

## **Avviso indagine di mercato per l'acquisto di un "Microscopio Raman confocale con altissima sensibilità e altissima risoluzione spaziale e spettrale"**

### **- Allegato tecnico**

Il DISAT – Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia - intende procedere all'acquisto di un microscopio Raman confocale con altissima sensibilità e altissima risoluzione spaziale e spettrale, necessario per lo svolgimento delle attività di ricerca descritte nei WP2, WP3, e WP4 del progetto "ERC, ANFIBIO".

#### **1. FINALITA' DELLA RICERCA**

Il rilevamento di biomarcatori di malattia circolanti nei fluidi corporei, noto anche come biopsia liquida, ha fatto passi importanti verso l'implementazione della medicina personalizzata. Tuttavia, soffre ancora di bassa sensibilità e costi elevati, che rendono la sua implementazione clinica non pratica o conveniente. In particolare, l'identificazione e la quantificazione dei biomarcatori oligonucleotidici è ostacolata dalla necessità di impiegare strumenti di sequenziamento che sono costosi, richiedono personale altamente qualificato e sono soggetti a errori. Tuttavia, le recenti scoperte cliniche che dimostrano l'importanza del rilevamento di biomarcatori tumorali o virali per la suscettibilità, l'insorgenza e aggressività della malattia, motivano la necessità di ulteriori ricerche che potrebbero rendere la loro rilevazione più semplice, meno costosa e quindi più ampiamente disponibile.

Sfruttando l'intrinseca capacità di amplificazione del surface enhanced Raman scattering (SERS), la ricerca affronterà i problemi di bassa sensibilità e costi elevati intrinseci ai metodi di sequenziamento tradizionali combinando nanoparticelle plasmoniche sintetizzate *ad hoc* per massimizzare l'amplificazione del segnale SERS diretto e strumenti di apprendimento automatico per l'analisi rapida delle complesse risposte spettrali ottenute dallo screening dei fluidi corporei per specifici biomarcatori target. La ricerca si concentrerà in particolare sul DNA del cancro alla prostata (PCa) e l'RNA virale dell'influenza A (IAV) nel sangue, nelle urine e nella saliva, per quantificare e correlare le loro quantità a quelle rilevate nei tessuti e nelle cellule.

Al completamento, il lavoro proposto fornirà una tecnologia di rilevamento innovativa in grado di rilevare e quantificare i biomarcatori cancerogeni e virali nei fluidi corporei, con un minimo pretrattamento del campione, nessuna amplificazione, e che utilizza SERS come meccanismo nuovo e affidabile di trasduzione con evidenti vantaggi rispetto a quelli attualmente impiegati.

#### **2. ESIGENZE**

Per raggiungere gli obiettivi di ricerca sopra descritti, il DISAT intende dotarsi di un Microscopio Raman confocale con altissima sensibilità e altissima risoluzione spaziale e spettrale:

- che sia in grado di raccogliere segnali intensi con tempi di acquisizione limitati, in modo da consentire di accumulare un numero estremamente elevato di acquisizioni e, di conseguenza, eseguire *training*, *testing*, e *validation* adeguati degli algoritmi di machine learning che verranno utilizzati per interpretare i dati;
- In aggiunta all'*high throughput*, le misure dovranno possedere risoluzione spettrale estremamente elevata, in considerazione del fatto che il progetto si basa interamente sulla possibilità di misurare ed interpretare shift spettrali nelle bande Raman dei nucleotidi analizzati e determinarne, di conseguenza, l'intorno chimico, alla stregua di quanto possibile con spettri NMR;

- che consenta di ottenere una risoluzione spaziale estremamente elevata, in considerazione del fatto che nella parte clinica del progetto dovranno essere analizzati campioni di cellule e tessuti umani, i quali possono essere accuratamente testati solo in modalità di mappatura, data la loro intrinseca eterogeneità.

