Parametry równoważne dla przedmiotu zamówienia

W związku z pytaniami otrzymanymi od potencjalnych Wykonawców w ramach postępowania o udzielenie zamówienia nr **BK/2026/261013/2/SWIFT**, dotyczącymi dopuszczenia rozwiązań równoważnych w zakresie usług sekwencjonowania WGS, WES oraz RNA-seq, po przeprowadzeniu konsultacji z zespołem naukowym określono parametry równoważne, które muszą zostać spełnione przez oferowane rozwiązania alternatywne.

Poniższe zestawienie określa wymagania techniczne i jakościowe, których spełnienie pozwoli uznać oferowane rozwiązanie za równoważne względem wymagań określonych w zapytaniu ofertowym.

I. Wymagane parametry techniczne:

A. Sekwencjonowanie całogenomowe – *Whole Genome Sequencing (WGS)*

Parametr	WGS – wariant 1	WGS – wariant 2
Kontrola jakości DNA	Tak	Tak
Przygotowanie bibliotek	Illumina TruSeq PCR-free	Illumina TruSeq PCR-free
Kontrola jakości bibliotek	Tak	Tak
Platforma	Illumina NovaSeq	Illumina NovaSeq
Tryb sekwencjonowania	Paired-end 2 × 150 nt	Paired-end 2 × 150 nt
Ilość danych na próbkę	≥ 120 Gbp	≥ 360 Gbp
Kontrola jakości sekwencjonowania	Tak	Tak
Format danych wynikowych	FASTQ	FASTQ

B. Sekwencjonowanie całoeksomowe – *Whole Exome Sequencing* (WES)

Parametr	Wariant 1	Wariant 2
Kontrola jakości DNA	Tak	Tak
Przygotowanie bibliotek	Agilent SureSelect All Exon V6 r2	Agilent SureSelect All Exon V6 r2
Kontrola jakości bibliotek	Tak	Tak
Platforma	Illumina NovaSeq	Illumina NovaSeq
Tryb sekwencjonowania	Paired-end 2 × 150 nt	Paired-end 2 × 150 nt
Ilość danych na próbkę	≥ 18 Gbp	≥ 40 Gbp
Kontrola jakości sekwencjonowania	Tak	Tak
Format danych wynikowych	FASTQ	FASTQ

C. Sekwencjonowanie RNA – *RNA-seq*

Parametr	Wymaganie
Kontrola jakości materiału wejściowego	RNA
Przygotowanie bibliotek	Illumina TruSeq RNA Exome
Kontrola jakości bibliotek	Tak
Platforma sekwencjonowania	Illumina NovaSeq
Tryb sekwencjonowania	Paired-end 2 × 150 nt
Liczba odczytów	60 mln odczytów całkowitych na próbkę (inaczej 2 x 30 mln odczytów)
Kontrola jakości sekwencjonowania	Tak
Format danych wynikowych	FASTQ
Oczyszczanie próbek	Dla próbek, które nie przeszły wstępnej kontroli jakości

II. Zakresy równoważności usług sekwencjonowania

A. Sekwencjonowanie całogenomowe – Whole Genome Sequencing (WGS)

Przedmiotem zamówienia jest wykonanie usługi sekwencjonowania całogenomowego DNA (WGS), obejmującej kontrolę jakości materiału wejściowego, przygotowanie bibliotek, sekwencjonowanie, kontrolę jakości uzyskanych danych oraz przekazanie wyników w formacie FASTQ.

Wymagane parametry techniczne:

1. Kontrola jakości próbek wyizolowanego DNA.
2. Przygotowanie bibliotek z wykorzystaniem zestawu Illumina TruSeq PCR-free lub rozwiązania równoważnego, zapewniającego przygotowanie bibliotek bez amplifikacji PCR.
3. Kontrola jakości przygotowanych bibliotek.
4. Sekwencjonowanie na platformie Illumina NovaSeq lub platformie równoważnej, w trybie paired-end, z długością odczytów 2 × 150 nt.
5. Uzyskanie wymaganej ilości danych sekwencyjnych na próbkę:
    - Wariant 1: co najmniej 120 Gbp na próbkę;
    - Wariant 2: co najmniej 360 Gbp na próbkę.
6. Kontrola jakości danych sekwencyjnych.
7. Przekazanie wynikowych plików w formacie FASTQ.

Kryteria równoważności:

Za rozwiązanie równoważne uznaje się usługę zapewniającą sekwencjonowanie całego genomu z zachowaniem wymaganego trybu i długości odczytów, wymaganej ilości danych na próbkę, porównywalnej jakości bibliotek i danych wynikowych oraz dostarczeniem plików FASTQ. W przypadku zastosowania innego zestawu do przygotowania bibliotek wykonawca powinien wykazać, że

rozwiązanie zapewnia porównywalną charakterystykę bibliotek i nie wprowadza nieakceptowalnych odchyleń wynikających z zastosowanej metody.

Wykonawca w szczególności powinien wykazać, że:

- chemiczny mechanizm sekwencjonowania danej technologii jest taki sam jak w przypadku Illumina NovaSeq, tj. *sequencing-by-synthesis with bridge amplification on patterned flow cells;*

- w przypadku konieczności użycia zestawu do tworzenia bibliotek dedykowanego dla danego rozwiązania technologicznego, że jest on oparty o równoważny chemiczny mechanizm, co wskazany w ogłoszeniu zestaw Illumina TruSeq DNA PCR-free, tj. mechaniczną fragmentacją DNA z ligacją adapterów, bez reakcji PCR i bez żelów;

- Wykonawca powinien przedstawić dokumentację walidacyjną, obejmującą porównanie danych uzyskanych dla tych samych prób referencyjnych przy wykorzystaniu obu technologii według części D pkt. 4.

B. Sekwencjonowanie całoeksomowe – Whole Exome Sequencing (WES)

Przedmiotem zamówienia jest wykonanie usługi sekwencjonowania całoeksomowego DNA (WES), obejmującej kontrolę jakości materiału wejściowego, przygotowanie bibliotek z wzbogaceniem regionów docelowych, sekwencjonowanie, kontrolę jakości uzyskanych danych oraz przekazanie wyników w formacie FASTQ.

Wymagane parametry techniczne:

1. Kontrola jakości próbek wyizolowanego DNA.
2. Przygotowanie bibliotek z wykorzystaniem zestawu Agilent SureSelect All Exon V6 r2 lub rozwiązania równoważnego, umożliwiającego wzbogacenie regionów kodujących genomu.
3. Kontrola jakości przygotowanych bibliotek.
4. Sekwencjonowanie na platformie Illumina NovaSeq lub platformie równoważnej, w trybie paired-end, z długością odczytów 2 × 150 nt.
5. Uzyskanie wymaganej ilości danych sekwencyjnych na próbkę:
    - Wariant 1: co najmniej 18 Gbp na próbkę;
    - Wariant 2: co najmniej 40 Gbp na próbkę.
6. Kontrola jakości danych sekwencyjnych.
7. Przekazanie wynikowych plików w formacie FASTQ.

Kryteria równoważności:

Za rozwiązanie równoważne uznaje się usługę zapewniającą sekwencjonowanie eksomu z wykorzystaniem metody wzbogacania regionów docelowych o porównywalnym zakresie, zachowaniem wymaganego trybu i długości odczytów, wymaganej ilości danych na próbkę oraz porównywalnej jakości danych wynikowych. Wykonawca stosujący inny zestaw do wzbogacania eksomu powinien wykazać porównywalność zakresu regionów docelowych i przydatności uzyskanych danych do analiz eksomowych.

Wykonawca w szczególności powinien wykazać, że:

- chemiczny mechanizm sekwencjonowania danej technologii jest taki sam jak w przypadku Illumina NovaSeq, tj. *sequencing-by-synthesis, patterned flow cells;*

- w przypadku konieczności użycia zestawu do tworzenia bibliotek dedykowanego dla danego rozwiązania technologicznego, że jest on oparty o równoważny chemiczny mechanizm – tj. mechaniczna fragmentacja DNA, ligacja adapterów, wychwyt pulą biotynylowanych oligonukleotydowych „baitów" komplementarnych do egzonów i wybranych regionów flankujących, reakcja PCR - oraz, że pokrywa on ten podobny obszar gDNA, co wskazany w ogłoszeniu zestaw Agilent SureSelect All Exon V6 r2;

- Wykonawca powinien przedstawić dokumentację walidacyjną, obejmującą porównanie danych uzyskanych dla tych samych prób referencyjnych przy wykorzystaniu obu technologii według części D pkt. 4.

C. Sekwencjonowanie RNA – RNA-seq

Przedmiotem zamówienia jest wykonanie usługi sekwencjonowania RNA (RNA-seq), obejmującej kontrolę jakości materiału wejściowego, przygotowanie bibliotek, sekwencjonowanie, kontrolę jakości uzyskanych danych oraz przekazanie wyników w formacie FASTQ.

Wymagane parametry techniczne:

1. Kontrola jakości próbek wyizolowanego RNA.
2. Przygotowanie bibliotek z wykorzystaniem zestawu Illumina TruSeq RNA Exome lub rozwiązania równoważnego, zapewniającego porównywalny zakres analizy RNA.
3. Kontrola jakości przygotowanych bibliotek.
4. Sekwencjonowanie na platformie Illumina NovaSeq lub platformie równoważnej, w trybie paired-end, z długością odczytów 2 × 150 nt.
5. Uzyskanie co najmniej 60 mln odczytów łącznie na próbkę, tj. 30 mln par odczytów (read pairs), co odpowiada około 9 Gbp danych sekwencyjnych na próbkę.
6. Kontrola jakości danych sekwencyjnych.
7. Przekazanie wynikowych plików w formacie FASTQ.
8. Oczyszczenie próbek, które nie przejdą wstępnej kontroli jakości, zgodnie z wymaganiem Zamawiającego.

