



PL24-0004 SERVICIOS DE GENÉTICA AMBIENTAL
DE AGUAS DE RÍOS, AÑOS 2024-27

CONDICIONES REGULADORAS TÉCNICAS

SERVICIOS DE GENÉTICA AMBIENTAL DE AGUAS DE RÍOS, AÑOS 2024-27

LIFE21-NAT-ES-LIFE KANTAUERIBAI (101074197)

PRESCRIPCIONES TÉCNICAS

1. OBJETO

La red de seguimiento de fauna mediante eDNA es una iniciativa nueva ligada al proyecto Life Kantauribai (101074197). El objetivo de esta red es crear y testar una herramienta para el control de la fauna ligada a los ríos que sea efectiva, precisa, fiable y complementaria a los trabajos que ya se hacen. La recogida de muestras de agua *in situ* en los puntos de la red y posterior filtrado de muestras es realizada con medios propios y no es objeto de este pliego.

En la actualidad, la ausencia de medios propios para poder llevar a cabo los procedimientos y analíticas genéticas necesarias, hace imprescindible la contratación de los trabajos de análisis a un laboratorio.

El laboratorio deberá realizar los análisis genéticos de las muestras de agua filtrada que reciba a modo de filtros de nitrato de celulosa preservados, y que pertenecen a diferentes puntos de los ríos y manantiales navarros y enviar los resultados a Gestión Ambiental de Navarra (GAN-NIK). Los datos recibidos por GAN-NIK permitirán evaluar la composición faunística de las masas de agua a que pertenecen. Para ello GAN-NIK designará un responsable de la red de control, que será el encargado de planificar los muestreos, comunicar la programación al laboratorio y recibir y validar los datos que envíe el laboratorio.

El objeto del presente pliego es el establecimiento de las condiciones técnicas para la realización por parte de un laboratorio de la detección genética de aguas de Navarra durante los años 2024-27.

2. ALCANCE DEL TRABAJO

El trabajo consiste en proporcionar a GAN-NIK (Gestión Ambiental de Navarra - Nafarroako Ingurumen Kudeaketa):

1. Desarrollo de parejas de primers y sondas específicos para la detección de cada especie objetivo (Tabla 1) cuando sea necesario.
2. Selección de parejas primers (y sondas cuando sea necesario) específicos más adecuados para cada especie. Para ello podrán contar con la asistencia técnica de GAN-NIK.
3. Validación de las parejas de primers y sondas. Tanto los seleccionados entre los ya existentes previamente, como los creados expresamente para este proyecto. Para ello, GAN-NIK proporcionará las muestras de tejido necesarias, tanto de las especies objetivo como de otras genéticamente cercanas que pudieran causar falsos positivos.
4. Recepción de las muestras y su posterior conservación en condiciones óptimas.
5. Extracción de ADN de cada muestra.
6. Realización de los análisis genéticos necesarios para determinar la presencia/ausencia de ADN de las especies objetivo en las muestras, y si fuera de interés, la intensidad de la señal de presencia. Para ello se harán las PCR/qPCR por triplicado para cada muestra (3 réplicas por muestra y especie).
7. Entrega de los resultados obtenidos para cada muestra y especie en formato Excel y en un informe firmado por su responsable.

Tabla 1: Especies objetivo del proyecto y necesidades previas al análisis de ADN ambiental

Especie objetivo	Necesidades
<i>Alosa alosa</i>	Verificación de primers y sondas
<i>Cottus aturi</i>	Elaboración de primers y sondas
<i>Lampetra planeri</i>	Elaboración de primers y sondas
<i>Margaritifera margaritifera</i>	Elaboración de primers y sondas
<i>Oxygastra curtisii</i>	Elaboración de primers y sondas
<i>Petromyzon marinus</i>	Verificación de primers y sondas
<i>Anguilla anguilla</i>	Elaboración de primers
<i>Parachondrostoma miegii</i>	Elaboración de primers
<i>Salmo salar</i>	Verificación de primers
<i>Salmo trutta</i>	Elaboración de primers
<i>Neovison vison</i>	Elaboración de primers
<i>Mustela sp.</i>	Elaboración de primers
<i>Galemys pyrenaicus</i>	Elaboración de primers

Las muestras serán filtros de nitrato de celulosa, preservados en etanol >95% no desnaturalizado dentro de tubos criogénicos de 4 ml y almacenados a -20°C.

Por otro lado, las muestras de tejido necesarias para la validación de las parejas de primers y evitar falsos positivos serán tomadas por GAN-NIK, preservadas en etanol >95% no desnaturalizado, refrigeradas y enviadas al adjudicatario.

La duración del contrato de trabajo será de 4 años. El alcance del trabajo no incluye la toma de muestras de 3L de agua y su filtrado, ni su preservación inmediatamente después del filtrado.

El número de muestras podrá variar entre campañas, dependiendo de los resultados obtenidos y los intereses para la conservación de especies. Sin embargo, máximo de muestras a analizar en un año será de 110. De las cuales aproximadamente 98 serán enviadas a finales de mayo/inicio de junio y 12 a inicio/mediados de septiembre.