### 3. CARATTERISTICHE GENERALI E SPECIFICHE TECNICHE

Considerate le esigenze sopra descritte, sono state identificate le **caratteristiche generali e le specifiche tecniche** del Microscopio Raman confocale con altissima sensibilità e altissima risoluzione spaziale e spettrale. Più in dettaglio:

#### 1) Caratteristiche generali del sistema

- Efficienza e sensibilità.** Per garantire la migliore efficienza sia nel visibile (VIS) che nel vicino infrarosso (NIR) e per consentire misure di Confocal Raman Imaging ad altissima sensibilità e altissima velocità, lo strumento deve essere dotato di due sistemi di acquisizione del segnale paralleli e indipendenti, ciascuno composto da uno spettrometro e un rivelatore CCD con le specifiche minime descritte nel presente documento. Non saranno accettate soluzioni basate su un singolo spettrometro, anche se dotato di due diversi rivelatori. Ulteriori requisiti e specifiche minime riguardanti gli spettrometri e i rivelatori sono descritti nel seguito.
- Misure disponibili.** Il sistema deve essere in grado di acquisire misure di Microscopia Raman Confocale 3D ad altissima risoluzione spettrale e spaziale allo stesso tempo. Il sistema deve essere in grado di operare nelle seguenti modalità di misurazione:
  - Misura Raman a punto singolo (acquisizione di spettri Raman su punti selezionati della superficie del campione);
  - Imaging Raman 2D (X-Y e X/Y-Z) e Imaging Raman 3D;
- Risoluzione spaziale.** La risoluzione spaziale richiesta in modalità Imaging (raster-scanning del campione) deve essere limitata solo dalla diffrazione ottica. In particolare, il sistema deve mostrare una risoluzione laterale FWHM < 350 nm utilizzando un laser di eccitazione 532 nm e un obiettivo ottico 100X, 0.9NA su strutture Raman attive con dimensioni laterali di nm. Per dimostrare tale risoluzione sarà richiesta una misura su nanotubi di carbonio isolati. Un profilo di profondità 1D con risoluzione assiale Z FWHM < 900 nm utilizzando un laser di eccitazione a 532 nm e un obiettivo ottico 100X, 0.9NA su strutture Raman attive con larghezza verticale nanometrica. Per dimostrare tale risoluzione sarà richiesta una misura su uno strato di grafene e/o grafite ultrasottile sospeso su un pattern di silicio.
- Risoluzione spettrale.** La risoluzione spettrale richiesta (risoluzione in pixel) deve essere < 0,1 cm<sup>-1</sup>/px a 2000 cm<sup>-1</sup>; circa 0,21 cm<sup>-1</sup>/px a 500 cm<sup>-1</sup> con eccitazione laser verde (532 nm) e utilizzando una delle combinazioni spettrometro/griglia incluse nella configurazione.
- Alta sensibilità/alto rendimento simultaneo e alta confocalità/risoluzione.** Per dimostrare l'alta sensibilità e l'alta confocalità è necessario un test sul silicio: il sistema nella configurazione proposta deve essere in grado di rilevare il picco del 4° ordine del silicio e il picco dell'N<sub>2</sub> ambientale non deve superare il picco del 4° ordine del silicio.

**Come previsto al par. 3, lett. C) dell'avviso, in riferimento alle lettere c), d) ed e) del presente elenco puntato, è richiesta una dimostrazione del corretto funzionamento del sistema proposto; in particolare, attraverso copie di test/prove eseguite dovrà essere dimostrato che il sistema proposto possiede i requisiti di "Risoluzione spaziale", "Risoluzione spettrale", "Alta sensibilità/alto rendimento simultaneo e alta confocalità/risoluzione" richiesti dalle specifiche tecniche della fornitura in oggetto.**

**Con particolare riferimento alla risoluzione spettrale è inoltre richiesta durante il test di installazione una prova di misurazione, il cui esito positivo è condizione necessaria per l'accettazione della fornitura.**

- f) **Velocità di acquisizione.** Il sistema deve raggiungere la massima velocità di acquisizione degli spettri anche durante le mappe 2D/3D (e non solo in modalità di acquisizione a singolo spettro). In particolare, deve essere possibile acquisire spettri con < 1 ms di tempo di integrazione nel visibile (eccitazione con  $\lambda = 532$  nm), durante una mappa 2D/3D con un rapporto segnale/rumore abbastanza buono da distinguere chiaramente i picchi Raman rilevanti e poter ottenere un'immagine Raman ad alta risoluzione.
- g) **Dimensioni e modularità.** A causa di una limitazione dello spazio del laboratorio è richiesto che il sistema abbia un ingombro massimo di 80 x 80 cm includendo tutti i componenti (spettrometri, laser, controller, etc.) escluso solo il monitor di visualizzazione. La configurazione deve essere modulare, con la possibilità di cambiare la posizione relativa dei componenti principali (microscopio ottico, laser, spettrometro) in modo arbitrario senza la necessità di eseguire procedure di allineamento ottico dopo lo spostamento. È richiesta un'ampia modularità e flessibilità in termini di sorgenti laser e spettrometri che possono essere aggiunti al sistema durante la vita dello stesso; gli add-on non devono incidere sull'ingombro massimo di 80 x 80 cm (il fornitore deve fornire il disegno tecnico e i dettagli relativi al layout dello strumento completo).

