



Septiembre 2023

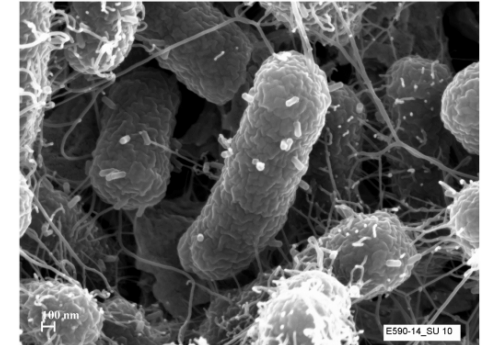
Colífagos: Los indicadores de contaminación vírica de la calidad del agua

Dra. Julia Martín, Ariadna Jorba y Núria Guilera

1. Bacteriófagos
2. Soluciones para análisis rutinarios
 1. Easy Kit BPI 601: ¿Cómo funciona?
 2. Easy Kit BPI 604: ¿Cómo funciona?
 3. Lectura e interpretación de resultados
 4. Rapid Kit BPF-SPA: ¿Cómo funciona?
 5. Rapid Kit BPF-SE: ¿Cómo funciona?
3. Resumen

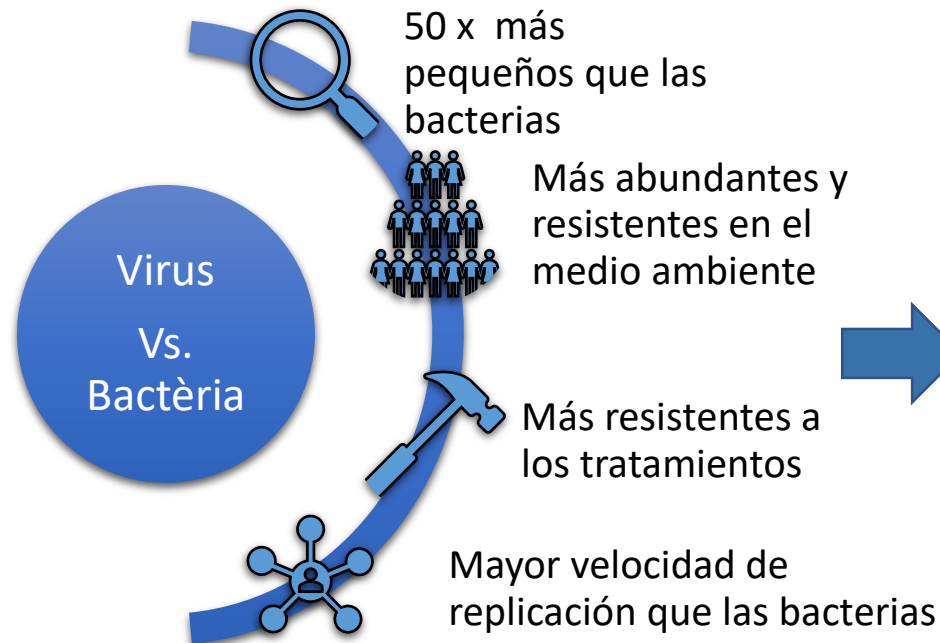
La monitorización y la gestión de la calidad microbiológica del agua es crítica para los planes de seguridad y saneamiento

- Parámetros actuales: Indicadores bacterianos
- Nuevos parámetros: **Indicadores víricos (colífagos)**



Comparison: Bacteria vs. Virus size

¿Por qué indicadores víricos?



Los indicadores bacterianos están limitados y no pueden detectar la presencia de patógenos víricos

...los colífagos sí que pueden

Why viral outbreaks occur in bacteriologically safe water?

- Higher environmental persistence
- Higher resistance to water treatments
- Very low infectious doses

Some waterborne virus outbreaks in bacteriologically safe water:

- More than 33 outbreaks
- More than 30,000 cases
- Virus involved: HuNoV, rotavirus, enterovirus, astrovirus...



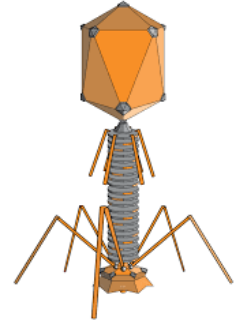
Last outbreak → June 2023 → Spain → Norovirus :

Las analíticas confirman que un virus en el agua provocó el brote de gastroenteritis de Betanzos

Sanidade detecta la presencia de "norovirus" y clasifica el agua como no apta para el consumo | El Concello pide explicaciones a la empresa concesionaria sobre los motivos por los que no se detectó hasta ahora el virus

I. Bacteriófagos

- Los **bacteriófagos son virus que infectan bacteria** y se definen o clasifican en **función de la cepa huésped bacteriana** que infectan.
- Son los organismos vivos más abundantes del planeta
- Roles de los bacteriófagos en la biosfera:
 - Regulan la población bacteriana
 - Proporcionan variabilidad en la población bacteriana



Los bacteriófagos se comportan como virus humanos/animales con respecto a:

- Circulación a través de los filtros (membranas, ultrafiltración...)
- Adsorción superficial (partículas, membranas...)
- Resistencia física y química a la desinfección
- Incremento de su resistencia a la desinfección cuando se adsorben a superficies sólidas

Resistencia a los tratamientos y persistencia medioambiental similar a los virus humanos/animales

Existe un amplio consenso en la comunidad científica sobre ambos aspectos

Ventajas adicionales de los bacteriófagos

- En muestras con contaminación fecal, los bacteriófagos son más abundantes que los virus humanos (excepto en humanos enfermos).
- Concentraciones altas y muy constantes en aguas residuales.
- Estabilidad a 4 °C durante 48h y durante meses a -20 °C o -80 °C con el 10% v/v de glicerol.
- Se eliminan los errores causados por los indicadores bacterianos debido a: fenómenos de estrés, reactivación, formas metabólicas dañadas...
- Detección rápida, fácil y de bajo coste.

Grupos de bacteriófagos propuestos como indicadores

Clasificación en función de la cepa huésped bacteriana que infectan

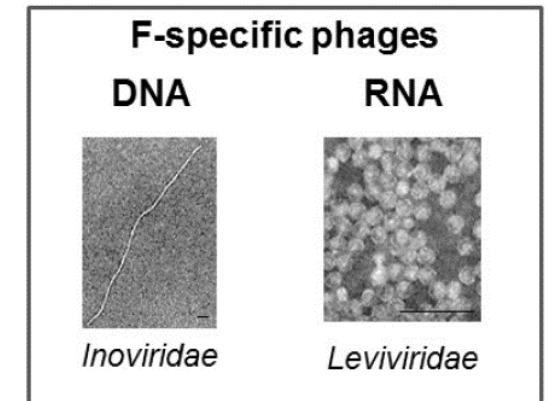
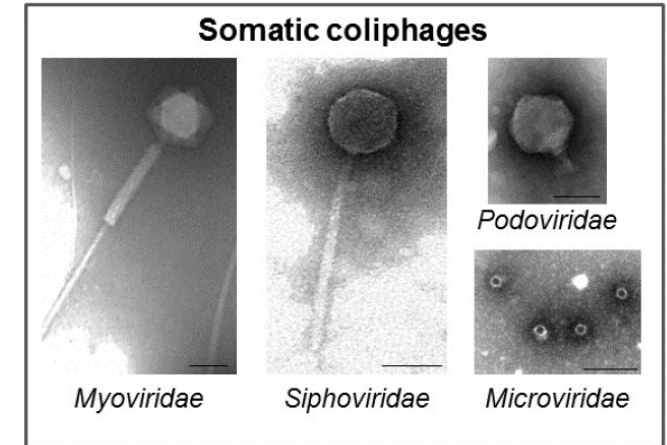
COLÍFAGOS

Colífagos somáticos

- Infectan *E. coli* a través de la pared celular
- Cepa huésped (acuerdo verbal) CNI3, WG5 derivada de la *E. coli* C (ATCCI3706)

Colífagos F-específicos

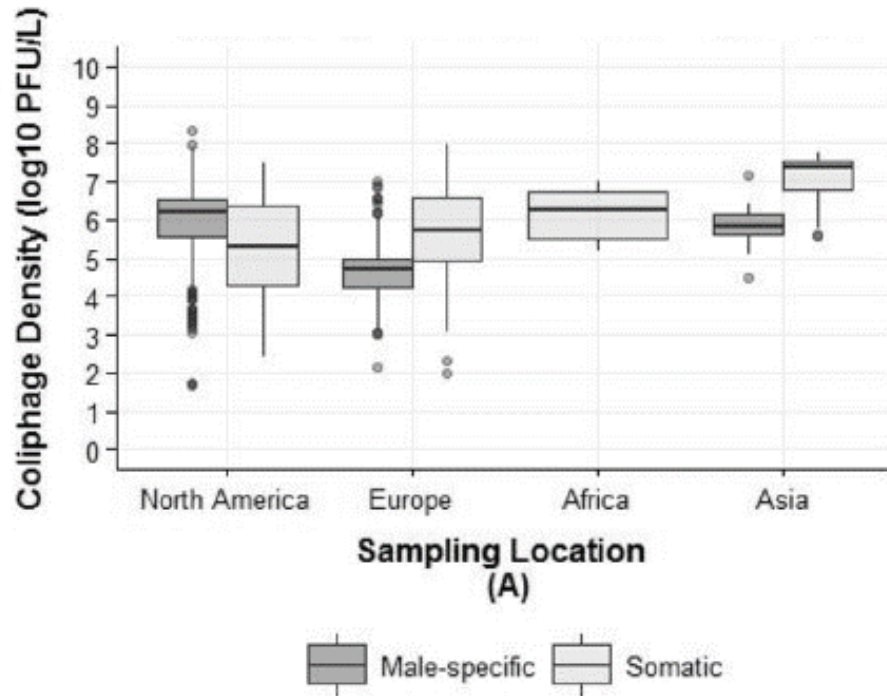
- Infectan *E. coli* y otras enterobacterias a través del pili sexual codificado por un plásmido
- Cepa huésped *Salmonella typhimurium* WG49 y *E. coli* HS



