



Calibrazione del microscopio ottico per la stima della densità endoteliale

Daide Camposampiero

Società Italiana Banche degli Occhi
VII Corso di Formazione
L' Aquila, 24 novembre 2012

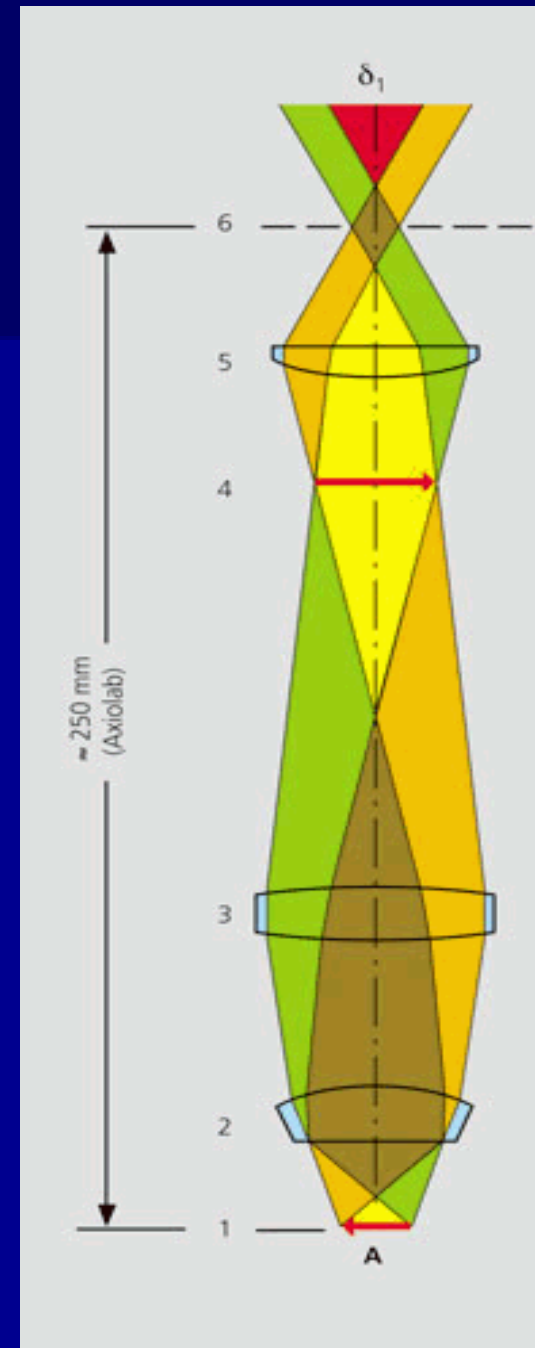
Microscopio composto

Un tipico microscopio composto ingrandisce in due fasi:

L'**obiettivo** (2) produce un'immagine ingrandita dell'oggetto (1) nel piano dell'immagine intermedia (4).

L'**oculare** (5) ingrandisce l'immagine intermedia come una lente d'ingrandimento.

Nei microscopi moderni, l'obiettivo con correzione all'infinito (ICS) proietta raggi paralleli a distanza infinita e l'immagine è formata da una **lente intermedia** (3).



I piani ottici coniugati

Serie delle aperture (risoluzione, contrasto)	Serie dei campi (illuminazione, immagine)
Filamento della lampada	
	Diaframma del campo luminoso
Diaframma del condensatore	
	Piano del preparato
Piano focale posteriore dell'obiettivo	
	Piano dell'immagine intermedia
Pupilla dell'osservatore	
	Retina dell'osservatore

