

Spett.le  
**Università degli Studi dell'Aquila**  
**Piazza Santa Margherita 2**  
**67100 L'Aquila**  
**referente prof.ssa Francesca Zazzeroni**

Progetto ECS00000041 "Innovation digitalisation and sustainability for the diffused economy in Central Italy - VITALITY" CUP E13C22001060006

Milano, 26 ottobre 2022

### ***DICHIARAZIONE DI UNICITÀ***

Gentile cliente,

La sottoscritta Società **PerkinElmer Italia S.p.A.**, con sede amministrativa in Viale dell'Innovazione 3, Milano e sede legale in Via Gioberti 1, Milano

#### **DICHIARA**

che il prodotto

**IVIS Spectrum ®**

È di esclusiva commercializzazione di PerkinElmer Inc. e che la PerkinElmer Italia S.p.A. è il distributore autorizzato sul territorio italiano dei prodotti di PerkinElmer Inc.

Lo strumento IVIS Spectrum presenta inoltre le seguenti caratteristiche che nel loro insieme costituiscono unicità strumentale:

#### **Caratteristiche generiche:**

- IVIS Spectrum è uno **strumento unico ed integrato**, che comprende la camera di acquisizione, il sistema di raffreddamento, la camera di alloggiamento degli animali, un sistema di bioluminescenza e fluorescenza ed una workstation basata su PC. Il sistema è altamente automatizzato, inclusi il movimento di tutti i motori, i parametri di acquisizione e l'analisi delle immagini controllata dal software proprietario Living Image®.

- **Percorso diretto della luce**, senza l'utilizzo di specchi o altri sistemi di deviazione della luce (nessuna perdita del segnale tra l'animale e la camera CCD).
- Può effettuare imaging di diverse tipologie: fotografico, in Bioluminescenza, in Fluorescenza, 2D, 3D Topografico.
- È in grado di acquisire **10 topi simultaneamente in modalità ottica 2D** e 2 topi per scansioni microCT e DLIT.
- Si avvale di **co-registrazione**: sovrappone automaticamente bioluminescenza 3D, fluorescenza 3D e ricostruzioni CT acquisite con micro CT dedicata ad alta risoluzione QUANTUM GX2.
- È in grado di **rilevare sino ad una singola cellula bioluminescente** in maniera non invasiva, fornendo il più alto grado di sensibilità e rappresenta il gold standard nella sensibilità per imaging ottico non invasivo su piccoli animali. Questo grado di sensibilità è ottenuto grazie a diverse caratteristiche uniche del prodotto, che includono:
  - camera per l'acquisizione delle immagini completamente oscurata e di un letto riscaldato per l'appoggio degli animali; questo consente di mantenere la temperatura corporea durante le fasi di acquisizione dell'immagine.
  - Readout noise inferiore a 3 elettroni con binning 1, 2 e 4 con on range dinamico di 16 bit.
  - Efficienza quantica >85% a 500-700 nm.
  - Dark current (tipica): <100 elettroni/s/cm<sup>2</sup> (la minimizzazione della dark current e del rumore associato è critica per avere elevata sensibilità, soprattutto con lunghi tempi di esposizione e a binning maggiori).
  - Lo stage per la collocazione degli animali può muoversi sull'asse Z, consentendo di acquisire a ROI diverse senza perdere in termini di risoluzione (migliore risoluzione 25µm).
  - telecamera Andor CCD USB compatta, retroilluminata ad alte prestazioni (Grado 1, detector 27x27mm), raffreddata a -90 ° C (temperatura assoluta) o -115°C (Delta) per la massima efficienza quantica nello spettro visibile e per garantire il minor rumore di fondo. Il raffreddamento fino a -80°C può essere ottenuto tramite raffreddamento ad aria. **Massimo tempo di esposizione: 10 minuti.**
- **Baseline Clamp** è una caratteristica unica della camera dello SpectrumCT: consente una performance più stabile e quantitativa su una serie di immagini e compensa eventuali deviazioni dalla baseline.
- **Imaging topografico 3D:** lo strumento comprende uno scanner laser che fornisce immagini topografiche 3D della superficie, le quali, analizzate con il software Living Image, forniscono una ricostruzione tomografica diffusa delle sorgenti interne in bioluminescenza e in fluorescenza.

