

●●●Al Magnifico Rettore
Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro

Oggetto: richiesta autorizzazione acquisto apparecchiature

Magnifico Rettore,

con la presente, il sottoscritto Prof. Giuseppe Viglietto richiede l'autorizzazione all'acquisto, con procedura di unicità, della seguente apparecchiatura scientifica, nell'ambito del Progetto PONa3 00435, denominato "Biomedpark@UMG" finanziato da MIUR:

N.ro 1 Sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay

Motivazione tecnico-scientifica

Il Sistema THUNDER Imager 3D Assay è il nuovissimo sistema di Imaging prodotto da Leica che consente di studiare con facilità, velocità e sensibilità i modelli 3D biologicamente significativi quali colture cellulari 3D, sezioni tissutali di un certo spessore e organoidi. Per rispondere a importanti domande scientifiche, il Sistema THUNDER Imager 3D Assay consente una chiara visualizzazione dei dettagli, anche in profondità all'interno di campioni intatti, in tempo reale e senza sfocature, Grazie al Computational Clearing, il Sistema THUNDER Imager 3D Assay, definisce una nuova classe di strumenti per la visualizzazione ad alta qualità e ad alta velocità di campioni tridimensionali caratterizzati da un certo spessore, raggiungendo la nitidezza di imaging su campioni 3D con la stessa facilità di utilizzo di un microscopio a fluorescenza widefield. L'acquisizione in modalità THUNDER è applicabile a tutte le possibili combinazioni di acquisizioni in fluorescenza, come Z-stack, acquisizioni multicanale, movie e timelapse, acquisizioni multiposizione e a mosaico e tutte le possibili combinazioni di esse garantendo, quindi, una migliore comprensione della biologia 3D in tempo reale.

La nuova tecnologia implementata in THUNDER Imagers 3D Assay è ideale per moltissime applicazioni biomediche tra cui la medicina rigenerativa, la ricerca delle cellule staminali e la ricerca in campo oncologico che sono rappresentano la totalità dei progetti di ricerca in corso presso il nostro Ateneo. Lo strumento richiesto risulta indispensabile per permettere lo studio di caratteristiche cellulari e fenomeni biologici con tempi e modalità significativamente superiori alle tecnologie disponibili. Ciò permetterà al nostro Ateneo di raggiungere standard sperimentali competitivi a livello nazionale e internazionale e, quindi, di conseguire brillanti risultati scientifici che frutteranno all'Ateneo importanti collaborazioni scientifiche e pubblicazioni su prestigiose riviste internazionali.

Relazione tecnica

Il sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay è fornito di una stazione di microscopia dotata dei più elevati standard a livello di automazione, capaci di eseguire degli esperimenti di time-lapse su colture cellulari che possono avere la durata anche di alcuni giorni, mantenendo le condizioni vitali delle cellule in esame. Il sistema è configurato su geometria invertita e risulta equipaggiato con un controllo hardware del fuoco, con dispositivo a led infrarosso per il mantenimento costante del fuoco con feedback attivo. Questa particolare configurazione del microscopio, insieme alla scelta del sistema di autofocus, sono cruciali per gli esperimenti con le cellule in condizioni vitali in quanto consentono di monitorare i campioni vivi nel tempo senza perdere il fuoco del campo inquadrato e quindi potendo seguire l'esperimento fino al termine nelle migliori condizioni sperimentali. Tale controllo del fuoco deve poter essere impostato dallo stativo stesso, una volta identificata agli oculari la regione di interesse.

Il sistema include inoltre un incubatore di tipo globale e i controller per regolare la temperatura, il flusso di anidride carbonica e l'umidità. Le funzioni di mantenimento attivo del fuoco e l'incubatore rappresentano delle necessità di primaria importanza per poter eseguire gli esperimenti di living cells.

Il Sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay è dotato di sorgente di eccitazione per la fluorescenza a LED e non a mercurio, per adeguarsi agli standard di sicurezza. Per le particolari esigenze sperimentali è, infatti, necessario utilizzare un illuminatore a luce LED dotato di lunghezze d'onda separate e specifiche ad elevata potenza. Ciascuna di queste lunghezze d'onda di eccitazione può essere modulata con step estremamente precisi in modo tale da utilizzare la percentuale adatta ad eccitare le sonde fluorescenti senza però provocare il photobleaching. Per sfruttare al meglio l'illuminazione in esperimenti di living cells, il sistema è dotato di una centralina veloce di gestione dell'illuminazione e della ruota portafiltri in emissione. Al contrario, i sistemi tradizionali producono un ritardo troppo elevato per i nostri esperimenti nell'acquisizione tra due fluorescenze diverse. Il Sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay invece è in grado di illuminare e di raccogliere il segnale di fluorescenza molto velocemente, in modo tale da non accumulare un ritardo tra le diverse fluorescenze acquisite che quindi devono risultare il più possibile simultanee. Per tale motivo, il sistema è dotato di una ruota filtri di emissione con velocità inferiore ai 30 millisecondi.

