

SCHEDA TECNICA

STRUMENTAZIONE PER ANALISI CELLULARE IN FLUSSO BASATO SULL'IMPIEGO DI BIOMOLECOLE QUALI ANTICORPI E/O ACIDI NUCLEICI CONIUGATI A DETERMINATI METALLI E LORO PARTICOLARI ISOTOPI CHE SONO RILEVATI TRAMITE SPETTROMETRIA DI MASSA

Premessa: Le nuove frontiere della Medicina di laboratorio hanno aperto nuove sfide che per essere affrontate necessitano di nuovi strumenti che devono permettere l'analisi simultanea di quanti più marcatori biologici su singola cellula.

Pertanto, questa Azienda, intende acquisire uno strumento nuovo e di ultima generazione per analisi cellulare in flusso basato sull'impiego di biomolecole quali anticorpi e/o acidi nucleici coniugati a determinati metalli e loro particolari isotopi che sono rivelati tramite spettrometria di massa.

La tecnologia deve fornire dati analoghi a quelli ottenuti con un citometro di flusso, tecnica molto diffusa in diagnostica per lo studio di popolazioni e sub-popolazioni cellulari senza incorrere nelle limitazioni rappresentate dalle classiche marcature con fluorocromi.

In particolare, la tecnologia deve permettere di rilevare nello stesso campione e durante la stessa misura almeno 50 antigeni di superficie e intracellulari, evitando le problematiche dovute a spillover e alle tecniche di compensazione. I segnali così ottenuti dallo strumento non devono avere alcuna traccia di autofluorescenza.

Inoltre, l'apparecchiatura richiesta dovrà essere in grado di essere facilmente aggiornata con una piattaforma di imaging di tessuti cellulari per eseguire sia test di flusso sia di imaging in modalità duale, allo scopo di poter eventualmente eseguire in futuro anche le possibili nuove correlazioni tra biomarcatori e nuove interazioni cellulari in tessuto.

Per il soddisfacimento delle esigenze è quindi necessario che la strumentazione oggetto di acquisizione garantisca le seguenti caratteristiche/funzionalità minime:

1. Lo strumento deve essere nuovo di fabbrica e conforme alle normative attualmente vigenti a livello nazionale, europeo e internazionale.
2. Lo strumento deve prevedere un equipaggiamento che combina lo stato dell'arte della tecnologia della spettrometria di massa a tempo di volo e del plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS) per misurare marcatori coniugati con isotopi stabili e con pesi molecolari più elevati rispetto agli elementi presenti in abbondanza nei sistemi biologici.
3. Possibilità di impiegare anticorpi o acidi nucleici marcati con un isotopo di un metallo specifico affinché ciascun marcatore (proteina e/o acido nucleico) venga rilevato in canali distinti.
4. Sistema di vuoto a 5 stadi con interfaccia plasma-vuoto a 2 stadi e una turbopompa.
5. Possibilità di analizzare simultaneamente almeno 50 segnali metallici su un singolo campione marcato.
6. Sensibilità di abbondanza <0,3% per 160Gd (M+1 per 159Tb) e <0,3% per 174Hf (M-1 per 175Lu).
7. Calibrazione automatizzata.
8. Acquisizione automatizzata del campione tramite autocampionatore con alloggiamenti per tubi da 5 ml o da 15 ml.
9. Archiviazione dati con mirroring RAID superiore a 3 TB.
10. Canali di acquisizione: ≥ 135 .
11. Intervallo di massa: 75-209 Dalton.
12. Intervallo dinamico: $\geq 4,5$ ordini di grandezza.

13. Funzione di ottimizzazione e massimizzazione del rilevamento del segnale per acquisizioni con durata superiore a 15 ore al fine di mantenere uniforme l'intensità del segnale.
14. Il modulo di analisi cellulare in flusso deve avere capacità multiparametrica per lo studio di proteine e acidi nucleici di campioni cellulari in sospensione. Deve possedere questi requisiti minimi:
 - a) velocità di flusso: $\geq 30 \mu\text{L}/\text{min}$;
 - b) formato dati minimo FCS;
15. Il computer di acquisizione deve avere questi requisiti minimi:
 - a) sistema operativo Windows 10 Enterprise o successivo;
 - b) CPU Intel Core i7 o successivo;
 - c) memoria archiviazione dati per Sistema Operativo: $\geq 240 \text{ GB}$;
 - d) memoria archiviazione dati: $\geq 3 \text{ TB}$;
 - e) monitor: ≥ 34 ;
 - f) software per acquisizione e per analisi dati con licenza inclusa.
16. Lo strumento deve essere equipaggiato con tutto il necessario per la sua corretta messa in funzione e un regolare funzionamento quali:
 - a) biglie di calibrazione per il controllo di qualità dello strumento;
 - b) soluzione di acquisizione;
 - c) nebulizzatore e kit di pulizia del nebulizzatore;
 - d) kit di pulizia delle linee dell'autocampionatore;
 - e) soluzione di permeabilizzazione e fissazione cellulare;
 - f) tampone per lo staining cellulare.
17. L'offerta "chiavi in mano" deve includere tutto il necessario per l'installazione a norma, nei locali messi a disposizione dall'Azienda, che devono essere predisposti per il funzionamento di quanto richiesto, utile e determinante per la produzione dei referti.

