**Załącznik nr 5 do zapytania ofertowego**

**nr LAB/FEWM.01.02-02/2024/1.1**

**Opis celu i zakresu usługi badawczej**

**Zakres ogólny usługi**

Przedmiotem zamówienia jest realizacja usługi badawczo‑rozwojowej polegającej na opracowaniu procesu wzbogacania targetów genetycznych poprzez namnażanie w reakcjach RT‑PCR/PCR reprezentatywnych fragmentów genomu o wysokiej zmienności, umożliwiających analizę filogenetyczną oraz jednoznaczne rozróżnienie szczepów terenowych (dzikich) i szczepionkowych badanych patogenów.

Zakres usługi obejmuje w szczególności:

* identyfikację i wybór regionów genomowych o wysokiej wartości filogenetycznej, umożliwiających rozróżnienie szczepów terenowych i szczepionkowych,
* projektowanie i walidację in silico specyficznych starterów RT‑PCR/PCR,
* optymalizację i walidację warunków reakcji RT‑PCR/PCR,
* uzyskanie amplikonów w ilości i jakości wystarczającej do dalszego przetwarzania, w tym budowy bibliotek NGS lub sekwencjonowania metodą Sangera.

Zakres prac ma charakter badawczo‑rozwojowy (R&D) i nie obejmuje pełnej walidacji klinicznej metod diagnostycznych w rozumieniu obowiązujących norm akredytacyjnych.

**Cel**

Celem badań jest opracowanie zestawów reakcji RT‑PCR/PCR umożliwiających namnażanie specyficznych fragmentów genomowych przeznaczonych do porównawczej analizy filogenetycznej i molekularnej charakterystyki szczepów, ze szczególnym uwzględnieniem rozróżnienia szczepów terenowych i szczepionkowych, dla następujących patogenów:

* **Ptasiego koronawirusa (aCoV), wirusa zakaźnego zapalenia oskrzeli (IBV)** – opracowanie metody wzbogacania targetów umożliwiającej analizę filogenetyczną szczepów IBV, w tym rozróżnienie szczepów terenowych i szczepionkowych.
* **Ptasiego metapneumowirusa (aMPV), czynnika etiologicznego zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy (TRT)** – opracowanie metody wzbogacania targetów umożliwiającej analizę filogenetyczną szczepów aMPV, w tym rozróżnienie szczepów terenowych i szczepionkowych.
* **Ptasiego birnawirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza (IBDV)** – opracowanie metody wzbogacania targetów umożliwiającej analizę filogenetyczną szczepów i wariantów wirusa, w tym rozróżnienie szczepów terenowych i szczepionkowych.
* **Wirusa zespołu rozrodczo‑oddechowego świń (PRRSV)** – opracowanie metody wzbogacania targetów umożliwiającej analizę filogenetyczną, w tym różnicowanie szczepów europejskich (EU) dzikich i szczepionkowych oraz analizę filogenetyczną szczepów północnoamerykańskich (NA).
* **Cirkowirusa świń typu 2 (PCV2)** – opracowanie metody wzbogacania targetów umożliwiającej analizę filogenetyczną wariantów wirusa PCV2, w tym rozróżnienie szczepów terenowych i szczepionkowych

**Etapy prac wraz z zakresem merytorycznym**

**Etap 1. Prace koncepcyjne i bioinformatyczne – identyfikacja targetów**

* przegląd literatury naukowej oraz publicznych baz sekwencji (NCBI GenBank, ViPR oraz inne ogólnodostępne repozytoria; dane z GISAID wykorzystywane wyłącznie do analiz porównawczych, zgodnie z warunkami licencyjnymi),
* analiza bioinformatyczna sekwencji z wykorzystaniem narzędzi takich jak MEGA, Geneious, UGENE, Clustal Omega, MUSCLE w celu:
  + określenia zmienności genetycznej potencjalnych regionów docelowych,
  + identyfikacji regionów umożliwiających jednoznaczne różnicowanie szczepów terenowych (dzikich) i szczepionkowych, w szczególności poprzez obecność charakterystycznych mutacji, delecji lub klastrów filogenetycznych powiązanych z pochodzeniem szczepu,
  + weryfikacji kompatybilności z dalszymi etapami (długość amplikonu, zawartość GC, brak homologii z genomem gospodarza),
* wybór co najmniej jednego regionu docelowego dla każdego patogenu (docelowo 400–1200 pz).

**Produkt etapu:** raport z analiz in silico oraz lista rekomendowanych regionów docelowych, przekazywane sukcesywnie do akceptacji Zamawiającego.

