PRINCIPI BASE DI MICROSCOPIA E CORRETTO USO DEL MICROSCOPIO

DAVIDE DE LORENZI
Medico Veterinario, Specialista in "Clinica e Patologia degli Animali da Affezione" - Forlì

Il microscopio ottico composto (cioè quello strumento più semplicemente definito "microscopio") rappresenta il mezzo diagnostico probabilmente più impiegato nelle scienze mediche e biologiche.

Sono molti gli strumenti scientifici, più o meno complessi, che vengono usati quotidianamente nella pratica clinica e chirurgica dal veterinario: siringhe, apparecchio radiologico, ecografo, elettrocardiografo, lampada scialitica, vaporizzatore, fonendoscopio, ...e la lista è ancora lunghissima.

Tuttavia, nessuno degli oggetti sopraelencati ha una origine che si possa collocare, nel tempo, a più di un secolo fa.

Si ritiene che il primo microscopio ottico composto (cioè formato dall'uso combinato di due o più lenti) sia stato costruito in Olanda da Zacharias Jansen nel 1595, anche se il termine "microscopio" fu creato in Italia più tardi, nel 17° secolo, ad opera dell'"Accademia dei Lincei".

Queste brevissime note storiche ci permettono di capire come l'attuale microscopio ottico sia il frutto di una evoluzione tecnica e scientifica di ben 400 anni; l'analisi delle singole innovazioni e scoperte che hanno permesso, nel tempo, la creazione di uno strumento di estrema precisione ed insostituibile utilità come il microscopio ottico dei nostri giorni, va al di là degli intenti di questo lavoro ma chi volesse approfondire l'argomento, potrà trovare utili informazioni e belle immagini nei richiami bibliografici a fine articolo.

A COSA SERVE IL MICROSCOPIO?

In generale si ritiene che il microscopio ottico serva ad ingrandire cose molto piccole, ma non è proprio così.

Ad esempio, è possibile acquistare in un negozio di giochi un microscopio che permetta fino a 1200 ingrandimenti per alcune centinaia di migliaia di lire, mentre un microscopio a 1000 ingrandimenti di media qualità costa circa tre milioni di lire; un ottimo microscopio da ricerca, sempre a 1000 ingrandimenti, ha un prezzo che parte da una decina di milioni.

Se la capacità di ingrandire un campione molto piccolo fosse la funzione principale del microscopio, il costo dovrebbe essere direttamente proporzionale all'ingrandimento massimo raggiungibile ma di fatto non è così perché a 1200 ingrandimenti, l'immagine che un microscopio economico ci offre appare indistinta e piena di aberrazioni cromatiche, mentre a 1000 ingrandimenti uno strumento di buona qualità permette una buona o ottima definizione dei particolari osservabili.

In un microscopio da ricerca, gli stessi particolari appariranno di una limpidezza cristallina.

Questa capacità del sistema ottico di rilevare dettagli molto piccoli viene definita potere di risoluzione: solamente quando è possibile identificare (il termine tecnico sarebbe "risolvere") i dettagli più piccoli, ha senso ingrandirli.

Per cui possiamo dire che la funzione principale del microscopio è quella di permetterci di distinguere i particolari di strutture estremamente piccole in maniera molto chiara; la possibilità di ingrandire questi particolari è solamente una caratteristica secondaria dello strumento.

IL POTERE DI RISOLUZIONE (PDR) ED APERTURA NUMERICA (AN)

Il potere di risoluzione di un sistema ottico consiste nella capacità di distinguere due punti dell'oggetto che stiamo osservando come due punti distinti fra di loro (questo concetto è importantissimo: il PdR è relativo alla distanza fra i punti e non al diametro del singolo punto).

L'occhio umano non può distinguere due punti separati da meno di 0,1 mm (PdR = 0,1 mm). Impiegando il microscopio ottico il potere risolutivo sale a 0,2 µm ed usando il microscopio elettronico si arriva a 0,0004 µm (Tab. 1).

Il PdR rappresenta una delle caratteristiche fondamentali del sistema ottico che compone il microscopio ed è diretta funzione delle lenti, dell'indice di rifrazione dei mezzi interposti fra campione e lente e della lunghezza d'onda della luce impiegata.

Tabella 1
Raffronto fra le principali unità di misura usate in microscopia

µ o µm	micrometro o micron	0,001 mm	10^{-6} m
mµ o nm	nanometro	0,001 µm	10^{-9} m
Å	ångström	0,0001 µm	10^{-10}m