**2) Specifiche tecniche del microscopio ottico.** Il Microscopio ottico di grado scientifico con percorso ottico diretto deve possedere le seguenti specifiche minime:

- a) Torretta a 6 posizioni che permette di installare fino a 6 obiettivi;
- b) Set di 4 obiettivi con alta trasmissione ottica nell'intera gamma spettrale da 360 nm a 1000 nm, con le seguenti specifiche: i) 10X, NA almeno 0,25, compatibile con il campo scuro; ii) 50X, NA almeno 0,80, compatibile con il campo scuro; iii) 100X, NA almeno 0,90; iv) 63X, immersione in acqua, NA almeno 0,9;
- c) Illuminazione Koehler dall'alto con sorgente luminosa a LED;
- d) Illuminazione in campo scuro;
- e) Videocamera digitale;
- f) Movimento Z motorizzato della torretta completa del microscopio, controllato via software con una gamma di almeno 30 mm e passi di 10 nm;
- g) Fase X-Y motorizzata, controllata da software, con almeno 50 x 50 mm e passi di 100nm;
- h) Sistema autofocus;
- i) Sistema "Focus stacking" che permette una focalizzazione a lunga profondità in luce bianca;
- j) Sistema di calibrazione spettrale basato su una lampada Ar/Hg, controllato via software;
- k) Tavolo ottico antivibrante con dimensioni massime di 80 x 80 cm in X-Y.

### **3. SORGENTI DI ECCITAZIONE LASER**

Tre sorgenti laser devono essere integrate nel sistema, due nella gamma visibile e una nella gamma del vicino infrarosso, ognuna delle quali deve essere dotata di filtri Raman di tipo edge ad alta efficienza e deve rispettare le specifiche descritte nel seguito.

- a) **Specifiche generali per tutte le sorgenti laser**

- Deve essere possibile passare da una sorgente all'altra semplicemente ruotando una ruota portafiltro o un selettore (manualmente o via software) senza bisogno di fare alcuna procedura di allineamento ottico;
  - Tutti i laser devono essere dotati di un'attenuazione della potenza del laser controllata dal software con una precisione di 0,1 mW che deve coprire l'intera gamma di potenza del laser. Le impostazioni di potenza sono registrate in ogni set di dati, mentre il laser funziona a potenza costante per migliorare la durata e la stabilità;
  - Tutti i laser devono essere dotati di una funzione di spegnimento automatico alla fine della misurazione senza l'intervento dell'utente.
- b) **Specifiche della prima sorgente laser (gamma visibile)**
- Laser a stato solido con eccitazione a  $\lambda = 532$  nm
  - Modo singolo
  - Potenza in uscita di almeno 75 mW
  - Laser classe 3B
  - Filtro Raman di tipo Edge incluso che permette la rilevazione da 90  $\text{rel cm}^{-1}$
- c) **Specifiche della seconda sorgente laser (gamma visibile)**
- Laser a stato solido con eccitazione a  $\lambda = 633$  nm
  - Modo singolo
  - Potenza in uscita di almeno 50 mW
  - Laser classe 3B
  - Filtro Raman di tipo Edge incluso che permette la rilevazione da 80  $\text{rel cm}^{-1}$
- d) **Specifiche della terza sorgente laser (Near Infrared)**
- Laser a stato solido con eccitazione a  $\lambda = 785$  nm
  - Modo singolo
  - Potenza in uscita di almeno 300 mW
  - Laser classe 3B
  - Filtro Raman di tipo Edge incluso che permette la rilevazione da 70  $\text{rel cm}^{-1}$

#### 4. SPETTROMETRI E RILEVATORI

Il sistema deve essere dotato di **due sistemi indipendenti per la dispersione e l'acquisizione del segnale** ciascuno composto da uno spettrografo ad alta efficienza, con geometria di trasmissione e non di riflessione (utilizzando lenti e non utilizzando specchi) e da un rivelatore CCD di tipo retroilluminato ad alta efficienza quantica. Entrambi i sistemi spettrometro/rivelatore devono essere collegati allo strumento principale e deve essere possibile passare dall'uno all'altro semplicemente per mezzo di un selettore (manualmente o via software) senza la necessità di alcun allineamento ottico. Più precisamente, i sistemi devono rispettare le specifiche descritte nel seguito.

