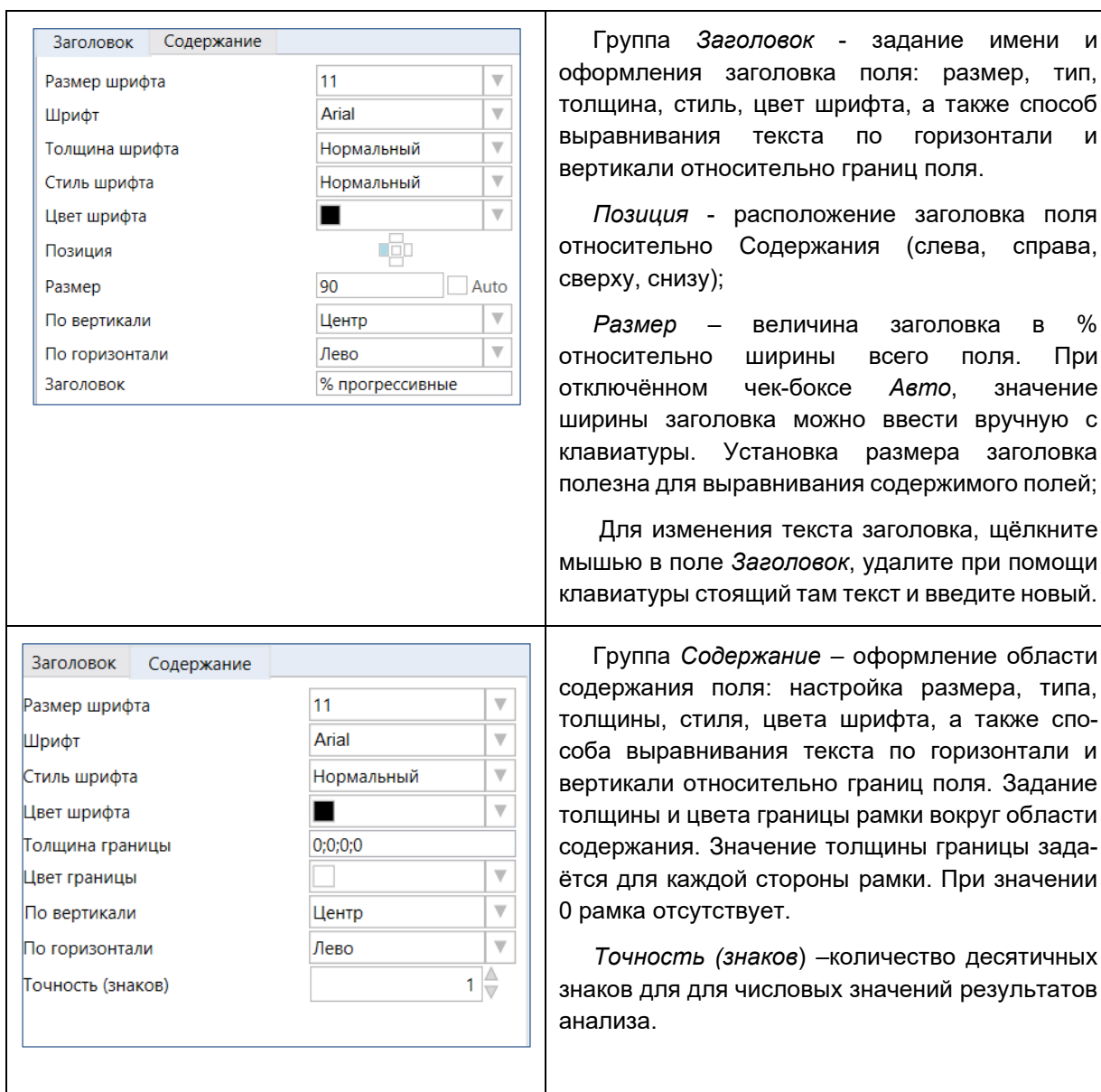


Рис. 63 Свойства поля Результаты анализа

ИЗМЕНЕНИЕ СТИЛЯ, РАСПОЛОЖЕНИЯ И РАЗМЕРОВ ПОЛЕЙ

Для того чтобы на бланке изменить размеры и положение поля щёлкните на нем левой кнопкой мыши. Вокруг выбранного поля появится рамка с активными зонами (см. Рис. 60, стр.71). Теперь поле можно перемещать по бланку и изменять его размеры.

- Для того чтобы **переместить** выбранное поле, поместите на него курсор мыши (курсор мыши пример вид «крестика»), нажмите левую кнопку мыши и, не отпуская кнопку, перемещайте поле по бланку. Когда поместите поле в нужное место, отпустите кнопку мыши;
- Для того чтобы **изменить размеры поля**, подведите курсор мыши к одной из активных зон. Курсор примет вид двунаправленной стрелки. Нажмите левую кнопку мыши и, не отпуская кнопку, перемещайте мышшь в направлении стрелки. Когда редактируемое поле достигнет нужных размеров, отпустите кнопку мыши;
- Для того, чтобы **изменить свойства сразу у нескольких полей** используйте кнопку *Применить стиль*. Выделите общей рамкой поля, свойства которых нужно изменить, или щёлкните на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг

всех отмеченных полей появятся рамки, а кнопки панели выравнивания станут доступны. Нажмите на панели выравнивания кнопку *Применить стиль*. При этом у всех выделенных полей в *Заголовке* и *Содержании* изменятся атрибуты шрифта, высота поля, размер заголовка по образцу первого выделенного поля;

- Если нужно **изменить расположение сразу нескольких полей**, выделите их. Для этого обведите рамкой поля, которые хотите переместить или щёлкните на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг всех отмеченных полей появятся рамки. Перемещайте выделенные поля, как одно поле (как это было описано выше)
- Для **выравнивания группы полей по положению** удобно пользоваться функциями **выравнивания** на панели инструментов конструктора (см. Рис. 64). Выделите общей рамкой поля, которые хотите выровнять или щёлкните на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг всех отмеченных полей появятся рамки, а кнопки выравнивания станут доступны. Нажмите на панели выравнивания кнопку с нужной функциональностью. Картинки на кнопке отображают тип выравнивания, а также при наведении курсора на кнопку появляется всплывающая надпись (тултип), которая поясняет назначение кнопки.

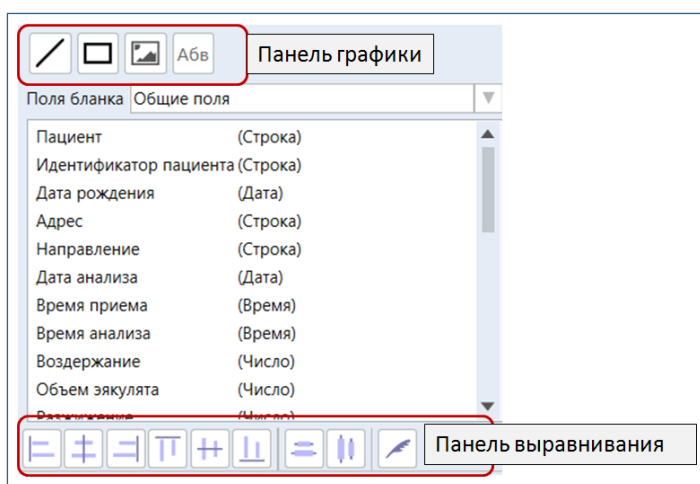


Рис. 64 Панели Выравнивания полей и нанесения графических элементов на панели Инструментов конструктора


- Для выравнивания группы полей по высоте и ширине выделите общей рамкой поля, которые хотите выровнять или щёлкните на них по очереди левой кнопкой мыши при нажатой клавише **Ctrl**. Вокруг всех отмеченных полей появятся рамки. Вызовите нажатием правой кнопки мыши контекстное меню и выберите пункты *Выровнять по ширине* и *Выровнять по высоте*.

Выравнивание всегда происходит по положению и размеру относительно первого выбранного поля!




НАНЕСЕНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

На бланк можно нанести текстовые поля, линии, геометрические фигуры, изображения. Эти элементы оформления будут всегда присутствовать в отчёте.

Для нанесения графики используйте кнопки на *Панели графика* (см. Рис. 64).