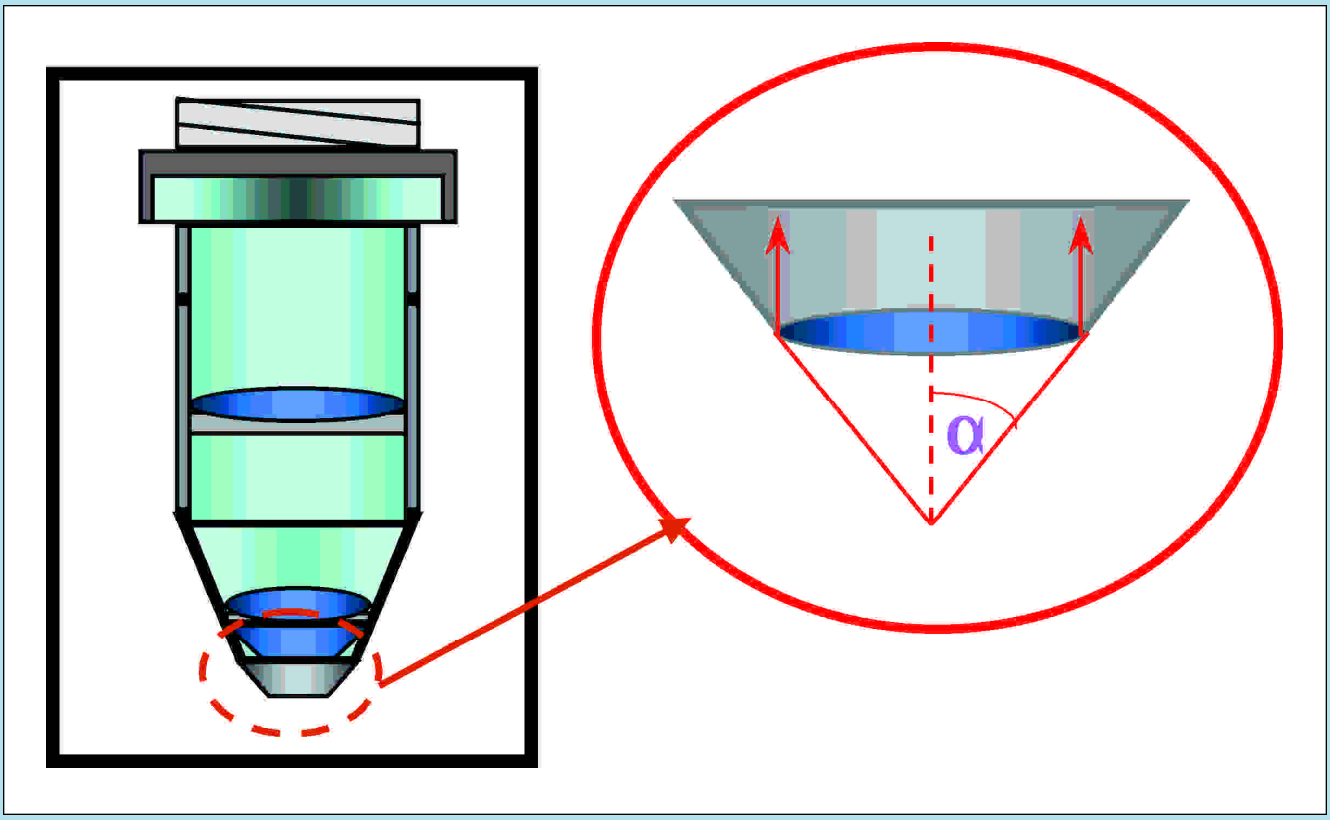


FIGURA 1 - L'angolo α ovvero 1/2 dell'angolo di accettazione della lente frontale dell'obbiettivo (vedi testo).

In particolare, per ciò che riguarda il sistema ottico, assume fondamentale importanza l'**Apertura Numerica** (AN) della lente dell'obbiettivo ovvero il suo angolo d'accettazione della luce; altri importanti fattori che influenzano l'AN sono l'indice di rifrazione del mezzo interposto fra oggetto e lente e la distanza di lavoro della lente dall'oggetto.

Il fisico tedesco Ernest Abbe ha elaborato una formula matematica che esprimere l'apertura numerica di un dato obbiettivo:

$$\mathbf{AN = n \text{ sen } \alpha}$$

dove **n** = indice di rifrazione del mezzo interposto fra lente ed oggetto ed $\alpha = {}^{1}/_{2}$ dell'angolo di accettazione della luce della lente frontale dell'obbiettivo (Fig. 1).

In definitiva, l'AN è un valore che descrive le qualità della lente ed è un parametro così importante che le case produttrici stampano questo dato direttamente sulla struttura esterna dell'obbiettivo, come vedremo più oltre, parlando di obbiettivi.

Oltre a questo, l'AN ci indica anche quale è l'ingrandimento finale massimo che un obbiettivo è in grado di sopportare; è sufficiente moltiplicare l'AN per 1000 e si avrà l'ingrandimento massimo al quale l'obbiettivo può essere usato.

Infine possiamo affermare che l'AN dell'obbiettivo determina il Potere di Risoluzione, secondo la formula di Abbe:

$$\mathbf{R = 0{,}5\ (\lambda\ /\ AN)}$$

dove **R** = distanza minima fra due punti che il sistema ottico è in grado di risolvere, λ = lunghezza d'onda del sistema di illuminazione impiegato, ed **AN** = apertura numerica dell'obbiettivo.

