

**AREA DI RICERCA PEDIATRIA TRASLAZIONALE E GENETICA CLINICA**  
**Responsabile dell'Unità di Ricerca Malattie Neuromuscolari: dott. E. Bertini**

**Progetto: Ministero della Salute, Ex Direzione generale della ricerca ed innovazione in sanità, Dipartimento della prevenzione, della ricerca e delle emergenze sanitarie del Ministero della salute, Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (PNRR) Missione 6 - Componente 2 - Investimento 2.1 Valorizzazione E Potenziamento Della Ricerca Biomedica Del SSN finanziato dall'Unione europea – NextGenerationEU**

**CUP E83C24000770006**

Roma, 14 aprile 2025

**OGGETTO: Relazione di infungibilità prodotti MERCK LIFE SCIENCE SRL**

Materiale richiesto:

**1. MRCPRT010 Microcon®– 10kDa Centrifugal Filter Units**

I Microcon®- 10 kDa Centrifugal Filter Units sono dei concentratori con membrana di cellulosa rigenerata Ultracel® (a basso legame) a cut-off di 10 kDa, che permettono di trattenere in modo efficiente e veloce gli analiti (come le proteine) di peso molecolare maggiore di 10000 ed eliminare tutto ciò che ha peso molecolare inferiore con una centrifugata. I filtri centrifughi Microcon® permettono non solo un'efficiente concentrazione, ma anche un'efficiente desalinizzazione o scambio di tampone di campioni biologici acquosi grazie alle caratteristiche di basso assorbimento della membrana membrana Ultracel® e dei componenti del dispositivo. Grazie alla centrifuga di recupero invertita, si ottengono tassi di recupero elevate. I filtri permettono anche la digestione delle protein con enzimi proteolitici senza dover manipolare in modo eccessivo il campione e in ultimo di poter raccogliere i risultati della digestione con una centrifugata.

**2. D9163-5G DL-Dithiothreitol**

L'1,4-ditiotreitolo (DL-Dithiothreitol o DTT) è una sostanza chimica: il treo isomero del 2,3-diidrossi-1,4-ditolbutano e un isomero dell'1,4-ditioeritritolo. Il DTT è utilizzato in biologia molecolare e in biochimica per mantenere i gruppi sulfidrilici (-SH) allo stato ridotto e per la riduzione quantitativa dei gruppi disolfuro (-S-S-), processo necessario in applicazioni di analisi proteomiche accoppiate alla spettrometria di massa di tipo shotgun bottom-up. La sua utilità come agente riducente deriva dalla solubilità in acqua e dall'odore ridotto rispetto ad altri composti tiolici. Il DTT viene ossidato al disolfuro ciclico, garantendo così la riduzione di altri disolfuri in soluzione. La riduzione del disolfuro è completa in pochi minuti a pH 8.

**3. I1149-5G Iodoacetamide**

La iodoacetamide è una sostanza chimica comunemente utilizzata in proteomica, per la sua capacità di reagire con i gruppi tiolici (-SH) delle cisteine nelle proteine bloccandone i gruppi tiolici delle cisteine dopo una riduzione dei ponti disolfuro (carbamidometilazione dei residui di cisteina) e prevenendo la ricostituzione di questi legami. La reazione che svolge è la modificazione covalente dei gruppi tiolici delle cisteine, attraverso l'alchilazione dei residui di cisteina. La iodoacetamide reagisce con il gruppo tiolico libero (-SH) delle cisteine, formando un legame covalente con il carbonio dell'iodo (I), e creando un addotto carbamidometilico (-CH<sub>2</sub>-CO-NH<sub>2</sub>) sui residui di cisteina. Questo impedisce la formazione di ponti disolfuro (SS), stabilizzando le proteine e impedendo che queste interagiscano tra loro, mantenendo la struttura primaria in condizioni di riduzione. Questa reazione è necessaria per preparare le proteine per il successivo taglio da parte di enzimi come la tripsina, che non agisce su proteine con ponti disolfuro non ridotti. Dunque la iodoacetamide è importante nelle analisi proteomiche basate sulla spettrometria di massa, perché permette di studiare la struttura delle proteine e dei peptidi senza che questi si associno tra loro in modo non desiderato.