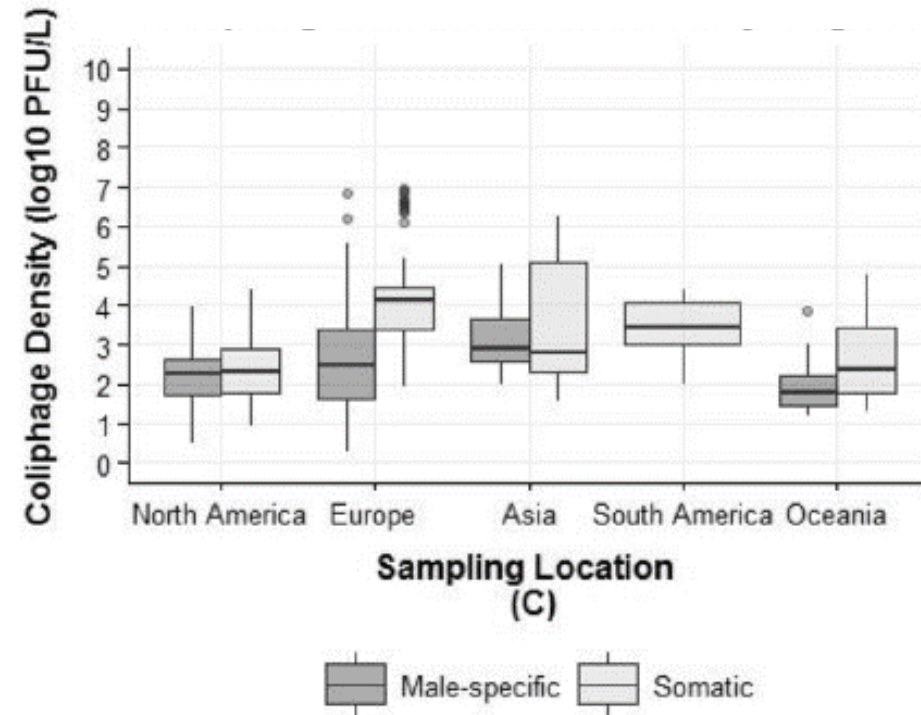
Bacteriófagos *Bacteroides fragilis*

Infectan *Bacteroides fragilis* a través de la pared celular (HSP40, RYC2056)

Colifagos en aguas residuales por continente

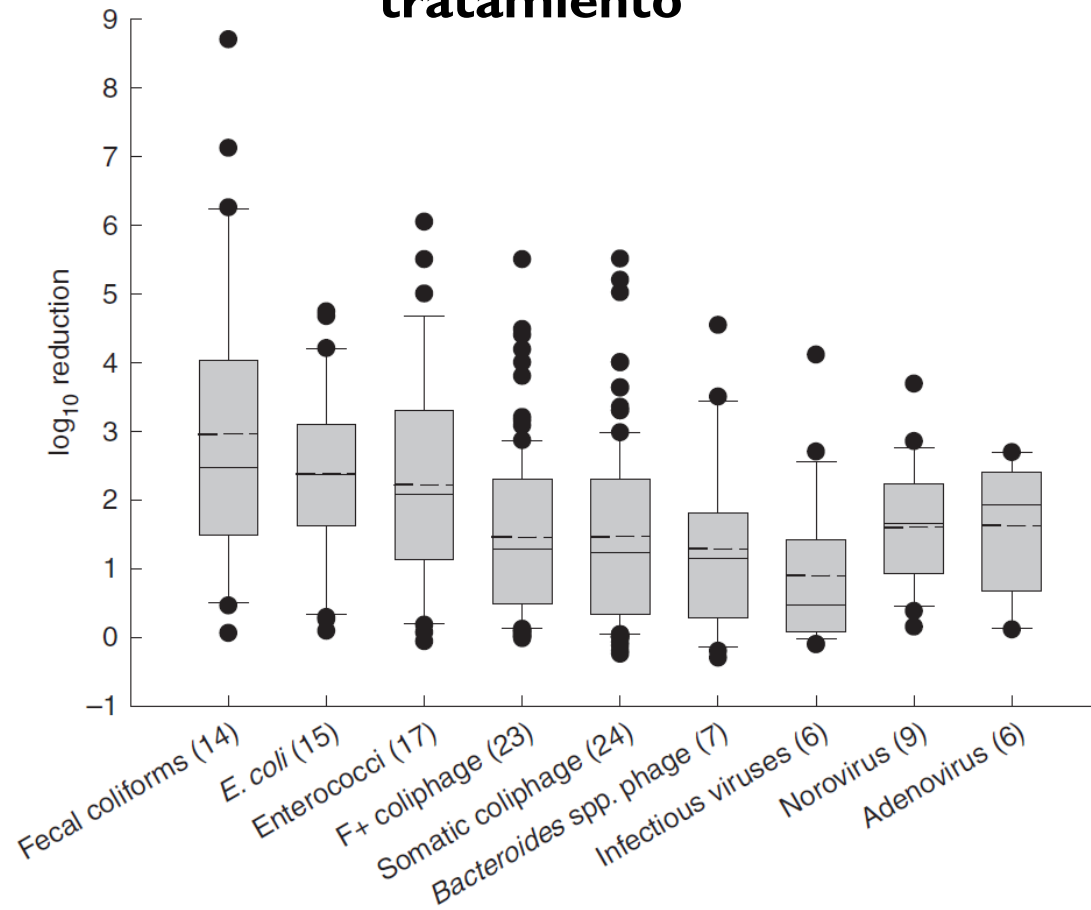


Colifagos en aguas naturales por continente



Nappier et al. 2019. Occurrence of coliphage in raw wastewater and in ambient water: A meta-analysis. Water Research 153: 263-273

Correlación en la reducción de la concentración de colifagos, bacterias y virus después del tratamiento



McMinn et al. 2017. Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. Letters in applied microbiology 65: 11-26.

2. Soluciones para análisis rutinarios

Normas más utilizadas

❖ International Organization for Standardization (ISO)

- 10705-1, 10705-2, 10705-3 and 10705-4

❖ United States Environmental Protection Agency (US EPA)

- 1642, 1643

- ISO 10705-1: Detección y recuento de bacteriófagos F-ARN específicos
- **ISO 10705-2: Detección y recuento de colifagos somáticos**
- **ISO 10705-3: Concentración de muestra**
- ISO 10705-4: Enumeración de bacteriófagos de *Bacteroides fragilis*

Características de las normas:

Preparación del material biológico (1 semana)

Calibración del medio

Preparación muestra

Análisis: Proceso con múltiples pasos

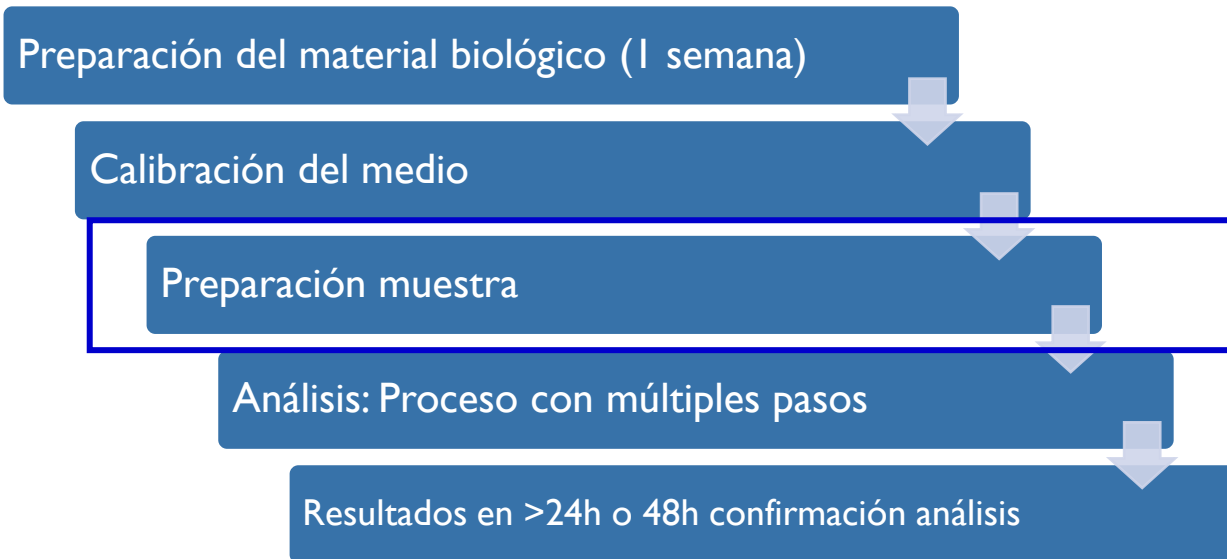
Resultados en >24h o 48h confirmación análisis

Normas más utilizadas

❖ International Organization for Standardization (ISO)

- 10705-1, 10705-2, 10705-3 and 10705-4

- ISO 10705-1: Detección y recuento de bacteriófagos F-ARN específicos
- **ISO 10705-2: Detección y recuento de colífagos somáticos**
- **ISO 10705-3: Concentración de muestra**
- ISO 10705-4: Enumeración de bacteriófagos de *Bacteroides fragilis*



- **Muestras con baja concentración de bacteriófagos** →

Se debe analizar un volumen de muestra de 100mL

Procedimiento concentración de muestra (ISO 10705-3)

Muestra 100mL se concentra siguiendo la ISO 10705-3 hasta 5mL y se analiza siguiendo la ISO 10705-2

- **Muestras con alta concentración de bacteriófagos** →

1mL de muestra o muestra diluida

Muestras con alta concentración de bacteriófagos como aguas residuales, regeneradas... contienen alta flora acompañante.