PROFONDITÀ DI CAMPO (PDC) E PROFONDITÀ DI FUOCO (PDF)

La profondità di campo rappresenta la distanza fra due piani, al di sopra ed al di sotto del campione da osservare, messi contemporaneamente a fuoco dall'obbiettivo. È piuttosto evidente che, se il campione da esaminare ha un certo spessore e l'obbiettivo ha una profondità di campo ridotta, si potranno avere delle difficoltà nella messa a fuoco. La PdC è inversamente proporzionale alla AN dell'obbiettivo, per cui ad es. un obbiettivo ad immersione 100X (AN 1,25) ha una PdC di 0,15 μ, mentre un obbiettivo a secco da 25X (AN 0,40) ha una PdC di 0,4 μ.

Durante l'osservazione dei campioni citologici ed ematologici la PdC non rappresenta generalmente un problema perché spesso troviamo sul vetrino cellule disposte in monostrato.

Dall'altra parte dell'obbiettivo, in corrispondenza dell'osservatore, si trova il piano di fuoco dell'immagine: il range di messa a fuoco dell'immagine è chiamato profondità di fuoco.

Questo parametro ha importanza analoga al PdC, ma presenta una importante differenza: aumentando il potere di ingrandimento dell'obbiettivo la PdC diminuisce, mentre la PdF invece aumenta.

CONTRASTO

Con questo termine si intende indicare grossolanamente la quantità di sfumature di grigio o di colore presenti nell'immagine di un campione: un'immagine fortemente contrastata presenterà idealmente due soli colori (il bianco ed il nero) mentre, diminuendo il contrasto aumenteranno le

sfumature e, conseguentemente, le informazioni che si possono acquisire dal campione. Semplificando, il contrasto nel microscopio ottico avviene come conseguenza dell'assorbimento della luce da parte dei coloranti usati sul campione da esaminare: come risultato di questo fenomeno meno luce arriverà all'occhio dell'osservatore e la parte più intensamente colorata apparirà più scura. Oltre al contrasto per assorbimento di radiazioni luminose esistono altri meccanismi per la formazione del contrasto, come il contrasto per diffrazione e quello per dispersione; si tratta tuttavia di meccanismi non impiegati nel comune microscopio ottico e la cui trattazione esula dagli intenti di questo articolo.

Nel microscopio ottico composto contrasto e risoluzione si escludono vicendevolmente poiché aumentando il contrasto si avrà, come conseguenza, una diminuzione del potere di risoluzione.

ANATOMIA DEL MICROSCOPIO

Indipendentemente dal loro prezzo e dalle caratteristiche tecniche specifiche, tutti i microscopi ottici composti sono costituiti dagli stessi elementi (Fig. 2):

1) Oculari
2) Torretta portaoculari
3) Braccio e basamento
4) Revolver portaobbiettivi
5) Obbiettivi
6) Tavolino traslatore
7) Condensatore
8) Fonte luminosa

L'OBBIETTIVO

L'obbiettivo rappresenta l'elemento più critico ed importante del microscopio poiché è soprattutto la qualità delle sue lenti che condiziona le prestazioni ed il valore dello strumento.

L'obbiettivo è rappresentato da un doppio sistema di lenti convergenti a corta focale (Fig. 3) che proietta l'immagine ingrandita ed invertita dell'oggetto sotto osservazione nel piano focale inferiore dell'oculare in modo che questo possa "vederla" ed ingrandirla ulteriormente.

La distanza di lavoro di un obbiettivo, ovvero la distanza della lente frontale dal campione, è piuttosto piccola variando da 30 mm a 0,1 mm a seconda del suo potere di ingrandimento, in maniera inversamente proporzionale: maggiore è il potere di ingrandimento minore è la distanza di lavoro dell'obbiettivo. È quindi necessario tenere presente questo dato e fare attenzione durante il lavoro al microscopio perché, proprio a causa di tali ridotte distanze è possibile rovinare il campione oppure rendere inutilizzabile l'obbiettivo per un minimo spostamento della lente frontale provocato da una eccessiva pressione sul vetrino.

Ogni obbiettivo porta sulla sua montatura alcune sigle ed alcune parole che è opportuno conoscere perché descrivono le potenzialità, i limiti e le istruzioni d'uso per ogni particolare obbiettivo (Fig. 4).

Pur non essendovi una assoluta uniformità fra le Case Produttrici, in generale ogni obbiettivo riporta sempre le stesse indicazioni; ad esempio, nell'obbiettivo illustrato nella Figura 4, troviamo le seguenti indicazioni:

FIGURA 2 - Anatomia del microscopio (vedi testo).

