 U.O. Attività Economiche e di Approvvigionamento
ER/vm

DETERMINAZIONE N. 340 DEL **11 FEB. 2021**

OGGETTO: Esito della procedura negoziata per la fornitura di kit di reagenti SALSA MLPA per l'identificazione di delezioni/amplificazioni nella diagnosi genetica – molecolare delle neuropatie ereditarie (diagnostici esclusivi) per la U.O. Genetica Medica, per il periodo 05.02.2021 - 15.12.2021. Importo complessivo contrattuale di Euro 7.820,00 esclusa IVA e di Euro 9.540,40 inclusa IVA al 22%, da imputarsi al C.E. 120.006.005.

L'anno duemilaventuno addì 11 del mese di FEB., presso la sede Amministrativa dell'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, sito in Genova, largo Rosanna Benzi 10,

IL DIRETTORE

- Vista la deliberazione n. 1935 del 28.10.2020 con la quale sono state definite le competenze e le responsabilità degli Organi di Governo e di Gestione delle Unità Operative;
- Visto il D. Lgs 18 Aprile 2016, n. 50 di attuazione delle Direttive 2014/23/UE, 2014/24/UE e 2014/25/UE ed il successivo decreto correttivo D. Lgs. n. 56/2017;
- vista l'allegata nota prot. n. 51904 del 29.12.2020 con cui la U.O. Farmacia ha trasmesso il verbale n. 40/CAD dell'incontro tenutosi in data 16.12.2020, nel quale la Commissione (CAD) preposta alla valutazione delle richieste di acquisto in esclusività ha esaminato la dichiarazione, formulata dal Direttore della U.O. Genetica Medica, nonché dal Direttore del Dipartimento di afferenza, esprimendo parere favorevole alla fornitura di kit di reagenti SALSA MLPA della ditta Resnova S.r.l., per l'identificazione di delezioni/amplificazioni nella diagnosi genetica – molecolare delle neuropatie ereditarie;
- considerato che in data 11.01.2021 è stato pubblicato sul sito istituzionale del Policlinico l'allegato avviso di consultazione preliminare finalizzato a verificare l'eventuale presenza sul mercato di prodotti equivalenti ai reagenti in argomento e che, al termine previsto del 21.01.2021, non è pervenuta alcuna manifestazione di interesse;
- dato atto, pertanto, che con nota prot. n. 3968 del 28.01.2021 si è provveduto a richiedere offerta economica alla sopra citata ditta Resnova S.r.l., che, con nota di riscontro recepita in data 01.02.2021 con prot. n. 4391, ha dato la propria disponibilità alla fornitura in argomento fino al 15.12.2021;
- precisato che l'iter procedurale per la fornitura di cui al presente provvedimento è conforme alle disposizioni di cui al Regolamento per l'acquisto di beni e/o servizi in regime di

infungibilità/esclusività ex art. 63 comma 2 lett. b) D. Lgs. n. 50/2016, approvato con Deliberazione n. 349 del 27.02.2019;

- ritenuto pertanto di affidare alla ditta Resnova S.r.l. la fornitura di kit di reagenti SALSA MLPA per l'identificazione di delezioni/amplificazioni nella diagnosi genetico – molecolare delle neuropatie ereditarie per la U.O. Genetica Medica, alle condizioni riportate nell'allegato "A" parte integrante e sostanziale del presente provvedimento, per il periodo 05.02.2021 - 15.12.2021, per l'importo complessivo contrattuale pari ad Euro 7.820,00 esclusa IVA e ad Euro 9.540,40 inclusa IVA al 22%, da imputarsi al C.E. 120.006.005, autorizzazione n. 1214 del Bilancio 2021;

DETERMINA

per le motivazioni espresse in premessa:

- 1) di affidare alla ditta Resnova S.r.l. la fornitura di kit di reagenti SALSA MLPA per l'identificazione di delezioni/amplificazioni nella diagnosi genetico – molecolare delle neuropatie ereditarie per la U.O. Genetica Medica, alle condizioni riportate nell'allegato "A" parte integrante e sostanziale del presente provvedimento, per il periodo 05.02.2021 - 15.12.2021, per l'importo complessivo contrattuale pari ad Euro 7.820,00 esclusa IVA e ad Euro 9.540,40 inclusa IVA al 22%, da imputarsi al C.E. 120.006.005, autorizzazione n. 1214 del Bilancio 2021;
- 2) di assumere in prima istanza sub-autorizzazione pari ad euro 100,00 sul sopra citato Conto Economico, riservandosi l'integrazione della stessa fino all'importo determinato;
- 3) di inviare il presente provvedimento all'U.O. Affari Generali e Legali, Area Delibere, entro tre giorni dall'adozione per la pubblicazione all'Albo pretorio on line, per la conservazione legale e per quant'altro sia previsto dalla normativa vigente;
- 4) di dichiarare il presente provvedimento esecutivo dalla data di pubblicazione all'Albo Pretorio on line.

ASSUNZIONE SUB-AUTORIZZAZIONE

C.E. 120.006.005 per Euro 100,00 1214/251

VM

IL RESPONSABILE DEL PROCEDIMENTO

(Elsabetta Rossi)

IL DIRETTORE U.O.

(Dott.ssa Stefania Rizzuto)

PUBBLICATA ALL'ALBO
FD ESECUTIVA

DAL GIORNO 15 FEB. 2021



OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO
Sistema Sanitario Regione Liguria
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

U.O.C. Farmacia
Direttore f.f. Dott.ssa S. Beltrami

Prot.

Genova li,

Protocollo Generale n. 0051904/20 del 29/12/2020

Al Direttore
U.O. Attività Economiche e di
Approvvigionamento
Dott.ssa S. Rizzuto

e.p.c. **Al Direttore UO Genetica Medica**
Prof.ssa P. Mandich

Al Direttore di Dipartimento
Prof. R. Fiocca

OGGETTO: acquisizione di diagnostici CAD/40 "Kit salsa MLPA per l'identificazione di delezioni/amplificazioni – ditta Resnova srl

Si trasmette il Verbale n. 40/CAD Diagnostici, dell'incontro tenutosi in data 16.12.2020, relativo all'acquisizione dei prodotti in oggetto.

Distinti saluti.

