



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ADENOVIRUS COMO
INDICADORES DE CONTAMINACIÓN DEL RÍO SANTA CLARA,
CANTÓN RUMIÑAHUI”**

AUTORA: SARMIENTO ALVARADO, BERENICE CAROLINA

DIRECTOR: IZQUIERDO ROMERO, ANDRÉS RICARDO Ph. D.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ADENOVIRUS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN DEL RÍO SANTA CLARA, CANTÓN RUMIÑAHUI*” fue realizado por la señorita *Sarmiento Alvarado Berenice Carolina* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 3 de diciembre de 2019

Firma:

Andrés Ricardo Izquierdo Romero, Ph. D.

C. I. 1714479506



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Sarmiento Alvarado Berenice Carolina*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Identificación molecular de adenovirus como indicadores de contaminación del río Santa Clara, cantón Rumiñahui* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 3 de diciembre de 2019

Firma

Berenice Carolina Sarmiento Alvarado

C. I. 1726193038



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

*Yo, Sarmiento Alvarado Berenice Carolina autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Identificación molecular de adenovirus como indicadores de contaminación del río Santa Clara, cantón Rumiñahui** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

Sangolquí, 3 de diciembre de 2019

Firma

Berenice Carolina Sarmiento Alvarado

C. I. 1726193038

DEDICATORIA

A mis hermanas, Ali y Kami

A mis padres, Marta y Ricardo

Home is wherever I'm with you

Berenice Carolina Sarmiento Alvarado

AGRADECIMIENTO

A mi papi, por cada día lleno de felicidad y ocurrencias. A mi mami, por toda su dedicación y ayuda incondicional. Gracias por enseñarme a no rendirme jamás. A mis hermanas, por ser tan pacientes. Gracias por los consejos y las peleas. Los amo infinitamente, lo que soy es por ustedes.

A mis tíos, Imelda y Manuel, todas sus historias y consejos los llevo siempre en mi corazón.

A Pedro José, por ayudarme a ver todo más claro, por los momentos compartidos y por los que nos faltan.

A Alma Koch, por sembrar en mí el amor al laboratorio, a Andrés Izquierdo, por tanta confianza y a Renato Naranjo por enseñarme que siempre hay más de una protocolo para llegar a un resultado. Gracias por todas las oportunidades y lecciones a lo largo de estos años.

A mis amigos Auro y Andy, por los paseos y acampadas, por las cervezas y los cafés.

A mis amigos David, Andre, Luis David, Gatita y Elio, por compartir esta aventura llamada *Biotecnología*.

A todos los tesisistas y pasantes con los que he compartido grandes momentos en el laboratorio, he aprendido mucho de ustedes. Cami, eres la mejor.

A todos mis profesores a lo largo de la carrera.

Berenice Carolina Sarmiento Alvarado

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del Problema	1
1.2. Justificación del Problema	2
1.3. Objetivos de Investigación.....	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4

1.4. Marco Teórico	4
1.4.1. Contaminación de ríos por aguas residuales	4
1.4.2. Indicadores biológicos de calidad de agua.....	5
1.4.3. Microorganismos indicadores	5
1.4.4. Virus como bioindicadores	6
1.4.5. Indicadores fisicoquímicos de la calidad de agua	8
1.4.6. Problemas de salud relacionados a virus, en Ecuador.....	9
1.4.7. Adenovirus	10
1.5. Hipótesis.....	15
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Revisión Bibliográfica	16
2.2. Zona de estudio	16
2.3. Metodología	17
2.3.1. Toma de muestras de agua	17
2.3.2. Concentración de partículas virales	18
2.3.3. Siembra en placas Petrifilm™ 3M™	18
2.3.4. Análisis fisicoquímico del agua	19
2.3.5. Extracción de ADN viral.....	19
2.3.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	19
2.3.7. Electroforesis en gel de agarosa.....	21

2.3.8. Secuenciación Sanger y análisis bioinformático.....	21
2.3.9. Análisis Estadístico.....	22
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	23
3.1. Observación de los puntos de interés del río Santa Clara y recolección de las muestras de agua	23
3.2. Siembra en placas Petrifilm™	25
3.3. Análisis estadístico, ANOVA	29
3.4. Análisis fisicoquímico.....	31
3.5. Concentración de las partículas virales	31
3.6. Extracción de ADN	32
3.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis en gel de agarosa	32
3.8. Resultados de secuenciación Sanger y búsqueda de homólogos mediante BLAST	34
3.9. Construcción del árbol filogenético con los genes identificados	34
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	36
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	45
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	47
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Grupos taxonómicos de los virus entéricos humanos	6
Tabla 2: Límites de descarga de efluentes al alcantarillado y a un cuerpo de agua dulce	9
Tabla 3: Grupos y serotipos virales de los adenovirus humanos	11
Tabla 4: Enfermedades comúnmente producidas por adenovirus humanos	11
Tabla 5: Grupos y serotipos virales de los adenovirus porcinos	12
Tabla 6: Cebadores para la amplificación de fragmentos de una sección del gen de la proteína del hexón de la cápside de adenovirus humanos	20
Tabla 7: Cebadores para la amplificación de fragmentos de una sección del gen de la proteína del hexón de la cápside de adenovirus porcinos	20
Tabla 8: Condiciones de temperaturas y tiempos para la PCR de adenovirus humanos	20
Tabla 9: Condiciones de temperaturas y tiempos para la PCR de adenovirus porcinos	20
Tabla 10: Componentes de la PCR para una reacción de 25 μ L.....	21
Tabla 11 Comparación de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en P1 con los LMP para descarga en cuerpo de agua dulce (TULSMA).....	38
Tabla 12 Comparación de los valores obtenidos en cada punto de CF con los LMP de la normativa nacional.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del adenovirus. Fuente: (NPTEL, 2013).	10
Figura 2. Diagrama esquemático de la PCR anidada. Fuente: (ThermoFisher, 2016).....	14
Figura 3. Esquema del método de secuenciación Sanger. Fuente: (Nussbaum et al., 2008).	15
Figura 4. Ubicación geográfica del Río Santa Clara y de los puntos de muestreo. Fuente: Google Maps.....	17
Figura 5. Punto P1 de muestreo junto a la Hostería del Río	23
Figura 6. Insectos encontrados en la muestra de agua de P1.	24
Figura 7: Punto P2 de muestreo, ubicado en la parte posterior de la ESPE.	24
Figura 8. Punto P3 de muestreo, tramo final del río.	25
Figura 9. Gráfico de barras del número de Escherichia coli en los tres puntos del río.....	26
Figura 10. Gráfico de barras del número de CF en los tres puntos del río.....	27
Figura 11. Placas Petrifilm Escherichia coli de las tres muestras de agua.....	28
Figura 12. Placas Petrifilm coliformes de las tres muestras de agua.	29
Figura 13. Diagrama de caja del número de CF en cada punto de muestreo del río.....	30
Figura 14. Diagrama de caja del número de Escherichia coli en cada punto de muestreo	31
Figura 15. Concentrados virales del punto P1 del río	32
Figura 16. Electroforesis PCR para PAdV.....	33
Figura 17. Electroforesis PCR para HAdV.	33
Figura 18. Árbol filogenético para los adenovirus identificados.	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxi Ribonucleico

AdV: Adenovirus

AP: Análisis Preliminar

ARN: Ácido Ribonucleico

CF: Coliformes Fecales

DBO: Demanda Bioquímica De Oxígeno

DQO: Demanda Química De Oxígeno

FT: Fósforo Total

HAdV: Adenovirus humano

LMP: Límite Máximo Permisible

MAdV: Adenovirus Murino

NMP: Número Más Probable

NT: Nitrógeno Total

PAdV: Adenovirus Porcino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

SS: Sólidos Suspendidos

SST: Sólidos Suspendidos Totales

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

UV: Ultra Violeta

RESUMEN

La calidad del agua de los ríos se ha visto afectada por la descarga de aguas residuales y la falta de plantas de tratamiento. Entre los contaminantes se encuentran altas cargas de materia orgánica y microorganismos de origen fecal que pueden representar un riesgo a la salud humana y animal. El río Santa Clara atraviesa el Valle de los Chillos en el cantón Rumiñahui, y con otros cuatro ríos, soporta las descargas domésticas de sus habitantes, acumulación de basura, maleza y desechos. El objetivo de la investigación es evaluar el contenido de adenovirus (AdV) como indicadores de contaminación. Se realizaron cuatro muestreos de agua en tres puntos del río Santa Clara y se emplearon técnicas moleculares y bioinformáticas para identificar los AdV a nivel de especie. Se determinó la existencia de AdV humanos, serotipos 41 y 31 relacionados a enfermedades diarreicas; AdV porcino 5, relacionado a enfermedades gastrointestinales y respiratorias; y AdV murino 2, que puede ser asintomático. Todos los virus descritos se transmiten vía fecal-oral. También se realizaron pruebas fisicoquímicas como demanda química y bioquímica de oxígeno; y microbiológicas, como conteo de coliformes fecales. Con los resultados obtenidos se confirmó la polución del río Santa Clara. La identificación de cuatro especies de adenovirus indicó contaminación fecal por heces humanas y animales.

