

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARA LA CONTRATACIÓN DEL SUMINISTRO DE UN MICROSCOPIO CONFOCAL DE SUPERRESOLUCIÓN STED CON FLIM INTEGRADO Y EXCITACIÓN LÁSER DE LUZ BLANCA PULSADA

I.- INTRODUCCIÓN

La Fundación Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona), es una fundación creada por la Generalitat de Catalunya, la Universitat de Barcelona (UB) y el Parque Científico de Barcelona (PCB), que tiene por objetivo contribuir a la mejora de la calidad de vida por medio de la aplicación de los avances en el ámbito de la ciencia biomédica básica y aplicada, y promover la investigación multidisciplinaria de excelencia en la interfaz entre la biología y la química, así como fomentar la colaboración entre las entidades locales y los institutos de investigación institucionales, impulsando y coordinando la investigación interdisciplinaria en biomedicina. El IRB Barcelona tiene condición de centro CERCA, reconocido por la Generalitat de Catalunya.

El IRB Barcelona, de acuerdo con sus objetivos, necesita implementar la tecnología de microscopía óptica de superresolución **STED** (“Stimulated Emission Depletion”) con detección **FLIM** (“Fluorescence Lifetime Microscopy”, o microscopía de tiempo de vida) integrada y **excitación LPLB (láser pulsado de luz blanca)**, para habilitar nuevas líneas de investigación basadas en obtener biomágenes 3D multiespectrales multicanales de microscopía óptica de super resolución en muestras biológicas (células y tejidos, viv-o/a-s o fijad-o/a-s) con hasta 50nm de resolución óptica con un mínimo de 4(cuatro) canales fluorescentes simultáneos en modalidad STED, permitiendo también recoger más canales de fluorescencia mediante microscopía confocal.

II.- OBJETO DE LA CONTRATACIÓN

El objeto del presente procedimiento es el suministro del sistema de adquisición de imágenes, en adelante, “**microscopio STED-FLIM-LPLB**”.

A efectos de mantener la integridad del contrato, así como la responsabilidad total de un único adjudicatario respecto de todas las obligaciones derivadas de esta contratación y atendiendo a los motivos de exclusividad debidamente acreditados en el expediente, no es posible la división en lotes del presente contrato.

Específicamente, estarán incluidos todos los servicios, provisiones y suministros que sean necesarios para la ejecución total y completa del contrato en los términos detallados, mientras no se especifique lo contrario en este pliego de prescripciones técnicas.

III.- REQUISITOS TÉCNICOS DE LA CONTRATACIÓN

El IRB Barcelona necessita adquirir un microscopio óptico:

- de tipo invertido,
- con sistema de control de temperatura y CO₂
- con módulo de depleción STED mediante 3 (tres) láseres de emisión continua o pulsada, destinados a inducir el confinamiento espacial de la fluorescencia.
- con módulo de excitación láser de luz blanca pulsada para fluorescencia, compatible con experimentos de conteo de tiempo de llegada de fotones individuales,
- con módulo FLIM permitiendo al análisis completo del tiempo de vida de fluorescencia, e integrado en la adquisición para explotar propiedades del tiempo de vida medio a fin de separar fluoróforos en base a su tiempo de vida o de mejorar la eficiencia de la modalidad STED.
- con ópticas (lentes objetivos) dedicadas a aplicaciones STED multicolor con correcciones de aberraciones ópticas que permitan la adquisición simultánea de mínimo 5 canales de fluorescencia en modalidad STED.
- con mesa antivibratoria
- con sistema de control de temperatura y CO₂

La oferta debe incluir y garantizar, con carácter de mínimos, las prestaciones y funcionales que se detallan a continuación, los cuales son obligatorios:

1. Requerimientos mínimos del suministro:

A continuación, se detallan los requisitos técnicos mínimos de cada módulo, hardware o software, que se deberán de ser incluidas en el sistema:

1.1 Microscopio de tipo invertido, totalmente motorizado, de campo claro y de fluorescencia:

- *Estativo*: El microscopio será de tipo invertido y deberá de contar con puertos ópticos que permitan visualización mediante oculares en fluorescencia y campo claro, y adquisición mediante i) barrido confocal y de super-resolución en fluorescencia y ii) campo claro mediante detector de luz transmitida.
- *Iluminación campo claro*: el sistema deberá de contar con un módulo de luz transmitida de tipo LED o similar.
- *Lentes Objetivos*: deberá de incluir objetivos compatibles con microscopía confocal con prestaciones mínimas similares a :
 - o 10x seco, con apertura numérica de mínimo 0,4
 - o 20x de inmersión en agua, con apertura numérica de mínimo 0,75
 - o 40x de inmersión tipo aceite, con apertura numérica de mínimo 1,3
 - o 60x de inmersión tipo aceite, con apertura numérica de mínimo 1,4

