

ALLEGATO A

Oggetto della fornitura

Il presente Capitolato Tecnico disciplina il contratto di fornitura *in service* di una strumentazione per l'analisi in Real Time PCR e Sequenziamento comprensivo di garanzia *full risk* e relativa fornitura reagenti e kit per analisi di mutazione per le specifiche attività della UOSD Laboratorio di Genetica Medica della ASL Viterbo.

La presente procedura è relativa ai seguenti ambiti:

- farmacodiagnostica per la corretta impostazione delle terapie oncologiche e oncoematologiche;
- caratterizzazione diagnostica e prognostica in oncologia.

La fornitura in particolare dovrà comprendere:

- Uno strumento di Real Time PCR
- Un Sequenziatore
- Strumentazione accessoria necessaria alla corretta esecuzione di ciascuna analisi richiesta (centrifuga/vortex da banco per provette da 1,5ml, centrifuga/vortex da banco per strips, blocchetti termici, dry block)
- Reagenti per le analisi di mutazione, lo studio delle fusioni geniche e lo studio dell'instabilità dei microsatelliti a partire da DNA e RNA estratto da tessuti FFPE o freschi, da campioni citologici, o da cfDNA e materiali di consumo necessari per l'esecuzione dei test.

Caratteristiche del Sistema

Il sistema richiesto dovrà possedere quanto sotto riportato.

a) Caratteristiche qualitative e tecniche:

- La strumentazione dovrà possedere le caratteristiche qualitative e tecniche minime precisate di seguito.
- I consumabili dovranno possedere le caratteristiche minime precisate di seguito.

b) Completezza:

Dovrà essere fornito tutto il necessario per l'esecuzione dell'attività diagnostica prevista e al funzionamento delle strumentazioni. In particolare la fornitura dovrà comprendere:

- noleggio, installazione e collaudo di tutta la strumentazione necessaria all'esecuzione dell'analisi di mutazione tramite Real Time PCR e di sequenziamento genico;
- hardware e software dedicati, comprensivi di memorie con capacità adeguata alla mole di dati prodotti dalla metodica
- l'offerta economica dovrà contenere tutti i kit, reagenti eventuali, e tutto il materiale di consumo a completamento della fornitura e necessario al corretto funzionamento della strumentazione e all'esecuzione dell'analisi;
- fornitura gratuita di eventuale strumentazione accessoria prevista nel manuale d'uso/scheda tecnica/protocollo di analisi e necessaria allo svolgimento dell'attività diagnostica;
- assistenza tecnica *full-risk* completa di manutenzione ordinaria, straordinaria, di supporto tecnico e di tutto il necessario al funzionamento della strumentazione;
- Formazione del personale in loco su strumentazione software hardware uso dei kit ed interpretazione dei dati.

Caratteristiche minime della strumentazione:

Le caratteristiche sotto indicate identificano i requisiti tecnici minimi che il sistema oggetto dell'appalto deve possedere:

- a) La strumentazione Real Time PCR (con almeno 4 canali ottici di lettura) e tutta la strumentazione accessoria (laddove previsto) dovrà essere marcata CE-IVD
- b) Software dedicati (CE-IVD) per l'analisi dei dati grezzi e per l'interpretazione del dato analitico con notazione della/e mutazione/i eventualmente presente/i
- c) Piattaforma per il sequenziamento di nuova generazione basata su "sequenziamento tramite sintesi" in grado di garantire un output dati massimo di 1.2 Gb e 4 milioni di letture singole per corsa.
- d) Sistema di analisi del dato di sequenziamento di nuova generazione, con SW certificato CE-IVD in locale senza alcuna necessità di condivisione o invio dati all'esterno della struttura ospedaliera né utilizzo di cloud.

Caratteristiche minime dei consumabili richiesti per l'analisi di mutazione e la ricerca delle fusioni geniche