PALABRAS CLAVE:

- **Virus entéricos**
- **Coliformes fecales**
- **Aguas residuales**
- **Serotipos virales**

ABSTRACT

In rivers, the water quality has been affected by the discharge of wastewater and the lack of treatment plants. Contaminants include high organic loads and fecal microorganisms that may be a risk to human and animal health. Santa Clara River crosses Valley of the Chillos in Rumiñahui canton, like four other rivers, supporting domestic discharges of its inhabitants, accumulation of garbage, weeds and waste. The objective of the investigation is to evaluate the content of adenovirus (AdV) as indicators of contamination. Four samples of water from Santa Clara River were carried out and molecular and bioinformatics techniques were used to identify AdVs at the species level. The existence of human AdV, serotypes 41 and 31 related to diarrheal diseases was determined; Porcine AdV 5, associated to gastrointestinal and respiratory diseases; and murine AdV 2, which can be asymptomatic. All these viruses are transmitted via fecal-oral route. Physicochemical tests such as chemical and biochemical oxygen demand were also performed; and microbiological, such as fecal coliform count. With the results obtained, the pollution of the Santa Clara River was confirmed. The identification of four adenovirus species indicated fecal contamination by human and animal feces.

KEYWORDS:

- **Enteric virus**
- **Fecal coliform**
- **Wastewater**
- **Viral serotypes**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

Los virus son componentes dominantes en los ecosistemas acuáticos, juegan un papel importante en las redes alimentarias microbianas y en los ciclos biogeoquímicos y ecológicos (Jacquet et al., 2010). Sin embargo, pueden considerarse contaminantes ambientales al ser agentes causales de enfermedades humanas y animales (Slováčková, 2008).

En países industrializados como Reino Unido, EE. UU. y España, se ha determinado la prevalencia de los virus infecciosos en el medio ambiente debido a la descarga de aguas residuales en fuentes de agua dulce, fugas en los sistemas sépticos y escorrentías agrícolas y urbanas (Fong & Lipp, 2005; Bofill-Mass et al., 2005; Calgua et al., 2013).

Más de un millón de partículas virales infecciosas son excretadas por cada gramo de heces humanas y animales; al llegar a los cuerpos de agua se diluyen hasta una concentración aproximada de 100 000 partículas por litro (OMS, 1979; Pina et al., 1998). Son la causa principal de morbilidad y mortalidad en enfermedades transmitidas por medio del agua, han logrado producir brotes y grandes impactos económicos sin importar el nivel de desarrollo de los países (De Giglio et al., 2017; Ríos, Agudelo, & Gutiérrez, 2017).

Los adenovirus, por ejemplo, han sido responsables de enfermedades gastrointestinales, respiratorias, oftalmológicas, entre otras (M. Jones et al., 2007). Son de amplia distribución, se encuentran ubicuamente en ambientes contaminados con aguas residuales. Han sido propuestos y utilizados como indicadores de contaminación fecal debido a su estabilidad y prevalencia a lo largo del año (Maluquer et al., 2004; Girones & Bofill-Mass, 2013; Olalemi et al., 2016; Rames et al., 2016; Sun et al., 2016; Jones & Muehlhauser, 2017).

1.2. Justificación del Problema

La falta de plantas de tratamiento de aguas residuales ocasiona el vertimiento de aguas contaminadas en ríos (Terneus & Yanez, 2018), constituyendo la mayor fuente de materia fecal en agua (Calgua et al., 2013).

El río Santa Clara atraviesa el Valle de los Chillos, en el Cantón Rumiñahui, se une al San Pedro y desembocan en el reservorio La Bocatoma. El olor emanado es insoportable según los habitantes del sector y causa malestar a los estudiantes del Liceo Naval, la Academia Militar del Valle y el Colegio Geovanny Farina. Los moradores han observado la acumulación de maleza, basura, carroña, lodo podrido y otro tipo de residuos a lo largo de la rivera; además, el cantón no cuenta con un camal, y los desechos de la ganadería terminan generalmente en los cuerpos de agua (La Hora, 2019).

Las bacterias han sido utilizadas como indicadores fecales; por ejemplo, coliformes, enterococos y *Escherichia coli*, encontradas comúnmente en el tracto gastrointestinal de los mamíferos (Ahmed, Goonetilleke, & Gardner, 2010).

La detección de *E. coli* no es útil para predecir la existencia de patógenos bacterianos (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp.) virales (norovirus) ni protozoos (*Giardia* spp.) según estudios estadísticos de correlación (Spearman). Al comparar su presencia con la de marcadores específicos de contaminación fecal humana (poliomavirus humano, HF183), tampoco se determinó una correlación significativa (regresión logística binaria). Entre las posibles causas de la discordancia de resultados, los investigadores sugieren la diferencia en el volumen de muestra necesaria para cada análisis, la cinética de supervivencia y la susceptibilidad ambiental de cada microorganismo (Hörman et al., 2004; McQuaig et al., 2006; Ahmed et al., 2010; Healy et al., 2016).

Los virus entéricos son especie-específicos, permitiendo realizar estudios de rastreo de fuentes de contaminación fecal (Wong, 2012). Se ha determinado que las variaciones en el ADN de *E. coli* pueden correlacionarse con un huésped particular y mediante análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) también se puede identificar el animal en el cual ha habitado últimamente (Zhi et al., 2015).

Los SNPs varían en función de las condiciones gastrointestinales propias del animal (dieta, metabolitos fisiológicos, pH), si la *E. coli* cambia de huésped puede adaptarse y sobrevivir. Además, es necesario tener un cultivo puro de la bacteria para realizar los análisis moleculares (Zhi et al., 2015; Lupolova et al., 2017). En contraste, la mayoría de virus entéricos son incapaces de adaptarse a otros hospederos, una vez excretados al ambiente mantendrán su especificidad y su identificación es independiente de cultivo (Hundesá et al, 2006; Wong et al., 2012).

La identificación de especies de adenovirus permitirá conocer si el río Santa Clara presenta contaminación fecal, para comprobarlo, se utilizarán otros indicadores como el crecimiento de *E. coli* y coliformes fecales en Petrifilm. También se cuantificarán los valores de demanda química de oxígeno (DBO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), nitrógeno total (NT), fósforo total (FT) y sólidos suspendidos totales (SST), con la finalidad de compararlos con los establecidos en la norma nacional (TULSMA, 2015).

1.3. Objetivos de Investigación

1.3.1. Objetivo General

Identificar, mediante técnicas moleculares, adenovirus como indicadores de contaminación del río Santa Clara, cantón Rumiñahui.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Concentrar virus a partir de muestras de agua del río Santa Clara.
- Determinar la presencia de adenovirus humanos y porcinos mediante PCR anidada y electroforesis en gel de agarosa.
- Identificar los virus encontrados mediante secuenciación Sanger.
- Confirmar la contaminación del río mediante parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Contaminación de ríos por aguas residuales

La materia orgánica de las aguas residuales domésticas puede ser degradada por microorganismos como algas y bacterias, pues les provee de nutrientes necesarios (González et al., 2018); sin embargo, al almacenar el agua en tanques de recolección y alcantarillas, donde el oxígeno es limitado, se dan condiciones propicias para la proliferación de agentes patógenos como *Clostridium* spp. y *Shigella* spp. (Cyprowski et al., 2018). Debido al crecimiento de las ciudades, la urbanización y la industrialización, los sistemas de alcantarillado son insuficientes y las aguas servidas no tratadas o tratadas parcialmente, se descargan en los ríos (Paz, 1971; Terneus & Yanez, 2018).

El sistema de alcantarillado de nuestro país no llega a todos sus habitantes, a 2001, solo el 57% de viviendas urbanas y el 36% de rurales contaban con excusados conectados al alcantarillado. En las zonas rurales dispersas casi la totalidad de su población bota sus residuos a las calles, quebradas o ríos, los queman o los entierran. Para el mismo año, la provincia de Pichincha contaba con el mayor porcentaje de hogares conectados a alcantarillado en el país, aun así, solo llegaba al 65.3% (Organización Panamericana de la Salud, 2001).

En 2002 el río Guayas constituía la mayor fuente de contaminación del Golfo de Guayaquil, aportando una cantidad equivalente al 75% de todas las descargas de aguas residuales e industriales del litoral. En Esmeraldas, el río Teatone recibía, aproximadamente, tres millones de metros cúbicos de aguas residuales por año (Escobar, 2002).

La mala disposición de desechos y el estancamiento del agua por ausencia o deficiencia de sistemas de drenaje de aguas negras han provocado el contagio de enfermedades gastrointestinales asociadas a virus y bacterias en Ecuador y otros países (Gutierrez & Jimenez, 2005).

1.4.2. Indicadores biológicos de calidad de agua

Aunque la información biológica no reemplaza las pruebas físicas y químicas utilizadas para definir la calidad del agua, algunos autores consideran importantes y ventajosos a los métodos biológicos respecto al nivel integrativo y bajo costo (De La Lanza, Hernández, & Carbajal, 2000). Los bioindicadores son organismos puntuales y selectos presentes en situaciones de estrés ambiental, pueden evaluar y predecir los efectos de las modificaciones ambientales (Hahn-vonHessberg, *et al.*, 2009).

El número potencial de bioindicadores es infinito y seleccionar el mejor no es sencillo, se debe identificar el apropiado para satisfacer un propósito particular; además, no solo sirven para medir la salud de un sistema acuático sino también para determinar el impacto potencial de las actividades humanas (De La Lanza et al., 2000).

1.4.3. Microorganismos indicadores

Para considerar un microorganismo como indicador de contaminación del agua, debe cumplir algunos requisitos, entre estos (García et al., 2006):

- Presencia en heces fecales, aguas residuales y aguas de desecho.

- Ausencia en aguas no contaminadas.
- Supervivencia en agua y resistencia a factores de depuración, similares a los patógenos.
- Detección por métodos simples, rápidos, baratos y seguros.
- Ser o no patógenos.
- Capacidad de crecer y proliferar en el agua.