Anatomia del microscopio

1: Filamento della lampada

2: Diaframma

3: Piano focale posteriore
dell'obiettivo

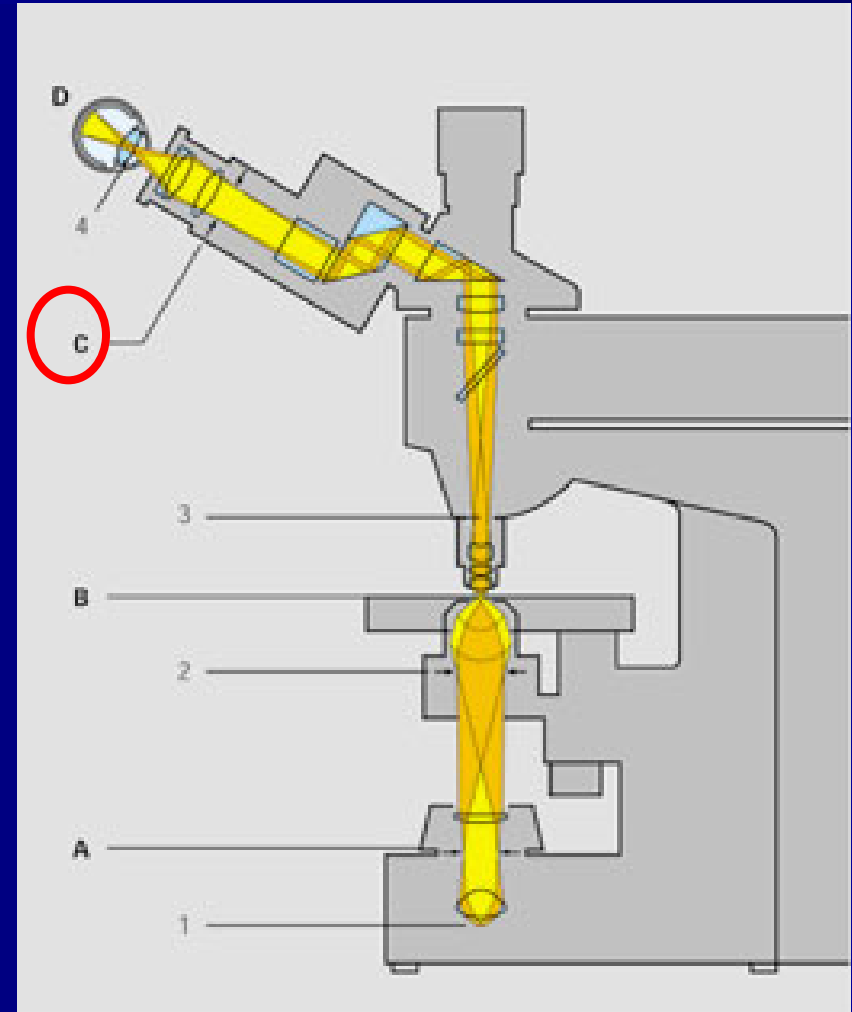
4: Pupilla dell'osservatore

A: Diaframma campo luminoso

B: Piano del preparato

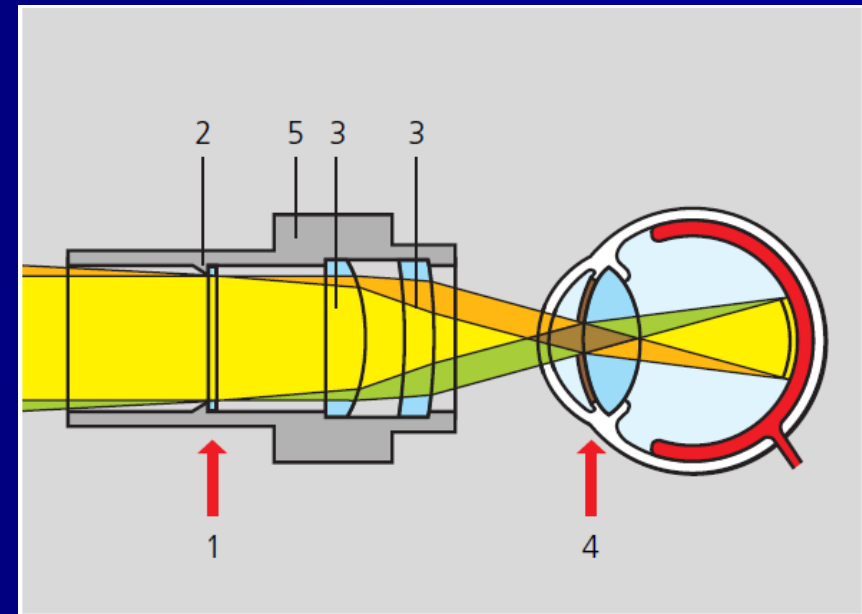
C: Immagine intermedia

D: Retina dell'osservatore



Oculare e reticolo di conta

- 1: Immagine intermedia e posizione del reticolo
- 2: Limite del campo
- 3: Ottiche dell'oculare
- 4: Pupilla dell'osservatore
- 5: Ghiera per la messa a fuoco