Se requiere descontaminación de la muestra

- **Objetivo:** eliminar las interferencias del microbiota acompañante
- **Materiales:**
 - **Pequeñas cantidades:** 10/20mL jeringa 0.22um filtro membrana PES
 - **Volumen de muestra grande:** Sistema de filtración con 0.22um filtro membrana PES

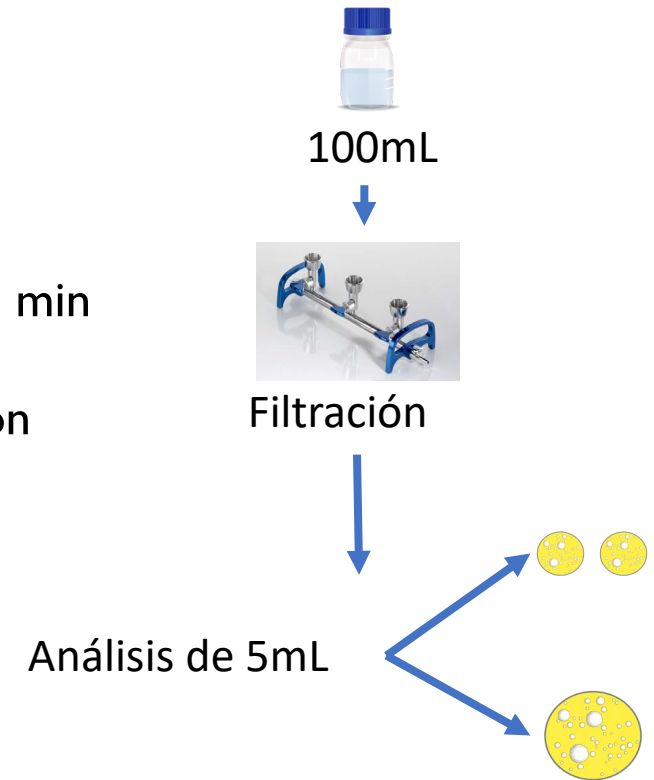
- **Método:** filtración por membrana ISO 10705-3 (Anexo A.2)
- **Uso:** muestras con baja turbidez (<2 NTU), normalmente agua potable
- **Volumen filtrado:** 100mL (método permite hasta 1L)
- **Volumen obtenido:** 5mL
- **Volumen analizado utilizando ISO 10705-2:** 5mL
- **Materiales:**
 - Sistema de filtración al vacío
 - Filtros de membrana MCE con tamaño de poro 0.22um y diametro 47mm
 - Solución de elución: 1% extracto de carne, 0.5 M NaCl y 3% Tween 80)
 - Solución de cloruro de magnesio: 5M



*Solución elución debe estar a pH 9

Procedimiento:

- Añadir 1 mL de la solución de cloruro de magnesio en la muestra (100mL)
- Filtrar la muestra utilizando el filtro MCE (0.22um) – aproximadamente 1L en 30 min
- Cortar el filtro en 8 fragmentos e introducirlos en los 5mL de solución de elución
- Sonicar durante 4min
- Analizar los bacteriófagos eluidos:
 - a) Utilizando placas de 90mm MSA: 2.5mL por cada placa: 2 placas
 - b) Utilizando placas de 140mm MSA: 5mL – 1 placa



Normas más utilizadas

❖ International Organization for Standardization (ISO)

- 10705-1, 10705-2, 10705-3 and 10705-4

- ISO 10705-1: Detección y recuento de bacteriófagos F-ARN específicos
- **ISO 10705-2: Detección y recuento de colífagos somáticos**
- **ISO 10705-3: Concentración de muestra**
- ISO 10705-4: Enumeración de bacteriófagos de *Bacteroides fragilis*

Preparación del material biológico (1 semana)


Calibración del medio

Preparación muestra


Análisis: Proceso con múltiples pasos

Resultados en >24h o 48h confirmación análisis

Bluephage ha desarrollado dos familias de productos



Easy kits
Tecnología base agar



Rapid kits
Libre de agar
Tecnología patentada

❖ Para una rápida y fácil implementación de los métodos ISO y US-EPA

1 pfu/1 ml – 1 pfu/100 mL	Sensibilidad	1 pfu/ 100 mL
12 pasos	# pasos del protocolo	6 pasos
1-2 horas	Tiempo de técnico	20 min
<24 horas	Tiempo	6 horas
ISO / US-EPA	Equivalencia	ISO
Cuantificable	Resultados	Presencia / Ausencia + Cuantificable

❖ El método más rápido para el análisis de colifagos basado en una tecnología patentada

Bluephage EASY KITS – ISO Kits

Easy Kits

Kit Product No.	Matrices	Volume Sample	Equivalence (Method)	Type of coliphage	No. Analysis per Kit
BPI601	Raw, treated, Wastewater, Surface water, Recreational, shellfish extracts, sediments and sludge	1mL – 10mL	ISO 10705-2 (DAL method)	Somatic	70
BPI604	Clean Water e.g. Drinking Water	100mL	Based on ISO (SAL method)	Somatic	10



Biological Materials

Kit Product No.	Description	Units
BPI603	Bacterial Host strain (WG5) + Virus bacteriophage (Φ x174)	10 + 10
BPI626	Virus bacteriophage (Φ x174)	20
BPI628	Bacterial Host strain (WG5)	20



Powder media

Kit Product No.	Description
BPI637	Modified Scholten's Broth (MSB) – 500g
BPI638	Modified Scholten's Agar (MSA) – 500g (for 550 plates approximately)



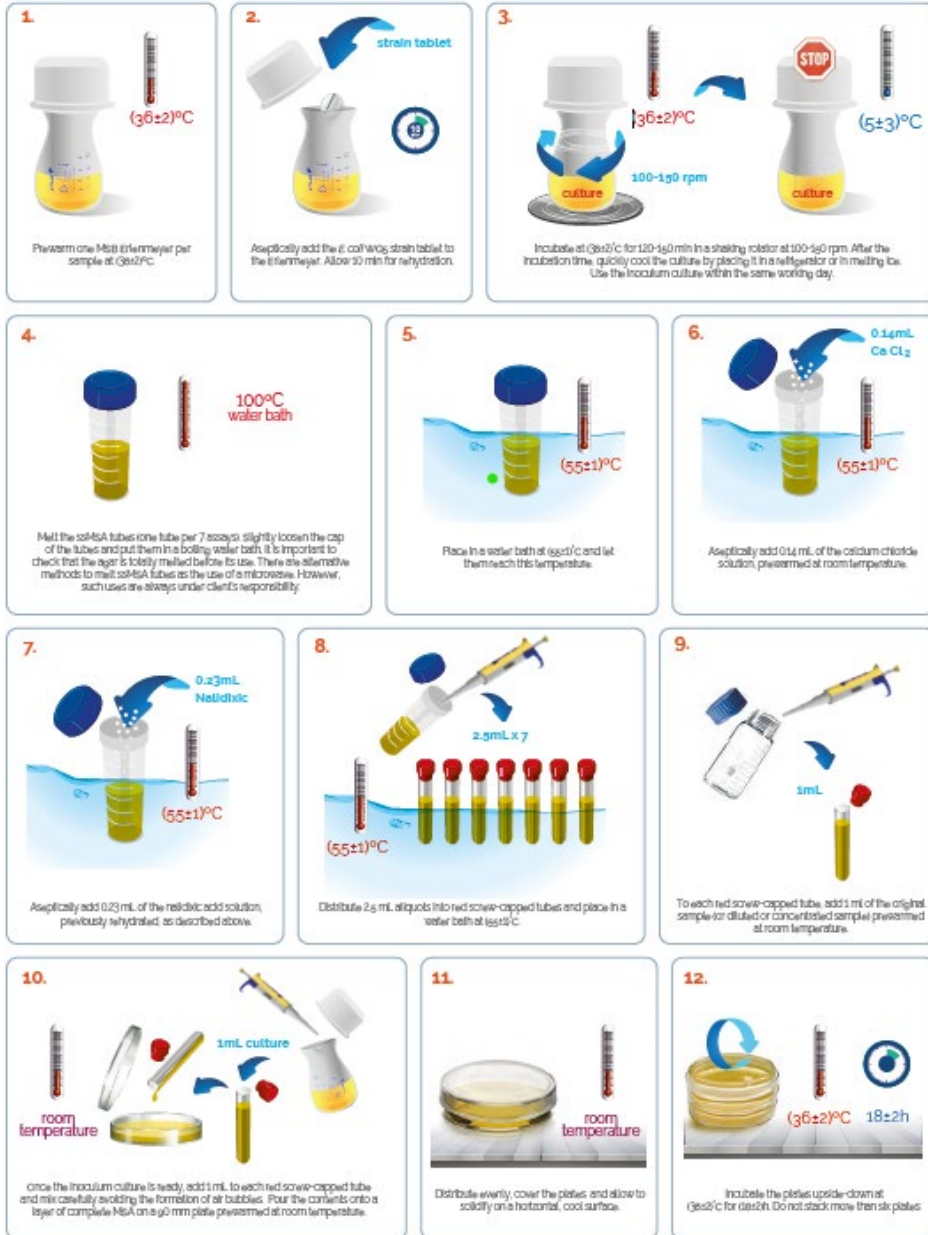
Plates with MSA layer

Kit Product No.	Description	Units
MSAI	90mm plates with MSA media	20



Reagents & materials for ISO 10705-2 + 10705-3

Kit Product No.	Description	Units
MSASSIN	Semi solid Modified Scholten's Agar prepared	10
MSB50I	Modified Scholten's Broth prepared (MSB)	10
ELUI	3mL Phage eluting solution	20