1.4.4. Virus como bioindicadores

Utilizar virus como indicadores tiene sus ventajas, en ciertas circunstancias, su conservación en agua es mayor a la de las bacterias; por ejemplo, muchos virus entéricos son más resistentes a desinfectantes y otras sustancias nocivas del medio acuático (Fong & Lipp, 2005; Jiang, 2006). Además, las bacterias son más sensibles a la inactivación por luz solar, no siempre son exclusivas a la fuente fecal de donde provienen ni tienen correlación con la cantidad de patógenos existentes (Hörman et al., 2004; McQuaig et al., 2006; Ahmed et al., 2010; Girones & Bofill-Mass, 2013; Zhi et al., 2015).

Los cuerpos de agua albergan gran cantidad de virus que pueden infectar a una variedad de plantas, animales acuáticos y terrestres; cuando el agua está contaminada con desechos fecales, contiene virus entéricos provenientes del tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente, estos virus patógenos pertenecen a varios grupos taxonómicos (Tabla 1) y son diferentes en cuanto a su morfología y genética (National Research Council, 2004).

Tabla 1:
Grupos taxonómicos de los virus entéricos humanos

Grupo	Ejemplos
ARN simple cadena	Enterovirus, calcivirus, astrovirus, coronavirus, hepatitis A y E
ARN doble cadena segmentado	Reovirus y rotavirus
ARN doble cadena	Picobirnavirus
ADN simple cadena	Parvovirus

CONTINÚA

ADN doble cadena	Adenovirus
------------------	------------

Fuente: (National Research Council, 2004)

Los bacteriófagos, al ser parásitos de bacterias, fueron los primeros utilizados como indicadores para determinar la presencia de *Escherichia coli* (colífagos somáticos y colífagos de ARN F-específicos) (García et al., 2006). Si un virus es encontrado en niveles sustanciales en heces fecales, debe evaluarse si resulta confiable como indicador, con esta finalidad se recolectan varias muestras de agua y se determina su persistencia, si luego del ensayo, se encuentra en todas las muestras, se concluye factible su uso (Ahmed-Hamza, et al., 2011).

Los adenovirus (AdV) se han empleado para caracterizar la contaminación relacionada con las prácticas humanas (Pina et al., 1998). Son resistentes a la luz UV; si sufren algún daño utilizan los mecanismos de reparación propios del hospedero para arreglar su ADN, pueden usarse para distinguir la contaminación humana de la animal, tienen una asociación prevalente con las aguas residuales y resisten también a algunos de los procesos de tratamiento (Jiang, 2006).

Debido a las características de los AdV, en 2006 ya se los consideraba como un indicador conservador para evaluar la calidad del agua en EE. UU. (Jiang, 2006). Los primeros ensayos realizados fueron cualitativos y utilizaron PCR anidada (Puig et al., 1994; Maluquer et al., 2004; Hundesa et al., 2006), pero con el tiempo, se desarrollaron técnicas cuantitativas mediante qPCR (Ahmed et al., 2010; Calgua et al., 2013; Bofill-Mas et al., 2013).

Los adenovirus humanos son un eficaz indicador viral de polución debido a su estabilidad, persistencia y amplia distribución en matrices de agua, aguas residuales e incluso, agua potable contaminada. Han sido detectados continuamente, tienen alta resistencia a la desinfección UV y son abundantes en comparación con otros virus entéricos; además, existe disponibilidad de

técnicas moleculares para su detección (en comparación con virus de RNA); y es específico a contaminación fecal humana (Pina et al., 1998; Jiang, 2006; Girones & Bofill-Mass, 2013; Rames, et al., 2016).

Los adenovirus porcinos también han sido considerados como bioindicadores, varios estudios han determinado que se distribuyen ampliamente en la población porcina como en aguas residuales y lodos de mataderos, pero no se encuentran en áreas sin actividades agrícolas; aunque no producen enfermedades severas, son útiles para determinar contaminación en agua (Maluquer et al., 2004; Hundesa et al., 2006; Bofill-Mas et al., 2013).

1.4.5. Indicadores fisicoquímicos de la calidad de agua

Entre los parámetros de control de la calidad del agua, se encuentran demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos totales en suspensión (SST), nutrientes, compuestos nitrogenados y fosforados (López & Martín, 2017). La DQO representa la cantidad de oxígeno necesario para oxidar químicamente las sustancias orgánicas presentes, y la DBO es la cantidad de oxígeno requerido por los microorganismos aclimatados, para degradar biológicamente la materia orgánica (Henry & Heinke, 1999).

Los SST consideran a las partículas flotantes del agua y pueden proceder de restos animales, vegetales, basura, arenas, arcillas, entre otros; los compuestos nitrogenados tienen su origen en moléculas orgánicas y organismos vegetales. El fósforo deriva de detergentes domésticos, aguas agrícolas y excreciones humanas (López & Martín, 2017).

La normativa nacional, Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA), Libro VI, Anexo 1, Recurso Agua establece, entre otras cosas, límites permisibles para la descarga de aguas residuales en cuerpos de agua y sistemas de alcantarillado;

entre los parámetros que considera esta normativa, se encuentran; DBO, DQO, SST, nitrógeno y fósforo total (TULSMA, 2015), los valores se describen en la Tabla 2.

Tabla 2:

Límites de descarga de efluentes al alcantarillado y a un cuerpo de agua dulce

Parámetro	Límites de descarga al alcantarillado público, mg/L	Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce, mg/L
DBO5	250	100
DQO	500	250
SST	220	100
Nitrógeno total	40	15
Fósforo total	15	10

Fuente: (TULSMA, 2015)

La normativa también contiene criterios de calidad de agua para la preservación de flora y fauna, equivalentes a los parámetros de un río sin contaminación. Entre estos, establece que el número de coliformes fecales no debe sobrepasar los 200 NMP/100 mL, pero no considera valores de DBO, DQO, SST, nitrógeno total ni fósforo total (TULSMA, 2015).

1.4.6. Problemas de salud relacionados a virus, en Ecuador

En niños de hasta cinco años de edad, la diarrea transmitida por agua es responsable del 6% de muertes, de las cuales, el 41% es producida por rotavirus, causando más de 1 000 muertes anuales, aproximadamente 53 000 hospitalizaciones, 60 000 consultas externas y 147 500 casos de diarrea en casa, con un costo de cinco millones de dólares al país (Puruncajas, 2015). Aunque a nivel mundial, los adenovirus entéricos constituyen la segunda causa de diarrea viral en niños (Romero, 2007), su incidencia no ha sido investigada en Ecuador. De forma general, más de 100 tipos de virus entéricos pueden encontrarse en ambientes acuáticos debido a la contaminación fecal, e ingresan al organismo por vía oral (Ahmed et al., 2010).

Los adenovirus también producen infecciones oftalmológicas (serotipos 8, 19 y 37) (Romero, 2017), que tampoco han sido estudiados aunque produzcan epidemias como la de Guayaquil, con 5 343 casos de conjuntivitis a inicios del 2018 (Sanitaria, 2018).

Un estudio reciente realizado por el INSPI (Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública del Ecuador) determinó que el 0.6% de casos de infecciones respiratorias virales son consecuencia de adenovirus (no especifica serotipo) con un riesgo de muerte de 4.7%, después de analizar 41 172 muestras de hisopos nasales de pacientes de todas las edades (Caini et al., 2019).

1.4.7. Adenovirus

El término *adenovirus* fue acuñado en 1956 por John Enders para denominar a aquellos virus responsables de infecciones respiratorias y en la mucosa ocular (Enders et al., 1956). Fueron observados en 1953 por primera vez, cuando los investigadores buscaban el agente causal del catarro común (Romero, 2007). Se distribuyen mundialmente y son ubicuos en lugares con heces fecales, por lo tanto, son comúnmente transmitidos por vía fecal-oral al ser ingeridos por agua o alimentos contaminados (Olalemi et al., 2016), por contacto directo, objetos, instrumentos quirúrgicos, y por contacto con mucosas en agua de piscinas (Romero, 2007).

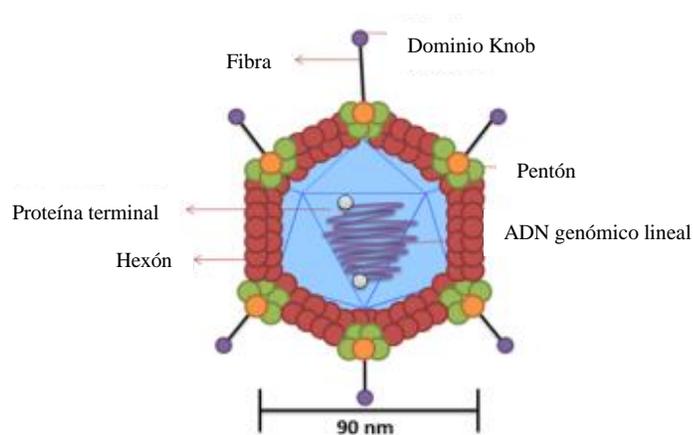


Figura 1. Representación esquemática del adenovirus. Fuente: (NPTEL, 2013).

Pertenecen a la familia Adenoviridae, comprendida por cinco géneros responsables de infecciones en un amplio espectro de vertebrados (Jiang, 2006). Son virus icosaédricos no envueltos, poseen una cadena doble de ADN lineal con peso molecular de aproximadamente $20\text{-}30 \times 10^6$ daltons (Shinagawa, *et al.*, 1983). Tienen un diámetro de 70-90 nanómetros, su cápside está compuesta por 252 capsómeros de los cuales 240 forman hexones y 12 forman pentones (*Figura 1*) (Romero, 2007). Ambos son proteínas estructurales, siendo los hexones los más grandes y abundantes (Rux, Kuser, & Burnett, 2003).

