

## **PLIEGO DE CONDICIONES TÉCNICAS QUE REGIRÁ EL PROCEDIMIENTO ABIERTO PAACP022016 CONVOCADO PARA LA CONTRATACIÓN DEL SERVICIO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN EN TRATAMIENTO CON FÁRMACOS ANTI-TNF**

### **1. OBJETO DE LA CONTRATACIÓN**

El presente documento describe los requisitos y especificaciones que deben cumplir los candidatos con respecto al servicio de análisis de secuenciación de genoma completo (*Whole-Genome Sequencing, WGS*), así como el análisis de los datos bioinformáticos obtenidos a cargo del proyecto "*Predicción de respuesta a corto y largo plazo al tratamiento con fármacos anti-TNF en pacientes con enfermedad de Crohn (EC). Estudio Predicrohn*". 60 muestras de DNA genómico extraído de muestras de sangre periférica congelada de pacientes con EC en tratamiento con fármacos anti-TNF.

### **2. FINANCIACION DEL SERVICIO**

El Contrato se financia por el Instituto de Salud Carlos III, por el PN de I+D+I 2008-2011 y el ISCIII –Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación. Este proyecto está cofinanciado con fondos FEDER. El proyecto tiene número de expediente PI12 02557

### **3. ESPECIFICACIONES DEL SERVICIO**

El adjudicatario deberá entregar todos los resultados, incluidos los datos obtenidos en el análisis de WGS basado en la plataforma *Illumina*, el análisis bioinformático posterior, así como el remanente de muestras originales, y el material y activos generados o adquiridos durante el servicio (en lo sucesivo,

Pliego de Condiciones Técnicas para la Contratación  
Procedimiento abierto nº PAACP02/2016

el "Servicio"). Estas especificaciones deberán ser cumplidas por el adjudicatario de este Servicio.

El Servicio se realiza bajo confidencialidad. El proveedor garantizará que el servicio se realizará de acuerdo a lo establecido Ley 14/2007, del 3 de julio, de Investigación Biomédica y el Real Decreto 1716/2011 del 18 de noviembre y en la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. La Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario de La Princesa tendrá derechos ilimitados y exclusivos de los resultados, incluyendo el derecho a solicitar la protección de patentes.

Todos y cada uno de los resultados obtenidos en la prestación del Servicio así como cualquier derecho de propiedad intelectual de los mismos serán propiedad exclusiva de la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario de La Princesa.

**3.1. Material suministrado por el grupo de investigadores del estudio Predicrohn**

El grupo de Gastroenterología de la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario de La Princesa proporcionará 60 muestras de DNA genómico extraído de muestras congeladas de sangre periférica de pacientes con EC en tratamiento con fármacos anti-TNF.

Las muestras se enviarán en nieve carbónica mediante mensajero. Este servicio correrá a cargo del adjudicatario.

**3.2. Incluido en el Servicio por parte del proveedor.**

Se requiere el servicio de un centro con experiencia en la realización de secuenciación de genoma completo y el análisis bioinformático de

Pliego de Condiciones Técnicas para la Contratación  
Procedimiento abierto nº PAACP02/2016

este tipo de datos. Es imprescindible que la empresa demuestre haber trabajado en secuenciación WGS durante al menos 3 años.

Control de calidad de las muestras.

- Preparación de las librerías de DNA.
- Secuenciación genoma completo (*Whole Genome Sequencing*)
- Análisis bioinformático de los datos obtenidos.
- Proporcionar todos los reactivos necesarios para la realización del servicio, excepto las muestras de DNA genómico.
- Facilitar los entregables (control de calidad, archivos procesados y resultados estadísticos finales).

#### **4. OTRAS ESPECIFICACIONES DEL SERVICIO**

##### **4.1. Descripción general**

El proveedor es responsable de la buena calidad del Servicio, en concreto en los procedimientos de manipulación de las muestras biológicas, control de calidad, preparación de librerías, secuenciación masiva y el análisis bioinformático de los resultados, de conformidad con las especificaciones técnicas que se describen a continuación.

Especialmente, el Proveedor asume toda y cualquier responsabilidad por los daños y perjuicios que pudieran derivarse del uso, almacenamiento o eliminación que ocurran durante el Servicio.

