

**PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA (PNRR)**  
**MISSIONE 4 "Istruzione e Ricerca" COMPONENTE 2 "Dalla ricerca all'impresa"**  
**INVESTIMENTO 1.3 "PARTENARIATI ESTESI"**  
**Finanziato dall'Unione Europea - NexGenerationEU**  
**Partenariato Esteso INF-ACT - One Health Basic and Translational Research Actions**  
**Addressing Unmet**  
**Needs on Emerging Infectious Diseases**  
**Codice progetto MUR: PE00000007 - CUP UNINA: E63C22002020007**

Responsabile scientifico del progetto: Prof. Giuseppe Matarese (giuseppe.matarese@unina.it)  
Responsabile amministrativo: Dott.ssa Annunziata Albanese (an.albanese@unina.it)

**DISCIPLINARE TECNICO**

**SCHEDA N.1 - Analizzatore Cellulare Spettrale**

WP	5.3
Ubicazione del bene	Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche – Via Sergio Pansini, 5 – 80131 Napoli (NA)
Costo del bene (senza IVA, €)	300.000,00
Tipologia	Acquisizione di strumentazione scientifica
Classe CPV	38434510-4 - Citometri
Categoria (S o G)	Singolo bene

1. Premessa

2. Caratteristiche tecniche fornitura
3. Software e requisiti di sistema
4. Descrizione Servizi, formazione del personale e garanzia

## 1. Premessa

Il Citofluorimetro ideale per le esigenze analitiche previste nel progetto è un Citofluorimetro automatico spettrale da banco corredato di 3 laser 405/488/638nm, spazialmente separati, con trasmissione del segnale dalla cella di flusso attraverso fibre ottiche a dei piani di rilevamento (*detection decks*) implementabili nel tempo, con la disposizione su ciascun piano di un sistema ottico costituito da gratings per la dispersione del segnale e array di PMTs pari a 35 PMT per il laser 405, 32 PMT per il laser 488nm e 26 PMTs per il laser 638 nm, per un totale di 86 PMTs per la rilevazione delle fluorescenza e due detectors per la rilevazione di FSC/SSC, ovvero 88 detectors, tale da consentire un'analisi multi parametrica di almeno 26 marcatori simultaneamente. Lo strumento deve essere dotato di un autocampionatore di serie che supporti l'acquisizione di campioni da diversi tipi di supporto: rack di 24 facs tube (5 ml tubes) e multiwell plates a 96-384 pozzetti di diverso formato. L'autocampionatore deve avere un sistema di raffreddamento (Peltier) a 4°C, per impedire la degradazione dei campioni durante l'acquisizione ed una *cleaning station* che provvede al lavaggio del probe di acquisizione al passaggio da un tubo/pozzetto all'altro, portando ad una riduzione del carry-over di < 0,1%; è altresì dotato di un sistema di agitazione in diverse modalità selezionabili dall'operatore. Inoltre, il citofluorimetro deve essere caratterizzato da procedure guidate e automatizzate per le fasi di start-up, cleaning e shutdown. Il software deve disporre di un'interfaccia user-friendly e di tools che guidano l'utente nel set-up dell'esperimento (Experiment designer), nell'acquisizione e definizione della spectral library, nell'identificazione di popolazioni autofluorescenti e nel successivo unimixing viewer per aggiustamenti del voltaggio dei PMTs.

## 2. Caratteristiche tecniche fornitura

Il citofluorimetro deve essere dotato di almeno 3 sorgenti laser (405nm, 488nm e 638nm), upgradabile con almeno altri 4 laser singolarmente, che includono laser a 320nm e 808 nm, per un totale di 7 laser, 184 detectors +FSC/SSC, ampliando la flessibilità nel design di pannelli multicolore. Dimensioni: W: 41.7 in (106 cm) x D: 28.3 in (71.9 cm) x H: 29.9 in (76 cm), 210 Kg. Lo strumento deve essere corredato da un carrello della fluidica contenenti una tanica per lo sheath fluid e i liquidi di scarto della capacità di 10 e deve avere un autocampionatore già integrato nel sistema per tubi da 5 mL (24 pz), piastre da 96 pozzetti (tutti i formati) e piastre da 384 pozzetti, con sistema di raffreddamento con elementi Peltier, e sostituzione del diverso formato da tubi a piastre senza la necessità di effettuare conversioni.