- Sistema di Lenti custom: una lente custom montata su torretta consente di accedere a 4 livelli di ingrandimento e ottenere un'uniforme raccolta di luce a f/1 con elevata risoluzione su tutto il field of view. Sono disponibili 4 impostazioni di ingrandimento: 3.9x3.9cm, 6.5x6.5cm, 12.5x12.5cm e 23x23cm e consente la risoluzione a singola cellula.  
Il field of view ad alta risoluzione 3.9x3.9 cm consente la **visualizzazione macroscopica con risoluzione a 25µm.**
- Software LivingImage®: un unico software per l'acquisizione, la visualizzazione, l'analisi e la quantificazione di immagini planari (2D) e tomografiche (3D). Comprende funzionalità per l'importazione di dati DICOM utilizzando il tool di multimodalità per effettuare la co-registrazione di dati tomografici acquisiti con scanner microCT con dati 3D bioluminescenti e fluorescenti acquisiti sul sistema di imaging ottico. È inoltre in grado di effettuare **acquisizione automatica**: normalizzare automaticamente le differenze di sensibilità risultanti da diversi parametri di acquisizione (tempo di esposizione, f-stop, binning, FOV) per effettuare confronti significativi tra topi o esperimenti diversi.
- Il software LivingImage® del sistema IVIS Spectrum permette di disegnare, in bioluminescenza e in fluorescenza, ROI (regioni di interesse) in diverse modalità (ROI geometrici, ROI di contorno, ROI a griglia per diversi formati di piastre multiwell, ROI dei soggetti su singoli animali).
- **Digital Mouse Atlas**, un atlante digitale 3D di organi di topo, utile per localizzare sorgenti luminose adattandosi al volume dell'animale.
- Dotato di funzione **"Imaging Wizard"**, per assistere l'utente nella creazione di protocolli complessi in 4 step, incluso un database con più di 99 spettri di reporter bioluminescenti e fluorescenti.

Vengono ora dettagliate le caratteristiche delle singole modalità di acquisizione.

#### **Caratteristiche di Bioluminescenza:**

- Possibilità di acquisire **fino a 10 animali in bioluminescenza 2D** (FOV regolabile da 3.9x3.9 cm a 23x23 cm).
- Il sistema IVIS Spectrum è **calibrato fisicamente** e misura i fotoni di luce attuali emessi dalla sorgente; questo consente all'utente di ottenere misurazioni assolute della luce emessa per poter effettuare confronti significativi tra topi diversi o esperimenti condotti in tempi diversi. Inoltre, consente di cambiare i parametri di acquisizione della camera durante uno studio in corso e correggere automaticamente per il cambiamento

apportato (ad es, se un tumore diventa troppo grande e luminoso, potrebbe essere necessario aggiustare le impostazioni della camera per evitare saturazione). La calibrazione fisica del sistema considera tutte le modifiche apportate così che l'utente non debba preoccuparsene. Tutti i sistemi IVIS sono calibrati contro standard NIST,

- Il sistema IVIS Spectrum utilizza, per la bioluminescenza, la **quantificazione delle intensità del segnale con unità fisiche calibrate** (basate su una sorgente luminosa calibrata certificata), espressi in radianza [ph/sec/sr/cm<sup>2</sup>].

Il software dello strumento permette la **normalizzazione automatica** delle differenze di sensibilità risultanti da diversi parametri di acquisizione (tempo di esposizione, f-stop, binning, FOV) per consentire confronti significativi tra topi o esperimenti diversi, anche nel tempo.

