



**PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS QUE HAN DE
REGIR EN EL CONTRATO DE**

**ANÁLISIS DE AGUA BRUTA PARA EVALUACIÓN
CUANTITATIVA QMRA EN ETAP**

**PROCEDIMIENTO ABIERTO CON PLURALIDAD DE
CRITERIOS**

**SUJETO A RECURSO ESPECIAL EN MATERIA DE
CONTRATACIÓN**

CONTRATO Nº 177/2019

INDICE

1.	ANTECEDENTES	3
2.	OBJETO	4
3.	ANÁLISIS A DESARROLLAR.....	4
3.1	Microorganismos patógenos seleccionados:.....	4
3.2.	Tipos de análisis a desarrollar.	4
3.3.	Número de muestras a desarrollar.	5
3.4.	Localización agua bruta a analizar	5
4.	MEMORIA CIENTÍFICA	5
4.1.	Planificación de la toma de muestra y análisis.	5
4.2.	Métodos relacionados con la toma y preparación de la muestra	5
4.3.	Métodos relacionados con la detección.	6
4.4.	Resultados.	6
5.	PUBLICACIONES.....	6
6.	MEDIOS TÉCNICOS Y HUMANOS	7
6.1	Director de los trabajos.....	7
6.2	Personal del contratista	7
6.3.	Normas de Seguridad y Salud.	8
7.	FACTURACIÓN Y ABONO	10
	ANEXO I. PRINCIPALES MÉTODOS ANALÍTICOS RECOGIDOS EN LA BIBLIOGRAFÍA.	11
1.1	Protozoos.	11
1.1.1	Presencia	11
1.1.2	Viabilidad	11
1.1.3	Infectividad	12
1.2	Campylobacter jejuni	13
1.2.1	Presencia- métodos moleculares	13
1.2.2	Viabilidad- (especialmente viables no cultivable).....	13
1.2.3	Infectividad	14
1.3	Enterovirus	14
1.3.1	Moleculares.....	14
1.3.2	Cultivo celular	15
1.3.3	Infectividad.....	15
1.3.4	Eficacia de recuperación de enterovirus.....	15
	ANEXO II. REFERENCIAS.....	16

1. ANTECEDENTES

Uno de los principales requisitos relacionados con la calidad del agua es garantizar su inocuidad desde el punto de vista microbiológico.

La calidad microbiológica del agua tratada puede evaluarse mediante una evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico. Para ello es necesario determinar el riesgo de infección por unos determinados patógenos y comprobar que está por debajo de unos umbrales marcados por las autoridades sanitarias.

Actualmente la inocuidad del agua se mide con el análisis de algunas bacterias que se utilizan como parámetros microbiológicos indicadores de contaminación biológica, debido a la dificultad técnica de llevar a cabo análisis de otros microorganismos como otras bacterias, virus y protozoos.

Se pretende, por primera vez en Canal, realizar una investigación para llevar a cabo la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico (QMRA) en ETAP de Canal de Isabel II.

El análisis de organismos patógenos permite evaluar el riesgo, mientras que el análisis de microorganismos indicadores permite evaluar la capacidad del sistema para reducir el riesgo a mínimos aceptables.

Para ello es preciso definir los patógenos representantes de virus, bacterias y protozoos. Una vez definidos los patógenos, es preciso el análisis, en el agua bruta de entrada, de estos microorganismos para evaluar la exposición.

Para el análisis exhaustivo de estos microorganismos patógenos en el agua bruta, y su evolución a lo largo del tratamiento, es preciso determinar tanto su **presencia**, como su **viabilidad y su infectividad**. También debe estimarse cómo afecta la capacidad de ciertas bacterias de permanecer en un estado latente (VNC-viable no cultivable, indetectable en las técnicas de cultivo) al riesgo microbiológico.

Este proceso es muy novedoso en España, ya que otros trabajos no han analizado todos los aspectos que influyen en la infectividad de los microorganismos:

- Infectividad real frente a la presencia determinada por la existencia de material genético de un determinado microorganismo.
- Estado viable no cultivable en bacterias.

Con los resultados obtenidos y aplicando los cálculos matemáticos estocásticos por parte de Canal, se determinará la eficacia de los métodos de tratamiento del agua potable aplicados para la eliminación de dichos microorganismos.

El resultado del análisis ayudará a la toma de decisiones necesarias en implantación de nuevas tecnologías de tratamiento que permitan disminuir el riesgo identificado, en el marco de la Línea Estratégica Nº 2- Garantizar la calidad del agua de consumo, y en particular del Plan Estratégico P.E.2.2. Plan para la potenciación del uso de nuevas tecnologías de tratamiento.

2. OBJETO

El Objeto del presente contrato es desarrollar los análisis de los patógenos del agua bruta de entrada en las ETAP de Canal, tanto de presencia, como de su viabilidad e infectividad.