Il Sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay permette inoltre di analizzare colture cellulari che si sviluppano su più piani focali, e strutture più complesse come sferoidi e organoidi, essendo dotato di un dispositivo in grado di migliorare la qualità delle immagini in fluorescenza tridimensionali, andando ad agire sulla rimozione dei piani non a fuoco attraverso un algoritmo veloce di processazione delle immagini 2D e 3D e deconvoluzione.

È fondamentale ai fini sperimentali potere ottenere immediatamente le immagini ad alta risoluzione con deconvoluzione applicata in modo tale da poter immediatamente

comprendere l'andamento di fenomeni biologici anche in campioni strutturalmente complessi e spazialmente estesi. Il Sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay è estremamente veloce nella processazione dei dati di deconvoluzione che sono disponibili e visualizzabili già durante il timelapse e non soltanto alla fine dell'esperimento.

Il Sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay è dotato di un sistema di integrazione con uno scanning stage per esperimenti che prevedono l'acquisizione di posizioni multiple durante gli esperimenti temporizzati. Il sistema consente agli utilizzatori l'acquisizione di regioni di interesse, oppure la scansione completa di un'area (come per esempio un pozzetto di una piastra) oppure di più aree all'interno del supporto specifico (piastra, labtek). Nel caso di tessuti in fluorescenza, o di colture cellulari particolarmente complesse ed estese spazialmente, il sistema è in grado di ottenere immagini nitide e qualitativamente eccellenti adoperando l'algoritmo della deconvoluzione. Ciò avviene in maniera concomitante all'acquisizione, in modo tale da evitare di essere costretti ad aspettare molto tempo prima di riuscire a fare una valutazione effettiva del risultato, e dell'aspettativa sul risultato. Al termine dell'esperimento di acquisizione di mosaici e sequenze di immagini, il sistema Leica prevede immediatamente la possibilità di visualizzare e valutare il rendering in 3D del deblur eseguito.

Il sistema THUNDER 3D Imager Assay è equipaggiato di sistema per la visualizzazione del contrasto interferenziale completamente motorizzato. Questo accorgimento tecnologico è cruciale per poter acquisire all'interno dello stesso esperimento, come per esempio un timelapse di alcune ore o anche più lungo, sia immagini in contrasto DIC sia immagini in fluorescenza sequenzialmente, senza avere per queste ultime un deterioramento della qualità dell'immagine e della sua risoluzione causata dalla presenza nel percorso ottico del prisma di Wollaston che potrebbe provocare un peggioramento della risoluzione in fluorescenza. Il sistema Leica è in grado di eliminare tali prismi completamente dal percorso ottico quando si acquisisce in fluorescenza. Inoltre, la posizione esatta del prisma nel percorso ottico deve essere riproducibile, in modo da poter ripetere nel tempo esperimenti nelle identiche condizioni sperimentali, e questo è possibile in quanto l'inserimento del prisma è aggiustabile da software, memorizzabile e richiamabile sperimentalmente. Un ulteriore vantaggio per l'operatore è quello di evitare di dover mettere le mani nel microscopio, aprire la camera climatica per ottimizzare la metodica, con conseguente dispersione del calore, instabilità termica e possibile introduzione di vibrazioni e spostamenti anche involontari del campione.

Caratteristiche uniche e vantaggi offerti dall'apparecchiatura

Il sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay è dotato di caratteristiche tecniche uniche non riscontrabili in nessuno strumento similare presente in commercio e quindi risponde a requisiti di unicità.

1) Il sistema THUNDER Imager include l'algoritmo proprietario Leica in grado di visualizzare il risultato della processazione di optical clearing e deconvoluzione in tempo reale* (* in accordo con ISO/IEC 2382:2015; esempio di performance di tempo del sistema: 1Gb di dati composti da 100 piani lungo l'asse Z, 2 canali di fluorescenza e acquisizione con risoluzione 2.8Mpx vengono processati in un tempo <10s). Tale algoritmo consente di poter osservare in tempo reale in campioni otticamente trasparenti segnali di fluorescenza fino a 150 µm in profondità all'interno del campione con una risoluzione radiale e assiale fino al limite di diffrazione ottica. Nell'acquisizione non è necessaria l'introduzione di alcun componente meccanico od ottico nel percorso ottico, evitando vibrazioni o potenziali problemi di natura meccanica su componenti integrate.