- **Imaging 3D Topografico**: il sistema è dotato di una modalità tomografica bioluminescente (3D BLI) che consente la localizzazione di sorgenti luminescenti individuali nell'intero volume corporeo. Ciò richiede un algoritmo di ricostruzione 3D basato sull'imaging spettrale con filtri di emissione a banda stretta, e deve essere fornita la superficie 3D dell'animale. La quantificazione del segnale (posizionando ROI 3D all'interno dell'immagine 3D ricostruita) deve essere indipendente dalla profondità della sorgente (correzione dei fotoni persi a causa dell'assorbimento durante il loro passaggio nei tessuti) ed espressa come l'intensità di luce all'origine in flusso totale [fotoni/sec].

## Caratteristiche di Fluorescenza

- Possibilità di acquisire **fino a 10 animali in Epifluorescenza 2D** (FOV regolabile da 3.9x3.9 cm a 23x23 cm).
- Per la fluorescenza, IVIS Spectrum® utilizza la **quantificazione delle intensità del segnale con unità fisiche calibrate**, espresse in radianza [ph/sec/sr/cm<sup>2</sup>], normalizzate all'energia della luce di eccitazione. L'unità è l'efficienza di radianza [(ph/sec/sr/cm<sup>2</sup>)/(uW/cm<sup>2</sup>)]. Questo richiede una calibrazione della sorgente di luce. Il software dello strumento permette la normalizzazione automatica delle differenze di sensibilità risultanti da diversi parametri di acquisizione (tempo di esposizione, f-stop, binning, FOV) per consentire confronti significativi tra topi o esperimenti diversi, anche nel tempo.
- IVIS Spectrum dispone di 24 filtri di emissione a banda stretta (20nm) che coprono lo spettro 490-850 nm, e di 12 filtri di eccitazione a banda stretta (30nm) che coprono lo spettro 415-760nm. I filtri sono costruiti per garantire resistenza fisica e prestazioni

migliori rispetto ai filtri di fluorescenza standard. Il pannello di filtri offerto consente di acquisire immagini per **tutti i possibili reporter in fluorescenza 2D e 3D.**

- Tutti i filtri sono **filtri ad alta efficienza OD8** e sono stati testati per raggiungere o superare i requisiti di durata ambientale e fisica, requisiti specificati ad esempio nelle norme MIL-STD-810F, MIL-C-48497°, MIL-C-675C, ISO 9022-2 e sono RoHS compliant. Tutti i filtri sono trattati con la sofisticata tecnologia Ion Beam Sputtering (IBS), rendendo così i filtri estremamente resistenti ("Hard Coated") e non presentano problemi di "burn out", al contrario di filtri presenti su altri sistemi che sono soft-coated e costituiti da vetro assorbente.
- IVIS Spectrum permette la **sottrazione del background dell'autofluorescenza** attraverso:
  - Sottrazione adattiva del background dello strumento: correzione software che distingue tra fluorescenza del soggetto ed il background dello strumento e sottrazione del background dello strumento dall'immagine originale, minimizzando l'interferenza dall'autofluorescenza dello strumento.
  - Sottrazione dell'autofluorescenza del tessuto: metodo basato sull'uso di filtri di background verso la luce blu per eccitare l'autofluorescenza del tessuto, senza eccitare il fluoroforo. L'immagine di background così ottenuta viene sottratta dal filtro di eccitazione primario, riducendo così il segnale di autofluorescenza.
- IVIS Spectrum è dotato di funzione **Spectral Unmixing**, che consente di contemporaneamente separare e quantificare l'autofluorescenza del tessuto e fluorofori multipli a diverse lunghezze d'onda presenti nello stesso animale. Spectral Unmixing è quindi un algoritmo con **4 modalità possibili** (Automatico, Manuale, Guidato e Libreria) che consente di **separare quantitativamente le componenti spettrali (fino ad un massimo di 5 diversi segnali)** di un'immagine per calcolare le concentrazioni di diversi fluorofori in ogni pixel. Questo permette la separazione quantitativa delle componenti spettrali all'interno di un'immagine per: estrarre il segnale di uno o più fluorofori dall'autofluorescenza del tessuto; analizzare immagini fluorescenti utilizzando più di un reporter nello stesso modello animale; utilizzare più fluorofori simultaneamente per esplorare più eventi fisiologici in parallelo nello stesso animale.
- IVIS Spectrum® è in grado di fornire diverse modalità di eccitazione, epi-illuminazione per imaging fluorescente ad elevato throughput (10 topi per volta in 2D) e transilluminazione per effettuare imaging di sorgenti luminose in profondità.
- **Tomografia in fluorescenza (3D FLI)**: IVIS Spectrum® è in grado di produrre immagini quantitative 3D in cui le sonde fluorescenti vengono accuratamente localizzate all'interno del corpo. Questo richiede la determinazione della superficie 3D dell'animale oltre alla transilluminazione per eccitare sorgenti luminose poste nella profondità dei tessuti. La tomografia in fluorescenza deve essere possibile ad ogni lunghezza d'onda dello spettro visibile. Le sorgenti fluorescenti devono essere