- 1.** Prewarm one Mini Erlenmeyer per sample at $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$.
- 2.** Aseptically add the *E. coli* WQ strain tablet to the Erlenmeyer. Allow 30 min for rehydration.
- 3.** Incubate at $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 120-140 min in a shaking isolator at 100-150 rpm. After the incubation time, quickly cool the culture by placing it in a refrigerator or in melting ice. Use the inoculum culture within the same working day.
- 4.** Melt the ssMSA tubes (one tube per 7 assays), slightly loosen the cap of the tubes and put them in a boiling water bath. It is important to check that the agar is totally melted before its use. There are alternative methods to melt ssMSA tubes as the use of a microwave. However, such uses are always under client's responsibility.
- 5.** Place in a water bath at $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$ and let them reach this temperature.
- 6.** Aseptically add 0.14 mL of the calcium chloride solution, prewarmed at room temperature.
- 7.** Aseptically add 0.23 mL of the nalidixic acid solution, previously hydrated, as described above.
- 8.** Distribute 2.5 mL aliquots into red screw-capped tubes and place in a water bath at $(55 \pm 1)^\circ\text{C}$.
- 9.** To each red screw-capped tube, add 1 mL of the original sample (or diluted or concentrated sample) prewarmed at room temperature.
- 10.** Once the inoculum culture is ready, add 1 mL to each red screw-capped tube and mix carefully avoiding the formation of air bubbles. Pour the contents onto a layer of complete MSA on a 60 mm plate prewarmed at room temperature.
- 11.** Distribute evenly, cover the plates, and allow to solidify on a horizontal, cool surface.
- 12.** Incubate the plates upside-down at $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ for 18±2h. Do not stack more than six plates.



- Análisis de colifagos somáticos
- Conforme ISO 10705-2
- Todo tipo de muestras
- Material para 70 análisis excepto placas de Petri y MSA para la primera capa
- Resultados pfu/mL



1
Peseletrar una botella de MSA por cada muestra a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$.

2
Atempere un vial de *E. coli* WGS a temperatura ambiente. Retirar el sello del tapón y girar en el sentido de las agujas del reloj para volver la cepa fuertemente bacteriana. Agitar bien para resuspender la bacteria, colocar el vial boca abajo y esperar 10 min a temperatura ambiente.

3
Abrir el vial de *E. coli* WGS y asegurarse de que todo el líquido se ha resuspendido bien. Verter todo el contenido del vial en la botella de MSA e incubar a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante 120-140 min en un agitador orbital a 100-150 rpm. Una vez finalizada la incubación, enfriar rápidamente el cultivo colocándolo en un refrigerador o en hielo seco. Utilizar el cultivo dentro del meso de vida de trabajo.

4
Horno microondas o autoclave
Fundir la botella de MSA 2x una botella por análisis: calentar el medio en un horno microondas durante 3 min a 90 W o autoclavearlo a 121°C durante 15 minutos. Al finalizar, es importante verificar que el agua está totalmente fundida antes de su uso.

5
Colocar la botella de MSA 2x fundida en un baño de agua a $(49 \pm 1)^\circ\text{C}$ y dejar atemperar. El uso de esta temperatura es muy importante para evitar la formación de gotas de condensación posteriormente.

6
Peseletrar 100 mL de muestra de agua en una botella a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$. El cultivo de *E. coli* WGS almacenado en el frigorífico también debe atemperarse a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$.

7
Añadir cuidadosamente la solución de cada componente en un tubo y los 20 mL del cultivo de *E. coli* WGS a la botella que contiene los 200 mL de muestra de agua y mantener a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante 5-10 minutos. No vaciar este tiempo. Aumentar el tiempo de contacto puede resultar en la neutralización de los fagos de tal manera que se sobreestime su concentración inicial en la muestra. Continuar con el siguiente paso inmediatamente.

8
Mezclar cuidadosamente
Verter cuidadosamente la muestra de agua junto con el cultivo de *E. coli* WGS en la botella de MSA 2x fundida y mezclar cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire con movimientos de rotación nunca agitando. Es muy importante que en este paso la mezcla y el agua estén bien atemperados.

9
Verter el contenido en cinco placas de Petri de 140 mm de diámetro distribuyéndolo uniformemente (aprox. 40-45 mL por placa) x5.

10
Dejar solidificar sobre una superficie horizontal a temperatura ambiente. Se recomienda encarecidamente no agitar las placas de Petri para evitar la formación de gotas de agua por condensación.

11
Incubar las placas boca arriba a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante 18±2h. Maximalmente, se recomienda no apilar las placas de Petri para evitar la formación de gotas de agua por condensación. Si es necesario hacerlo por razones de espacio, apilar el menor número posible.



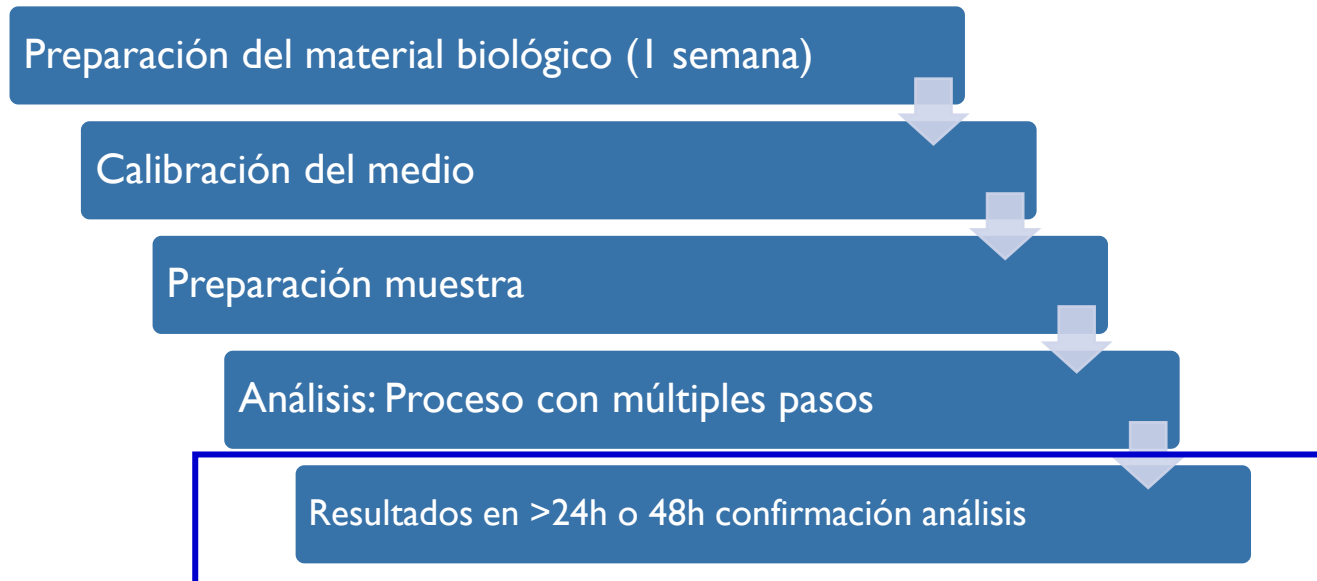
- Análisis de colifagos somáticos
- Basado ISO 10705-2
- Muestras limpias: potable, regenerada...
- Volumen muestra 100mL
- Material para 0 análisis excepto placas de Petri
- Resultados pfu/100mL