**4. L4509-100G Sodium dodecyl sulfate**

Il sodium dodecyl sulfate (SDS) è una sostanza chimica tensioattiva anionica. La sua struttura chimica è costituita da una lunga catena idrofobica (dodecilico) e un gruppo solfatato (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

che lo rende solubile in acqua e capace di interagire con molecole proteiche. Viene utilizzato nelle applicazioni di proteomica perchè denatura le proteine legandosi in modo non specifico ai loro gruppi idrofobici, distruggendo le strutture secondarie e terziarie delle proteine e rendendole lineari. Questo significa che le proteine perdono la loro conformazione tridimensionale naturale e diventano catene polipeptidiche lineari, facilitando l'analisi e la loro caratterizzazione.

**5. A6141-500G Ammonium bicarbonate**

L'ammonium bicarbonate (bicarbonato di ammonio,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) è un composto chimico utilizzato in proteomica nelle fase di digestione enzimatica delle protein. Il bicarbonato di ammonio, mantenendo il pH alcalino, è utile per creare condizioni in cui le proteine possano essere efficientemente scomponibili in peptidi più piccoli durante la digestione enzimatica (es. tripsina). Un pH troppo acido o troppo basico potrebbe compromettere l'attività enzimatica, mentre il bicarbonato di ammonio contribuisce a mantenere l'ambiente di digestione ottimale. Inoltre il bicarbonato di ammonio, essendo solubile in acqua, può essere usato per lavare o diluire le proteine, rimuovendo sali o contaminanti che potrebbero interferire con la digestione enzimatica o con la successiva analisi in spettrometria di massa.

**6. 4738292001 FastStart\_HiFi PCR System dNTP Pack (500U)**

Il FastStart\_HiFi PCR System dNTP Pack è un kit di reagenti necessario per poter analizzare i campioni biologici tramite sequenziamento di nuova generazione (NGS, metagenomica). Il kit comprende il sistema FastStart High Fidelity PCR e una soluzione pronta all'uso di nucleotidi di grado PCR (i quattro deossinucleotidi trifosfati dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Questi reagenti sono necessari per l'amplificazione del DNA, tramite reazione PCR, estratto da campioni complessi contenenti una grande varietà di organismi, come nel caso di ambienti naturali (terreni, acqua, suolo, intestino umano, etc.). Il sistema FastStart High Fidelity PCR è composto a sua volta da una miscela di una polimerasi ad alta fedeltà (HiFi) e di una proteina di correzione termostabile (che media l'attività di correzione, ma non svolge alcuna attività di polimerasi): questo sistema è stato progettato per amplificare il DNA in modo preciso, con una bassa probabilità di errore di incorporazione, e quindi utilizzato per ottenere una replica accurata del DNA target, processo particolarmente importante quando si lavora con DNA complesso e altamente diversificato come in metagenomica, poiché garantisce che la replicazione del DNA avvenga con un basso tasso di errori, cruciale per ottenere risultati affidabili nelle analisi downstream (come sequenziamento, assemblaggio e annotazione). Entrambe le proteine sono inattive al di sotto di  $+75^\circ\text{C}$  e vengono attivate riscaldando a  $+95^\circ\text{C}$  per due minuti. Il sistema è quindi ottimizzato per ridurre il tempo e le condizioni necessarie per amplificare il DNA, aumentando l'efficienza della PCR, un aspetto molto utile quando si lavora con campioni metagenomici complessi.

