

## Relazione Tecnica

**Oggetto:** aggiornamento delle caratteristiche tecniche della piattaforma di microscopia confocale con sorgente laser a luce bianca, ad alta risoluzione necessaria per l'attivazione dei progetti di ricerca della dell'Associazione Rete Italiana salute Dell'Età evolutiva (Rete IDEA), sulla luce delle emergenti innovazioni tecnologiche nel campo, appena introdotte sul mercato. La piattaforma verrà impiegata per l'acquisizione ottimizzata di segnali fluorescenti da modelli biologici *in vitro* e *in vivo* impiegati per lo studio dei meccanismi patogenetici di malattie rare, con efficiente separazione spettrale in modalità AOBS/AOBM (*Acousto-Optical Beam Splitter/Mixer*) e sensibilità di rivelazione tramite sensori di segnale ibridi (HyD: *hybrid detectors*).

**Razionale ed esigenze prestazionali:** nel contesto dell'attivazione dei progetti di ricerca dell'Associazione Rete Italiana salute Dell'Età evolutiva (Rete IDEA) recentemente finanziati per le analisi genomiche e l'inquadramento di pazienti pediatriche orfane di diagnosi, si rende necessario l'approvvigionamento di una tecnologia di microscopia confocale ad alta prestazione per l'indagine approfondita dei meccanismi patogenetici sottostanti le malattie pediatriche sia in modelli *in vitro* che *in vivo*. A tal fine, ed in base ai recenti progressi tecnologici nel campo, sono state individuate le caratteristiche tecniche fondamentali della piattaforma di microscopia desiderata per l'utilizzo condiviso nell'ambito delle attività di ricerca inerenti a differenti esigenze di imaging rapido ad alta risoluzione spaziale e temporale e in *real time* su campioni fluorescenti e/o cromogenici. I requisiti indispensabili di tale strumentazione, che dovrà essere altresì disponibile ad un'utenza con un grado variabile di necessità, sono relativi all'**elevata capacità di separazione spettrale precisa e flessibile del segnale fluorescente**, che consente studi ad ampio spettro su una serie di fenomeni biologici (potenzialmente alterati nelle malattie oggetto di studio) sfruttando il segnale di più bio-marcatori (coniugati a fluorofori) in un singolo campione (sia *in vitro* che *in vivo*). Le esigenze sperimentali dei progetti afferenti alla rete IDEA richiedono analisi su modelli malattia *in vivo* e/o in *real time* (quali eventi precoci del neurosviluppo come migrazione cellulare, traffico intracellulare o fluttuazioni di calcio relative all'attività neuronale su colture di neuroni differenziati da cellule staminali o in piccole larve di pesci, modelli animali di malattia). Per tale motivo la tecnologia del sistema confocale richiesto (POSTAZIONE 1) dovrà garantire la possibilità di utilizzo fino ad 8 linee di eccitazione contemporaneamente (e quindi lavorare su 8 fluorocromi in contemporanea) con velocità di commutazione tra le linee (10 microsecondi lungo tutto lo spettro del visibile) ad elevatissima capacità selettiva con regolazione senza soluzione di continuità lungo tutto lo spettro del visibile; un'ottimizzazione quantica di fotoni eccitati ed emessi e, quindi, la minore eccitazione del campione in modo da diminuire la fototossicità ed aumentare così il tempo di osservazione. Il suddetto combinato sistema di fattori è realizzato unicamente tramite un **crystallo acusto-ottico (AOBS = Acousto-Optic Beam Splitter)** liberamente programmabile in modo da selezionare le lunghezze d'onda in eccitazione-emissione desiderate, sistema integrato nell'unità di scansione del campione. Questa tecnologia apporta un netto miglioramento del rapporto segnale/rumore rispetto ai classici specchi diecrici per la separazione spettrale. Le esigenze sperimentali altamente flessibili e relativi agli sforzi multicentrici e multidisciplinari su malattie pediatriche rendono fondamentale 1. la possibilità di aggiungere la tecnologia AOBS **con linee laser a stato solido classiche** (fra cui 405, 488, 516 etc.), e 2. la possibilità di accoppiare una **sorgente di illuminazione di tipo laser a luce bianca (WLL = White Laser Light)** funzionante in continuità nello spettro visibile in modo da riuscire ad eccitare campioni con un'ampia flessibilità di lunghezza d'onda ed una elevata potenza di eccitazione. La combinazione di 1. e 2. nella POSTAZIONE 1 consentirebbe di acquisire campioni fluorescenti con eccitazioni da basse (405 nm) fino ad alte lunghezze d'onda (685 nm). Laser bianchi