- *Excitación de fluorescencia:* deberá de incluir una fuente de fluorescencia basada en LEDs, o similar, controlable en intensidad y con espectro de excitación que alcance un rango espectral mínimo de 390-680nm.
- *Filtros de fluorescencia:* deberá de disponer de mínimo 3 sets de filtros de fluorescencia para inspección mediante oculares, adaptados a los siguientes típicos fluoróforos:
 - o DAPI, Hoeschst o similar, mediante emisión de tipo Bandpass.
 - o GFP, AlexaFluor488 o similar, mediante emisión Bandpass.
 - o RFP, TexasRed, AlexaFluor594 o similar, incluidos fluoróforos de espectro de emisión desplazados hacia el rojo lejano, mediante emisión Longpass.
- *Control de posicionamiento XYZ:* El sistema incluirá una platina motorizada en X-Y con velocidad de movimiento de mínimo 10mm/s y reproducibilidad inferior a 1µm. Incorporará un elemento de control de posicionamiento en Z adicional, de tipo galvanométrico o piezoeléctrico, con rango de trabajo de mínimo 1mm y un mínimo de reproducibilidad de posicionamiento de 40nm. Dicha platina contará con adaptadores para placas de petri, placas multipocillos y porta-objetos convencionales (e.g. lama de vidrio).
- *Sistema de auto-enfoque:* El sistema dispondrá de un módulo de auto-enfoque por hardware, mediante LED o láser, para mantener el posicionamiento de enfoque en Z automáticamente. También dispondrá de auto-enfoque software basado en procesamiento de imagen.

1.2 Módulo confocal de barrido láser de alta velocidad y alta resolución:

El microscopio incluirá un sistema de barrido láser de alta velocidad y resolución, para generar imágenes en modalidad confocal, STED y FLIM.

- **El módulo de excitación** incluirá las siguientes características mínimas:
 - Contar con una línea de excitación específica mediante diodo láser a 405nm,
 - Contar con múltiples Líneas de excitación láser seleccionables en un rango espectral continuo desde 440nm hasta 790nm, con precisión mínima de 1 nm, mediante fuente pulsada láser de luz blanca, permitiendo seleccionar hasta un mínimo de 350 líneas láser de excitación distintas en el rango espectral especificado.
 - Las líneas de luz blanca podrán seleccionarse de manera simultánea con hasta 8 líneas.
- **El módulo de barrido** incluirá las siguientes características mínimas:
 - El sistema de barrido trabajará a velocidad de hasta aproximadamente 10 imágenes por segundo en campo completo con resolución 512x512,
 - El sistema de barrido trabajará a una resolución de mínimo 8000x8000 pixeles en modalidad confocal y STED,
 - El zoom óptico de barrido tendrá límites inferior y superior de mínimo 1x y 40x respectivamente,

- El sistema de adquisición permitirá realizar escaneos secuenciales multidimensionales versátiles, en 6 dimensiones: X, Y, Z, Tiempo (repetición), Lambda (emisión) y Lambda (excitación).
- **El módulo de detección** incluirá las siguientes características mínimas:
 - El sistema de detección permitirá seleccionar intervalos de detección libremente ajustables entre 410 y 850nm, con intervalos entre 5 y 380nm y una precisión de hasta 1nm.
 - En fluorescencia y reflexión, un mínimo de 5 (cinco) detectores podrán usarse simultáneamente.
 - Un mínimo de dos detectores de los 5 mencionados tendrá alta eficiencia cuántica superior a 50%.
 - Todos los detectores de fluorescencia deberán de ofrecer el régimen de conteo de fotones.
 - Todos los detectores de fluorescencia deberán de ofrecer un control de ganancia independiente.
 - En luz transmitida, un detector adicional podrá usarse en combinación con los de fluorescencia en reflexión.

