



LIFE18 NAT/RO/001082

CAIET DE SARCINI (Specificații tehnice)

TECHNICAL SPECIFICATIONS

În vederea atribuirii contractului de achiziție publică având ca obiect contractarea de servicii pentru analize genetice ale probelor non-invasive de ADN pentru speciile urs, lup, râs și cerb.

To award a public procurement contract to provide laboratory research services for the analysis of non-invasive DNA samples of brown bear, wolf, Eurasian lynx and red deer.

CPV Code	Description RO	Descriere EN
73111000-3	Servicii de laborator de cercetare	Laboratory research services

1. ASPECTE GENERALE

1.1. Denumire servicii

Contractarea de servicii pentru analize genetice ale probelor non-invasive de ADN pentru speciile urs, lup, râs și cerb.

1.2. Achizitor/ Autoritatea contractantă:

FUNDAȚIA CONSERVATION
CARPATHIA, Calea Feldioarei, NR. 27,
Mun. BRAȘOV.

Email: info@carpathia.org, CF: 26358046,
atribut fiscal RO.

Cod postal 500471, Tel. 0040740235406,
Fax: 0368452411

1. GENERAL ASPECTS

1.3. Services name

Contracting services for genetic analysis of non-invasive DNA samples for brown bear, wolf, Eurasian lynx and red deer.

1.4. Purchaser / Contracting authority:

FUNDAȚIA CONSERVATION
CARPATHIA, 27 Calea Feldioarei,
BRAȘOV.

Email: info@carpathia.org, CF: 26358046,
fiscal attribute RO.

Postcode 500471, Tel. 0040740235406,
Fax: 0368452411.

2. DATE TEHNICE

Pentru o buna intelegere a obiectivelor contractului și pentru a formula oferta, ofertanții trebuie să țină cont de urmatoarele aspecte:

Fundația Conservation Carpathia (FCC) a implementat începând cu 2017 o schemă de monitorizare pe termen lung a speciilor urs, lup, râs și cerb. La momentul actual FCC a finalizat cu succes etapa inițială din schema de monitorizare (*T0*) având estimări populaționale exacte plecând de la date genetice pentru toate speciile (e.g., [losif et al., 2021](#)). Conform proiectul LIFE18 NAT/RO/001082, la 4-5 ani de la etapa inițială de monitorizare, FCC trebuie să monitorizeze din nou populațiile studiate (*T1*) pentru a înțelege care sunt tendințele populaționale în contextul măsurilor de conservare luate (restaurare ecologică, interzicerea vânătorii la trofeu, șamd). De aceea comparabilitatea datelor între momentele *T0* și *T1* este crucială pentru succesul proiectului LIFE18 NAT/RO/001082.

Activitatea de monitorizare a faunei din proiectul LIFE18 NAT/RO/001082 are trei mari etape: etapa de teren, etapa de laborator și etapa analizei statistice a datelor. Chiar dacă contractul de față se referă mai ales la etapa de laborator, celelalte două fiind realizate de FCC, prezentăm mai jos toate cele trei etape astfel încât ofertanții să înțeleagă întregul proces și calendarul aferent. Etapa de laborator are metodologia detaliată. Ofertanții vor oferi suport pentru câteva zile și în etapa de teren pentru codificarea recipientelor de colectare probe de genetică.

2. TECHNICAL DATA

For a good understanding of the contract objectives and for writing the offer, the bidders shall take into consideration the following requirements:

The Foundation Conservation Carpathia (FCC) has implemented a long-term monitoring scheme for brown bear, wolf, Eurasian lynx and red deer since 2017. At present FCC has successfully completed the initial stage of the monitoring scheme (*T0*) having accurate population estimates from genetic data for all species (e.g., [losif et al., 2021](#)). According to the LIFE18 NAT/RO/001082 project, 4-5 years after the initial monitoring stage, FCC should monitor the studied populations again (*T1*) to understand what the population trends are in the context of the conservation measures taken (ecological restoration, trophy hunting ban, etc.). Therefore, data compatibility between *T0* and *T1* is crucial for the success of the LIFE18 NAT/RO/001082 project.

The wildlife monitoring activity within the LIFE18 NAT/RO/001082 project has three main phases: the field phase, the laboratory phase and the data analysis phase. Although this contract is mainly concerned with the laboratory phase, the other two being carried out by the FCC, we present all three phases below so that bidders can understand the whole process and the timeline. The laboratory phase has detailed methodology. Bidders will also give marginal support in the field phase for coding and labelling the genetics sample collection kits.

2.1. Etapa de teren

Responsabilități:

- *Furnizează codurile data matrix pentru recipientele de colectare - prestatorul;*
- *Pregătește recipientele de colectare - autoritatea contractantă;*
- *Colectează probele în teren - autoritatea contractantă;*
- *Transportul probelor - autoritatea contractantă;*

În perioada 2022-2023 proiectul sus-menționat presupune realizarea unor studii populaționale (recensăminte) bazate pe genetică. Etapa de teren care presupune colectarea probelor non-invasive de ADN va fi realizată de FCC astfel: septembrie - decembrie 2022 - colectare probe urs, decembrie 2022 - mai 2023 - colectare probe lup și râs, iunie - octombrie 2023 - colectare probe cerb. Probele non-invasive de ADN colectate vor fi în principal excremente, fire de păr, urină lăsate de animale în habitatul lor, și mai rar sânge și țesut de la animale găsite moarte.

Întrucât vom colecta și procesa un număr mare de probe cu volum mare de date asociate fiecărei probe, dar și datorită faptului că probele vor fi prelucrate de un număr mare de persoane în toate etapele studiului, există un risc semnificativ de a încurca setul de date (erori umane). Pentru a reduce aceste erori la zero, traseul probelor și a datelor asociate va fi urmărit cu ajutorul unor coduri unice de tip data matrix din teren până la laborator, în cadrul tuturor procedurilor de laborator, respectiv în cadrul analizelor statistice post laborator. Aceste coduri sunt lipite inițial pe recipientele de colectare, prestatorul trebuie să aibă experiență de lucru cu seturi mari de probe biologice, să implementeze un sistem de trasabilitate cu ajutorul unei imprimante de coduri de bare pe hârtie plastifiată și cititor de coduri. După semnarea contractului, prestatorul va furniza codurile unice de tip data matrix pentru a fi lipite pe recipientele de colectare pentru toate speciile (vezi mai jos).

2.1. Field stage

Responsibilities:

- *Provide data matrix codes for sampling kits - the bidder;*
- *Prepare sampling kits - contracting authority;*
- *Collect the samples in the field - contracting authority;*
- *Samples shipping - contracting authority;*

Between 2022-2023 the above-mentioned project involves population surveys (censuses) based on non-invasive DNA sampling. The field stage will be carried out by FCC as follows: September - December 2022 - brown bear sample collection, December 2022 - May 2023 - wolf and lynx sample collection, June - October 2023 - deer sample collection. The non-invasive DNA samples collected will mainly be scat, hair, urine left by animals in their habitat, and less frequently blood and tissue from animals found dead.

Since we will be collecting and processing a large number of samples with a large volume of data associated with each sample, but also because the samples will be processed by a large number of people at all stages of the study, there is a significant risk of mistaking records in the dataset (human errors). In order to reduce these errors to zero, the samples and associated data will be tracked using unique data matrix barcodes from the field to the laboratory, in all laboratory procedures, and in post-laboratory statistical analyses. These codes are initially glued to collection kits, the bidder must have experience working with large sets of biological samples, implement a traceability system using a laminated paper barcode printer and bar-code reader. Once the contract is signed, the bidder will provide unique data matrix codes to be glued to collection kits for all species (see below).

Etapa de teren va avea următorul calendar care cuprinde și frecvența de livrare aproximativă a probelor colectate (Figura 1).

Urs: Între septembrie și decembrie 2022 vom colecta aproximativ 1000-1200 probe non-invazive de urs din excremente și fire de păr. Ocazional vom colecta și țesut și sânge de la animale găsite moarte. Probele de păr vor fi fixate în plicuri de hârtie închise într-o pungă de plastic ziplock cu silica gel. Pentru a evita degradarea materialului genetic, probele de păr vor fi trimise prestatorului o dată pe lună pentru extragerea ADN-ului cu prioritate. Probele de excremente (ocazional și țesut și sânge) vor fi colectate în tubușoare cu alcool și păstrate la -20 grade Celsius și vor fi trimise către prestator o singură dată la sfârșitul perioadei de colectare.