Il Direttore f.f.
Dott.ssa S. Beltrami

ALLEGATO ¹ ALLA DETERMINAZIONE N. 340 DEL 11 FEB. 2021
COMPOSTO DA N. 43 PAGINE NUMERATE DA 1 A

Copia al Direttore U.O. Governo Clinico e Organizzazione Ospedallera
Copia U.O. Information & Communication Technologies (ICT)



OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO
Sistema Sanitario Regione Liguria
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico per l'Oncologia

Verbale incontro N° 40

Dispositivi Medici - Diagnostici

Data: 16/12/20

Presso: Direzione Sanitaria VIA TEAMS

Ora inizio: 10:00

Ora termine: 11:00

PRESENTI	COD-IMP	SIRIUSA
A. MORANDO	hcr	
S. BELTRAMINI	HFA	<i>Beltrami</i>
M. BASSO	HFA	<i>M. Basso</i>
M. STADREMI	HST	<i>M. Stadremi</i>

Oggetto: valutazione Dichiarazioni di esclusività Dispositivi Medici

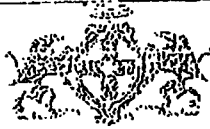
KIT SALSA MLPA PER L'IDENTIFICAZIONE DI
DELEZIONI/AMPLIFICAZIONI - ditta RESNOVA SRL

Centro di costo richiedente: U32X - GENETICA MEDICA

Si comunica che per la richiesta di acquisto con procedura di esclusività presentata è stato espresso parere favorevole.

Note:

la U.O. Gestione Approvvigionamenti effettuerà le indagini preliminari di mercato di sua competenza per verificare l'unicità del prodotto.



OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO
Sistema Sanitario Regione Liguria
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico per l'Oncologia

Verbale incontro N° 40

Dispositivi Medici - Diagnostici

Data: 16/12/20

Presso: Direzione Sanitaria VIA TEAMS

Ora inizio: 10:00

Ora termine: 11:00

PRESENTI	CATEGORIA	Firma
A. MORANDO	hce	<i>Morando</i>
S. BELTRAMINI	HFA	<i>Beltrami</i>
M. BADO	HFA	<i>Bado</i>
M. SANDREMI	HST	

Oggetto: valutazione Dichiarazioni di esclusività Dispositivi Medici

KIT SALSA MLPA PER L'IDENTIFICAZIONE DI
DELEZIONI/AMPLIFICAZIONI - sito RESNOIA srl

Centro di costo richiedente: U02X - GENETICA MEDICA

Si comunica che per la richiesta di acquisto con procedura di esclusività presentata è stato espresso parere favorevole.

Note:

la U.O. Gestione Approvvigionamenti effettuerà le indagini preliminari di mercato di sua competenza per verificare l'unicità del prodotto.

U.O. GOVERNO CLINICO E ORGANIZZAZIONE OSPEDALIERA HOR	OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO	MODAZHOR_0050		
	MODULO AZIENDALE DICHIARAZIONE ESCLUSIVITA' DISPOSITIVO MEDICO IN VITRO	Rev. 2	Data 18/02/2019	Pag 1 di 4

U.O. GENETICA MEDICA
CDC: U92X

**Ai sensi dell'art. 63 comma 2 lettera b del D.Lgs 50/2016
Assumo personale responsabilità che il seguente prodotto:**

Descrizione: Kits SALSA MLPA (Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification), kit per l'identificazione di delezioni/amplificazioni. I kit sono soggetti a brevetti e sono stati creati per singole patologie. Tutti i prodotti elencati sono CE-IVD

Nome Commerciale:

- 1) SALSA MLPA EK1 reagent kit – 100 rxn
- 2) Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT); Neuropathy with liability to pressure palsies, hereditary (HNPP) Region: CMT/HNPP region 17p12; KIF1b 1p36

Codice Prodotto:

- 1) SALSA MLPA EK1 reagent 100 reactions (cod. EK1-FAM)
- 2) SALSA MLPA Probemix P033 CMT1 – 100 rxn (cod. P033-100R)

Produttore / Rivenditore: MRC Holland/ Resnova
da acquisire presso la Ditta: Resnova S.r.l.

- DM in vitro di nuovo inserimento
 DM in vitro già utilizzato

indicare il fabbisogno annuo presunto:

- | | |
|---|--------|
| 1) SALSA MLPA EK1 reagent 100 reactions (cod. EK1-FAM) | 5 conf |
| 2) SALSA MLPA Probemix P033 CMT1 – 100 rxn (cod. P033-100R) | 5 conf |

Quantità richiesta: **5 confezioni cadauno**

Prezzo unitario:

- | | |
|---|-----------|
| 1) SALSA MLPA EK1 reagent 100 reactions (cod. EK1-FAM) | 367,00 € |
| 2) SALSA MLPA Probemix P033 CMT1 – 100 rxn (cod. P033-100R) | 1127,00 € |

Prezzo totale presunto della fornitura (IVA esclusa): **7470,00 €**

Redatto U.O. HOR; U.O. HFA; U.O. HPR	Controllato RAQ U.O.	Approvato Direzione U.O.
---	-------------------------	-----------------------------

U.O. GOVERNO CLINICO E ORGANIZZAZIONE OSPEDALIERA HOR	OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO		MODAZHOR_0050		
	MODULO AZIENDALE		Rev. 2	Data 18/02/2019	Pag 2 di 4
DICHIARAZIONE ESCLUSIVITA' DISPOSITIVO MEDICO IN VITRO					

Specificare se si tratta di:

- Diagnostici e reagenti
- diagnostici o reagenti dedicati ad apparecchiatura elettromedicale **già in uso**
Indicare numero inventario dell'apparecchiatura: _____
- diagnostici o reagenti dedicati a **nuova** apparecchiatura elettromedicale
(indicare modello _____)

APPARECCHIATURA DI PROPRIETA' :

- OSPEDALIERA
- UNIVERSITARIA PER SOLA ATTIVITA ASSISTENZIALE

- 1) **CARATTERISTICHE DI INFUNGIBILITÀ:** dichiaro che il prodotto è infungibile in quanto non ha alternativa terapeutica o diagnostica o tecnica. E' l'unico, prodotto che può essere utilizzato per (indicare con dettagliata relazione anche con evidenze scientifiche / pubblicazioni). (Art. 63, c. 2, lett. b del D. Lgs. 50/2016):

L'MLPA è l'unica tecnica che in una sola reazione permette di evidenziare la presenza di delezioni/amplificazioni nei geni di interesse per ogni singola patologia. La ditta ha brevettato tale metodica costruendo per tutti gli esoni dei geni interessati un'unica mix che ibridizzandosi con il DNA del paziente permette di valutarne il numero di copie (2 copie: DNA normale, 1 copia delezione, più copie amplificazione). Non esiste nessuna altra metodica in grado di ottenere lo stesso risultato in tempi approssimativamente di 24 ore, a costi relativamente ridotti.