di nuova generazione sono ideali poiché garantiscono un'ampia flessibilità di eccitazione in termini di lunghezze d'onda con passo di 1 nm verso lunghezze d'onda nel rosso (utili per multiplexing e anche per campioni spessi). Inoltre, si richiede un unico software che sia capace di ottimizzare e settare i parametri di separazione spettrale in fase di acquisizione anche da personale non esperto, processamento, conservazione e visualizzazione dei dati di *imaging* risultanti dagli esperimenti di microscopia.

Per le finalità progettuali, la piattaforma sopradescritta deve essere corredata di una **postazione "widefield" non confocale** (POSTAZIONE 2), con almeno 5 linee fluorescenti e **revolver portaobiettivi motorizzato con mantenimento della parafocalità, con sistema di raccolta dei versamenti di acqua e altri liquidi biologici**. Tale postazione dovrà essere dotata: 1) di un **metodo computazionale capace di processare ("clearance") le immagini complesse tridimensionali e multi-canale in tempo reale rispetto all'acquisizione**; 2) di **modulo di navigazione veloce compatibile con formati multi-pozzetto come la postazione confocale**, per acquisire rapidamente e quantizzare fenomeni biologici da molteplici campioni su preparati *in vitro* che *in vivo*. Questi requisiti sono fondamentali considerata la molteplicità di osservazioni necessarie al fine di testare statisticamente ipotesi su meccanismi patogenetici. La modalità e la preselezione dei campi di navigazione per campione e su diversi campioni dovrà essere compatibile con la selezione effettuata sulla piattaforma confocale, vista la necessità di acquisizione di più piani focali ad alta risoluzione dei campioni stessi. Considerata la molteplicità dei progetti, dei campioni (tessutali, cellulari e *in vivo*) e delle tecniche di colorazione considerate (sia fluorescenti che cromogeniche) si rende necessario che la postazione *widefield* sia dotata di **torretta DIC motorizzata (Differential Interference Contrast per effettuare rilevazioni di tipo Nomarski) e di prismi e polarizzatori della luce appositi con inserzione e disinserzione motorizzata e automatica in modo da lavorare in fluorescenze DIC in maniera sequenziale** secondo la necessità su obiettivo 20x, espandibile ad altri obiettivi. Questa postazione dovrà essere compresa nel costo massimo sopra indicato.

**Piattaforma commerciale individuata:** L'analisi accurata delle specifiche tecniche delle strumentazioni di microscopia ad oggi disponibili sul mercato effettuata da personale tecnico specializzato relative alla postazione 1 ha portato all'individuazione di un'unica tipologia confocale in commercio, recentemente aggiornata con numerose innovazioni tecnologiche utili allo scopo di ricerca dei progetti afferenti alla Rete IDEA. La piattaforma individuata è il nuovo microscopio confocale **Leica STELLARIS 5 dotato di sistema motorizzato, laser bianco, tecnologia AOBS e Power HyD S, avente una configurazione base con il sistema FLIM-based TauSense integrato**, distribuito in esclusiva da Leica Microsystems S.r.l. Vicolo San Michele 15 – 21100 Varese P.IVA., 09933630155, filiale italiana della LMS Holdings GmbH, Wetzlar Germany, produttore e distributore esclusivo dei prodotti con marchio LEICA. Dall'analisi emerge che la stessa LEICA offre anche il sistema **Thunder**, un sistema di microscopia "*widefield*" che risponde alle caratteristiche già menzionate per la postazione 2.

Per pervenire a tale valutazione di unicità di prodotto, sono state esaminate anche le altre piattaforme di microscopia ad oggi in commercio ma nessuna sembra soddisfare tutte le caratteristiche fondamentali necessarie e per gli scopi sperimentali programmati. Nessuna macchina presente sul mercato risulta offrire la tecnologia WLL accoppiata all' AOBS per la suddivisione delle linee spettrali, e a sistemi di rilevatori ad alta sensibilità di ultima generazione, intervallo dinamico come riportato di seguito, unitamente alle caratteristiche della postazione di *widefield*, con *computational clearance*, componenti motorizzati tra cui torretta DIC motorizzata con disinserzione dei polarizzatori automatica e mantenimento del fuoco completamente automatizzato.