Reticolo

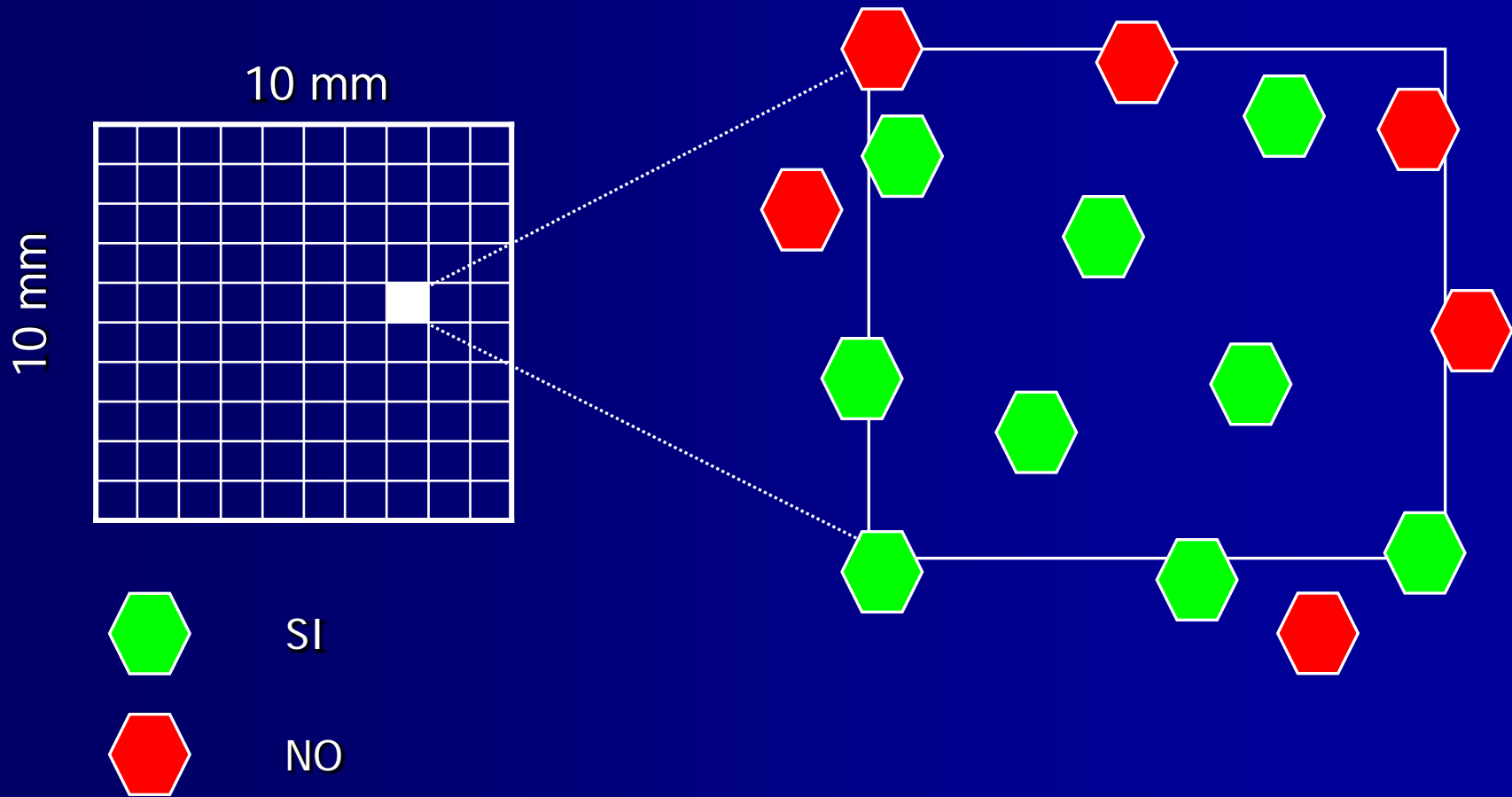
- Il reticolo di conta è allineato esattamente sul piano dell'immagine intermedia e appare sovrapposto all'immagine.
- L'ingrandimento dell'oculare non deve essere tenuto in considerazione poiché il suo effetto si attua dopo l'immagine intermedia.

Stima della densità cellulare

- Reticolo 10 x 10 mm (100 mm²), diviso in 100 quadrati.
- Con obiettivo 10X, la superficie di cornea visualizzata in ciascun quadrato è 1/100 di mm².
- Media delle conte x 100 = cellule/mm².