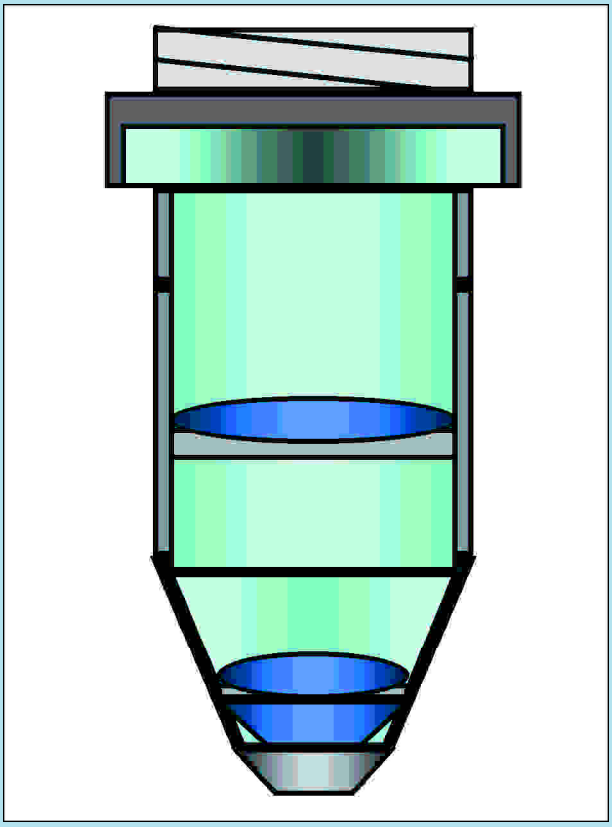


FIGURA 3 - Struttura interna di un obbiettivo per microscopia: si evidenziano vari gruppi di lenti per la correzione delle aberrazioni.

Apo Plan 100 1,25 160/0,17 Oil

Questo vuole dire che si tratta di un obbiettivo "apocromatico" (ovvero che produce una immagine corretta per le aberrazioni cromatiche), "planare" (ovvero che

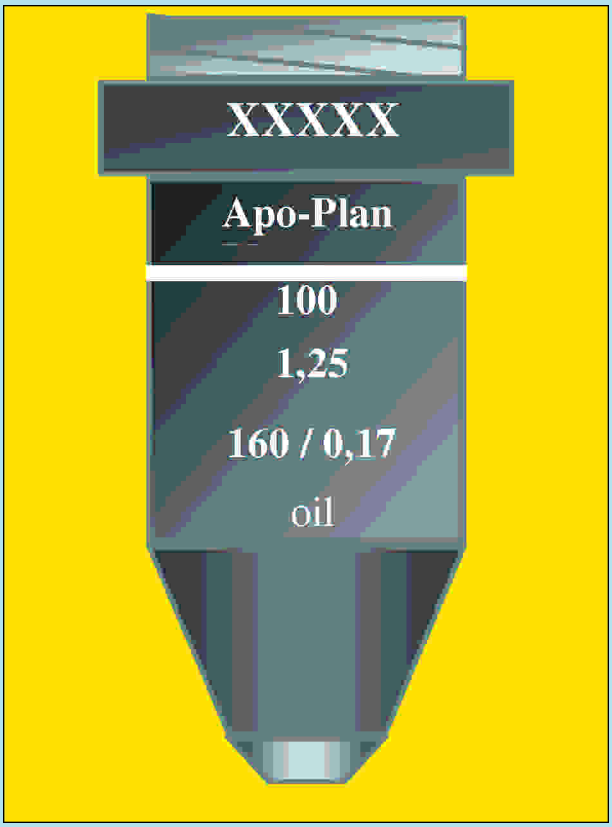


FIGURA 4 - L'obbiettivo del microscopio e le informazioni che si possono trovare sulla sua montatura (vedi testo).

produce una immagine corretta per le aberrazioni di curvatura), che ingrandisce l'immagine 100 volte (100X), che ha una Apertura Numerica (A.N.) di 1,25 (vedi paragrafo sulla A.N.) che il tubo porta-oculare per cui è progettato questo obbiettivo deve essere di 160 mm, che il vetrino coprioggetto da usarsi con questo obbiettivo deve avere uno spessore di 0,17 mm e che deve essere usato con una goccia d'olio interposta fra lente frontale e superficie del campione.

L'OBBIETTIVO AD IMMERSIONE

Tutti i microscopi impiegati in campo biomedico hanno, nel loro corredo di ottiche, un obbiettivo "ad immersione"; si tratta in generale di obbiettivi dotati di forte potere di ingrandimento del campione e la sostanza in cui vengono immersi è quasi invariabilmente olio minerale per microscopia, per cui portano scritto, sulla loro montatura. "oil" (oppure "oel" o ancora "Hl") e sono in genere contrassegnati da una riga di colore bianco o nero.

Più specificamente si definiscono "ad immersione" quegli obiettivi che possono essere usati unicamente interponendo una goccia di liquido (in genere olio minerale, appunto) fra la loro lente frontale ed il vetrino coprioggetto del campione.

Questa loro caratteristica può essere spiegata facendo ancora ricorso alla formula già analizzata:

AN = n sen α con **n** = indice di rifrazione del mezzo interposto ed $\alpha = {}^1/_2$ dell'angolo di accettazione della luce da parte della lente frontale dell'obbiettivo.

Tabella 2
Indice di rifrazione (n) dei principali mezzi di immersione e di montaggio

Aria	1
Acqua	1,33
Olio sintetico	1,51
Balsamo	1,53
Eukitt®	1,55
Vetro	1,53

Con un obbiettivo "a secco" il mezzo interposto è aria che ha un indice di rifrazione (n) pari ad 1 (Tab. 2) ed il massimo angolo di accettazione della luce sfruttabile dalla lente frontale non può mai superare 143°36'; data la formula precedente con un obbiettivo avente tali caratteristiche la massima AN sarà:

AN = 1 sen $^1/_2$ 143°36' = 0,95. Da ciò deriva che nessun obbiettivo a secco potrà mai raggiungere una AN maggiore di 0,95.