**Dettagli dei requisiti tecnici della postazione confocale richiesta:** La piattaforma confocale richiesta dovrà possedere necessariamente tutte le caratteristiche elencate di seguito e poter operare in configurazione 3D (x,y,z), 4D (x,y,z,t) e 5D (x,y,z,t,spettrale).

**Illuminazione del campione con elevata separazione spettrale mediante tecnologia AOBS:** rispetto ai classici sistemi di separazione spettrale a specchi dicroici, il cristallo acusto-ottico (AOBS = *Acousto-Optical Beam Splitter*) integrato nel modulo di scansione rende possibile un cambio di linea di eccitazione altamente veloce (circa 10 millisecondi per cambio di eccitazione lungo tutto lo spettro del visibile) ed efficiente fino a 8 linee laser di illuminazione contemporaneamente, consentendo di impiegare quindi fino a 8 fluorocromi con lunghezze d'onda di eccitazioni e emissioni anche molto vicine in maniera contemporanea. Insieme all'elevata capacità selettiva relativa alle lunghezze d'onda le caratteristiche uniche sopra menzionate ampliano le possibilità di rilevazioni multicolore simultanee da un singolo campione. La selezione dell'ampia gamma di lunghezze d'onda in eccitazione con passo di un 1nm è flessibile e programmabile dall'utente (incluso lunghezze d'onda spostate sul rosso, > 670 nm di eccitazione); così da poter registrare più eventi biologici da un singolo campione sia *in vitro* che *in vivo*, ottimizzando notevolmente i tempi sperimentali, il numero di modelli animali impiegati secondo la legislazione vigente e l'interpretazione dei dati ottenuti. Il sistema AOBS garantisce questa separazione spettrale senza l'impiego di software dedicati o di interventi fisici (cambi meccanici dei filtri) dell'utente sulla componente hardware. Già nella fase dell'acquisizione del segnale fluorescente questo minimizza l'energia necessaria per eccitare i fluorofori presenti nel campione biologico di interesse, i quali mantengono le loro caratteristiche spettrali senza perdita di segnale (senza *photobleaching*). **L'efficienza quantica** nella raccolta del segnale e la possibilità di analizzare ed ottimizzare gli spettri di eccitazione/emissione dei diversi fluorofori in base al microambiente cellulare specifico del campione in esame migliorano il rendimento qualitativo e quantitativo della rilevazione del segnale. In questo modo si ottiene fino ad un 30% di efficienza quantica in più rispetto a piattaforme di imaging che impiegano classici filtri dicroici ed il segnale di emissione può essere registrato senza distorsioni. Un ulteriore aspetto rilevante per l'uso della piattaforma confocale per l'esame dell'alterazione dei meccanismi cellulari e molecolari sottesi alle patologie pediatriche e neurologiche, oggetto di studio, è la minimizzazione dell'eccitazione luminosa garantita dal sistema AOBS. Tale sistema riduce anche la foto-tossicità sui campioni, consentendo quindi di osservare processi fisiologici cellulari sia su colture *in vitro* che su embrioni di sistemi modelli animali acquisiti *in vivo* per un periodo lungo. Infine, la tecnologia AOBS garantisce anche la collezione dei fotoni riflessi dal campione (in aggiunta a quelli emessi da fluorofori). Questo consente anche una rivelazione confocale (con risoluzione sub-cellulare) di campioni biologici analizzati mediante sistemi di colorazioni cromogeniche (e formazione di cristalli riflettenti), tipici di analisi di molecole quali RNA messaggeri su tessuto o intero campione come ad esempio su modelli animali di *zebrafish* (*Danio rerio*), impiegati per la sperimentazione dei progetti della rete.

**Sistema di illuminazione mediante il sistema di luce bianca:** viste le esigenze sperimentali di *imaging* dei diversi centri impiegati nei progetti della rete e su preparazioni cellulari e molecolari diverse con un alto numero di segnali fluorescenti (multi-colorazioni) sia *in vitro* che *in vivo*, è fondamentale che la strumentazione sia equipaggiata di una sorgente laser di tipo bianco (WLL= *White Light Laser*). Tale laser a singolo fotone super continuo e pulsato capace di un'emissione da 485 a 685 nm di lunghezza d'onda con un passo di un 1nm, unitamente ad un laser a stato solido nello spettro UV (405 nm), sarà capace di eccitare una gamma vasta di fluorofori, permettendo un multiplexing nello stesso campione. In termini pratici infatti, questo garantisce la possibilità unica di usufruire di 200 linee laser da una singola sorgente luminosa e quindi di ottenere informazioni