Las 110 muestras de agua corresponden, por una parte, a la red seguimiento de especies de interés en ríos y por otra a la red para la validación y comparación de los resultados obtenidos en el laboratorio y en muestreos tradicionales.

El número de análisis para cada especie podrá variar cada campaña y año. Sin embargo, no se superarán los 1500 análisis de muestras anuales.

En resumen, se analizará un máximo anual de muestras, y habrá un máximo de análisis anuales. Un ejemplo de cómo se podrían distribuir las muestras y análisis anuales es el siguiente:

Tabla 2: Ejemplo de como se prevee que será la distribución de muestras y análisis anual por especie.

Número de muestras	Especie objetivo	Tipo de analítica	Número de muestras en las que la especie es objetivo	Total de analíticas (triplicado por muestra)
Campaña primavera 2024				
98	<i>Alosa alosa</i>	qPCR	16	48
	<i>Cottus aturi</i>	qPCR	26	78
	<i>Lampetra planeri</i>	qPCR	10	30
	<i>Margaritifera margaritifera</i>	qPCR	18	54

Número de muestras	Especie objetivo	Tipo de analítica	Número de muestras en las que la especie es objetivo	Total de analíticas (triplicado por muestra)
	<i>Oxygastra curtisii</i>	qPCR	12	36
	<i>Petromyzon marinus</i>	qPCR	16	48
	<i>Anguilla anguilla</i>	PCR	81	243
	<i>Parachondrostoma miegii</i>	PCR	81	243
	<i>Salmo salar</i>	PCR	91	273
	<i>Salmo trutta</i>	PCR	93	279
	<i>Neovison vison</i>	PCR	10	30
	<i>Mustela sp.</i>	PCR	10	30
	<i>Galemys pyrenaicus</i>	PCR	10	30
Campaña verano 2024				
12	<i>Margaritifera margaritifera</i>	qPCR	12	36

GAN-NIK proporcionará anualmente un documento detallado de las campañas de muestreo con la relación de las muestras y los análisis a ejecutar (especies objetivo y método) en cada una de ellas. Este documento será enviado al adjudicatario antes de comenzar con la primera campaña del año. El adjudicatario deberá adaptarse a esta programación para recibir y analizar las muestras. En esa programación se detallará:

- El número de muestras que se recogerá.
- La fecha aproximada en que se espera tener el lote de muestras de cada campaña listo para su envío.
- La relación entre las muestras y especies que buscar en los análisis en cada una de ellas.

Se intentará mantener el programa inicialmente previsto, si bien es posible que el responsable de la red modifique el programa inicialmente establecido por diversas causas (avenidas, factores biológicos, causas operativas) que puedan afectar tanto a la seguridad en la recogida de las muestras como a la representatividad de las mismas. En cualquier caso, se debe indicar en el programa de trabajo qué métodos se van a usar para recibir las muestras y cómo se va a adaptar la recepción a posibles cambios en los programas.

El análisis por parte del laboratorio se certificará como realizado, cuando para cada muestra se hayan cumplido los siguientes requisitos:

1. Recepción de las muestras por parte del laboratorio
2. Realización las analíticas de las muestras en el laboratorio.
3. Envío de los datos de las analíticas en formato digital (tipo Excel u otro programa similar) que deberán ser comprobadas y validadas por el responsable de la red, antes de dar por finalizada la analítica. En caso de tener que reanalizar alguna muestra, si el valor de la analítica cambia tras el segundo análisis y posterior validación, se debe emitir a GAN-NIK un informe indicando valor inicial, final y causa del problema que propició el valor erróneo.
4. Se enviarán los PDF de los boletines analíticos firmados o se habilitará un acceso web o ftp para su descarga en la que se puedan identificar por código proporcionado por GAN-NIK y fecha.

Cuando se cumplan estos requisitos para cada muestra, se podrá incluir en la siguiente certificación que se realice a Gobierno de Navarra la muestra y por tanto proceder a su facturación. No se aceptará facturar muestras cuyas analíticas no se hayan recibido en formato digital, ni muestras que no hayan sido validadas por el responsable de la red.

2.1. RECEPCIÓN DE MUESTRAS Y ENTREGA DE RESULTADOS

Las muestras serán enviadas por GAN-NIK tras cada campaña de muestreo, previo aviso (1día al menos) del envío al adjudicatario. El envío se realizará por medio de la empresa de mensajería que ambas partes convengan, y el método que se estime óptimo por las dos partes para preservar en las mejores condiciones las muestras.