Dichiaro, sotto la mia responsabilità, che i prodotti / test / reagenti alternativi sono stati testati e non risultano idonei per le ragioni sotto indicate:

NON ESISTONO PRODOTTI ALTERNATIVI

- ☞ Allegare dichiarazione **di privativa industriale per destinazione d'uso**
Brevetto n.: no 00200506.4
firmata in originale dal rappresentante legale della ditta non antecedente a 6 mesi.

- ☞ Casistica a cui è dedicato il prodotto:
Reagenti destinati alla ricerca di *Copy Number Variations* nella diagnosi genetico-molecolare delle Neuropatie Ereditarie, in particolare di CMT1A e HNPP.

- ☞ Indicare linee guida/ istruzione operativa riconosciuta da società scientifiche/ network nazionali o internazionali e allegare documentazione
Si allega pubblicazione: Stuppia L et al., 2012

Redatto U.O. HOR; U.O. HFA; U.O. HPR	Controllato RAQ U.O.	Approvato Direzione U.O.
---	-------------------------	-----------------------------

U.O. GOVERNO CLINICO E ORGANIZZAZIONE OSPEDALIERA HOR	OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO	MODAZHOR_0050		
	MODULO AZIENDALE DICHIARAZIONE ESCLUSIVITA' DISPOSITIVO MEDICO IN VITRO	Rev. 2	Data 18/02/2019	Pag 3 di 4

- 2) **MATERIALE DI CONSUMO E/O REAGENTI E/O ACCESSORI LEGATI AD APPARECCHIATURE E ATTREZZATURE IN PROPRIETÀ** che garantiscano, in esclusiva, l'attendibilità dell'esito dell'esame o siano unici per compatibilità con l'attrezzatura (Art. 63, c. 2, lett. b del D. Lgs. 50/2016).

Indicare le caratteristiche specifiche di compatibilità in modo dettagliato:

Allegare dichiarazione della Ditta produttrice firmata in originale dal rappresentate legale della ditta non antecedente a 6 mesi

Dichiaro inoltre che il Dispositivo Medico in vitro sopra richiesto è usato esclusivamente a scopo diagnostico e/o terapeutico (COME DA DICHIARAZIONE ALL. 1).

LE DICHIARAZIONI SONO RESE SEMPRE SOTTO LA PERSONALE RESPONSABILITA' PENALE, CIVILE, AMMINISTRATIVO-CONTABILE E DISCIPLINARE PREVISTA PER I DIPENDENTI DELLE AMMINISTRAZIONI PUBBLICHE (ART. 20 D.LGS. N. 29/93, COMMA 10).

Il Direttore/Responsabile
della U.O. richiedente

Mandich
I.R.C.C.S. - Ospedale Policlinico San Martino
Dipartimento Diagnostico Regione Liguria
Genetica Medica
Prof. Paolo Mandich
(timbro e firma)
Dipartimento di U.M. GE 11251
DIP. PLA 61M47 D969H

Data, 25/11/2020

Il Direttore di Dipartimento
Azienda Ospedaliera Universitaria
"San Martino" - Genova
Dipartimento dei Laboratori Biomedici
U.O. Anatomia Patologica Universitaria
Direttore: Prof. R. Fiocca

Redatto U.O. HOR; U.O. HFA; U.O. HPR	Controllato RAQ U.O.	Approvato Direzione U.O.
---	-------------------------	-----------------------------

U.O. GOVERNO CLINICO E ORGANIZZAZIONE OSPEDALIERA HOR	OSPEDALE POLICLINICO SAN MARTINO	MODAZHOR_0050		
	MODULO AZIENDALE	Rev. 2	Data 18/02/2019	Pag 4 di 4
DICHIARAZIONE ESCLUSIVITA' DISPOSITIVO MEDICO IN VITRO				

DICHIARAZIONE

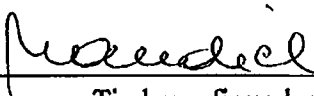
ALL. 1

Io sottoscritto Prof. Paola Mandich in qualità di Direttore della U.O. U92X a cui afferisce il Laboratorio Genetica Medica

DICHIARO

CHE I PRODOTTI INDICATI NELLA DICHIARAZIONE DI ESCLUSIVITA' (di cui al MODAZHOR_0050 allegato) VENGONO UTILIZZATI, SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ, PER USO DIAGNOSTICO. NON ESISTONO SUL MERCATO PRODOTTI EQUIVALENTI CON INDICAZIONE SPECIFICA PER USO DIAGNOSTICO ED I PRODOTTI RICHIESTI GARANTISCONO L'AFFIDABILITÀ DEI TEST.

In fede,


 Timbro e firma leggibile

I.R.C.C.S. - Ospedale Policlinico San Martino
 Sistema Sanitario Regione Liguria
 U.O. Genetica Medica
 Prof. Paola Mandich
 Direttore - O.M. GB 11251
 PIA 61M47 D969H

Data, 24.11.2020

Redatto U.O. HOR; U.O. HFA; U.O. HPR	Controllato RAQ U.O.	Approvato Direzione U.O.
---	-------------------------	-----------------------------



**SOLUZIONI PER LA RICERCA E
LA DIAGNOSTICA AVANZATA**

VIA CADORE, 14 00045 GENZANO DI ROMA
TEL: +39 06 93955058 FAX: +39 06 93955059
P.IVA 05158401009

I.R.C.C.S. OSP. POLICL. SAN MARTINO
LARGO ROSANNA BENZI 10
16132 GENOVA GE

DESTINAZIONE
D.I.N.O.G.M.I.
LAB. GENETICA MEDICA
L.GO R.BENZI 10
16132 GENOVA GE
Alla c.a.: Dr.ssa MANDICH

OFFERTA

Offerta N° P01492/20 del 23-11-2020

RIFERIMENTO: VS. RICHIESTA

Con riferimento alla Vostra richiesta, abbiamo il piacere di trasmetterVi in allegato la nostra offerta relativa ai prodotti di Vostro interesse.

- Vogliate cortesemente indicare sull'ordine il tipo di marcatura per i primer (FAM oppure Cy5).

Si fa presente che in caso di mancata indicazione i primer verranno inviati di default con marcatura FAM.

- N.B. Si comunica che a partire dal 01/01/2019 per gli ordini relativi al kit MLPA viene richiesto un contributo spese di spedizione in ghiaccio secco di 35€.

Per eventuali procedure tramite piattaforma MEPA, all'importo della merce verranno aggiunti € 20,00 quali spese accessorie.