biologiche su molteplici processi fisiopatologici in contemporanea (e.g. dallo stesso tessuto/modello di malattia, spesso altamente preziosi da un punto di vista preparativo). La messa a punto dedicata della lunghezza d'onda di eccitazione (*excitation color*) permessa dall'impiego del laser bianco è di fatto garantita se si dispone di un sistema di separazione spettrale adeguato e modulabile sia automaticamente che manualmente. Quindi, l'unicità dell'accoppiamento del laser bianco alla tecnologia AOBS di ultima generazione (presente nella piattaforma confocale Leica identificata) è **un requisito fondamentale ed insostituibile** per l'ottimizzazione spettrale, in termini di illuminazione e rivelazione, per garantire una precisione spettrale con una modalità estremamente rapida di commutazione delle lunghezze d'onda desiderate, attualmente non comparabile in termini prestazionali con altre tecnologie in commercio.

**Rivelazione ad alta sensibilità del segnale con ottimizzazione dell'intervallo temporale di acquisizione e del rapporto segnale/rumore grazie al sistema di separazione spettrale con sensori del tipo "Power HyD S":** viste le esigenze sperimentali che richiedono l'impiego di campioni altamente sensibili (sistemi cellulari *in vitro* ed *in vivo* acquisiti in tempo reale), è necessario che la piattaforma individuata sia capace di abbinare all'elevato grado di flessibilità e precisione di selezione spettrale di eccitazione ed emissione anche rivelatori di ultima generazione ad elevata efficienza quantica, quali i sensori del tipo Power HyD S = *Hybrid detectors* che garantiscono fino ad una sensibilità del 30% maggiore rispetto a classici PMT. Tali fotomoltiplicatori infatti possono funzionare sia in modalità analogica per segnali molto intensi, sia in modalità "*photon counting*" per massimizzare la *detection* di segnali molto deboli. Più precisamente, a differenza dei PMT questi Hybrid S impiegano un sistema di amplificazione del segnale basato sulla amplificazione a valanga che quindi consente l'uso in modalità di conteggio a singolo fotone in condizioni dove il campione offre basso numero di fotoni (spesso preparati *in vivo*) o in campioni multi-tessuto complessi con alta dispersione fotonica (come il tessuto cerebrale), restando comunque in un'ampia dinamica. Oltre all'efficienza quantica, questo sistema di rilevazione consente un'ulteriore ottimizzazione del rapporto segnale/rumore con un vantaggio chiaro sul contrasto: esso garantisce la scrupolosa indagine di segnali cellulari e molecolari specifici a bassa emissione fotonica anche in un contesto complesso dove essi potrebbero essere "offuscati" da segnali più forti, come avviene ad esempio in campioni interi di modelli larvali di *zebrafish in vivo* o su campioni complessi di tessuto. Tali innovativi sensori possono essere impiegati con modalità di selezione della finestra temporale di arrivo dei fotoni (*time gated modality*) nell'intervallo da 0,6 a 12,5 nanosecondi. L'accoppiamento di questo tipo di fotomoltiplicatori con una sorgente di luce bianca (*WLL*) con emissione in un'ampia finestra dello spettro di luce visibile in maniera pulsata (laser pulsato) consente di lavorare quindi in *time gated modality* avanzato. Queste caratteristiche migliorano ulteriormente il rapporto segnale/rumore del fenomeno biologico analizzato riconoscendo maggiormente segnali riflessi dal campione e non desiderati. Tali vantaggi risultano di cruciale importanza in campioni complessi e in sistema di analisi *in vivo* (processi in *real time* di eventi biologici). L'alta sensibilità dei sensori Power Hybrid S riduce ulteriormente la necessità della quantità di luce di eccitazione. Insieme al sistema AOBS questi sensori, quindi, permettono di ridurre al massimo la foto-tossicità e di mantenere il campione biologico nelle condizioni più vitali -e quindi fisiologiche- possibili, il fattore più rilevante per le indagini sperimentali dei meccanismi fisiopatologici riscontrati in modelli *in vitro* ed *in vivo* di patologia. Riassumendo, la presenza sinergica di questo tipo di fotomoltiplicatori insieme al Laser bianco di ultima generazione consente prestazioni elevate in termini di i) capacità di acquisizione verso lunghezze d'onda spostate nel rosso (impiegate anche in campioni spessi, quali organoidi o preparazioni di tessuto cerebrale), ii) velocità di acquisizione di dinamiche in *real time* (ideale per esperimenti di live imaging su campioni live cellulari e sub-cellulari in modelli *in vivo* e modelli