a) **Specifiche del primo sistema spettrometro/rivelatore**  
**Spettrometro 1**

- Lunghezza focale almeno 600 mm;
- Trasmissione ottimizzata nella gamma spettrale visibile (VIS); almeno il 60% di rendimento nella gamma 450 - 750 nm;
- Torretta motorizzata controllata da software per la selezione del reticolo, dotata di 3 reticoli, un reticolo da 300 l/mm (bruciato a 500 nm), uno da 1800 l/mm (bruciato a 500 nm) e uno da 2400 l/mm (bruciato a 500 nm).

**Rivelatore 1**

- Rivelatore EM-CCD retroilluminato ultrasensibile con rivestimento AR ottimizzato per il VIS;
- Almeno 1600 x 200 pixel;

- Efficienza quantica > 90% (a 500 nm);
  - Velocità di acquisizione di almeno 1300 spettri/s;
  - Raffreddamento Peltier < - 60°C.
- b) **Specifiche del secondo sistema spettrometro/rivelatore**
- Spettrometro 2**
- Lunghezza focale almeno 400 mm;
  - Trasmissione ottimizzata nella gamma spettrale del vicino infrarosso (NIR): almeno il 60% di rendimento nella gamma 700 - 1000 nm;
  - Torretta motorizzata controllata da software per la selezione del reticolo, dotata di almeno 2 reticoli, un reticolo da 300 l/mm (bruciato a 750nm) e uno da 1200 l/mm (bruciato a 750 nm);
  - Possibilità di aggiungere una terza griglia.
- Rilevatore 2**
- Rilevatore CCD a esaurimento profondo retroilluminato ultrasensibile con rivestimento AR ottimizzato per il NIR;
  - Almeno 1024 x 127 pixel;
  - Efficienza quantica  $\geq$  95% (a 800 nm);
  - Velocità di acquisizione di almeno 80 spettri/s;
  - Raffreddamento Peltier < - 60°C.

## 5. SPECIFICHE DEL SOFTWARE.

- a) Un unico software per il controllo del sistema e l'analisi dei dati per tutte le tecniche disponibili, inclusi gli upgrade per 24 mesi decorrenti dalla verifica di conformità;
- b) Visualizzazione ed elaborazione on-line dei dati (media linea per linea, sottrazione dello sfondo, etc.);
- c) Post-elaborazione dei dati;
- d) Ampia selezione di filtri e algoritmi preconfigurati per l'elaborazione dei dati (sottrazione del fondo, soppressione dei raggi cosmici, etc.) possono essere applicati all'intero set di misure 2D e 3D;
- e) Rappresentazione con codice colore di 2D e 3D di qualsiasi file immagine (Raman, topografia, etc.);
- f) Possibilità di sovrapporre le immagini acquisite con diverse modalità di misurazione (microscopia ottica in campo chiaro, Raman, topografia);
- g) Possibilità di esportare gli spettri Raman in banche dati per l'identificazione dei componenti chimici;
- h) Possibilità di esportare tutti i file di dati in formato ASCII;
- i) Modalità di analisi avanzate per il Raman Imaging:
  - Analisi dei cluster
  - Analisi delle componenti principali (PCA)
  - Fattorizzazione di matrice non negativa (NMF)
  - Funzioni avanzate di adattamento su singoli spettri o set di dati 2D/3D.

## 6. COMPONENTI ACCESSORI

Nell'oggetto della fornitura è compreso:

- a) Un PC di ultima generazione con un monitor abbastanza ampio da ospitare simultaneamente tutte le finestre del software applicativo;
- b) Criostato per microscopia confocale, stadio di riscaldamento e congelamento da -196°C a 600°C. Più precisamente:
  - Riscaldamento fino a 130°C/min
  - Stabilità di temperatura <0,1°C
  - 16 mm di manipolazione del campione X,Y

- Area campione 22 mm di diametro
- Camera a tenuta di gas per il controllo atmosferico
- Corpo stadio raffreddato ad acqua per lavoro ad alta temperatura (>300°C)
- Deve essere adatto per microscopia confocale e laser Raman

Da ultimo, si precisa che l'attrezzatura deve essere nuova di fabbrica, mai usata, ed essere provvista di garanzia legale di 24 mesi.