CODICE	DESCRIZIONE	U.M.	Q.TÀ	PREZZO	SCONTO	IMPORTO IVA
P033-100R	SALSA MLPA P033 CMT1 PROBEMIX - 100 REACTIONS 100 rxs	PZ	5	1.127,00		5.635,00 22
EK1-FAM	SALSA MLPA EK1 REAGENT KIT 100 REACTIONS (6 VIALS) - 100 rxs	PZ	5	367,00		1.835,00 22
Spese Trasporto					35,00	22

Totale Preventivo: 7.470,00 + Spese = 7.505,00

CONDIZIONI DI FORNITURA:

- I.V.A. VS. CARICO
- PAGAMENTO: MANDATO 90 GG. D.F.
- BANCA: ABI 01030 CAB: 03200 - BANCA MONTE DEI PASCHI DI SIENA S.P.A.
- VALIDITA' 15-12-2020

NOTE:

- A) Per l'invio dei Vostri ordini o per informazioni tecniche e commerciali potete rivolgerVi agli indirizzi sopra indicati.
B) Vi preghiamo di consultare le ns. condizioni generali di vendita allegate alla presente.

In attesa del Vs. gradito ordine, restiamo a disposizione per ogni chiarimento ed uniamo i ns. più cordiali saluti.

RESNOVA S.r.l.

Servizio Clienti

CONDIZIONI GENERALI DI VENDITA - ITALIA

- 1) I prezzi di vendita sono quelli contenuti nei Listini prezzi in vigore al momento dell'ordine e si intendono al netto di IVA ed eventuali spese accessorie.
- 2) I prezzi si intendono **comprensivi di spese di trasporto ed imballo** solo per ordini di valore complessivo **superiore a 350 (trecentocinquanta) €** (IVA esclusa).

- **Minimo d'ordine:** La Resnova si riserva di accettare anche ordini di importo unitario inferiore a 350 € **procedendo però all'addebito di 35 €** quale contributo alle spese di spedizione ed imballo.
- **Kit MLPA:** Per le sole spedizioni di kit MLPA verrà applicato un contributo spese fisso di **35€**, **per ogni spedizione.**
- **Minimo fatturabile:** **Non potranno comunque essere accettati ordini di importo inferiore a 150 €.**

- 3) Gli ordini possono essere inviati, per posta, fax o posta elettronica con la seguente intestazione ed ai recapiti sotto indicati:

RESNOVA S.r.l.
Sede Centrale ed Amministrativa
Via Cadore, 14 - 00045 GENZANO RM - Italia €€
Partita I.V.A. : I-05158401009
Fax: 06/93955059 Tel.: 06/93955058
E-mail: ordini@resnovaweb.it oppure: resnova@pec.it Sito WEB: www.resnovaweb.com

- 4) Gli ordini dovranno riportare chiaramente i seguenti dati informativi del Cliente:
- a) Ragione Sociale completa;
 - b) Numero di partita IVA o Codice Fiscale;
 - c) Indirizzo di fatturazione;
 - d) Il CODICE UNIVOCO rilasciato dal SDI, e l'indirizzo PEC su cui si intende ricevere le nostre fatture elettroniche.
 - e) Indirizzo di consegna, se diverso da quello di fatturazione;
 - f) Recapito telefonico, E-mail e/o Fax;
 - g) Eventuali indicazioni aggluntive (orari di consegna, regimi IVA particolari, n° copie fatture richieste, etc.).
- 5) Nell'ordine dovranno inoltre essere indicati:
- a) Numero di codice del prodotto e quantità ordinata;
 - b) Eventuali sconti **solo se precedentemente concordati.**
 - c) I prezzi, le caratteristiche e la disponibilità dei prodotti sono soggetti a variazione senza ulteriore preavviso.
- N.B: E' preferibile quindi contattare sempre il nostro Ufficio Commerciale e/o Servizio Clienti prima di ogni ordine per conferma circa l'effettiva disponibilità del prodotto di interesse, specie per richieste di consegna urgenti.**
- 6) Le specifiche tecniche e le caratteristiche dei prodotti sono descritte nei vari Cataloghi prodotti delle diverse Società commercializzate da Resnova.
- 7) I Cataloghi delle varie Linee di prodotto, i Listini prezzi e le ulteriori informazioni tecniche possono essere richieste al Servizio Clienti Resnova (E-mail: servizioclienti@resnovaweb.it)
- 8) **La merce viaggia a rischio e pericolo dell'acquirente anche se spedita in porto franco.** La consegna dei prodotti si intende in ogni caso effettuata all'acquirente al momento della consegna al vettore, allo spedizioniere ovvero ad altri incaricati del ritiro. Ne farà fede il documento di vettura.
- 9) Eventuali reclami inerenti ad ordini di nostri prodotti saranno accettati solo **in forma scritta entro e non oltre 10 giorni lavorativi** dalla data di ricevimento della merce, riportando il numero dell'ordine, quello del documento di trasporto ed una chiara descrizione dell'anomalia riscontrata. Trascorso tale termine, i prodotti si intenderanno definitivamente accettati **con decadenza di ogni diritto od azione al riguardo.**
- 10) **Non verranno accettate restituzioni di merce inviateci senza nostra preventiva autorizzazione scritta.** In tale eventualità la merce verrà rispedita al mittente con addebito delle spese relative e decadrà il diritto di contestazione previsto al punto 9).
- 11) I pagamenti delle somme dovute dovranno pervenire direttamente alla nostra Società nei tempi e nei modi concordati e **non potranno essere in nessun caso e per nessuna ragione ritardati o sospesi.**
- 12) Gli importi dovuti dovranno essere trasmessi integralmente **al netto di ogni eventuale spesa di trasferimento** (spese bancarie per Ricevute o Bonifici, di vaglia od altro) essendo tali oneri **totalmente a carico dell'acquirente.** Eventuali detrazioni indebitamente effettuate sugli importi dovuti verranno ri-addebitate al Cliente, con l'aggravio dei costi aggiuntivi.
- 13) La RESNOVA si riserva il diritto di applicare gli interessi di mora, al tasso commerciale, nel caso di pagamenti effettuati oltre i termini concordati ed accettati dal Cliente al momento dell'ordine dei prodotti.
- 14) Per qualunque controversia sarà competente il Foro di Roma - Italia.