L'olio da immersione ha un indice di rifrazione (n) pari a 1,51 e l'obbiettivo ad immersione ha un massimo angolo di accettazione della luce pari a 137°; inserendo questi dati nella formula sopra citata sarà AN = 1,51 sen $^1/_2$ 137° = 1,4.

L'olio interposto permette in pratica lo sfruttamento di un maggiore cono di luce, poiché la luce stessa viaggia in un mezzo con un indice di rifrazione uniforme (vetro-balsamo-vetro-olio-lente frontale) e non risente della totale rifrazione che alcuni raggi luminosi hanno nel passare dal vetro all'aria e poi di nuovo al vetro (Fig. 5). Per cui, riassumendo e semplificando, lo scopo di un sistema ad immersione è quello di riuscire ad ottenere, nell'obbiettivo impiegato, una AN > di 0,95 (gen da 1,20 ad 1,40).

In pratica: abbiamo visto come sia necessario inserire una goccia di olio fra lente frontale e campione; non si tratta certo di una manovra particolarmente complessa ma attenzione e pulizia sono requisiti fondamentali per evitare inconvenienti spiacevoli e spesso molto costosi. Vale la pena di ricordare che la distanza di lavoro fra lente frontale di un obbiettivo ad immersione ed il coprioggetto è meno di 0,1 mm per cui l'avvicinamento della lente al campione deve essere fatto con estrema cautela: i danni derivanti da un avvicinamento rapido ed eccessivo vanno dalla distruzione del vetrino (e sarà sicuramente l'unico vetrino del vostro più bel caso citologico) allo spostamento o rigatura della lente frontale (e saranno sicuramente alcune centinaia di euro che prenderanno il volo dalle vostre tasche).

Fortunatamente molti di questi obbiettivi a forte ingrandimento e ad immersione sono dotati di un sistema di sicurezza costituito da una sorta di "ammortizzatore" sul quale è montata la lente frontale e che spesso previene i gravi danni descritti più sopra.

Una raccomandazione: abbiamo discusso dei vantaggi derivanti dall'uso di obbiettivi ad immersione; è tuttavia opportuno sottolineare che l'immersione possa e debba essere usata unicamente negli obbiettivi costruiti a questo scopo poiché il suo impiego in altri obbiettivi determina numerosi inconvenienti. In primo luogo la formazione di aberrazioni cromatiche e sferiche impediranno di distinguere qualsiasi particolare; secondariamente la