L'attrezzatura deve essere consegnata e installata presso il Centro Interdipartimentale Polito Biomedlab dove verrà sottoposta a verifica di conformità per accertarne il buon funzionamento.

Inoltre, è richiesta al fornitore dell'attrezzatura **un training** completo sulle modalità di utilizzo della stessa per la durata di 3 giorni e per 3 addetti. Il training comprenderà un'ulteriore formazione avanzata per la durata di 2 giorni e per 3 addetti, su richiesta della Stazione appaltante entro 12 mesi dalla data del training iniziale.

\*\*\*

### **Technical specifications for the purchase of a “Confocal Raman microscope with high sensitivity and high spectral and spatial resolution”**

The Department of Applied Science and Technology (DISAT) intends to proceed with the acquisition of a Raman microscope with extremely high sensitivity and spatial and spectral resolution, necessary to achieve the proposed objectives of the research activities described in WP2, WP3, and WP4 of the ERC project “ANFIBIO”.

#### **1. RESEARCH OBJECTIVES**

The detection of circulating disease biomarkers in bodily fluids, also known as liquid biopsy, has taken important strides toward the implementation of personalized medicine. However, it still suffers from low sensitivity and high costs, which render its clinical implementation not practical or affordable. In particular, the identification and quantification of oligonucleotide biomarkers is hampered by the need to employ sequencing tools that are expensive, require highly trained personnel, and are prone to error. Nonetheless, the recent clinical breakthroughs demonstrating the importance of detecting cancerous or viral biomarker to susceptibility, onset, and aggressiveness of the disease, motivate the need for further research that could render their detection simpler, cheaper, and thus more widely available.

By leveraging the intrinsic amplification capability of surface enhanced Raman scattering (SERS), the research will address the issues of low sensitivity and high costs by combining plasmonic nanoparticles synthesized ad hoc to maximize SERS signal amplification with direct SERS sensing and machine learning tools for the rapid analysis of the complex spectral responses obtained by screening bodily fluids for specific target biomarkers. It will focus in particular on prostate cancer (PCa) DNA and influenza A viral (IAV) RNA in blood, urine, and saliva, to quantify and correlate their amounts to those detected in tissues and cells.

At completion, the proposed work will deliver a breakthrough sensing technology capable of detecting and quantifying cancerous and viral biomarkers in bodily fluids, with minimal sample pretreatment, no target amplification, and that uses SERS as novel and reliable transduction mechanism with distinct advantages over those currently employed.

There is therefore the need to acquire a Confocal Raman microscope with very high sensitivity and very high spatial and spectral resolution type equipment that meets the requirements described below:

### 1) General system characteristics

- a) **Efficiency and sensitivity.** In order to guarantee the best efficiency both in the visible (VIS) and in the near infrared (NIR) and to allow Confocal Raman Imaging measurements at very high sensitivity and very high speed, a system equipped with two parallel and independent signal acquisition systems, each consisting of a spectrometer and a CCD detector with the minimum specifications described in section 5, is required. Solutions based on a single spectrometer, even if equipped with two different detectors, will not be accepted. Further requirements and minimum specifications concerning spectrometers and detectors will be described in section 4.
- b) **Available measurements.** The system shall be able to acquire 3D Confocal Raman Microscopy measurements with very high spectral and spatial resolution at the same time. The system shall be able to operate in the following measurement modes:
  - i. Single point Raman measurement (acquisition of Raman spectra at selected points on the sample surface);
  - ii. 2D Raman Imaging (X-Y and X/Y-Z) and 3D Raman Imaging;
- c) **Spatial Resolution.** The required spatial resolution in Imaging mode (raster-scanning of the sample) should only be limited by optical diffraction. In particular, it must be possible to show a lateral resolution FWHM < 350 nm using a 532 nm excitation laser and a 100X, 0.9NA optical objective on active Raman structures with lateral dimensions of nm. A measurement on isolated carbon nanotubes will be required to demonstrate this resolution. A 1D depth profile with axial Z resolution FWHM < 900 nm using a 532 nm excitation laser and a 100X, 0.9NA optical objective on active Raman structures with nanometer vertical width. A measurement on an ultrathin graphene and/or graphite layer suspended on a silicon pattern will be required to demonstrate this resolution.
- d) **Spectral resolution.** The required spectral resolution (pixel resolution) must be < 0.1  $\text{cm}^{-1}/\text{px}$  at 2000  $\text{cm}^{-1}$ ; approximately 0.21  $\text{cm}^{-1}/\text{px}$  at 500  $\text{cm}^{-1}$  with green (532nm) laser excitation and using one of the spectrometer/grid combinations included in the setup.
- e) **Simultaneous high sensitivity/high throughput and high confocal/resolution.** To demonstrate the high sensitivity and high confocality, a silicon test is required: the system in the proposed configuration must be able to detect the 4th order silicon peak and the ambient N2 peak must not exceed the 4th order silicon peak.