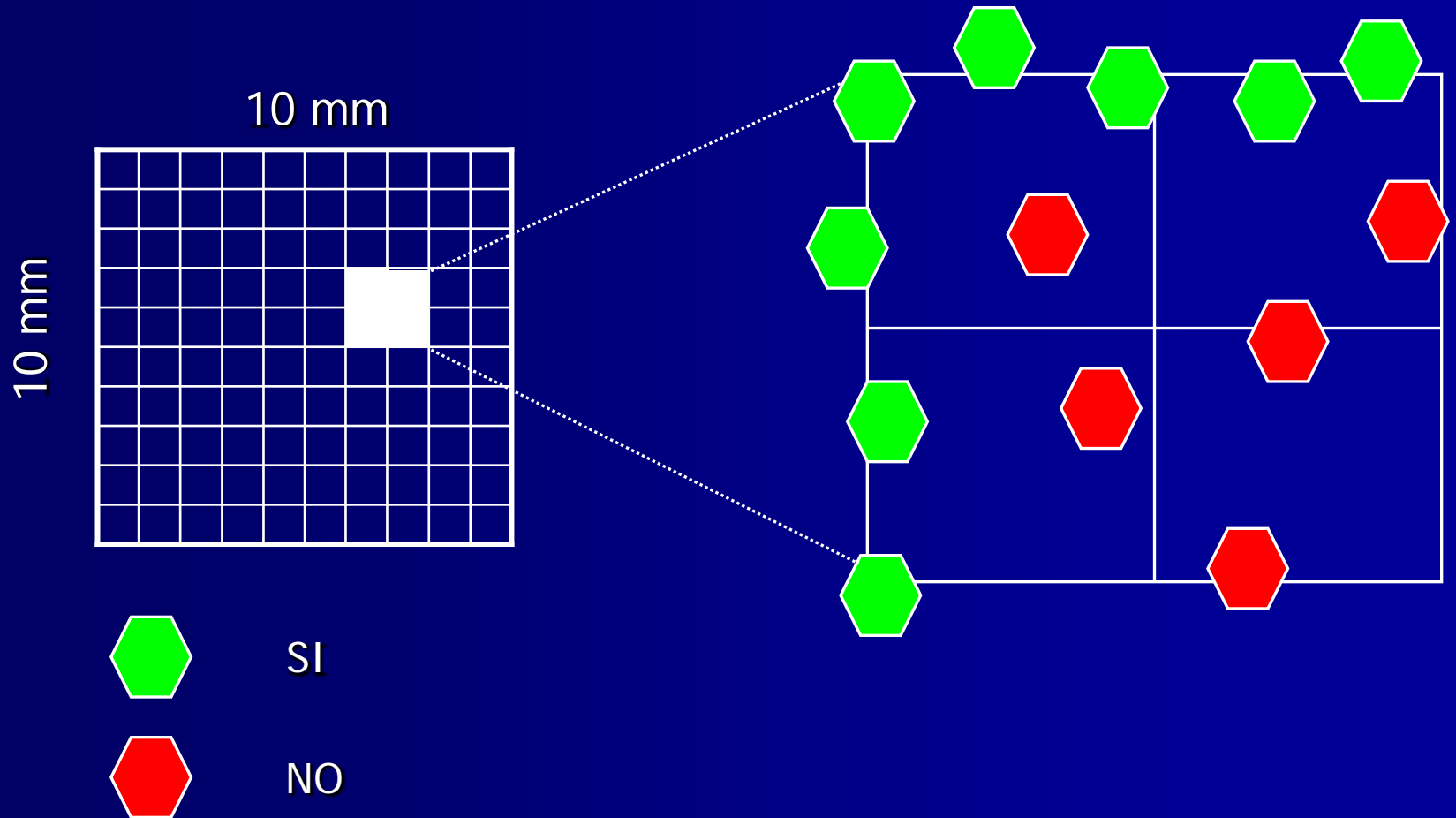
Stima della densità cellulare

Zone strategy



Stima della densità cellulare

Border strategy



Riferimenti

- D. Lgs. 25 gennaio 2010, n. 16. Allegato V.
- Linee guida per il prelievo, la processazione e la distribuzione di tessuti a scopo di trapianto. Sez. B, paragrafo 6.2.

“ Tutte le attrezzature che dispongono di una funzione di misurazione critica sono tarate su un parametro di riferimento reperibile, qualora esista.”