Normas más utilizadas

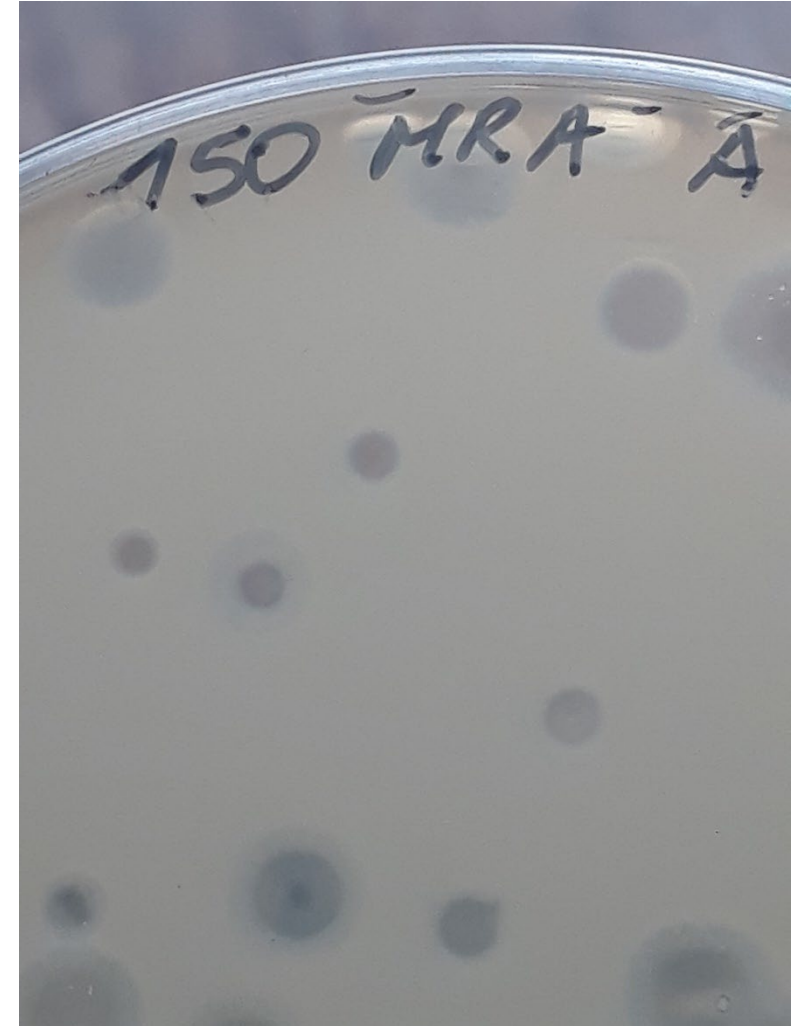
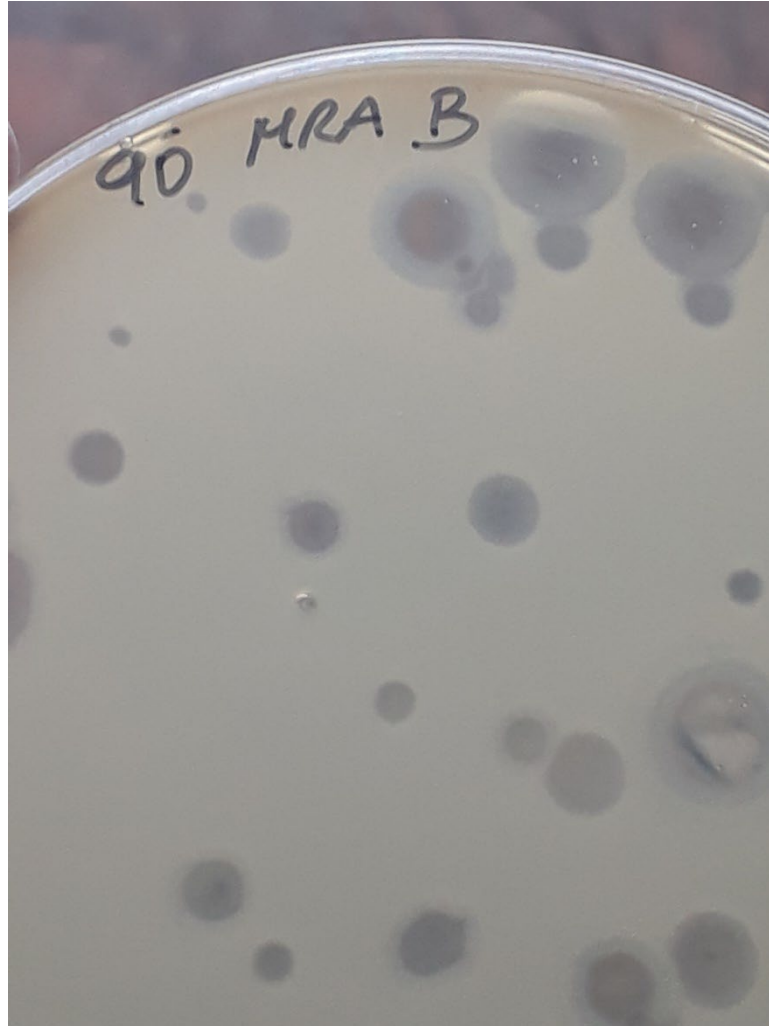
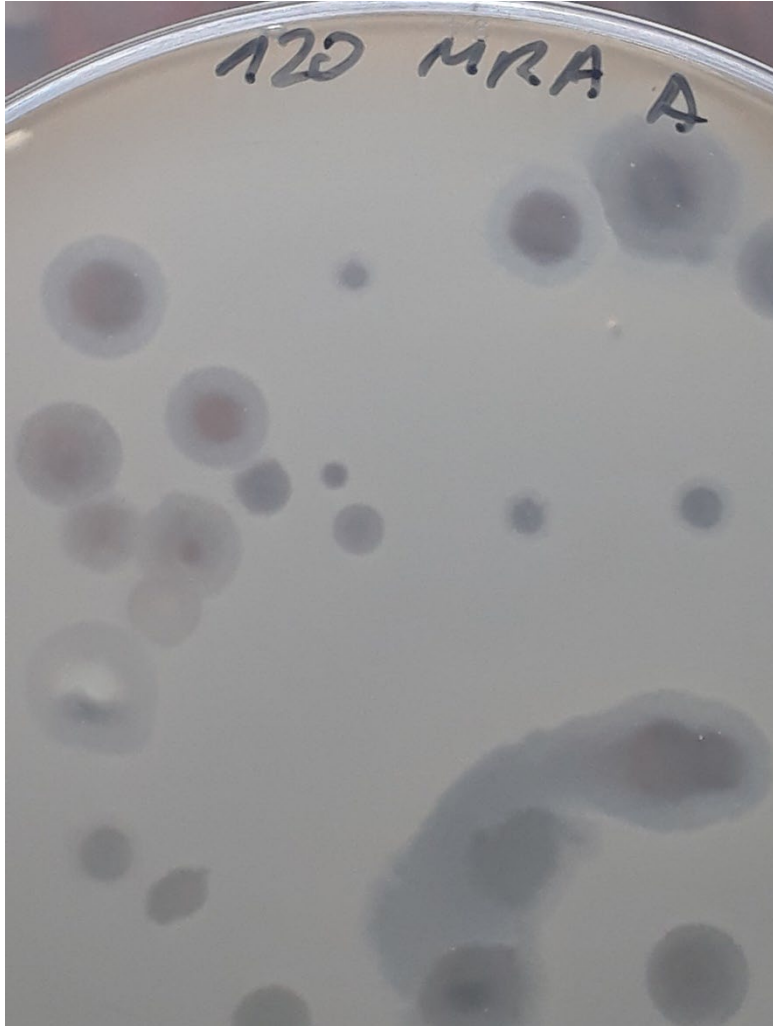
❖ International Organization for Standardization (ISO)