delicati *in vitro*). A questo proposito, la nuova funzionalità *TauSense*, basata su tecnologia FLIM (Fluorescence-lifetime imaging microscopy), presente solo in confocali individuati di ultimissima generazione (di recente immissione sul mercato), consente di utilizzare il tempo di vita dei fluorofori presenti nei campioni marcati per ampliare la gamma di informazioni biologiche registrabili dal campione in esame. Moduli aggiuntivi sono normalmente necessarie per ottenere questa prestazione. La presenza del modulo *TauSense* integrata nella piattaforma richiesta garantisce di ottenere senza costi aggiuntivi informazioni derivanti non solo di tipo qualitativo ma funzionale/quantitativo (per esempio relative al pH e alle variazioni chimiche del contesto biologico). Le acquisizioni biologiche derivanti sono fondamentali per analizzare l'impatto funzionale delle mutazioni genetiche riscontrate in malattie pediatriche complesse, di cui i meccanismi molecolari di patologia restano ad oggi ignoti. Quindi, la possibilità di separare multipli fluorofori in base al tempo di vita rappresenta un parametro analitico importante per garantire ed allargare la risoluzione di più eventi biologici (marcati da diversi fluorofori) da uno stesso campione. Questa capacità di aumentare il multiplexing di fluorofori su un singolo campione, che massimizza le informazioni anche dinamiche acquisibile per esperimento, riduce la variabilità sperimentale ed ottimizzando il processamento dei campioni, con minor impiego di preparati biologici preziosi, tra cui modelli in vivo o da tessuti di pazienti rari. La rimozione di segnali di autofluorescenza garantisce una maggiore accuratezza del valore biologico della fluorescenza acquisita in termini qualitativi e quantitativi.

**Caratteristiche base essenziali della configurazione:** La piattaforma confocale (POSTAZIONE 1) dovrà essere composta da un microscopio dritto ad alta risoluzione spaziale e temporale dotato di: tavolo anti-vibrante passivo, *fine focusing* motorizzato e tenuta a fuoco nel tempo, revolver per obiettivi ad almeno 6 posizioni, filtri selettivi per fluorescenza (eccitazione/emissione) di 360/470 nm, 450/490 nm, 546/585 nm, lampada alogena non necessitante di allineamento, condensatore e sensori per acquisizione in luce trasmessa (*Bright Field*), con contrasto di interferenza differenziale, scanning stage motorizzato con inserto per *z stack imaging* (galvo con un minimo *step size* di 20 nm), corredo ottico *plan apo* con almeno n.1 obiettivo a secco 10x/ A.N  $\geq 0.30$ , n.1 obiettivo ad immersione in acqua 25x/A.N.  $\geq 0.9$  con distanza di lavoro  $\geq 2$ mm, n. 1 obiettivo apocromatico ad olio 63x/A.N. $\geq 1.30$  con distanza di lavoro  $\geq 0,1$ mm, 3 detectors del tipo Power HyD S di nuova generazione e laser a stato solido aggiuntivo 405 DMOD con potenza di eccitazione in uscita di 50 mW. La piattaforma dovrà anche essere corredata di una postazione di lavoro pari o superiore alla presenza di doppio monitor con una RAM almeno di 64 MB e HDD  $\geq 6$ TB, 96 GB di working memory e software che faciliti il *set up* degli esperimenti anche per personale non esperto, l'acquisizione e visualizzazione ottimale di dinamiche cellulari fisiologiche in live mode (con pannello programmabile di controllo dei parametri di acquisizione immagine e modalità di supervisione anticipata di più campioni e scelta delle posizioni x,y,z da analizzare) che per la selezione e separazione delle differenti fluorescenze durante l'acquisizione, corredata con algoritmi per processamento di esperimenti multidimensionali (x, y, z, lambda, t), modulo per ricostruzione 3D in tempo reale, analisi di co-localizzazione, FRET e FRAP, algoritmo per aumentare rapporto segnale/rumore anche su acquisizioni veloci, algoritmo deconvoluzione integrato per correzione e elaborazione digitale in tempo reale con un alto rapporto segnale /rumore. La presenza di una funzione "Rolling Average" sarà utile per consentire acquisizioni veloci di dinamiche *in vivo* con sistema Resonant scanner (Tandem Scanner 8 KHZ) che permette di lavorare fino a 10 frames per secondo (fps) a 512x 512 px e 22 mm di FOV.