A chi di interesse

Genzano di Roma, 5 Ottobre 2020

DICHIARAZIONE

La sottoscritta Società **RESNOVA S.r.l.**, con Sede Centrale ed Amministrativa in Via Cadore, 14 a Genzano di Roma RM,

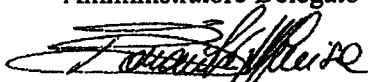
DICHIARA

- a) che la Società **MRC-Holland B.V.** con sede legale in Hudsonstraat 68hs 1057SN ad Amsterdam (NL) è produttrice **dei kits MLPA** (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, sviluppati interamente nei propri Laboratori e coperti da numerosi brevetti, ed è la **sola Azienda a livello mondiale** a produrre tali kit e
- b) che la Società **RESNOVA S.r.l.**, è la **distributrice diretta unica ed esclusiva per l'Italia dei prodotti "MLPA"** e che non esiste, al momento, nessun rivenditore a livello locale o nazionale da noi autorizzato per la rivendita dei medesimi prodotti.

Si dichiara inoltre che, sulla base delle nostre conoscenze, non esistono disponibili in commercio, allo stato attuale, tecniche similari.

In fede.

RESNOVA S.r.l.
Amministratore Delegato


Maria Luisa Bonardi

RESNOVA S.r.l.

Sede Centrale ed Amm.va: Via Cadore, 14 - 00045 GENZANO di Roma RM - Italy - Tel.: 06 93955058 - Fax: 06 93955059
Sito WEB: www.resnovaweb.com Email: resnova@resnovaweb.it

C.F. / P.IVA / Iscriz. Registro Imprese RM: n° 05158401009 - R.E.A. Roma n° 852194



To whom It may concern:

J.P. Schouten, as director of MRC-Holland B.V. with legal address in Willem Schoutenstraat 1, 1057DL Amsterdam, the Netherlands and Chamber of Commerce nr. 34204804 (fiscal V.A.T. Identification number NL813037761B01) hereby

DECLARES

That MRC-Holland B.V. is the sole company worldwide that produces MLPA kits and RESNOVA S.r.l., with commercial address in Via Cadore, 14- 00045 GENZANO di Roma RM – Italy, is the sole authorized exclusive distributor of such kits in the Italian territory.

A chi di Interesse:

Con la presente, il dr. J.P. Schouten, nella propria qualità di Direttore della MRC-Holland BV, con Sede legale in Willem Schoutenstraat 1 1057DL ad Amsterdam (Olanda), Iscritta alla Camera di Commercio N° 34204804 e Partita IVA n° NL813037761B01, qui di seguito DICHIARA che la MRC-Holland B.V. è la sola Società a livello mondiale produttrice dei kits MLPA e che la Società RESNOVA S.r.l., avente Sede in Via Cadore, 14 – 00045 GENZANO di Roma RM, è il solo distributore esclusivo autorizzato alla vendita di tali kits in Italia.

Amsterdam, 5 October 2020

Dr. J.P. Schouten
Director, MRC-Holland

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, sweeping strokes that form a stylized representation of the name J.P. Schouten.

MRC-Holland b.v. • Willem Schoutenstraat 1 • 1057 DL Amsterdam • The Netherlands
Phone: +31 88 8657200 • Fax: +31 88 8657201 • E-mail: info@mlpa.com • Web: www.mlpa.com VAT: NL813 037
761 801 • Trade register Amsterdam: 34204804

Bank: ABN-AMRO Amsterdam • IBAN: NL56ABNA 0418 9650 56 • BIC/Swift: ABNANL2A

Review

Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases

Liborio Stuppia *, Ivana Antonucci, Glandomenico Palka and Valentina Gatta

Department of Oral Sciences, Nano and Biotechnologies, "G. d'Annunzio" University, Via dei Vestini 31, 66013 Chieti, Italy; E-Mails: i.antonucci@unich.it (I.A.); gdpalka@unich.it (G.P.); v.gatta@unich.it (V.G.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: stuppia@unich.it;
Tel.: +39-0871-3555300; Fax: +39-0871-3555341.

Received: 30 December 2011; in revised form: 28 February 2012 / Accepted: 29 February 2012 / Published: 8 March 2012

Abstract: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) assay is a recently developed technique able to evidence variations in the copy number of several human genes. Due to this ability, MLPA can be used in the molecular diagnosis of several genetic diseases whose pathogenesis is related to the presence of deletions or duplications of specific genes. Moreover, MLPA assay can also be used in the molecular diagnosis of genetic diseases characterized by the presence of abnormal DNA methylation. Due to the large number of genes that can be analyzed by a single technique, MLPA assay represents the gold standard for molecular analysis of all pathologies derived from the presence of gene copy number variation. In this review, the main applications of the MLPA technique for the molecular diagnosis of human diseases are described.

Keywords: gene copy number; MLPA; CNV; molecular diagnosis; genetic disease

1. Background

Although the majority of human hereditary diseases are due to abnormalities in the DNA sequence of specific genes (point mutations), gene deletions or duplications represent a relevant portion (about 5%) of all disease-causing mutations, and in some cases are the most frequent cause of a genetic disease, such as in the cases of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) or Spinal Muscular Atrophy (SMA) [1–3]. The correct characterization of gene deletions and duplications is a crucial point in order

to identify the genotype phenotype correlation. In fact, entire and partial gene deletions/duplications can produce a completely different phenotypic effect. A complete gene duplication can lead to a disease due to the presence of an extra copy of the gene, while a partial duplication can lead to a loss of function for that gene copy, such as in the case of DMD where duplications affect some exons within the gene, but not the entire gene. Moreover, the complete absence of a protein or the presence of a partially deleted protein, lead in the first case to DMD and in the second one to BMD (see Section 3). In addition, it has been recently demonstrated that the genetic basis of several human diseases is related to the Copy Number Variation (CNV), generally defined as a DNA segment, longer than 1 kb, showing a variable copy number compared with a reference genome [4]. At present, the real proportion of genetic diseases caused by CNVs is unknown, but it may be substantial, when considering that it has been suggested that germline CNVs can also predispose an individual to syndromic malformations [5]. Neither conventional cytogenetic analysis or DNA sequencing is able to detect gene deletions/duplications and CNVs. As a consequence, these mutations must be investigated by using specific approaches. At the beginning, the detection of gene deletions/duplications was mainly based on the use of Southern Blot and FISH techniques. However, both approaches are time consuming, with low throughput analysis, and are not able to detect small intragenic rearrangements. On the other hand, CNV detection is mainly based on the use of array Comparative Genomic Hybridization (CGH), but results provided by this approach must in some cases be validated by other quantitative PCR methods, such as microsatellite genotyping, long-range PCR or different array CGH or genotyping platform [4].

