

ALLEGATO A

Lotto 1: Sistema per analisi molecolari dedicato allo studio di varianti di rilevanza clinica in Oncologia molecolare, Oncoematologia, Farmacogenetica, Immunogenetica e Fibrosi cistica

ESAMI ESEGUIBILI	Marcatura CE-IVD	Test/anno
Ricerca con metodica NGS di mutazioni e CNV dei geni BRCA 1 e BRCA 2 su DNA estratto da tessuto FFPE e DNA Genomico	RICHIESTA	1.500
Ricerca con metodica NGS di Mutazioni e CNV di rilevanza clinica del gene CFTR a partire da DNA estratto da sangue intero e dry spot	RICHIESTA	200
Studio mutazionale con metodica NGS dei principali geni implicati nella patogenesi delle leucemie mieloidi, sindromi mielodisplastiche e neoplasia mieloproliferativa (almeno 70 geni) a partire da DNA genomico	NON RICHIESTA	150
Pannello NGS con tecnologia di cattura ad ibridazione per lo studio di oltre 200 geni per mutazioni germinali e somatiche comprensivo di sistema per analisi terziaria	NON RICHIESTA	2.800
Pannello Microarray Umano per lo studio di CNV, LOH e SNP su oltre 800.000 target su DNA genomico	NON RICHIESTA	500
Tipizzazione in alta risoluzione con metodica NGS per ognuno dei seguenti loci HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, HLA-DPB1	RICHIESTA	1.800
Ricerca delle mutazioni del gene EGFR (codoni 18,19,20,21) su cfDNA con metodica real-time PCR	RICHIESTA	48
Ricerca di varianti associate a tossicità a chemioterapici del gene UGT1A1 su sangue intero con metodica Real Time PCR	RICHIESTA	48
Ricerca di varianti associate a tossicità a chemioterapici del gene DPYD su sangue intero con metodica Real Time PCR	RICHIESTA	48
TOTALE TEST		7.094

REAGENTI, CALIBRATORI, CONTROLLI, MATERIALE DI CONSUMO

Fornitura di reagenti, calibratori e controlli in quantità necessaria all'esecuzione dei test nella quantità annua indicata

Fornitura di materiale di consumo, soluzioni di lavaggio, diluenti e quanto altro necessario all'esecuzione dei test nella quantità annua

STRUMENTI RICHIESTI

N. 2 sequenziatori Next Generation Sequencing ad alta processività, nuovi o ricondizionati, basati su tecnologia "SBS" (sequenziamento tramite sintesi) con un output fino a 15 Gigabasi di sequenze e fino a 25 milioni di read

N. 1 sequenziatore Next Generation Sequencing ad alta processività, nuovo o ricondizionato, basato su tecnologia "SBS" (sequenziamento tramite sintesi) con un output di circa 120 Gigabasi di sequenze e fino a 400 milioni di reads. Lo strumento deve essere certificato per uso diagnostico in vitro (CE-IVD)

N. 1 sequenziatore Next Generation Sequencing ad alta processività, nuovo, di ultima generazione, basato su tecnologia "SBS" (sequenziamento tramite sintesi) che permetta di sequenziare non meno di 5.000 Giga basi in una singola sessione sperimentale. Lo strumento deve permettere l'analisi in parallelo di gruppi da circa 20, da circa 50 e da circa 130 test, con una copertura media delle basi sequenziate di circa 150X. Lo strumento deve essere certificato per uso diagnostico (CE-IVD)

N. 2 strumenti CE-IVD per l'esecuzione di real time PCR, nuovi o ricondizionati, con durata complessiva di analisi massima di 3 ore compresa la procedura manuale dell'operatore, per lo studio di varianti geniche di importanza clinica nell'ambito della predizione di risposta a farmaci biologici di nuova generazione e della valutazione di tossicità al trattamento con farmaci chemioterapici

N.1 bioanalizzatore, nuovo o ricondizionato, per la valutazione della qualità delle librerie

Strumentazione accessoria necessaria per la preparazione degli array, nuova o ricondizionata

Strumentazione accessoria necessaria per l'esecuzione del workflow di analisi validato, compresi : N. 2 set di pipette dedicate, N.1 vortex, N.1 centrifuga per piastre, N.1 Rack di separazione magnetica per provetta Eppendorf, N.1 Rack di separazione magnetica per piastra PCR, N.1 agitatore per piastre, N.1 termociclatore validato per l'esecuzione della metodica

Gruppi di continuità con pacchi batteria nuovi in grado di sostenere il carico della strumentazione fornita

Software per l'analisi primaria (chiamata delle basi associata a relativi parametri di qualità) e software per l'analisi secondaria (allineamento delle letture al genoma di riferimento, chiamata delle varianti e visualizzazione dei dati)

REQUISITI MINIMI DI INGRESSO (da possedere tutti, pena esclusione)

Tutti i sistemi hardware e software per l'analisi bioinformatica devono essere in linea con le normative italiane nell'ambito della privacy e gestione del dato genetico sensibile; devono essere in grado di garantire analisi ed interpretazione dei dati dedicata alle applicazioni offerte.