- SOP C3.200 Manutenzione e pulizia apparecchiature

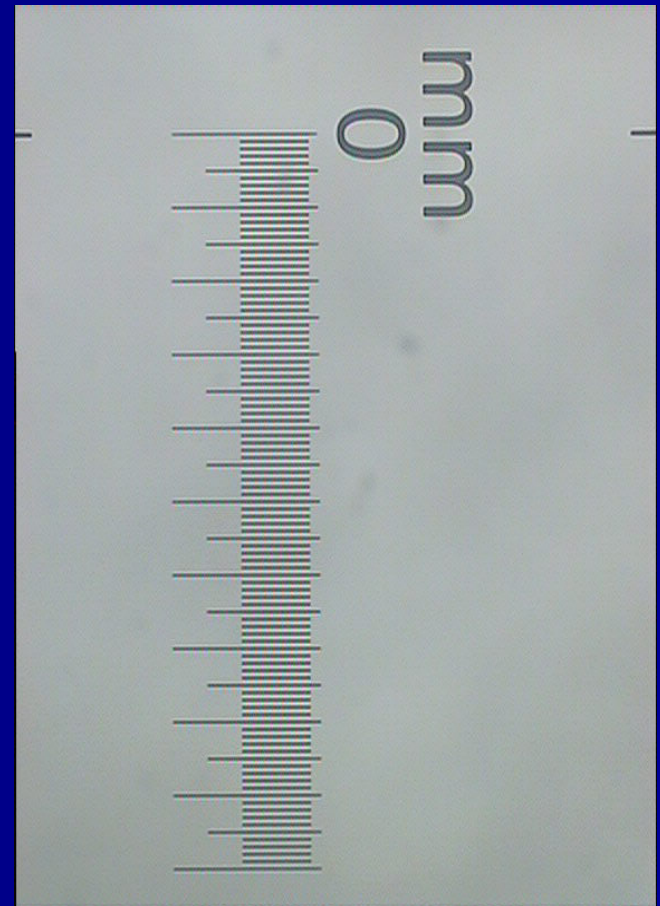
Taratura

La **taratura** è una caratterizzazione il cui scopo è la definizione delle caratteristiche metrologiche di uno strumento di misura. Questo avviene tramite un confronto di misure con uno strumento di riferimento, definito campione.

Calibrazione

La **calibrazione** è l'operazione in cui uno strumento di misura viene regolato in modo da migliorarne l'accuratezza.

La calibrazione richiede il confronto con misure di riferimento prodotte utilizzando uno strumento campione.



2. All critical equipment and technical devices must be identified and validated, regularly inspected and preventively maintained in accordance with the manufacturers' instructions. Where equipment or materials affect critical processing or storage parameters (e.g. temperature, pressure, particle counts, microbial contamination levels), they must be identified and must be the subject of appropriate monitoring, alerts, alarms and corrective action, as required, to detect malfunctions and defects and to ensure that the critical parameters are maintained within acceptable limits at all times. All equipment with a critical measuring function must be **calibrated** against a traceable standard if available.

DIRETTIVA 2006/86/CE

2. Tutte le attrezzature e i dispositivi tecnici critici devono essere identificati e convalidati, periodicamente ispezionati e preventivamente sottoposti a manutenzione conformemente alle istruzioni del fabbricante. Le attrezzature o i materiali che incidono su parametri critici di lavorazione o stoccaggio (ad esempio temperatura, pressione, numero di particelle, livello di contaminazione microbica) devono essere identificati ed eventualmente sottoposti a osservazioni, vigilanza, allarmi e interventi correttivi adeguati per individuarne le disfunzioni e i difetti e per garantire che i parametri critici rimangano costantemente al di sotto dei limiti accettabili. Tutte le attrezzature che dispongono di una funzione di misurazione critica devono essere **tarate** su un parametro di riferimento reperibile, qualora esista.

DECRETO LEGISLATIVO 25 GENNAIO 2010, N. 16

2. Tutte le attrezzature e i dispositivi tecnici critici sono identificati e convalidati, periodicamente ispezionati e preventivamente sottoposti a manutenzione conformemente alle istruzioni del fabbricante. Le attrezzature o i materiali che incidono su parametri critici di lavorazione o stoccaggio (ad esempio temperatura, pressione, numero di particelle, livello di contaminazione microbica) sono identificati ed eventualmente sottoposti a osservazioni, vigilanza, allarmi e interventi correttivi adeguati per individuarne le disfunzioni e i difetti e per garantire che i parametri critici rimangano costantemente al di sotto dei limiti accettabili. Tutte le attrezzature che dispongono di una funzione di misurazione critica sono **tarate** su un parametro di riferimento reperibile, qualora esista.

EXTENDED REPORT

Is manual counting of corneal endothelial cell density in eye banks still acceptable? The French experience

G Thuret, C Manissolle, S Acquart, J-C Le Petit, J Maugery, L Campos-Guyotat, M J Doughty, P Gain

Br J Ophthalmol 2003;87:1481-1486



PILOT STUDY OF ENDOTHELIAL CELL DENSITY IN TISSUE EXTERNAL QUALITY CONTROL IN AFSSAPS (FRANCE)

N. DELESALLE⁽¹⁾, J. DUBUS⁽¹⁾, C. AUXENFANS⁽²⁾, TANGUY E.⁽³⁾, I. MARTINACHE⁽⁴⁾, S. ACQUART⁽⁵⁾, M. GIRAUD⁽⁶⁾, L. FLEURY⁽¹⁾

(1) French Health Products Safety Agency (Afssaps), Laboratories and Controls Directorate, Unit Blood products and Cellular Therapy, 93200 Saint-Denis, France; (2) Tissue and Cells Bank, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon cedex 03, France; (3) Tissue Bank, Banque Française des Veux, 75004 Paris, France; (4) Tissue Bank, CHU Lille, 59037 Lille, France; (5) Tissue Bank, EFS Auvergne Loire, 42023 Saint Etienne, France; (6) Tissue Bank, EFS Alpes Méditerranée, 13005 Marseille, France

Standard Microlithographic Mosaics to Assess Endothelial Cell Counting Methods by Light Microscopy in Eye Banks Using Organ Culture