Among the different approaches used in recent years for the detection of gene deletions/duplications or for the validation of array CGH results in the analysis of CNVs, particular interest has been devoted to the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) assay (Table 1) [6]. This technique is able to analyze in a single reaction up to 50 DNA sequences and to detect copy number variation of specific genes, including small intragenic rearrangements. So far, over 300 probe sets are commercially available from MRC Holland [6], specific for a very large range of common and rare genetic disorders. MLPA assay has become in a few years a widely used technique in laboratories performing genetic testing for the molecular diagnosis of several diseases. A search in the Pubmed database using the word "MLPA" displays the presence of a total of 978 scientific articles, of which 45 in 2005, 74 in 2006, 124 in 2007, 170 in 2008, 163 in 2009, 229 in 2010, and 203 up to October 2011, thus demonstrating the growing interest devoted by the scientific community to this technique. In this review, we will describe the principles of the MLPA technique and the main applications of this assay in the molecular diagnosis of the most important congenital and acquired genetic diseases.

Table 1. Comparison between Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) Assay and other methods for the detection of gene deletions/duplications.

Method	Advantages	Disadvantages
MLPA	Detects small rearrangements Up to 40 targets High throughput Low cost	Cannot detect copy neutral loss of heterozygosity. May have problems with mosaicism, tumor heterogeneity, or contamination with normal cells.
FISH	Detects balanced rearrangements Detects mosaicism Detects tumor heterogeneity Can quantify multiple copies	Cannot detect copy neutral loss of heterozygosity. Cannot detect small rearrangements (e.g., deletions <100 kb or duplications >500 kb). Limited number of targets and throughput.
Quantitative/Sq-PCR	Detects small rearrangements and even point mutations Can quantify multiple copies Low cost	Test optimization and efficiency is a concern. Limited number of targets. May have problems with mosaicism, tumor heterogeneity, or contamination with normal cells.
Southern blot	Detects small rearrangements Detects mosaicism	Cannot detect copy neutral loss of heterozygosity. Not quantitative. Laborious and time consuming Limited number of targets and throughput.
CGH array	Can detect very small rearrangements Can probe entire genome Low cost per data point	Cannot detect copy neutral loss of heterozygosity. Costly equipment and reagents Low throughput
SNP array	Can detect copy neutral loss or heterozygosity Can probe entire genome Low cost per data point	Cannot detect small rearrangements (e.g., deletions or duplications <100 kb). Costly equipment and reagents Low throughput

2. Principles of MLPA Assay

MLPA is a multiplex PCR assay that utilizes up to 40 probes, each specific for a different DNA sequence (mainly exons of a specific gene of interest), to evaluate the relative copy number of each DNA sequence. Each probe is composed of two half-probes (5' and 3' half-probes), consisting of a target-specific sequence and a universal primer sequence allowing the simultaneous multiplex PCR amplification of all probes [6]. In addition, one or both half-probes contain a stuffer sequence allowing differentiation during electrophoresis of the length of the probe itself, and, as a consequence, the size of the amplification product. The MLPA reaction can be divided into five steps: (1) DNA denaturation and probes hybridization; (2) ligation reaction; (3) PCR amplification; (4) separation of amplification products by electrophoresis; (5) data analysis. In the first step, the DNA is denatured and incubated

with a mixture of MLPA probes. The two half probes are able to recognize contiguous target-specific sequences, and only in the presence of a perfect match without a single gap, after hybridization, can the two half-probes be ligated and amplified. PCR amplification is performed using only one PCR primers pair, one of which is fluorescently labelled. Because only ligated probes will be amplified during the subsequent PCR reaction, the number of probe ligation products is a measure of the number of target sequences in the sample. PCR products are then separated by size using Capillary Electrophoresis under denaturing conditions. The height or area of the PCR derived fluorescence peaks is measured, quantifying the amount of PCR product after normalization and comparing it with control DNA samples, thus indicating the relative amount of target DNA sequence in the input DNA sample [6,7]. The quality of the reaction is assessed by the presence of control peaks providing information about the efficiency of the amplification and the correct amount of DNA used for the reaction. A key point in the MLPA reaction is that PCR does not amplify the target sequences, but the ligated probes. Thus, a single pair of PCR primers is used for the amplification, while typical multiplex PCR requires the use of specific PCR primers for each target sequence.

A crucial point in the use of MLPA assay as a genetic test for the molecular diagnosis of gene deletions/duplications is the interpretation of the MLPA results. Homozygous or hemizygous deletions are clearly evidenced by the absence of the specific peaks for the target gene, in the presence of a normal amplification of control probes. On the other hand, heterozygous deletions, duplications and CNVs produce a different height and/or area of the relative peaks, and the interpretation of these results can be challenged by the presence of different efficiencies of the PCR reaction among the different probes and sample-to-sample variations. As a consequence, different MLPA data analysis strategies have been developed to allow a correct interpretation of the reaction raw data. Among these, the most widely used is the Coffalyser software, an Excel-based program able to perform all data normalization steps and corrections for signal sloping. Also other software have been recently released [8–10].

3. MLPA Applications in Genetic Testing

3.1. MLPA and Neuromuscular Disorders

Several types of inherited neuromuscular disorder are due to deletions or duplications of specific genes. Among these, Dystrophinopathies (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD, and Becker Muscular Dystrophy, BMD), Spinal Muscular Atrophy (SMA), Charcot Marie Thoot (CMT) disease and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies (HNPP) represent a large portion of all mendelian neuromuscular disease for which genetic testing is routinely carried out for diagnostic purposes, for the identification of healthy carriers and for the evaluation of the recurrence risk. For this reason, MLPA assay represents a powerful tool for the study of these different conditions.

