



ISTITUTO AGRARIO
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

SPECIFICA TECNICA LOTTO 2

Allegato 2 del Capitolato

“FORNITURA DI UN SISTEMA MICRO HPLC ACCOPPIATO AD UNO SPETTROMETRO DI MASSA A TRIPLO QUADRUPOLO”

1) Informazioni generali

La Fondazione Edmund Mach, Trentino-Italia, continua la tradizione ideale dell'Istituto agrario di San Michele all'Adige, fondato nel 1874 e divenuto uno dei più quotati centri per la ricerca in scienze agrarie. La Fondazione avrà un ruolo centrale nello sviluppo dell'economia territoriale del Trentino fornendo ricerca, trasferimento tecnologico, formazione professionale ed istruzione secondaria ed universitaria.

Come parte della ristrutturazione, la Fondazione Mach investirà prioritariamente nella ricerca e sviluppo, capitalizzando sulle importanti strutture e risorse esistenti, ed intensificando ed espandendo la copertura di attività di ricerca altamente innovative e di rilevanza internazionale, operando in una Provincia che è uno dei più intensi finanziatori pubblici nella ricerca. Attualmente, il Centro Sperimentale ha uno staff di 230 persone ed è attrezzato con tecnologie di avanguardia in molte aree della ricerca agraria, ed in particolare nella genomica vegetale, nelle biotecnologie dei prodotti naturali e nella fitochimica. Viene data forte enfasi allo sfruttamento delle più moderne piattaforme tecnologiche. Nel 2006 i ricercatori dell'Istituto agrario di San Michele all'Adige hanno completato il sequenziamento ed assemblaggio del genoma della vite ed iniziato il sequenziamento del genoma del melo. In parallelo, l'Istituto ha attivato un Programma Interdisciplinare di Genomica Traslazionale finalizzato a sfruttare le conoscenze e gli strumenti generati dai progetti di sequenziamento del genoma. Lo scopo finale del programma è lo sviluppo di sistemi e prodotti innovativi finalizzati a promuovere la competitività e sostenibilità della produzione di frutta e vino.

Come prosecuzione e parte di questo percorso strategico, la Fondazione Edmund Mach sta ora creando un **Gruppo di Ricerca sulla Metabolomica Vegetale**. Questo gruppo interagirà strettamente con i gruppi del Sequenziamento del Genoma e con la Genomica Traslazionale. E' attesa inoltre una forte interazione con l'Università di Trento, in relazione alla creazione di sinergie ed alleanze strategiche per il futuro sviluppo di un'iniziativa di Genomica Nutrizionale. Un'ulteriore area strategica di interazione è quella con il Gruppo di ricerca sulle Interazioni Pianta-Patogeno. Lo sviluppo di queste attività necessita della creazione di una **Piattaforma Tecnologica** basata sulla **Metabolomica**. Attraverso la creazione di questa Piattaforma, il **Gruppo di Ricerca sulla Metabolomica Vegetale** assicurerà alla Fondazione la capacità analitica specialistica necessaria per la dissezione a livello molecolare dei processi



ISTITUTO AGRARIO
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

basali coinvolti nello sviluppo del frutto ed in altri processi chiave per la biologia della pianta.

La identificazione dei “biomarker” è una componente chiave nella Metabolomica Vegetale finalizzata a scoprire l’impatto di nuove entità chimiche che devono essere pienamente caratterizzate a livello molecolare. Questo compito richiede l’impiego di un sistema basato su un cromatografo liquido ad alta risoluzione (micro HPLC), interfacciato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (MS/MS) avente elevatissima sensibilità e range dinamico, dedicato alla quantificazione seriale con accuratezza e precisione di un elevato numero di composti in matrici vegetali particolarmente complesse. E’ richiesta la capacità di rilevazione anche di composti incogniti non separati cromatograficamente, che devono essere caratterizzati e identificati da complesse matrici biologiche attraverso esperimenti di metabolomica. Il sistema deve essere ad elevata produttività, pienamente automatizzabile ed equipaggiato con efficienti sistemi per il processo e l’indagine statistica sui dati analitici.