Caratteristiche del sistema bioinformatico per l'analisi terziaria dei dati di pannelli NGS maggiori di 200 geni

Aggiunta e modifica delle evidenze delle linee guida ACMG e valutazione di un eventuale aggiornamento della classificazione

Restrizione dell'analisi ai soli geni d'interesse

Gestione dell'analisi di più individui della stessa famiglia, per valutare ogni variante in base ai possibili schemi di trasmissione ereditaria

Condivisione dei dati analizzati tra utenti diversi e memoria delle operazioni effettuate; creazione di una knowledge base interna di varianti genomiche confermate

Supporto per la gestione di file VCF e gVCF e conservazione degli input e dei risultati per almeno 18 mesi

Analisi dei file VCF relativi alla chiamata di varianti puntiformi

Analisi dei file VCF relativi alla chiamata di varianti strutturali (incluse le CNV, copy number variants)

Aggiornamenti periodici delle risorse di annotazione utilizzate dal sistema

Il Software deve integrare le versioni del genoma umano con GRCh37 e GRCh38

Analisi terziaria e interpretazione dei dati NGS effettuata in modo standardizzato secondo linee guida internazionali

Annotazione delle varianti come segue : a) con riferimento ai trascritti di interesse (Ensembl o RefSeq) per le patologie selezionate dagli utenti (MedGen, Orphanet); b) secondo le nomenclature HGVS (Human Genome Variation Society) e HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) aggiornate; c) includendo la descrizione delle varianti a livello di cDNA (c.), a livello proteico (p.) e a livello genomico (g.); d) utilizzando informazioni sulla frequenza delle varianti nella popolazione generale (almeno dbSNP, 1000GP, ExAC, ESP, gnomAD); e) riportando la presenza di ogni variante su database internazionali (almeno ClinVar e HPO); f) fornendo una sintesi della letteratura scientifica a supporto di ogni variante

Adeguato corso di formazione in sede per il personale utilizzatore e servizio di assistenza tecnica mediante specialist nei giorni feriali dalle 8.00 alle 18.00 entro 12 h dalla chiamata

Caratteristiche del kit per la ricerca di mutazioni e CNV del gene BRCA 1 e BRCA2

1) Kit per la ricerca di mutazioni e CNV dei geni BRCA1 e BRCA2 validato a partire da DNA estratto da campioni FFPE e sangue intero, completo di reagenti per la quantifica e qualifica del DNA basata su real time PCR e di metodica di estrazione del DNA rapida

2) Reagenti liofilici pronti all'uso e prealiquotati in strip di reazione

3) Sistema di analisi del dato bioinformatico CE-IVD dedicato e completamente in locale, senza necessità di invio di dati su server remoto o condivisione su piattaforma cloud

Caratteristiche del kit di rilevazione mutazioni e CNV del gene CFTR

1) Kit validato su DNA genomico estratto da sangue intero e da dry-spot

2) Master mix unica ed esecuzione degli step di reazione in singolo tubo

3) Coverage totale ed uniforme per il gene CFTR che consente la chiamata di SNV, Indel e CNV in tutte le regioni codificanti e nelle regioni introniche fiancheggianti. Il kit deve garantire anche la copertura di regioni hotspot di interesse clinico in regioni introniche profonde per la detection delle mutazioni patogenetiche introniche più rilevanti del gene CFTR

4) Soluzione di analisi certificata CE-IVD con pipeline dedicata per analisi dati NGS che consenta di rilevare SNV, Indel e CNV in un unico step di analisi

5) Analisi separata di un primo livello di screening che includa un pattern di varianti definite dal laboratorio (incluso polyT-TG) e un secondo livello in grado di ampliare l'analisi a tutte le varianti del gene (incluse CNVs) effettuando un solo sequenziamento e senza ulteriori costi di analisi

Caratteristiche del pannello per lo studio di almeno 70 geni implicati nella patogenesi delle neoplasie mieloidi

1) Reagenti pronti per il sequenziamento delle librerie preparate, compatibili con il sequenziatore da 120 Gigabasi

2) Sistema di arricchimento del target basato su sonde a cattura o ampliconi, con primer provvisti di adattatori molecolari unici per la correzione degli errori e la rilevazione di mutazioni anche a basse frequenze alleliche

3) Kit completo di sistema di analisi del dato dedicato in locale e senza necessità di condivisione di dati con l'esterno della struttura