3. ANÁLISIS A DESARROLLAR

Será de obligado cumplimiento cuanto se dispone en este Pliego de Prescripciones Técnicas Particulares.

3.1 Microorganismos patógenos seleccionados:

Atendiendo a la bibliografía, y cumpliendo con las condiciones de que sean medibles, relevantes y conservadores, los patógenos de referencia que deben ser analizados son:

- Protozoos: - *Cryptosporidium parvum*,
- *Giardia*
- Bacteria: *Campylobacter jejuni*
- Virus: Enterovirus

3.2. Tipos de análisis a desarrollar.

Dentro del objeto del presente contrato, para cada microorganismo es preciso determinar:

- Presencia: La detección de ADN específico del patógeno (por PCR).
- Viabilidad: Los microorganismos viables vivos, capaces de alimentarse, intactos, metabólicamente funcionales.
- Infectividad: microorganismos viables capaces de reproducirse (en los protozoos: liberan esporozoítos o salen de su forma resistente) e infectar a un ser humano.

Los métodos deben ser capaces de discriminar los microorganismos presentes de los viables y de los infectivos, ofreciéndose los tres resultados. La oferta técnica deberá definir los métodos de toma de muestras, concentración, elución y análisis propiamente dicho. Se ofrecen en el Anexo I los métodos de referencia que se han escogido a partir de la literatura. No obstante, si la evolución del conocimiento permite que los licitadores oferten métodos diferentes, estos deberán estar contrastados por la comunidad científica. La oferta técnica podrá ofrecer métodos diferentes, perfectamente justificados, siempre que hayan sido publicados en revistas con un índice de impacto (JCR)>2,00 y que hayan sido citados en más de 30 referencias. Los métodos que se presenten en la oferta estarán guiados para realizar una estimación de riesgo microbiológico, preferentemente bajo el modelo QMRAspot (Schijven, 2011), justificando los valores de recuperación e infectividad, a partir de los análisis.

En el Anexo I se adjunta un listado de los métodos habituales recogidos en la bibliografía.

3.3. Número de muestras a desarrollar.

El número de patógenos a analizar por cada ETAP, atendiendo al modelo QMRAspot asciende a:

- Cryptosporidium: 122 ensayos.
- Giardía: 33 ensayos.
- Campylobacter jejuni: 98 muestras
- Enterovirus: 35 ensayos.

3.4. Localización agua bruta a analizar

Las instalaciones de referencia de este contrato son las siguientes:

Estación de Tratamiento de Colmenar: En el km 28,5 de la carretera de Madrid a Colmenar Viejo.

Estación de Tratamiento de Santillana: En el Km. 2,1 de la carretera M609 de Colmenar Viejo a Miraflores, desvío Instalaciones Canal de Isabel II (Término municipal de Manzanares el Real).

Estación de Tratamiento de Valmayor: En las inmediaciones de Colmenarejo, con vía de penetración de 2 km., partiendo del km. 13 de la carretera local M-510 de Galapagar a Valdemorillo (origen de la carretera nacional de Madrid a El Escorial).

Estación de Tratamiento de Majadahonda: En las inmediaciones del pueblo de Majadahonda, carretera desde este punto a Boadilla del Monte, Km. 0,8, polígono El Carralero.

Agua bruta de embalse de Pedrezuela: Presa de Pedrezuela.

4. MEMORIA CIENTÍFICA

El licitador debe proporcionar una memoria científica en su oferta, que incorpore, al menos:

4.1. Planificación de la toma de muestra y análisis.

Planificación de los momentos en los que se llevará a cabo la toma de muestras y los análisis.

4.2. Métodos relacionados con la toma y preparación de la muestra

- Esterilización de los medios de toma de muestra
- Filtración, con control de volumen filtrado y de presión acoplados.
- Concentración, elución.

4.3. Métodos relacionados con la detección.

El licitador debe definir los métodos de detección, presencia, viabilidad e infectividad, especialmente los métodos que se van a emplear, el alcance de éstos y las referencias científicas que soportan dichos métodos. Dichas referencias se deberán incorporar íntegramente a la memoria y podrán ser coincidentes con las propuestas del Anexo I de este PPT. En cualquier caso, de cada método se indicarán:

- Equipos e instalaciones necesarios.
- Material, reactivos, cultivos a emplear tanto para técnicas de biología molecular como cultivos, cultivos celulares y bioensayos, así como cualquier otra técnica propuesta.
- Animales de referencia en el caso de los bioensayos.
- Material y métodos de referencia para garantizar
 - Sensibilidad,
 - Especificidad
 - Detección de bacterias VNC.
 - Inhibición (por ejemplo, para PCR por sustancias húmicas),
 - los controles de proceso para calcular la recuperación, especialmente en virus:
 - Control WPC desde la etapa de concentración.
 - Control MPC o molecular desde la etapa de extracción de ácidos nucleicos.
 - Control (RT-)qPCR sobre el proceso de replicación y cuantificación qPCR.