2) Requisiti tecnici:

La strumentazione deve essere in grado di supportare pienamente l’approccio di “**High-Throughput-Metabolomics**” attraverso l’uso di tecniche **LC-MS** e **LC-MS/MS** che permettano l’esplorazione del metaboloma della pianta, attraverso la quantificazione precisa ed accurata della concentrazione del maggior numero di metaboliti nel più ampio range dinamico e lineare, nonché la analisi dei metaboliti differenzialmente espressi finalizzata alla identificazione di nuovi biomarker, in particolare per la qualità organolettica e nutrizionale, il controllo dei processi fisiologici e la resistenza ai patogeni. L’intero sistema, incluso il software gestionale, deve essere automatizzabile e pienamente integrato con i necessari strumenti per poter svolgere con elevata produttività le applicazioni connesse con la metabolomica. Sulla base della specifica esperienza e del supporto della recente letteratura abbiamo identificato le seguenti caratteristiche tecniche.

3) Il sistema deve avere i seguenti requisiti minimi:

a) Spettrometro di massa e micro HPLC.

1. **Sorgente e sistema di ionizzazione:** deve disporre delle seguenti sorgenti: a) electrospray (ESI); b) atmospheric pressure chemical ionization (APCI), c) combinata ESI/APCI. Deve essere disponibile come opzione sorgente ESI compatibile per flussi inferiori a 1 microlitro/minuto senza splittaggio. La sorgente deve comprendere le interfacce di sistema per la completa integrazione nella configurazione LC-MS e la possibilità di infusione diretta controllata via software.
2. **Spettrometro di Massa:** triplo quadrupolo.



ISTITUTO AGRARIO
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

3. **Linearità di risposta:** almeno 4 ordini di grandezza a partire dal limite di rilevazione.
4. **Intervallo di Massa:** non inferiore all'intervallo $\geq 50 - 2.000$ m/z.
5. **Rilevatore:** deve garantire l'ottenimento di picchi con eccellente definizione e accuratezza di massa.
6. **Risoluzione di Massa ($m/\Delta m$):** superiore a 0,7 Da FWHM in tutto l'intervallo di lavoro
7. **Accuratezza di Massa:** 0.1 amu nell'intero intervallo di masse coperto dallo strumento.
8. **Velocità di Scansione (spettri/s):** ≥ 2000 amu/s.
9. **Stabilità di massa:** drift minore di 0.1 Da in 8 ore.
10. **Intervallo dinamico:** non inferiore a 6 ordini di grandezza.
11. **Metodo di frammentazione:** CID (collision-induced dissociation). L'energia di collisione deve essere controllata in modo digitale. Deve essere controllabile la pressione del gas di collisione. L'introduzione del gas di collisione deve essere completamente gestita dal sistema di controllo. La pressione del gas di collisione usata durante l'acquisizione dei dati deve essere automaticamente associata al file di dati salvato.
12. **Energia di collisione:** controllabile via software.
13. **HPLC**
 - Possibilità di usare tecnologie compatibili con le colonne cromatografiche di più recente tecnologia con diametro costante < 2 micron di dimensione delle particelle.
 - Velocità di flusso: 0,050 – 1,000 mL/min.
 - Range di pressione: almeno fino a 600 bar.
 - Volume morto effettivo del sistema < 200 microlitri indipendente dalla pressione operativa.
 - Alta precisione di flusso, $< 0,1$ RSD con colonna di particelle di piccolo diametro.
 - Campionatore automatico programmabile termostatabile (refrigerato) e capace di alloggiare sia vials che micropiastre, ottimizzato per micro volumi.
 - Forno colonna termostatabile (sia refrigerato che riscaldato).

b) Sistema hardware e software per l'acquisizione ed il controllo strumentale

Deve essere fornito un PC configurato con un sistema operativo Microsoft Windows o compatibile, equipaggiato con un'interfaccia grafica multi-finestra. Il PC deve gestire il sistema di acquisizione dei dati e permettere un controllo dinamico dell'intero sistema (MS e LC) compresi tutti gli accessori (autocampionatore, iniettori, forno colonna, ecc.).

Deve permettere inoltre di visualizzare simultaneamente l'acquisizione dati in tempo reale ed i parametri strumentali.



ISTITUTO AGRARIO
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

Il software della massa deve incorporare tutte le funzionalità per il pieno controllo operativo dello strumento, inclusa la auto-calibrazione e l'impostazione di masse di riferimento per la misura di massa esatta su tutto il range dinamico.