- Tutti i kit offerti devono essere marcati CE-IVD come da normativa vigente e in linea con i fabbisogni specificati
- Identificazione di tutti i marcatori (DNA ed RNA) in linea con le raccomandazioni e linee guida AIOM-SIAPEC, note integrative AIFA e linee guida oncologiche vigenti.
- Tutti i kit offerti devono essere completi di reagenti di amplificazione e controlli positivi
- I reagenti devono essere pre-caricati in strip o provette e pronti a l'uso per una semplice ed immediata gestione del flusso di lavoro
- Il sistema deve, nel complesso, essere semplice da utilizzare, con step di pipettamento ridotti al minimo al fine di minimizzare errori e rischi di contaminazioni
- Dal campione al risultato in meno di 4 ore e con un hands on time ridotto a meno di 45 minuti
- Ampia flessibilità: ridotta quantità di DNA/RNA input da varie tipologie di campioni (tessuti freschi, congelati, FFPE, plasma, sangue venoso periferico)
- Work-flow di analisi semplice e veloce che garantisca tempi di lavoro totale sia per RT PCR che per analisi di sequenziamento inferiori a 3 giorni.
- Kit di sequenziamento completi di reagenti per la determinazione attraverso real time PCR della qualità e quantità degli acidi nucleici da sottoporre a successivo sequenziamento.
- Flusso di lavoro per le analisi di sequenziamento integrato che permetta l'esecuzione contemporanea in singola seduta analitica di DNA ed RNA.
- Fornitura di soluzioni di analisi del dato CE-IVD e completamente in locale, in grado di facilitare e velocizzare l'interpretazione del dato grezzo fino al risultato che non richiedano conoscenze tecniche specialistiche in ambito bioinformatico da parte del personale utilizzatore.
- Kit per il rilevamento qualitativo delle principali mutazioni del gene BRAF nel DNA genomico isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), da agoaspirati tiroidei o da plasma come da normative vigenti. Il test deve poter individuare e differenziare tra loro le più comuni mutazioni del codone 600 nell'esone 15 del gene BRAF. Il Test deve garantire una Sensibilità Analitica con un LOD (Limite di rilevamento) 0,5-1% di allele mutato per le mutazioni somatiche. Il kit deve prevedere un controllo interno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare
- Kit per il rilevamento dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) associati alla tossicità al trattamento con fluoropirimidine, del gene DPYD nel DNA genomico umano isolato da sangue periferico in EDTA. In particolare il kit deve permettere la ricerca dei seguenti polimorfismi (previsti dalle raccomandazioni AIOM 2019 per le analisi farmacogenetiche): c.1905+1G>A (IVS14+1G>A). c.1679T>G (p.1560S); c.2846A>T (p.D949V); c.1129-5923C>G o c.1236G>A

(IVS10C>G, HapB3); c.2194G>A. Il kit deve prevedere sia un controllo positivo wild type sia un controllo positivo mutato.

- Kit per il rilevamento qualitativo delle principali mutazioni del gene KRAS nel DNA genomico isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), o da plasma, come da normative vigenti. Il test deve poter individuare le più comuni mutazioni sui codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 del gene KRAS. Il Test deve garantire una Sensibilità Analitica con un LOD (Limite di rilevamento) fino a 0,5-1% di allele mutato per mutazioni somatiche. Il kit deve prevedere un controllo interno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare.
- Kit per il rilevamento qualitativo delle principali mutazioni del gene NRAS nel DNA genomico isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), o da plasma, come da normative vigenti. Il test deve poter individuare le più comuni mutazioni sui codoni 12, 13, 59, 61, 117, 146 Il Test deve garantire una Sensibilità Analitica con un LOD (Limite di rilevamento) 0,5-1% di allele mutato per mutazioni somatiche. Il kit deve prevedere un controllo interno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare.
- Kit per il rilevamento qualitativo delle principali mutazioni del gene EGFR nel DNA genomico isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), o da plasma, come da normative vigenti. Il test deve poter individuare le più comuni mutazioni sugli esoni 18, 19, 20, e 21 Il Test deve garantire una Sensibilità Analitica con un LOD (Limite di rilevamento) 0,5-1% di allele mutato per mutazioni somatiche. Il kit deve prevedere un controllo interno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare.
- Kit rilevamento qualitativo delle principali mutazioni del gene PIK3CA nel DNA genomico isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), o da plasma, come da normative vigenti. Il test deve poter individuare le più comuni mutazioni sugli esoni 4,7,9,20 Il Test deve garantire una Sensibilità Analitica con un LOD (Limite di rilevamento) 0,5-1% di allele mutato per mutazioni somatiche. Il kit deve prevedere un controllo interno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare
- Kit rilevamento qualitativo delle principali mutazioni dei geni IDH1 e IDH2 nel DNA genomico isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE), o da sangue intero (periferico o midollare), come da normative vigenti. Il test deve poter individuare le più comuni mutazioni nei codoni 105 e 132 del gene IDH1 e 140 e 172 nel gene IDH2. Il Test deve garantire una Sensibilità Analitica con un LOD (Limite di rilevamento) fino a 0,5-1% di allele mutato per mutazioni somatiche. Il kit deve prevedere un controllo interno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare
- Kit per il rilevamento delle fusioni geniche di ALK, ROS1, RET e dello skipping dell'esone 14 di MET nell'RNA totale isolato da campioni citologici e tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) e amplificato mediante One Step Real Time PCR. Il test deve poter individuare le fusioni geniche più comuni dei geni ALK, ROS1, e RET ritrovate nel tessuto tumorale dell'adenocarcinoma NSCLC. Il kit deve prevedere un controllo endogeno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare
- Kit per il rilevamento delle varianti di fusione dei geni NTRK1, NTRK2 e NTRK3 mediante One Step Real Time su campioni di RNA totale isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) e campioni citologici. Il kit deve prevedere un controllo endogeno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare
- Kit per la determinazione dell'instabilità dei microsatelliti nel DNA genomico isolato da tessuto tumorale fresco, congelato, fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) o sangue, amplificato mediante PCR end point e successiva analisi dei target attraverso profilo di denaturazione o tramite sequenziamento. I marcatori analizzati devono essere compatibili con il pannello Bethesda modificato del 2002 ovvero marcatori mononucleotidici quasi monomorfici al fine di evitare la necessità di analisi parallela tra tessuto tumorale tessuto sano. Il Kit deve garantire una specificità maggiore del 99% e una sensibilità clinica considerando la sottopopolazione di campioni di tumori del colon maggiore o uguale al 99%