Lup și Râs: Între decembrie 2022 și mai 2023 vom colecta aproximativ 300-400 probe non-invazive de lup și râs din excremente, fire de păr și urină din zăpadă. Ocazional vom colecta și țesut și sânge de la animale găsite moarte. Probele de păr vor fi fixate în plicuri de hârtie închise într-o pungă de plastic ziplock cu silica gel. Pentru a evita degradarea materialului genetic, probele de păr vor fi trimise ofertantului o dată pe lună pentru extragerea ADN-ului cu prioritate. Probele de excremente și urină (ocazional și țesut și sânge) vor fi colectate în tubușoare cu alcool și păstrate la -20 grade Celsius și vor fi trimise către ofertant o singură dată la sfârșitul perioadei de colectare.

Cerb: Între iunie și octombrie 2023 vom colecta între 600-900 probe non-invazive de cerb din excremente. Ocazional vom colecta și țesut și sânge de la animale găsite moarte. Probele de excremente (ocazional și țesut și sânge) vor fi colectate în tubușoare cu alcool și păstrate la -20 grade Celsius și vor fi trimise către prestator o singură dată la sfârșitul perioadei de colectare.

Riscurile din etapa de teren pot afecta și etapa de laborator. Riscurile meteorologice pot reduce drastic capacitatea de colectare a probelor în teren. În situația în care condițiile meteo vor bloca activitatea de teren, e.g., lipsa zăpezii la lup și la râs (detectabilitate redusă a probelor) sau ploile

The field phase will have the following timetable which also covers the approximate delivery frequency of the collected samples (Figure 1).

Brown bear: Between September and December 2022 we will collect about 1000-1200 non-invasive bear samples from scats and hairs. Occasionally we will also collect tissue and blood from animals found dead. Hair samples will be secured in paper envelopes sealed in a plastic ziplock bag with silica gel. To avoid degradation of genetic material, hair samples will be sent to the bidder once a month for priority DNA extraction. Scat samples (occasionally also tissue and blood) will be collected in tubes with ethanol and stored at -20 degrees Celsius and will be sent to the bidder once at the end of the collection period.

Wolf and Lynx: Between December 2022 and May 2023 we will collect approximately 300-400 non-invasive samples of wolf and lynx from scats, hairs and urine on snow. Occasionally we will also collect tissue and blood from animals found dead. Hair samples will be secured in paper envelopes sealed in a plastic ziplock bag with silica gel. To avoid degradation of genetic material, hair samples will be sent to the bidder once a month for priority DNA extraction. Scats and urine samples (occasionally also tissue and blood) will be collected in tubes with ethanol and stored at -20 degrees Celsius and will be sent to the bidder once at the end of the collection period.

Red deer: in June-October 2023 we will collect between 600-900 non-invasive samples from red deer faecal pellets. Occasionally we will also collect tissue and blood from animals found dead. Faecal pellets samples (occasionally also tissue and blood) will be collected in tubes with ethanol and stored at -20 degrees Celsius and will be sent to the bidder once at the end of the collection period.

Risks in the field phase can also affect the laboratory phase. Meteorological risks can drastically reduce the ability to collect samples in the field. If weather conditions severely affect field work, e.g., lack of snow for wolf and lynx sampling (reduced sample detectability) or heavy rains for red deer and bear

abundente la cerb și la urs (ploi care degradează ADN-ul în probele non-invazive), FCC va recalibra efortul de eșantionare în teren în următorul an față de calendarul propus. În consecință, ofertantul trebuie să aibă capacitatea să recalibreze calendarul său de analiză a probelor în laborator.

sampling (rains degrading DNA in non-invasive samples), FCC will recalibrate the field sampling effort in the next year from the proposed schedule. Accordingly, the bidder must have the ability to recalibrate its laboratory schedule.

2.2. Etapa de laborator

2.2. Laboratory stage

Responsabilități:

- *Oferă probele non-invazive de ADN pentru toate speciile: autoritatea contractantă;*
- *Probe de referință câine pentru analizele de hibridizare la lup: autoritatea contractantă;*
- *Oferă datele de teren asociate fiecărei probe (metadata) - autoritatea contractantă;*
- *Analizele de laborator - prestatorul;*
- *Livrabile, rapoarte, date brute cu privire la genotipuri - prestatorul;*

Responsibilities:

- *Provides the non-invasive DNA samples for all species: contracting authority;*
- *Dog reference samples for wolf-dog hybridization analysis - contracting authority;*
- *Provide the field data associated with each sample (metadata) - contracting authority;*
- *Lab analyses - the bidder;*
- *Deliverables, reports, raw data with genotypes - the bidder;*

2.2.1 Organizarea laboratorului și prevenirea contaminării

2.2.1 Laboratory organisation and contamination prevention

ADN-ul în probele non-invazive este de calitate slabă și în cantitate redusă, de aceea contaminarea (mai ales cu reziduri PCR) este o problemă serioasă. Ofertanții sunt responsabili de implementarea unei proceduri stricte de lucru a probelor astfel încât să elimine riscul contaminării. Ofertanții trebuie să folosească o cameră laborator dedicată extracției de ADN și o altă cameră laborator dedicată analizelor PCR și post PCR și trebuie să aibă protocoale stricte de acces / transfer între cele două laboratoare. Ofertanții trebuie să folosească controale negative ale probelor în toate etapele de laborator.

DNA in non-invasive samples is of poor quality and low quantity, thus, the contamination (especially with PCR residues) is a serious problem. Bidders are responsible for implementing a strict procedure for working with samples so as to eliminate the risk of contamination. Bidders must use one laboratory room dedicated to DNA extraction and another laboratory room dedicated to PCR and post PCR analysis and must have strict access/transfer protocols between the two laboratories. Bidders must use negative sample controls at all stages in the laboratory.

2.2.2 Extracția ADN cu ajutorul roboților de laborator

2.2.2 DNA extraction using laboratory robots

Extracția ADN este o etapă crucială a procesului de genotipare a probelor care influențează toate etapele de laborator ulterioare. Pentru a reduce riscul de contaminare, pentru a extrage ADN-ul din probele de excremente, urină și păr, manipularea probelor se va face cu ajutorul roboților (liquid handling robots).

DNA extraction is a crucial step in the process of genotyping samples that influences all subsequent laboratory steps. In order to reduce the risk of contamination, to extract DNA from faeces, urine and hair samples, sample handling will be done with robots (liquid handling robot). DNA extraction using

Extracția ADN cu ajutorul acestor roboți este crucială atât pentru eliminarea erorilor cât și pentru reducerea timpilor de extracție și respectarea termenelor de livrare. Utilizarea roboților în această etapă este importantă fiindcă elimină practic posibilitatea de a încurca probele între ele, întrucât robotul citește codurile unice de tip data matrix asociate fiecărei probe (vezi 2.1. Etapa de teren).

În cazul probelor de sânge sau țesut, întrucât numărul lor este mic, extracția ADN se poate realiza și manual, cu ajutorul kiturilor de extracție (spre exemplu Sigma GenElute).

2.2.3 Genotiparea probelor

Metodele de genotipare diferă de la specie la specie datorită faptului că utilizăm markeri genetici specifici pentru fiecare specie.

2.2.3.1 Ursul brun

Pentru comparabilitatea genotipurilor între momentele de timp T_0 și T_1 , ofertanții trebuie să utilizeze metoda de genotipare descisă în De Barba și colab. (2016). Metoda se bazează pe secvențierea ADN de ultimă generație (NGS), rezolvă problema comparabilității genotipurilor între diferite laboratoare, rezolvă problema subiectivismului în genotipare, crește succesul de genotipare, și reduce timpul de analiză la un preț mai redus.