- Текстовое поле используется, например, для создания постоянного заголовка шаблона (название учреждения, адреса и т.д.). В предустановленных шаблонах в текстовых полях отображаются название учреждения, адрес, название анализа Спермограмма (см. Рис. 58, стр.69). Для **добавления текстового поля** на бланк нажмите левой кнопки мыши на кнопку  и, не отпуская левую кнопку мыши, перетащите его на бланк (Drag and

drop). Отпустите кнопку мыши, – поле зафиксируется на бланке. При активизации поля в панели инструментов отображаются его настраиваемые свойства: параметры шрифта, выравнивание относительно границ поля, текстовое содержимое. Для того чтобы изменить в предустановленных шаблонах название и адрес организации нужно заменить в свойствах содержимое поля Текст;

- Поле изображения используется, например, для вставки на бланк логотипа или эмблемы организации. Для **добавления поля изображения** на бланк нажмите левой кнопки мыши на иконку  и, не отпуская ее, перетащите поле на бланк (Drag and drop). Отпустите кнопку мыши, – поле зафиксируется на бланке, но оно будет пустое. Нажатием правой кнопки мыши вызовите контекстное меню и выберите пункт *Загрузить изображение*. При активизации поля в панели инструментов отображаются его настраиваемые свойства: толщина и цвет границы.
- Поле Прямоугольник используется для оформления бланка. С помощью него можно выделить группы элементов или поместить их на однородном фоне. Для **добавления поля прямоугольника** на бланк нажмите левой кнопки мыши на иконку  и, не отпуская ее, перетащите поле на бланк (Drag and drop). Отпустите кнопку мыши, – поле зафиксируется на бланке. Используйте активные зоны по сторонам и углам для изменения размера. При активизации поля в панели инструментов отображаются его настраиваемые свойства: толщина и цвет границы, цвет фона. Прямоугольник можно наложить на группу полей и поместить его на задний план (через команду *На задний план* в контекстном меню). Таким образом, визуально будет выделена группа полей (см. Рис. 65).
- Поле Линия используется для оформления бланка. Для **добавления поля линия** на бланк нажмите левой кнопки мыши на иконку  и, не отпуская ее, перетащите поле на бланк (Drag and drop). Отпустите кнопку мыши, – поле зафиксируется на бланке. Используйте активные зоны на концах линии для изменения размера и угла. При активизации поля в панели инструментов отображаются его настраиваемые свойства: толщина и цвет.



НАЧАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ		
Норма (ВОЗ 2010)		
Объем эякулята (мл)	2	1,5-10
Разжижение (мин)	15	10-30
Цвет	Серо-белый	Беловато-серый
Вязкость	Умеренная	Умеренная
pH	7,9	7,6-8
Слизь	Умеренно	Умеренно
Агглютинация	Отсутствует	
Агрегация	++	

Рис. 65 Пример выделения группы полей прямоугольником с фоном

УПРАВЛЕНИЕ ШАБЛОНАМИ

В верхней части *Панели инструментов* находится панель управления шаблонами, с помощью которой производится выбор, сохранение и удаления шаблонов (см. Рис. 66).

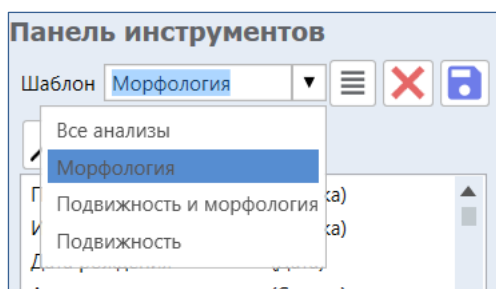





Рис. 66 Панель управления шаблонами

- Поле выпадающего списка отображает название активного шаблона. Для выбора другого шаблона выберите его имя из списка.

Если вы сделали в текущем шаблоне изменения, то при переключении на другой шаблон будет задан вопрос о его сохранении. Предусмотренные шаблоны изменять нельзя! Поэтому, если вы редактировали подобный шаблон, нужно в поле с названием ввести с клавиатуры имя, отличное от имени предустановленного шаблона.

- При нажатии на кнопку  появляется меню с набором функций:
 - *Новый* – создание нового пустого шаблона. Ему автоматически присваивается имя Новый...;
 - *Экспорт* – сохранение активного шаблона отчета в отдельном файле формата *.tpl. Рекомендуется это сделать для всех рабочих шаблонов, так как в случае переустановки программы или утрате шаблона его можно будет импортировать и не тратить время на восстановление;
 - *Импорт* - восстановление шаблонов из файлов формата *.tpl.
- Кнопка  Удалить – удаление активного шаблона;
- Кнопка  Сохранить – сохранение активного шаблона.

Созданные Вами шаблоны автоматически сохраняются в папке c:\Users\Имя пользователя\AppData\Roaming\ArgusSoft\CASA\Templates в виде файлов с расширением tpl. Вы можете скопировать эти файлы для хранения или добавления шаблона в программу АРГУС-CASA на другом компьютере.

ЭКСПОРТ ТАБЛИЦЫ ГАЛЕРЕИ В ФАЙЛ ФОРМАТА CSV И ИМПОРТ ФАЙЛА CSV В MS EXCEL

При необходимости провести детальный анализ данных, полученных в программе АРГУС-CASA, можно выполнить экспорт таблиц галереи в виде текстового файла формата csv (Comma-Separated Values – значения, разделённые запятой).

Для этого в режиме отображения таблицы галереи в контекстном меню выбрать функцию *Экспорт в csv...* и сохранить файл таблицы в формате csv.

Действия для того, чтобы конвертировать формат.csv в формат.xlsx или xls, зависят от версии MS Excel.

ВЕРСИИ EXCEL 2013, 2010, 2007 ИЛИ 2003 И РАНЬШЕ.

Нужно выполнить следующие действия:

- В программе MS Excel на закладке *Данные* выбрать функцию *Из текста* (см. Рис. 67) и выбрать сохранённый файл в формате csv. При этом откроется окно *Импорт текстового файла*.

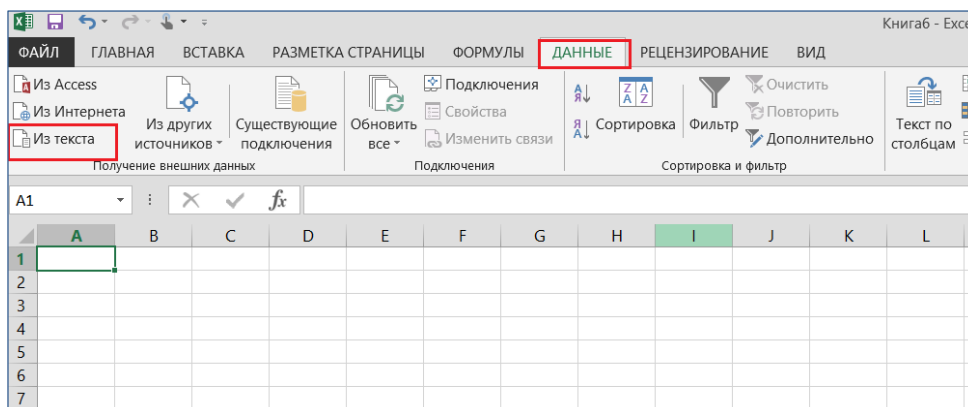


Рис. 67

- В окне *Импорт текстового файла* нажать на кнопку *Импорт* (см. Рис. 68)

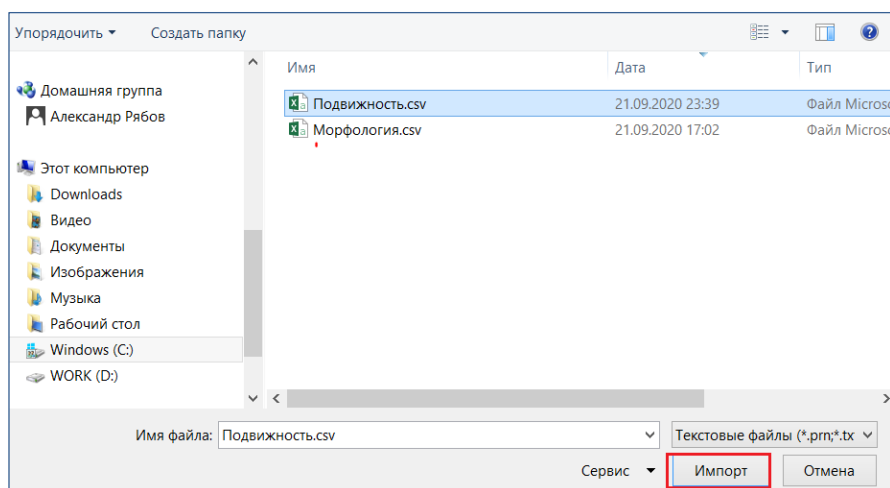


Рис. 68

- В окне *Мастер текстов (Импорт)* - шаг 1 из 3 выбрать следующие настройки (см. Рис. 69) и нажать кнопку *Далее*:

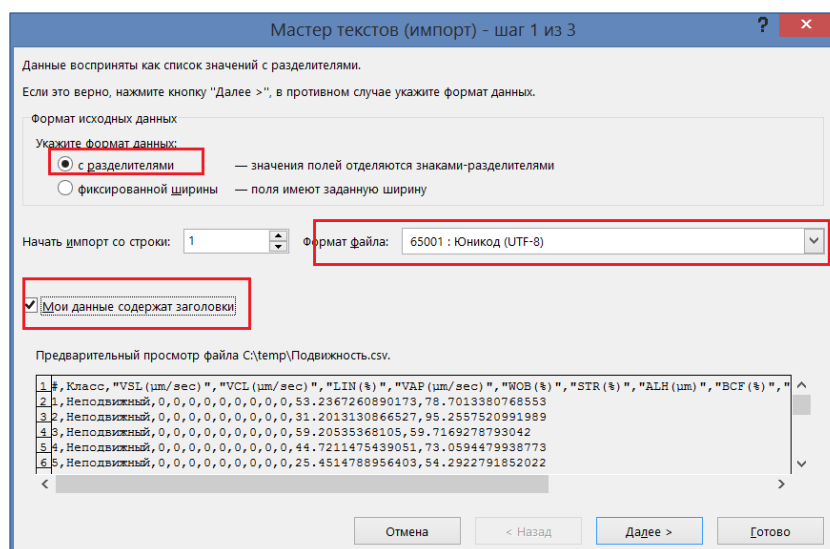


Рис. 69

- В окне *Мастер текстов (Импорт)* - шаг 2 из 3 выбрать следующие настройки (см. Рис. 70) и нажать кнопку *Далее*:

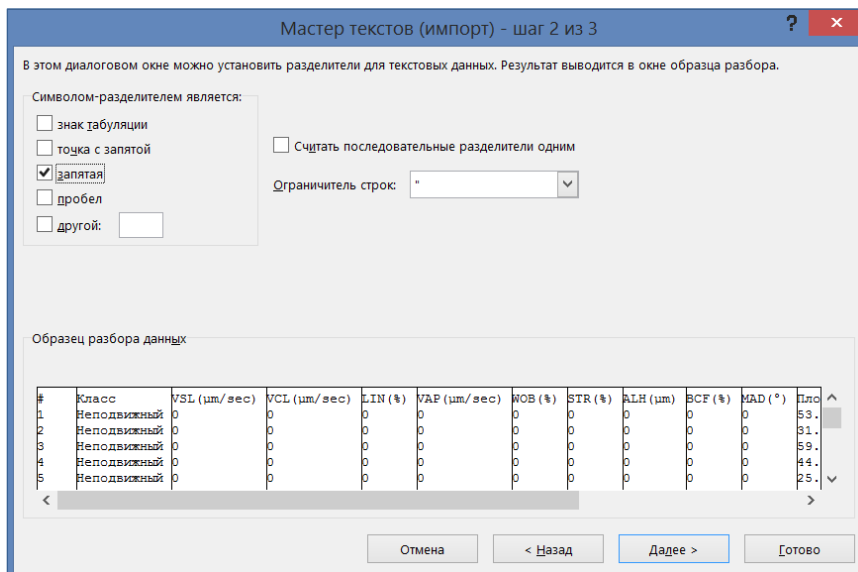


Рис. 70

- В окне *Мастер текстов (Импорт)* - шаг 3 из 3 выбрать следующие настройки (см. Рис. 71) и нажать кнопку *Подробнее*. Откроется бокс *Дополнительные настройки импорта текста* (см. Рис. 72). В поле *Разделитель целой и дробной части* нужно выбрать «.» (точка), нажать ОК, и в окне *Мастер текстов (Импорт)* - шаг 3 из 3 нажать на кнопку *Готово*.

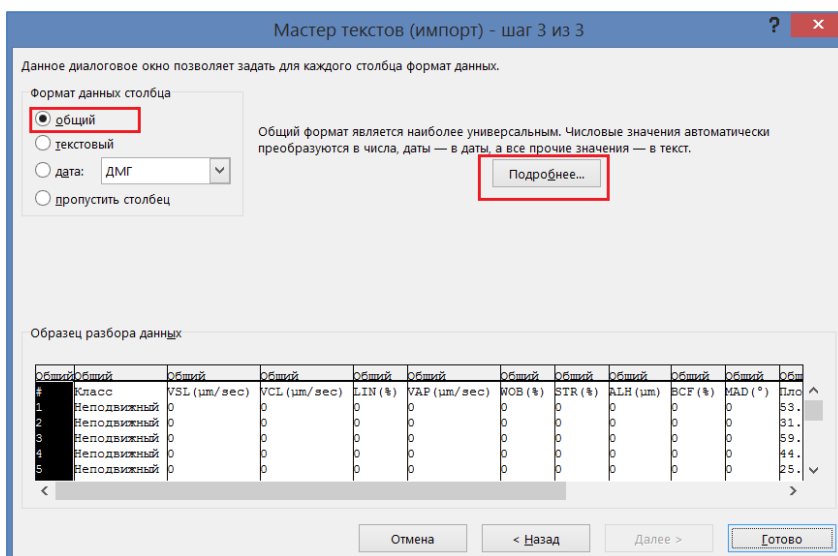


Рис. 71

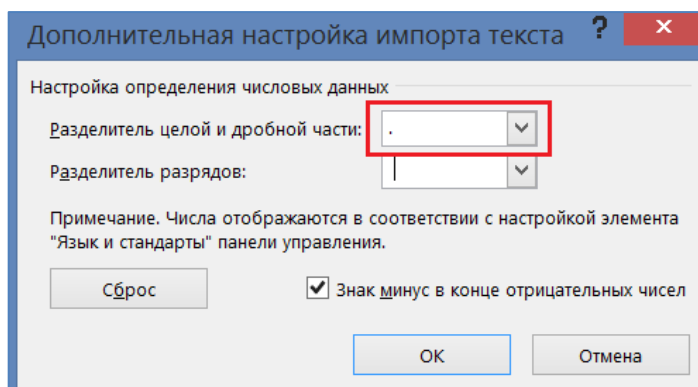


Рис. 72

- В окне *Импорт данных* выбрать необходимые настройки (см. Рис. 73) и нажать кнопку *OK*. На листе откроется импортируемый файл в табличном виде.

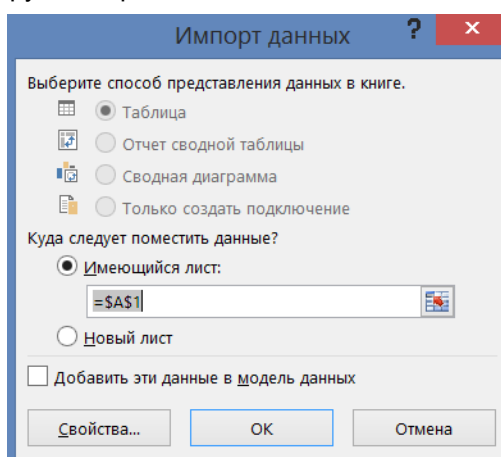


Рис. 73

- Сохранить таблицу в формате *xlsx* для дальнейшей работы с данными таблицы в программе MS Excel.

ВЕРСИЯ MICROSOFT® EXCEL® 365

Нужно выполнить следующие действия:

- В программе MS Excel на закладке *Данные* выбрать *Из текстового/CSV файла* (см. Рис. 74). При этом откроется окно *Импорт данных* (см. Рис. 75), в котором нужно загрузить сохранённый файл в формате *csv*.