Caratteristiche del pannello con tecnologia di cattura ad ibridazione per lo studio di oltre 200 geni	
1) Frammentazione DNA tramite modalità enzimatica (tagmentazione) sia per DNA di buona qualità che per DNA da tessuti in paraffina (FFPE)	
2) Sistema di arricchimento del target basato su sonde a cattura	
3) Reagenti per il sequenziamento delle librerie preparate, compatibili con il sistema di sequenziatore da 5000 Gigabasi	
Caratteristiche pannello Microarray Umano per lo studio di CNV, LOH e SNP su oltre 800.000 target	
1) Analisi di oltre 800.000 SNP e oltre 3.000 geni le cui CNV (sia somatiche che germinali) sono state associate a patologie genetiche	
2) Sonde di lunghezza 50-mer	
Caratteristiche del pannello per la tipizzazione HLA loci A, B, C, DRB1, DQB1	
1) Metodica per la tipizzazione HLA ad alta risoluzione con tempi di esecuzione brevi almeno per i loci HLA- A-B-C-DRB1-DRB3/4/5-DQB1-DPB1	
2) Certificazione CE/IVD della metodica e del software di interpretazione	
3) Kit HLA aggiornati alla nomenclatura HLA (WHO NOMENCLATURE) in vigore alla data di consegna	
4) Software in grado di analizzare automaticamente i file di sequenza ottenuti dal sequenziatore, di identificare gli alleli HLA fino a 4 campi, di preparare i report, di identificare posizioni eterozigoti e di mismatch, di aggiornare periodicamente il database allelico	
5) Capacità di processazione fino a 96 test per seduta, con variabilità di programmazione anche per numeri di test inferiori per seduta	
6) Identificazione per ogni reagente del numero del lotto, della data di scadenza e delle condizioni di conservazione	
Caratteristiche dei Kit RT-PCR per lo studio dei polimorfismi di interesse nella predizione di risposta e tossicità a farmaci oncologici (EGFR, GPYD, UGT1a1)	
1) Reagenti prealiquotari e pronti all'uso che garantiscano tempi brevi di preparazione e di risposta	
2) Contenuto dei kit in termini di biomarker di predizione alle terapie biologiche in linea con le prescrizioni LEA e le raccomandazioni AIOM, SIAPEC, SIF e note informative AIFA	
3) Presenza del controllo interno per monitorare eventuali errori legati alla mancata dispensazione del campione o alla presenza di inibitori	
4) Rilevamento in grado di identificare almeno le seguenti varianti: UGT1A1*1 (TA)6, UGT1A1*28 (TA)7, UGT1A1*36 (TA)S, UGT1A1*37 (TA)8 e UGT1A1*6 (211G>A)	
ELEMENTI VALUTABILI STRUMENTAZIONE (punti max 40)	punti
Possibilità di automatizzare completamente l'amplificazione clonale della libreria senza intervento manuale da parte dell'operatore (SI/NO) (documentare)	0-5
Possibilità di impostare prima della corsa la lunghezza delle sequenze che verranno generate (SI/NO) (documentare)	0-3
Possibilità degli strumenti di sequenziamento tramite sintesi a partire da entrambe le estremità (paired end) (SI/NO) (documentare)	0-5
Sequenziatore NGS (non meno di 5000 Gb) in grado di alloggiare almeno 2 cartucce di sequenza contemporaneamente ed indipendentemente l'una dall'altra (SI/NO) (documentare)	0-5
Strumenti NGS tutti aperti all'utilizzo di pannelli con arricchimento tramite cattura con sonde molecolari e ampliconi (SI/NO) (documentare)	0-2
Strumenti PCR real time basati possibilmente su blocco peltier a 96 pozzetti ad elevata efficienza termica e che non necessitino di computer esterno per l'impostazione della run (SI/NO) (documentare)	0-6
Possibilità di fornire un software certificato CE-IVD per l'analisi automatica del dato di PCR real time che permetta di verificare anche l'andamento delle curve di reazione senza accesso a cloud (SI/NO) (documentare)	0-6

Strumentazione RT-PCR CE-IVD con sistema ottico modulare che permetta l'aggiunta o rimozione di nuovi canali ottici senza la necessità di intervento da parte di personale specializzato esterno (SI/NO) (documentare)	0-8
ELEMENTI VALUTABILI PER I REATTIVI (punti max 30)	punti
Analisi di real time PCR per un tempo di procedura manuale dell'operatore preferibilmente non superiore ai 15 minuti (documentare)	0-6
Completezza e semplicità d'utilizzo delle soluzioni software proposte (Punteggio maggiore sarà attribuito alle soluzioni che garantiscono una più semplice ed immediata elaborazione del dato senza necessità di intervento di personale con conoscenze bioinformatiche) (documentare)	0-6
Pannello HLA: metodica basata sulla presenza di una tecnologia che permetta di ovviare ai problemi di inefficienza collegati all'uso della PCR Long-Range (amplificazione preferenziale o sbilanciamento allelico) (documentare)	0-3
Pannello HLA: per tutti i loci HLA di seconda classe, indagati dalla metodica, copertura dell'esone 1 all'interno dello stesso kit e nella stessa seduta di lavoro senza utilizzo di primer aggiuntivi (documentare)	0-3
Pannello per lo studio di almeno 70 geni implicati nella patogenesi delle neoplasie mieloidi: reagenti possibilmente pronti all'uso, prealiquotati in strip di reazione ed in formato liofilo, senza necessità di congelare, scongelare o pipettare in ghiaccio (documentare)	0-5
Semplicità e velocità del workflow di lavoro proposto ed aderenza alle necessità cliniche. (Maggior punteggio sarà attribuito al progetto tecnico in grado di presentare la più elevata rapidità di produzione del referto ed ottemperanza alle informazioni di rilevanza clinica in ambito diagnostico) (documentare)	0-7