Secvențele ADN utilizate sunt descrise în De Barba și colab. (2016) și nu vor fi repetate aici. Pentru înțelegerea tuturor detaliilor ofertanții trebuie să citească lucrarea sus-menționată dar și studiile Skrbinek et al. 2019 și Iosif et al 2021. Pe scurt, la specia urs trebuie analizați 13 markeri genetici și un marker de identificare a sexului în cadrul aceleiași analize PCR. Markerii genetici folosiți sunt: Ua03, Ua06, Ua14, Ua16, Ua17, Ua25, Ua51, Ua57, Ua63, Ua64, Ua65, Ua67, Ua68, and ZF for sex ID. În această etapă prestatorul trebuie să aibă grijă la erorile de pipetare pentru că aceste erori pot afecta toate etapele ulterioare de laborator. Folosirea roboților pentru procesarea microplăcilor cu secvențe ADN este crucială și aici.

these robots is crucial both to eliminate errors and to reduce extraction times and meet delivery deadlines. The use of robots at this stage is important because it virtually eliminates the possibility of mixing up samples, as the robot reads the unique data matrix codes associated with each sample (see 2.1 Field stage).

In the case of blood or tissue samples, since their number is small, DNA extraction can also be performed manually using extraction kits (e.g. Sigma GenElute).

2.2.3 Genotyping of samples

Genotyping methods differ from species to species because we use species-specific genetic markers.

2.2.3.1 Brown bear

For comparability of genotypes between time frames T_0 and T_1 , bidders must use the genotyping method described in De Barba et al. (2016). The method uses genotyping-by-sequencing of microsatellite markers based on next-generation DNA sequencing (NGS), solves the problem of genotype comparability between different laboratories, solves the problem of subjectivity in genotyping, increases genotyping success, and reduces analysis times at a lower cost.

The analytical procedure is described in De Barba et al. (2016) and will not be repeated here. To understand all the details bidders should read the above mentioned paper but also the studies by Skrbinek et al. 2019 and Iosif et al 2021. Briefly, for brown bear, 13 genetic markers and one sex identification marker have to be analysed in the same PCR analysis. The genetic markers used are Ua03, Ua06, Ua14, Ua16, Ua17, Ua25, Ua51, Ua57, Ua63, Ua64, Ua65, Ua67, Ua68, and ZF for sex ID. At this stage the bidder must be careful about pipetting errors because these errors can affect all subsequent laboratory steps. The use of liquid handling robots for processing DNA sequence microplates is crucial here as well.

După obținerea secvențelor de ADN sub forma unui fișier text, ofertanții trebuie să utilizeze unelte informatice pentru a identifica alelele fiecărui urs. Pentru a verifica acuratețea acestei etape informatice, ofertanții vor calcula următorii indici pentru fiecare probă: până la opt re-amplificări per probă în funcție de calitatea probei și suprapunerea genotipului cu altă probă conform Adams & Waits, 2007 respectiv Taberlet și colab., 1996; indicele de calitate descris de Miquel și colab., 2006 și indicele de calitate descris de Miller, Joyce, & Waits, 2002.

Cea mai buna proba de la fiecare individ, va trebui analizata si cu metoda capillary sequencing. Cea mai bună probă, sau proba de referință a urșilor noi, adică cei detectați la momentul $T1$ dar care nu au fost detectați și la momentul $T0$. În situația în care un număr relativ mic de probe trebuie analizate rapid, costurile cresc semnificativ. Este cazul probelor colectate de la ursii problemă, cei care fac atacuri repetate în satele din zona de proiect. În acest caz, metoda capillary sequencing este mai potrivită chiar dacă folosește un set diferit de markeri genetici. Scopul acestei analize suplimentare este de a genera genotipuri comparabile pentru toți urșii identificați cu ajutorul markerilor NGS (vedeți mai sus). Acest lucru va permite o identificare directă, și o comparare rapidă a seturilor mici de probe, respectiv o relaționare directă cu setul istoric de genotipuri. Probele de referință trebuie să fie genotipate cu un set adițional de 11 loci microsatelitari (Mu50, G10X, G10D, G10H, G10C, G10P, Mu09, Mu59, Mu23, Mu15, G10L) și o altă genă de identificare a sexului (SRY) în cadrul unei singure reacții PCR. Protocolul este descris în detaliu în Skrbinišek et al. 2010.

2.2.3.2 Lup

Probele de lup vor fi genotipate cu ajutorul a 16 microsatelitari loci specifici canidelor în cadrul unei singure analize PCR. Cei 16 microsatelitari loci sunt: AHT137, AHT171, AHT260, AHTk211, AHTk253, CXX279, FH2054, FH2848, INRA21, INU030, INU055, REN162C04, REN169D01, REN169O18,

After obtaining the DNA sequences as a text file, bidders must use bioinformatic tools to identify the alleles of each bear. To check the accuracy of this computational step, bidders are required to calculate the following indices for each sample: up to eight re-amplifications per sample depending on the quality of the sample and the overlap of the genotype with another sample according to Adams & Waits, 2007, respectively Taberlet et al., 1996; the quality index described by Miquel et al., 2006; and the genotype reliability index described by Miller, Joyce, & Waits, 2002.

The best sample for each new individual has to be analyzed with capillary sequencing as well. The best sample is also known as the reference sample for each new individual genotyped at moment $T1$ but never detected at moment $T0$. When a small number of samples needs to be analysed in short time it becomes too slow and expensive, this being the case of samples from problem bears that do recurrent attacks in the villages. In this case, the capillary analysis is more suitable, but with this method a different set of microsatellite markers is used. The aim of this analysis is to provide genotypes from fragment analysis microsatellite markers for all the brown bear individuals identified by the NGS marker panel (see above). This will allow a quick and direct comparison of smaller batches of new samples with the already known brown bear samples. The samples have to be genotyped on 11 additional microsatellite loci (Mu50, G10X, G10D, G10H, G10C, G10P, Mu09, Mu59, Mu23, Mu15, G10L) and another sex identification locus (SRY) in a single PCR reaction. The protocol is described in detail in Skrbinišek et al. 2010.

2.2.3.2 Wolf

Wolf samples will be genotyped using 16 canid-specific microsite loci in a single PCR analysis. The 16 microsite loci are: AHT137, AHT171, AHT260, AHTk211, AHTk253, CXX279, FH2054, FH2848, INRA21, INU030, INU055, REN162C04, REN169D01, REN169O18, REN247M23,

REN247M23, REN54P11. Pentru determinarea sexului se va folosi Amelogenin locus. Acest set de markeri nu este influențat de prezența ADN-ului speciilor pradă în excremente spre exemplu (de la speciile de copitate).

Și în cadrul lupului probele vor fi analizate cu un secvențiator automat (spre exemplu Applied Biosystem ABI 3130xl Genetic Analyzer). Probele din care nu au rezultat produse PCR după două amplificări PCR vor fi eliminate din analizele ulterioare. Cele care vor genera produse PCR vor fi genotipate de până la 8 ori. Succesul de genotipare va fi verificat ca și în cazul ursului cu ajutorul indicilor de calitate din Miller, Joyce, & Waits, 2002.

Cea mai bună probă a fiecărui lup va fi amplificată cu un set adițional de 10 microsatellite loci. Aceștia sunt C09_250, C20_253, CPH12, CPH5, CPH7, CPH8, CPH9, Cxx_121, FH2010, FH2145. Încă un locus pentru identificarea sexului va fi folosit în această etapă: SRY. Motivul pentru care această analiză suplimentară va fi făcută la specia lup este pentru a evalua relațiile parentale între indivizi și pentru a detecta eventuale hibridizări cu câinii. Aceiași indici de calitate vor fi calculați și pentru acest set adițional de loci. Prestatorul va analiza relațiile parentale cu softuri specifice (spre exemplu Colony), la fel și hibridizarea (spre exemplu Structure). FCC va pune la dispoziție probe de referință de câine din zona de proiect. Rezultatele analizei de relații parentale vor trebui livrate de către prestator în format spațial, sub forma de fișiere GIS pentru fiecare pereche reproducătoare și puii ei.

2.2.3.3 Râs

Se vor folosi 10 markeri genetici pentru identificarea râșilor în cadrul unei singure secvențieri. Markerii folosiți vor fi: Fca132, Fca201, Fca247, Fca293, Fca391, Fca424, Fca567, Fca650, Fca723, Fca82. Pentru identificarea sexului se va folosi din nou markerul SRY.