**As described in paragraph 3 C) of this notice, with respect to points c), d), and e) of this list, it is required a demonstration of the correct functioning of the proposed equipment; in particular, by showing the results of additional prior tests run onto the equipment, it will have to be demonstrated that it possesses the required "Spatial Resolution", "Spectral Resolution", "High sensitivity/High Throughput and High Confocality/High Resolution". With respect to spectral resolution, it is further requested that, during conformity testing at installation, a series of measurements is carried out to assess it; the positive outcomes of these tests are a necessary condition for acceptance of the goods.**
- f) **Acquisition speed** the system must reach the maximum acquisition speed of the spectra also during 2D/3D maps (and not only in single spectrum acquisition mode). In particular it must be possible to acquire spectra with < 1 ms integration time in the

visible (excitation with  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ), during a 2D/3D map with a signal-to-noise ratio good enough to clearly distinguish the relevant Raman peaks and to obtain a high-resolution Raman image.

- g) **Dimensions and modularity** Due to a space limitation in the laboratory, the system must have a maximum footprint of 80 x 80 cm including all components (spectrometers, laser, controller, etc.) excluding only the display monitor. The configuration must be modular, with the possibility to change the relative position of the main components (optical microscope, laser, spectrometer) arbitrarily without the need to perform optical alignment procedures after the move. A wide modularity and flexibility is required in terms of laser sources and spectrometers that can be added to the system during its life; the add-ons shall not affect the maximum footprint of 80 x 80 cm (the supplier shall provide the technical drawing and details of the complete instrument layout).

**2) Optical Microscope Specifications.** Scientific grade optical microscope with direct optical path with the following minimum specifications:

- a) 6-position turret that allows you to install up to 6 lenses;
  - i. Set of 4 objectives with high optical transmission over the entire spectral range from 360 nm to 1000 nm, with the following specifications: i) 10X, NA at least 0.25, dark field compatible; ii) 50X, NA at least 0.80, dark field compatible; iii) 100X, NA at least 0.90; iv) 63X, water immersion, NA at least 0.9;
- b) Koehler lighting from above with LED light source;
- c) Darkfield illumination;
- d) Digital camera;
- e) Motorized Z-motion of the complete microscope turret, controlled by software with a range of at least 30 mm and 10 nm steps;
- f) Software-controlled motorized X-Y phase with at least 50 x 50 mm and 100nm steps;
- g) Autofocus system;
- h) Focus stacking system that allows long depth focusing in white light;
- i) Spectral calibration system based on an Ar/Hg lamp, controlled by software;
- j) Optical table with maximum dimensions of 80 x 80 cm in X-Y.

**3) Laser excitation sources** Three laser sources shall be integrated into the system, two in the visible range and one in the near-infrared range, each of which shall be equipped with high-efficiency edge-type Raman filters. More specifically, it has to comply with the following technical specifications:

- a) **General specifications for all laser sources.** It shall be possible to switch from one source to another simply by rotating a filter wheel or selector (manually or via software) without having to do any optical alignment procedure; All lasers must have software-controlled laser power attenuation with an accuracy of 0.1 mW that must cover the entire laser power range. Power settings are recorded in each data set while the laser operates at constant power to improve durability and stability; All lasers must be equipped with an automatic shut-off function at the end of the
- b) **Specifications of the first laser source (visible range)**
  - Solid state laser with excitation at  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ;
  - Single mode; Output power of at least 75 mW;
  - Laser class 3B;
  - Edge-type Raman filter included that allows detection from 90 rel  $\text{cm}^{-1}$ ;
  - measurement without user intervention.
- c) **Specifications of the second laser source (visible range):**
  - Solid state laser with excitation at  $\lambda = 633 \text{ nm}$
  - Single mode