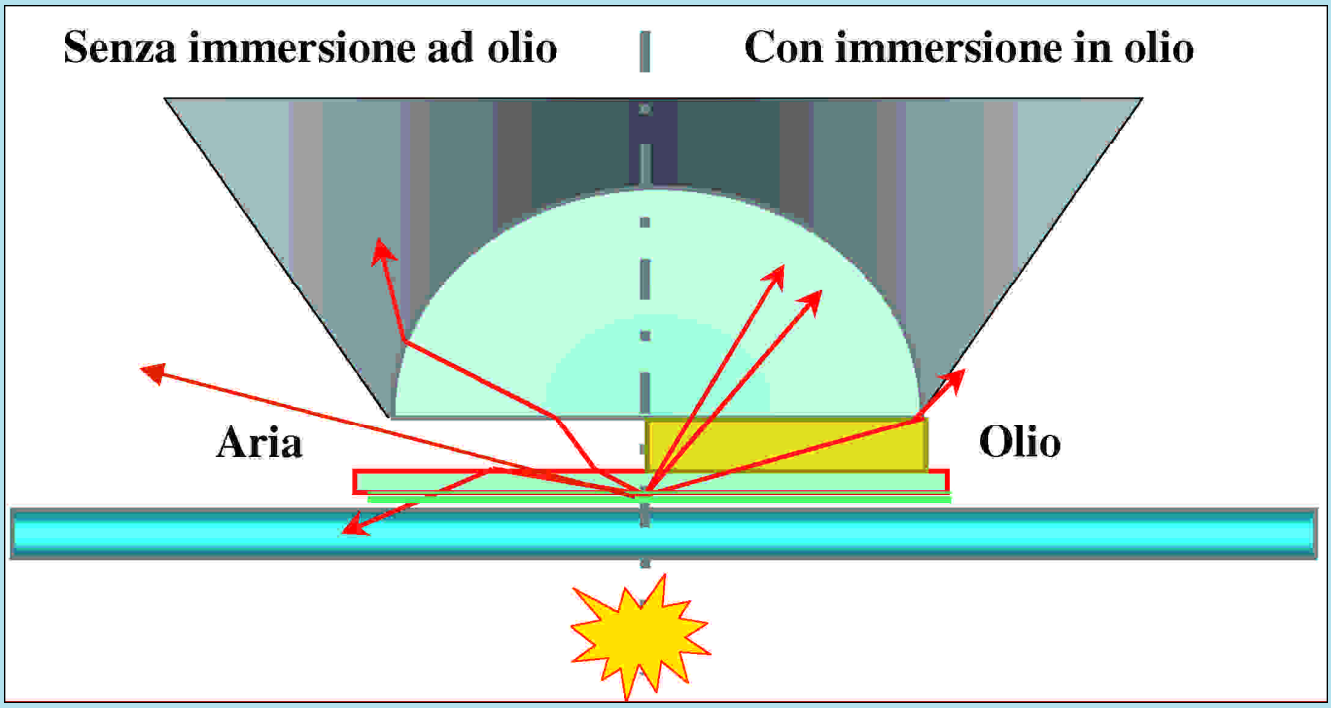


FIGURA 5 - Diverso comportamento dei raggi luminosi in un obbiettivo a secco (sx) ed uno ad immersione (dx) (vedi testo).

colla che fissa la lente all'obbiettivo tende a rammollirsi per azione dell'olio e a fare deviare l'asse focale del sistema ottico. Infine, mentre le lenti frontali degli obbiettivi ad immersione sono fissate in modo tale da rendere la struttura impermeabile alle infiltrazioni di olio, questo non avviene negli altri obbiettivi, per cui l'olio può filtrare all'interno ed impedire la visione (altre centinaia di euro che se ne vanno...).

IL CONDENSATORE

I campioni da esaminare al microscopio ottico devono essere illuminati perché si possa formare una loro immagine visibile nell'oculare e, di solito, questo viene ottenuto con "luce trasmessa", ovvero la luce attraversa i campioni stessi.

Il condensatore è un sistema di lenti posto al di sotto del tavolino traslatore del microscopio ed è provvisto di un "diaframma di apertura" che permette di modificare l'ampiezza del cono di luce che da esso esce, adattandolo alla AN dell'obbiettivo in uso; oltre a ciò il diaframma è dotato di un sistema di centratura e di regolazione della distanza dal tavolino traslatore.

La funzione del condensatore è quella di mettere a fuoco sul piano focale posteriore dell'obbiettivo l'immagine della sorgente luminosa, cosicché ogni punto del campione diviene a sua volta una sorgente luminosa e la sua immagine potrà essere vista nitidamente attraverso l'oculare.

Per ottenere questo, è necessario che vengano soddisfatte due condizioni fondamentali:

1) regolazione perfetta in altezza del condensatore (pena la comparsa di distorsioni cromatiche e lo scadimento generale della nitidezza dell'immagine trasmessa);
2) chiusura opportuna del diaframma di apertura in rapporto all'AN dell'obbiettivo in uso (pena la diminuzione del potere di risoluzione e la formazione di immagini di qualità scadente).

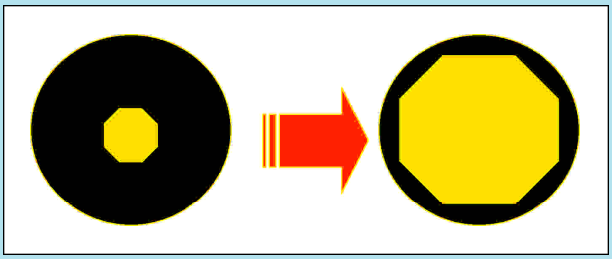


FIGURA 6 - Impostazione della apertura del diaframma del condensatore (vedi testo).

Le regole di base per una **corretta regolazione del condensatore** sono le seguenti:

- centrare correttamente il condensatore attraverso le due piccole viti di posizionamento;
- regolare in altezza il condensatore, generalmente 1 – 2 mm al di sotto del tavolino traslatore;
- togliere un oculare e, guardando attraverso il tubo portaottiche, aprire il diaframma del condensatore fino a circa 7/8 del campo luminoso visibile (Fig. 6).

Il diaframma del condensatore non deve essere chiuso eccessivamente poiché gli aumenti di profondità di campo e di contrasto sono solo apparenti: in realtà, chiudendo eccessivamente il diaframma si ottiene solamente una drastica riduzione del potere di risoluzione dell'obbiettivo.

In aggiunta al diaframma "di apertura" alcuni microscopi sono dotati anche di un diaframma "di campo": si tratta di un accessorio presente solamente su strumenti di buona ed ottima qualità e consiste in un ulteriore diaframma ad iride inserito fra la sorgente luminosa ed il condensatore.

Lo scopo di questo diaframma è quello di permettere un ulteriore miglioramento della distribuzione della luce sul campione ottimizzando al massimo il potere di risoluzione del sistema ottico e ciò risulta particolarmente utile in campo fotomicrografico.

Questo particolare metodo di trasmissione della luce prende il nome di "metodo di Köhler" dal nome del microscopista tedesco del gruppo Zeiss che ha messo a punto questa tecnica. Non rientra fra gli scopi di una trattazione sui principi di base di microscopia la descrizione dell'intimo meccanismo alla base di questa tecnica; alla fine di questa trattazione sono elencati numerosi testi che descrivono approfonditamente la tecnica dell'illuminazione "secondo Köhler".