- Kit per il rilevamento dei polimorfismi associati alla tossicità al trattamento con irinotecano, della regione promotrice del gene UGT1A1 nel DNA genomico umano isolato da sangue periferico in EDTA. In particolare il kit deve permettere la ricerca dei seguenti polimorfismi UGT1A1*1 (TA)6, UGT1A1*28 (TA)7, UGT1A1*36 (TA)5 e UGT1A1*37 (TA)8, UGT1A1*6 come da nota EMA/AIFA del 31/01/2022. Il kit deve prevedere sia un controllo positivo wild type sia un controllo positivo mutato.
- Ricerca di mutazioni dei gene HRAS, KRAS, BRAF e NRAS per la diagnosi e il trattamento dei pazienti con noduli tiroidei a citologia indeterminata. Il kit deve permettere la ricerca delle principali mutazioni dei codoni 12, 13, e 61 dei geni HRAS, NRAS, KRAS e dei codoni 600 e 601 del gene BRAF nel DNA genomico isolato da campioni citologici tiroidei o da tessuto tumorale tiroideo fresco, congelato o fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Il test deve garantire un LOD fino al 1%. Il kit deve prevedere un controllo interno per il monitoraggio della quantità e qualità del campione da analizzare.
- Kit per il rilevamento delle fusioni geniche RET/PTC1 (CCDC6-RET), RET/PTC2 (PRKARIA-RET), RET/PTC3 (NCOA4-RET), PAX8/PPARG nell'RNA totale isolato da tessuto tumorale fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) o da agoaspirati tiroidei e amplificato mediante One Step Real-Time RT-PCR. Il kit deve includere un controllo endogeno in ciascuna mix di amplificazione: l'amplificazione del gene di controllo interno permette di verificare la corretta esecuzione della procedura di amplificazione, la quantità di RNA utilizzata come input e l'eventuale presenza di inibitori, che possono causare dei risultati falsamente negativi.
- Pannello Primo Livello DNA: KIT CE-IVD con reagenti pronti all'uso per la detection di mutazioni a singolo nucleotide dei geni ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, FGFR3, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET, ROS1, POLE. Kit di sequenziamento validato a partire da campioni FFPE e ctDNA.
- Pannello RNA: KIT CE-IVD per il sequenziamento genico con reagenti pronti all'uso per la detection di traslocazioni dei geni ALK, FGFR2, FGFR3, MET (exon 14 skipping), NTRK1, NTRK2, NTRK3, PPARG, RET, ROS1. Kit di sequenziamento validato a partire da campioni FFPE e ctDNA.
- BRCA1/2: Kit per il sequenziamento genico marcato CE-IVD per lo studio di mutazioni CNV di interesse nelle neoplasie ovariche e della prostata, validato a partire da DNA estratto da tessuto FFPE. Il test deve prevedere reagenti pronti all'uso, un sistema CE-IVD automatico di interpretazione e produzione dei risultati in locale e per analisi di BRCA1/2 Germinale da DNA estratto da sangue intero, in particolare per le neoplasie mammarie e del pancreas. Il test deve prevedere reagenti pronti all'uso ed un sistema CE-IVD automatico di interpretazione e produzione dei risultati in locale.