2.2.3.4 Cerb

REN54P11. Amelogenin locus will be used for sex determination. This set of markers is not influenced by the presence of prey species DNA in the scat e.g. (from ungulate species).

In the wolf the samples will be analysed with an automated capillary sequencer (e.g. Applied Biosystem ABI 3130xl Genetic Analyzer). Samples from which no PCR products are obtained after two PCR amplifications will be discarded from further analysis. Those that will generate PCR products will be genotyped up to 8 times. Genotyping success will be checked as for bear using the quality indices from Miller, Joyce, & Waits, 2002.

Each wolf's best (reference) sample will be amplified with an additional set of 10 microsatellite loci. These are C09_250, C20_253, CPH12, CPH5, CPH7, CPH8, CPH9, Cxx_121, FH2010, FH2145. Another locus for sex identification will be used at this stage: SRY. The reason why this additional analysis will be done in the wolf species is to assess parental relationships between individuals and to detect possible hybridization with dogs. The same quality indices will be calculated for this additional set of loci. The bidder will analyse parental relationships with specific software (e.g. Colony), as well as hybridisation (e.g. Structure). FCC will provide reference dog samples/genotypes from the area. Pedigree reconstruction results must be delivered in a spatial format, with GIS files for all parent-offspring pairs

2.2.3.3 Lynx

Ten genetic markers will be used to identify the lynxes in a single sequencing run. The markers used will be: Fca132, Fca201, Fca247, Fca293, Fca391, Fca424, Fca567, Fca650, Fca723, Fca82. The SRY marker will again be used for sex identification.

2.2.3.4 Red deer

Se vor folosi 11 markeri genetici pentru identificarea cerbilor. Markerii folosiți vor fi: OarFCB193, TGLA127, CER14, DM44, OarFCB304, DM11, DM33, MM12, BM888, OarAE129, and BM1818. Amelogenin marker va fi folosit pentru identificarea sexului.

The bidder will use 11 genetic markers to identify red deer individuals. The markers used will be: OarFCB193, TGLA127, CER14, DM44, OarFCB304, DM11, DM33, MM12, BM888, OarAE129, and BM1818. Amelogenin marker will be used for sex ID.

2.2.4 Identificarea probelor care aparțin aceluiași genotip - atribuirea indivizilor fiecărei probe genotipate cu succes

2.2.4 Identification of samples belonging to the same genotype - assignment of individuals to each successfully genotyped sample

Identificarea probelor care aparțin aceluiași genotip nu este o operațiune simplă. În cadrul acestei etape pot apărea erori de atribuire precum atribuirea incorectă atunci când indicii de calitate ai probelor au valori mici sau crearea de indivizi noi ne-reali din cauza erorilor de genotipare. Dacă prima eroare este minimizată de numărul mare de markeri genetici folosiți per specie, pentru a cunoaște magnitudinea celei de-a doua erori prestatorul va trebui să livreze genotipurile brute pentru verificarea eventualelor neconsecvențe.

Identifying samples belonging to the same genotype is not a simple operation. Attribution errors can occur during this step, such as incorrect attribution when the quality indices of the samples have low values, or the creation of new non-real individuals due to genotyping errors. If the first error is minimised by the large number of genetic markers used per species, in order to know the magnitude of the second error the bidder will have to deliver the raw genotypes to check for possible inconsistencies.

Livrabilul final va avea forma unor seturi de date cu istoric de recapturare al indivizilor identificați pentru toate probele colectate / genotipate. Seturile de date livrate per specie vor avea o structură predefinită și vor conține toate datele colectate din teren atribuite fiecărei probe, precum și rezultatele analizelor genetice: genotipul, sexul genetic, indicii de genotipare. Pe lângă datele brute, rapoartele trebuie să includă (vedeți tabelul de la capitolul 6 mai jos): statistici descriptive și evaluări ale succesului de genotipare în funcție de diversi factori (fondul cinegetic, persoana care a colectat proba, luna în care au fost colectate probele, vechimea probei, etc.); descrierea relațiilor parentale la lup; descrierea relațiilor de hibridizare lup-câine dacă este cazul.

The final report for all species should contain raw datasets with recapture history of identified individuals for all collected/genotyped samples. The delivered datasets per species will have a predefined structure and will contain all data collected from the field assigned to each sample, as well as the results of genetic analyses: genotype, genetic sex, genotyping indices. Beside the raw data, the reports (see tables at point 6 below) should include: descriptive statistics and explorations of the genotyping success against various factors (game management unit, collector, month of sampling, scat age, etc.); description of the parental relationships for wolf; description of the wolf-dog hybridization patterns.

2.3. Etapa de birou - analiză statistică

Responsabilități:

- Analiza datelor, modelare statistică - autoritatea contractantă;

Livrabilele de la punctul 2 vor fi utilizate de către FCC pentru modele de marcare-recapurare pentru estimarea mărimii populaționale, a densității și a raportului dintre sexe pentru toate speciile. La specia lup FCC va realiza hărți și grafice de recapturare pentru fiecare haită identificată cu ajutorul analizelor de relații parentale livrate de prestator.

2.3. Desk phase - statistical analysis

Responsibilities:

- Data analyses, statistical modeling - contracting authority;

The deliverables at point 2 will be used by the FCC for mark-recapture models to estimate population size, density and sex ratio for all species. For wolf, FCC will produce maps and recapture plots for each pack identified using the bidder delivered parental relationship analyses.

Wildlife Monitoring	2022												2023												2024			
	July	August	September	October	November	December	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December	January	February	March	April						
D.5 Monitoring of species targeted by conservation actions																												
D.5.2 Changes in the abundance of large carnivores and red deer																												
Legend																												
field stage - FCC																												
laboratory stage - provider																												
desk stage - FCC																												

Figure 1 - Calendarul contractului de servicii pentru analize genetice ale probelor non-invasive de ADN. Contractul vizează doar etapa de laborator însă aceasta a fost încadratată între etapa de teren și cea de birou (statistică) pentru o mai bună înțelegere a calendarului.

Figure 2 - Schedule of contract services for genetic analysis of non-invasive DNA samples. The contract only covers the laboratory phase but this has been framed between the field and desk (statistical) phases for a better understanding of the timetable.

2.4 Literatură citată

Adams, J.R. & Waits, L.P. (2007). An efficient method for screening faecal DNA genotypes and

2.4. Literature cited

Adams, J.R. & Waits, L.P. (2007). An efficient method for screening faecal DNA genotypes and

detecting new individuals and hybrids in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area. *Conserv. Genet.* 8, 123–131. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-006-9154-5>

De Barba, M., Miquel, C., Lobreáaux, S., Quenette, P.Y., Swenson, J.E. & Taberlet, P. (2016). High-throughput microsatellite genotyping in ecology: improved accuracy, efficiency, standardization and success with low-quantity and degraded DNA. *Mol. Ecol. Resour.* 17, 492–507. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1755-0998.12594>

Iosif, R., Skrbinšek, T., Jelenčič, M., Boljte, B., Konec, M., Erich, M., Sulică, B., Moza, I., Ungureanu, L., Rohan, R., Bîrlou, D., Promberger, B. (2021). Report on monitoring brown bears using non-invasive DNA sampling in the Romanian Carpathians. <https://www.carpathia.org/wp-content/uploads/2021/10/FCC-Report-on-monitoring-brown-bear-using-non-invasive-DNA-sampling-in-the-Romanian-Carpathians.pdf>

Miller, C.R., Joyce, P. & Waits, L.P. (2002). Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160, 357–366. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11805071/>

Skrbinšek T., Jelenčič M., Waits L.P., Kos I., Trontelj P. (2010). Highly efficient multiplex PCR of noninvasive DNA does not require preamplification *Molecular Ecology Resources*, 10, 495–501. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2009.02780.x>

Skrbinšek, T., Jelenčič, M., Boljte, B., Konec, M., Erich, M., Iosif, R., Moza, I. & Promberger, B. (2019). Report on analysis of genetic samples collected in 2017 – 2018 on brown bears (*Ursus arctos*), Eurasian lynx (*Lynx lynx*) and grey wolf (*Canis lupus*) in a pilot area in Southern Carpathians, Romania. <https://www.carpathia.org/wp-content/uploads/2021/08/FCC-2017.2018.Final-Report-Bear.pdf>

detecting new individuals and hybrids in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area. *Conserv. Genet.* 8, 123–131. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-006-9154-5>

De Barba, M., Miquel, C., Lobreáaux, S., Quenette, P.Y., Swenson, J.E. & Taberlet, P. (2016). High-throughput microsatellite genotyping in ecology: improved accuracy, efficiency, standardization and success with low-quantity and degraded DNA. *Mol. Ecol. Resour.* 17, 492–507. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1755-0998.12594>

Iosif, R., Skrbinšek, T., Jelenčič, M., Boljte, B., Konec, M., Erich, M., Sulică, B., Moza, I., Ungureanu, L., Rohan, R., Bîrlou, D., Promberger, B. (2021). Report on monitoring brown bears using non-invasive DNA sampling in the Romanian Carpathians. <https://www.carpathia.org/wp-content/uploads/2021/10/FCC-Report-on-monitoring-brown-bear-using-non-invasive-DNA-sampling-in-the-Romanian-Carpathians.pdf>

Miller, C.R., Joyce, P. & Waits, L.P. (2002). Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160, 357–366. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11805071/>

Skrbinšek T., Jelenčič M., Waits L.P., Kos I., Trontelj P. (2010). Highly efficient multiplex PCR of noninvasive DNA does not require preamplification *Molecular Ecology Resources*, 10, 495–501. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2009.02780.x>

Skrbinšek, T., Jelenčič, M., Boljte, B., Konec, M., Erich, M., Iosif, R., Moza, I. & Promberger, B. (2019). Report on analysis of genetic samples collected in 2017 – 2018 on brown bears (*Ursus arctos*), Eurasian lynx (*Lynx lynx*) and grey wolf (*Canis lupus*) in a pilot area in Southern Carpathians, Romania. <https://www.carpathia.org/wp-content/uploads/2021/08/FCC-2017.2018.Final-Report-Bear.pdf>

Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P. & Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping from small DNA. *Nucleic Acids Res.* 24, 3189–3194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146079/>

Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L.P. & Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping from small DNA. *Nucleic Acids Res.* 24, 3189–3194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146079/>

3. FORMA DE ATRIBUIRE

Contractul pentru analize genetice ale probelor non-invasive de ADN pentru speciile urs, lup, râs și cerb va fi atribuit în urma analizei ofertelor multiple respectând raportul calitate-preț menționat în grila de evaluare prezentată în specificațiile tehnice aferente achiziției.

4. PREZENTAREA OFERTEI

Ofertanții trebuie să realizeze și trimită următoarele documente:

4.1 Propunerea tehnică va trata aspectele de la punctul 2 în viziunea conceptuală a ofertantului și va conține abordarea propusă pentru realizarea serviciilor printr-o descriere amănunțită a metodelor propuse, inclusiv un calendar detaliat al activităților de laborator. Pentru realizarea propunerii tehnice, ofertantul va folosi formularul de propunere tehnică nr. 6 din cadrul secțiunii Formulare. Este permisă asocierea a doi sau mai mulți ofertanți.

Oferta tehnică trebuie să conțină cel puțin următoarele informații conform descrierii de la pct. 2 din caietul de sarcini: protocoalele PCR pentru toate speciile, calendarul de lucru, descrierea măsurilor luate pentru a reduce erorile de laborator. De asemenea, conform descrierii de la pct. 4.3 din caietul de sarcini, oferta tehnică trebuie să prezinte capacitatea profesională și tehnică.

Anexat ofertei tehnice se atașează o prezentare a experților cheie implicați.

4.2 Propunerea financiară se va prezenta conform formularului de ofertă financiară nr. 4 regăsit în cadrul secțiunii Formulare. Oferta

3. CONTRACT ASSIGNMENT

Contract assignment for services for genetic analysis of non-invasive DNA samples for bear, wolf, lynx and red deer species will be awarded after analysing the multiple offers respecting the quality-price ratio mentioned in the evaluation grid presented in the technical specifications related to the procurement.

4. PRESENTATION OF THE OFFER

The offer shall contain the following documents:

4.1 The technical proposal will address the issues at chapter 2 in the bidder's conceptual vision and will contain the proposed approach for performing the services through a detailed description of the proposed methods, including a detailed schedule of laboratory activities. To write the technical proposal, the bidder will use the technical proposal form nr. 6 available in the Forms section. The association of two or more bidders is allowed.

The technical proposal will contain at least the following information, based on the description form chapter 2 in the terms of references: PCR protocols for all species, timetable for processing the samples, measures taken to reduce lab errors. Also, based on the details from chapter 4.3 from the terms of references, the technical proposal must show the professional and technical capacity.

A presentation of the key experts involved is attached to the technical proposal.

4.2 The financial proposal must be submitted according to the financial offer form no. 4 found in the Forms section. The financial offer shall be

financiară va fi exprimată în euro fără TVA, are caracter ferm și obligatoriu, din punctul de vedere al conținutului ofertei, pe toată perioada de valabilitate a ofertei, sub sancțiunea respingerii acesteia. Perioada de valabilitate a ofertei trebuie să fie valabilă minim 60 de zile.

Lipsa completării ofertei financiare atrage imposibilitatea evaluării ofertei. Nu se admit oferte alternative.

4.3 Ofertantul va trebui să demonstreze capacitatea sa prin:

4.3.1 experiența profesională:

- Cel puțin un expert coordonator în genetică moleculară care să îndeplinească obligatoriu următoarele cerințe:
 - Studii universitare (minim PhD);
 - Experiență 10 ani în studii / proiecte de genetică moleculară - dovada îndeplinirii se face cu CV.
 - Experiență în coordonare în minim două studii / proiecte de evaluare populațională cu ajutorul geneticii la carnivore mari și copitate (măcar la o specie din fiecare categorie) - dovada îndeplinirii se face cu CV în care se indică titlul proiectelor, finanțatorul și anul;
 - Succesul de genotipare obținut în studiile menționate / proiecte pe carnivore mari sau copitate și coordonate de expertul coordonator să nu fie mai mic de 50% - dovada îndeplinirii se face cu link către rapoarte tehnice / articole științifice rezultate în urma proiectelor.
 - Cel puțin o publicație ca autor principal în revistă științifică peer-reviewed disponibilă în Web of Science. Publicația trebuie să aibă ca obiectiv inclusiv estimarea mărimii populației pentru oricare din speciile urs, lup, râs sau cerb -

expressed in euros exclusive of VAT, and shall be firm and binding, in terms of the content of the offer, throughout the period of validity of the offer, under penalty of rejection. The period of validity of the tender must be at least 60 days.

Failure to complete the financial offer makes it impossible to evaluate the offer. Alternative offers are not allowed.

4.3 The bidder will have to demonstrate its capacity by:

4.3.1 professional experience:

- At least one coordinating expert in molecular genetics who must meet the following requirements:
 - University degree (minimum PhD);
 - Ten years' experience in molecular genetics studies/projects - proof of fulfilment with CV.
 - Experience in coordinating a minimum of two population assessment studies/projects using genetics in large carnivores and ungulates (at least one each) - proof of fulfilment with CV in which is specified the title of the projects, funding source and year;
 - The genotyping success achieved in the mentioned studies/projects on large carnivores and ungulates, and coordinated by the coordinating expert, must be not less than 50% - proof of achievement is provided by linking to the technical reports/scientific articles resulting from the projects.
 - At least one publication as lead author in a peer-reviewed scientific journal available on the Web of Science. The publication objective must include population size estimation for any of the bear, wolf, lynx or red deer species - proof of

- dovada îndeplinirii condiției se face cu CV cu link de accesare;
- Experiență în folosirea metodelor Next generation sequencing (NGS) cu markeri microsatelitari. Dovada îndeplinirii cu linkuri către rapoarte tehnice și articole științifice relevante.
- Cel puțin doi experți seniori în echipă cu experiență în:
 - Studii universitare (minim PhD);
 - Experiență cinci ani în proiecte de genetică moleculară - dovada îndeplinirii se face cu CV.
 - Experiență în prelucrarea probelor non-invazive de ADN pe carnivore mari sau copitate - cel puțin un proiect în CV;
 - Cel puțin o publicație ca și coautor în revistă științifică peer-reviewed disponibilă în Web of Science. Publicația trebuie să aibă ca obiectiv inclusiv estimarea mărimii populației pentru oricare din speciile urs, lup, râs sau cerb - dovada îndeplinirii condiției se face cu CV cu link de accesare;
 - Cel puțin doi tehnicieni laborator cu experiență în:
 - Studii universitare (minim MSc);
 - Experiență în prelucrarea probelor non-invazive de ADN - dovada îndeplinirii condiției se face cu CV;
 - Experiență minim un an într-un laborator de genetică - dovada îndeplinirii condiției se face cu CV.
- 4.3.2 Capacitate tehnica minimă:**
- Data matrix coding: ofertanții trebuie să poată implementa un sistem de trasabilitate
- fulfilment of the condition is by CV with link to the relevant publication(s);
- Experience in use of genotyping-by-sequencing with next generation (NGS) sequencing for microsatellite markers. Proof of achievement is provided by linking to the appropriate technical reports/scientific articles.
- At least two senior experts on the team with experience in:
 - University degree (minimum PhD);
 - Five years' experience in molecular genetics projects - proof of fulfilment with CV.
 - Experience in processing non-invasive DNA samples on large carnivores or ungulates - at least one project in CV;
 - At least one co-authored publication in a peer-reviewed scientific journal available on the Web of Science. The publication must have as its objective the population size estimation for any of the bear, wolf, lynx or red deer species - proof of fulfilment of the condition is by CV with link to the relevant publication(s);
 - At least two laboratory technicians with experience in:
 - University degree (minimum MSc);
 - Experience in processing non-invasive DNA samples - proof of fulfilment of the requirement is by CV;
 - At least one year's experience in a genetics laboratory - proof of fulfilment of the requirement is provided by CV.
- 4.3.2 Minimal technical capacity:**
- Data matrix barcoding: bidders must demonstrate they can implement a

- cu ajutorul unei imprimante de coduri de bare pe hârtie plastifiată și cititor de coduri;
- Roboți PCR: ofertanții trebuie să menționeze în lista de capacități tehnice că pot realiza extracția ADN cu ajutorul acestor roboți, tehnică importantă pentru eliminarea erorilor cât și pentru reducerea timpilor de extracție și respectarea termenelor de livrare;
 - Pipetare automatizată: ofertanții trebuie să prezinte în lista de capacități tehnice numărul și tipul de echipamente prin care se efectuează, precum și capacitatea de pipetare, că pot reduce erorile de pipetare prin utilizarea roboților întrucât aceste erori pot afecta toate etapele ulterioare de laborator. Folosirea roboților pentru procesarea microplăcilor cu secvențe ADN este crucială.
- traceability system using a barcode printer on synthetic labels and a barcode reader;
 - Liquid-handling automation: bidders must demonstrate that they can perform DNA extraction using these liquid-handling robots, an important technique for eliminating errors as well as reducing extraction times and meeting delivery deadlines;
 - Automated pipetting: bidders must show in a technical capacity list the number and type of equipments that they will use, as well as the pipetting capacity. Bidders must show they can reduce pipetting errors by using liquid-handling robots as these errors can affect all subsequent laboratory steps. The use of liquid-handling robots for processing DNA sequence microplates is crucial.

Ofertantul trebuie să demonstreze că poate utiliza aceste aparate în practica de laborator prin referirea la articole științifice și rapoarte tehnice în care este specificată folosirea acestor tipuri de aparate.

The bidder shall demonstrate the required technical capacity and the expertise in applying said technical capacity in practice by providing reference to usage of these technologies in technical reports or scientific articles.

În procesul de atribuire pe lângă factorul preț se va aplica factorul experiență în realizarea de studii similare privind recensămintele genetice, experiență ce se va dovedi cu o listă de publicații științifice disponibile în Web of Science, rapoarte tehnice și alte documente / publicații de natură și complexitate similară (sau de avengură mai mare) cu serviciile care fac obiectul contractului.

In the award process, in addition to the price factor, experience in conducting similar genetic census studies will be applied, as demonstrated by a list of scientific publications available on the Web of Science, technical reports and other documents/publications of a similar nature and complexity (or greater) to the services covered by the contract.

5. OBLIGAȚIILE PĂRȚILOR

5. OBLIGATIONS OF THE PARTIES

A. OBLIGAȚII GENERALE

A. GENERAL OBLIGATIONS

Achizitorul recomandă ca ofertanții să citească lista bibliografică de la punctul 2 pentru a înțelege cum să desfășoare activitățile.

The purchaser recommends that bidders read the bibliographic list at point 2 to understand how to carry out the activities.

Atât achizitorul cât și ofertanții vor răspunde la solicitările de clarificări pe toată perioada de derulare a achiziției serviciilor. Ofertantul câștigător va răspunde la solicitările de clarificări pe toată

Both the purchaser and the bidders will respond to requests for clarification throughout the period of the procurement of services. The successful tenderer will respond to requests for clarification throughout

LIFE18 NAT/RO/001082

perioada execuției serviciilor cuprinse în caietul de sarcini.

Ofertantul câștigător își asumă integral răspunderea pentru respectarea legislației privind sănătatea și securitatea muncii pentru personalul însărcinat cu realizarea serviciilor.

Ofertantul este obligat să indice în cadrul ofertei faptul că la elaborarea acesteia au ținut cont de obligațiile relevante din domeniile mediului, social și al relațiilor de muncă.

Documentația va fi întocmită astfel încât să poată fi folosită cu succes pentru prestarea serviciilor și realizarea obiectivelor proiectului LIFE NAT/RO/001082, nefiind necesare modificări semnificative pe durata prestării serviciilor.

B. FORMA DE PREZENTARE A DOCUMENTAȚIEI

Ofertanții vor comunica propunerea tehnică în format pdf, scanată și semnată fie olograf fie cu semnătură electronică la adresa r.iosif@carpathia.org.

Documentațiile tehnice se vor elabora în limba română sau engleză, pe suport de hârtie sau scanat, pe suport digital.

the performance of the services covered by the specifications.

The successful bidder assumes full responsibility for compliance with health and safety at work legislation for the staff responsible for carrying out the services.

The bidder is obliged to indicate in the offer that they have taken into account the relevant environmental, social and labour relations obligations when drawing up the tender.

The documentation will be prepared in such a way that it can be used successfully for the delivery of the services and the achievement of the objectives of the LIFE NAT/RO/001082 project, and no significant changes will be required during the delivery of the services.

B. FORM OF SUBMISSION OF DOCUMENTATION

Tenderers shall send the technical proposal in pdf format, scanned and signed either in holograph or with electronic signature to r.iosif@carpathia.org.

The technical documentation must be drawn up in Romanian or English on paper or one scanned copy on digital support.

6. TERMENE

Rezultate intermediare	Termen de realizare asteptat	*Termen de realizare (*a se completa de catre ofertant)
Un raport privind succesul de genotipare preliminar pentru specia urs	Februarie 2023	
Un raport privind succesul de genotipare preliminar pentru speciile lup și râs	Iulie 2023	
Un raport privind succesul de genotipare preliminar pentru specia cerb	Noiembrie 2023	

6. DEADLINES

Interim results	Expected Deadline	*Time of completion (*to be completed by the bidder)
A report on preliminary genotyping success for the bear species	February 2023	
A report on preliminary genotyping success for wolf and lynx species	July 2023	
A report on preliminary	November 2023	

LIFE18 NAT/RO/001082

genotyping success for the deer species		
---	--	--

Nr.	Livrabil final	Termen de realizare asteptat	*Termen de realizare (*a se completa de catre ofertant)
1	Un raport final care să cuprindă genotipurile de referință și istoricul cu recapturi ai tuturor urșilor detectați.	Mai 2023	
2	Raport final care sa includa genotipurile de referință la urs - capillary sequencing	May 2023	
3	Un raport final care să cuprindă genotipurile de referință și istoricul cu recapturi ai tuturor lupilor / râșilor detectați.	October 2023	
4	Un raport final care să cuprindă relațiile parentale între lupi și situația hibridizării.	October 2023	
5	Un raport final care să cuprindă genotipurile de referință și istoricul cu recapturi ai tuturor cerbilor detectați.	February 2024	

No.	Final deliverable	Expected Deadline	*Time of completion (*to be completed by the bidder)
1	A final report including reference genotypes and recapture history of all bears detected - next generation sequencing.	May 2023	
2	A final report including reference samples of all new bears - capillary sequencing	May 2023	
3	A final report including the reference genotypes and recapture history of all wolves/lynxes detected.	October 2023	
4	A final report covering parental relationships between wolves and the hybridisation situation.	October 2023	
5	A final report including reference genotypes and recapture history of all detected deer.	February 2024	

7. FINANȚAREA

Finanțarea *servicii pentru analize genetice ale probelor non-invasive de ADN pentru speciile urs, lup, râs și cerb* se asigură din bugetul proiectului LIFE NAT/RO/001082- Crearea unei zone de sălbăcie în sudul Munților Carpați, România.