Il software dovrebbe offrire la possibilità di acquisizione dipendente dai dati, con possibilità di passare automaticamente nella modalità MS/MS durante l'acquisizione, in base ai dati acquisiti in MS in scansione precedente. Per ogni ione che supera la soglia definita dall'operatore in scansione MS, lo strumento dovrebbe essere in grado di acquisire automaticamente lo spettro dello ione prodotto. Lo switching dovrebbe essere pilotabile in base a specifiche masse target, range di massa e stato di carica, o masse indesiderate, impostate dall'utente. La durata della acquisizione MS/MS dovrebbe essere definibile in base alla intensità del picco o in base ad un tempo di switch impostabile dall'utente per permettere la acquisizione dei dati degli ioni prodotti senza richiedere la conoscenza a priori della composizione del campione. Dovrebbe avere la possibilità di ricerca esatta dello ione parente, generando in condizioni automatiche spettri MS/MS e "neutral-loss".

Il software deve permettere una determinazione qualitativa e quantitativa nonché deve essere in grado di integrare automaticamente i picchi e deconvolvere gli spettri, di cercare in librerie (con possibilità di creare proprie librerie) e di comparare i diversi campioni. Deve essere garantita la possibilità di processare campioni singoli o multipli durante l'acquisizione dei dati. Deve essere possibile salvare e modificare i metodi.

I calcoli per l'integrazione dei picchi, la calibrazione e la quantificazione devono essere completamente automatizzabili.

Il software deve permettere la generazione di report visibili ed esportabili verso un sistema terzo. Il report deve essere salvato e processato indipendentemente dai dati originali su di un PC diverso da quello utilizzato per l'acquisizione dei dati.

c) Software per la gestione dei dati metabolomici

Caratteristiche principali che tale software dovrebbe possedere:

- Produrre una tabella delle coppie di tempo di ritenzione e massa che rifletta tutte le masse presenti nel campione sopra un livello di intensità definito dall'utente.
- Il sistema deve processare i dati, cercare i metaboliti attesi e non attesi acquisiti dal LC-MS usando soglie di intensità dei picchi e pulizia dello spettro definite dall'utente. Possibilità di impostare una lista di specifiche masse da escludere e di deconvolvere i dati isotopici.
- Capacità di effettuare misure di massa accurate on-line LC/MS and MS/MS fornendo i dati necessari per una identificazione non ambigua del metabolita, con ricerca del metabolita, meglio se anche automatica, su banche dati che utilizzano accurati difetti di massa e rapporti isotopici. Il software dovrebbe permettere di deconvolvere i dati isotopici per ridurre la complessità dei dati spettrali.



ISTITUTO AGRARIO
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

- Identificazione automatica di metaboliti conosciuti e sconosciuti tramite confronto dei campioni con un controllo.
- La applicazione deve gestire analisi sia su singoli campioni che su gruppi di campioni, per supportare la determinazione di metaboliti differenzialmente espressi.
- La possibilità di trattare i dati con metodi statistici multivariati e visualizzare i risultati tramite interfaccia grafica.
- Il software dovrebbe essere ben integrato con la strumentazione ed essere user-friendly.

4) Vanno altresì indicati e saranno oggetto di valutazione:

- d) **Elementi migliorativi inclusi nella fornitura:** sono considerati tali i sistemi addizionali rispetto alla configurazione minimale, atti a migliorare la deconvoluzione di miscele complesse, e ad estendere la capacità qualitativa del sistema (ad esempio, detector UV a fotodiodi).
- e) **Elementi accessori non inclusi nella fornitura:** altri sistemi quotati per espandere la configurazione, non richiesti dal capitolato e non inclusi nella fornitura (i.e: interfaccia APPI atmospheric pressure photo ionization).

5) Prova pratica.

Per la valutazione delle performance degli strumenti oggetto delle diverse offerte pervenute verrà effettuata una prova pratica nelle condizioni operative definite dalla Fondazione. A tal fine è richiesta una dichiarazione di disponibilità ad effettuare una dimostrazione su macchina funzionante nella configurazione offerta, da tenersi entro 40 giorni dalla data di scadenza per la presentazione delle offerte, in una sede Italiana od Europea indicata dal Fornitore. La prova avrà durata complessiva di 2 (due) giorni ed avverrà esclusivamente sulla configurazione base indicata nel capitolato.