El Servicio deberá realizarse en un espacio debidamente equipado. El Proveedor es responsable de la calidad, la precisión y la rectitud del Servicio que, en ningún caso debe exceder la variabilidad especificada en los requisitos específicos..



## 4.2. Requerimientos técnicos específicos

El procedimiento se divide en diferentes etapas.

Es necesaria la realización de los siguientes pasos con los reactivos especificados:

### Secuenciación WGS

1. Control de calidad de los 60 DNAs genómicos obtenidos de sangre total incluyendo la cuantificación mediante ensayos fluorométricos (e.g. Qubit(R), Picogreen(R)) y la integridad mediante gel de agarosa. Se requerirá un input de DNA genómico mínimo de 600ng y hasta 1ug. Aquellas muestras que no tengan una cantidad mínima (600 ng) y/o que presente degradación, serán descartadas. El proveedor informará al equipo investigador del total de muestras que superan el QC para permitir la restitución de las muestras de baja calidad o con material insuficiente.
2. **Fragmentación** del DNA genómico para la generación de librerías para generar tamaños de inserto de ~360pb. Puesto que el tamaño de inserto mejora el rendimiento de la librería, permitiendo lecturas de mayor tamaño en la plataforma *Illumina HiSeq X*, se requerirá el uso de instrumentos que fragmenten el DNA a este tamaño promedio de forma sistemática y reproducible. Este control de calidad se realizará mediante sistemas de biochips de alta densidad basados en gel de agarosa.
3. Generación de librerías de DNA: el DNA fragmentado de cada paciente se utilizará para la generación de librerías de DNA en base al protocolo de la plataforma *Illumina*. El rendimiento de cada etapa de generación de las librerías se realizará mediante fluorescencia. La comprobación de los tamaños de fragmentos generados así como su

Pliego de Condiciones Técnicas para la Contratación  
Procedimiento abierto nº PAACP02/2016

distribución se realizará mediante sistemas biochips de alta densidad basados en gel de agarosa. Aquellas librerías que no presenten una distribución de insertos normal alrededor del pico de 350 pb serán descartadas del análisis.

4. Secuenciación mediante la plataforma Illumina HiSeq X. Se realizarán pools de 8 (o más) muestras para reducir los sesgos técnicos introducidos por el instrumento y/o los reactivos. Cada muestra será codificada mediante códigos de barras que permitan >18.000 códigos únicos en las dos dimensiones. Se generarán >360 millones de lecturas "paired-end", cada una de 150 pb, por cada muestra de cada paciente.
5. **Cobertura:** >30x sobre el genoma humano de referencia (hg38).
6. Análisis bioinformático: el análisis El análisis bioinformático será realizado por el proveedor. Este análisis consistirá en tres etapas principales:

A) Alineamiento y generación de variantes: las lecturas de las secuencias de DNA genómico generadas por la plataforma de secuenciación serán demultiplexadas y se enmascararán los adaptadores para generar los archivos fastq. Los archivos *fastq seq* alinearán contra el genoma humano de referencia (hg38) mediante el algoritmo Burrows-Wheeler (BWA). Los pares de lecturas que no mapeen a menos de 2 desviaciones estándar del tamaño promedio de la librería se descartarán. El proveedor generará informes sobre la tasa de alineación y el *coverage* (i.e. cobertura de la secuencia) de todo el genoma por cada una de las muestras. El *coverage* debe representar, como mínimo, el 80% del genoma de cada individuo. Se eliminarán lecturas con posiciones duplicadas, de realizará el realineamiento de *indels* y se recalibrará la calidad de cada base. Se generarán los archivos de datos brutos por variante Variant Call Format (VCF). Aquellas posiciones del genoma que tengan una menor calidad o sean falsos positivos (i.e. scores de calidad bajos (<50), *allelic imbalance* (>0.75), lecturas largas de homopolímeros

Pliego de Condiciones Técnicas para la Contratación  
Procedimiento abierto nº PAACP02/2016

(>3) y/o baja calidad por bajo cubrimiento (<5x)). El informe de la alineación así como los archivos VCF se reportaran por el proveedor al equipo investigador.