I campioni contenuti in tubi o in piastre devono essere agitati direttamente dalla sample probe, riducendo il danno cellulare. Le modalità di mixing che possono essere effettuate anche durante l'acquisizione, devono includere l'agitazione una sola volta prima dell'acquisizione (Once), e a intervalli regolari durante l'acquisizione (Cyclic) oppure continuamente durante l'acquisizione (Continuous). Il meccanismo di pulizia



Finanziato  
dall'Unione europea  
NextGenerationEU



Ministero  
dell'Università  
e della Ricerca



Italiadomani  
PIANO NAZIONALE  
DI RIPRESA E RESILIENZA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO  
FEDERICO II

(*cleaning block mechanism*) del probe di acquisizione deve muoversi su e giù lungo essa effettuando una pulizia interna ed esterna o solamente interna del sample nozzle (a scelta dell'utente), riducendo il carry over. L'autocampionatore deve essere corredato di una extra station che alloggia 3 tubi da 5 mL. Lo strumento deve poter essere configurato per lo shut down automatico attraverso procedure che con l'ausilio di grafiche intuitive sul software, guidano l'utente al caricamento delle soluzioni necessarie per la pulizia dello strumento nella stazione dedicata nell'area dell'autocampionatore. L'auto-acquisizione dei campioni deve disporre di un *event checker* tool che consente, ad acquisizione terminata, di individuare i pozzetti/tubi dove sia avvenuto un errore durante l'acquisizione (es. esaurimento del campione). L'utente potrà indicare, nel caso di cambiamenti dell'event rate con riduzione degli eventi rilevati, se l'acquisizione dovrà proseguire ai pozzetti/tubi successivi o interrompersi. Inoltre, il citofluorimetro deve avere due modalità di acquisizione del campione ovvero, modalità standard e modalità Low-dead volume. Quest'ultima consente di utilizzare poca quantità di campione particolarmente vantaggiosa nel caso di campioni poco disponibili.

I volumi minimi di campioni acquisibili, a seconda che siano contenuti in tubi /piastre, devono essere i seguenti:

5-mL tube: 100  $\mu$ L in standard mode/50  $\mu$ L in low-volume mode

96-well plate: 55  $\mu$ L in standard mode/10  $\mu$ L in low-volume mode

384-well plate: 40  $\mu$ L in standard mode/10  $\mu$ L in low-volume mode \*Minimum volumes provided for the sample vessel type are averages of data obtained from multiple experiments.

Lo strumento deve possedere 3 differenti modalità di acquisizione e *measurement*, ovvero

-**Standardization mode**: con questa modalità, la potenza dei laser potrà essere settata ad un dato valore e richiamata all'esperimento successivo. Tale modalità aumenta la riproducibilità dei risultati tra laboratori e tra esperimenti. Gli spettri dei diversi laser possono essere controllati indipendentemente;

-**Normal mode**: con questa modalità gli spettri dei diversi laser possono essere controllati indipendentemente;

-**Advanced mode**: Ogni PMT può essere controllato indipendentemente.

## Performance:

La sensibilità in fluorescenza espressa in MESF (Molecule of equivalent soluble fraction) deve essere pari a FITC $\leq$ 58MESF, PE $\leq$ 4MESF e APC  $\leq$  7MESF.

Il segnale deve essere misurato in Altezza (Height), Ampiezza (Width) e Area (Area) con una risoluzione pari a 20 bit per Height e 32 bit per Area ad una frequenza di 60 MHz.

La risoluzione in Fluorescenza determinata dal CV di Chicken Erythrocyte Nuclei (CEN) marcati con ioduro di propidio deve essere inferiore al <3%.

La velocità di acquisizione deve raggiungere i 40.000 eventi al secondo, con un sample rate che varia da 33 mL/minuto a 200 mL/minuto.

La configurazione del sistema ottico deve essere costituita da 86 PMTs per la configurazione a 3 laser, che consente la detection di un range di lunghezze d'onda da 413nm-844.7nm. Il segnale costituito da tutto lo spettro di emissione della fluorescenza derivante dal contributo di ciascun fluorocromo è rilevato da 86 PMT e la separazione dei singoli spettri deve essere effettuata attraverso lo *Spectral unmixing* che impiega l'algoritmo WLSM (weighted least square Methods), in cui i residuals (noise) non vengono considerati ugualmente distribuiti, ma valutati attraverso l'imposizione di un valore, calcolato sulla base dell'intensità del segnale, al valore quadrato dei residui su ogni canale. L'applicazione dello *spectral unmixing* per la separazione del segnale derivante dai diversi marcatori presenti nel campione da analizzare necessita di una previa acquisizione di spettri di emissione di riferimento, costituiti dai single color control sotto forma di anticorpi coniugati a beads oppure anticorpi legati a cellule.