**Etap 2. Projektowanie i walidacja in silico starterów**

* projektowanie kilku alternatywnych par starterów RT‑PCR/PCR dla każdego wybranego regionu docelowego z wykorzystaniem narzędzi takich jak Primer3, OligoAnalyzer, NCBI Primer‑BLAST,
* uwzględnienie kluczowych parametrów projektowych: długość starterów 18–25 nt, temperatura topnienia (Tm), brak struktur drugorzędowych (dimery, spinki), wysoka specyficzność wobec sekwencji docelowej,
* walidacja in silico zaprojektowanych starterów, obejmująca analizę specyficzności oraz ocenę ryzyka amplifikacji niespecyficznej,
* weryfikacja kompatybilności starterów z planowanym sekwencjonowaniem (NGS/Sanger).

**Produkt etapu:** zestawy starterów wraz z dokumentacją projektową, przekazywane sukcesywnie do zatwierdzenia przez Zamawiającego.

**Etap 3. Optymalizacja i walidacja laboratoryjna RT‑PCR/PCR**

* optymalizacja warunków reakcji RT‑PCR/PCR (typ reakcji one‑step/two‑step, temperatura przyłączania, stężenie starterów, MgCl₂, ilość matrycy, liczba cykli),
* walidacja amplifikacji na materiale referencyjnym dostarczonym przez Wykonawcę i uzgodnionym z Zamawiającym,
* jakościowa i ilościowa ocena produktów PCR (elektroforeza, Fragment Analyzer lub metody równoważne),
* selekcja optymalnych zestawów starterów i warunków reakcji zapewniających:
  + jednoznaczną amplifikację produktu o oczekiwanej długości,
  + wysoką powtarzalność wyników (>95%),
  + możliwość amplifikacji z niskiej ilości materiału genetycznego,
  + brak amplifikacji niespecyficznej.

**Produkt etapu:** zoptymalizowane protokoły RT‑PCR/PCR oraz raport walidacyjny.

**Etap 4. Weryfikacja przydatności do sekwencjonowania**

* przygotowanie próbnych bibliotek NGS z wybranych amplikonów lub weryfikacja kompatybilności z sekwencjonowaniem metodą Sangera,
* ocena jakości bibliotek (rozkład długości fragmentów, molarność, udział sekwencji on‑target),
* analiza danych sekwencyjnych w celu potwierdzenia zgodności uzyskanych sekwencji z przewidywanymi regionami filogenetycznymi oraz zdolności rozróżniania szczepów terenowych i szczepionkowych.

**Produkt etapu:** Raport potwierdzający przydatność uzyskanych amplikonów do dalszego sekwencjonowania poprzez analizę danych sekwencyjnych z próbnych bibliotek NGS, w którym zostanie wykazane odrębne klastrowanie szczepów terenowych i szczepionkowych.

**Harmonogram realizacji usługi**

Realizacja usługi planowana jest na okres od30 marca 2026 roku do 31 maja 2027 roku, z etapową realizacją prac i odbiorami częściowymi umożliwiającymi sukcesywne przekazywanie wyników oraz ich bieżącą weryfikację przez Zamawiającego.

**Osoba prowadząca/nadzorująca ze strony Zamawiającego**

Tomasz Szubstarski

**Powstanie nowej wiedzy i sposób jej weryfikacji**

**Wskaźnik wykonania:** Opracowanie pięciu zestawów starterów RT‑PCR/PCR do wzbogacania specyficznych targetów genomowych patogenów IBV, aMPV, IBDV, PRRSV i PCV2, umożliwiających analizę filogenetyczną oraz jednoznaczne rozróżnienie szczepów terenowych i szczepionkowych.

**Sposób weryfikacji:**

* Raport z analizy in silico potwierdzający specyficzność zaprojektowanych starterów oraz filogenetyczną użyteczność wybranych targetów. Zidentyfikowane i zatwierdzone przez Zamawiającego regiony docelowe, potwierdzające zdolność wybranych targetów do rozróżniania szczepów terenowych i szczepionkowych;
* Pełna optymalizacja i walidacja RT‑PCR/PCR dla wszystkich patogenów. Raport z wynikami testów laboratoryjnych potwierdzających skuteczność i powtarzalność amplifikacji, rozumianą jako odsetek udanych amplifikacji w próbach referencyjnych przy zdefiniowanych warunkach reakcji na poziomie ≥95%;
* Potwierdzenie w warunkach laboratoryjnych, że uzyskane amplikony umożliwiają rozdział szczepów terenowych i szczepionkowych w analizie filogenetycznej.
* Potwierdzona przydatność uzyskanych amplikonów do dalszego sekwencjonowania poprzez analizę danych sekwencyjnych z próbnych bibliotek NGS,
* Analiza filogenetyczna uzyskanych sekwencji wykazuje odrębne klastrowanie szczepów terenowych i szczepionkowych, zgodnie z danymi referencyjnymi.

**Formalne potwierdzenie wykonania usługi**

Podstawą odbioru usługi będą raport końcowy oraz raporty cząstkowe dla poszczególnych etapów prac, zawierające wyniki analiz, protokoły RT-PCR/PCR (SOP) oraz dokumentację walidacyjną.