**Dettagli dei requisiti tecnici della postazione *widefield* richiesta:** Viste le esigenze sperimentali summenzionate, la postazione *widefield* dovrà possedere le seguenti caratteristiche fondamentali come indicato di seguito.

**Caratteristiche base:** La POSTAZIONE 2 dovrà essere dotata di uno stativo completamente motorizzato dotato di monitor LCD frontale per il controllo di tutte le funzioni del microscopio e di un **revolver portaobiettivi motorizzato a 6 posizioni dotato di sistema di mantenimento della parafocalità, con sistema di raccolta dei versamenti di acqua e altri liquidi biologici**. Per garantire l'uso della fotocamera veloce sCMOS, il sistema dovrà possedere una porta fotografica motorizzata laterale con ripartizione della luce 100/0 e campo da 19 mm per consentire l'utilizzo completo del sensore della fotocamera sCMOS e **sistema di mantenimento del fuoco completamente automatizzato di tipo hardware basato su LED a diodo infrarosso (850nm) e sensore CMOS con feedback di riposizionamento closed loop** con un tempo di risposta tipico: <650ms, compatibile sia con supporti in vetro che in plastica e con un'ampia varietà di obiettivi sia a secco che ad immersione con un *range* di fuoco 12mm, passo minimo <5nm. 2 oculari planari 10x con indice di campo 25 e regolabili secondo le diottrie dovranno essere compresi con un angolo di osservazione aggiustabile 30-45.

I seguenti obiettivi dovranno far parte del corredo base: obiettivo planacromatici 5x, NA=0.12, in contrasto di fase, un 10x, NA=0.32, in contrasto di fase, un 20x NA=0.40, distanza di lavoro >6.5mm, in contrasto di fase con collare di correzione ed obiettivi planapocromatico 20x, NA=0.80, un 63x a immersione a olio, NA=1.4. La postazione dovrà essere equipaggiata con un condensatore a 7 posizioni completamente motorizzato dotato di lente condensatrice con una distanza di lavoro di 55mm e che consenta l'uso di piastre *multiwell* e set di anelli di fase. Inoltre, le seguenti caratteristiche dovranno essere presenti: a) un set di anelli di fase, b) un condensatore a 7 posizioni completamente motorizzato dotato di lente condensatrice con apertura numerica da 55mm e distanza di lavoro che consenta l'uso di piastre *multiwell* per colture cellulari e di esemplari *zebrafish*, c) illuminazione a luce trasmessa a LED con *shutter* controllato elettronicamente attraverso TTL montata su colonna reclinabile, d) una torretta motorizzata dovrà consentire di selezionare e cambiare 6 posizioni in fluorescenza. Viste le diverse colorazioni in fluorescenza necessarie sulle diverse tipologie di campioni da analizzare, la postazione dovrà essere corredata di un set di filtri completo per le fluorescenze nello spettro visibile del DAPI, FITC, TRITC e Cy5 (con cubo quadruplo in eccitazione e set di filtri emissione su ruota portafiltri esterna ad alta velocità). Si rende quindi necessario equipaggiare la postazione con sorgente di eccitazione a LED (con canali singoli di eccitazione) con a) lunghezze d'onda: 395nm, 475nm, 555nm, 635nm, b) controllo indipendente per ciascuna lunghezza d'onda dell'accensione/spegnimento e della potenza (con *step* da 1%) e connessione al microscopio tramite guida d'onda liquida (LLG – Liquid Light Guide). Tale configurazione (ruota esterna per filtri, *beam splitter* e illuminazione di eccitazione selettiva) consente lo *switch* in emissione con velocità < 27ms fra due posizioni adiacenti e quindi un'ottimizzazione del *workflow* sperimentali su campioni con colorazioni multiple. Per le diverse applicazioni sopraindicate, il sistema deve essere corredata di un **tavolino rimovibile e motorizzato ad elevata precisione** con un *range* di movimento tra 122x82mm, una velocità aggiustabile tra 10-500 mm/s ed una risoluzione <20 nm. Il tavolino dovrà consentire inserti per formati di osservazione *multiwell*, *Petri dish* e vetrini standard di microscopia e compatibile con inserti da 160x110mm. Inoltre, per le acquisizioni veloci si rende necessario corredata il sistema con una telecamera raffreddata dotata di sensore sCMOS (13.3 x13.3 mm) con risoluzione di almeno 4.2

Mpx (2048x2048 e dimensione del pixel: 6.5  $\mu\text{m}$ ) ed un'efficienza quantica di picco > 80% in modo da consentire la minima illuminazione del campione biologico.