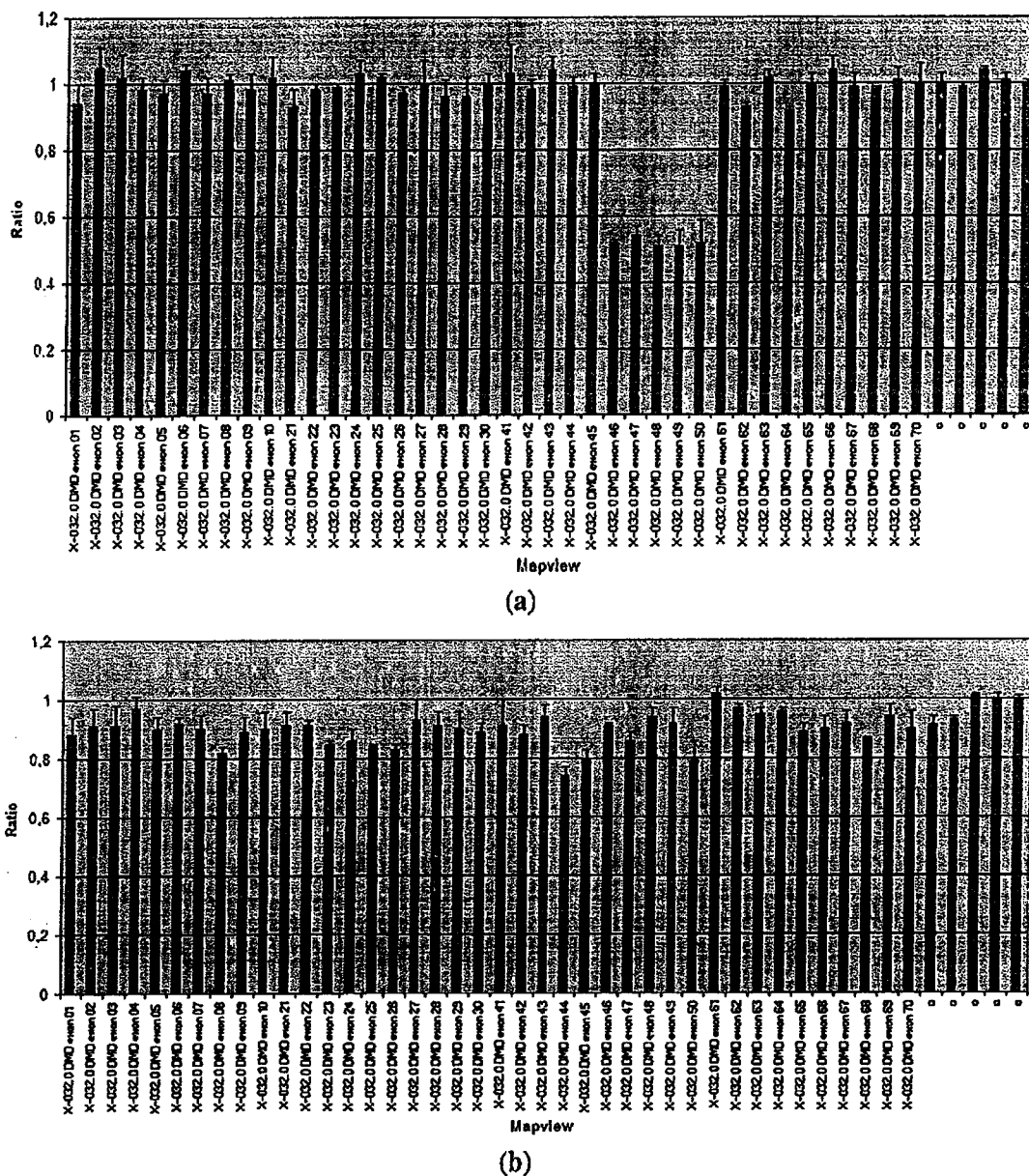
3.1.1. Dystrophinopathies

DMD and BMD are X-linked diseases affecting 1:3500 and 1:18,000 birth males, respectively, both caused by mutations of the *DMD* gene on Xp21.2. In about 65% of DMD cases and up to 85% of BMD cases the pathogenic mutation is represented by large deletions of the *DMD* gene, while duplications of

the same gene account for 5–10% of cases and point mutation are responsible for the remaining 25–30% of cases [2,11–14]. In affected males, about 98% of deletions are easily detectable using a multiplex PCR approach, able to analyze two hot spot regions (exons 2–20 and 44–53) [2,15,16]. However, this approach is not able to detect heterozygous deletions in female carriers, which represents a crucial point for the calculation of the recurrence risk of the disease within a family and the prevention of the birth of affected children. In fact, about one third of DMD cases are due to “*de novo*” mutations in children whose mothers are not healthy carriers and are thus at very low risk of recurrence of the disease. Moreover, *DMD* gene duplications cannot be detected by multiplex PCR approach either in affected males or in female carriers. As a consequence, a number of different approaches has been suggested for the identification of DMD duplications and heterozygous deletions, such as linkage analysis [17,18], quantitative analysis of gene dosage [19,20], FISH analysis [21,22], Entangled Solution Capillary Electrophoresis (ESCE) [23], Primed *In Situ* Labeling (PRINS) combined with FISH [24], Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) [25], quantitative real time PCR [26] and CGH array [27,28]. MLPA analysis, based on the use of two SALSA kits able to investigate all the exons of the *DMD* gene and several control probes on sex chromosomes and autosomes, have been used by several groups in the study of DMD and BMD, both in affected patients and in female carriers [29–35]. All these studies reported MLPA as a simple, rapid and reliable tool in the screening of deletions and duplications of the *DMD* gene, based on its ability to simultaneously hybridize and amplify all of the 79 *DMD* exons in only two reactions tubes, allowing a reduction in labor intensity compared with ESCE, PRINS, real-time PCR and MAPH. The usefulness of MLPA assay is evident in the study of suspected carrier females, where this approach represents a first choice method for the detection of heterozygous deletions/duplications and thus for the assessment of the carrier status in female relatives of affected males (Figure 1).

In the study of affected patients, the MLPA ability to analyze all of the *DMD* exons provides high sensitivity and specificity and a sharp identification of the breakpoints of the rearrangements. This latter represents a crucial point in the management of *DMD* affected patients, since the determination of the full extent of the *DMD* gene deletions/duplications is critical knowledge for possible gene therapy strategies based on the skipping of specific exons involved in the deletion [32]. However, although some authors suggested that the identification of all exons involved in the deletion is critical for predicting the progression of the disease [32], it must be stressed that MLPA analysis is not able to provide information about the “in frame” or “out of frame” status of the deletions, which represents the crucial difference between DMD and BMD causing mutations. The frame-shift mutations in DMD patients result in the complete absence of dystrophin in their skeletal muscle because the translational reading frame of the mRNA is not maintained, whereas muscle tissue from BMD patients contains truncated dystrophin translated from the in-frame mRNA. The difference between “in frame” or “out of frame” deletions can be due to the involvement of even a single nucleotide, and is thus not detectable by MLPA, able to evidence the involved exons but not to identify the specific break points of the deletion.

Figure 1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis of the Duchenne Muscular Dystrophy (*DMD*) gene. Abscissa represents *DMD* gene and control probes (c); ordinate represents fluorescent intensity of amplification. For each probe, the ratio <0.75 stands for deletion; and the ratio >1.3 stands for duplication. (a) MLPA analysis showing a heterozygous deletion of exons 46–50 (ratio < 0.75) of the *DMD* gene in the mother of an affected patient; (b) Normal control ($0.75 < \text{ratio} < 1.3$).