Avrà la funzione di testare l'intero sistema nel suo complesso dalla gestione dei campioni, alla identificazione e quantificazione dei metaboliti e alla elaborazione dei risultati. Lo scopo è quello di valutare quale sistema nel suo insieme è il più adatto a gestire esperimenti di metabolomica, al fine di garantire la massima efficienza e produttività complessiva del sistema da valutare, requisito assolutamente necessario per questo tipo di applicazioni. Di fondamentale importanza sono la capacità di risolvere i singoli picchi, di deconvolvere i segnali e l'identificazione e quantificazione corretta del numero maggiore di metaboliti sia conosciuti che sconosciuti, con la massima sensibilità e nel più ampio range dinamico e lineare.

Le condizioni specifiche della prova verranno comunicate a mezzo fax almeno 5 giorni lavorativi prima della data di effettuazione concordata. Gli standard ed i campioni di prova verranno forniti dalla Fondazione, i materiali consumabili dal Fornitore. Le misure incluse nella prova verranno effettuate esclusivamente in presenza di tecnici incaricati dalla Fondazione. Indicare specificamente nominativo e recapito del referente del Fornitore per la esecuzione della prova.



ISTITUTO AGRARIO
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

5) Scopo e durata del contratto.

Il contratto sarà diviso in due distinte fasi:

- Fase I: Fornitura, installazione, formazione sul posto, per più persone, circa il funzionamento della macchina, collaudo e stesura della documentazione entro 3 mesi dalla sottoscrizione del contratto. Successivamente, dopo 2-3 settimane dall'installazione, ulteriore corso di formazione, sul posto, per più persone, sull'impiego avanzato dello strumento per le applicazioni di metabolomica. 2 (due) anni di garanzia a partire dalla data di accettazione della strumentazione, definita come la data in cui il tecnico incaricato dalla Fondazione controfirmerà il rapporto finale di installazione e collaudo steso dal referente tecnico del fornitore; tale fornitura includerà non meno di una visita annuale di manutenzione preventiva.
- Fase II (eventuale): Manutenzione obbligatoria (sia preventiva che correttiva) della strumentazione per 1 (un) anno, prorogabile a prezzo bloccato per 2 (due) anni, da svolgere con le modalità sotto riportate. Il contratto per la manutenzione sarà stipulato solamente nel caso di esercizio da parte dell'Istituto dell'opzione, di cui al par. 5.2 del Disciplinare di gara.

6) Manutenzione obbligatoria:

Durante la Fase I ed il relativo periodo di garanzia, e successivamente in caso di sottoscrizione della Fase II, il Fornitore deve assicurare i seguenti servizi:

a) Manutenzione preventiva

Si definisce come manutenzione preventiva un intervento periodico sulla strumentazione al fine di assicurarne adeguato funzionamento e calibrazione. Questa manutenzione preventiva verrà svolta a cadenza non superiore ad un anno, presso la sede della Fondazione e durante l'orario di lavoro dello stesso, e deve essere completata in un periodo di massimo 3 (tre) giorni lavorativi per ciascun intervento, da parte di tecnici del Fornitore.

b) Manutenzione correttiva per emergenze

L'intervento di manutenzione correttiva per emergenze deve essere fornito dietro richiesta della Fondazione, via telefono confermata per fax o e-mail, al numero fornito dal Fornitore. Si definisce come intervento di emergenza qualsiasi intervento fatto in caso di inadeguata prestazione o rottura della strumentazione. Questi interventi vengono eseguiti su richiesta al Fornitore e verranno eseguiti presso la sede della Fondazione e durante l'orario di lavoro dello stesso. Il tempo tra la chiamata e l'intervento sul posto non deve superare i 3 (tre) giorni lavorativi a partire dalla formulazione della richiesta.

c) Rapporto di manutenzione



ISTITUTO AGRARIO
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

La sostituzione di qualsiasi parte verrà effettuata dietro autorizzazione con il tecnico della Fondazione incaricato della gestione della strumentazione, che sarà presente durante gli interventi di manutenzione preventiva o correttiva. Alla conclusione di ogni intervento, sia di manutenzione preventive che correttiva, verrà prodotto dal tecnico del Fornitore e controfirmato dal tecnico incaricato dalla Fondazione un rapporto sul lavoro effettuato.

Questo rapporto includerà anche una descrizione dettagliata dei difetti riscontrati e delle eventuali parti sostituite.

7) Indicare i laboratori presso i quali la macchina offerta è utilizzata nel campo della metabolomica.