L'insieme dei single color control costituiscono la *spectral library*, che una volta acquisita, può essere conservata e richiamata per la ripetizione dell'esperimento.

Il *Reference Spectrum Adjuster* che deve essere presente nello strumento consente di effettuare aggiustamenti sugli spettri necessari per la successiva separazione dei marcatori utilizzati nel pannello sperimentale, eliminando la necessità di ulteriori aggiustamenti da effettuarsi con software esterni.

### 3. Software e requisiti di sistema

L'analizzatore deve avere una workstation che comprenda:

Operating System: Windows® 10 Pro 64 bit

Processor: Intel® Xeon® 6248 2.5 GHz 20 Core

Memory: 256 GB DDR4

Graphics card: NVIDIA Quadro P2200

Storage: 8TB x3 (RAID5:16TB) HDD

2 Ethernet ports

4 display ports

DVD disc drive

Il software con un'interfaccia intuitiva e semplice, che offre la possibilità di creare diversi account associati ad ogni user.

Deve essere caratterizzato da procedure guidate per le fasi di start-up, QC, performance verification, set-up dell'esperimento, pulizia e shut down. Dopo l'accensione dello strumento e il login, il software invita l'utente ad effettuare il Priming mediante flushing nel sistema fluidico di *sheath fluid* e successivamente, visualizza la schermata per effettuare il Quality Control giornaliero che permette di valutare lo status dello strumento, calibrazione del flow rate, calibrazione del laser delay, calibrazione della sensibilità di rilevazione. Il successivo Performance Check deve provvedere alla calibrazione della sensibilità di fluorescenza. I risultati di entrambi i controlli giornalieri devono essere conservati e devono poter essere richiamati per una successiva visualizzazione.

Nello strumento che ci occorre, l'acquisizione dei campioni è preceduta dall'acquisizione dei singoli colori che formeranno la spectral library. L'utente dovrà elencare i fluorofori ed i marcatori ad esso associati. I fluorofori possono essere scelti da una lista o inseriti ex novo nel sistema. Il sistema offre la possibilità di importare un pannello creato e salvato in formato CSV file. Inoltre, dopo l'acquisizione della Spectral Library, condivisibile tra i diversi users, l'utente procede nel design dell'esperimento dove indicherà la spectral library che il software utilizzerà per effettuare lo *spectral unmixing*.

L'interfaccia principale di acquisizione deve essere costituita da strumenti per l'avvio, stop, pausa e registrazione degli eventi cellulari impostabili durante l'acquisizione, dovrà visualizzare le informazioni riguardanti la struttura dell'esperimento, la schermata centrale dove verranno disegnati i grafici con la selezione dei parametri definiti per l'esperimento, la visualizzazione degli spectral plot con possibilità di direct gating di più di due popolazioni da visualizzare in dot plot e viceversa. Inoltre, il software deve offrire una funzione di Virtual Filter, per il settaggio del range di lunghezza d'onda dei fluorocromi di interesse attiva solo in assenza dello spectral unmixing.

Il software deve consentire l'identificazione delle popolazioni Autofluorescenti tramite un tool da applicare su popolazioni *unstained*, in cui l'autofluorescenza sarà considerata come un marcatore e, di conseguenza, separata dagli altri. I dati acquisiti devono essere esportabili in formato FCS file sia manualmente che automaticamente durante l'acquisizione, selezionando la voce autoexport.

Le procedure di manutenzione giornaliera e mensile dovranno essere completamente effettuabili attraverso procedure guidate dei vari step da svolgere, in maniera tale che ogni utente possa essere indipendente nell'effettuare le procedure di pulizia e shutdown dello strumento e della sua manutenzione.

#### **4. Descrizione Servizi, formazione del personale e garanzia**

Sono a carico del fornitore i servizi di trasporto, consegna, installazione e collaudo della fornitura. Successivamente al primo training di familiarizzazione con lo strumento durante l'installazione, l'appaltatore dovrà effettuare un ulteriore corso di formazione specialistica (sul funzionamento della strumentazione e sullo sviluppo di metodi analitici) non inferiore a 3 giorni lavorativi per 6 partecipanti presso la sede di installazione. Il fornitore dovrà garantire obbligatoriamente sull'attrezzatura una garanzia di 12 mesi dalla data di effettuazione del collaudo.