Si consiglia sopralluogo insieme al personale tecnico dell'Arnas.

Oltre alla strumentazione richiesta nella fornitura iniziale, per la messa in opera delle metodiche e eventuale comparazione dei dati, l'offerta deve includere almeno ventimila anticorpi già marcati con metalli e suddivise in confezioni da cento per singolo metallo. Inoltre, devono essere anche forniti un cocktail di anticorpi già marcati per eseguire studi del profilo immunitario di campioni di sangue periferico intero o PBMC umano. La quantità deve essere sufficiente per eseguire almeno cento test su 30 marcatori e forniti in un formato secco in singola provetta includendo un intercalante per l'identificazione delle cellule vive/morte.

La fornitura deve permettere l'identificazione e la caratterizzazione complete di almeno 37 popolazioni di cellule immunitarie, comprese tutte le principali sottopopolazioni di cellule T (CD4+ e CD8+ naive, memoria centrale, memoria effettrice e effettrice terminale), cellule T regolatorie CD4+, cellule T mucosa-associate invarianti (MAIT) / cellule T natural killer (NKT), sottopopolazioni di cellule B (naive e di memoria, plasmablasti), cellule natural killer (precoci e tardive), sottopopolazioni fenotipiche di cellule T helper (Th1-like, Th2-like e Th17-like), cellule T gamma delta ($\gamma\delta$), monociti (classici, transizionali e non classici), sottopopolazioni di cellule dendritiche (plasmacitoidi e mieloidi) e granulociti (basofili, eosinofili e neutrofili).

Ogni cocktail deve includere i seguenti anticorpi (tra parentesi è riportato il clone):

- CD45 (HI30)
- CD196/CCR6 (G034E3)
- CD123 (6H6)
- CD19 (HIB19)

- CD4 (RPA-T4)
- CD8a (RPA-T8)
- CD11c (Bu15)
- CD16 (3G8)
- CD45RO (UCHL1)
- CD45RA (HI100)
- CD161 (HP-3G10)
- CD194/CCR4 (L291H4)
- CD25 (BC96)
- CD27 (O323)
- CD57 (HNK-1)
- CD183/CXCR3 (G025H7)
- CD185/CXCR5 (J252D4)
- CD28 (CD28.2)
- CD38 (HB-7)
- CD56/NCAM (NCAM16.2)
- TCR (B1)
- CD294 (BM16)
- CD197/CCR7 (G043H7)
- CD14 (63D3)
- CD3 (UCHT1)
- CD20 (2H7)
- CD66b (G10F5)
- HLA-DR (LN3)
- IgD (IA6-2)
- CD127 (A019D5)
- e tutti i reagenti Standard BioTools™ necessari per la marcatura delle cellule.

Deve essere inoltre inclusa una licenza software per analisi e report di dati.

18. Predisposizione degli impianti di gas argon necessario al collaudo, successivo start up e utilizzo della strumentazione per la messa a punto delle metodiche da utilizzare.

In particolare, devono essere previsti:

- Almeno 192 bombole da 50L di argon gassoso con purezza compatibile con lo strumento;
 - Trasporto delle stesse in pacchi da 12;
 - Punto di utilizzo da inserire nel laboratorio per fornire il gas con flusso e pressione adeguata.
19. Predisposizione di sistema di aria condizionata, di espulsione dei gas residui ed impianto elettrico adatti ad un uso ottimale dello strumento.
 20. Consegna, installazione, messa in funzione dello strumento e collaudo.
 21. Servizio di garanzia, di assistenza e di manutenzione full risk.

Assistenza tecnica/garanzia, full risk per due anni dalla data del collaudo,/Formazione

- In caso di guasti, non risolvibili senza l'intervento diretto dell'operatore, devono essere previsti interventi a chiamata con tempi di ripristino del sistema che non devono superare, di norma, le 72 ore solari dalla richiesta, cinque giorni su sette (feriali).
- Dovranno essere incluse tutte le attività di manutenzione preventiva (comunque tutte quelle previste dal costruttore) e il tutto deve essere tracciato e inviato ad apposita Email indicata dal laboratorio.
- Devono esistere chiari protocolli scritti di manutenzione ordinaria e straordinaria con chiara indicazione delle competenze degli operatori dell'Arnas e del personale del Servizio di assistenza.
- Dovranno essere inclusi tutti i consumabili e tutte le parti di ricambio per le manutenzioni ordinarie e straordinarie senza esclusione alcuna e senza oneri aggiuntivi.
- Devono essere assicurati, senza oneri aggiuntivi:
 - corsi di formazione all'uso dei sistemi e alla manutenzione di base, in house, per il personale addetto, presentare nell'offerta il piano formative.
 - ulteriori corsi di formazione in caso di aggiornamento tecnico dei sistemi analitici forniti ovvero di avvicendamento del personale utilizzatore fino a un massimo di due all'anno.
 - Devono essere rilasciati e consegnati al Responsabile della U.O. gli attestati di formazione che certifichino le competenze acquisite.