Serviciile propuse a se achiziționa sunt prevazute în proiect la activitatea cu codul D.5.2, iar procedura de achiziție este înscrisă în Programul Anual al Achizițiilor Publice pentru 2022.

7. FINANCING

Funding for *services for genetic analysis of non-invasive DNA samples for bear, wolf, lynx and red deer* is provided from the budget of the LIFE project NAT/RO/001082 - Creation of a wilderness area in the Southern Carpathians, Romania

The services proposed to be procured are foreseen in the project under activity code D.5.2 and the procurement procedure is included in the Annual Public Procurement Programme for 2022.

Derularea contractului se face prin departamentele din cadrul Fundatiei Conservation Carpathia, cu atribuții privind implementarea proiectului și a contractului, iar prin serviciul financiar - contabilitate se realizează controlul documentelor financiare și decontarea serviciilor prestate.

The contract is carried out through the departments of the Foundation Conservation Carpathia, responsible for the implementation of the project and the contract, and the financial-accounting department is responsible for the control of financial documents and the settlement of services rendered.

8. RECEPȚIE ȘI MODALITĂȚI DE PLATĂ

Livrabilele vor fi predate achizitorului conform termenelor de predare a serviciilor menționate la pct.6. Plata finală va fi realizată după recepția finală a serviciilor confirmată printr-un proces verbal de recepție.

8. RECEPTION AND PAYMENT METHODS

The deliverables will be handed over to the purchaser according to the deadlines for the delivery of the services mentioned at point 6. Final payment will be made after the final acceptance of the services confirmed by an acceptance report.

Autoritatea contractantă va efectua plata după cum urmează:

The contracting authority will make payment as follows:

- Avans în cuantum de 25% din valoarea atribuită, în 7 zile de la semnarea contractului.
- Plata parțială în cuantum de 30% din valoarea contractului, în 7 zile de la recepția livrabilelor menționate în tabelul de livrabile finale la pct. 1 și 2;
- Plata parțială în cuantum de 15% din valoarea contractului, în 7 zile de recepția livrabilelor menționate în tabelul de livrabile finale la pct. 3 și 4;
- Plata finală în cuantum de 30% din valoarea contractului, în 7 zile de la recepția livrabilului menționat în tabelul de livrabile finale la pct. 5.

- Advance payment in the amount of 25% of the value awarded, within 7 days of signing the contract.
- Partial payment in the amount of 30% of the value of the contract, within 7 days of receipt of the deliverables mentioned in the final deliverables table in points 1 and 2;
- Partial payment in the amount of 15% of the contract value, within 7 days of receipt of the deliverables mentioned in the final deliverables table in points 3 and 4;
- Final payment in the amount of 30% of the value of the contract, within a maximum of 7 days after receipt of the deliverable mentioned in the table of final deliverables in point 5.

Autoritatea contractantă, în termen de maxim 15 zile de la predarea livrabilelor de către prestator, va întruni comisia de recepție și dacă este cazul va formula observații cu privire la documentația predată. Prestatorul va răspunde solicitărilor de remediere ale achizitorului în maxim 15 zile de la primirea obiecțiunilor.

The contracting authority shall, within a maximum of 15 days after the delivery of the deliverables by the contractor, convene the acceptance committee and, if necessary, comment on the documentation submitted. The service bidder shall respond to the purchaser's requests for remedies within a maximum of 15 days of receipt of the objections.

Autoritatea contractantă va avea la dispoziție încă 10 zile lucrătoare pentru a analiza livrabilul supus reviziei și pentru a accepta livrabilul final. Livrabilele vor fi considerate recepționate odată cu semnarea procesului verbal de recepție cantitativă și calitativă a serviciilor prestate.

Factura, reprezentând contravaloarea serviciilor prestate, va fi comunicată Fundației Conservation Carpathia, după semnarea procesului verbal de recepție fie parțial, fie final și va fi achitată de către autoritatea contractantă după ce fondurile au fost virate în contul autorității contractante, de către finanțatorul proiectului.

9. RISCURI

Riscurile cu cea mai mare probabilitate de apariție pe perioada derulării contractului pot fi:

- neîncadrarea în termenul stabilit pentru finalizarea serviciilor prin contractul care rezultă din această procedură mai ales datorită riscurilor aferente etapei de teren (probleme cu colectarea probelor, întârzieri în livrarea probelor către laborator), sau probleme tehnice în laboratorul prestatorului (defecțiuni ale aparaturii de laborator, probleme cu consumabilele de laborator)

Autoritatea contractantă împreună cu contractantul vor face toate demersurile necesare pentru gestionarea acestor riscuri, respectiv:

- Autoritatea contractantă va urmări în permanență stadiul serviciilor, încadrarea în termenele asumate în propunerea tehnică, astfel încât să fie respectată durata de finalizare a acestora;
- Autoritatea contractantă va comunica în timp real progresul etapei de teren de care depinde etapa de laborator. Eventualele întârzieri datorate riscurilor meteorologice (lipsa zăpezii la lup sau ploile abundente pe perioadă lungă la cerb) vor fi comunicate prestatorului. Prestatorul trebuie să aibă capacitatea de a recalibra efortul de

The Contracting Authority will have an additional 10 working days to review the deliverable subject to review and accept the final deliverable. The deliverables will be deemed to have been received once the quantitative and qualitative acceptance of services rendered has been signed.

The invoice, representing the value of the services rendered, will be submitted to the Foundation Conservation Carpathia after the signing of the acceptance report, either partial or final, and will be paid by the contracting authority after the funds have been transferred to the account of the contracting authority by the project funder.

9. RISKS

The risks most likely to occur during the course of the contract may be:

- failure to meet the deadline for completion of the services laid down in the contract resulting from this procedure due to inherent fieldwork risks (problems with field sampling and delay in delivery of samples to the laboratory), or technical issues in the laboratory (equipment failure, issues with laboratory reagents).

The contracting authority together with the contractor will take all necessary steps to manage these risks, namely:

- The contracting authority will continuously monitor the status of the services, the deadlines assumed in the technical proposal, in order to respect the timeframe for their completion;
- The Contracting Authority will communicate in real time the progress of the field phase on which the laboratory phase depends. Any delays due to meteorological risks (lack of snow for wolves or long periods of heavy rain for red deer) will be communicated to the bidder. The bidder must have the capacity to recalibrate the

procesare a probelor și de a se adapta noului calendar; In cazul in care autoritatea contractanta va livra cu intarziere probele, termenele limita vor fi corectate cu aprobarea ambelor parti.

- Prestatorul va informa imediat autoritatea contractanta despre orice problemă neprevăzută legată de procesul de laborator (defectiuni ale aparaturii, probleme cu consumabilele) și care ar putea intarzia livrarea rapoartelor la termen. O solutie va fi gasita cu acordul ambelor parti.
- Totodată, la întocmirea propunerii tehnice, ofertatul va ține cont de termene realiste de prestare a serviciilor, și va alocă resursa umană necesară pentru îndeplinirea întocmai a sarcinilor;

10. ATRIBUȚIILE ȘI RESPONSABILITĂȚILE PĂRȚILOR

10.1 Autoritatea contractantă este responsabilă pentru îndeplinirea următoarelor atribuții:

- punerea la dispoziția prestatorului a tuturor informațiilor disponibile pentru obținerea rezultatelor așteptate;
- pune la dispoziție probele prestatorului;
- punerea la dispoziție a unui spațiu pentru derularea întâlnirilor de lucru și a ședințelor de analiză a progresului în cadrul contractului;
- desemnarea și comunicarea către prestator a echipei/persoanei responsabile cu interacțiunea și suportul oferit prestatorului;
- organizarea recepțiilor parțiale și finale la terminarea tuturor prestațiilor executate în conformitate cu prevederile prezentului caiet de sarcini;
- achitarea contravalorii prestațiilor executate de către contractant, în baza facturilor emise de către acesta și a proceselor verbale de recepție cantitativă și calitativă.