1.3 Módulo de super-resolución STED con 3 láseres de depleción y ópticas corregidas:

El sistema ofrecerá un módulo de super-resolución, o nanoscopía, basado en STED con las siguientes características mínimas:

- Incluirá un láser de depleción de emisión pulsante entorno a 775nm con potencia mínima de 1.5W,
- Incluirá un láser de depleción de emisión continua entorno a 660nm con potencia mínima de 1.5W,
- Incluirá un láser de depleción de emisión continua entorno a 592nm con potencia mínima de 1.5W,
- Objetivo corregido para STED: el microscopio dispondrá de un mínimo de un objetivo de alta resolución corregido especialmente para aplicaciones STED que permitirá mantener perfectamente coalineadas las líneas de depleción y las líneas de excitación, así como para efectuar el barrido simultáneo de hasta 3 láseres de depleción y 8 líneas de excitación. El aumento mínimo de dicho objetivo será de 90x, y permitirá trabajar a profundidades de hasta un mínimo de 250µm mediante corrección óptica motorizada para mantener las características óptimas de enfoque del patrón de depleción STED.
- Con la óptica mencionada, el sistema permitirá alcanzar resolución lateral XY inferior a 50nm, o axial inferior a 130nm.
- La detección STED será compatible con los detectores espectrales del sistema confocal, y se podrán usar un mínimo de 3 detectores simultáneamente.
- La excitación de los fluoróforos en modalidad STED será compatible con el módulo de excitación pulsada de luz blanca y con técnicas de caracterización de tiempo de vida.

1.4 Módulo de medición de tiempo de vida medio de fluoróforos en tiempo real.

1.4.1 El microscopio contará con un sistema de medición de tiempo de vida medio de los fluoróforos por pixel, con las siguientes características mínimas:

- Permitirá obtener y visualizar medidas del tiempo de vida medio de los fluoróforos simultáneamente en modalidad confocal y/o STED, en tiempo real sin necesidad de procesamiento por parte del usuario.
- Dichas medidas de tiempo de vida medio se obtendrán con cualquiera de las líneas de excitación del rango espectral extendido de la fuente de luz blanca pulsada, i.e. desde 440 hasta 790nm, dentro de los límites espectrales de los detectores previamente mencionados.
- Dichas medidas de tiempo de vida medio se obtendrán con un mínimo de dos de los detectores de la unidad confocal.
- Dichas medidas de tiempo de vida medio permitirán acceder a las siguientes opciones dedicadas a mejorar o procesar la imagen adquirida en tiempo real:
 - o Separar emisiones solapadas de distintas fuentes fluorescentes (i.e. fluoróforos) en base a diferencias en su tiempo de vida,
 - o Separar o eliminar fluorescencia no específica (e.g. autofluorescencia) mediante deferencia en tiempo de vida,
 - o Eliminar componentes de luz reflejada mediante el tiempo de vida.
 - o Usar ventanas personalizadas de tiempo de vida para filtrar el rango de detección, con un mínimo de 10 (diez) ventanas simultáneas.

1.4.2 El sistema deberá de ofrecer opciones integradas destinadas a mejorar el rendimiento de la modalidad STED mediante el uso de medición del tiempo de vida medio. Las mejoras consistirán en limitar la contribución a la imagen final de los fotones detectados en base a su tiempo de vida medio, a fin de:

- Mejorar la resolución de la imagen y reducir el ruido de fondo, extrayendo aquellos fotones cuyo tiempo de vida es máximo dentro del volumen de depleción de STED, y eliminando aquellos fotones cuyo tiempo de vida medio no correla con el patrón de variación de tiempo de vida inducido por el láser de depleción.
- Reducir la fototoxicidad y/o el “photobleaching” en experimentos con modalidad STED utilizando el mismo concepto de selección específica de los fotones detectados en base a su tiempo de vida medio, así como para permitir usar niveles de depleción STED inferiores y por tanto conseguir más imágenes (distribuidas en el tiempo o en 3D) y a la misma resolución comparado con experimentos de STED convencional sin el uso información de tiempo de vida.

1.4.3 En terminos del número de fluoróforos mínimos que podrán combinarse en un mismo experimento con modalidades combinadas confocal y STED, el sistema deberá de poder adquirir, conjuntamente y simultáneamente, un mínimo de 6 fluoróforos y separarles en canales independientes de manera automática, según esta distribución:

- Un mínimo de 2 fluoróforos mediante microscopía confocal de alta resolución,

- Un mínimo de 4 fluoróforos con resolución STED, de los cuales mínimo uno podrá ser espectralmente solapado con los otros y será separable por tiempo de vida.