Será necesario justificar, mediante referencias publicadas y contrastadas, que los métodos propuestos detectan los microorganismos infectivos, cuando no se empleen bioensayos.

También será necesario presentar autorización para la realización de los bioensayos, conforme se establece en Anexo I del PCAP.

4.4. Resultados.

El licitador debe definir cómo serán sus informes de ensayo. Siempre debe tenerse en cuenta que el fin último de la investigación es realizar una evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico, con lo que la expresión de resultados cobra especial importancia.

5. PUBLICACIONES.

Los resultados de estos análisis son estrictamente confidenciales.

Cualquier publicación requiere aprobación expresa por parte del director del proyecto de Canal.

Si Canal de Isabel II, S.A. considera conveniente y adecuada la publicación de la investigación realizada, el licitador deberá elaborar un informe final de resultados adaptado a los requisitos de una publicación con un índice de impacto JCR superior a 200. Como requisito de validación de la investigación realizada, este informe debe ser aceptado. Dicho informe debe contar con una aprobación expresa por parte de Canal de Isabel II previo a su publicación.

6. MEDIOS TÉCNICOS Y HUMANOS

6.1 Director de los trabajos

El Director de los Trabajos, como representante de Canal de Isabel II, S.A. será el responsable de la coordinación y ejecución del contrato y resolverá, en general, sobre todos los problemas que se planteen durante la ejecución de los trabajos del presente Proyecto conforme a sus atribuciones.

El contratista está obligado a prestar su colaboración al Director de los Trabajos para el normal cumplimiento de las funciones encomendadas a éste.

6.2 Personal del contratista

El Contratista adjudicatario de los trabajos nombrará un representante responsable de los mismos (Responsable del Contratista). Esta persona contará con perfil adecuado y acreditación de técnico competente que posea titulaciones académicas y profesionales habilitantes, así como, conocimientos en actividades de laboratorios de análisis y de prevención de riesgos laborales acordes con las funciones a desempeñar. Los requisitos mínimos quedan recogidos en el punto 5.1. A) del PCAP.

El adjudicatario velará porque el equipo designado para la ejecución de los trabajos tenga la suficiente estabilidad que no ponga en riesgo la consecución de los mismos en calidad y tiempos.

El adjudicatario dedicará a la realización del proyecto una plantilla de acreditada solvencia técnica, para que la labor comprometida pueda ser realizada de modo satisfactorio y en el plazo establecido. En sus ofertas, los licitadores presentarán una relación de personal que se asignará al trabajo encomendado, con indicación de su titulación, experiencia (currículum vitae) y dedicación al proyecto.

El adjudicatario se comprometerá a aportar los recursos humanos recogidos en su oferta. En el caso de que alguna de las personas propuestas no pudiera continuar en el proyecto, el adjudicatario propondrá a Canal de Isabel II recursos alternativos con categoría profesional y experiencia igual o superior a los propuestos inicialmente, propuesta que deberá ser aceptada por la dirección del proyecto por parte de Canal de Isabel II.

El responsable nombrado por el Contratista será el interlocutor del Director de los Trabajos, con obligación de recibir todas las comunicaciones verbales y/o escritas que del Director, directamente o a través de otras personas, debiendo cerciorarse, en este caso, de que están autorizadas para ello y/o verificar el mensaje y confirmarlo, según su procedencia, urgencia e importancia. Todo ello, sin perjuicio de que el Director pueda comunicar directamente con el resto del personal subalterno, que deberá informar seguidamente al Delegado del Contratista. Los trabajos realizados por el contratista, sin la autorización previa y expresa de la Dirección, de acuerdo con la forma descrita, no serán de recibo y, por tanto, no procederá su abono.

Para un correcto seguimiento de la ejecución del proyecto, resolución de posibles incidencias y aseguramiento del cumplimiento de objetivos y plazos, se programarán reuniones, con periodicidad, al menos trimestral, y con asistencia de los miembros del proyecto de Canal de Isabel II, con la asistencia obligatoria del responsable del proyecto de la empresa adjudicataria y el personal que se requiera.

6.3. Normas de Seguridad y Salud.

Todos los trabajos previstos deben ejecutarse observando las medidas de seguridad establecidas en los diferentes Reglamentos de aplicación, y el Contratista propondrá, con tal fin, las medidas pertinentes.

El Contratista establecerá el personal de vigilancia competente y en la cantidad necesaria, para que impida toda posible negligencia e imprudencia que pueda dar lugar a cualquier accidente, siendo responsable el Contratista de los que, por incumplimiento de esta previsión, pudieran producirse.

El Contratista adoptará las medidas necesarias para evitar la contaminación del entorno por efecto de cualquier material que pueda ser perjudicial o producir deterioro. Asimismo, se tendrán en cuenta las siguientes prescripciones y medidas consideradas al analizar la incidencia ambiental del proyecto.