**7. 27232 Supelco Pk100 20mm Butyl Septa**

I tappi Supelco PK100 20mm Butyl Septa sono utilizzati in gas cromatografia per chiudere i contenitori in vetro ("vials") dove vengono preparati i campioni da analizzare (come ad esempio le feci per lo studio del microbiota) in applicazioni di metabolomica untargeted. Il loro scopo principale è quello di sigillare le vials in modo da prevenire contaminazioni e perdite del campione: impediscono infatti che sostanze esterne contaminino il campione durante la preparazione, mantenendo l'integrità del campione. I tappi sono realizzati in gomma butilica, un materiale elastico, che consente una chiusura sicura, ma anche una facile penetrazione per le successive necessarie iniezioni dei campioni, senza contaminare l'analisi. I tappi. La gomma butilica è abbastanza morbida da permettere l'inserimento dell'ago del sistema di iniezione della gas cromatografia, senza compromettere la qualità del campione. La gomma butilica è inoltre resistente a una varietà di solventi e reagenti chimici, che la rende adatta per una vasta gamma di analisi in gas cromatografia.

**8. 27230-U Aluminum crimp seal (without septum), silver aluminum, open center, diam. × opening 20 mm × 9.5 mm, pkg of 100 ea**

Questo prodotto è una ghiera in alluminio che serve per sigillare in modo ancora più le vials contenenti i campioni in applicazioni di gas cromatografia (per applicazioni di metabolomica untargeted): esso è realizzato per essere "crimpato" (ovvero, schiacciato) assieme al tappo in gomma butilica sulle vials, creando una chiusura ancora più sicura e impermeabile. L'unione del tappo con questa ghiera protegge il campione da contaminazioni esterne, impedisce evaporazioni o perdite e garantisce ancora di più l'integrità durante il trasporto e la preparazione. La chiusura molto stretta non lascia passare gas o liquidi, mantenendo stabile il campione e quindi la precisione dei risultati. È di facile utilizzo perché vengono "crimpati" sopra le vials con l'aiuto di una macchina crimpatrice, garantendo una chiusura uniforme e sicura. Una volta crimpato, il tappo è stabile e non si allenta facilmente, a meno che non venga rimosso intenzionalmente.

**9. 57334-U SPME fiber assembly Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), df 85 µm, needle size 24 ga, for use with manual holder, StableFlex fiber**

Lo SPME fiber assembly Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) è una fibra utilizzata nella tecnica SPME (Solid Phase Microextraction), impiegata per l'estrazione di composti (metaboliti) volatili o semi-volatili da campioni solidi, liquidi o gassosi, per le successive analisi in gas cromatografia. Una volta che i composti sono stati adsorbiti sulla fibra, la fibra viene riscaldata ed i composti vengono desorbiti, iniettati nel sistema cromatografico per l'analisi. Poiché l'estrazione è solida (solid phase), non richiede l'uso di solventi, il che riduce i rischi di contaminazione o perdita di composti e semplifica la preparazione del campione.

La fibra metallica è rivestita da Carboxen (CAR) che è un materiale adsorbente (tipo carbone attivo), particolarmente efficace per adsorbire piccole molecole come gas e vapori, mentre il Polydimethylsiloxane (PDMS) è un materiale più selettivo per composti non polari o semi-volatili. Combinando entrambi i materiali, si ottiene una fibra che è altamente versatile per l'estrazione di una vasta gamma di composti, dai più leggeri e volatili (caratterizzati dalla CAR) ai composti più pesanti e non polari (grazie al PDMS). L'uso della combinazione CAR/PDMS permette di estrarre una vasta gamma di composti (sia volatili che semi-volatili), rendendo la fibra adatta per diverse applicazioni, tra cui l'analisi del microbiota intestinale. La "df" sta per "film thickness" (spessore del film) della fibra, che in questo caso è 85 micrometri. Questo indica lo spessore della pellicola che riveste la fibra, influenzando la capacità di estrazione e la selettività. Un rivestimento di 85 µm è considerato abbastanza equilibrato, adatto per una varietà di composti. Il diametro dell'ago della fibra di 24 gauge è relativamente sottile, che ne permette l'utilizzo in vials creando un foro molto piccolo. Il materiale del supporto metallico StableFlex che costituisce il corpo della fibra è molto resistente e flessibile, il che consente un'ottima durata e stabilità, evitando che la fibra si rompa o si deformi facilmente durante le operazioni di estrazione. La fibra è progettata per essere utilizzata con un "holder manuale\*", che permette all'operatore di immergere la fibra direttamente nel campione o nell'ambiente da cui estrarre i composti.