Desde la recepción de las muestras se dispondrá de 60 días naturales para la remisión de los resultados analíticos. Los datos se entregarán, debidamente firmados por el técnico competente en PDF y además en formato digital tipo tabla de Excel (u otro programa similar compatible y que deberá responder a los requisitos de formato que pida GAN-NIK), e incluirá cada campaña completa, siendo remitidas a las distintas personas responsables de la red que designe GAN-NIK. Una vez validados los resultados de la tabla tipo Excel por el responsable de GAN-NIK, se podrán eliminar las muestras almacenadas si ambas partes están de acuerdo. En cualquier caso, no habrá obligación de conservar las muestras más allá de un año. En caso de que haya algún valor que presente indicios de ser erróneo, el responsable de GAN-NIK podrá solicitar al adjudicatario la repetición de la analítica en un plazo inferior a 15 días desde la recepción de los datos tipo Excel. En caso de confirmarse finalmente el error se remitirá a GAN-NIK un informe con los siguientes datos:

CÓDIGO DE MUESTRA GAN-NIK
VALOR INICIAL
VALOR CORREGIDO
CAUSA DEL ERROR

Se considera una parte fundamental del plan de trabajo asegurar un adecuado manejo de las muestras desde su recepción hasta la entrega de resultados. En el Programa de trabajo se debe reflejar con claridad todas las acciones que se tomen para asegurar que la muestra, desde su recepción, hasta que se emiten los resultados, se conserva siempre en buenas condiciones y se minimizan los riesgos de pérdidas de las muestras o de cambios en las características de las mismas debido a las condiciones de transporte, conservación... Si el licitador tiene varios centros de trabajo, se explicará el método utilizado para asegurar la calidad de los resultados y la seguridad e integridad de la muestra.

El informe final de los resultados se entregará en formato PDF. Tendrá que contener al menos los siguientes puntos:

- a) identificación de la muestra
- b) cualquier punto importante a cerca de la muestra (por ej. tamaño insuficiente, estado degradado)
- c) el estándar utilizado para el análisis y la metodología seguida
- d) fecha de recepción de la muestra
- e) método de almacenamiento
- f) fecha del análisis
- g) persona responsable del análisis
- h) tamaño de la muestra usada (volumen, masa, o equivalente)
- i) resultados del análisis

- j) información sobre el desempeño de los ensayos (análisis de las curvas de fusión, eficiencia de la amplificación, valores Cq, ...)
- k) pareja de primers usados para cada especie y sus características
- l) particularidades observadas durante el análisis
- m) cualquier desviación, adición a o exclusión u otra información relevante a un test específico
- n) firma del responsable del informe

Si hubiera sido encargado desarrollar primers (y sondas en el caso de la qPCR) y/o testar su validez se incluirá al menos lo siguiente en el informe:

- a) taxón objetivo
- b) secuencia de la pareja de primers (y si fuera necesario sonda) escogida cómo más adecuada y secuencia que amplifica en la especie objetivo
- c) características del cebador escogido (Tm, % de G/C que contiene, longitud, etc.)
- d) posibles primers alternativos
- e) los resultados del ensayo *in silico* e *in vitro* (incluyendo comprobación de que no existen falsos positivos con especies cercanas)
- f) la metodología seguida
- g) cualquier desviación, adición a o exclusión u otra información
- h) firma del responsable del informe

2.2. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

Durante el procesado de las muestras y le preparación de los ensayos el adjudicatario deberá realizar al menos los siguientes controles:

- Control negativo de extracción
- Control interno/externo de amplificación
- Control negativo de PCR/qPCR
- Control positivo de PCR/Qpcr

En el caso de la qPCR con sondas fluorescentes deberá además realizar:

- Control de no amplificación

El método de realización de estos controles deberá incluirse en el plan de trabajo.

En cualquier caso, los métodos analíticos a emplear asegurarán la precisión necesaria para desarrollar las comprobaciones y controles necesarios.

ANÁLISIS	MÉTODO	EXPRESIÓN
Presencia/Ausencia	PCR	Positivo/Negativo
		Imagen del gel de electroforesis
Presencia/Ausencia + intensidad de la señal	qPCR	Positivo/Negativo
		Cuantificación absoluta (copias/μl)

5. PLAN DE TRABAJO

En la oferta técnica se entregará un plan de trabajo en el que se muestre la planificación que el laboratorio va a realizar para cumplir los requisitos de este pliego. Dicho plan debe incluir al menos:

- Método que se va a utilizar para recibir las muestras y conservarlas, y como se va a adaptar la recepción a posibles cambios en los programas.
- Planificación del procedimiento de desarrollo de los primers y sondas. Planificación de duración de ensayo y tiempo estimado en la entrega de resultados desde la recepción de la muestra. Justificación de infraestructura suficiente. Método para la entrega de resultados.
- Planificación del procedimiento de los ensayos PCR/qPCR. Planificación de duración de ensayo y tiempo estimado en la entrega de resultados desde la recepción de la muestra. Justificación de infraestructura suficiente para poder asumir picos de muestras y analizarlas en el menor tiempo posible. Método para la entrega de resultados.
- Cualquier otro método, planificación o complemento al plan de trabajo de cara a asegurar la calidad del dato analítico y la seguridad e integridad de la muestra desde su recepción hasta que se emiten los resultados.