quantificate come resa di fluorescenza utilizzando un ROI 3D posto nell'immagine tomografica ricostruita utilizzando il software dello strumento.

## **Pubblicazioni:**

**Più di 16.000 pubblicazioni** peer review che documentano la funzionalità di Bioluminescenza e Fluorescenza 2D e 3D nell'imaging in vivo.

**Reagenti, linee cellulari reporter e supporto applicativo da parte dello stesso fornitore.**

**Personale tecnico locale, assunto e trainato da casa madre.**

## **Brevetti:**

- Qui di seguito si elencano infine le componenti proprietarie e sotto brevetto:
  - Living Image® software package (US Patent No. 6.614.452): un software unico, semplice ed intuitivo che consente tutte le fasi sperimentali (acquisizione, quantificazione, analisi e conservazione delle immagini). Il software mostra non solo le conte dei fotoni assolute e quantificate, ma converte anche i dati in immagini a falsi colori che vengono sovrapposte alle immagini dell'animale in modo tale da identificare in maniera precisa la sorgente di fotoni nel soggetto. Inoltre, tutte le condizioni di acquisizione sono conservate per ogni immagine.
  - Design della camera di alloggiamento (US Patent No. 6.775.567 e 6.901.279): a prova di luce esterna, costituito da materiali a basso background fluorescente. Ciò consente di utilizzare il sistema anche in ambienti con elevati livelli di luce ambientale, senza dover allestire appositamente una camera oscura.
  - Sistema di fluorescenza proprietario (US Patent No. 6.894.289 e 6.922.246): consente l'utilizzo di tecniche di bioluminescenza e di fluorescenza in un unico sistema.
  - Strumento di calibrazione proprietario (US Patent No. 6.919.919) per la determinazione e la calibrazione dell'intensità assoluta dei fotoni per misure standardizzate da esperimento a esperimento.
  - Illuminazione ottimizzata per Imaging nel NIR: la sorgente di eccitazione è una sorgente al tungstendo da 150W con range esteso al NIR e che consente una maggiore potenza a lunghezze d'onda superiori a 700nm. Il design esclusivo di PerkinElmer consente una trasmissione elevata di luce nell'infrarosso vicino, controllando contemporaneamente la generazione di calore grazie all'utilizzo di fibre ottiche ad alta temperatura.
  - CPS (Compute Pure Spectrum) Spectral Unmixing: degli strumenti software di generazione di librerie spettrali assicurano un'accurata rimozione

dell'autofluorescenza e la quantificazione dei fluorofori. Gli strumenti IVIS possono acquisire immagini a diverse lunghezze d'onda per calcolare la concentrazione delle diverse componenti fluorescenti in ogni pixel di un'immagine. Questo consente la separazione quantitativa delle componenti spettrali in un'immagine e consente di:

Estrarre il segnale di uno o più fluorofori dall'autofluorescenza del tessuto;

Analizzare immagini fluorescenti quando viene usato più di un reporter nello stesso modello animale;

Acquisire immagini di reporter fluorescenti multipli simultaneamente, facilitando l'esplorazione di multipli esiti fisiologici in parallelo nello stesso animale.

*Cordiali saluti,*

PerkinElmer Italia S.p.A.

---