Nilanjana Deb-Joardar,^{1,2} Gilles Thuret,^{1,2} Georges-André Racine,³ David Pons,⁴ Gerald Brun,⁴ Olivier Parriaux,⁴ Michel Peoc'h,¹ Sophie Acquart,^{1,5} and Philippe Gain¹



EUROKERATOTEST

EUROPEAN STUDY ON RELIABILITY ASSESSMENT OF ENDOTHELIAL CELL COUNT IN EYE BANKS

[Home](#)

[How to proceed ?](#)

[1 : Questionnaire](#)

[2 : First evaluation](#)

[3 : Second evaluation](#)

[References](#)

[Contact](#)

[Login](#)

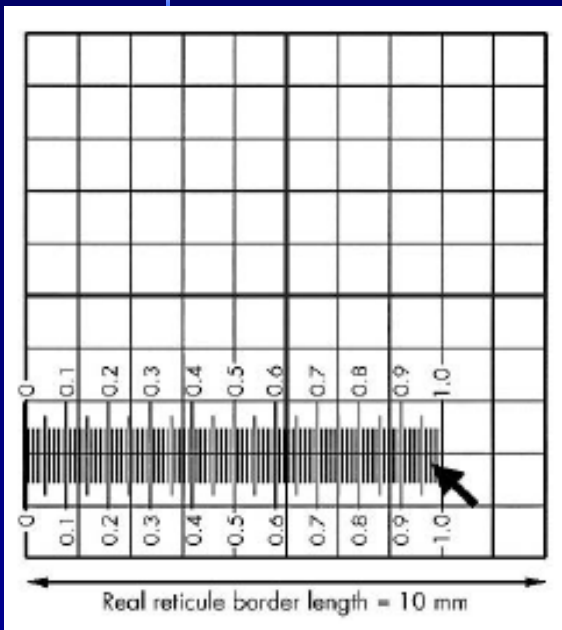
Welcome to the first collaborative study on the reliability of endothelial cell count in Eye Banks.

Taratura e calibrazione del microscopio

Materiale: micrometro da 1 mm, reticolo di lato 10 mm, obiettivo 10x.

La dimensione lineare del micrometro è ingrandita e proiettata in 8 mm anziché in 10 mm di reticolo, pertanto:

- rapporto lineare di ingrandimento = $8/10$
- rapporto quadratico di ingrandimento = $64/100$
- fattore di conversione fra le aree = $0,64$



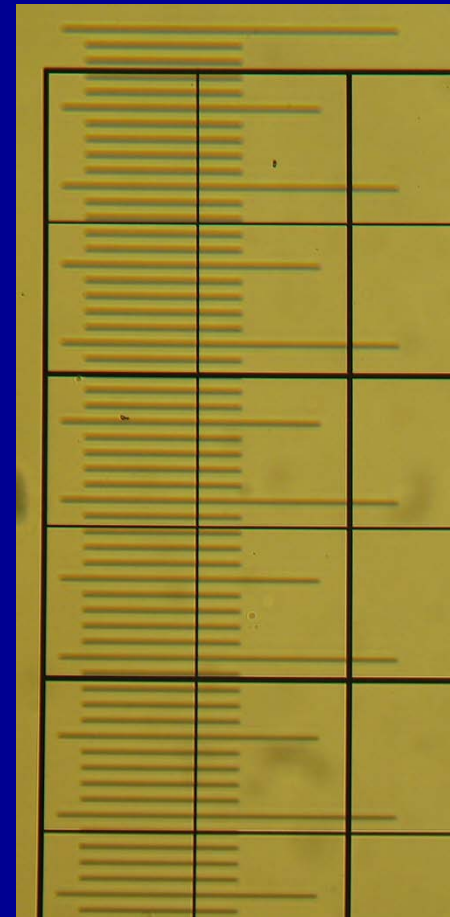
DENSITA' CORRETTA = Densità calcolata X Fattore di Conversione fra le aree

Esempio pratico n. 1

Materiale: micrometro da 1 mm, reticolo di lato 10 mm, obiettivo 10x.

La dimensione lineare del micrometro è ingrandita e proiettata in 10,3 mm anziché in 10 mm di reticolo, pertanto:

- rapporto lineare di ingrandimento = $10,3/10$
- rapporto quadratico di ingrandimento = $106/100$
- fattore di conversione fra le aree = 1,06



Esempio pratico n. 2

Materiale: micrometro da 1 mm, reticolo di lato 10 mm, obiettivo 10x.