**Prismi, polarizzatori e analizzatori automatizzati per analisi in modalità *Differential Interference Contrast*:** Per acquisizioni in campo chiaro su processi biologici rilevati con colorazioni cromogeniche da campioni tessutali, la postazione dovrà essere dotata di **una torretta per DIC (per il Differential Interference Contrast) completamente motorizzata** e dotata di polarizzatori e analizzatore e di prismi di di Wollastone per obiettivo 20x, espandibile ad altri obiettivi. **Sia i prismi che polarizzatore/analizzatore devono potersi inserire/disinserire automaticamente quando si seleziona/deseleziona la modalità DIC e per consentire di acquisire immagini in fluorescenza durante esperimenti sequenziali DIC/fluorescenza.**

**Sistema di rimozione del background in tempo reale** (e/o deconvoluzione in tempo reale): Considerata la complessità dei campioni cellulari, tessutali ed in vivo in 3D con la possibilità di un grado elevato di *scattering* dei fotoni emessi da piani focali profondi del campione (in z), la postazione *widefield* dovrà essere corredata di un **sistema di rimozione del background in tempo reale** e/o deconvoluzione in tempo reale (in accordo con ISO/IEC 2382:2015). Dovrà essere possibile processare almeno 100 piani focali in Z con due marcature fluorescenti e una risoluzione di acquisizione di 2.8Mpx in <10 secondi, con possibilità di visualizzare e recuperare ed analizzare le immagini grezze (pre-processamento). L'acquisizione dell'immagine (sia 2D che 3D e timelapse multicanale e multiposizione) dovrà poter avvenire in parallelo con il processamento, quindi sulla stessa CPU del processore associato e GPU della scheda grafica. Dovrà essere possibile ottenere immagini acquisite e processate senza movimentazione meccaniche e/o ottiche in fluorescenza. In aggiunta, la postazione dovrà essere corredata di un software per le suddette modalità di acquisizioni multicanale e in *timelapse*, con controllo automatico dell'asse in z e autofocus, con visualizzazione e *rendering* 3D delle immagini acquisite. Un **modulo di navigazione** integrato dovrà consentire di selezionare posizioni diverse da acquisire sui campioni analizzati. Il software dovrà poter eseguire uno *sweep* a spirale per ricostruire il campione dal punto corrente con disponibilità di modelli che rappresentano diversi portacampioni (vetrini, piastre o *multiwell*) per facilitare la navigazione in essi e la programmazione di acquisizioni di immagini automatiche (sia a mosaico che singole immagini) in più posizioni e di esperimenti in multi-posizione complessi (compresa la realizzazione di più mosaici in diverse posizioni in tutte le dimensioni di acquisizione delle immagini) e con registrazione automatica di parametri sperimentali stabiliti come riferimento, ricaricabili su esperimenti successivi. Il software dovrà garantire acquisizioni su campioni trasparenti di almeno 150  $\mu\text{m}$  in profondità all'interno del campione in fluorescenza. Il software di deconvoluzione in tempo reale dovrà essere applicabile automaticamente a tutte le posizioni memorizzate del tavolino motorizzato. Tutti i parametri sperimentali dovranno poter essere registrati e applicati a nuove acquisizioni.

La piattaforma dovrà anche essere corredata di una postazione di lavoro con una memoria RAM di almeno 64 GB DDR4-2666ECC REG RAM e disco SSD da 512 GB (ed ulteriore SSD da 2 TB) e HDD da 4 TB, processore 3.6 GHz4C CPU ed una scheda grafica tipo GTX 1080 Ti.

**Aggiornamenti della configurazione base selezionata:** La POSTAZIONE 2 dovrà essere estendibile con moduli aggiuntivi (quali il TIRF, *total internal reflection fluorescence*) e apparati di fotomanipolazione per stimolazione di campioni biologici in vivo.