1.5 Análisis del tiempo de vida FLIM mediante postprocesado.

El sistema permitirá el análisis del tiempo de vida de fluoróforos mediante dos métodos de postprocesamiento:

- Análisis estadístico del tiempo de vida en cada píxel de la imagen mediante fit matemático de tipo multiexponencial del tiempo de llegada.
- Análisis gráfico mediante el método “Phasor plot”.

1.6 Control de adquisición, estación de trabajo y super resolución basada en postprocesado.

El sistema contará con una interfaz de control que deberá de incluir al menos las siguientes características técnicas:

- Contará con un equipo informático de altas prestaciones, multiusuario y con monitor de al menos 31”, para efectuar la adquisición automatizada, las opciones de procesado y las herramientas de visualización de todas las funciones anteriormente descritas.
- El equipo tendrá un panel de control digital configurable, adicional al panel del estativo del microscopio, para el control personalizado de varios parámetros de adquisición.
- El software de control del equipo permitirá explorar muestras mediante navegador adaptados para mosaicos o multiposiciones.
- El software de adquisición permitirá reconstruir y visualizar los resultados adquiridos en 2D y en 3D.
- El software del sistema permitirá reconstruir y visualizar adquisiciones de tipo mosaicos de imágenes de varios campos.
- El software de adquisición permitirá reconstruir imágenes de muestras con multiples fluoróforos mediante separación espectral.
- El software de adquisición tendrá un módulo específico para operar y analizar experimentos de FRAP (i.e. “Fluorescence Recovery After Photobleaching”)

1.7 Mesa óptica y sistema de incubación

El sistema deberá de ser instalado encima de una mesa antivibratoria activa, incluida, con control automático de mantenimiento de presión mediante aire comprimido, de dimensiones máximas de 1.2x1.5m (Ancho x Largo).

El sistema debe de disponer de una cámara de incubación de control ambiental (Temperatura y CO2) con controles digitales. Dicha cámara será de formato grande de manera que el volumen controlado por temperatura englobe toda la platina motorizada XYZ

más allá de sus límites de movimientos XY. El control de CO₂ será efectivo con el uso de placas de petri y placas multipocillos para ensayos en células vivas.

2. Instalación y ejecución

Transporte, desembalaje, instalación y conexión en ubicación final durante el mismo día incluida, así como la formación necesaria para el correcto funcionamiento del equipo al personal TÉCNICO del IRB.

La formación ofertada no podrá ser inferior a 7 días laborables y tendrá que ser impartida por LEICA MICROSISTEMAS S.L.U. y/o especialistas de LEICA MICROSYSTEMS GmbH, por las funcionalidades base del equipo y por los protocolos avanzados de adquisición y análisis de imagen.

3. Plazo de entrega

La fecha límite de entrega del equipo será de 60 días a partir de la formalización del contrato. Una vez realizada la entrega del equipo, se dispondrá de una semana adicional para la instalación del mismo.

4. Garantía

El equipo deberá disponer de un plazo de garantía que será mínimo de 4 años, a contar desde la instalación del mismo, y estarán incluidos todos los conceptos y actuaciones necesarias para su correcto funcionamiento y la resolución de las eventuales incidencias en que pueda incurrir en el equipo derivados de su uso y normal funcionamiento así como cualquier imprevisto en los mismos), recambios, mano de obra, transportes, desplazamientos, etc.

El adjudicatario responderá de la correcta prestación de los servicios incluidos en esta garantía y durante su vigencia, con la garantía definitiva depositada al momento de la adjudicación del contrato.

5. Documentación técnica



El contratista tendrá que presentar con la oferta técnica un documento con la descripción técnica detallada de las características del equipo ofertado.

Se tendrá que aportar la declaración responsable del fabricante certificando que las equipaciones propuestas cumplen con todos los requerimientos técnicos y los indicados en los criterios de valoración técnica, así como el cumplimiento de seguridad de organismos internacionales.

El sistema se entregará con una cantidad suficiente de los fungibles esenciales para su funcionamiento así como para efectuar la instalación, puesta en marcha y funcionamiento hasta el último día de formación del personal de la facility, la fecha de la cual será determinada después de la adjudicación de esta contratación. Los fungibles incluyen, por ejemplo, aceites de inmersión, fusibles eléctricos, etc...

Barcelona, 6 de Junio de 2023

Julien Colombelli
ADM Facility Manager (Responsable tècnic de la contractació / del contracte)
Fundació Institut de Recerca Biomèdica (IRB Barcelona)