A crucial point in the interpretation of MLPA results is represented by the detection of deletions involving a single *DMD* exon. In these cases, in fact, the apparent deletion could actually consist of a change in the exon sequence hampering the correct hybridization of the specific probe. This sequence variation can be represented either by a *DMD* pathogenic point mutation or by a polymorphism not

affecting gene function. Thus, apparent single exon deletions detected by MLPA should be checked by an independent method [31].

In order to further improve the throughput and speed of the MLPA approach in the diagnosis of *DMD* gene rearrangements, a modification of the original protocol has been described involving the use of a 96-well flow-through microarray system for the detection of the different probes, allowing the hybridization to be completed in 5 to 30 min [36]. In addition, a possible improvement in the detection rate of MLPA analysis is represented by the use of probe multiplexes, including specific probes for common point mutations of the *DMD* gene, allowing both full dosage analysis and partial point mutation analysis in a single test [37].

3.1.2. SMA

SMA (classified in SMA I, II and III according to the severity of symptoms) is a neuromuscular disease characterized by symmetric proximal muscle weakness due to degeneration of the anterior horn cells of the spinal cord. SMA is inherited as an autosomal recessive trait with a prevalence of about 1 in 10,000 newborns and a carrier frequency of 1 in 50 [38]. All the three SMA types are caused by homozygous mutations of the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene (5q13), which in about 95% of cases is represented by the functional absence of this gene due to deletion or its conversion to *SMN2*. This latter gene, mapped within the SMA critical region, is not directly related to the disease, but is considered a disease-modifying gene because its copy number relates to the disease severity and survival of affected patients [39–42].

The standard molecular diagnosis of SMA is based on a PCR-RFLP test, able to detect homozygous *SMN1* loss [43]. However, this method does not detect heterozygous *SMN1* loss, and cannot be used for identifying healthy carriers, which can be checked by linkage or quantitative analysis of *SMN1* copy number. As in the case of the *DMD* gene, also in the case of SMA several additional techniques have been proposed for the identification of healthy carriers, including LightCycler PCR [40], TaqMan Technology [44], and denaturing high-performance liquid chromatography [45].

MLPA assay for the molecular diagnosis of SMA is based on a kit containing several probes for the SMA critical region, including specific probes for *SMN1* and *SMN2* genes, probes able to hybridize both genes and other probes for sequences mapped either within the SMA critical region (*NAIP*, *GTF2H2*, *N-cadherin-like*, *CDH6* and *RAD17* genes) or on other autosomal regions. Due to this specific probe set, MLPA assay for the SMA critical region is able to detect the copy number of both *SMN1* and *SMN2* genes. As a consequence, both homozygous and heterozygous *SMN1* deletions or conversions to *SMN2*, can be detected, allowing the diagnosis of affected patients or healthy carriers. Moreover, the assessment of *SMN2* copy number can provide useful information in order to evaluate the genotype-phenotype correlation. Different groups have investigated the efficiency of MLPA in the molecular diagnosis of SMA, both in affected patients and in healthy controls [46–51]. Based on the obtained results, MLPA analysis can be considered as the gold standard technique in the molecular diagnosis of SMA, providing an easy, fast, and high throughput system for analyzing the SMA critical region both in affected patients and in healthy carriers. The advantages of MLPA assay have been particularly stressed in a study of Arkblad *et al.*, showing that this technique allowed the identification of a previously unreported, partial deletion of *SMN1* in two apparently unrelated Swedish families, which would not have been

detected by conventional diagnostic methods [47]. Due to its ability to simultaneously analyze several samples, MLPA analysis can be used for population screening of SMA healthy carriers in specific conditions, such as in a couple undergoing Assisted Reproduction Techniques. In this light, very recently the usefulness of *SMN1* genotyping in carrier screening for SMA has been suggested by the American College of Medical Genetics, and MLPA approach has been used in this context [52]. The simultaneous analysis of different sequences within and outside the SMA critical region provides an accurate control system, reducing the risk of false positive and false negative results. Moreover, a quick MLPA-based assay for the detection of *SMN1* and *SMN2* copy numbers with high specificity and low complexity has been recently developed [53]. On the other hand, MLPA assay is not able either to detect *SMN1* point mutations or to disclose the presence of two *SMN1* copies in the same allele. However, these conditions account for less than 5% of SMA cases.

3.1.3. CMT and HNPP

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most common inherited peripheral neuropathy. Among the different CMT forms, CMT1 is characterized by the presence of demyelinating neuropathies with severe reduction in the motor nerve conduction velocities. CMT1A is the most common type, representing about 70 to 80% of all CMT, and is transmitted as an autosomal dominant trait. The majority of CMT1A cases are caused by a tandem duplication of a 1.5-Mb region encompassing the *PMP22* gene on 17p11.2-p12 [54]. Deletions involving the same gene cause a distinct genetic disease, namely Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies (HNPP) [55]. The incidences of each CMT1A and HNPP are estimated to be as high as 1 in every 2500 individuals [56]. The usefulness of MLPA assay in the detection of *PMP22* duplications and deletions for the molecular diagnosis of CMT1A and HNPP, respectively, has been investigated by Slater *et al.* in a study carried out by comparing the performance of this technique with one of interphase FISH analysis. Authors evidenced a very high concordance of FISH and MLPA, since only one of 50 paired tests produced a false result with FISH analysis, and concluded that MLPA assay represents a robust, simple, and cost-effective approach for the molecular diagnosis of CMT1A and HNPP [57]. Thus, this technique is now currently used for the molecular diagnosis of *PMP22* duplications (Figure 2). Moreover, MLPA analysis has been recently used in studies aimed at the identification of alterations of the 17p12 region not involving the *PMP22* gene [58,59].

3.2. MLPA and Analysis of the *SHOX* Gene

The Short Stature Homeobox containing gene (*SHOX*), mapped within the Pseudoautosomal Region 1 (PAR 1) of the X and Y chromosomes, is involved in the regulation of growth and is related to different diseases such as Turner syndrome (TS), Idiopathic Short Stature (ISS), Leri Weill dyschondrosteosis (LWD) and Langer disease (LS) [60]. The majority of mutations causing *SHOX* deficit is represented by deletions within the coding region of this gene or involving a region mapped several hundred kilobases downstream of the coding region and containing conserved non-coding DNA elements (CNE) acting as regulatory elements (enhancer) of *SHOX* [61–64]. *SHOX* mutations affect one to two in 1000 individuals, representing the most common mendelian disease in the Caucasian population [65]. Due to the high frequency of alterations of the *SHOX* gene and to the recently