**10. 279307-1G Acetic acid-2-13C**

L'Acetic acid-2-13C (acido acetico-2-13C) è un composto chimico ed in particolare una forma isotopica marcata dell'acido acetico, in cui l'atomo di carbonio nella posizione 2 (il carbonio del gruppo metilico, -CH<sub>3</sub>) è sostituito con l'isotopo carbonio-13 (<sup>13</sup>C) stabile e non radioattivo, che può essere rilevato con tecniche analitiche specifiche. Il <sup>13</sup>C, essendo un isotopo stabile, non decade nel tempo, a differenza degli isotopi radioattivi. L'acido acetico-2-13C è utilizzato principalmente come standard interno in tecniche analitiche avanzate, come la spettrometria di massa (MS). Viene aggiunto ai campioni per quantificare con precisione l'acido acetico naturale o altri metaboliti. Grazie alla sua massa diversa (dovuta al <sup>13</sup>C) può essere distinto dagli analiti naturali durante l'analisi. In studi di metabolomica viene utilizzato per tracciare il metabolismo dell'acido acetico e dei suoi derivati in campioni biologici (ad esempio, sangue, urine, tessuti). Come standard interno, migliora l'accuratezza e la riproducibilità delle misurazioni, riducendo gli errori dovuti a variazioni strumentali o di preparazione del campione. Il <sup>13</sup>C permette di distinguere il composto marcato da quello naturale, facilitandone l'identificazione e la quantificazione in matrici complesse.

**11. 589586-1G Propionic acid-13C3**

Il Propionic acid-13C3 (acido propanoico-13C3) è un composto chimico ed in particolare una forma isotopica marcata dell'acido propanoico (noto anche come acido propionico), in cui tutti e tre gli atomi di carbonio (C) sono sostituiti con l'isotopo carbonio-13 (<sup>13</sup>C) stabile e non radioattivo, che può essere rilevato con tecniche analitiche specifiche. Il <sup>13</sup>C, essendo un isotopo stabile, non decade nel tempo, a differenza degli isotopi radioattivi. L'acido propanoico-13C3 è utilizzato principalmente come standard interno o tracciante isotopico in tecniche analitiche avanzate, come la spettrometria di massa (MS). Viene aggiunto ai campioni per quantificare con precisione l'acido propanoico naturale o altri metaboliti. Grazie alla sua massa diversa (dovuta al <sup>13</sup>C), può essere distinto dagli analiti naturali durante l'analisi e viene utilizzato per tracciare il metabolismo dell'acido propanoico e dei suoi derivati in campioni biologici (ad esempio, sangue, urine, tessuti) per studiarne il ruolo nella regolazione del metabolismo e nella salute umana. Come standard interno, migliora l'accuratezza e la riproducibilità delle misurazioni, riducendo gli errori dovuti a variazioni strumentali o di preparazione del campione. Il <sup>13</sup>C permette di distinguere il composto marcato da quello naturale, facilitandone l'identificazione e la quantificazione in matrici complesse.

**12. 1504790001 SeQuant® ZIC-HILIC™ (150 mm L. × 0.3 mm I.D., 3.5 µm, 200 Å)**

La SeQuant® ZIC-HILIC™ è una colonna cromatografica utilizzata nella cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS). La sigla "HILIC" sta per Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, una tecnica particolarmente utile per separare composti polari e idrofili che potrebbero essere difficili da trattenerne con metodi di cromatografia a fase inversa tradizionale. La colonna ZIC-HILIC™ è progettata con una fase stazionaria costituita da silice modificata con gruppi funzionali aminopropilici di tipo zwitterionico, ovvero gruppi chimici con cariche positive e negative in prossimità tra loro. La fase stazionaria consente un'interazione idrofila zwitterionica con gli analiti in studio e presenta una forte affinità per molecole polari, migliorando la separazione di composti come zuccheri, amminoacidi, peptidi, nucleotidi e altre molecole idrofile, rendendola ideale per studi sui metaboliti, sugli zuccheri e altre biomolecole idrosolubili e, quindi, uno strumento versatile per l'analisi di molecole polari, particolarmente utile in ambito bioanalitico. Le applicazioni principali includono: analisi di metaboliti in campioni biologici, separazione di composti polari in campioni complessi e quindi studi di proteomica e metabolomica.