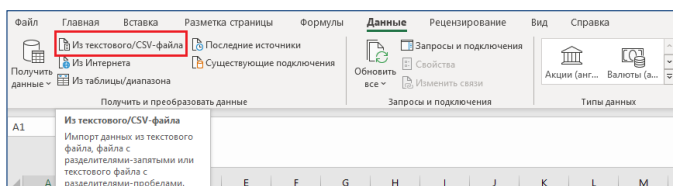


Рис. 74

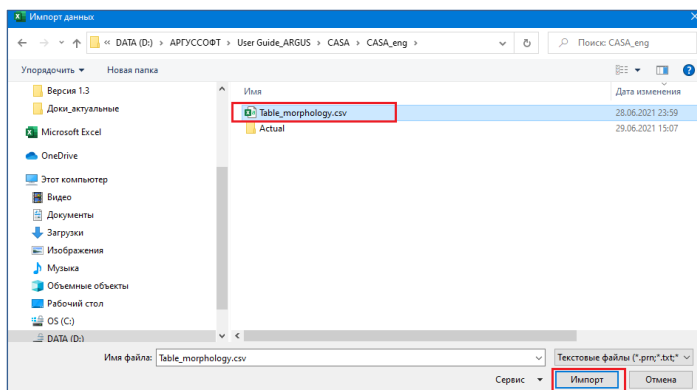


Рис. 75

- В форме предварительного просмотра делать соответствующие настройки и нажать на кнопку *Преобразовать данные* (см. Рис. 76).

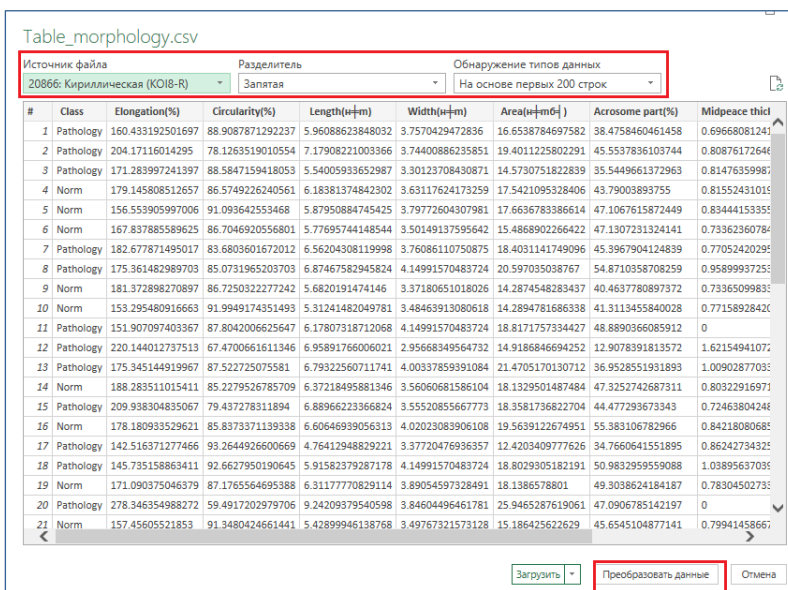


Рис. 76

- В окне просмотра запроса нажать на кнопку *Закрыть* и *Загрузить* (см. Рис. 77). После этого таблица отобразится в окне программы MS Excel

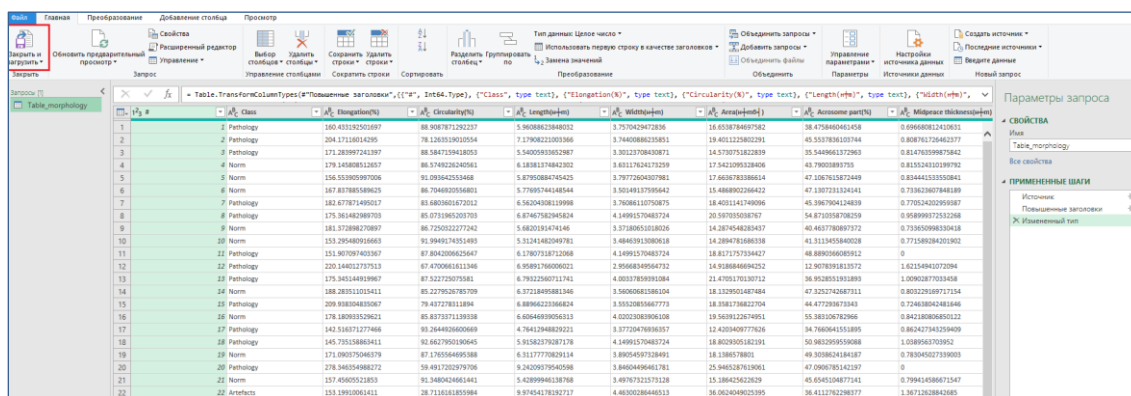


Рис. 77

- Сохранить таблицу в формате xlsx для дальнейшей работы с данными таблицы в программе MS Excel.

ОБУЧЕНИЕ КЛАССИФИКАТОРА

В программе АРГУС-CASA для автоматической классификации в методиках *Подвижность*, *Морфология* и *Фрагментация ДНК* используются предустановленные классификаторы.

Обучение этих классификаторов проводилось на изображениях, полученных с препаратов, изготовленных в соответствии с рекомендациями по пробоподготовке (см. Приложение 1, Приложение 2, Приложение 4).

Если в Вашей лаборатории другая окраска или другие критерии классификации, Вы можете создать и обучить свой собственный классификатор. Для этого:

- Активируйте методику, для которой будет создаваться новый классификатор;
- Выполните автоматический анализ на серии изображений в соответствии с выбранной методикой. Количество проанализированных сперматозоидов должно быть такое, чтобы каждый класс (для методик *Подвижность* и *Фрагментация ДНК*) и дефект (для методики *Морфология*) включал не менее 30 объектов. Для этого может понадобиться обработать несколько препаратов разных образцов, где имеются необходимые дефекты. В этом случае добавляйте изображения с разных препаратов в один документ.
- Получите галерею объектов и внесите необходимые изменения в результаты автоматической классификации, удалите все артефакты (не сперматозоиды).

Тщательно проверьте правильность классификации в галерее, так как от этого будет зависеть точность распознавания с помощью нового классификатора!

- Активируйте команду текстового меню **Инструменты** > **Обучить классификатор**. Откроется окно, где нужно ввести имя нового классификатора.

Для того, чтобы подключить новый классификатор для работы в методике:

- Активируйте команду текстового меню **Инструменты** > **настройки** и выберите в боксе *Настройки приложения* закладку с названием активной методики.
- Выберите новый классификатор из списка (см. Рис. 78) и закройте бокс настроек, нажав на ОК.

Информация о текущем классификаторе отобразится в строке информации.

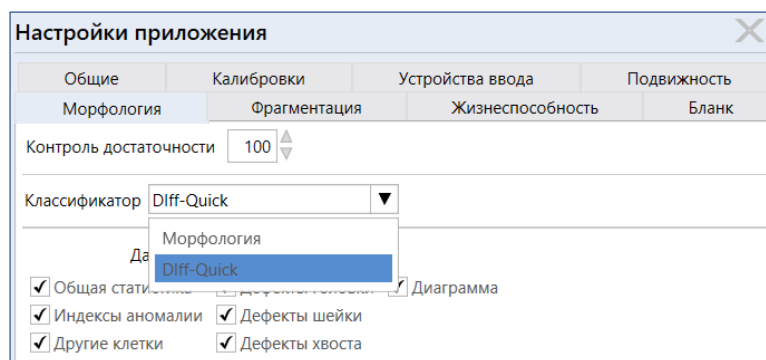


Рис. 78 Выбор классификатора для методики *Подвижность*

Созданные Вами классификаторы автоматически сохраняются в папке c:\Users\Имя пользователя\AppData\Roaming\ArgusSoft\CASA\Classifiers в виде файлов с расширением xml. Вы можете скопировать эти файлы для хранения или добавления данного классификатора в программу АРГУС-CASA на другом компьютере.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК И СБОЕВ