\*\*\* \*\*

**Nella fornitura (costo stimato 470.000 €, al netto di IVA) dovranno essere assicurati per entrambe le POSTAZIONI: trasporto, installazione, collaudo, training del personale tecnico e manutenzione ed assistenza tecnica in garanzia di 3 anni (compresi i costi di viaggio e ore di lavoro di personale addetto). Per il laser bianco dovrà essere assicurata la garanzia di 3 anni.**

\*\*\*\* \*\*

Alla luce delle caratteristiche e finalità del progetto di ricerca dell'Associazione Rete Italiana salute Dell'Età evolutiva (Rete IDEA) recentemente finanziati per le analisi genomiche e l'inquadramento di pazienti pediatrici orfani di diagnosi, risulta appurato, ai sensi dell'art. 63 lett. b comma 2 e comma 3 del decreto legislativo 50/2016, nonché, e comunque ai sensi dell'art. 63 comma lett. a) del decreto legislativo 50/2016:

- 1) l'impossibilità di soddisfare le esigenze del progetto di ricerca rivolgendosi indistintamente al mercato per l'acquisto di piattaforma confocale **dotata di sistema motorizzato, laser bianco, tecnologia AOBS di ultima generazione e sensori del tipo Power HyD S, con configurazione base dotata della funzionalità FLIM-base TauSense, alla luce dell'assenza di piattaforme alternative disponibili**, unitamente all'acquisto di una postazione aggiuntiva per analisi in *widefield* ad alta velocità e capacità di processamento su multicanale dotata di **sistema automatizzato e motorizzato di acquisizione in modalità DIC**, congiuntamente ad un tavolino motorizzato ad alta precisione, un **sistema di navigazione** per esperimenti complessi in multi-posizione ed un **sistema di rimozione del background computazionale in tempo reale e sistema di mantenimento del fuoco hardware completamente automatizzato basato su LED a diodo infrarosso (850nm) con sensore sCMOS con feedback di riposizionamento closed loop**.
- 2) l'infungibilità della piattaforma confocale **dotata di sistema motorizzato, laser bianco, tecnologia AOBS di ultima generazione e sensori del tipo Power HyD S, con configurazione base dotata della funzionalità FLIM-base TauSense**, unitamente alla postazione aggiuntiva **Thunder** per analisi in *widefield* ad alta velocità e capacità di processamento su multicanale dotata di **sistema automatizzato e motorizzato di acquisizione in modalità DIC** congiuntamente ad un tavolino motorizzato ad alta precisione, un **sistema di navigazione** per esperimenti complessi in multi-posizione ed un **sistema di rimozione del background computazionale in tempo reale e sistema di mantenimento del fuoco hardware completamente automatizzato basato su LED a diodo infrarosso (850nm) con sensore sCMOS con feedback di riposizionamento closed loop** distribuita in esclusiva da Leica Microsystems S.r.l. Vicolo San Michele 15 – 21100 Varese P.IVA., 09933630155, filiale italiana della LMS Holdings GmbH, Wetzlar Germany, produttore e distributore esclusivo dei prodotti con marchio LEICA.  
rispetto alle esigenze e finalità del progetto di ricerca dell'Associazione Rete Italiana salute Dell'Età evolutiva (Rete IDEA)
- 3) l'unicità della piattaforma confocale **dotata di sistema motorizzato, laser bianco, tecnologia AOBS di ultima generazione e sensori del tipo Power HyD S, con configurazione base dotata della funzionalità FLIM-base TauSense**, unitamente alla postazione aggiuntiva **Thunder** per analisi in *widefield* ad alta velocità e capacità di processamento su multicanale dotata di **sistema automatizzato e motorizzato di acquisizione in modalità DIC** congiuntamente ad un tavolino motorizzato ad alta precisione, un **sistema di navigazione** per esperimenti complessi in multi-posizione ed un **sistema di rimozione del background computazionale in tempo reale e sistema di mantenimento del fuoco hardware completamente automatizzato basato su LED a diodo infrarosso (850nm) con sensore sCMOS con feedback di riposizionamento closed loop** distribuita in esclusiva da Leica Microsystems S.r.l. Vicolo San Michele 15 – 21100 Varese P.IVA., 09933630155, filiale italiana della LMS Holdings GmbH, Wetzlar Germany, produttore e distributore esclusivo dei prodotti con marchio LEICA, rispetto alle erogazioni temporali del progetto di ricerca



dell'Associazione Rete Italiana salute Dell'Età evolutiva (Rete IDEA) rischiando, con l'acquisto di piattaforme prive di tutte le sopra elencate caratteristiche tecniche, la perdita del finanziamento da parte del Ministero della Salute.

Roma, 9/06/2020

Dott. Marco Tartaglia

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Tartaglia', written in a cursive style.