I vantaggi principali derivanti dal suo utilizzo sono: - l'alta risoluzione, dato che la tecnologia HILIC consente separazioni molto dettagliate dei composti polari; - la flessibilità perchè si adatta alla separazione di una vasta gamma di composti polari e idrosolubili, rendendola utile in applicazioni diverse, come quella relativa all'analisi untargeted dei metaboliti presenti in campioni biologici e -la compatibilità con le successive analisi di spettrometria di massa. La fase mobile utilizzata nella ZIC-HILIC™ (ad esempio, miscele di acetonitrile e tamponi acquosi) è infatti altamente compatibile con la spettrometria di massa, migliorando la ionizzazione e la sensibilità degli analiti. Inoltre, Grazie alla sua capacità di trattenerne composti polari, la ZIC-HILIC™ riduce la necessità di derivatizzare i campioni, semplificando la preparazione del campione e riducendo i tempi di analisi.

**13. BAF199230001-100EA Bel-Art® Disposable Pestles polypropylene, pack of 100 ea (for 1.5 mL microcentrifuge tube)**

I Bel-Art® Disposable Pestles sono dei pestelli in polipropilene monouso progettati per omogeneizzare, frantumare o miscelare piccoli campioni in provette da microcentrifuga ed estrarre proteine e metaboliti che possono poi essere analizzati tramite tecniche analitiche quali la spettrometria di massa. Essendo monouso, eliminano il rischio di contaminazione tra campioni diversi, a differenza di pestelli riutilizzabili. Sono resistenti, leggeri e compatibili con la maggior parte dei solventi e reagenti chimici.

#### 14. M51458-5G 3-methylindole

Il 3-metilindolo, noto anche come skatolo, è un metabolita prodotto dalla degradazione batterica dell'aminoacido triptofano nell'intestino di mammiferi, inclusi gli esseri umani. Esso viene utilizzato come standard marcatore per studiare il metabolismo del triptofano per monitorare l'attività del microbiota e la disbiosi intestinale. Costruendo una curva di calibrazione con lo standard si può determinare in modo quantitativo tramite applicazioni di spettrometria di massa targeted la presenza di questo marcatore di disbiosi in vari campioni biologici quali urine e feci.

#### 15. MAK128-1KT INDICAN ASSAY KIT

L'Indican Assay Kit è un kit di analisi progettato per misurare la concentrazione di indicano (un metabolita) in campioni biologici. L'indicano è un composto prodotto nel fegato a partire dall'indolo, che a sua volta deriva dalla degradazione batterica dell'aminoacido triptofano nell'intestino. La misurazione dell'indicano è utile in ambito clinico e di ricerca per valutare la disbiosi intestinale, la funzionalità epatica e il metabolismo del triptofano. L'aumento dell'indicano nelle urine può indicare una cattiva digestione o malassorbimento delle proteine, oppure una crescita eccessiva di batteri anaerobici nell'intestino. Il kit Indican Assay fornisce una procedura semplice e diretta per misurare i livelli di indicano nelle urine. Questo test si basa su un metodo Curzon e Walsh migliorato in cui la reazione dell'indicano con la p-dimetilamminobenzaldeide dà luogo a un prodotto colorimetrico che viene misurato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 480 nm. La concentrazione di indicano viene determinata confrontando i risultati con una curva standard inclusa nel kit.

**Si riferisce un'infungibilità tecnica dei materiali sopra descritti, ai sensi dell'art. 76, comma 4 lett. b), per le seguenti motivazioni:**

tutti i materiali elencati sono stati utilizzati in Ospedale in protocolli ottimizzati nel corso degli anni e ne abbiamo esperienza di elevata affidabilità e riproducibilità necessarie per garantire dati altamente attendibili.

*Firma*

  
Dott.ssa Romina Moavero