Kryteria równoważności:

Za rozwiązanie równoważne uznaje się usługę zapewniającą sekwencjonowanie RNA z zachowaniem wymaganego trybu i długości odczytów, minimalnej liczby odczytów na próbkę oraz porównywalnego zakresu analizy RNA. Dopuszcza się zastosowanie innej metody przygotowania bibliotek, pod warunkiem wykazania jej przydatności do realizacji wymaganego zakresu analizy. Usługa musi obejmować kontrolę jakości materiału wejściowego, bibliotek i danych końcowych, przekazanie plików FASTQ oraz oczyszczanie próbek niespełniających wstępnych kryteriów jakości.

Wykonawca w szczególności powinien wykazać, że:

- chemiczny mechanizm sekwencjonowania danej technologii jest taki sam jak w przypadku Illumina NovaSeq, tj. *sequencing-by-synthesis, patterned flow cells;*

- w przypadku konieczności użycia zestawu do tworzenia bibliotek dedykowanego dla danego rozwiązania technologicznego, że jest on oparty o równoważny chemiczny mechanizm, co wskazany w ogłoszeniu zestaw Illumina TruSeq RNA Exome oraz, że zestaw ten może być użyty do prób o niskiej zawartości total RNA (od 0,1 ug) i wysokim zdegradowaniu (DV200 > 50%). Nie jest on oparty o wyłapywanie ogonów polyA RNA (ang. *oligo-dT beads capture polyA* tails), jak większość zestawów do RNA-seq, a o biotynylowane sondy wychwytujące kodujące RNA (ang. *biotinylated capture probes targetting coding RNA*). Wpływa to na istotne różnice w strukturze biblioteki, która podlega sekwencjonowaniu.

- Wykonawca powinien przedstawić dokumentację walidacyjną, obejmującą porównanie danych uzyskanych dla tych samych prób referencyjnych przy wykorzystaniu obu technologii według części D pkt. 4.

D. Wspólne zasady oceny równoważności

Dla wszystkich trzech usług przyjmuje się następujące zasady:

1. Rozwiązanie równoważne musi zapewniać realizację tego samego celu badawczego i zakresu analizy co rozwiązanie opisane w wymaganiach.

2. Dopuszcza się zastosowanie platform, zestawów odczynnikowych i metod przygotowania bibliotek innych producentów, pod warunkiem spełnienia wszystkich wymaganych parametrów technicznych.

3. Nie dopuszcza się obniżenia wymaganej ilości danych sekwencyjnych ani zmiany wymaganego trybu i długości odczytów.

4. Wykonawca powinien przedstawić informacje techniczne umożliwiające weryfikację równoważności oferowanego rozwiązania; tj. Wykonawca powinien przedstawić dokumentację walidacyjną, obejmującą porównanie danych uzyskanych dla tych samych prób referencyjnych przy wykorzystaniu obu technologii w trybie 2 x 150 nt i tej samej ilości odczytów, w tym co najmniej:

    - analizę zgodności średniego pokrycia, przeprowadzone tym samym algorytmem;
    - zgodność rozkładu jakości zasad w sekwencji – ang. *per base sequence quality*;
    - zgodność rozkładu jakości sekwencji – ang. *per sequence quality scores*;
    - zgodność zawartości zasad w sekwencji – ang. *per base sequence content*;
    - zgodność zawartości GC w sekwencji – ang. *per sequence GC content*;
    - zgodność, zmniejszenie lub brak zawartości N wobec zasad – ang. *per base N content*;
    - zgodność rozkładu długości sekwencji – ang. *sequence length distribution*;
    - zgodność poziomów duplikacji sekwencji – ang. *sequence duplication levels*;
    - zgodność, zmniejszenie zawartości lub brak sekwencji wzbogaconych – ang. *overrepresented sequences*;
    - zgodność lub zmniejszenie zawartości adapterów w sekwencji;
    - w przypadku sekwencjonowania WGS i WES - porównywalne wykrywanie wariantów SNP, CNV oraz strukturalnych - przeprowadzone tym samym algorytmem;
    - w przypadku RNA-seq - porównywalne wykrywanie wariantów SNP, a także zgodności ilościowej wyników ekspresji genów - przeprowadzone tym samym algorytmem.

5. Wszystkie usługi muszą obejmować kontrolę jakości materiału wejściowego, kontrolę jakości bibliotek, kontrolę jakości danych sekwencyjnych oraz przekazanie wyników w formacie FASTQ.