Ошибка/Сбой	Причина(ы)	Способ устранения
При запуске программы появляется сообщение «Ключ Guardant не обнаружен...», и программа не запускается.	Электронный ключ защиты от несанкционированного использования <i>Guardant Stealth</i> не установлен в USB порт компьютера.	Установить ключ защиты АРГУС-CASA в USB порт компьютера. На ключе должен загореться световой индикатор.
При запуске программы появляется сообщение «USB ключ не соответствует данной программе»	Установленный в USB порт компьютера электронный ключ защиты от несанкционированного использования <i>Guardant Stealth</i> не соответствует ПО АРГУС-CASA.	Проверить маркировку ключа и установить ключ, соответствующий ПО АРГУС-CASA.
Электронный ключ защиты от несанкционированного использования <i>Guardant Stealth</i> вставлен в USB порт, но при этом световой индикатор на ключе не горит и программа не запускается. При запуске программы появляется сообщение «Ключ Guardant не обнаружен...»,	Не установлен драйвер ключа <i>Guardant Stealth</i> или ключ не исправен.	Установить драйвер ключа, который находится на USB-флеш-накопителе с инсталлятором ПО. После этого на ключе должен загореться световой индикатор, и программа должна запуститься. Если этого не происходит, то следует обратиться в службу техподдержки ООО АргусСофт для проверки исправности ключа.
Пункт текстового меню <i>Ввод</i> не активен.	В настройках программы не выбрана видеокамера, с помощью которой должен осуществляться ввод изображений в программу.	В настройках программы выберите видеокамеру (см.выбор устройства ввода, стр.20).
В настройках программы на закладке <i>Устройство ввода</i> список доступных устройств ввода пустой.	На компьютере не установлен драйвер видеокамеры.	Выйдите из программы АРГУС-CASA и установите драйвер производителя видеокамеры, которая установлена на микроскопе. Для камер ES Experts этот драйвер находится USB-флеш-накопителе с инсталлятором ПО. После успешной установки драйвера запустите программу и выберите камеру в настройках приложения

		(см.выбор устройства ввода, стр.20).
Изображения, полученные с видеокамеры, плохого качества (отсутствует резкость, насыщенность, контраст и т.д.), что приводит к невозможности проведения исследований.	1. Плохое качество препаратов,	1.Проверить пробоподготовку на соответствие рекомендациям в РП (см. Приложение 1-Приложение 4);
	2 Неверная настройка параметров видеокамеры,	2. Настроить видеокамеру в соответствии с рекомендациями по настройкам ввода для каждой методики.
	3. Неправильная настройка освещения микроскопа или микроскоп в неисправном состоянии.	3. Проверить настройку освещения микроскопа Проверить чистоту оптических поверхностей микроскопа.
После проведения анализа выделение сперматозоидов осуществлено некорректно – контуры объектов не соответствуют сперматозоидам.	Неверно установлен порог сегментации.	Настроить порог сегментации. В руководстве пользователя для каждой методики содержится необходимая информация по установке пороговых выделений сперматозоидов.
Контуры объектов выделены верно, но большая часть объектов классифицирована как артефакты или не учтена в анализе.	Неверно сделаны калибровки для рабочих объективов или выбрана калибровка, не соответствующая увеличению объектива для данной методики.	Проверить правильность калибровок и выбор для каждой методики соответствующей калибровки.
Не активен пункт текстового меню <i>Печать</i>	В операционной системе Windows не установлен драйвер принтера.	Установить драйвер принтера, подключенного к компьютеру.
Нет возможности печати отчетов с результатами анализа в pdf и xps файлы.	В операционной системе Windows не установлено программное обеспечение для печати в pdf и xps файлы.	Установить ПО для печати в pdf и xps файлы

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ЭКСПЛУАТАЦИИ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИИ

- В конструкции изделия не предусмотрены виды измерений, относящиеся к сфере государственного регулирования в соответствии с Приказом МЗ РФ от 21.02.2014 №81н.;
- В составе изделия лекарственные средства, биологические материалы и наноматериалы не используются;
- При эксплуатации расходные материалы (компоненты, реагенты) не используются;
- Изделие следует эксплуатировать при нормальных климатических условиях по ГОСТ 15150:
 - температура окружающего воздуха 15-35°C;
 - относительная влажность воздуха при температуре 25°C 45-80%;
 - атмосферное давление 84-107 кПа (630-800 мм рт.ст)
- Изделие является нестерильным, стерилизация не требуется.
- Обработка, очистка, дезинфекция не требуется.
- Изделие не является источником радиации.
- МИ не является источником электромагнитных помех.
- Изделие не предназначено для введения лекарственных средств или биологических материалов.
- В состав МИ не входят лекарственные вещества или биологические материалы.
- В состав изделия не входят материалы, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ МЕТОДИКИ ПОДВИЖНОСТЬ

Для получения объективных данных оценки показателей спермы необходимо соблюдать рекомендации при сборе материала.

Эякулят получают при помощи мастурбации. Анализ проводится после 3-х дневного полового воздержания, но период воздержания не должен превышать 7 дней. Если показатели спермограммы высокие, то можно ограничиться одним анализом. При наличии патологических изменений в эякуляте требуется 2-х, 3-х кратный анализ с интервалом в неделю.

Эякулят собирается в условиях лаборатории, в специальной комнате в одноразовую посуду. В особых случаях эякулят собирают дома. При этом его необходимо доставить в лабораторию не позже 30 минут. Оптимальной температурой для того, чтобы не погибли сперматозоиды, является 25-37° С. Нельзя использовать презерватив, т.к. он покрыт специальным составом, который за 15-20 минут делает сперматозоиды неподвижными.

На контейнере необходимо указать идентификационные данные, дату и время получения материала.

Микроскопическое исследование спермы проводят после разжижения, но не позже, чем через час после эякуляции. При проведении исследования необходимо поддерживать постоянную комнатную температуру (20-25° С), т.к. ее перепады могут привести к искажению результата. Оптимально использовать следующий прием: выдерживать приготовленную камеру 15-20 мин. в термостате при 37°С.

Помимо погрешностей при проведении исследования в лаборатории, в разных образцах спермы, полученных от одного и того же мужчины, такие показатели, как концентрация, подвижность и морфология сперматозоидов, могут варьироваться. Во многом на такой разброс показателей влияет длительность периода воздержания. С каждым дополнительным днем воздержания (до 1 недели) объем семени увеличивается на 0,4 мл, концентрация сперматозоидов на 10-15 млн., а общее количество сперматозоидов на 50-90 млн. Подвижность и морфология сперматозоидов не изменяется в течение 5-7 дней воздержания, но при более длительном периоде отмечается снижение подвижности сперматозоидов.

Интерпретация результатов спермограммы должна учитывать различия между разными образцами. Минимальное число образцов спермы, необходимое для установления хорошего или низкого качества спермы, – три образца с интервалом 6-8 недель и периодом воздержания 2-3 дня. При обследовании, как фертильных мужчин, так и пациентов с проблемой бесплодия, было обнаружено, что у 97% обследуемых с первоначально хорошими результатами спермограммы такие же результаты будут сохраняться при проведении в динамике 3-6 исследований. Если же при первом визите были обнаружены нарушения, то эти нарушения сохранялись и в дальнейшем. В случае сомнительных результатов при первом обследовании требовалось, по крайней мере, 3 повторных анализа для получения стабильных результатов.

ПОДГОТОВКА ЭЯКУЛЯТА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята определяется с помощью счётных камер. Для ручного метода традиционно используются устройства, имеющие глубину 100 мкм. Так как концентрация сперматозоидов в семенной плазме высокая, клетки в таких камерах располагаются в несколько слоёв. Для подсчёта количества клеток проба разводится. Однако оценка подвижности сопряжена с субъективностью оценки.

Для автоматического подсчёта получили распространение камеры, заполнение которых не требует предварительного разведения, например камера Маклера, одноразовые камеры Leja.



(а)



(б)

Рис. 79. Камера Маклера (а) и одноразовая камера Leja (б).

КАМЕРА МАКЛЕРА

Нижняя, основная часть имеет металлическую основу (А) и две ручки (Н). В центре основания имеется плоский диск (D), на который помещается исследуемый материал (S). По бокам диска имеются четыре возвышения, выступающие на 10 микрон над поверхностью центральной части.



