

Núm. expediente: SER2024-006

Centro orgánico: Fundació Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí

Responsable orgánico: Lluís Blanch Torra

Servicios de metabolómica, metagenómica y secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr a cargo del proyecto PI22/01775 titulado “Análisis integrado de datos multi-ómicos para establecer perfiles clínicos y moleculares” financiado por el Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por la Unión Europea.

1. Objeto del contrato

El objeto del presente procedimiento de licitación es la contratación de servicios de metabolómica, metagenómica y secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr, en muestras de heces y sangre de 100 pacientes con espondilitis anquilosante que presentan uveítis recidivante, así como el transporte y almacenamiento de las muestras humanas a analizar con sistemas de protección y protocolos establecidos para el total cumplimiento de la normativa vigente, a cargo del proyecto PI22/01775 titulado “Análisis integrado de datos multi-ómicos para establecer perfiles clínicos y moleculares” financiado por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades).

A lo largo del presente pliego de prescripciones técnicas se describen concretamente las tareas incluidas dentro del objeto de este contrato, así como el alcance del servicio propuesto.

2. Características técnicas

Los servicios consistirán en:

- a) Transporte y almacenamiento de las muestras biológicas (plasma y heces) de 100 pacientes que aporta el I3PT.
- b) Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr con técnicas de secuenciación NGS (*Next Generation Sequencing*) en muestras de heces.
- c) Análisis metagenómicos con técnicas de secuenciación *Whole Genome Shotgun* en muestras de heces.
- d) Análisis metabolómicos en muestras de plasma y de heces.
- e) Análisis bioinformáticos, integración de tecnologías ómicas y algoritmos predictivos.

Las características técnicas de cada uno de los servicios se detallan a continuación:

a) Transporte y almacenamiento de las muestras biológicas (plasma y heces) que aporta el I3PT

La empresa adjudicataria se encargará del transporte de las muestras (y del coste asociado a este) desde las instalaciones del I3PT hasta el laboratorio de destino donde se realizarán los servicios. Las muestras tendrán que ser transportadas en nieve carbónica, asegurando la cadena de frío, y podrá realizarse en diferentes servicios según la disponibilidad de las muestras. El transporte, trazabilidad y almacenamiento de las muestras biológicas será con sistemas de protección y protocolos establecidos para el total cumplimiento de la normativa vigente.

b) Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr con técnicas de secuenciación NGS (Next Generation Sequencing) en muestras de heces

La extracción del ADN bacteriano se realizará manualmente para evitar la contaminación cruzada y aerosoles generados por sistemas automatizados de extracción y utilizará protocolos de extracción optimizados para muestras con baja carga bacteriana. Además, el protocolo de extracción de ADN incluirá pasos de lisis enzimática y mecánica, para asegurar la obtención de ADN de todos los microorganismos (bacterias gram positivas y negativas) presentes con rendimiento equivalente. Las muestras de ADN extraído deberán someterse a un estricto control de calidad antes de proceder a la secuenciación. La concentración del ADN se determinará por fluorimetría. Aquellas muestras que no cumplan los requisitos técnicos podrán ser sustituidas o descartadas a criterio del personal investigador. Se procesará muestra sin material inicial (blancos de extracción) para evaluar la contaminación del laboratorio o los reactivos de los kits en cada extracción.

Las muestras de ADN y los blancos de extracción se utilizarán para amplificar por PCR las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S ARNr bacteriano. Se realizarán controles de calidad y cantidad de los amplicones obtenidos mediante técnicas fluorimétricas (ej. Qubit y Agilent Bioanalyzer 2100). Si los resultados son los esperados, se seguirá con la preparación de librerías, de las cuales también se realizarán controles de calidad. La secuenciación masiva se llevará a cabo mediante la tecnología Illumina MiSeq, con secuencias apareadas (300 x 2 pb), 600 ciclos de secuenciación, y con una cobertura de secuenciación mínima de 80.000 lecturas por muestra, para obtener el perfil de la microbiota de cada una de las muestras analizadas en el estudio.