10.2 Prestatorul este responsabil pentru îndeplinirea următoarelor atribuții:

sample processing effort and adapt to the new schedule. In case of late delivery of samples to the laboratory, all subsequent deadlines will be appropriately corrected, with agreement of both parties.

- The bidder will immediately inform the contracting authority of any unpredictable laboratory issues (equipment failure, problems with reagents) that could cause unrecoverable delay in analyses and missing of deadlines. An appropriate solution will be found in agreement of both parties.
- At the same time, when drawing up the technical proposal, the bidder shall take into account realistic deadlines for the provision of services and shall allocate the human resources necessary to carry out the tasks accurately;

10. DUTIES AND RESPONSIBILITIES OF THE PARTIES

10.1 The contracting authority is responsible for carrying out the following tasks:

- making available to the bidder all needed information to achieve the expected results;
- providing samples to the bidder;
- providing a space for working meetings and progress review meetings under the contract;
- designation and communication to the bidder of the team/person responsible for the interaction and support provided to the bidder;
- organisation of partial and final acceptance tests on completion of all work carried out in accordance with these specifications;
- payment of the value of the services provided by the contractor, on the basis of the invoices issued by the contractor and the quantitative and qualitative acceptance reports.

10.2 The bidder is responsible for performing the following tasks:

- realizarea activităților în cadrul contractului în conformitate cu cerințele legislației aplicabile pentru îndeplinirea obiectivului contractului;
 - realizarea planurilor de lucru pentru derularea activităților din cadrul contractului în conformitate cu specificațiile tehnice;
 - respectarea termenelor de elaborare/predare a serviciilor contractate;
 - transmiterea către autoritatea contractantă spre revizuire și aprobare a planurilor de lucru solicitate, de asemenea, orice modificare a acestora trebuie aprobată de către autoritatea contractantă;
 - prezentarea documentațiilor tehnice și a rapoartelor în formatul/formatele care să respecte cerințele stabilite prin reglementările stabilite de Autoritatea Contractantă;
 - colaborarea cu personalul Autorității Contractante alocat pentru serviciile desfășurate conform Contractului (monitorizarea progresului activităților în cadrul Contractului, coordonarea activităților în cadrul Contractului, feedback);
 - asistarea Autorității Contractante și punerea la dispoziția Autorității Contractante a documentelor suport necesare în relația cu instituțiile abilitate în materie de control și asigurarea calității serviciilor prestate;
 - punerea la dispoziția Autorității Contractante a tuturor informațiilor solicitate pentru a sprijini procesul de evaluare a performanței Prestatorului în legătura cu realizarea activităților din Contract;
 - oferirea de suport și gestionarea lecțiilor învățate în vederea îmbunătățirii activităților din contract.
- to carry out the activities under the contract in accordance with the requirements of the applicable legislation to fulfil the objective of the contract;
 - drawing up work plans for carrying out the activities under the contract in accordance with the specifications;
 - compliance with the deadlines for the development/delivery of technical specifications;
 - submission to the contracting authority for review and approval of the required work plans, also any changes to these must be approved by the contracting authority;
 - the submission of technical documentation and reports in the format(s) complying with the requirements laid down in the regulations established by the Contracting Authority;
 - working with the Contracting Authority staff assigned to the services under the Contract (monitoring progress of activities under the Contract, coordination of activities under the Contract, feedback);
 - assisting the Contracting Authority and providing the Contracting Authority with the necessary supporting documents in its relations with the institutions responsible for control and quality assurance of the services provided;
 - making available to the Contracting Authority all information required to support the process of evaluating the performance of the Contractor in relation to the implementation of the activities in the Contract;
 - providing support and managing lessons learned to improve the activities in the contract.

Modelul de contract de servicii este atașat la documentația anunțului.

Contract form example is attached to the call documents.

11. ATRIBUIREA CONTRACTULUI

11. CONTRACT AWARD

Contractul se va atribui ofertantului ce prezintă oferta cu cel mai bun raport calitate-preț (best value for money), ca urmare a aplicării factorilor de evaluare prevăzuți.

Având în vedere că serviciile intelectuale ce fac obiectul contractului presupun o complexitate ridicată, beneficiarul a optat pentru factori de evaluare care se referă la experiența a ofertantului.

Evaluarea ofertelor se va face astfel:

Nr.	Factor de evaluare	Punctaj
1	Propunerea financiara (cel mai mic pret)	50
2	Experienta (cea mai mare valoare)	50
	Total	100

Experiența se calculează prin adunarea nr. total de ani de experiență relevantă ai coordonatorului și nr. total de articole peer reviewed (care au ca obiectiv estimarea mărimii populației pentru oricare din speciile care fac obiectul contractului, vedeți punctul 4.3.1).

Algoritmul de calcul este următorul:

Pmax – este punctajul maxim care se acorda fiecărui criteriu (Pmax1 = 50 puncte pentru oferta cu cel mai mic pret, Pmax2 = 50 puncte pentru oferta cu cea mai mare valoare);

Punctajul aferent ofertei „n” (Pofn) se calculează cu formula:

$$Pofn = (\text{Factorul 1 al ofertei "n"} / \text{Factorul 1 al ofertei minime}) \times Pmax1 + (\text{Factorul 2 al ofertei "n"} / \text{Factorul 2 al ofertei cu valoarea cea mai mare experiență}) \times Pmax2$$
, exprimat in puncte.

Nota: Ofertele care depășesc valoarea estimată vor fi respinse.

Orice erori matematice vor fi corectate conform legislației în vigoare.

The contract will be awarded to the bidder offering best ratio between quality and price (best value for money), taking into account the weighting of the evaluation factors.

Given that the intellectual services covered by the contract involve a high, the contracting authority has opted for evaluation factors referring to the experience of the bidder.

Thus, offers evaluation will follow the procedure below:

No.	Evaluation factor	Score
1	Financial proposal (lowest price)	50
2	Experience (highest value)	50
	Total	100

The experience is calculated by summing the total number of years of relevant experience of the coordinating expert and the number of peer reviewed papers (having as objective population estimate for any of the species that this tender refers to; see chapter 4.3.1).

The calculation algorithm is as follows:

Pmax - is the maximum score to be given to each criterion (Pmax1 = 50 points for the lowest priced offer, Pmax2 = 50 points for the most experienced offer);

The score for offer "n" (Pofn) is calculated with the formula:

$$Pofn = (\text{Factor 1 of offer "n"} / \text{Factor 1 of minimum offer}) \times Pmax1 + (\text{Factor 2 of offer "n"} / \text{Factor 2 of offer with highest experience}) \times Pmax2$$
, expressed in points.

Note: Offers exceeding the estimated value will be rejected.

Any mathematical errors will be corrected in accordance with the legislation in force.

LIFE18 NAT/RO/001082

Evaluarea ofertelor:


Punctajul final al ofertei va fi stabilit prin calcularea sumei punctajelor aferente fiecărui factor de evaluare, calculate conform algoritmului de calcul prezentat anterior. Oferta cu punctajul final cel mai mare va fi considerată oferta câștigătoare.

Evaluation of offers:

The final score of the offer will be determined by calculating the sum of the scores for each evaluation factor, calculated according to the calculation algorithm presented above. The tender with the highest final score will be considered the winning tender.

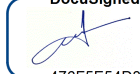
PROJECT COORDINATOR,

Ruben Iosif

DocuSigned by:

77CAE6B4AA6E4BB...

PROJECT MANAGER

Daniel Bucur

DocuSigned by:

476F5E54D3E74A4...

LEGAL DEPARTMENT,

Ioana Săvulescu

DocuSigned by:
Ioana Săvulescu
5B0B11FDB52E4ED...

Approved,

EXECUTIVE DIRECTOR

Barbara Promberger

DocuSigned by:
Barbara Promberger
3C21436385864BF...