Assistenza tecnica

Tutto il sistema deve prevedere supporto scientifico e assistenza tecnica certificata

Il servizio di assistenza tecnica e manutenzione ordinaria e straordinaria deve essere garantito per tutta la durata della fornitura, sia con interventi in loco, sia con contatto telefonico e da remoto tramite sistemi informatici.

L'assistenza tecnica *full-risk* dovrà essere completa di manutenzione ordinaria e straordinaria: manutenzione ordinaria secondo quanto previsto nei manuali d'uso e di manutenzione della strumentazione; supporto specialistico telefonico in lingua italiana nelle fasce orarie lavorative dal lunedì al venerdì dalle 9:00 alle 17:30, in caso di urgenza intervento in loco entro 24 (ventiquattro) ore lavorative dalla segnalazione e risoluzione del malfunzionamento entro le successive 72 (settantadue) ore lavorative. In caso non sia possibile l'intervento tecnico risolutivo, il laboratorio deve essere messo in condizioni di continuare l'erogazione delle prestazioni. In caso di problemi gravi per cui il sistema, in toto, non è utilizzabile, la ditta deve fornire il supporto necessario per garantire comunque la continuazione delle attività diagnostiche.

La ditta deve impegnarsi a presentare ed eventualmente ad apportare per l'intera durata della fornitura e previo accordi, tutte le modifiche, integrazioni ed aggiornamenti tecnologici proposti dal mercato.

Fabbisogno presunto di consumabili

Nella **Tabella 1** viene riassunto il quantitativo presunto (n. di campioni/quadriennali) suddiviso per tipologia di KIT descritto precedentemente:

KIT	N. CAMPIONI/QUADRIENNALI
a) TEST PER LA RICERCA DI MUTAZIONI SU GENE KRAS	160
b) TEST PER LA RICERCA DI MUTAZIONI SU GENE BRAF.	320
c) TEST PER LA RICERCA DI MUTAZIONI SU GENE NRAS	160
d) TEST PER LA RICERCA DI MUTAZIONI SU GENE EGFR	160
e) TEST PER LO STUDIO DEI POLIMORFISMI DEL GENE DPYD PER LA TOSSICITA' ALLA TERAPIA CON FLUOROPIRIMIDINE	720
f) TEST PER LO STUDIO DEI POLIMORFISMI DEL GENE UGT1A1 PER LA TOSSICITA' ALLA TERAPIA CON IRINOTECANO	160
g) TEST PER LA RICERCA DI FUSIONI GENICHE DI ALK, ROS1, RET E PER LO SKIPPING DELL'ESONE 14 DI MET MEDIANTE ONE-STEP REAL TIME	320
h) TEST PER LA RICERCA DELLE PRINCIPALI MUTAZIONI DEL GENE PIK3CA	160
i) TEST PER LA RICERCA DELLE FUSIONI DEL GENE NTRK1, NTRK2, NTRK3 MEDIANTE ONE-STEP REAL TIME	160
j) TEST PER LA RICERCA DI MUTAZIONI SUI GENI IDH1/IDH2	160
k) TEST PER LO STUDIO DELL'INSTABILITA' DEI MICROSATELLITI	160
l) TEST PER LA RICERCA DELLE FUSIONI GENICHE CHE COINVOLGONO RET/PTC1, RET/PTC2, RET/PTC3 E PAX8/PPARG per i tumori Tiroidei	160
m) TEST PER LA RICERCA DELLE MUTAZIONI DEI GENI KRAS, HRAS, NRAS E BRAF PER LA DIAGNOSI E LA PROGnosi DEI NODULI TIROIDEI A CITOLOGIA INDETERMINATA	160

Tabella 1: quantitativo presunto (n. di campioni)

Nella **Tabella 2** viene riassunto il quantitativo presunto (n. di campioni/quadriennali) suddiviso per tipologia di KIT descritto precedentemente:

PANNELLO	N. CAMPIONI QUADRIENNALI
Pannello per la detection di mutazioni a singolo nucleotide dei geni ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, FGFR3, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET, ROS1, POLE. Kit validato a partire da campioni FFPE e ctDNA.	192
Pannello per la detection di traslocazioni dei geni ALK, FGFR2, FGFR3, MET (exon 14 skipping), NTRK1, NTRK2, NTRK3, PPARG, RET, ROS1.	192
Pannello per lo studio di mutazioni CNV di interesse nelle neoplasie ovariche e della prostata, validato a partire da DNA estratto da tessuto FFPE.	192

Tabella 2: quantitativo presunto (n. di campioni)

Caratteristiche preferenziali soggette a punteggio

Strumentazione 40 punti:

Nella **Tabella 3** le caratteristiche preferenziali della Strumentazione soggette a punteggio.

CARATTERISTICA SOGGETTA A VALUTAZIONE	VALUTAZIONE
Sistema Real Time PCR: almeno 5 canali ottici di lettura	Max 5 PUNTI
Sistema NGS: Flusso di lavoro NGS integrato che permetta l'esecuzione contemporaneamente in singola seduta analitica di analisi a partire da DNA e RNA	Max 5 PUNTI
Sistema Real Time PCR: possibilità di processare campioni sia a RNA che DNA in una singola	Max 10 PUNTI

corsa	
Sistema Real Time PCR: Possibilità di correre saggi diversi in unica corsa per ottimizzare tempi macchina (medesimo protocollo termico per diversi saggi)	Max 10 PUNTI
Software CE-IVD di Real Time PCR che permette di visionare sempre i dati grezzi di amplificazione	Max 5 PUNTI
Software con possibilità di interpretazione automatica	Max 5 PUNTI

Tabella 3: Caratteristiche preferenziali della Strumentazione soggette a punteggio.

Reagenti 25 punti:

Nella **Tabella 4** le caratteristiche preferenziali dei Reagenti soggette a punteggio.

CARATTERISTICA SOGGETTA A VALUTAZIONE	VALUTAZIONE
Reagenti per RTPCR e per sequenziamento liofilati precaricati in strip e pronti all'uso stabili a temperatura ambiente	Max 5 PUNTI
Possibilità di effettuare sia analisi di mutazione per singolo gene sia analisi a pannello (per esempio pannello lung o pannello coloncarcinoma) in un'unica reazione	Max 5 PUNTI
Kit NGS completi di reagenti necessari per la quantifica e la valutazione qualitativa degli acidi nucleici tramite qPCR.	Max 5 PUNTI
Pannello per la ricerca di varianti predittive nell'ambito dei principali tumori solidi, quali: COLON – POLMONE- MELANOMA- GIST – TIROIDE – SNC. (etc.) Validato CE-IVD a partire da tessuto FFPE e ctDNA	Max 5 PUNTI
Fornitura di VEQ nazionali e/o internazionali per tutti in saggi richiesti	Max 3 PUNTI
Possibilità di analisi di marcatori con valore diagnostico/prognostico/predittivo utilizzabili anche su matrici biologiche diverse da tessuto o cfDNA isolato da plasma (relazionare)	Max 2 PUNTI

Tabella 4: Caratteristiche preferenziali dei Reagenti soggette a punteggio.

Assistenza 5 punti

Nella **Tabella 5** le caratteristiche preferenziali relative all'assistenza soggette a punteggio.

CARATTERISTICA SOGGETTA A VALUTAZIONE	VALUTAZIONE
Assistenza tecnica e Supporto scientifico certificato da remoto o in loco per qualsiasi esigenza di allestimento delle reazioni di sequenziamento (da preparazione delle librerie all'analisi del dato ottenuto)	Max 2 PUNTI
Presenza sul territorio Nazionale di un laboratorio aziendale in cui effettuare risoluzione di problemi e corsi di aggiornamento addizionali	Max 1 PUNTI
Disponibilità di assistenza tecnico-applicativa finalizzata al supporto di analisi dei dati bionformatici in lingua italiana	Max 2 PUNTI

Tabella 5: Caratteristiche preferenziali relative all'assistenza soggette a punteggio.

Sopralluogo obbligatorio e vincoli impiantistici

Le ditte dovranno effettuare un sopralluogo nel laboratorio destinatario della fornitura per valutare l'idoneità degli spazi messi a disposizione per installare la loro strumentazione. Le ditte dovranno indicare le caratteristiche impiantistiche e logistiche necessarie alla corretta installazione della strumentazione negli spazi dedicati.