Los residuos generados durante la fase de ejecución se llevarán a los lugares destinados a su almacenamiento, reutilización o eliminación según su naturaleza y de acuerdo con las normas de gestión de los mismos.

El contratista debe informar a sus trabajadores de las Evaluaciones de Riesgo de las instalaciones de Canal que le hayan sido aportadas en las reuniones de Coordinación de Actividades Empresariales.

Para el desarrollo de las tareas que transcurran dentro de instalaciones del Canal, como la toma de muestras, deben ser llevadas a cabo respetando todas las normas de Seguridad y Salud de Canal de Isabel II. Se debe atender en todo momento a las indicaciones del personal responsable de las mismas.

En términos generales el contratista deberá cumplir con todas las obligaciones previstas en la Ley 31/1995, de 8 de Noviembre, de Prevención de Riesgos Laborales, el Real Decreto 39/1997, de 17 de Enero, por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención, el Real Decreto 171/2004, de 30 de Enero, por el que se desarrolla el Art. 24 de la Ley 31/95, en materia de coordinación de actividades empresariales y cuantas otras normas, legales o convencionales, contengan prescripciones relativas a la adopción de medidas preventivas en el ámbito laboral o susceptibles de producirlas en dicho ámbito así como en el Real Decreto 337/2010, de 19 de marzo, por el que se modifican el Real Decreto 39/1997, de 17 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de los Servicios de Prevención y su legislación complementaria y de desarrollo.

En consecuencia, será obligación del contratista:

- Garantizar la seguridad y salud de los trabajadores.
- Realizar la prevención de los riesgos laborales mediante la adopción de cuantas medidas sea necesarias.
- Evaluar los riesgos laborales.
- Planificar la acción preventiva a partir de los resultados de la evaluación de los riesgos.
- Asegurarse de que los medios de trabajo garanticen la seguridad de los trabajadores.
- Proporcionar a los trabajadores los medios de protección personal adecuados al trabajo a realizar.
- Informar adecuadamente a los trabajadores acerca de los riesgos existentes, las medidas y actividades de protección aplicables y las medidas de emergencia adoptadas.

- Consultar a los trabajadores y permitir su participación en todas las cuestiones que afecten a la seguridad y la salud laborales.
- Garantizar que cada trabajador reciba una formación adecuada en materia preventiva.
- Informar y adoptar medidas, cuando los trabajadores pueden estar expuestos a un riesgo grave e inminente.
- Garantizar la vigilancia médica periódica de la salud de los trabajadores.

Requisitos particulares para la ejecución de los trabajos.

- Conforme a lo previsto en la Ley de Prevención de Riesgos Laborales y Reglamentos de desarrollo, y con la finalidad de garantizar que los servicios contratados por la empresa contratista se ejecutan conforme a las medidas de seguridad establecidas por la normativa vigente y Canal de Isabel II, S.A., la empresa adjudicataria habrá de presentar ante Canal de Isabel II, S.A. o a la empresa que ésta designe, la documentación acreditativa de los siguientes extremos:
- Relación nominal e identificación de los trabajadores que ejecutarán los trabajos objeto del Contrato. Incluso capacitación médica para el desempeño del trabajo.
- Sistema de gestión de prevención.
- Certificados de formación en materia de prevención de riesgos laborales de los trabajadores que realicen los trabajos objeto del presente Contrato.
- Identificación y nombramiento del trabajador o trabajadores designados como recurso preventivo.
- Evaluación de los riesgos generales y específicos de los puestos de trabajo, incluyendo la planificación de la actividad preventiva.
- Plan de formación en materia de prevención de riesgos laborales, que incluirá tanto la relativa a la actividad objeto del Contrato como la relacionada con el plan de emergencia y contra incendios.

La documentación relacionada en la presente cláusula habrá de ser presentada por la empresa adjudicataria con carácter previo al inicio de los trabajos objeto del presente Contrato.

Cuando Canal de Isabel II, S.A. lo considere oportuno, podrá solicitar información adicional o realizar comprobaciones y auditorías para verificar la validez de la información entregada y asumiendo el contratista la obligación de tener a disposición del Canal de Isabel II, S.A. la documentación requerida para su exhibición cuando fuera requerida con tal fin.

7. FACTURACIÓN Y ABONO

El proyecto debe ejecutarse en un periodo máximo de **36 meses** desde la fecha de formalización del contrato.

Se podrán realizar facturaciones parciales. La facturación se realizará cuando estén redactados, entregados y revisados los informes parciales que recojan los resultados de los diferentes lotes de muestras, así como el informe final en caso de que Canal lo considerase preciso.

El abono de los trabajos tendrá como importe, el calculado en base a los precios ofertados por las actuaciones o tareas **efectivamente** realizadas.

