

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS

EXP.NÚM. IISPV2024-13

DESCRIPCIÓN Y ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL SERVICIO DE MEDIDA DE PERFIL LIPOPROTEICO, GLICOPROTEICO Y DE FAMILIAS LIPÍDICAS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (SUERO/PLASMA) Y DEL PERFIL DE METABOLITOS DE BAJO PESO MOLECULAR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (SUERO/PLASMA) MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TECNOLOGÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

1.- Objeto del contrato y objetivos del servicio

El presente contrato tiene por objeto la prestación de los servicios de realización, en modo de autoservicio, de las medidas para la **determinación de perfil de lipoproteínas, de glicoproteínas, y familias lipídicas de muestras de suero y del perfil de metabolitos de bajo peso molecular en suero.**

El objetivo del servicio será realizar las medidas y la caracterización de los espectros para la obtención del perfil lipoproteico, glicoproteico, de metabolitos de bajo peso molecular y lipídico en muestras de suero, provenientes de sujetos con diagnóstico de esquizofrenia o autismo.

Cualquier información derivada del servicio será propiedad íntegra del IISPV, facilitando gratuitamente el licitador cualquier clave o contraseña necesaria para el acceso a los datos y el uso de estos.

2.- Introducción

El éxito de los estudios de perfiles metabolómicos radica en la habilidad de determinar cambios diferenciales en los fluidos o tejidos de un organismo para una determinada condición patológica. En suero, los lípidos se caracterizan y varían en su función biológica tanto por las clases de lipoproteínas que los transportan como por las características bioquímicas de los lípidos transportados. La tecnología de la resonancia magnética nuclear (RMN) es idónea para tal análisis debido a su posibilidad de medir el suero de manera directa (dando información sobre lipoproteínas, glicoproteínas y metabolitos de bajo peso molecular) y sobre extractos (dando información de los lípidos) sin la destrucción de la muestra, con adecuada sensibilidad, amplia cobertura de las diferentes clases de lípidos, alto rendimiento y elevado rango dinámico.

La necesidad del contrato se plantea ante un proyecto de investigación "**PI21/01812 "Double-blind randomized controlled pilot study of the efficacy of nutraceuticals combined with physical activity as an adjunctive treatment for autism and schizophrenia"**" para cuya realización se requiere obtener medidas de los perfiles lipoproteicos, glicoproteicos, de metabolitos de bajo peso molecular y de familias lipídicas de un gran número de muestras de suero.

Concretamente, dada la naturaleza del estudio planteado, se precisará la realización durante el período de 6 meses para su completa ejecución; de diferentes medidas de RMN para la caracterización tanto del perfil de lipoproteínas, de glicoproteínas, de metabolitos de bajo peso molecular, como del perfil lipídico (extractos lipídicos) de las muestras de suero de este estudio.

3.-Requisitos del servicio

Los estudios de RMN de suero, al ser una técnica no destructiva y que permite la edición con diferentes pulsos de la señal obtenida, permiten extraer de la misma muestra diversas informaciones sobre las lipoproteínas, **sus tamaños y distribuciones (perfil lipoproteico)**, las glicoproteínas, los metabolitos de bajo peso molecular y los extractos lipídicos. Para la mejor realización del servicio será requisito que el adjudicatario tenga acceso a una plataforma de RMN de alta resolución (≥ 600 MHz) que dispongan de alta capacidad de medida de muestras en automático (muestreadores de 100-500 muestras por lote), con control de temperatura y sondas de ^1H de pulsos editados y calibrados tales como experimentos de difusión, filtros de bajo peso molecular y medidas directas de suero crudo y sus extractos. Se valorará la existencia de equipos adicionales de respaldo por si surgieran imprevistos técnicos.

Para la preparación de las muestras a analizar se requerirá que el adjudicatario disponga de sistemas automáticos de preparación y manipulación de líquidos para disminuir el tiempo y la variabilidad de la preparación de un gran número de muestras y posibles errores humanos.

El adjudicatario deberá ser capaz de aplicar diferentes procesos de control de calidad y estabilidad a los equipos de RMN a los datos obtenidos por RMN, haciendo equiparables los diferentes ensayos realizados con todas las muestras analizadas.

El adjudicatario deberá asignar un responsable del servicio a efectos de todas las comunicaciones y requerimientos del investigador principal del proyecto, que se encargará de asegurar el buen funcionamiento del servicio durante el tiempo que necesite el usuario.

4.- Metodología

Dada la naturaleza del proyecto, el número de muestras sobre el que se solicitarán los servicios contratados en el periodo de ejecución será de hasta 165 muestras de suero y sus extractos.

En coordinación con la persona responsable del proyecto, el adjudicatario será responsable de (i) recibir las muestras biológicas, (ii) procesar las mismas en el equipamiento designado (iii) obtener las diferentes medidas analíticas deseadas para posteriormente (iv) recoger y responsabilizarse de los resultados, transmitir estos a los responsables de proyecto.

El adjudicatario realizará un seguimiento técnico de los equipos durante la medida para garantizar la calidad del servicio, comunicando cualquier incidencia al responsable del proyecto, en formato electrónico. Si los responsables del proyecto así lo solicitan se entregará un informe sobre los procesos de control valorando los parámetros utilizados para el control de calidad de los espectros adquiridos tanto con controles internos (calibración de pulso, ajuste sintonía, anchura línea, control temperatura...) como con estándares externos a la medida (muestra referencia, ERETIC®, etc.)

El responsable del proyecto podrá solicitar cuantas aclaraciones consideren oportunas con respecto a dichos informes al responsable asignado por parte del adjudicatario u otro medio de comunicación que considere oportuno, durante 3 meses desde la entrega de los espectros. Esta posibilidad no supondrá en ningún caso incremento del coste del servicio.

5.-Detalle del Trabajo a realizar

Se utilizarán los siguientes equipos:

- Uso de Sistema de robotización Gilson: 20 h
- Uso del Sistema de robotización Bravo: Bravo: 35 h
- Uso de Speedvac: 50 h
- Uso de equipo RMN 600MHZ: 180 h

Los espectros de RMN de suero (n=165) se adquirirán en el equipo de 600 MHz aplicando a cada muestra de suero crudo acondicionada con agua deuterada un pulso de noesy de 4 scans para ajuste de condiciones, pulso LED de difusión de 32 scans para obtener el perfil de lipoproteínas y el perfil de glicoproteínas y un pulso de cpmg (filtro bajo peso molecular) de 64 scans para el perfil de metabolitos acuosos y un pulso de zgpr (presaturación de la señal del agua) de 64 scans para extractos lipídicos.

Una vez analizadas las muestras por RMN se obtendrá para cada una de ellas un espectro complejo el cual deberá procesarse con algoritmos desarrollados por el adjudicatario que permitan obtener datos cuantitativos de los metabolitos acuosos de manera automatizada.

Para ello, sobre el espectro de RMN se aplicará un algoritmo optimizado de deconvolución y las funciones resultantes serán utilizadas para calcular la concentración absoluta de los metabolitos. La concentración de metabolitos se calculará mediante un algoritmo de optimización por mínimos cuadrados PLS (Partial Least Squares).

Este software desarrollado por el adjudicatario asociado a la cuantificación de metabolitos deberá cumplir los requisitos que permitan la futura implementación como dispositivo de diagnóstico in vitro compatible con el marcaje CE y las normas ISO 13485 a partir de espectros de resonancia magnética nuclear.

Los espectros de extractos lipídicos (n=165) se adquirirán en el equipo de 600 MHz equipado con sonda de ^1H con un pulso adquisición de 64 scans.

A continuación, se obtendrán la cuantificación de los metabolitos siguientes:

a) Caracterización de lipoproteínas en suero o plasma:

El tamaño y el número de partículas de los principales tipos de lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL) y la concentración de partículas de nueve subtipos. La señal de metilo se deconvolucionará con 9 funciones lorentzianas asociadas a cada subtipo de lipoproteínas: grandes, medianas y pequeñas de los tipos principales de lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL). El área de cada función lorentziana está relacionada con la concentración de lípidos de cada subtipo de lipoproteína, y el tamaño de cada subtipo se calculará a partir de su coeficiente de difusión. El número de partículas de cada subtipo de lipoproteínas se calculará dividiendo el volumen de lípidos por el volumen de partícula de cada clase. Los volúmenes de lípidos se determinan mediante el uso de factores de conversión para convertir unidades de concentración en unidades de volumen.

De cada espectro se obtendrán los siguientes parámetros:

Cholesterol	VLDL lipoprotein particle number	Particle size
Total cholesterol	Large VLDL particle number	VLDL size
Remnant cholesterol	Medium VLDL particle number	LDL size
Non-HDL cholesterol	Small VLDL particle number	HDL size
VLDL cholesterol	LDL lipoprotein particle number	
IDL cholesterol		
LDL cholesterol		
HDL cholesterol		
Triglycerides	HDL lipoprotein particle number	
Total triglycerides	Large HDL particle number	
VLDL triglycerides	Medium HDL particle number	
IDL triglycerides	Small HDL particle number	
LDL triglycerides		
HDL triglycerides		

b) Caracterización de glicoproteínas en suero o plasma:

El perfil glucoproteico se obtendrá a partir de los espectros LED 1H-RMN: este pulso permite cuantificar los niveles de glucoproteína detectando los protones asociados a la cadena lateral del carbohidrato de N-acetilo unido a las proteínas plasmáticas. Para obtener la región del perfil de RMN relacionada con las proteínas glicosiladas, se seleccionará el pico entre 2.16 y 1.90 partes por millón (ppm) del espectro de frecuencias de 1H-RMN. Posteriormente se aplicará una descomposición matemática en la región seleccionada para obtener tres funciones lorentzianas asociadas a los diferentes enlaces glucoproteicos. El resultado de la descomposición constituye el patrón de glicosilación (concentración relativa de cada clase de glicoproteínas). Cada función se caracterizará por su área total, altura, anchura y posición. De cada espectro se obtendrán los siguientes parámetros asociados a la inflamación:

Inflammation

NMR signal GlycA
NMR signal GlycB
NMR signal GlycF
Ratio H/W Glyc-A
Ratio H/W Glyc-A

c) Compuestos de bajo peso molecular en suero o plasma:

El perfil de metabolitos de bajo peso molecular se obtendrá a partir de los espectros CPMG 1H-RMN: este pulso permite cuantificar los niveles de moléculas pequeñas detectando los protones asociados a cada metabolito.

Se identificarán un conjunto de metabolitos acuosos para muestras de suero que incluyen aminoácidos, metabolitos de función renal, metabolitos del metabolismo de la glucosa y cuerpos

cetónicos. (En plasma, los metabolitos visibles difieren en algunos casos, como en el caso del *formato* que se puede cuantificar en plasma).

Amino acids	Glucose metabolism
Glutamate	Glucose
Histidine	Lactate
Glycine	Citrate
Alanine	Glycerol
Glutamine	
Leucine	Renal function
Valine	Creatine
Isoleucine	Creatinine
Tyrosine	
	Ketone bodies
	3-Hydroxyisobutyric acid
	Acetate
	Acetona

d) Caracterización de familias de lípidos de la extracción lipídica del plasma o suero:

El perfilado de familias de lípidos incluye la cuantificación absoluta (concentración) de las siguientes especies lipídicas:

Fatty acids	Cholesterol
Saturated fatty acids	Free cholesterol
Polyunsaturated fatty acids	Esterified cholesterol
Linoleic fatty acid	
Docosahexaenoic fatty acid	Glycerides
Arachidonic fatty acid	Phosphoglycerides
Eicosapentaenoic fatty acid	Lysophosphatidylcholine
Omega 3	Phosphatidylcholine
Omega 6 and 7	Sphingomyelin
Omega 9	

Se presentará un informe final que constará de, al menos:

1. Un documento en el que se explicará la metodología empleada para la medida y las incidencias más relevantes encontradas.
2. Un apartado que contenga toda la información de calidad (ya sea cualitativa o cuantitativamente) y los parámetros de diagnóstico utilizados.

3. Los informes y documentación generada podrán estar redactados en castellano y/o inglés.

4. Cualquier empresario que presente propuesta, se presume que ofrece el servicio íntegro explicado en el PPT, sin limitaciones posteriores al acceso y tratamiento de los datos derivados del servicio. A nivel enunciativo no limitativo, no se podrá cobrar a la entidad contratante con posterioridad a la adjudicación importe alguno por licencias, accesos, informes, etc.... derivados del análisis de las muestras objeto de contratación.

La presentación de este informe y la entrega de los resultados al responsable del proyecto representa, sin menoscabo ninguno de acciones posteriores, la finalización del servicio objeto de este contrato.

6.- Plazo de vigencia del servicio

El plazo de realización del servicio por parte del adjudicatario será de 6 meses máximo, a partir de la fecha de formalización del contrato o la que figure en este.

Este plazo incluirá todos los servicios necesarios para la realización completa de las tareas definidas en este PPT, que incluyen de forma enunciativa y no limitativa, tratamiento de las muestras, análisis de las muestras por RMN, estadística, análisis de datos e informe final.