В центре нижней поверхности покровного стекла имеется сетка, площадью 1 кв. мм, разделённая на 100 частей, 0,1 x 0,1 мм каждая.

ПОДГОТОВКА КАМЕРЫ

Перед использованием убедитесь, что стеклянные детали камеры абсолютно чистые и пыль отсутствует. Покровное стекло установлено правильно, если в местах контакта с возвышениями наблюдается феномен Ньютона, его лучше видно в отражённом свете.

ЗАПОЛНЕНИЕ КАМЕРЫ

Через 30-40 минут после получения материала (время достаточное для разжижения нормальной спермы), хорошо перемешайте исследуемый материал, избегая образования пузырьков. С помощью специальной палочки поместите маленькую каплю в центр нижнего диска.

Как только покровное стекло устанавливается на место, его не следует трогать, поднимать или перемещать, т.к. это может повлиять на равномерное распределение спермы. Поднимите камеру за ручку и поместите ее на предметный столик микроскопа. Установите объектив 10x или 20x. Увеличение рабочего объектива выбирается в зависимости от модели микроскопа и увеличения адаптера

Нельзя использовать объектив 40x, т.к. покровное стекло камеры можно повредить при попытке фокусировки. Даже при применении объектива 20x, будьте осторожны и не надавливайте на покровное стекло. Изображение является чётким, когда кончик объектива находится на расстоянии приблизительно 1 мм над уровнем поверхности.

Счетная камера Маклера обеспечивает стандартные условия для всех анализируемых образцов. Сперматозоиды свободно двигаются на неподвижной горизонтальной пластине. Запись видеоролика для исследования подвижности необходимо завершить через 3-5 минут после нанесения исследуемого материала для того, чтобы избежать ошибки, возможной из-за тенденции спермы мигрировать с периферии. Повторите процедуру с 3-4 каплями для получения среднего результата.

Большие вариации в подсчетах на разных каплях одного исследуемого материала означают, что образцы не были хорошо перемешаны, либо поверхность камеры не была чистой.

КАМЕРА LEJA

Стандартная камера LEJA представляет собой цельную, неразборную конструкцию, глубиной 10, 12, 20 и 100 мкм. На двух- (четырёх-) камерное предметное стекло нанесено покровное стекло и специальная насечка для заполнения исследуемым материалом. Такое устройство камеры обеспечивает равные условия для всех анализируемых образцов и предотвращает попадание пузырьков воздуха. Камера предназначена для одно-

Пробоподготовка для методики Подвижность

кратного применения. При анализе спермы содержащей достаточное количество сперматозоидов используются камеры глубиной 12 и 20 мкм. В случае азооспермии рекомендуется использовать камеру глубиной 100 мкм.

Через 30-40 минут после получения образца спермы (время достаточное для разжижения нормальной спермы) эякулят аккуратно перемешивают несколько раз осторожно, избегая образования пены, набирая и сливая исследуемый образец. Кончиком пипетки касаются зазора между предметным стеклом камеры и покровным стеклом и помещают каплю эякулята под покровное стекло. Для заполнения камеры можно пользоваться пастеровской пипеткой (стеклянной или одноразовой пластиковой), либо автоматической с одноразовым наконечником.

Свежеприготовленный препарат оставляют примерно на 1 мин. Колебания температуры в помещении могут привести к искажению результатов по определению подвижности сперматозоидов.

Запись видеоролика для исследования подвижности необходимо завершить через 3-5 минут после нанесения исследуемого материала для того, чтобы избежать ошибки, возможной из-за тенденции спермы мигрировать на периферию.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ МЕТОДИКИ МОРФОЛОГИЯ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКА

Для оценки морфологии сперматозоидов следует приготовить мазки.



Рис. 80 Приготовление мазка. для анализа Морфологии

Мазки эякулята готовят на обезжиренных 70-процентным этанолом и высушенных предметных стёклах. Небольшую каплю (5-10 мкл) эякулята после разжижения наносят на поверхность стекла, распределяя ее тонким слоем с помощью другого предметного стекла со шлифованным краем. Стекло, которым делают мазок, подносят к капле эякулята и дотрагиваются до нее, держа шлифованный край параллельно поверхности будущего мазка. Не следует прижимать шлифованный край к предметному стеклу, расстояние между ними должно быть 1-2 мм, чтобы капля растеклась под шлифованным краем за счёт капиллярных сил. Затем шлифованный край проводят по предметному стеклу, капля эякулята распределяется по нему без давления (см. Рис. 80). При сильном надавливании на стекло сперматозоиды могут деформироваться. Стекло со шлифованным краем следует держать под углом примерно 45° к предметному стеклу и с наклоном в сторону движения. Можно использовать другой метод для приготовления мазка: поместить каплю с эякулятом посередине предметного стекла и накрыть вторым стеклом. Эякулят растекается между стёклами, их осторожно разделяют и готовят два мазка.

Для компьютерного анализа необходимо готовить мазок из промытой физиологическим раствором фракции сперматозоидов. Для этого 0,5-1 мл эякулята разводят физиологическим раствором в 10 раз, центрифугируют 10-15 мин. при 1000 об/мин., осадок разводят в 0,5 мл физиологического раствора и аккуратно пипетируют, 5-10 раз набирая и сливая жидкость пипеткой. Далее отмытый эякулят наносят на предметное стекло описанным в предыдущем абзаце способом.

Если этап промывания пропущен, то препарат имеет прокрашенный фон, что влияет на автоматизацию анализа, т.к. уменьшается точность выделения границ объектов, а также вместе со сперматозоидами выделяются участки фона (см. Рис. 81).

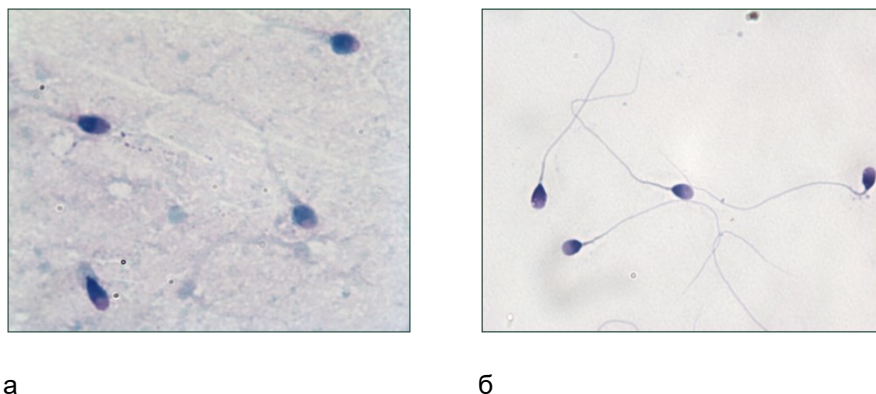


Рис. 81 Препарат из не отмытого эякулята (а) и отмытого (б)

После нанесения сперматозоидов предметное стекло просматривают при малом увеличении (окуляр 10х, объектив 10х) и оценивают качество мазка. В поле зрения микроскопа должно быть не менее 30 клеток (сперматозоидов и/или круглых клеток). Клетки должны быть расположены на стекле равномерно. Если клетки лежат скоплениями, образуя многослойные агрегаты, в эякулят повторно добавляют 4,5 мл физиологического раствора и центрифугируют 15 мин. при 1000 об/мин. Супернатант сливают, к осадку добавляют 0,5 мл физиологического раствора и размешивают пипетированием. Если на мазке остаются агрегаты, их наличие протоколируется.

При слишком густом мазке или, наоборот, при малом количестве сперматозоидов, приготовление промытых сперматозоидов повторяют, используя меньшее или большее количество эякулята, например, 0,1 мл или 5 мл, соответственно. Желательно, чтобы физиологический раствор для промывания сперматозоидов имел температуру 37° С (при использовании охлаждённого раствора сперматозоиды могут деформироваться). Далее мазки высушивают на воздухе и фиксируют в зависимости от метода окраски.