1.4.7.1. Adenovirus humanos

Los adenovirus humanos (HAdV) forman parte del género *Mastadenovirus*, comprenden 57 serotipos, clasificados en siete grupos (A – G) con base en sus criterios bioquímicos, biofísicos, inmunotípicos y moleculares (Romero, 2007; M. Jones et al., 2007; Iaconelli et al., 2017). En la Tabla 3, se detallan los grupos y los serotipos correspondientes y en la Tabla 4, se encuentran los serotipos virales y las infecciones producidas comúnmente.

Tabla 3:

Grupos y serotipos virales de los adenovirus humanos

Grupo	Serotipo
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55
C	1, 2, 5, 6, 57
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56
E	4
F	40, 41
G	52

Fuente: (Romero, 2007; M. Jones et al., 2007; Iaconelli et al., 2017)

Tabla 4:

Enfermedades comúnmente producidas por adenovirus humanos

Infección / Enfermedad	Grupos	Serotipos
Gastroenteritis	F	40, 41
Faringitis febril aguda	B y C	1-3, 5-7

CONTINÚA

Fiebre faringoconjuntival	B	3, 7, 14
Enfermedad respiratoria aguda	B y E	3, 4, 7, 14, 21
Neumonía	B, C y E	1-4, 7
Queratoconjuntivitis	B y D	8, 11, 19, 37
Síndrome similar a la tos ferina	C	5
Cistitis hemorrágica aguda	B	11, 21
Meningoencefalitis	A, B, y D	7, 12, 32
Hepatitis	C	1, 2, 5

Fuente: (M. Jones et al., 2007)

Entre los virus entéricos encontrados en agua, los adenovirus humanos son los más abundantes, sin embargo, la diversidad de serotipos no se encuentra suficientemente documentada; los HAdV-40 y 41 son los más comunes (Ogorzaly et al., 2015). Los métodos usados para su detección son moleculares (PCR, PCR en tiempo real, secuenciación) e inmunológicos (inhibición de la hemoaglutinación) (Allard, Albinsson, & Wadell, 2001).

1.4.7.2. Adenovirus porcinos

Los adenovirus porcinos (PAdV) fueron aislados por primera vez a partir de muestras rectales de lechones con diarrea (Haig, Clarke, & Pereira, 1964). También forman parte del género *Mastadenovirus* y contiene cinco serotipos virales agrupados en tres grupos (Tabla 5). Infectan a poblaciones porcinas de todo el mundo; usualmente no causan enfermedades graves pero pueden manifestarse con diarreas e infecciones respiratorias en lechones (Maluquer et al., 2004). Al llegar a la adultez los puercos desarrollan anticuerpos de inmunidad (Jerman et al., 2014).

Tabla 5:
Grupos y serotipos virales de los adenovirus porcinos

Grupo	Serotipo	Característica
A	1-3	Estrechamente relacionados entre sí. Causa enfermedades no específicas
B	4	Asociado a enfermedades neurológicas

CONTINÚA

C	5	Poco relacionado con los del grupo A
---	---	--------------------------------------

Fuente: (Benkő, 2015)

1.4.7.3. Técnicas moleculares de detección viral

La detección de virus no reproducibles en cultivos celulares o pobremente replicables se ha visto facilitada por el desarrollo de métodos basados en ácidos nucleicos; la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo, ha demostrado ser sensible, específica y rápida (Pina et al., 1998; Maluquer et al., 2004; Hundesa et al., 2006). El continuo diseño de sistemas de cebadores para la detección de adenovirus, por al menos 20 años, ha permitido su uso exhaustivo hasta la actualidad (Allard et al., 2001; De Giglio et al., 2017; Iaconelli et al., 2017).

1.4.7.4. PCR anidada

La PCR anidada es una modificación de la PCR convencional, sirve para aumentar la sensibilidad del ensayo y consiste en realizar dos amplificaciones sucesivas utilizando dos pares de cebadores, dirigidos hacia la misma diana (Winn et al., 2008). En la primera reacción se emplea un par de cebadores responsables de amplificar un fragmento concreto del ADN de interés, a continuación se toma una pequeña muestra del ADN recién amplificado como ADN molde para realizar la segunda PCR, para la cual se usa otro par de cebadores complementarios a secuencias internas del producto de la primera PCR (Figura 2) (Morcillo, Cortés, & García, 2013).

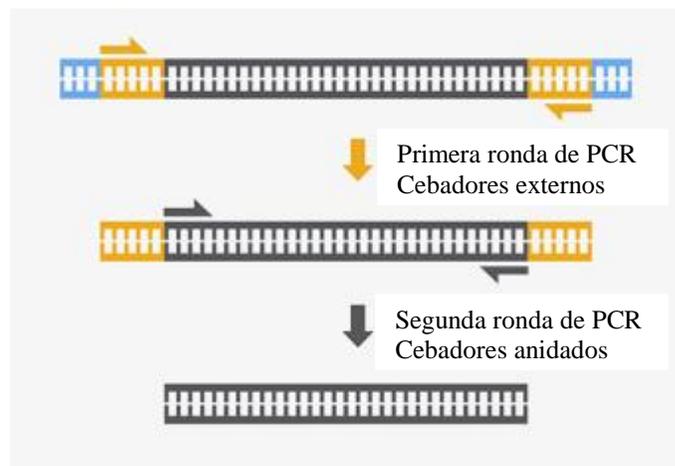


Figura 2. Diagrama esquemático de la PCR anidada.
Fuente: (ThermoFisher, 2016)

El mayor problema de esta técnica es la contaminación, pues el procedimiento requiere manipulaciones abiertas del primer amplificado, siendo muy susceptible a formar aerosoles inadvertidos y contaminar otra reacción; pudiendo disminuir la sensibilidad del ensayo (Winn et al., 2008; Forbes, et al., 2009).

1.4.7.5. Cebadores degenerados para la identificación de adenovirus

Tanto para la identificación de adenovirus humanos como de porcinos, se utiliza la secuencia conservada del gen de la proteína del hexón de la cápside (Figura 1), se han diseñado pares de cebadores degenerados cuyas modificaciones aumentan la homología con las secuencias de nucleótidos de interés (Allard et al., 2001; Maluquer et al., 2004; Hundesa et al., 2006).

1.4.7.6. Secuenciación Sanger

También denominada secuenciación por terminación, la secuenciación Sanger funciona mediante la incorporación de dideoxi nucleótidos (ddA, ddC, ddG y ddT) en una hebra creciente de ADN, estos carecen de grupo hidroxilo en 3', impidiendo que la enzima polimerasa de ADN se una a la siguiente base complementaria al ADN molde e interrumpiendo la cadena en

formación (Winn et al., 2008). Se obtiene, por lo tanto, una serie de fragmentos de ADN tan numerosos como los nucleótidos de la hebra, estos fragmentos se separan según su tamaño mediante electroforesis y el dideoxi nucleótido responsable de la terminación es identificado a través de una molécula concreta de colorante fluorescente (Figura 3) (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2008).

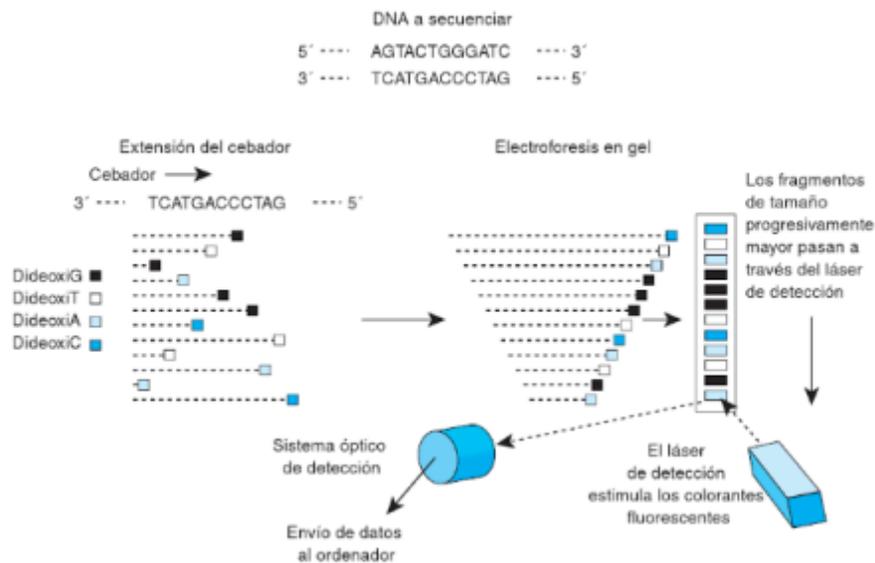


Figura 3. Esquema del método de secuenciación Sanger.
Fuente: (Nussbaum et al., 2008).

1.5. Hipótesis

El río Santa Clara se encuentra contaminado, por lo tanto, contiene adenovirus (humanos y animales), coliformes fecales (*E. coli*), altas concentraciones de demanda química y biológica de oxígeno (DBO y DQO), y de nutrientes (nitrógeno y fósforo), según la norma TULSMA (2015) y parámetros internacionales de calidad de agua de ríos.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Revisión Bibliográfica

Para la revisión bibliográfica se utilizaron las bases de datos PubMed, del NCBI y Google Scholar. Primero se estudió el estado del arte sobre la contaminación de ríos por aguas residuales, bioindicadores de la calidad del agua, presencia de virus en aguas contaminadas y la problemática del país respecto a las enfermedades virales. Se buscó información sobre la detección de adenovirus humanos y porcinos mediante técnicas moleculares y las secuencias de los cebadores a usar en la PCR anidada. También se investigaron metodologías para la concentración viral a partir de agua.

2.2. Zona de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT), Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicado en Sangolquí en la Av. El Progreso s/n, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador a $0^{\circ}18'53''S$ y $78^{\circ}26'36''O$.

Las muestras se obtuvieron del agua del río Santa Clara, en tres puntos, junto a la Hostería del Río, $0^{\circ}20'04.0''S$ y $78^{\circ}26'16.6''O$ (P1); en la parte posterior de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, $0^{\circ}19'06.6''S$ y $78^{\circ}26'54''O$ (Bulevar Santa Clara, P2) y antes de unirse con el río San Pedro, $0^{\circ}18'12.4''S$ y $78^{\circ}27'25.2''O$ (P3) cerca del reservorio La Bocatoma (P4). En la Figura 4 pueden observar los puntos representativos del río.



Figura 4. Ubicación geográfica del Río Santa Clara y de los puntos de muestreo.

Fuente: Google Maps.

2.3. Metodología

2.3.1. Toma de muestras de agua

El muestreo se realizó según lo establecido por Calgua y colaboradores (2013), en su estudio sobre virus entéricos en agua de ríos de Barcelona y Río de Janeiro.

Las cuatro muestras de agua se tomaron entre las 8h45 y las 9h00, desde puentes ubicados sobre el río en los diferentes puntos de muestreo (P1, P2 y P3). Con ayuda de una cuerda, se bajó un balde de 6 L de capacidad con el objetivo de ir tomando pequeñas cantidades de agua (2.5-3L) hasta completar los 11 L de agua necesarios en un balde de 12 L.

Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Microbiología Ambiental para ser procesadas. Se separó 1 L de muestra de agua del volumen final, en una botella para el análisis físicoquímico en el laboratorio LABANNCY, Quito.

Antes de procesar las muestras, se dejó el agua en reposo para precipitar los residuos (partículas vegetales, arena y tierra) y evitar su interferencia en la concentración de partículas virales.

Para el análisis preliminar (AP) y estandarización de la PCR, se tomó una muestra de agua del punto P2. Para los análisis completos se tomaron muestras de los puntos P1, P2 y P3.

2.3.2. Concentración de partículas virales

La floculación de las partículas virales se realizó mediante la metodología descrita por Calgua y colaboradores (2013). Inicialmente, se dejaron precipitar las partículas vegetales, arena y tierra, y se transfirió el agua limpia a otro balde. A cada muestra de agua se le ajustó el pH a 3.5 con HCl 1 N y se le añadió 100 mL de leche descremada (1 g de leche descremada en polvo en 100 mL de agua de mar artificial). Se mantuvo en agitación durante 10 h y en reposo 13 h para la precipitación de los flóculos.

El sobrenadante fue retirado con cuidado de no tocar el precipitado, el cual fue colocado en tubos cónicos de 50 mL. Los tubos fueron llevados a centrifugación durante 80 minutos a 4 °C y 4000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el pellet con tampón fosfato (Na_2HPO_4 0.2 M, NaH_2PO_4 0.2 M, en relación 1:2 v/v, pH 7.5).

El concentrado viral se colocó en tubos eppendorf de 2 mL y fue llevado a -20 °C para su conservación y uso posterior.

2.3.3. Siembra en placas Petrifilm™ 3M™

Se realizaron dos diluciones seriadas antes de la siembra. Primero se tomaron 5 mL de muestra de agua y se colocaron 45 mL de agua destilada y autoclavada, se agitó para homogenizar (dilución 10^{-1}). Luego se tomaron 5 mL de esta dilución y nuevamente se colocaron en 45 mL de agua estéril (dilución 10^{-2}) (Alonso & Poveda, 2008).

Se tomó 1 mL de cada muestra diluida y se sembró en una placa Petrifilm siguiendo las especificaciones del fabricante (3M™). Se utilizaron placas para la detección de coliformes fecales y de *E. coli* y se sembró cada muestra por triplicado. Se incubaron las placas durante 24 h

a 44.5 °C. Se emplearon las placas con un número de 15 a 150 colonias de acuerdo a lo señalado en la guía de interpretación de 3M™.

Los datos obtenidos mediante la técnica se expresaron en unidades de UFC/mL, sin embargo, en la normativa nacional (TULSMA) se encuentran en NMP/100 mL. Para poder compararlos se realizó la conversión utilizando la fórmula establecida por 3M™:

$$\log\left(\frac{UFC}{mL}\right) = 0.37 + 0.90 * \log\left(\frac{NMP}{100 mL}\right)$$

2.3.4. Análisis fisicoquímico del agua

Para cada muestreo, excepto el preliminar, se tomó 1 L de agua de río y se colocó en una botella plástica estéril. Se trasladó hasta el laboratorio LABANNCY (Quito) conservando la cadena de frío a 4 °C.

2.3.5. Extracción de ADN viral

Los tubos con concentrado viral fueron retirados de refrigeración y puestos a descongelar al ambiente. Se centrifugaron por un minuto a 4000 rpm para eliminar el sobrenadante (tampón fosfato). Se utilizó el kit PowerSoil DNA Isolation Kit de MO BIO Laboratories Inc., y el pellet de partículas virales floculadas se empleó como muestra.

2.3.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron dos juegos de cebadores degenerados para la identificación de HAdV y dos juegos para PAdV, los cuales han sido descritos y utilizados anteriormente (Allard et al., 2001; Maluquer et al., 2004), sus secuencias se encuentran en las Tablas 6 y 7, mientras que las condiciones de la reacción se detallan en las Tablas 8 y 9. Se utilizó el kit de enzima polimerasa DreamTaq Green PCR Master Mix de ThermoScientific, en una reacción de 25 µL cuyos componentes (Tabla 10).

Tabla 6:

Cebadores para la amplificación de fragmentos de una sección del gen de la proteína del hexón de la cápside de adenovirus humanos

Nombre	Reacción	Secuencia 5' – 3'	Tamaño del fragmento, pb
Hex1deg	Primera	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC	301
Hex2deg		CAGCACSCCICGRATGTCAA	
Hex3deg	Anidada	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	171
Hex4deg		CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	

Fuente: (Allard et al., 2001)

Tabla 7.

Cebadores para la amplificación de fragmentos de una sección del gen de la proteína del hexón de la cápside de adenovirus porcinos

Nombre	Reacción	Secuencia 5' – 3'	Tamaño del fragmento, pb
PARF	Primera	CACGGAGGAGTCRAACTGGATG	612
PALF		GATGTCATGGAYAACGTCAAC	
PARN	Anidada	GGAATGGAGATGGGCAGGTT	344
PALN		TACTGCMAGTTYCACATCCAGGT	

Fuente: (Maluquer et al., 2004)

Tabla 8:

Condiciones de temperaturas y tiempos para la PCR de adenovirus humanos

Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Objetivo
1x	95°C	3 min	Desnaturalización inicial
	95°C	30 s	Desnaturalización
40x	56°C	30 s	Alineamiento
	72°C	30 s	Extensión
1x	72°C	5 min	Extensión final

Fuente: (Allard et al., 2001)

Tabla 9:

Condiciones de temperaturas y tiempos para la PCR de adenovirus porcinos

Repeticiones	Temperatura	Tiempo	Objetivo
1x	94°C	3 min	Desnaturalización inicial
	92°C	30 s	Desnaturalización
35x	54°C*	30 s	Alineamiento
	72°C	1 min	Extensión

CONTINÚA

1x	72°C	5 min	Extensión final
----	------	-------	-----------------

*Para la segunda PCR, la temperatura cambiará a 57°C, el resto de condiciones permanecerán igual.
Fuente: (Maluquer et al., 2004).

Tabla 10:

Componentes de la PCR para una reacción de 25 µL

Componente	Volumen, µl (1x)	Concentración final
DreamTaq MasterMix	12.5	-
Cebador F	0.5	0.2 µM
Cebador R	0.5	0.2 µM
Agua libre de DNasas	6.5	-
ADN	5.0	0.4 ηg/µL

2.3.7. Electroforesis en gel de agarosa

Para observar el ADN amplificado por la PCR anidada se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se disolvieron 2 g de agarosa grado molecular en 100 mL de tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA). La corrida electroforética se realizó durante 45 min a 115 V (constante) y 300 mA. Posteriormente se incubó el gel durante 40 min con tampón de tinción (SYBR® Safe DNA Gel Stain, 1X). Los resultados se observaron bajo luz UV mediante un transiluminador.

2.3.8. Secuenciación Sanger y análisis bioinformático

La secuenciación Sanger fue realizada por la empresa Macrogen (Korea), se enviaron 20 µL del producto de PCR y 10 µL de cada cebador de la segunda reacción (hex3deg y hex4deg, PALN y PARN) a una concentración de 10 µM. Como resultado, la empresa envió, por correo electrónico, dos secuencias por cada muestra, una *forward* y una *reverse*, ambas en sentido 5' a 3'.

Una vez obtenidas las secuencias de los adenovirus se utilizó el programa Mega7 para su análisis. Primero, se observaron los electroferogramas y se cortaron las colas para eliminar las

secciones con bases inconsistentes, luego se procedió a alinear las secuencias *forward* con su *reverse* correspondiente para obtener la secuencia consenso (*contig*) sin olvidar cambiar la secuencia *reverse* por su complemento reverso.

Los *contigs* se guardaron en formato FASTA y se analizaron en el sistema BLAST (Nucleotide Blast y BlastX) de la base de datos del NCBI, en la cual se realizó la identificación de los serotipos virales.

La construcción del árbol filogenético se realizó en el programa Mega7, utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Tamura-Ney para sustitución de nucleótidos.

2.3.9. Análisis Estadístico

Se utilizó el programa estadístico OriginPro 8 para realizar un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y evaluar la diferencia en el número de los microorganismos, entre los puntos de muestreo. Se construyeron los diagramas de cajas y de barras para representar los resultados.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Observación de los puntos de interés del río Santa Clara y recolección de las muestras de agua

En el punto P1 (junto a la Hostería del Río) se observó basura de tipo doméstico en las orillas del río, como fundas, cáscaras y restos vegetales (Figura 5). Además, existía descarga directa de aguas residuales desde un domicilio cercano produciendo un olor desagradable. Se evidenció la presencia de vegetación en las orillas, del tipo arbustiva (Rueda, 2011).



Figura 5. Punto P1 de muestreo junto a la Hostería del Río
A) Presencia de basura orgánica e inorgánica en el río. B) Muestra obtenida, el color café y la turbidez del agua impiden ver el fondo del balde.

La muestra de agua recolectada estaba turbia, presentó un color ligeramente café, con varios sólidos vegetales que fueron descartados. Se encontraron dos larvas identificadas como quironomidos (familia Chironomidae) debido a sus características morfológicas y su representativo color rojo, consecuencia de la hemoglobina que acumulan (85%) (Sotelo, Cupul, & Rodriguez, 2014), y dos mosquitos (sin identificar) como se observa en la Figura 6.

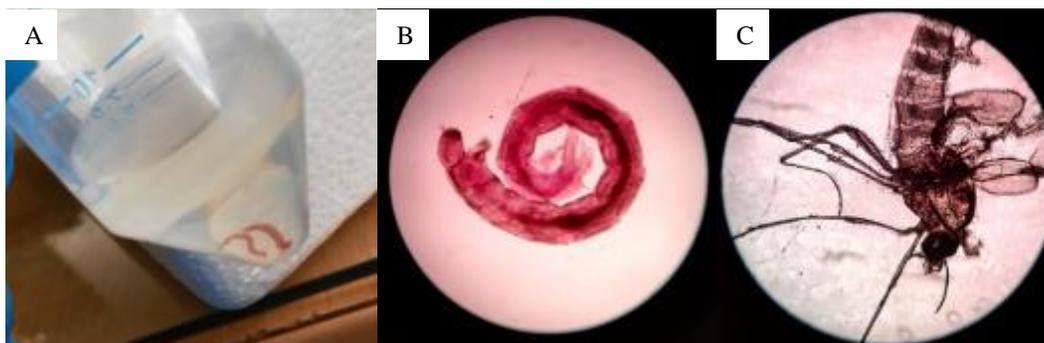


Figura 6. Insectos encontrados en la muestra de agua de P1.

A) Larvas de quironomidos. B) Vista en microscopio campo claro de la larva, lente 40X. C) Mosquito visto en microscopio, lente 40X.

En el punto P2 (parte posterior a la ESPE), se observaron fundas, residuos plásticos y ramas caídas (Fig 7). El caudal era visiblemente mayor que en el punto P1 y el agua se observó más clara y sin malos olores. En las orillas existe vegetación del tipo arbórea (Rueda, 2011).



Figura 7: Punto P2 de muestreo, ubicado en la parte posterior de la ESPE.

A) Presencia de residuos plásticos y ramas en el río. B) Muestra de agua obtenida, poca turbidez permite observar el fondo del balde.

La muestra de agua en este punto presentó un color claro, menor turbidez y partículas sedimentadas que en P1. Se encontró una larva de quironomido y tres mosquitos (sin identificar).

En el punto P3 (antes de unirse con el río San Pedro), el caudal es visualmente más grande comparado a los puntos P1 y P2. La vegetación en las orillas es arbórea y arbustiva. Se observó

una aglomeración de ramas y residuos plásticos en el centro del río (Figura 8). No se encontraron mosquitos ni larvas, tampoco se detectó mal olor. Aguas arriba de este punto se encontró una descarga de agua residual, probablemente doméstica; y escombros de construcción.

La muestra recolectada presentó un color claro, con menor turbidez y desechos vegetales en comparación con P1. Las partículas sedimentadas constituyeron mayormente tierra y arena.



Figura 8. Punto P3 de muestreo, tramo final del río.

A) Presencia de una aglomeración de ramas y basura en el centro del río. B) Muestra de agua obtenida, color anaranjado, se observa en el fondo tierra y arena precipitadas.

3.2. Siembra en placas Petrifilm™

En el Anexo 1 se encuentran los resultados del conteo de UFC/mL para *Escherichia coli* y coliformes fecales (CF), en los tres puntos de muestreo. El promedio se muestra corregido con el factor de dilución correspondiente (10, 100). Se evidencia que el número de microorganismos varía a lo largo del río, para *E. coli* entre $8.33 (\pm 1.03) \times 10^2$ y $6.63 (\pm 3.33) \times 10^3$ UFC/mL y para CF entre $1.19 (\pm 0.04) \times 10^3$ y $1.44 (\pm 0.16) \times 10^4$ UFC/mL.

En las Figuras 9 y 10 se representa el diagrama de barras con desviación estándar por cada punto de muestreo. En P1 existe mayor número de microorganismos que en P2 y P3. En las Figuras 11 y 12, se observan las placas de Petrifilm™ utilizadas.

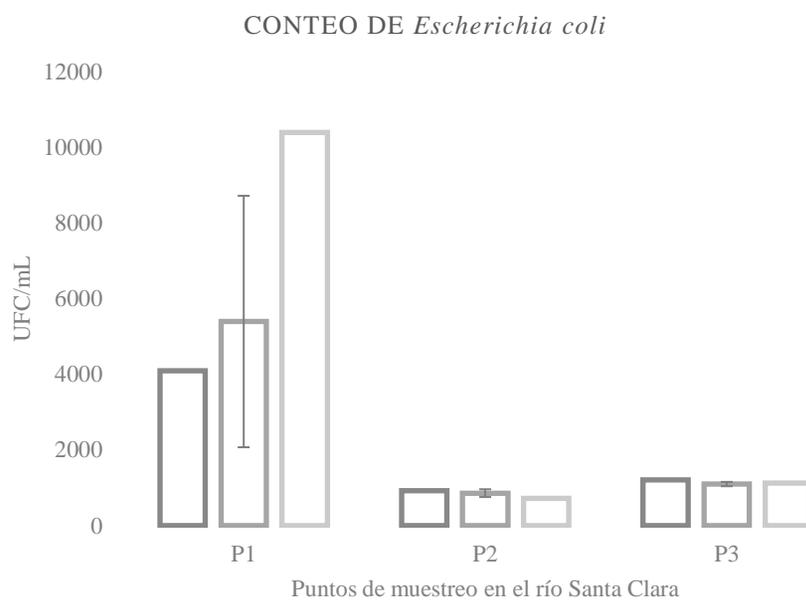


Figura 9. Gráfico de barras del número de *Escherichia coli* en los tres puntos del río.

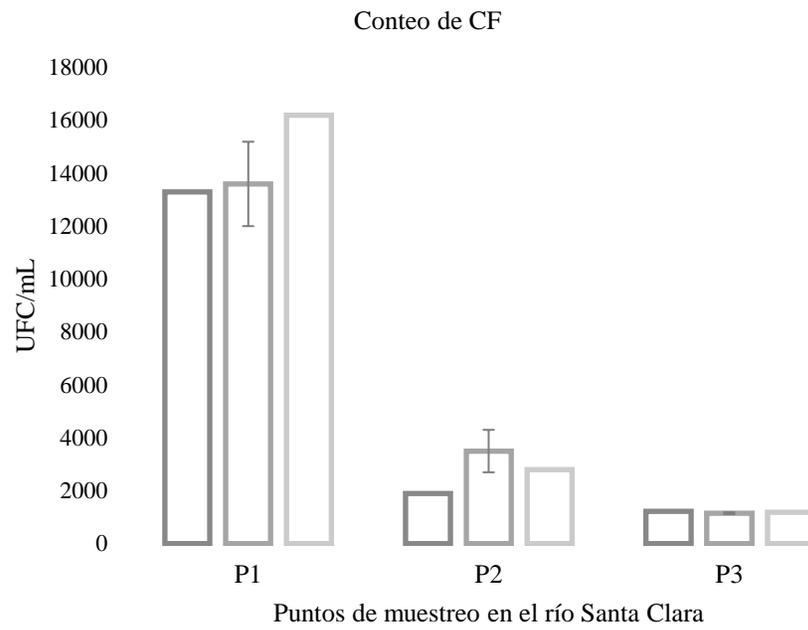


Figura 10. Gráfico de barras del número de CF en los tres puntos del río.

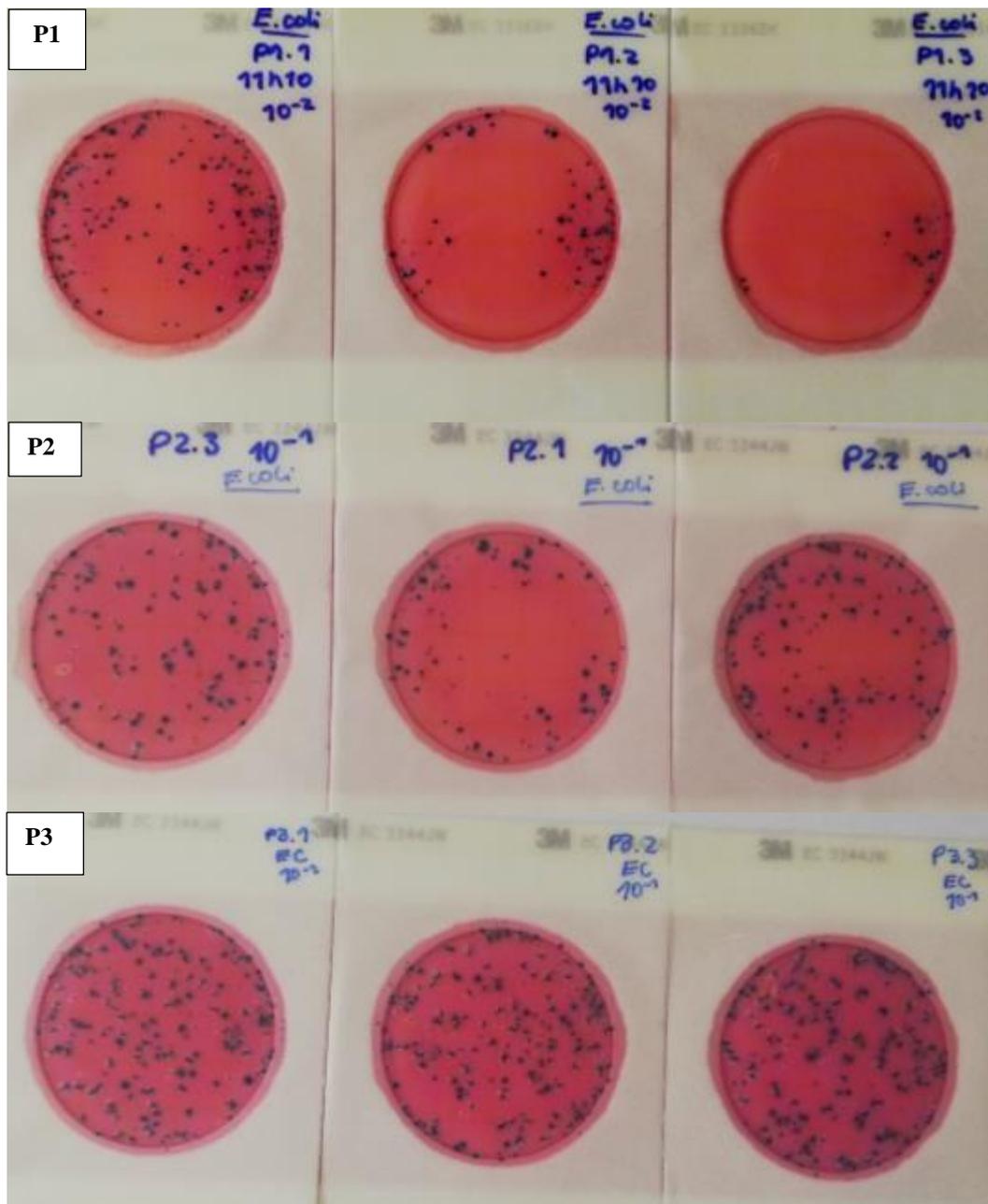


Figura 11. Placas Petrifilm *Escherichia coli* de las tres muestras de agua. Se observan las colonias de color azul asociadas a burbujas de aire, confirmando la presencia de *E. coli* en el agua del río Santa Clara. Para el punto P1 se empleó la dilución 10^{-2} y para P2 y P3, la dilución 10^{-1} .

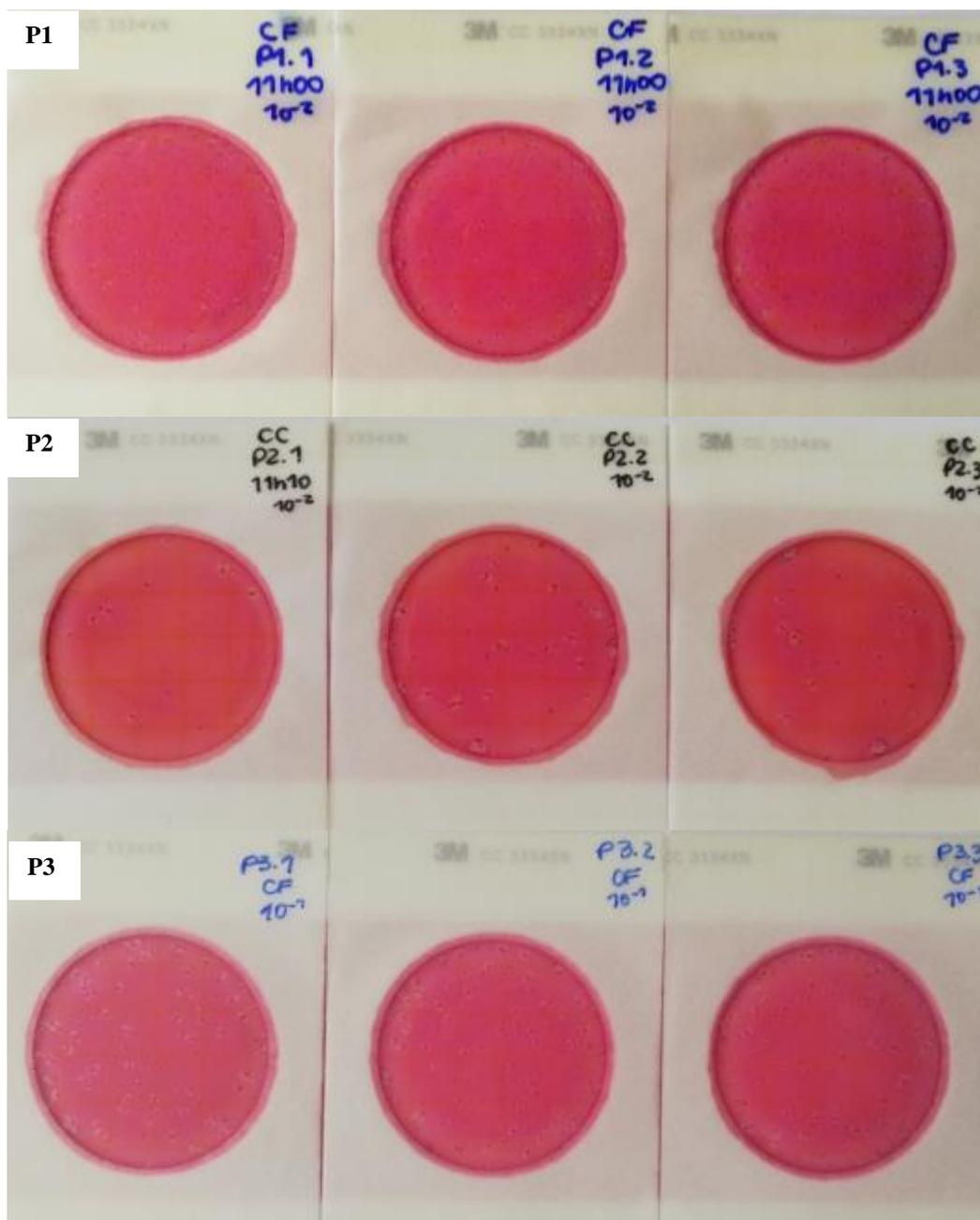


Figura 12. Placas Petrifilm coliformes de las tres muestras de agua. Se observan colonias rojas asociadas a burbujas de aire, confirmando la presencia de coliformes fecales en el agua del río Santa Clara. Para los puntos P1 y P2 se empleó la dilución 10^{-2} y para P3, la dilución 10^{-1} .

3.3. Análisis estadístico, ANOVA

Para CF se utilizó un nivel de significancia de 0.05, permitiendo determinar la diferencia en el número de los microorganismos en los tres puntos de muestreo ($p_value < 0.05$). Al

comparar los datos por pares (test de Tukey), la diferencia se encontró entre P1-P2, y P1-P3. El resumen de resultados se encuentra en el Anexo 2 y el diagrama de cajas en la Figura 13.

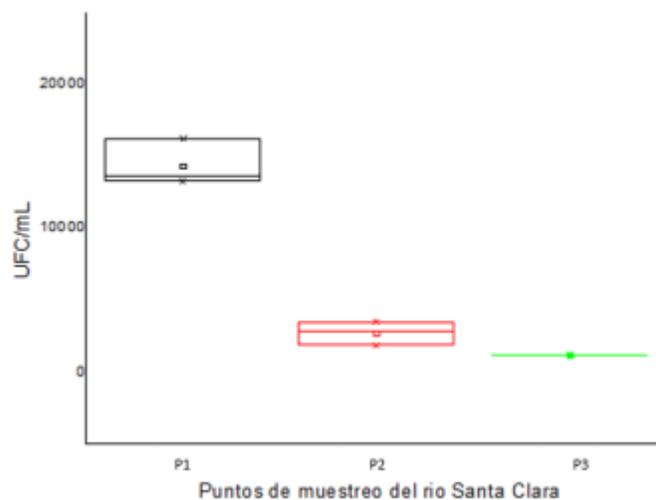


Figura 13. Diagrama de caja del número de CF en cada punto de muestreo del río.

Para el número de *E. coli* no se encontró diferencia significativa con un nivel de 0.05, por lo tanto se utilizó un alfa de 0.10. El test de Tukey determinó la diferencia entre P1-P2. En la Figura 14 se observan los diagramas de cajas para el número de CF y *E. coli* concuerdan con los diagramas de barras, en P1 existe mayor número de microorganismos. El resumen de resultados se encuentra en el Anexo 3.



Figura 14. Diagrama de caja del número de *Escherichia coli* en cada punto de muestreo

3.4. Análisis fisicoquímico

Los resultados del análisis fisicoquímico se resumen en el Anexo 4. Se observa la disminución de los parámetros aguas abajo del río, incluso hasta límites no detectables por las técnicas utilizadas.