2) Il sistema THUNDER Imager 3D Assay sviluppato di microscopio rovesciato DMi8 Leica, è dotato di un dispositivo di mantenimento del fuoco di tipo adattivo composto da una sorgente LED a 850nm e un sensore di feedback closed loop con capacità di mantenimento della posizione in z inferiore a 20nm. Ciò consente di poter effettuare esperimenti time-lapse di cellule *in vivo* della durata anche di diversi giorni. Questa caratteristica è coperta da brevetto internazionale # US2013/0342902A1 3).

3) Il sistema THUNDER Imager 3D Assay integra una ruota portafiltri esterna con tempi di switch tra due lunghezze d'onda adiacenti < 27ms. Tale velocità di switch consente di poter effettuare esperimenti multicanale ad altissima velocità di acquisizione su lunghezze d'onda plurime.

- Sistema di microscopia Widefield a fluorescenza ad altissima risoluzione ed elevatissima velocità che sfrutta la nuova tecnologia "Computational Clearing" per rimuovere in tempo reale i contributi provenienti dai piani fuori fuoco, permettendo di acquisire immagini ad elevatissimo contrasto e definizione anche su campioni biologici spessi.
- Microscopio rovesciato completamente motorizzato e automatizzato in tutte le sue componenti, modulare ed espandibile,
- Revolver portaobiettivi motorizzato a 6 posizioni dotato di sistema di mantenimento della parafozialità e della paracentricità
- Sistema di raccolta dei versamenti di acqua e altri liquidi biologici ● Dotazione obiettivi:
 - a. N Pian 5x, NA=0.12, PH0
 - b. HC PL Fluotar 10x, NA=0.32, PH1
 - c. HC PL Fluotar L 20x, NA=0.40, PH1, con collare di correzione
 - d. HC PL 40x, NA=0.80,
 - e. HC PL APO 63x a immersione a olio, NA=1.4

- Sistema di mantenimento del fuoco completamente automatizzato di tipo hardware basato su LED a diodo infrarosso (850nm) e sensore CMOS con feedback di riposizionamento closedloop, compatibile sia con supporti in vetro che in plastica
- Tubo binoculare ergonomico con 2 oculari planari 10x con indice di campo 25, regolabili e correzione per le diottrie, angolo di osservazione aggiustabile 30-45 °, distanza interpupillare aggiustabile 55-75mm
- Tavolino motorizzato a scansione con corsa da 127x83mm, risoluzione di 20 nm e riproducibilità di posizionamento <1µm.
- Colonna di illuminazione reclinabile con diaframma di campo motorizzato, shutter controllato elettronicamente attraverso TTL e illuminazione Koehler
- Sorgente a luce LED bianca (4500 K) da IOW e durata superiore alle 20.000 ore di lavoro
- Condensatore a 7 posizioni preparato per alloggiare tutti i principali metodi di contrasto, completamente motorizzato dotato di lente intercambiabile con distanza di lavoro 28mm e Apertura Numerica 0.55
- Set di anelli di fase
- Sistema di contrasto interferenziale tipo Nomarski (DIC) su ob. ad alta risoluzione ad immersione ad olio, completamente motorizzato ed automaticamente eliminabile per acquisizioni combinate con imaging in fluorescenza in modo tale da evitare problemi di risoluzione e/o di birifrangenza dovuti alla mancata eliminazione del prisma lato obiettivo dal percorso ottico
- Asse a fluorescenza montato su porta infinity, con controllo dell'intensità e otturatore motorizzato
- Torretta motorizzata 6 posizioni con sistema di riconoscimento automatico del cubo di fluorescenza inserito attraverso sensore RFD
- External Filter Wheel (EFW): Ruota portafiltri in emissione a 5 posizioni, ad alta velocità montata su adattatore passo C della camera che consente lo switch in emissione con tempi < 27ms fra due posizioni adiacenti
- Filtro quadruplo montato su EFW (per fluorofori quali DAPI, FITC, TRITC e Cy5)
- Sorgente a fluorescenza a LED con 4 canali singoli di eccitazione per le seguenti lunghezze d'onda: 390, 480, 555, 630nm. Controllo indipendente per ciascuna lunghezza d'onda dell'accensione/spegnimento e della potenza (con step da 1%). Connessione al microscopio tramite guida d'onda liquida (LLG — Liquid Light Guide)
- Camera digitale con sensore sCMOS da 4.2 milioni di pixel (2048x2048), dimensione del pixel 6.5 µm, dimensione del sensore 13.3x13.3 mm (diagonale da 19mm), efficienza quantica massima 80% @580nm