ОКРАШИВАНИЕ МАЗКОВ

В руководстве ВОЗ рекомендуется использовать окраску по Papanicolaou, однако для исследования морфологии сперматозоидов с помощью программно-аппаратного комплекса наибольшее распространение получил так называемый «Быстрый метод окрашивания для оценки морфологии сперматозоидов (Diff-Quick)». Для проведения этого метода окрашивания предназначен набор реагентов Reastain® Diff-Quick (набор для быстрого дифференцированного окрашивания). Набор состоит из трех ёмкостей с раствором I (синий), раствором II (красный), и фиксатором.

РЕАГЕНТЫ

- Фиксатор: 1,8 мг/л триарилметана в метиловом спирте.
- Раствор I (синий): 1 г/л ксантена в буфере с азидом натрия (консервант).
- Раствор II (красный): 1,25 г/л смеси красителя

ХОД ОКРАСКИ:

- Мазок фиксируют в течение 15 сек в фиксаторе.
- Избыток раствора удаляют, поставив стекло вертикально на фильтровальную бумагу.
- Препараты окрашивают раствором I в течение 10 сек, а затем раствором 2 в течение 5 сек. Между этапами удаляют избыток раствора со стекла.
- Препараты погружают в проточную воду 10 -15 раз для удаления избыточного красителя
- Чтобы удалить избыточную воду и высушить их на воздухе, препараты располагают вертикально.

Если возникает фоновое окрашивание, следует промыть аликвоту эякулята и приготовить и окрасить новый мазок.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. ПРОБОПОДГОТОВКА ДЛЯ МЕТОДИКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ.

Анализ жизнеспособности проводится на окрашенных мазках. Используется суправитальная окраска. Данная одношаговая методика использует нигрозин для увеличения контраста между фоном и головками сперматозоидов. Окрашивание нигрозином делает фон темным, благодаря чему на нем хорошо выделяются слабо окрашенные сперматозоиды.

Производится подсчёт окрашенных (мёртвых) и неокрашенных (живых) клеток. Проводится исследование 200 сперматозоидов в каждом образце, полученную долю живых сперматозоидов в образце округляют до ближайшего целого числа.

Живые сперматозоиды имеют белый цвет головки, мёртвые – красный или темно-розовый. Сперматозоиды с бледно-розовой головкой считают живыми. Если окрашен только участок шейки, а головка остаётся неокрашенной, то считают, что синдром «дырявой мембраны» шейки не свидетельствует о смерти клетки или полном нарушении целостности оболочки. Подобные клетки следует считать живыми.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ (ПО РЕКОМЕНДАЦИЯМ ВОЗ 2010)*

РЕАГЕНТЫ

- Эозин Y: при лёгком нагревании растворить 0,67 г эозина Y (индекс цвета 45380) и 0,9 г NaCl в 100 мл дистиллированной воды;
- Эозин-нигрозин: добавить 10 г нигрозина (индекс цвета 50420) в раствор эозина Y;
- Довести суспензию до кипения, затем охладить при комнатной температуре;
- Отфильтровать раствор с помощью фильтровальной бумаги (например, 90 г/м²) для удаления осадка и хранить в герметично закрывающейся бутылки из тёмного стекла.

ХОД ОКРАСКИ

- Хорошо перемешайте образец эякулята;
- Смешайте в пробирке 50 мкл эякулята с 50 мкл раствора эозина-нигрозина, подождите 30 секунд;
- При помощи стекла со шлифованным краем сделайте мазки и дайте им высохнуть;
- Проанализируйте полученные препараты, используя объектив 40x-60x.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ КРАСИТЕЛЕМ VITALSCREEN

Помимо методики окрашивания эякулята, рекомендованной ВОЗ, была опробована методика, которая используется при применении готовых красителей VitalScreen Fertipro (<http://www.fertipro.com/inserts/VitalScreen.pdf>). Данная методика удобна и также показала хорошие результаты.

РЕАГЕНТЫ:

Эозин – 1% солевой раствор.

Нигрозин – 5% солевой раствор

Ход окраски (по инструкции, предложенной производителем красителей VitalScreen Fertipro):

* (WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Fifth edition, 2010)

ХОД ОКРАСКИ

- Хорошо перемешайте образец эякулята;
- Смешайте в пробирке 50 мкл эякулята с 2 каплями раствора эозина и тщательно перемешайте;
- Через 30 секунд добавьте в пробирку 3 капли предварительно перемешанного раствора нигрозина;
- Через 30 секунд при помощи стекла со шлифованным краем сделайте мазки и дайте им высохнуть;
- Нанесите на стекло небольшую каплю иммерсионного масла и равномерно, тонким слоем распределите по препарату. Это позволит повысить резкость изображения при дальнейшем анализе препарата;
- Проанализируйте полученные препараты с использованием объектива x40-x60.

При использовании красителя с истекшим сроком годности может появиться зернистость фона, которая мешает оценке результата (см.Рис. 82).

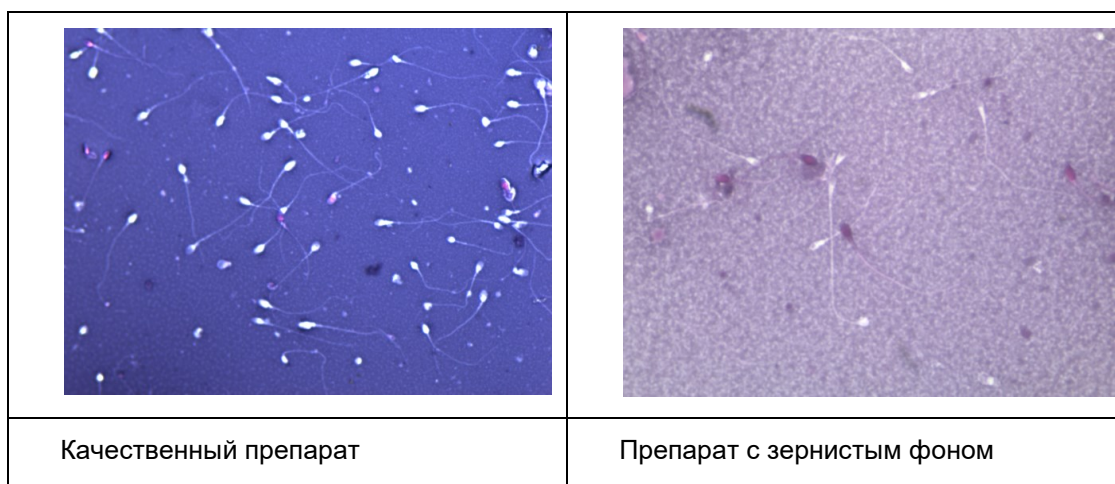


Рис. 82 Изображения окрашенных препаратов для анализа жизнеспособности

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ ДЛЯ МЕТОДИКИ ФРАГМЕНТАЦИЯ ДНК

Анализ проводится на изображениях препаратов, окрашенных Toluidine blue по методике Beletti ME, Mello ML. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. Theriogenology. 2004 Aug;62(3-4):398-402. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.10.016., модифицированной по плану проекта РФФ № 19-16-00009П для сперматозоидов петухов: фрагментированные клетки окрашиваются интенсивно, не фрагментированные – слабо окрашиваются. Также есть промежуточный средне окрашенный вариант (см. Рис. 83).

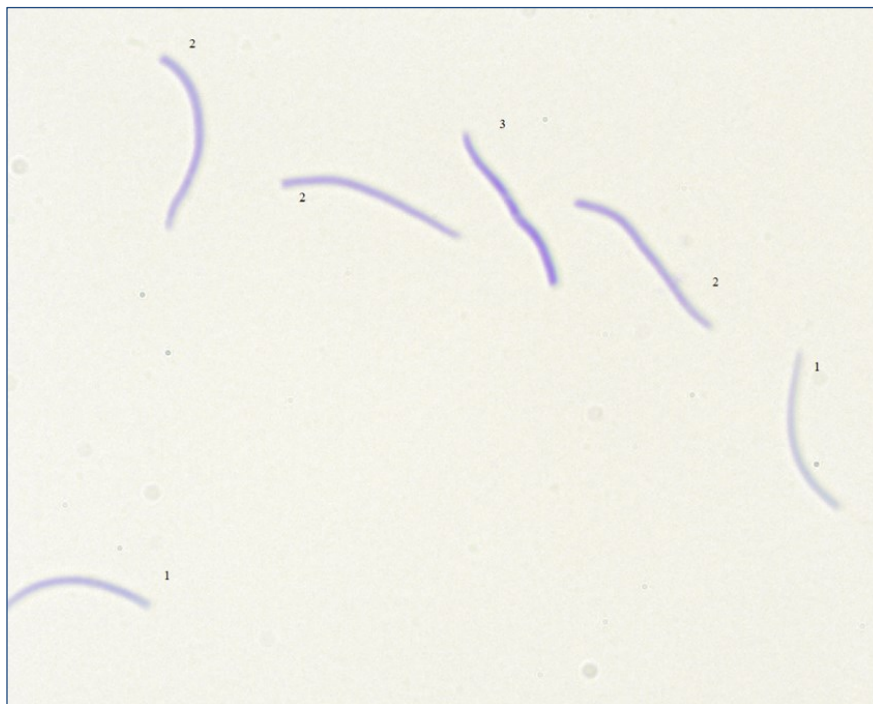


Рис. 83 (3 - фрагментированные клетки, 2 - частично фрагментированные, 1 – не фрагментированные).