PULIZIA DEL MICROSCOPIO

A parte i danni derivati da un improprio uso del microscopio, l'unica vera causa di inefficienza e di invecchiamento dello strumento è da ricercarsi nell'assente od errata manutenzione delle sue lenti e delle parti meccaniche.

Un buon microscopio resterà tale anche dopo molti anni di lavoro quotidiano a patto che venga mantenuto al riparo dalla polvere e pulito regolarmente.

In generale, il microscopio impiegato per gli esami citologici ed istologici non dovrebbe essere impiegato anche per gli esami coprologici e questo perché le sostanze impiegate per la flottazione dei campioni delle feci (Cloruro di Zn, Cloruro di Na, etc) possono rovinare seriamente le lenti ed i loro collanti se vengono a contatto con questi ultimi e se non vengono rimossi immediatamente.

Il corredo di accessori del microscopio comprende anche una copertura di plastica o di tela che deve sempre coprire lo strumento quando questo non è in uso; la polvere ambientale è infatti in grado di infiltrarsi in ogni fessura ed apertura del microscopio tappezzando letteralmente le lenti anche nella loro parte inferiore o all'interno dei tubi.

In generale, il microscopio deve essere pulito alla fine di ogni giornata di lavoro ed, in maniera più approfondita, alla fine di ogni settimana d'uso.

La pulizia quotidiana consiste nella rimozione della polvere accumulatasi sulle lenti durante la giornata, nella pulizia della superficie del tavolino traslatore e dello sporco raccoltosi sulle lenti esterne degli oculari come conseguenza degli occasionali contatti con palpebre e ciglia.

Per questo tipo di pulizia è sufficiente rimuovere la polvere con uno spazzolino molto morbido oppure con un getto d'aria compressa come quello che si può ottenere impiegando le bombolette per la pulizia delle macchine fotografiche e delle loro lenti. Allontanata così la polvere, sarà sufficiente alitare leggermente sulle lenti e rimuovere con un fazzolettino di carta morbida e che non lasci frammenti il sottile strato di vapore acqueo formatosi sulle lenti.

La pulizia settimanale prevede più o meno le stesse procedure eseguite però anche all'interno dei tubi portaottiche, nella parte inferiore del condensatore, nel revolver portaobbiettivi, nella parte inferiore della lente posta immediatamente dopo la fonte luminosa e di quelle parti del tavolino traslatore più "nascoste" e quindi meno facilmente raggiungibili nella pulizia quotidiana.

FIGURA 7 - Pulizia dell'obbiettivo ad immersione.

Un discorso leggermente più complesso deve essere fatto per la pulizia degli obbiettivi ad immersione e, anche se l'argomento sembra banale, in realtà esistono nella Rete vari siti con pagine di discussione proprio su questo argomento.

Ogni casa produttrice inserisce, nel libretto di istruzione, alcune note su come pulire le lenti degli obbiettivi, con particolare riguardo per gli obbiettivi ad immersione; ad esempio la Nikon suggerisce l'impiego di benzina, l'Olimpus una miscela 50/50 di alcool/etere, mentre la Zeiss mette in guardia dai possibili danni derivanti alle lenti dall'impiego di alcool.

Vediamo di seguito i vantaggi e gli svantaggi di alcuni fra i solventi più usati per pulire le lenti degli obbiettivi ad immersione:

- Xilolo: ampiamente usato per molti anni, si tratta di una sostanza con discrete qualità di solvente ma sicuramente dotata di potere tossico per contatto ed inalazione per cui se ne sconsiglia decisamente l'impiego;
- Etere: ottimo solvente per la rimozione di olio dalle lenti, si tratta di una sostanza fortemente infiammabile e da usarsi con cautela in presenza di lampadine ad incandescenza in funzione;
- Benzina: si tratta di un ottimo solvente per l'olio da immersione, rapidamente volatile; è infiammabile e potenzialmente tossico per inalazione o contatto prolungato;
- Alcool: quasi tutte le case produttrici sconsigliano l'impiego di alcool puro per la pulizia delle lenti, a causa della possibilità che questo possa alterare il collante delle lenti;
- Prodotti a base di ammoniaca: si tratta dei comuni prodotti ad uso domestico per la pulizia dei vetri di casa¸ non hanno un potere solvente paragonabile alle sostanze precedentemente elencate; tuttavia questi prodotti non presentano nessun rischio per la salute di chi li impiega.

La procedura per la pulizia delle lenti dagli obbiettivi ad immersione è la seguente:

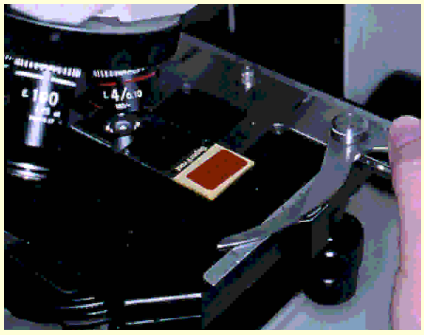
1) rimuovere delicatamente l'eccesso di olio residuato sulla lente con un pezzetto di carta ottica (che non lascia detriti) non siliconata (perché non assorbirebbe adeguatamente l'olio) (Fig. 7);
2) inumidire leggermente un altro pezzettino di carta con il solvente per l'olio e detergere la lente frontale;
3) asciugare la lente frontale con carta ottica pulita e quindi con un getto d'aria compressa per essere sicuri di non lasciare tracce residue di olio, solvente o polvere.