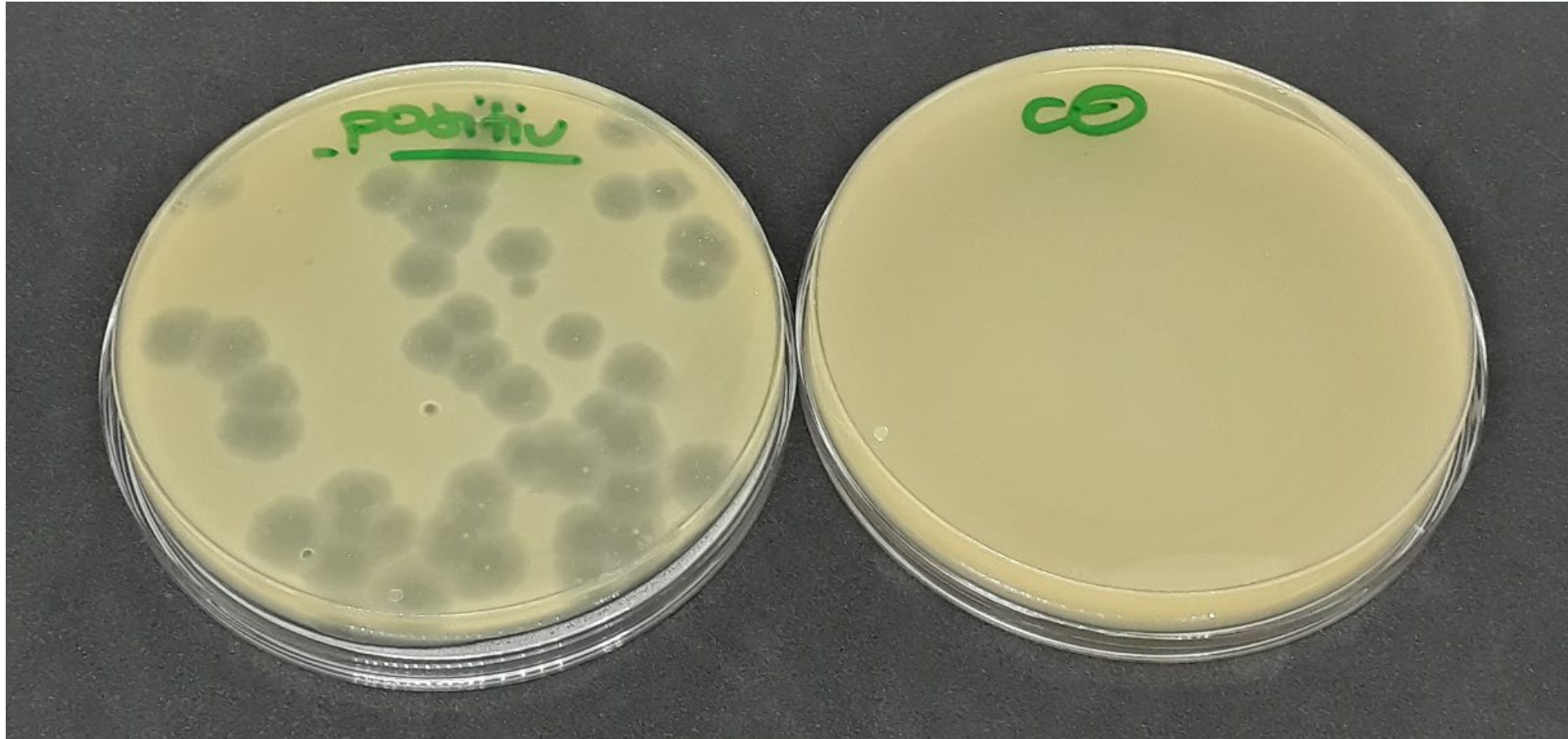
- 10705-1, 10705-2, 10705-3 and 10705-4

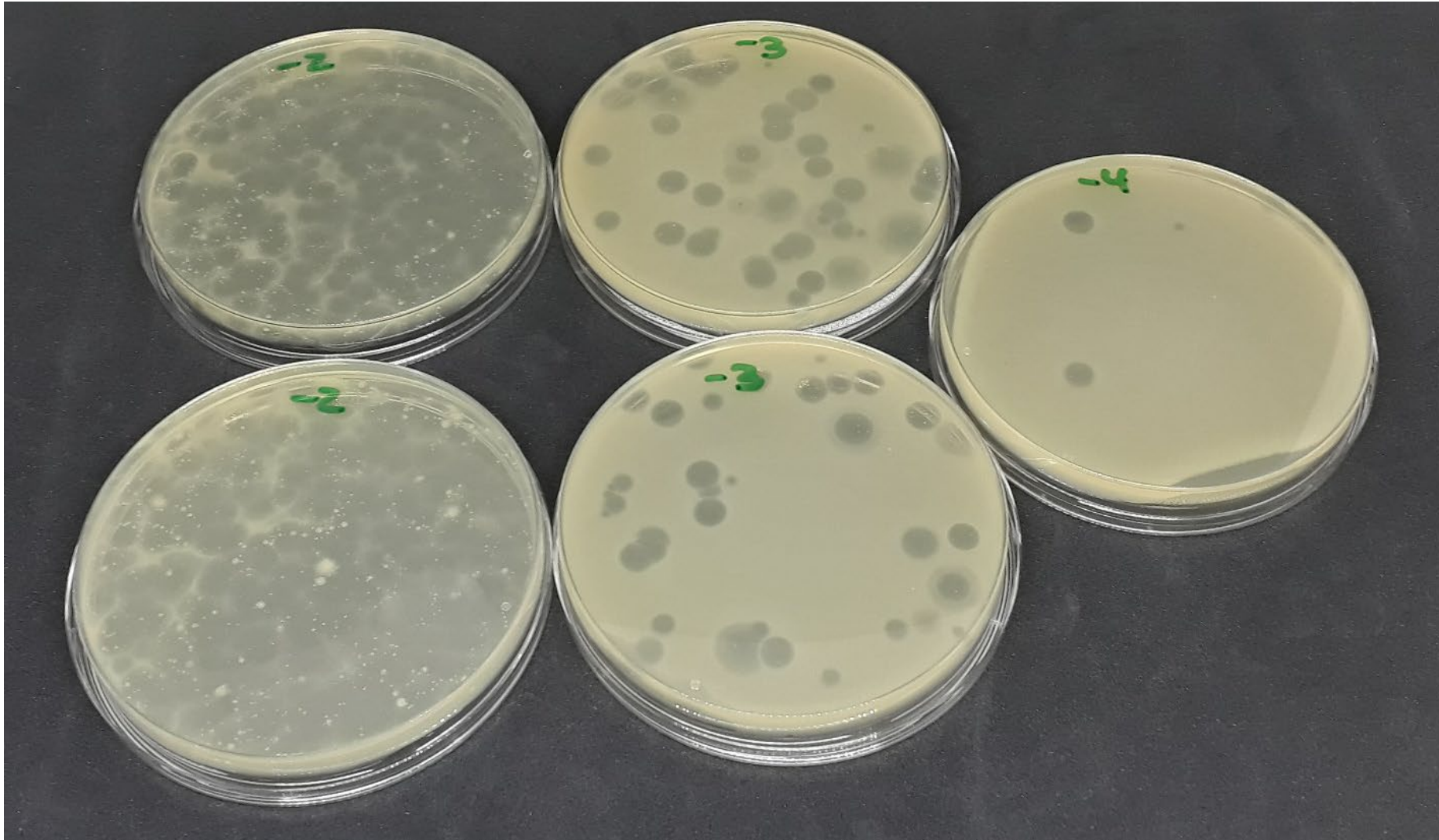
- ISO 10705-1: Detección y recuento de bacteriófagos F-ARN específicos
- **ISO 10705-2: Detección y recuento de colífagos somáticos**
- **ISO 10705-3: Concentración de muestra**
- ISO 10705-4: Enumeración de bacteriófagos de *Bacteroides fragilis*

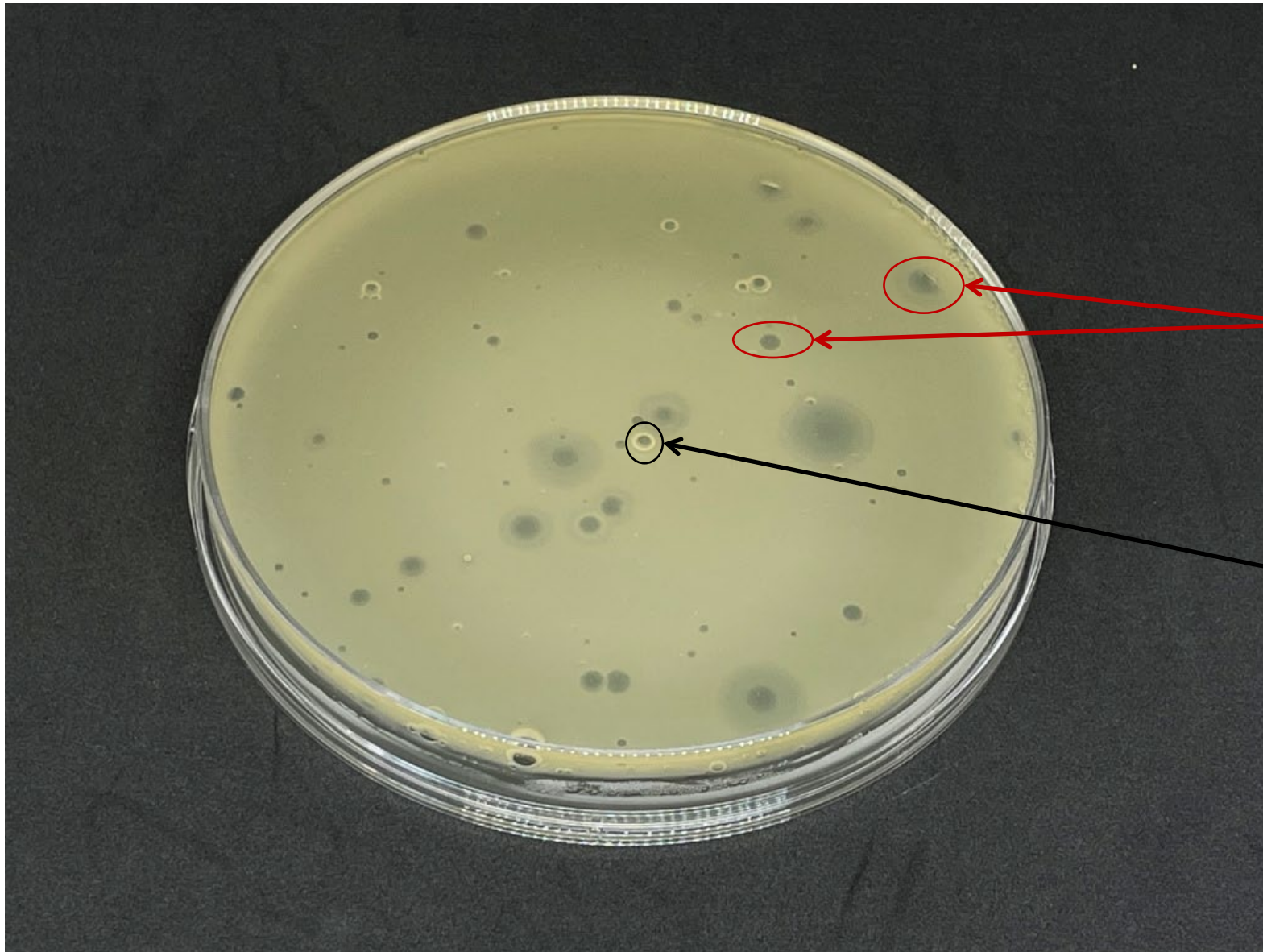


Calvas de diferentes tamaños y aspectos



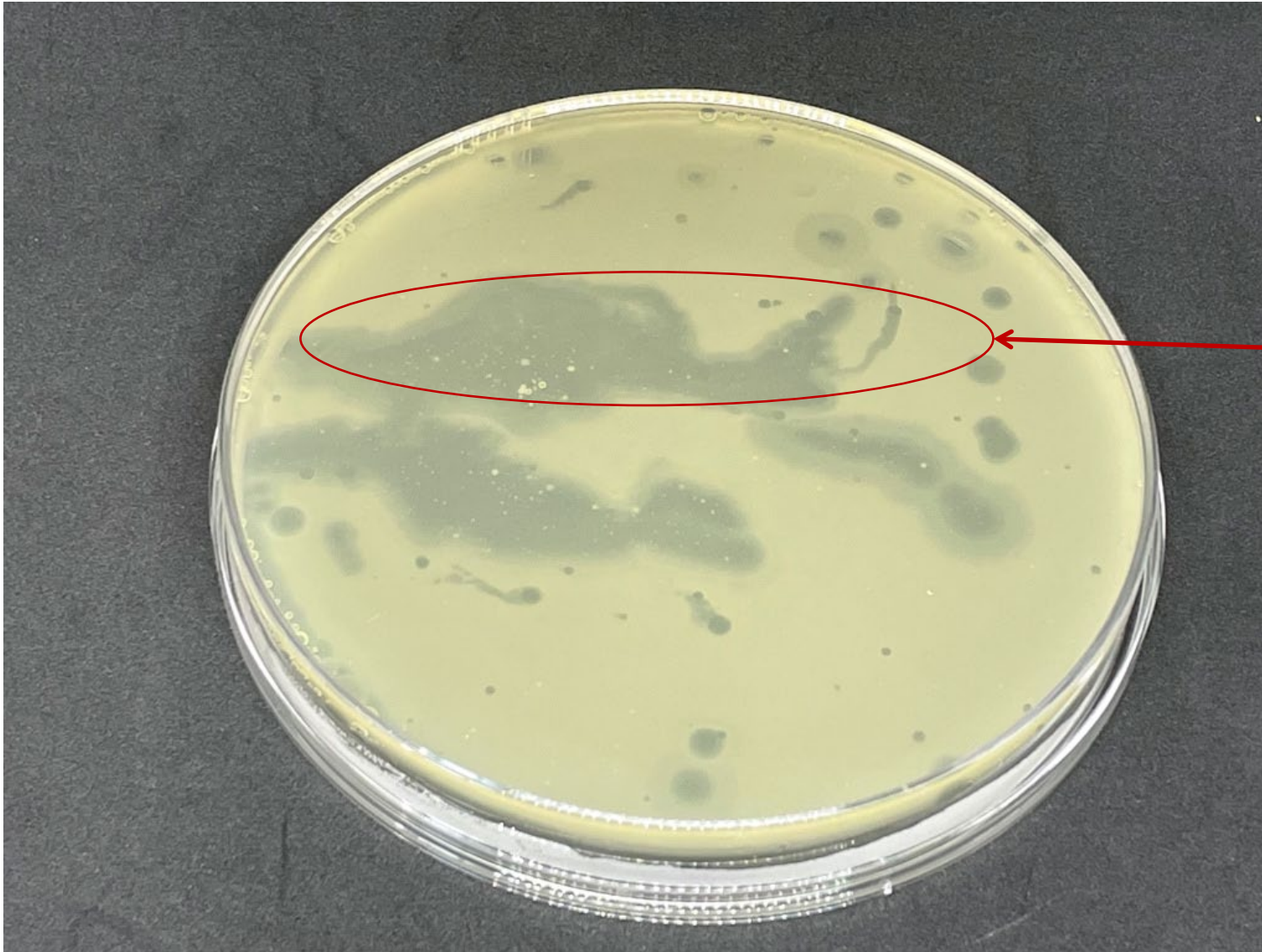




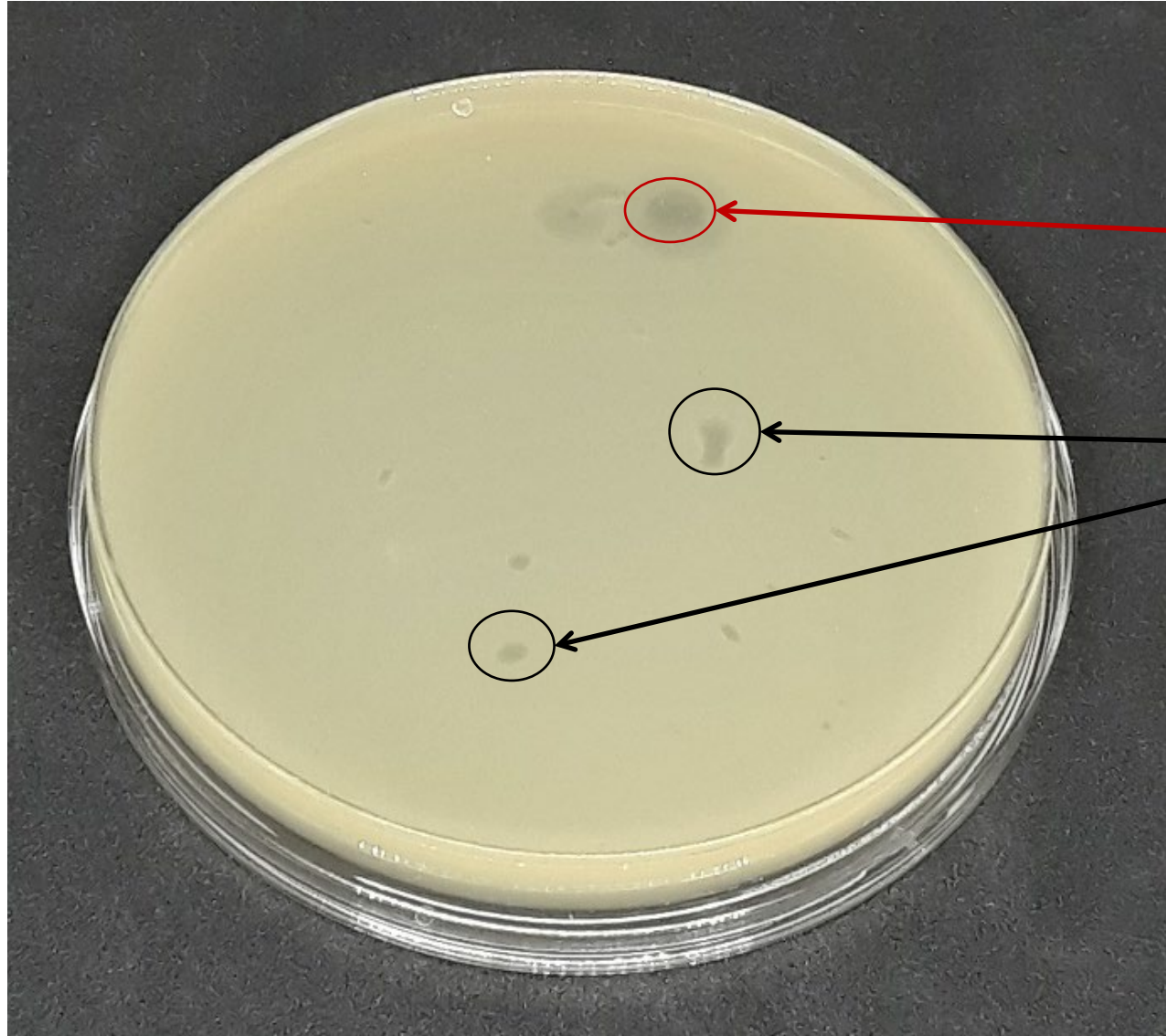


Calvas

Burbuja

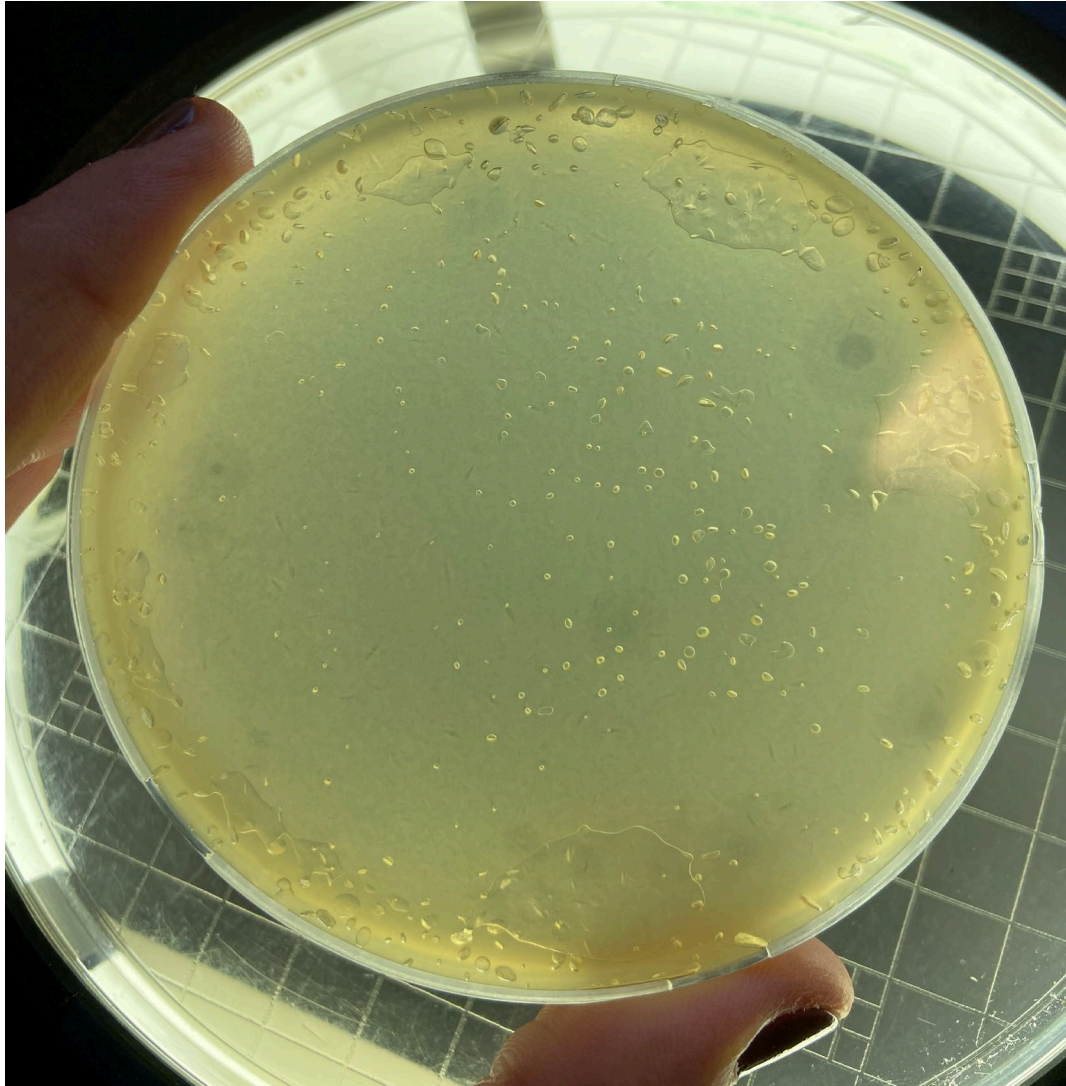


Calva movida



Calva

Grumo de agar



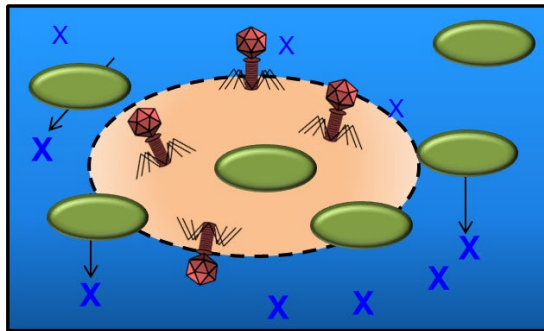
Burbujas de aire
producidas por el
espesor/grosor de la
capa de agar

Tecnología:

La **cepa huésped bacteriana patentada** para colifagos cambia el **color** del medio a **azul-verde** en presencia de virus infectivos

US Patent Granted US
9.932.645 B2 (April 3rd 2018)

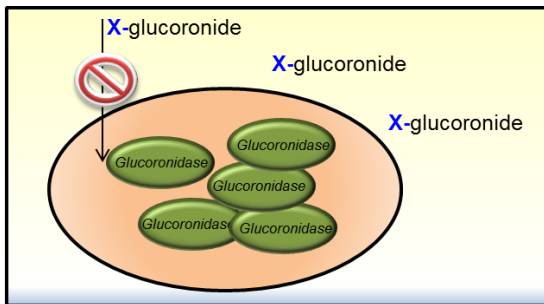
EPO 3068894
(April 17th, 2019)



→ **X se detecta**
generando **color azul**
que con el amarillo de
base cambia a verde



Color Azul-Verde
(Agua no segura)



→ **Sin Señal**



Color Amarillo
(Agua segura)

Medio de cultivo basado en la ISO (con x-glucurónico)



- Análisis de colifagos somáticos
- Agua potable
- Volumen muestra 100 mL
- Resultados: Ausencia / Presencia
- El cambio de color se observa en 6h de incubación

1. Preparing the sample



Prewarm the water sample at (35±2)°C. It is very important that the sample reaches this temperature before starting the analysis.

2. Preparing the host strain



Prewarm the Host Strain Vial at room temperature. Remove the seal from the cap and gently rotate it clockwise to release the host strain. Shake vigorously to resuspend the host strain and let it stand for 10 minutes, upside-down at room temperature.

3. Water sample



Measure 100 mL of the water sample. The 100 mL mark is just an orientation reference. Open the BP Testing Bottle and pour in the water sample.

4. Mixing the resuspended host strain and the sample



Open the Host Strain Vial and check that all the contents in the cap have been resuspended. Pour the host strain into the BP Testing Bottle. Close the bottle.

5. Starting the test. Resuspension of Bluephage Medium.



Rotate the BP Testing Bottle cap clockwise to make the Bluephage Medium fall inside the bottle. Shake gently to completely dissolve the Bluephage Medium in the water sample.

6. Running the test



Incubate the BP Testing Bottle at (35 ± 2)°C during 1 h. Then, transfer the BP Testing Bottle to an incubator at (30 ± 2)°C during 5 h more. Total incubation time is 6 h.

7. Reading the results



Read the test results after 6h. If the yellow colour is maintained (negative), it indicates absence of somatic coliphages. If colour changes to green-blue (positive), there is presence of somatic coliphages. The colour change always occurs before 6h if there is a presence of bacteriophages, even at very low concentrations (1 PFU / 100 mL). Do not extend the incubation and reading of tests beyond the time when the negative control presents a start of color change due to enter in the natural death phase of the culture. In case of confirmation of negative results, see Spot Test at Section 8.



- Análisis de colifagos somáticos
- Volumen muestra 100 mL
- Resultados en pfu/100mL
- El cambio de color se observa en 6h de incubación

1. Preparing the sample



Prewarm the water sample at 36±2°C. It is very important that the sample reaches this temperature before starting the analysis.