Madrid, a 17 de junio de 2019

FIRMA MANUSCRITA OCULTA POR PROTECCIÓN DE DATOS

Firma: Lydia Sáez García
Responsable de Investigación

FIRMA MANUSCRITA OCULTA POR PROTECCIÓN DE DATOS

Firma: Jaime Flores Cabeza
Responsable de Investigación e Innovación
Subdirección I+D+i

FIRMA MANUSCRITA OCULTA POR PROTECCIÓN DE DATOS

Firma: Juan Sánchez García
Director de Innovación e Ingeniería

ANEXO I. PRINCIPALES MÉTODOS ANALÍTICOS RECOGIDOS EN LA BIBLIOGRAFÍA.

Los métodos de los análisis mediante qPCR identifican la presencia de material genético, pero no puede identificar si el microorganismo es infectivo (capaz de generar una enfermedad).

Por tanto, es necesario aplicar técnicas para discriminar los microorganismos viables y para ello se han desarrollado diversas técnicas moleculares (2010-Gironés), complementarias de las técnicas de cultivo en paralelo:

- Tinciones EMA o PMA que evitan que se contabilicen los microorganismos con membranas dañadas.
- Análisis del ARNm (ARN mensajero) que se degrada rápidamente después de la muerte de la célula.
- ARNse, proteinasa K.

Por último, las bacterias que están en estado viables no cultivables (VNC, o bien VBNC por sus siglas en inglés), pueden dar lugar a falsos negativos si se emplean métodos de detección de cultivo. Por este motivo, es necesario emplear técnicas complementarias a las técnicas de cultivo tradicionales, que no podrán detectar a las bacterias VNC, que pueden recuperar la infectividad. Se ha observado que existen más de 67 especies de bacterias patógenas capaces de entrar en estado VNC, para recuperar después su virulencia, entre ellas, *Campylobacter jejuni*.

1.1 Protozoos.

1.1.1 Presencia

La cuantificación de *Cryptosporidium parvum*, escogido como representante de los protozoos esporulados, requiere concentración previa mediante filtración in situ por filtros específicos. El procedimiento normalizado conforme a EPA1623 y/o ISO/DIS 15553 no discrimina los microorganismos viables ni los infectivos. Necesita:

- Equipo de filtración, con control de volumen filtrado y de presión acoplados.
- Agitador (800 oscilaciones/min).
- Centrífuga >1100 g para concentración.
- Gradillas imantadas Dynal MPC-L y Dynal MPC-S unidas a anticuerpos específicos.
- microscopio con epifluorescencia FITC, filtro UV (λ_{exc} / $\lambda_{emisión}$ 480/520 nm), 200x, 400x y 600x.

La elución del filtro con lauril detergente y la posterior captura de los quistes y ooquistes, desde un volumen de 10 mL, se realiza mediante abalorios (dynales) específicos que se unen a ambos y los recogen al quedar pegados a un imán.

La detección se realiza por inmunofluorescencia, al añadir anticuerpos específicos conjugados con fluorocromo, habitualmente FITC. Tras la unión se lava para quitar restos no unidos y se visualizará al microscopio con fluorescencia, realizando la identificación por fluorescencia y por tamaño y morfología.

No obstante, este método de detección no discrimina entre microorganismos infectivos, viables o no viables.

1.1.2 Viabilidad

Existen varias familias de métodos de ensayo (Rousseau-2018) para comprobar la viabilidad:

- Métodos moleculares:
 - ARN: basados en que el ARN está ligado a la secuencia de proteínas, de donde se infiere viabilidad de las células. No obstante, el ARN es relativamente estable por lo que no es la estabilizada
 - RT-PCR: basados en que las células viables producen ARN mensajero (mARN)
 - *Cryptosporidium parvum* transformación del ARN que codifica la proteína hsp70 (IRES_Hsp70). Correlacionable con ensayos de cultivos celulares sometidos a oxidantes.
 - *Giardia duodenalis* transformación del gen β -giardina. Detecta viable pero no infectivos.
 - Hibridación por fluorescencia in situ (FISH): buscar la secuencia de 18S rARN (ARN ribosómico) con una sonda fluorescente, método rápido, económico.
 - El rARN puede persistir hasta 6 días después de la muerte del microorganismo. Sólo para *Cryptosporidium spp.*
 - ADN
 - PMA PCR: combinación de tinción PMA con PCR. Esta técnica puede sobreestimar la exposición a protozoos infectivos.
 - *Cryptosporidium parvum* gen ADN que expresa la proteína hsp70.
 - *Giardia duodenalis* transformación del gen β -giardina.

Estos ensayos, en general, no estiman correctamente el riesgo sanitario ni la eficacia de los tratamientos de inactivación.

1.1.3 Infectividad

Para *Cryptosporidium spp.* La literatura refiere un bioensayo inoculando en ratones neonatos inmunodeprimidos BALB/c y NMRI lactantes, en los que se cuantifiquen los ooquistes en el intestino o en las heces. Será necesario que exista un comité de ética de experimentación animal para evaluar los bioensayos con animales.