La dimensione lineare del micrometro è ingrandita e proiettata in 9,85 mm anziché in 10 mm di reticolo, pertanto:

- rapporto lineare di ingrandimento = $9,85/10$
- rapporto quadratico di ingrandimento = $97/100$
- fattore di conversione fra le aree = $0,97$

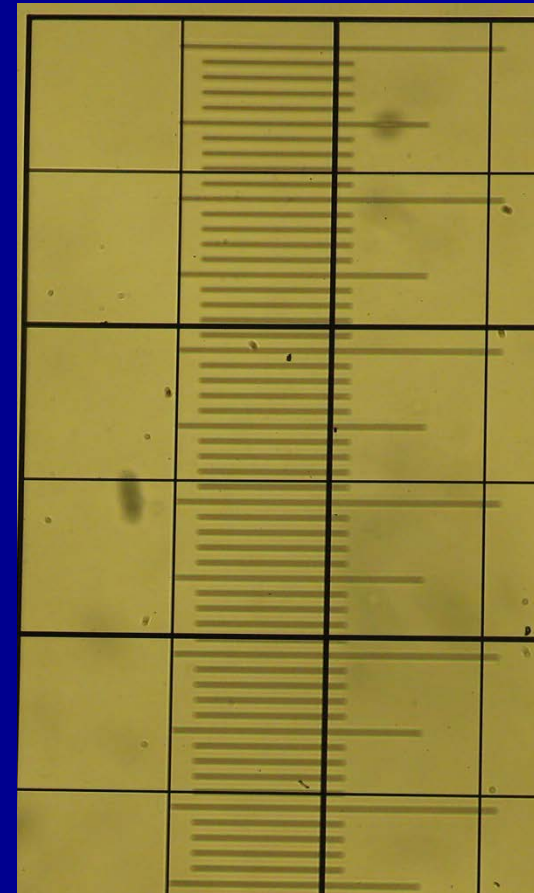


Tabella di calibrazione

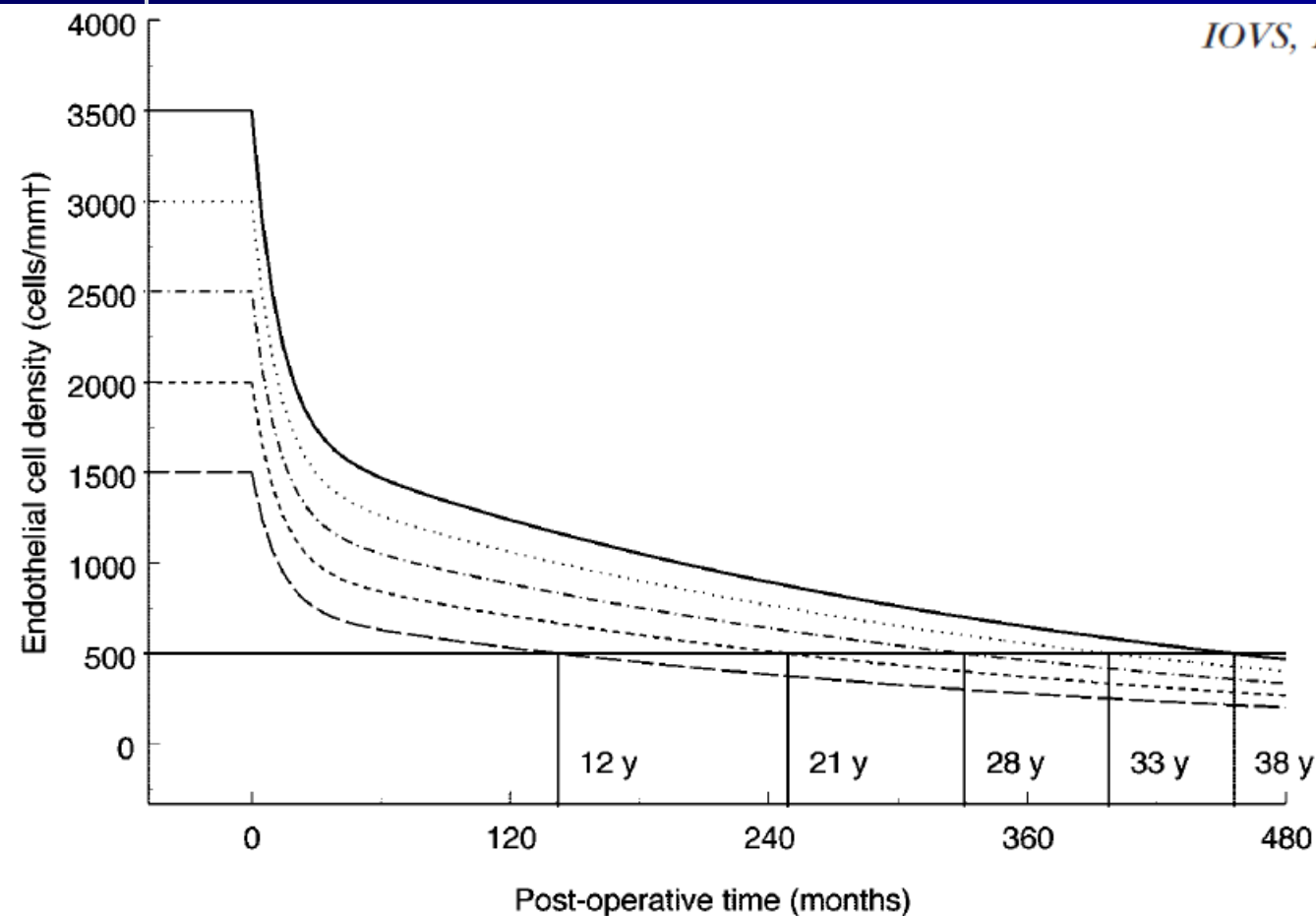
F.C. = 1.06

Densità reale (LM-1) (cell/mm ²)	Densità reticolo (cell/mm ²)	Densità reale (LM-2) (cell/mm ²)
1802	1700	1649
1908	1800	1746
2014	1900	1843
2120	2000	1940
2226	2100	2037
2332	2200	2134
2438	2300	2231
2544	2400	2328
2650	2500	2425
2756	2600	2522
2862	2700	2619
2968	2800	2716
3074	2900	2813
3180	3000	2910

F.C. = 0.97

Predicting Endothelial Cell Loss and Long-Term Corneal Graft Survival