2. Preparing the host strain



Prewarm the Host Strain Vial at room temperature. Press the top of the cap to ensure the internal thread fits. Rotate it clockwise to break the seal and to release the host strain. Shake vigorously to resuspend the host strain and let it stand for 10 minutes upside-down at room temperature.

3. Water sample



Measure 100 mL of the water sample. The 100 mL mark is just an orientation reference. Open the BP Testing Bottle and pour in the water sample.

4. Mixing the resuspended host strain and the sample



Open the Host Strain Vial and check that all the contents in the cap have been resuspended. Pour the host strain into the BP Testing Bottle. Close the bottle.

5. Starting the test. Resuspension of Bluephage Medium and filling of ENUMERA® Testing Tray.



Rotate the BP Testing Bottle cap clockwise to make the Bluephage Medium fall inside the bottle. Shake gently to completely dissolve the Bluephage Medium in the water sample. Carefully, pour the contents of the BP Testing Bottle in the ENUMERA® Testing Tray.

6. Sealing the ENUMERA® Testing Tray



Prewarm the ENUMERA® Sealer. Put the ENUMERA® Testing Tray in the blue mould and, carefully, seal it.

7. Running the test



Place the ENUMERA® Testing Tray on a dark mat. Start the Bluephage App, follow the instructions and take the initial picture. Incubate the ENUMERA® Testing Tray at 36 ± 2°C during 1 h, placing the membrane side up to assure gas exchange. Then, transfer the ENUMERA® Testing Tray to an incubator at 30 ± 2°C during 5.5 h more. Total incubation time is 6.5 h.

8. Reading the results



Read the test results at the end of the incubation time (6.5 h). Place the ENUMERA® Testing Tray on a dark mat and start the Bluephage App. Follow the instructions and take the final picture. The result, in PFU/100 mL, will appear on your device screen.

If the yellow colour is maintained (negative) in all wells, it indicates absence of somatic coliphages. If colour changes to green-blue (positive) in any well, there is presence of somatic coliphages. The colour change always occurs before 6.5 h if there is a presence of bacteriophages, even at very low concentrations (1 PFU / 100 mL). Do not extend the incubation and reading of tests beyond the time when the negative control presents a start of colour change due to enter in the natural death phase of the culture.

Parameter	ISO	Bluephage EASY KIT	Bluephage RAPID KIT
Sensitivity	1 PFU/1mL	1 PFU/1mL 1 PFU/100mL	15 PFU/100mL
Ease to use	*	**	***
Applicability	Water, Food, Biosolids	Water, Food, Biosolids	Water, Food, Biosolids
Availability of strains	Not included	Included	Included
Preparation of material (h) (previous steps)	40-60	0	0
Preparation of inoculum culture (h)	3-4	2	0,16
Results time (h)	18-20h	18-20	6
Hours Technician	4	1	<0.5

*Not very easy **Easy ***Very easy



Depending on the Kit (volume analysed)



Eric Queralt
CEO and co-founder



Anicet Blanch
Scientific Advisor &
Co-founder



Núria Guilera
Commercial Director



Julia Martin
CDO



Miriam Pascual
CQO



Ariadna Jorba
Biotechnologist



Mireia Azuara
Press Officer



Contacto

Núria Guilera Grandes

Commercial Director

nguiler@bluephage.com

www.bluephage.com

DISTRIBUIDORES ACTUALES