B) Control de calidad: una vez generados los archivos VCF, se llevarán a cabo diferentes estadísticos sumarios para evaluar la calidad del WGS. Estos incluirán: ratio Ti/Tv (valor cercano a 2.1, descartando sitios = 0.5), missingness (máximo 2%), ratio ns/ss (en exones, cercano a 1), ratio sitios heterozigotos/sitios homozigotos y singletons. La distribución de estos estadísticos a lo largo de las 60 muestras permitirá identificar casos con valores extremos donde la secuenciación no ha sido óptima (i.e. *outliers*). De encontrarse, estas muestras serán descartadas del estudio. El resultado del control de calidad se reportará como informe al equipo investigador.

C) análisis de asociación: el proveedor llevará a cabo el análisis de asociación estadística por cada región génómica mediante análisis combinados de test "burden" y test basado en "kernel". El análisis combinado utilizando el método combinado generará valores *P* de significación que serán reportados junto con un informe de anotación biológica. En este último análisis, para aquellas regiones más significativas ( $P < 1e-3$ ) se caracterizará la función biológica de la región asociada (génica y/o intergénica) mediante las bases de datos del NCBI, UCSC y ENSEMBL. En las regiones nominalmente significativas ( $P < 0.05$ ) se evaluará el enriquecimiento funcional mediante el test *GeneSet Enrichment Analysis* (GSEA).

Todas estas etapas incluidas en los requerimientos técnicos específicos y cualquiera que se derive del servicio que así lo requiera deberán pasar los controles de calidad pertinente.



## **5. OTRAS CONSIDERACIONES O CARACTERÍSTICAS COMPLEMENTARIAS QUE SE EXIGEN**

- 5.1. Los licitadores deberán presentar la oferta a la totalidad del servicio, pero desglosarán en su oferta cada uno de los ítems que la componen, con especificación de plazos.
- 5.2. Las muestras de DNA genómico que no superen los controles de calidad establecidos por Illumina no serán procesadas.
- 5.3. Con el fin de evitar el posible efecto *batch* (i.e. sesgo por lote o grupo), las muestras deberán procesarse en paralelo (control de calidad, preparación de librerías, captura y secuenciación) y con reactivos del mismo lote.
- 5.4. El servicio debe quedar garantizado de forma que los posibles errores técnicos producidos durante la obtención de resultados serán subsanados por parte del adjudicatario sin coste adicional.
- 5.5. El inicio de la prestación del servicio (condicionado a la recepción de muestras y reactivos por parte de las casas comerciales) tendrá lugar en quince días a la formalización del contrato.
- 5.6. Plazo y lugar de prestación del servicio: El servicio se prestará en las instalaciones del adjudicatario y deberá haber sido ejecutado en los 2 meses posteriores al inicio de la firma del contrato.
- 5.7. De acuerdo con lo que establece el artículo 10 de la Ley Orgánica 15/1996, de 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, la empresa adjudicataria, así como el personal que adscriba a la prestación del servicio, quedan obligados a guardar secreto respecto aquellos datos que conozca por razón de la prestación de los servicios que se contraten y a no comunicarlos a terceras personas, obligaciones que subsistirán incluso en el caso de que finalizase su relación contractual con la Fundación de Investigación del Hospital de La Princesa.

## **6. NORMAS DE EJECUCION DEL SERVICIO Y ENTREGA**

Pliego de Condiciones Técnicas para la Contratación  
Procedimiento abierto nº PAACP02/2016

El adjudicatario es responsable de la buena calidad del Servicio, en concreto en los procedimientos de manipulación de las muestras biológicas, control de calidad, preparación de librerías, secuenciación masiva y el análisis bioinformático de los resultados, de conformidad con las especificaciones técnicas que se describen a continuación.

Especialmente, el adjudicatario asume toda y cualquier responsabilidad por los daños y perjuicios que pudieran derivarse del uso, almacenamiento o eliminación que ocurran durante el Servicio.

El Servicio deberá realizarse en un espacio debidamente equipado. El adjudicatario es responsable de la calidad, la precisión y la rectitud del Servicio que, en ningún caso debe exceder la variabilidad especificada en los requisitos específicos..

El inicio de la prestación del servicio estará condicionado a la recepción de muestras que tendrá lugar en quince días a la formalización del contrato.

Cualquier gasto derivado del servicio será a cargo del adjudicatario.

El adjudicatario deberá entregar el servicio en la dirección que se establece en la cláusula 8 del Pliego de Cláusulas Administrativas y en la forma que establece la cláusula 19 también del Pliego de Cláusulas Administrativas.

CONFORME:  
EL ADJUDICATARIO