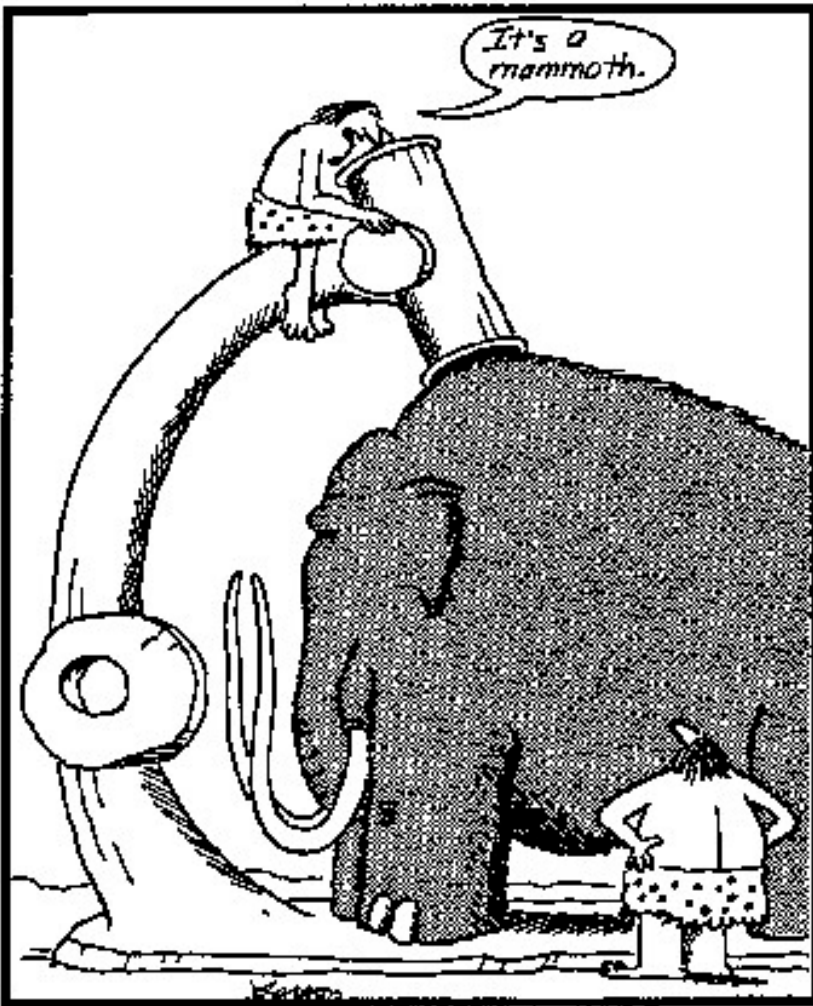
W. John Armitage,¹ Andrew D. Dick,¹ and William M. Bourne²



IOVS, August 2003, Vol. 44, No. 8

FIGURE 4. Predicted endothelial cell loss from donor corneas of different initial cell densities ranging from 1500 to 3500 cells/mm² using the exponential model from Figure 3. The model was used to calculate the percentage loss of cells with time, which allowed the change in cell density to be determined for the different initial (donor) cell densities. The time to reach the upper limit of the critical range of cell density compatible with graft function (assumed to be 500 cells/mm²) is given for each curve.

Grazie!



Early microscope

MCHUMOR.com by T. McCracken



"Hey, guys, come over here.
I just discovered the telescope."

©T. McCracken mchumor.com