- Output power of at least 50 mW
  - Laser class 3B
  - Edge-type Raman filter included that allows detection from 80 rel cm-1
- d) **Specifications of the third laser source (Near Infrared)**
- Solid-state laser with excitation at  $\lambda = 785$  nm
  - Single mode
  - Output power of at least 300 mW
  - Laser class 3B
  - Edge-type Raman filter included that allows detection from 70 rel cm-1

**4) Spectrometers and detectors.** The system shall be equipped with **two independent systems for signal dispersion and acquisition**, each consisting of a high-efficiency spectrograph with transmission geometry and not reflection geometry (using lenses and not using mirrors) and a CCD detector of the back-illuminated type with high quantum efficiency. Both spectrometer/detector systems shall be connected to the main instrument and it shall be possible to switch from one to the other simply by means of a selector (manually or via software) without the need for any optical alignment. More specifically, it has to comply with the following technical specifications:

**a. Specifications of the first spectrometer/detector system**

**Spectrometer 1**

- Focal length at least 600 mm;
- Optimized transmission in the visible spectral range (VIS): at least 60% efficiency in the range 450 - 750 nm;
- Software-controlled motorized turret for graticule selection, equipped with 3 graticules, one 300 l/mm graticule (burnt at 500 nm), one 1800 l/mm graticule (burnt at 500 nm) and one 2400 l/mm graticule (burnt at 500 nm).

**Detector 1**

- Ultra-sensitive backlit EM-CCD detector with VIS-optimized AR coating;
- At least 1600 x 200 pixels;
- Quantum efficiency > 90% (at 500 nm);
- Acquisition speed of at least 1300 spectra/s;
- Peltier cooling < -60°C.

**b. Specifications of the second spectrometer/detector system**

**Spectrometer 2**

- Focal length at least 400 mm;
- Optimized transmission in the near-infrared spectral range (NIR): at least 60% efficiency in the 700 - 1000 nm range;
- Software-controlled motorized turret for reticle selection, equipped with at least 2 reticles, a 300 l/mm reticle (burned at 750nm) and a 1200 l/mm reticle (burned at 750nm);
- Possibility of adding a third grid.

**Detector 2**

- Ultra-sensitive backlit deep depletion CCD detector with AR coating optimized for NIR;
- At least 1024 x 127 pixels;
- Quantum efficiency  $\geq 95\%$  (at 800 nm);
- Acquisition speed of at least 80 spectra/s;
- Peltier cooling < -60°C.

**5) Software specifications**

- a) One software for system control and data analysis for all available techniques, including its upgrades for 24 months from the date of conformity verification;
- b) On-line data visualization and processing (line-by-line averaging, background subtraction... );
- c) Post-processing of data;
- d) Wide selection of filters and preconfigured algorithms for data processing (background subtraction, cosmic ray suppression, etc...) can be applied to the whole set of 2D and 3D measurements;
- e) Color-coded representation of 2D and 3D of any image file (Raman, topography, etc.);
- f) Possibility to superimpose the images acquired with different measurement modes (bright field optical microscopy, Raman, topography);
- g) Ability to export Raman spectra to databases for chemical component identification;
- h) Ability to export all data files in ASCII format;
- i) Advanced analysis modes for Raman Imaging:
  - Cluster analysis
  - Principal Component Analysis (PCA)
  - Non-Negative Matrix Factorization (NMF)
  - Advanced fitting functions on single spectra or 2D/3D data sets

**6) Accessories and additional features**

- a) State-of-the-art PC with a display monitor wide enough to simultaneously accommodate all the application software window
- b) Cryostat for confocal microscopy, heating and freezing stage from -196°C to 600°C.  
More specifically:
  - Up to 130°C/min heating
  - Temperature stability <0.1°C
  - 16 mm X,Y sample manipulation
  - Sample area 22 mm diameter
  - Gas-tight chamber for atmospheric control
  - Water cooled stage body for high temperature work (>300°C)
  - Suitable for confocal and laser Raman microscopy

The equipment must be new from the factory and never used, and be covered by a legal guarantee of 24 months.

The equipment must be shipped and installed in the Interdepartmental Polito Biomedlab where it will be subjected to a compliance check to ensure its proper functionalities.

In addition, a complete 3-day training for 3 employees on the use of the equipment is required from the supplier at installation, and an additional advanced training (of at least 2 days) is required within 12 months from the date of the initial training.