Se incluirán controles positivos y negativos en las siguientes etapas: extracción de DNA, primera PCR, segunda PCR y placa de secuenciación. Los controles positivos serán comunidades simuladas de bacterias (“bacterial mock communities”) con diferentes especies y concentración conocida de cada una de ellas.

Todo el proceso se realizará en condiciones controladas en una cabina de seguridad de nivel II (BSL2).

Una vez realizados los análisis mencionados se deberá hacer entrega de toda la *raw data* correspondiente.

c) Análisis metagenómicos con técnicas de secuenciación *Whole Genome Shotgun* en muestras de heces

Se usarán las mismas extracciones de ADN realizadas previamente también para secuenciación *Whole Genome Shotgun*, con el fin de conseguir mayor resolución taxonómica y caracterización funcional del microbioma. Para ello, se construirán las librerías correspondientes y se harán controles de calidad de las mismas. Las muestras que no superen el control de calidad podrán ser reemplazadas. La secuenciación se llevará a cabo con la tecnología Illumina, generando lecturas apareadas de 300 pb y con una profundidad mínima de 35 millones de lecturas por muestra.

Una vez realizados los análisis mencionados se deberá hacer entrega de toda la *raw data* correspondiente.

d) Análisis metabolómicos en muestras de plasma y de heces

El análisis metabolómico de las muestras de plasma recogidas incluirá una combinación de métodos complementarios dirigidos y no dirigidos mediante cromatografía líquida de rendimiento ultra alto (UHPLC) - espectrometría de masas en tándem de alta resolución (QqTOFMS), UPLCMS. El análisis incluirá el análisis dirigido de: i) un panel de aminoácidos; ii) un panel de metabolitos implicados en el metabolismo del triptófano y fenilalanina; iii) un perfil metabolómico no dirigido utilizando ionización por electrospray positiva y negativa (ESI+/-) y una separación cromatográfica en fase reversa.

Una vez realizados los análisis mencionados se deberá hacer entrega de toda la *raw data* correspondiente.

e) Análisis bioinformáticos, integración de tecnologías ómicas y algoritmos predictivos

Para el estudio del microbioma, las secuencias procedentes de la secuenciación 16S se importarán en el software Quantitative Insight Into Microbial Ecology 2 (QIIME 2), que se utilizará para el procesado de las secuencias. El filtrado de calidad y eliminación de quimeras se realizará con DADA2. Las secuencias se clasificarán en ASVs (Amplicon Sequence Variant), que se utilizarán para clasificar y asignar taxonomía a las secuencias con una identidad del 99% utilizando la base de datos de referencia SILVA o la opción óptima en el momento de análisis. Se hará un control de calidad bioinformático de las secuencias provenientes de *Whole Genome Shotgun* con FastQC y cutadapt, para verificar que cada muestra obtiene una alta calidad ($Q \geq 30$) después de: demultiplexado y eliminación de barcodes, eliminación de secuencias duplicadas, eliminación de secuencias cortas (<60 bases) después de eliminar barcodes, entre otros. El perfil taxonómico de las muestras se obtendrá a partir de la identificación y recuento de un set de marcadores genéticos bacterianos con MetaPhlan3. El perfil funcional se obtendrá a partir de las secuencias post-chequeo de calidad mediante la herramienta HUMAnN3. La diversidad alfa y beta analiza las diferencias dentro y entre las muestras, respectivamente, y se llevarán a cabo utilizando una profundidad de lectura equivalente para todas las muestras. La diversidad alfa estará representada por las especies observadas (riqueza o número total de ASVs y/o especies bacterianas) y el índice de Shannon (uniformidad o abundancia relativa de ASVs/especies además de la riqueza). La diversidad beta estima cuántos taxones se comparten entre las muestras y se calculará utilizando matrices de distancias

Unifrac ponderadas y no ponderadas, que tienen en cuenta los enfoques cualitativos y cuantitativos, respectivamente, además del análisis filogenético. Se utilizarán pruebas de significación no paramétricas, como la prueba por pares de Kruskal-Wallis para analizar los resultados de la diversidad alfa, o la prueba por pares de PERMANOVA para analizar la diversidad beta. Las diferencias taxonómicas se evaluarán mediante el análisis de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn en parejas en R (<http://www.R-project.org>) con los correspondientes procesos de normalización adecuados para datos composicionales (center log-ratio transformation).