Respecto a *Giardia duodenalis* para el bioensayo se ha descrito la inoculación preferentemente en jerbos de Mongolia, aunque también pueden emplearse ratones neonatos inmunodeprimidos BALB/c y NMRI lactantes, en los que se cuantifiquen los ooquistes en el intestino o en las heces. Será necesario que exista un comité de ética de experimentación animal para evaluar los bioensayos con animales. En el caso de *Giardia*, dado que no es un parásito intracelular y que puede cultivarse, no tiene mucho sentido el cultivo celular.

Si se confirmara que, para detectar la infectividad en *Cryptosporidium*, alguna técnica de infección de cultivo celular tiene igual o superior fiabilidad que las técnicas de bioensayo, siempre que esté suficientemente avalada por criterios científicos, se operaría con cultivos estables, preferiblemente:

- HCT-8 enterocitos humanos por su facilidad de mantenimiento y sensibilidad a la infección con pequeñas dosis de ooquistes.
- FHs 74 Int con alta susceptibilidad a la infección.
- COLO-680N fácil de manejar permitiendo una alta producción de patógenos.

La inestabilidad de las líneas celulares cancerígenas, aneuploides, puede implicar diferencias significativas entre generaciones de una misma línea celular. Por ello, la literatura consultada aconseja el empleo de cultivos celulares estables, depositados en alguna colección de cultivos tipo (ATCC, CECT) y validados para este uso. Posteriormente, se detectaría mediante marcaje por fluorescencia y recuento de focos parásitos en monocapa celular.

1.2 *Campylobacter jejuni*

La especie *Campylobacter jejuni* es la escogida como bacteria por su patogenicidad en humanos (90-95% de campylobacteriosis descritas en humanos).

Cobra especial importancia conocer la viabilidad e infectividad de los microorganismos, para evitar el problema de los microorganismos viables no cultivables (VNC). *Campylobacter j.* es susceptible de presentarse en este estado de supervivencia VNC, cuyo principal problema es que no se detecta en los cultivos microbiológicos, pero puede manifestar toda su patogenicidad cuando encuentre las condiciones adecuadas de resucitación. Por ello, los métodos para controlar este estado

- Presencia y conteo MPN-qPCR
- Viabilidad (especial atención a VNC):
 - tinciones específicas discriminantes
 - qRT-PCR sobre el ARNm, que desaparece con la muerte celular
- Infectividad: Bioensayo sobre ratones

1.2.1 Presencia- métodos moleculares

En cuanto a la concentración de los microorganismos patógenos de la especie *Campylobacter jejuni* (subespecie jejuni), se concentrará **la muestra previamente, se filtrará en filtro de nitrato de celulosa de 0,22 µm, colocando el filtro en un medio** de aislamiento selectivo y se realizará cultivo siguiendo la norma ISO17995:2005, incubándose en condiciones microaerófilas (5% O₂, 10% CO₂, y un 85% N₂) a 42°C grados durante 24-48 horas.

Para la confirmación se realizará un test rápido de aglutinación por látex para *Campylobacter* termófilos y como doble prueba confirmativa se realizarán pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, hidrólisis de hipurato, de indoxil acetato, crecimiento a 37°C, a 42°C 1% de glicina sensible a ácido nalidíxico negativo ureasa, crecimiento a 25°C y sensibilidad cefalotina) y enzimáticas.

Existen métodos alternativos para detectar la presencia de *Campylobacter jejuni* (Banting-2016; Maridor-2011), independientemente de su viabilidad e infectividad:

- La identificación se podrá realizar por PCR, prestando especial cuidado respecto a la especificidad y sensibilidad, especialmente respecto a *Arcobacter*.
 - MPN-qPCR conforme a Banting 2016 y vanDyke con identificación de especie mediante identificación genómica 16S e identificación de especie por MLST o codificación secuencia genómica del gen flaA.
- Sensibilidad: Debe detectar al género *Campylobacter spp.*
- Especificidad: Deben excluir al género *Arcobacter spp.*

1.2.2 Viabilidad- (especialmente viables no cultivable)

Existen métodos alternativos para detectar a los microorganismos VNC (Fakruddin-2013; Zhao-2017):

Tinciones

- Microscopía campo brillante añadiendo inhibidores de la división, observando diferencias fisiológicas, o con biosensores
 - Microscopía de fluorescencia:
 - tinción con DAPI, CTC, FITC, INT, para detectar diferencias en el estado de la membrana o de la respiración
 - Método LIVE/DEAD® de BacLight, por diferencia entre vivas, VNC y muertas.
- Citometría de flujo, detectando características concretas de VNC.
- Moleculares

- ARNm RT-PCR debido a que el ARNm apenas persiste pocos minutos después de la muerte celular.
- PMA-qPCR Unión de PMA sobre ADN, detectando la ausencia de PMA
- ARNr FISH

1.2.3 Infectividad

Para comprobar la infectividad se plantea un bioensayo. Se tiene referencia (Giallorou-2018) para *Campylobacter jejuni* de un bioensayo inoculando en ratones neonatos (22 días) inmunodeprimidos C57BL/6, con dieta dZD baja en zinc, con antibióticos a los 14 días gentamicina, vancomicina y metronizadol, en los que se detecten los biomarcadores e indicios de patología intestinal en intestino o en las heces. Será necesario que exista un comité de ética de experimentación animal para evaluar los bioensayos con animales.

Existen más referencias de modelos de ratón para bioensayo en *Campylobacter jejuni*, concretamente Stahl-2016 definió con ratones knockout neonatos inmunodeprimidos Sigirr, tratados conforme a dicha referencia.

1.3 Enterovirus

En cuanto a la cuantificación de enterovirus debe realizarse una concentración previa empleando cartuchos microfiltrantes específicos para adsorción-elución de virus (tipo VIRADEL Zeta Plus 1-MDS), conforme a EPA/600/R-95/178, adsorbiendo los virus a superficies cargadas eléctricamente y reduciendo el volumen 1:1000, tras elución con extracto de carne. Se procede a una etapa de reconcentración mediante floculación orgánica y ultracentrifugación, reduciendo el volumen a 5 mL, conforme a Fout-2016). El método de referencia es el EPA 1615 en versión de cultivo celular y en versión molecular RT-qPCR. No existe evidencia científica de que exista un modelo animal (simio o ratón) que pueda servir a efectos de realizar bioensayos (Wang-2014).

Si se estimara necesario, se procedería a una etapa de reconcentración (floculación orgánica-proteínas lácteas ultracentrifugación reduciendo el volumen a 5 mL.

1.3.1 Moleculares

El concentrado eluido es concentrado aún más mediante ultrafiltración por centrifugado. El ARN viral es extraído y se efectúa un ensayo de PCR tras realizar una transcripción inversa (RT-qPCR) con los cebadores 5'-3' directo, inverso y la sonda definidos por De Leon-1990. La concentración de virus es calculada en términos de copias genómicas de ARN viral por litro, conforme a una curva patrón.

El método de referencia es el método EPA 1615 en versión molecular RT-qPCR.

El método requiere la posterior extracción de los ácidos nucleicos y posteriormente ejecutar el protocolo (RT)-qPCR. Deberá preverse la posible inhibición por sustancias húmicas, la infectividad y los controles de proceso para calcular la recuperación.

Las especies de enterovirus que se van a analizar son enterovirus humano A, B, C y D. Representan los serotipos representativos de a efectos de salud pública, ya que los serotipos de las especies de orthoreovirus no están asociadas a ningún episodio hídrico y no suelen causar enfermedad en los seres humanos.

1.3.2 Cultivo celular

El concentrado eluido es inoculado en frascos de células renales de mono Buffalo Green (BGMK). Durante dos semanas se examinan las muestras para el desarrollo de efectos citopáticos y vuelve a pasarse por cultivos frescos. La concentración de virus se calcula conforme al número más probable NMP. Ciertos enterovirus no cultivables no pueden ser detectados mediante este método.

1.3.3 Infectividad.

En el caso de enterovirus, la determinación de la infectividad en una muestra que sea positiva por qPCR se realizará en cultivos celulares de células confluentes (BGM-ATCC 90092601). También es posible analizar la infectividad mediante métodos moleculares o incluso mediante la combinación de métodos moleculares integrados con cultivos celulares ICC-RT-qPCR, pero deberán estudiarse caso por caso (Haramoto-2018)

1.3.4 Eficacia de recuperación de enterovirus.

Previo al comienzo del análisis sistemático de muestras se realizará una etapa de puesta a punto y auto-control encaminada a determinar la eficacia de recuperación de organismos en cada una de los pasos a seguir con objeto de:

- Evaluar la eficacia de recuperación de individuos en cada una de las etapas.
- Modificar el procedimiento para optimizar la recuperación de las especies.

Para llevar a cabo esta etapa, se prepararán muestras control con un número de individuos conocido de cada una de las especies. Se prepararán tres diluciones para cada una de las especies y tres réplicas para cada dilución.

Se determinará la eficacia de la recuperación en las distintas etapas.

Una vez analizada la eficacia de recuperación con muestras patrón se procederá a analizar cómo influye en cada una de las etapas: la presencia de materia orgánica particulada, sólidos en suspensión, arena, etc.

Para virus, dado que el proceso de análisis qPCR puede tener valores de recuperación más bajos, deberán establecerse controles de proceso exhaustivos (Haramoto-2018), escogiendo los patrones virales a inocular entre los que la literatura ofrece como recuperación óptima:

- Control WPC desde la etapa de concentración.
- Control MPC o molecular desde la etapa de extracción de ácidos nucleicos.
- Control (RT-)qPCR sobre el proceso de replicación y cuantificación qPCR.

