**All.1**

**Caratteristiche tecniche minime del Microscopio a fluorescenza rovesciato motorizzato con acquisizione automatizzata**

L’apparecchiatura richiesta è necessaria alla UOSD Network cellulari e bersagli terapeutici molecolari dell’IRE al fine di analizzare strutture intracellulari in modo automatizzato per la messa a punto di test diagnostici.

In particolare, l’apparecchiatura deve permettere l’esecuzione di analisi di microscopia su campioni biologici fissati e opportunamente marcati con sonde o proteine fluorescenti al fine di evidenziare determinate strutture e componenti intracellulari, e rilevare particolari fenotipi cellulari, il tutto operando in maniera rapida, su un largo numero di campioni e con elevata informatività.

Tale apparecchiatura sarà indispensabile per lo svolgimento in automazione e in maniera quantitativa e indipendente dalla discrezionalità dell’operatore di procedure sperimentali previste in progetti già in corso agli IFO e renderà possibile l’automazione e la standardizzazione delle analisi che saranno effettuate nello specifico su campioni biologici prelevati nell’ambito del più ampio progetto di ricerca in cui è prevista l’automazione del test di localizzazione di p53 al centrosoma (p53.MCL) per la caratterizzazione delle varianti di ATM su campioni di linfociti prelevati da pazienti con tumore al seno.

La lettura in modalità manuale risulta estremamente impegnativa e laboriosa poiché le cellule che vengono analizzate sono quelle mitotiche, che rappresentano solo l’1-3% dell’intera popolazione cellulare. E’ quindi necessario, per ottenere l’analisi di un numero statisticamente rilevante, garantire che l’apparecchiatura sia in grado di effettuare, in modo rapido e automatico, la rapida scansione del campione e la ricerca di determinati segnali fluorescenti anche di debole intensità.

Il microscopio richiesto deve essere caratterizzato dalle seguenti caratteristiche tecniche:

1. Microscopio rovesciato predisposto per tutte le metodiche di osservazione, da ricerca, motorizzato ad elevata stabilità e solidità e predisposto ad avere fino a 6 uscite fotografiche dotato di dispositivo, integrato nello stativo, di mantenimento continuo della posizione di fuoco con lente di offset (real-time focus correction ad almeno 855 nm) per la memorizzazione di più piani di fuoco mantenendo lo stesso riferimento nel campione;
2. Dispositivo di messa a fuoco motorizzato macro e micrometrica bilaterale ergonomica con risoluzione 0.02 μm, range 10 mm.

Sistema di traslazione motorizzato risoluzione 0.1 μm e riproducibilità +/- 3 μm o migliore

Tubo binoculare indice di campo 22 mm, distanza inter pupillare 50-75 mm

Variatore di ingrandimento incluso nello stativo con lente 1x e 1,5x, con rilevazione automatica della posizione.

Uscita laterale per telecamera con FOV da 25mm

Revolver portaobiettivi motorizzato a 6 posizioni, per campo chiaro e DIC in tutte le posizioni

Condensatore universale per campo chiaro, DIC e contrasto di fase.

Dispositivo a Fluorescenza con FOV da 25mm, completo di illuminatore ad alta resa con potenza 120 W

Set di filtri da 32mm di diametro per DAPI, FITC, TRITC,

Torretta portafiltri per fluorescenza motorizzata a 6 posizioni

Corredo ottico corretto all'infinito

Obb. CFI 20X Plan Apocromatico A.N.0,75 d.l.1 mm.

1. Sistema di acquisizione immagini digitali:

Telecamera digitale CMOS (non reflex) monocromatica raffreddata specifica per fluorescenza da almeno 16Mega pixel reali non interpolati

Passo F di collegamento al microscopio (NO passo C)

Frame rate di almeno 40 immagini al secondo in modalità LIVE ad una risoluzione di almeno 1600x1000

Collegamento a PC tramite porte ad alta velocità USB 3

1. campo largo (acquisizione con diametro utile massimo osservabile [FOV] di 25mm). Tale attributo si rende necessario per:
* aumentare significativamente l’output di dati nel processo di acquisizione delle immagini. Ciò consente di ridurre drasticamente il numero di immagini acquisite che dovranno poi essere analizzate
* ridurre i tempi di acquisizione delle immagini e di analisi permettendo il rapido completamento dell’esperimento.
* Massimizzare l’utilizzo di fotocamere a largo formato
1. Il sistema deve essere associato ad una telecamera ad altissima risoluzione raffreddata monocromatica da 16 Megapixel reali (non reflex). Questa caratteristica unica del sistema risulta indispensabile in quanto senza di essa non sarebbe possibile osservare segnali fluorescenti anche di debole intensità impedendo la corretta rilevazione dei centrosomi mitotici e della proteina p53, o di altri eventuali segnali di interesse scientifico/traslazionale, rendendo impossibile analizzare in modo quantitativo, attendibile ed efficiente i campioni biologici prelevati dai pazienti.
2. Software di gestione dello strumento, acquisizione ed analisi dell’immagine

Il programma dovrà gestire in modo completo il processo di acquisizione delle immagini da microscopio

Possibilità di gestire da mouse messa a fuoco e movimentazione del tavolino motorizzato

Completa integrazione con software per esperimenti in 6D

Modulo di deconvoluzione delle immagini acquisite

Strumento che permetta il collage in acquisizione di immagini per ottenere viste di insieme di grandi dimensioni

Acquisizioni multiple con gestione del tavolino motorizzato e relativo controllo degli assi X/Y/Z .

Completo set di misure manuali ed automatiche che comprende misure di lunghezze, aree, perimetro, conta di oggetti.

Conta di oggetti semplici con differenziazione di appartenenza a classi diverse (es. cellule vive, morte, in apoptosi).

Strumenti di rimozione del background in modalità manuale o automatica.

Pacchetto di misure automatiche per quantificazione di intensità di fluorescenza,

Conta e classificazione automatica di oggetti con possibilità di discriminazione secondo fattori di dimensione, forma, morfologia, colorimetria.

Pacchetto per lo studio di colocalizzazione dei segnali di fluorescenza

Pacchetto di rendering 3D in diverse modalità per evidenziare le caratteristiche di superficie dell’oggetto oppure per osservare l’oggetto 3D in trasparenza

Possibilità di report di stampa con le immagini visualizzate nei diversi rendering 3D

Possibilità di acquisire nel tempo, selezionare regioni di interesse e quantificare un segnale medio di fluorescenza sia nell’immagine acquisite nel tempo sia su Z-stack.

Pacchetto di programmazione ad oggetti per l’acquisizione e l’analisi di immagini per la realizzazione esperimenti complessi. Il pacchetto dovrà essere completo di funzioni logiche che consentano all’operatore di impostare criteri decisionali a seconda di diversi parametri (di tipo quantitativo, dimensionale, morfologico e morfometrico). Tutto questo deve essere possibile senza dover inserire righe di comando o conoscere linguaggi di programmazione. L’interfaccia grafica dovrà consentire di inserire delle task semplicemente trascinando le icone in un foglio di lavoro pe assegnare un preciso comando al microscopio o al pc.

1. PC e monitor

Workstation per collegamento e gestione telecamera e dello strumento

Monitor da almeno 27"