



**Bambino Gesù**

OSPEDALE PEDIATRICO

**AREA DI RICERCA ONCOLOGIA E OFFICINA FARMACEUTICA**

**Responsabile dell'Unità di Terapia genica dei Tumori: Prof. Concetta Quintarelli**

**PNC - DD 931 del 6 giugno 2022. Avviso per la concessione di finanziamenti destinati ad iniziative di ricerca per tecnologie e percorsi innovativi in ambito sanitario e assistenziale D3 4 Health Digital Driven Diagnostics, prognostics and therapeutics for sustainable Health care –**

**CUP B53C22006140001**

Roma, 16 maggio 2025

**Oggetto: Relazione di infungibilità piattaforma trascrittomica composta di: n. 1 sistema Single Cell Chromium X; n. 1 sistema VISIUM CytAssist; n. 1 sistema Xenium**

Per la conduzione delle attività previste dal progetto “Driven Diagnostics, prognostics and therapeutics for sustainable Health care” è stata individuata la piattaforma di trascrittomica, prodotta da *10x Genomics* e distribuita in Italia esclusivamente da Euroclone Spa, composta dai seguenti sistemi:

- a) n. 1 sistema per analisi single cell *Chromium X*, per la separazione automatica di singole cellule in qualsiasi fase;
- b) n. 1 sistema VISIUM CytAssist, per l'espressione genica spaziale da sezioni fresche congelate o a tessuti FFPE archiviati in blocchi o pre-sezionati su vetrini standard;
- c) n. 1 sistema Xenium, per la profilazione spaziale *in situ* basata su immagini ad alta risoluzione che consente l'analisi dell'espressione simultanea di target di RNA (attualmente nell'ordine delle centinaia) all'interno della stessa sezione di tessuto.

Si riferisce un'infungibilità tecnica della strumentazione sopra elencata, ai sensi dell'art.76, comma 2 lett. b), punto 2 del Dlgs 36/2023, basata sulle seguenti motivazioni:

punto a)

il modello *Chromium X* sostituisce il modello *Chromium Controller* già in uso presso i Laboratori di Ricerca OPBG e in dismissione per mancanza di produzione di reagenti da parte del fabbricante *10x Genomics*. Il fabbricante ha dichiarato la piena interoperabilità con dati e risultati generati in precedenti esperimenti condotti con il precedente modello, assicurando coerenza e confrontabilità nei progetti longitudinali. L'adozione della piattaforma Chromium X è necessaria per garantire la continuità dei progetti di ricerca in corso: l'introduzione di soluzioni alternative richiederebbe una



**Bambino Gesù**

OSPEDALE PEDIATRICO

**AREA DI RICERCA ONCOLOGIA E OFFICINA FARMACEUTICA**

**Responsabile dell'Unità di Terapia genica dei Tumori: Prof. Concetta Quintarelli**

completa riprogettazione dei protocolli sperimentali e delle pipeline bioinformatiche, con tempi e costi non sostenibili.

punto b)

il modello VISIUM CytAssist è una tecnologia compatta in grado di processare fino a 2 sezioni di tessuto - fissati e conservati in paraffina (FFPE) anche microarray e/o fissati e conservati in OCT (inclusi tessuti freschi congelati in isopentano) - in parallelo, riducendo i tempi di analisi a meno di un'ora, impostando aree di cattura variabili per l'analisi (6.5 x 6.5 mm e 11 x 11 mm). L'analisi dei profili trascrittomici è compatibile con i protocolli di colorazione ematossilina/eosina (H&E) e immunofluorescenza (fino a 4 target in contemporanea), comprendo tutta la casistica di processamento impiegata per i campioni raccolti per la conduzione del progetto, compresi quelli lavorati in altri laboratori e inviati solo per l'analisi trascrittomica. La visualizzazione dei risultati è possibile mediante software proprietari (Space Ranger e Loupe Browser) che open source, consentendo un'ampia possibilità di sviluppo di pipeline customizzate per il progetto.

punto c)

il modello XENIUM è l'unico analizzatore sul mercato in grado di analizzare simultaneamente a livello subcellulare l'espressione di pannelli di geni e proteine, rilevando RNA e proteine all'interno di intere sezioni di tessuto combinando insieme una potente tecnologia ottica, di acquisizione dati e di decodifica per rilevare rapidamente centinaia di analiti con risoluzione subcellulare. Lo strumento è progettato per analizzare tessuti freschi congelati (FF) che fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), preliminarmente trattati con i kit 10x Genomics. Le sonde di DNA utilizzano la consolidata tecnologia "padlock" che presenta due regioni che si ibridano indipendentemente all'RNA bersaglio. Una volta avvenuto il riconoscimento della sonda al suo target, questa viene circolarizzata e sottoposta ad eventi di amplificazione. L'ibridazione di una sonda fluorescente rileva gli anticorpi con codice a barre del DNA per ciascuna proteina marcata nella sezione del tessuto: completato l'evento di ibridazione, i campioni possono venire inseriti nell'analizzatore Xenium (che ospita a due vetrini contemporaneamente con un'area di imaging pari a 12 x 24 mm) e le sonde di DNA amplificate enzimaticamente attaccate all'RNA sono legati con oligo fluorescenti, creando un segnale luminoso e facile da visualizzare grazie ad un elevato rapporto segnale-rumore dovuto all'amplificazione effettuata precedentemente. Il campione subisce cicli successivi di ibridazione, imaging e rimozione della sonda fluorescente. Una firma ottica specifica per ciascun gene viene quindi generata, consentendo l'identificazione del gene bersaglio. I confini cellulari vengono dedotti attraverso la segmentazione nucleare o identificati attraverso la cellula colorazione morfologica. Infine, le cellule vengono mappate sull'immagine e le



**Bambino Gesù**

OSPEDALE PEDIATRICO

**AREA DI RICERCA ONCOLOGIA E OFFICINA FARMACEUTICA**

**Responsabile dell'Unità di Terapia genica dei Tumori: Prof. Concetta Quintarelli**

trascrizioni e le proteine vengono assegnate alle cellule tramite software di analisi e deconvoluzione. È possibile rilevare fino a 400 trascritti di RNA con una risoluzione subcellulare, con una potenzialità di acquisizione fino a 1.000 analiti contemporaneamente a seconda della tipologia di pannello sviluppato, e di variare dinamicamente l'area di interesse durante l'analisi, per un'analisi mirata e personalizzata. Il throughput settimanale è di 12 sezioni di dimensioni 10 mm x 10 mm a settimana.

Lo strumento Xenium è uno strumento modulare che utilizza pannelli curati e validati dal produttore. Questi pannelli possono essere combinati e personalizzati con set di geni specifici, adattandosi alle esigenze del progetto, e analizzati mediante pipeline integrate in dotazione per l'analisi e la rianalisi dei dati. È possibile assegnare ogni trascritto o proteina rilevata a una cellula specifica e di annotare i tipi cellulari, utilizzando i pannelli genetici selezionati, per fornire informazioni dettagliate sulle caratteristiche e funzioni cellulari e di esportare i dati in formati standard, consentendo l'utilizzo di software di terze parti (inclusi strumenti open source, per la post-elaborazione) e la combinazione dei dati molecolari con la morfologia del tessuto sottostante.

*Firma*

Responsabile di UNITÀ DI RICERCA TERAPIA GENICA DEI TUMORI  
Responsabile di ' OPERATIVA SEMPLICE TERAPIE CELLULARI INNOVATIVE  
Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma