

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARTICULARES PARA LA CONTRATACIÓN DEL SERVICIO DE DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 Y DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE SUS VARIANTES EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES A ADJUDICAR POR PROCEDIMIENTO SUJETO A REGULACIÓN ARMONIZADA.

REF: TEC00005540

1. Descripción de los trabajos

El presente Pliego tiene por objeto la contratación, por Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., S.M.E., M.P. (en lo sucesivo Tragsatec) de los trabajos de SERVICIO DE DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 Y DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE SUS VARIANTES EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES.

El pasado 23 de marzo de 2021 se publicó la “RECOMENDACIÓN DE LA COMISIÓN de 17.3.2021 sobre un enfoque común para establecer una vigilancia sistemática del SARS-CoV-2 y sus variantes en las aguas residuales de la UE”, en la que se establecen orientaciones para que cada Estado miembro establezca un sistema de vigilancia de las aguas residuales como herramienta complementaria de recopilación de datos y gestión de la pandemia de COVID-19, centrándose en la detección de la aparición y la propagación de las variantes del SARS-CoV-2. En ella se anima a los Estados miembros a establecer, antes del 1 de octubre de este año, el sistema de vigilancia de las aguas residuales.

Teniendo en cuenta que la vigilancia de las aguas residuales es una herramienta para observar tendencias y no un criterio absoluto para extraer conclusiones sobre la prevalencia de la COVID-19 en la población, dicho control puede servir para distintos fines en las diferentes fases de una epidemia. El seguimiento de las tendencias de la concentración viral de las variantes del SARS-CoV-2 en las aguas residuales puede servir de base para las medidas de preparación y respuesta.

Por todo ello, desde el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO), se ha encargado a Tragsatec la realización de los trabajos “3055295- CONTROL MICROBIOLÓGICO EN AGUAS RESIDUALES COMO INDICADOR EPIDEMIOLOGICO DE ALERTA TEMPRANA DE PROPAGACIÓN DE COVID-19. FASE 2.”. Dentro de los mismos, Tragsatec requiere la colaboración en la realización de los siguientes análisis en muestras de agua residual tomadas en diversas EDARs españolas:

- Detección del SARS-CoV-2 en agua residual: en 3.960 muestras.
- Determinación de variantes conocidas del SARS-CoV-2 en las muestras analizadas: en 3.960



muestras.

- Identificación de nuevas variantes del SARS-CoV-2 por secuenciación masiva: en 990 muestras.

El número total de analíticas a realizar se dividirá en 4 lotes prácticamente iguales que contendrán cada uno el siguiente número de determinaciones:

Lote TIPO:

- 990 uds. detección del SARS-CoV-2 en agua residual.
- 990 uds. determinación de variantes conocidas del SARS-CoV-2 en las muestras analizadas.
- 248 uds. identificación de nuevas variantes del SARS-CoV-2 por secuenciación masiva.

2. Especificaciones técnicas

Los trabajos requeridos por Tragsatec para todos los lotes definidos son los que se describen a continuación:

Recepción y preparación de la muestra.

La toma de la muestra de agua residual y el transporte de la misma hasta las instalaciones de la empresa adjudicataria serán realizados por Tragsatec. Las muestras irán identificadas con un código que hará referencia a la depuradora donde se ha tomado la muestra y la fecha en la que se realiza la misma. Para la recepción de las muestras en el laboratorio, la empresa adjudicataria deberá realizar los siguientes pasos:

- Las muestras procedentes de las diferentes EDARs, transportadas hasta las instalaciones de la empresa adjudicataria, se recibirán por parte del personal del laboratorio.
- El personal del laboratorio llevará guantes y bata desechable de un solo uso para recibir las muestras.
- Antes de abrir la nevera que contenga la/s muestra/s se pulverizará con una solución de lejía diluida a 20 ppm o con alcohol al 70%.
- Una vez en el laboratorio, las muestras se irán sacando de una en una, y el resto de las muestras se mantendrán en la nevera de transporte en una zona segura del laboratorio para impedir tropiezos o vuelcos.
- Una vez se toma el volumen necesario de cada muestra, se guardará una pequeña alícuota de la muestra en una duquesita de 100 ml, bien rotulada y se guardará en los

congeladores de -20 / -80 °C, destinados a las muestras biológicas, los cuales estarán adecuadamente señalizados con la señal de Peligro Biológico.

- El resto del material que no se vaya a analizar y que no sea necesario guardar, se situará en la zona destinada al material contaminado para su posterior autoclavado.

Detección del SARS-CoV-2 en agua residual.

Las empresas adjudicatarias deberán realizar la detección del SARS-CoV-2 en muestras de agua residual. Para ello deberá cumplir con las normas específicas que figuran en la “RECOMENDACIÓN (UE) 2021/472 DE LA COMISIÓN de 17 de marzo de 2021 sobre un enfoque común para establecer una vigilancia sistemática del SARS-CoV-2 y sus variantes en las aguas residuales de la UE” (Normas para la PCR/Digital-PCR (reacción en cadena de la polimerasa)):

- a) El valor umbral del ciclo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) debe ser inferior a 40 para notificar una muestra como positiva, tanto para un análisis qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) como para su utilización para la secuenciación.
- b) Podrían utilizarse enfoques alternativos de cuantificación de la RT-qPCR (como la reacción en cadena de la polimerasa digital – dPCR), siempre y cuando se logren resultados equivalentes a los de la RT-qPCR y cumplan requisitos de calidad equivalentes a los de la RT-qPCR.
- c) Todas las muestras deben analizarse, como mínimo, por duplicado para evitar resultados falsos positivos o falsos negativos.
- d) El procedimiento analítico de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real debe incluir controles adecuados para evaluar, como mínimo, la eficiencia en los pasos de concentración/extracción y la ausencia de una inhibición significativa de la reacción.
- e) Cada análisis debe contar con patrones adecuados (diluciones en serie de ARN SARS-CoV-2 sintético de, al menos, tres puntos cada uno de ellos calibrados por triplicado) y controles positivos y negativos para determinar si la PCR/qPCR arrojó resultados fiables.
- f) Debe establecerse un valor de corte de ciclos de cuantificación (Cq) para las muestras positivas [de] cinco ciclos antes de que finalice el protocolo de amplificación, a fin de evitar la cuantificación incorrecta por señales residuales de fluorescencia tardía.
- g) Debe utilizarse un control de extracción negativo para descartar cualquier contaminación durante la extracción del ARN.

Además, usará el protocolo ampliamente contrastado por la red de laboratorios del proyecto VATar

COVID-19, “PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN AGUAS RESIDUALES: CONTROL MICROBIOLÓGICO EN AGUAS RESIDUALES COMO INDICADOR EPIDEMIOLÓGICO DE ALERTA TEMPRANA DE PROPAGACIÓN DE COVID-19” (Versión mayo 2020). Para ello deberán cumplir con los siguientes criterios:

1. Concentración de 200 ml de agua residual mediante precipitación con $Al(OH)_3$, basado en Randazzo et al 2020. Como control de proceso se añade al inicio una cantidad conocida de un coronavirus (por ejemplo, Mouse hepatitis virus, Porcine coronavirus, o Transmissible gastroenteritis virus).
2. La extracción de RNA se llevará a cabo preferentemente mediante métodos comerciales robotizados, como por ejemplo el sistema Maxwell RSC utilizando el Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Promega).
3. La detección del SARS-CoV-2 se realiza mediante la amplificación de dos dianas: **N1** (RT-PCR diseñada en CDC, Atlanta, CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>) e **IP4** (RT-PCR diseñada en Institut Pasteur, Paris. Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. 2020 https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2). En caso de obtener resultados positivos para únicamente una de estas dos dianas, se realiza también la detección de la diana E (Hospital Charité, Berlin, Corman, V.M., et al., Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill, 2020. 25(3)). Para cada muestra se analizan 2 réplicas del RNA extraído sin diluir y dos réplicas de una dilución 1/10, con el objetivo de identificar muestras que pueden contener inhibidores de la amplificación. El análisis mediante RTqPCR incluye una curva estándar con una preparación de concentración conocida de moléculas de RNA de cadena sencilla que contenga las dianas analizadas, y controles negativos del proceso de extracción y de RTqPCR. Para cada muestra, también se realiza la RTqPCR con primers específicos para el coronavirus añadido como virus control de proceso.

La detección del SARS-CoV-2 en agua residual se realizará de todas las EDARs con una frecuencia semanal.

El plazo máximo para poner a disposición de Tragsatec los resultados de estas determinaciones será de 48 horas desde la recepción de la muestra en el laboratorio de la empresa adjudicataria.

Esta metodología de detección podrá sufrir modificaciones y se deberá adaptar en función de los criterios que puedan surgir por indicaciones del Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico o que provengan de recomendaciones europeas. Por lo tanto, estos cambios se deberán asumir y realizar por la empresa adjudicataria no suponiendo coste adicional alguno.

Determinación de variantes conocidas en las muestras analizadas.

El seguimiento de variantes conocidas de SARS-CoV-2 puede realizarse mediante determinaciones por RTqPCR que permiten la identificación de uno o más marcadores moleculares específicos y a su vez permiten estimar la proporción relativa presente en la muestra de dicho(s) marcador(es), respecto al resto de variantes presentes en la muestra.

Las empresas adjudicatarias realizarán la determinación de variantes conocidas en las muestras analizadas por procedimiento Real Time RTqPCRs dúplex para la cuantificación relativa de variantes, incluyendo la variante B.1.1.7, la variante B.1.351 y la variante P.1 (ya conocidas) respecto del resto. Para ello se utilizarán los protocolos que ya se hayan aceptado y publicado por parte del MITECO. Para aquellas variantes para las que no se disponga de este protocolo y a medida que vayan emergiendo nuevas variantes, las empresas adjudicatarias deberán desarrollar nuevos ensayos específicos para su determinación que deberán ser aceptados por el MITECO. La determinación de variantes conocidas por este método en cada muestra se realizará para todas aquellas variantes de las que se tenga conocimiento de su existencia en el momento de la realización de los análisis y para las que se disponga de protocolo aceptado.

La determinación de variantes se llevará a cabo sólo en muestras previamente diagnosticadas como positivas para SARS-CoV-2 por el método previamente detallado. La metodología en cuanto a controles positivos, negativos y de virus control de proceso es idéntica a la descrita en el apartado anterior para la cuantificación genérica de SARS-CoV-2.

La cuantificación relativa de las variantes por Real-Time-RT-PCR se realizará de todas las EDARs con una frecuencia semanal, en la misma muestra en la que se realiza la detección del SARS-CoV-2 semanal y, como ya se ha comentado, sólo en muestras previamente diagnosticadas como positivas para SARS-CoV-2.

El plazo máximo para poner a disposición de Tragsatec los resultados de estas determinaciones será

de 48 horas desde la recepción de la muestra en el laboratorio de la empresa adjudicataria.

Estas metodologías de detección podrán sufrir modificaciones y se deberán adaptar en función de los criterios que puedan surgir por indicaciones del Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico o que provengan de recomendaciones europeas. Por lo tanto, estos cambios se deberán asumir y realizar por la empresa adjudicataria no suponiendo coste adicional alguno.

Identificación de nuevas variantes por secuenciación masiva.

Las empresas adjudicatarias deberán aplicar en la muestra de agua residual un protocolo de secuenciación masiva que se centre en la región del genoma que codifica para la glicoproteína S, para obtener una mayor profundidad de análisis en la región que contiene los marcadores de mayor preocupación. Se deberán aplicar protocolos que permitan obtener un mínimo de 1 millón de reads por muestra. Las empresas adjudicatarias deberán desarrollar estos protocolos que deberán ser aprobados por el MITERD.

Se seleccionarán las muestras en las que se aplicará la secuenciación masiva a través de algoritmos para identificar aquellas muestras más idóneas, por tener mayor carga viral o menos cantidad de inhibidores.

Para la identificación de una variante conocida, se recomienda detectar al menos 3 de los marcadores/mutaciones específicas que caracterizan aquella variante en una misma muestra.

Como se trata de una metodología que, además de tener un coste económico elevado, es laboriosa y compleja y que de promedio requiere de 8-10 días para la obtención de resultados, la secuenciación masiva en profundidad de cada una de las EDARs se realizará en una muestra al mes.

El plazo máximo para poner a disposición de Tragsatec los resultados de estas determinaciones será de 10 días desde la recepción de la muestra en el laboratorio de la empresa adjudicataria.

Esta metodología de detección podrá sufrir modificaciones y se deberá adaptar en función de los criterios que puedan surgir por indicaciones del Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico o que provengan de recomendaciones europeas. Por lo tanto, estos cambios se deberán asumir y realizar por la empresa adjudicataria no suponiendo coste adicional alguno.

Resultados y soporte científico-técnico

A medida que se vayan obteniendo los resultados de los análisis, ya sean detección del SARS-CoV-2 en agua residual, determinación de variantes conocidas en las muestras analizadas o identificación de nuevas variantes por secuenciación masiva, la empresa adjudicataria los reportará al personal de TRAGSATEC en el formato digital que se indique e incluyendo la información que se especifique. Para todos los casos, el número viral de copias de genes se expresará en copias genómicas por litro (cg/L). Además, en este archivo se indicarán todas las anomalías o comentarios en la recepción de la muestra o en el proceso de análisis que faciliten la interpretación de los resultados.

La información correspondiente a detección del SARS-CoV-2 en agua residual y determinación de variantes conocidas en las muestras analizadas se incluirá también en la aplicación HEBAR del Ministerio de Sanidad, con un plazo de 48 horas después de obtener el resultado analítico.

La Comisión Europea creará una plataforma europea de intercambio con el objeto de:

- Recopilar y compartir las mejores prácticas, tanto de los Estados miembros como de otros países
- Recoger los resultados de las actividades de vigilancia de las aguas residuales
- Publicar y actualizar periódicamente los métodos de muestreo y análisis
- Crear una lista voluntaria de expertos que participen en la vigilancia de las aguas residuales y en la prevención y el control de enfermedades mediante la vigilancia de las aguas residuales
- Organizar un entorno de colaboración que promueva la intercalibración de enfoques y el intercambio de las mejores prácticas

Las empresas adjudicatarias prestarán todo el soporte científico-técnico necesario a la representación española en la plataforma europea de intercambio en sus tareas de recopilar, compartir, intercalibrar enfoques, defender posturas e intercambiar mejores prácticas en el ámbito de los trabajos objeto de este Pliego. Por ello es necesario que la empresa adjudicataria disponga para estos trabajos de un perfil de reconocido prestigio con altos conocimientos en materia de virología ambiental; además, este soporte científico-técnico deberá prestarse en **español**.

Estas actividades de soporte científico-técnico, así como las de recepción y preparación de la

muestra y la de entrega de resultados, se entiende que estarán incluidas en el precio de las otras tres determinaciones.