El análisis de los datos metabolómicos generados se llevará a cabo de forma conjunta, e incluirá etapas de QA/QC, generación de tablas de picos, integración y alineamiento de señales y anotación de metabolitos. El procesado de datos se llevará a cabo empleando herramientas abiertas (MATLAB, R, Python) para garantizar la reproducibilidad y reutilización de los resultados a través de repositorios de datos de acceso libre.

Los datos de microbioma y metabolómica se integrarán, conjuntamente a los datos clínicos y biomarcadores plasmáticos, para identificar potenciales interacciones entre ambos tipos de datos que pudieran explicar el fenotipo de la cohorte. Para ello, se utilizará una aproximación estadística doble, mediante pruebas multivariantes y univariantes. Para el estudio multivariante, se usará la herramienta MOFA+, que permite aplicar procesos de reducción de la dimensionalidad mediante componentes principales, identificando sets de bacterias y metabolitos estrechamente relacionados entre ellos y la patología de estudio. Además, se estudiará el potencial origen bacteriano de los metabolitos diferenciales mediante modelos de regresión LASSO usando tanto la caracterización taxonómica como funcional del microbioma. Finalmente, se generarán modelos predictivos mediante Random Forest combinando la taxonomía y la funcionalidad del microbioma y los metabolitos de interés.

Una vez realizados los análisis mencionados se deberá hacer entrega de toda la *raw data* correspondiente.

Asimismo, además de la entrega de la *raw data* correspondiente a cada uno de los análisis, se deberá hacer entrega de los resultados de los análisis en formato de informe final.

3. Otros compromisos del contratista

El adjudicatario se compromete a devolver los remanentes de las muestras biológicas originales de plasma y heces, de ADN y de librerías de secuenciación que no se hayan utilizado.

De acuerdo con el punto 2.a, el envío de las muestras se incluye en el precio total y será a cargo del adjudicatario.

En ningún caso, debido a la confidencialidad de la información, la empresa adjudicataria podrá utilizar la documentación generada o la información a la que tenga acceso para un fin distinto del indicado en este pliego.

La empresa adjudicataria se compromete expresamente al cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales, y a formar e informar en las obligaciones que de tales normas dimanen.

En cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales, la entidad adjudicataria y el personal que tenga relación directa o indirecta con la prestación prevista en este contrato, guardarán secreto profesional sobre los datos personales, todas las informaciones, documentos y asuntos a los que tenga acceso o conocimiento durante la vigencia del contrato, estando obligados a no hacer públicos o enajenar cuantos datos conozcan como consecuencia o con ocasión de su ejecución, incluso después de finalizar el plazo contractual.

Las muestras de heces se enviarán anonimizadas y codificadas, tal como dispone la legislación vigente en materia de protección de datos aplicable, con el fin de preservar los datos personales de los pacientes, y el adjudicatario no tendrá acceso a las mismas en ningún momento de la realización del servicio.

Los plazos de ejecución de los análisis de secuenciación 16S, metagenómicos, metabolómicos y análisis bioinformáticos de integración de tecnologías ómicas tendrán que realizarse según los plazos establecidos en el apartado 5.

El servicio debe quedar garantizado de forma que los posibles errores técnicos producidos durante la obtención de resultados serán subsanados por parte del proveedor sin coste adicional.

Asimismo, se prestará un servicio técnico que ofrezca servicio al cliente los días laborables (de lunes a viernes) en horario comercial. Se garantizará la prestación de este servicio mediante el uso del catalán como lengua vehicular.