Estos valores deberán presentarse para poder estimar la fiabilidad de los resultados. Los valores aceptables serán entre un 1% y un 10%, siendo buenos valores por encima de un 10%. En cualquier caso, el valor global debe ser superior a un 1% global.

ANEXO II. REFERENCIAS.

- Betancourt, W.Q., and Shulman, L.M. 2017. Polioviruses and other Enteroviruses. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. <http://www.waterpathogens.org> (J.S Meschke, and R. Girones (eds) Part 3 Viruses) <http://www.waterpathogens.org/book/polioviruses-and-other-enteroviruses> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.
- Bichai, F.; Smeets Patrick W.M.H. Using QMRA-based regulation as a water quality management tool in the water security challenge: Experience from the Netherlands and Australia Water Research 47 (2013) 7315-7326; dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.062
- De Leon R, Shieh YSC, Baric R, Sobsey MD. 1990. Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples by gene probes and polymerase chain reaction, p 833-853. In Water Quality Technology Conference Proceedings. AWWA, Denver, CO.
- Drinking Water Parameter Cooperation Project Support to the revision of Annex I Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption (Drinking Water Directive) 11 september 2017.
- EPA/630/R-97/001 March 1997 Guiding Principles for Monte Carlo Analysis
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J.L., Rodríguez-Manzano, J.; Calgua, B.; Abreu Corrêa, A., Hundesa, A.; Carratala, A.; Bofill-Mas, S. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques; Water Research 44(2010) 4325-4339; doi:10.1016/j.watres.2010.06.030
- Hijnen, W.A.M., Willemsen-Zwaagstra, J., Hiemstra, P., Medema, G.J., van der Kooij, D. (2000a). Removal of sulphite-reducing clostridia spores by full-scale water treatment processes as a surrogate for protozoan (oo)cyst removal. Wat. Sci. Tech. 41(7):165-171.
- Inspectierichtlijn Analyse microbiologische veiligheid drinkwater Artikelcode: 5318
- Haramoto, E. et al. (2018) A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. Water Research 135 (2018) 168-186; doi: 10.1016/j.watres.2018.02.004
- Hijnen, Wim; Medema, Gertjan; van der Kooij, Dick; Havelaar, Arie. (2018). Quantitative assessment of the removal of indicator bacteria in full-scale treatment plants (THESIS VERSION).
- Jofre, J. ; Lucena, F.; Blanch, A.; Muniesa, M. (2016) Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. Water 8, 199; doi: 10.3390/w8050199
- Lapen D.R., Schmidt P.J. , Thomas J.L. , Edge T.A. , Flemming C. , Keithlin J. , Neumann N., Pollari F., Ruecker N., Simhon A. , Topp E. , Wilkes G. , Pintar K.D.M. Towards a more accurate quantitative assessment of seasonal Cryptosporidium infection risks in surface waters using species and genotype information Water Research Volume 105, 15 November 2016, Pages 625-637; <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.023>.
- Nieminski EC, Bellamy WD, Moss LR (2000) Using surrogates to improve plant performance. Journal of the American Water Works Association, 92(3):67
- RIVM Report 2014-0020
- Stahl M., Graef F.A., Vallance B.A. (2017) Mouse Models for Campylobacter jejuni Colonization and Infection. In: Butcher J., Stintzi A. (eds) Campylobacter jejuni. Methods in Molecular Biology, vol 1512. Humana Press, New York, NY
- Salaheen S, Chowdhury N, Biswas D. Do the Current Campylobacter Detection Methods in Poultry Carcass Fail To Include Viable But Non- Culturable (VNBC) Cells? J Food Processing & Beverages. 2014;2(1): 2.
- Schijven, J.F., Teunis, P.F., Rutjes, S.A., Bouwknecht, M., Husman, A.M., 2011. QMRAspot: a tool for Quantitative Microbial Risk Assessment from surface water to potable water. Water Res. 45 (17), 5564-5576

- Teunis, P. F. M. ; Medema, G. J. ; Kruidenier I.; Havelaar a H. (1997); Assessment of the risk of infection by Cryptosporidium or Giardia in drinking water from a surface water source Water Res. 31 (06), 1333-1346
- Teunis, P.F.M., Havelaar, A.H. 1999. Cryptosporidium in drinking water. Evaluation of the ILSI/RSI quantitative risk assessment framework. Rapport 284550.006, RIVM, Bilthoven.
- Tfaily, R.; Papineau, I; Andrews, R.C. Barbeau, B. 2015 Application of Quantitative Microbial Risk Assessment at 17 Canadian Water Treatment Facilities. J. AWWA; 107:10 dx.doi.org/10.5942/jawwa.2015.107.0141
- WHO Regional Office for Europe; Revision of Annex I of the Council Directive on the Quality of Water Intended for Human Consumption (Drinking Water Directive). Background paper on microbiologically safe water and microbiological parameters Version: 15 September 2016
- WHO Quantitative microbial risk assessment: application for water safety management. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 978 92 4 156537 0. NLM classification: WA 675