- Camera di incubazione con controllo della temperatura e CO₂ ● Computer dotato delle seguenti caratteristiche:
 - a. Processore Intel Xeon W 2123 3.6 GHz 4C CPU
 - b. Memoria RAM 64 Gb DDR4-2666 ECC REG RAM
 - c. Disco SSD SATA da 512 GB e disco HDD SATA da 4 TB
 - d. Ulteriore disco SSD RAID da 2 TB
 - e. Scheda grafica NVIDIA GTX 1080 Ti, 11 Gbps
 - f. Sistema operativo Windows IO 64 bits
 - g. Monitor 32"
- Software unico a corredo dotato dei seguenti moduli:
- acquisizione multi-canale (fluorescenze e metodi di contrasto)
 - a. timelapse
 - b. controllo automatico dell'asse Z e dell'autofocus
 - c. visualizzazione e rendering 3D
 - d. esperimenti su posizioni diverse attraverso il modulo di navigazione.
 - e. creazione di immagini panoramiche posizionando le immagini acquisite o visualizzate in anteprima nella loro posizione reale sullo stage/portacampioni e consentendo il loro utilizzo per la navigazione attraverso il campione.
 - f. possibilità di eseguire uno sweep a spirale che ricostruisce il campione dal punto corrente, disponibilità di modelli che rappresentano diversi portacampioni (vetrini, piastre multi-pozzetto) per facilitare la navigazione in essi e la programmazione di acquisizioni di immagini automatiche (sia a mosaico che singole immagini) in più posizioni.
 - g. progettazione di esperimenti di multiposizione complessi (compresa la realizzazione di più mosaici in diverse posizioni), compresi gli stack Z, i timelapse e la combinazione di tutte le dimensioni di acquisizione dell'immagine.
- Sistema software di rimozione del background in tempo reale e deconvoluzione in tempo reale (in accordo con ISO/IEC 2382:2015) per la rimozione dei contributi provenienti dai piani fuori fuoco, al fine di acquisire immagini ad elevatissimo contrasto e definizione anche su campioni biologici spessi:
 - a. Instant Computational Clearing (ICC): rimozione istantanea dei contributi provenienti dai piani fuori fuoco senza necessità di acquisire Z-stack (anche su singolo piano) e indipendente dalla PSF dell'obiettivo
 - b. Small Volume Computational Clearing (SVCC) e Large Volume Computational Clearing (LVCC): combinazione di ICC e deconvoluzione istantanea adattiva che tiene conto automaticamente dei diversi parametri hardware e sperimentali (apertura numerica obiettivo, indice rifrazione mezzo utilizzato)

- L'algoritmo è applicabile sia a Z-stack di immagini sia su singoli piani focali (2D / 3D) con le seguenti caratteristiche:
 - a. elaborazione dell'immagine eseguita in parallelo contemporaneamente sulla CPU del PC e sulla GPU della scheda grafica - possibilità di processare in tempo reale esperimenti timelapse, Z-stack multiposizione, o combinazioni di questi. Per questi esperimenti possibilità di processazione dell'immagine già durante l'esperimento di acquisizione.
 - b. visualizzazione parallela di immagine a fluorescenza widefield e immagine processata in esperimenti tipo timelapse e multi-posizione
 - c. su campioni ottici trasparenti possibilità di acquisire segnali di fluorescenza fino a 150 in profondità all'interno del campione
 - d. possibilità di acquisire e di ottenere le immagini processate senza la movimentazione di alcun componente meccanico e/o ottico nel percorso di fluorescenza
 - e. mantenimento del dato originale acquisito insieme con l'immagine processata

Informazioni commerciali

La casa produttrice dello strumento è: Società LEICA Microsystems S.r.l. con sede legale in Varese, Vicolo San Michele n. 15 e sede operativa in Buccinasco (Milano) in via Emilia 26, quale filiale italiana del Gruppo Leica Microsystems GmbH con sede in ErnstLeitz-Strasse 17-37 — 35578 Wetzlar (Germany).

Si dichiara inoltre che la Società LEICA Microsystems S.r.l. è l'unica importatrice e distributrice in esclusiva sia per la vendita che per l'Assistenza tecnica su tutto il territorio nazionale del sistema Leica THUNDER Imager 3D Assay.

Il costo orientativo è di 100.000€ (IVA esclusa)

Per quel che riguarda l'esclusività di produzione e di vendita, si veda la dichiarazione allegata.

In Fede

Prof. Giuseppe Viglietto