4. Responsable del contrato

La responsable del contrato será la Dra. Maria Llop Vilaltella, MD. PhD Investigadora Principal del proyecto PI22/01775 titulado "Análisis integrado de datos multi-ómicos para establecer perfiles clínicos y moleculares", que podrá delegar sus actividades de gestión y control sobre la ejecución del contrato.

5. Plazos de ejecución

La fecha de inicio de vigencia del contrato será la del día siguiente al de su formalización, hasta como máximo el 31 de diciembre de 2025.

La prestación del servicio objeto del contrato se prevé que se pueda realizar en el plazo de un año de acuerdo con la siguiente cronología de ejecución del contrato:

El análisis metabolómico de las muestras del estudio se llevará a cabo en el plazo de seis (6) meses.

La determinación de la biodiversidad bacteriana con los análisis de secuenciación 16S y metagenómica a partir de las muestras de heces del estudio se llevará a cabo en el plazo de doce (12) meses.

La integración de las tecnologías ómicas mediante análisis bioinformático se llevará a cabo en el plazo de seis (6) meses.

Los datos de todos los análisis de secuenciación (metagenómica), metabolómica e integración de tecnologías ómicas se entregarán en una fecha no posterior a los doce (12) meses después de la fecha de entrega de las muestras.

En cualquier caso, atendiendo a las especificidades en materia de plazos y demoras que presenta un proyecto de investigación, la fecha exacta de inicio de la ejecución del contrato podrá variar atendiendo a las necesidades del proyecto, pudiendo iniciarse la ejecución del contrato en cualquier momento dentro del período de vigencia del mismo, y debiendo la empresa prestar los servicios de acuerdo con los plazos previstos en la cronología (12 meses), sin perjuicio que las fechas exactas difieran de las aquí indicadas.

No se prevé la prórroga del plazo de ejecución del contrato. No obstante, en virtud del apartado segundo del artículo 195 de la LCSP, cuando se produzca un retraso en la ejecución de la prestación por motivos no imputables al contratista y éste ofreciera cumplir sus compromisos, el órgano de contratación podrá acordar ampliación del plazo de ejecución inicialmente concedido. Esta circunstancia no modificará ninguna de las condiciones del contrato más allá de sus fechas de inicio y final de ejecución, manteniéndose los plazos previstos en la cronología (12 meses) a cumplir por la empresa. En ningún caso la ampliación del plazo de ejecución significará que se requieran más servicios, y que por consiguiente, que vaya a abonarse un mayor importe o se modifique cualquier otra característica.

6. Ubicación de prestación del servicio

El adjudicatario tendrá que prestar el servicio objeto de la presente licitación en sus propias instalaciones, que deberán disponer de tecnología y personal necesario para la realización de los servicios.

7. Facturación

El pago del precio del contrato se realizará de la siguiente manera:

- Se facturará un 10% del importe total del contrato una vez se realice el servicio de “extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr con técnicas de secuenciación NGS (Next



Generation Sequencing) en muestras de heces”, acreditado con la correspondiente entrega del raw data.

- Se facturará un 10% del importe total del contrato una vez se realice el servicio de “análisis metagenómicos con técnicas de secuenciación Whole Genome Shotgun en muestras de heces”, acreditado con la correspondiente entrega del raw data.

- Se facturará un 10% del importe total del contrato una vez se realice el servicio de “análisis metabolómicos en muestras de plasma y de heces”, acreditado con la correspondiente entrega del raw data.

- Se facturará el 70% restante del importe total del contrato una vez se finalice la prestación total de los servicios especificados en este documento acreditado con la correspondiente entrega del informe final de los análisis y la totalidad del raw data.

En las facturas deberán constar las faenas facturadas y desglosadas por tareas realizadas, con los correspondientes precios.

8. Derechos de las partes

Más allá de los derechos y obligaciones para las partes, establecidas en los presentes pliegos técnicos, la prestación del servicio no generará ningún derecho para el adjudicatario en relación a la propiedad intelectual de los resultados científicos que genere el servicio, que serán única e íntegramente del I3PT.

Cualquier mención por el adjudicatario de la marca I3PT deberá tener la aceptación formal previa del I3PT.