ПРИЛОЖЕНИЕ 5. ПАРАМЕТРЫ, РАССЧИТЫВАЕМЫЕ В МЕТОДИКЕ ПОДВИЖНОСТЬ

Параметр	Описание	Единицы измерения
VSL	Прямолинейная скорость перемещения головы сперматозоида по прямой линии между начальной позицией и конечной	микрон/сек
VCL	Средняя криволинейная скорость головки сперматозоида на протяжении его реальной криволинейной траектории	микрон/сек
LIN	Линейность криволинейного пути. Вычисляется как VSL/VCL	%
VAP	Средняя скорость перемещения головы сперматозоида по усредненной траектории	микрон/сек
STR	Прямонаправленность. Линейность усредненной траектории. Вычисляется как VSL/VAP	%
Площадь	Площадь головки	Микроны ²
Округлость	Характеризует близость формы головки к идеальному кругу. Для идеального круга 100, для всего остального меньше.	%

ПРИЛОЖЕНИЕ 6. ПАРАМЕТРЫ, РАССЧИТЫВАЕМЫЕ В МЕТОДИКЕ МОРФОЛОГИЯ

Параметр	Описание	Единица измерения
Удлиненность	Соотношение большой оси эллипса к малой оси эллипса.	%
Округлость	Характеризует близость формы головки к идеальному кругу. Для идеального круга 100, для всего остального меньше. $c = \frac{4\pi A}{P^2}$ <i>A – площадь, P - периметр</i>	%
Длина	Длина большой оси эллипса	Микрон (µm)
Ширина	Длина малой оси эллипса	Микрон (µm)
Площадь	Площадь головки сперматозоида	микроны кв. (µm ²)
Доля акросомы	Отношение площадей акросомы и полной площади головки.	%
Толщина шейки	Средняя ширина шейки перпендикулярно оси шеи	Микрон (µm)
Максимальная толщина шейки	Толщина в самом толстом месте шейки	Микрон (µm)

ПРИЛОЖЕНИЕ 7. ИНДЕКСЫ МНОЖЕСТВЕННЫХ АНОМАЛИЙ СПЕРМЫ

Вычисление Индексов множественных аномалий спермы обеспечивает более подробную информацию по анализируемому образцу семени, нежели простая оценка процентных соотношений нормальных и имеющих патологию сперматозоидов.

MAI (индекс множественных аномалий) – количество патологий голов, шей и хвостов, деленное на количество патологических сперматозоидов.

TZI (индекс тератозооспермии) – похожий на MAI индекс, отличающийся от него тем, что в расчет количества патологий принимаются по одному дефекту для головы, шеи, хвоста и ERC от каждого сперматозоида, а не все дефекты этого сперматозоида как при расчете MAI. Количество посчитанных дефектов делится на число патологических сперматозоидов.

SDI (индекс деформации спермы) – общее количество патологий, деленное на общее количество сперматозоидов (патологических и нормальных). Общее количество патологий считается следующим образом: все патологии голов сперматозоидов суммируются и к этой сумме прибавляется по одному дефекту от каждой шеи и от каждого хвоста.


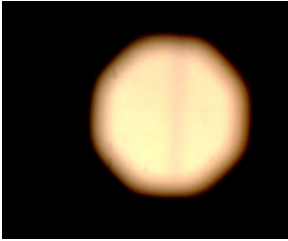
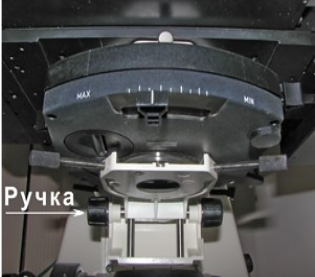

ПРИЛОЖЕНИЕ 8. СПИСОК ГОРЯЧИХ КЛАВИШ

CTRL+N	Ввести начальные данные.
F4	Включение/выключение режима «живого» видео с камеры
Ctrl+O	Вызов диалогового окна Открыть файлы
Ctrl+ S	Вызов диалогового окна Сохранение
Ctrl+ P	Вызов диалогового окна Печать.
Ctrl + «+»	Увеличение изображения в окне документа.
Ctrl + «-»	Уменьшение изображения в окне документа.
F5	Начать Анализ
Ctrl+1	Показать одно окно документа
Ctrl+2	Разделить окно документа на 2 части
Ctrl+M	Показать/скрыть маски сперматозоидов в Морфология, Жизнеспособность, Фрагментация ДНК
Ctrl+I	Показать/скрыть траектории сперматозоидов в методике Подвижность или контуры сперматозоидов методиках Морфология, Жизнеспособность, Фрагментация ДНК
Del	Удаление активного элемента
Esc	Отказ от текущей операции, закрытие диалоговых окон.
Space (клавиша Пробел)	Сделать снимок при открытом окне «живого» видео

ПРИЛОЖЕНИЕ 9. НАСТРОЙКА ОСВЕЩЕНИЯ МИКРОСКОПА

Одним из важнейших факторов, определяющих качество получаемых изображения, является правильная настройка освещения в микроскопе. В большинстве современных микроскопов с точечным освещением (галогеновая или лампа накаливания) используется метод, предложенный Келером в 1893 году.

Для того, чтобы правильно настроить освещение микроскопа по Келеру, необходимо выполнить следующие несложные операции:

 <p>Полевая диафрагма микроскопа.</p>	<p>Включите микроскоп и положите препарат на столик. Выберите объектив с кратностью 10x. Сфокусируйтесь на препарате, то есть получите резкое и достаточно яркое изображение в окулярах микроскопа.</p> <p>Полностью откройте апертурную диафрагму. Закройте полевую диафрагму настолько, чтобы ее края можно было видеть (пусть даже не резко) в поле зрения.</p>
 <p>Изображение полевой диафрагмы до фокусировки и центрирования</p>	<p>Посмотрите в окуляры микроскопа. Возможный вариант изображения, которое Вы увидите, представлен на Рисунке слева.</p>
 <p>Ручка</p> <p>Ручка фокусировки конденсора.</p>	<p>Поднимая или опуская конденсор с помощью ручки фокусировки конденсора, добейтесь получения максимально резкого изображения краев полевой диафрагмы.</p>
 <p>Центрировочные винты</p> <p>Центрировочные винты конденсора</p>	<p>Отцентрируйте изображение полевой диафрагмы, поворачивая центрировочные винты конденсора.</p> <p>После фокусировки и центрировки конденсора изображение полевой диафрагмы в окулярах будет выглядеть так, как показано на Рисунке.</p>



Изображение полевой диафрагмы после фокусировки и центрировки

Теперь откройте полевую диафрагму до размера поля зрения микроскопа. При недостаточном открытии полевой диафрагмы углы изображения будут затемнены, а при излишнем мы не получим максимальной концентрации света на объекте исследования.



Изображение апертурной диафрагмы

Снимите один окуляр. Посмотрев в отверстие, Вы увидите изображение апертурной диафрагмы. Рекомендуется открыть примерно на $2/3$ от видимого поля. В этом случае достигается максимальная контрастность изображения. Добавьте или убавьте свет с помощью ручки регулировки яркости лампы микроскопа, если в этом есть необходимость.