Il tutto in 20 secondi o poco più.

PREPARAZIONE ED IMPOSTAZIONE DEL MICROSCOPIO PER IL LAVORO

- Accendere la fonte luminosa del microscopio ed impostarla alla intensità desiderata.

- Posizionare correttamente (con la parte da esaminare rivolta verso la lente) il vetrino sul tavolino traslatore.

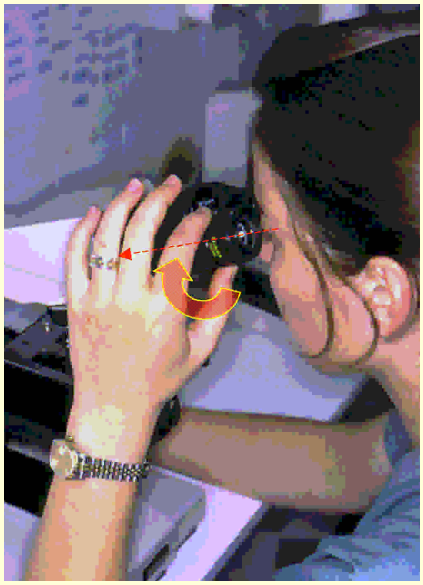


- Mettere a fuoco il campione agendo sulle manopole macro e micrometriche.

- Aggiustare la distanza interpupillare agendo sul sistema binoculare del portaoculari.

- Ricontrollare la messa a fuoco con il solo occhio destro.

- Aggiustare la messa a fuoco anche con l'occhio sinistro agendo sulla ghiera di regolazione diottrica.



- Selezionare l'ottica 10X; chiudere completamente il diaframma di campo ed abbassare il condensatore fino ad avere il diaframma a fuoco nell'obbiettivo (**solo per strumenti dotati di diaframma di campo**).

- Centrare il diaframma di campo nel campo di osservazione agendo sulle viti di centratura ed aprire il diaframma di campo fino a quando la sua apertura non occupi tutto il campo di osservazione (**solo per strumenti dotati di diaframma di campo**).

- Riportare il condensatore alla giusta altezza (1-2 mm al di sotto del tavolino traslatore) e regolare il diametro del diaframma di apertura, in relazione all'AN dell'obbiettivo in uso (vedi testo).

Letture consigliate

1. Oldfield R. Light microscopi: an illustrated guide Wolfe Publishing, 1994 (testo fondamentale per la comprensione dei principi fisici che regolano la visione e la regolazione del microscopio ottico, a campo oscuro ed a contrasto di fase).
2. Eastman Kodak Company Photograpy through the microscope 7 ed., 1980 (Ogni persona interessata alla fotomicrografia dovrebbe leggere e studiare questo libro prima di collegare la fotocamera al microscopio).
3. Diaspro A. Immagini dal microcosmo ne I quaderni de LE SCIENZE n° 123, dicembre 2001 (una serie di articoli relativi al passato, al presente ed al futuro della microscopia in campo biomedico).
4. Durante M., Russo G. Microscopia Edises, 1995 (testo divulgativo, che affronta in maniera semplice i principi di ottica alla base della microscopia).
5. Castleman K.R. Digital Image Processing Prentice-Hall ed, 1996 (testo "cult" sulla elaborazione di immagini microscopiche e non, chiarissimo ed utilissimo).

Siti WEB consigliati

1. http://www.sime.unile.it/ (Sito della società italiana di microscopia)
6. http://www.eurmicsoc.org/ (Sito della società europea di microscopia)
7. http://www.rms.org.uk/ (Sito della prestigiosa Royal Microscopical Society, contiene un catalogo di libri per tutti i livelli)
8. http://www.microscopy.com/ (Sito della società americana di microscopia)
9. http://www.microrg.demon.co.uk/ (Ottima Rivista che tratta tutte le tecniche di microscopia e che si può ricevere gratuitamente)
10. http://www.ou.edu/research/electron/www-vl/ (Una gigantesca biblioteca virtuale di microscopia)

ECVD

INFORMAZIONI SUL COLLEGE EUROPEO DI DERMATOLOGIA VETERINARIA (ECVD)

Per ottenere il Diploma del College Europeo di Dermatologia Veterinaria (ECVD) è necessario sostenere un esame. È possibile sostenere l'esame finale del College e conseguire quindi il titolo di diplomato:

- dopo aver completato un programma di residency approvato dall'ECVD.
- dopo aver superato la prima parte dell'esame dell'ECVD* e dopo aver ottenuto ulteriori credenziali (tre anni di attività clinica dedicati alla dermatologia, pubblicazioni, ecc.).

*Per sostenere questa prima parte dell'esame sono necessarie alcune credenziali (attività clinica dedicata alla dermatologia, partecipazione a corsi, congressi, ecc.).