3.5. Concentración de las partículas virales

Utilizando el protocolo propuesto por Calgua y colaboradores (2013), se obtuvo un volumen de 10 mL de concentrado viral, resuspendido en tampón fosfato, para cada punto. Presentó tonalidades cafés según su grado de concentración como se observa en la Figura 17.



Figura 15. Concentrados virales del punto P1 del río

3.6. Extracción de ADN

El protocolo de extracción utilizado permitió obtener ADN con ratios 260/280 y 260/230 entre 1,8 y 2, verificando su calidad; y concentraciones entre 5 y 15 ng/ μ L.

3.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis en gel de agarosa

La PCR se realizó en dos periodos, una reacción inicial y una anidada, obteniéndose como resultado la amplificación de dos fragmentos de ADN para cada adenovirus. El gel de agarosa se preparó al 2% y permitió visualizar las bandas de ADN. En las Figuras 16 y 17 se observan los amplicones correspondientes a las reacciones anidadas para PAdV y HAdV con un peso aproximado de 350 pb y 170 pb, respectivamente.

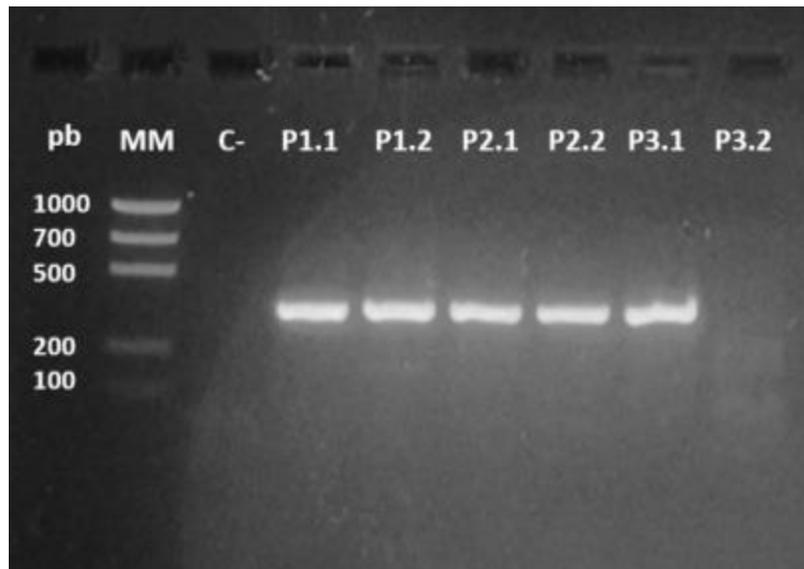


Figura 16. Electroforesis PCR para PAdV. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Las bandas corresponden a los productos de PCR anidada, con cebadores para adenovirus porcinos, con un peso molecular aproximado de 350 pb. Se realizaron dos repeticiones por cada punto.

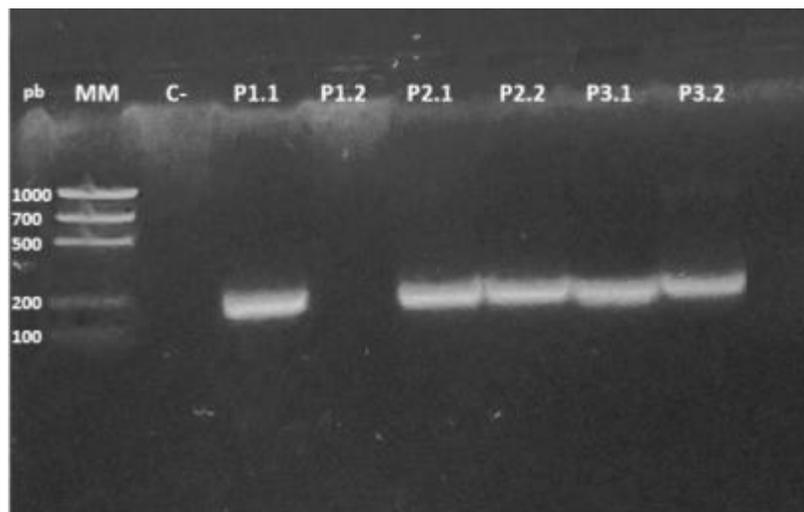


Figura 17. Electroforesis PCR para HAdV. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Las bandas corresponden a los productos de PCR anidada con cebadores para adenovirus humanos, con un peso molecular aproximado de 170 pb. Se realizaron dos repeticiones por cada punto.

3.8. Resultados de secuenciación Sanger y búsqueda de homólogos mediante BLAST

Para la secuenciación Sanger se enviaron dos amplicones de la prueba preliminar y dos amplicones por cada punto del ensayo completo; en total ocho muestras, cuatro amplificando segmentos del gen de la proteína del hexón de adenovirus humanos y cuatro para adenovirus porcinos.

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas mediante el programa Mega7, posteriormente se utilizó el sistema de búsqueda de homólogos para nucleótidos (BLAST) y para aminoácidos (BLASTX). Como resultado se obtuvo la identificación de cuatro serotipos de adenovirus, género *Mastadenovirus*; dos humanos (HAdV), un porcino (PAdV) y un murino (MAdV), como se observa en el Anexo 5.

3.9. Construcción del árbol filogenético con los genes identificados

Se utilizó el programa MEGA7 para realizar un alineamiento múltiple entre los genes identificados y uno que corresponde al *outgroup* o grupo de control, para esto se seleccionó el gen de la proteína del hexón del herpesvirus humano número 4 (HerpesHum4).

Con el alineamiento se construyó el árbol filogenético, los números sobre las ramas del árbol representan el valor de soporte del *bootstrap* mientras que los decimales bajo las ramas, indican la distancia evolutiva entre cada una (Anexo 6). La escala es de 0.20 sustituciones por posición en la secuencia (Figura 18).

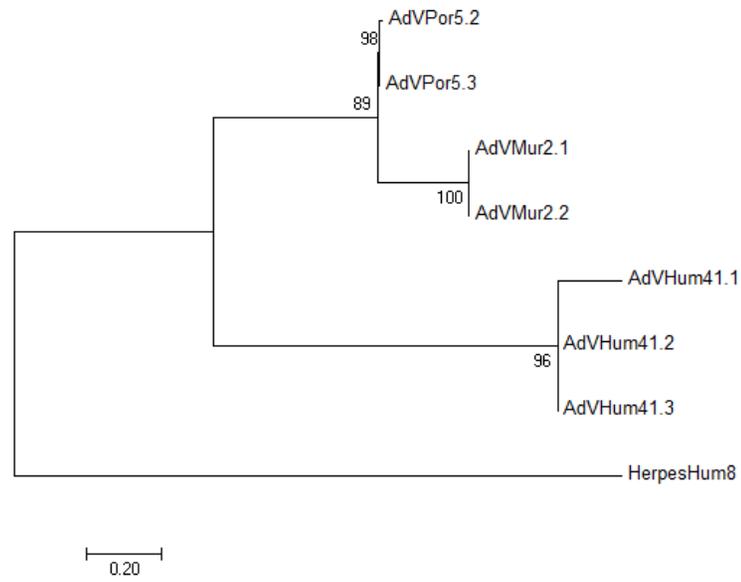


Figura 18. Árbol filogenético para los adenovirus identificados.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), *calidad de agua* se refiere a la idoneidad de este recurso para cumplir con ciertos usos o procesos, considerando particularmente características físicas, químicas o biológicas específicas (Bartram, et al., 1996).

La calidad de agua en los ríos se ve influenciada de manera natural por el suelo, pero con el desarrollo de actividades humanas y la contaminación ha perdido su integridad (Best, Bogacka, & Niemirycz, 1997; World Water Assessment Programme, 2003). Los principales parámetros que permiten determinar el grado de contaminación del agua de un río son DBO y DQO (Sawyer & McCarty, 1988).|

A lo largo de esta investigación, se cuantificaron varios parámetros relacionados a la calidad de agua, entre estos DBO y DQO. Según Wen y colaboradores (2017), en su estudio sobre contaminación de ríos a nivel mundial, la concentración límite de DBO es de 5mg/L. Los datos descritos en el Anexo 2 evidencian la contaminación del río Santa Clara, aunque en los puntos P2 y P3 apenas se sobrepasa el límite, en el punto P1, es significativa (83mg/L).

Además, aunque de los ríos posean la capacidad para auto depurarse, el número de personas afectadas por aguas contaminadas incrementará de 1.1 billones en 2000 a 2.5 billones en 2050 (Wen et al., 2017). Por lo tanto, se debería verificar la carga orgánica de los afluentes vertidos en ríos y su cumplimiento con la normativa TULSMA (Tabla 2).

En cuanto a la DQO, la OMS fijó el límite de calidad en 10mg/L (WHO, 1993). De igual forma, en P1 el valor de este parámetro es elevado (178mg/L) pero en P2 y P3 no se logró determinar un valor específico debido a los límites de detección de la técnica empleada por el laboratorio LABANNCY (30mg/L).

La relación DBO/DQO se ha utilizado como criterio de biodegradabilidad, si es mayor a 0.40 los contaminantes son biodegradables (Henry & Heinke, 1999; Dwumfour et al., 2017). Con los datos del Anexo 4, se calculó una relación de 0.46 en P1. Si se aplica esta relación a P2 y P3, suponiendo que se mantenga constante a lo largo del río, se obtienen valores de DQO de 11.44 y 12.73 mg/L respectivamente, superando el límite establecido (10mg/L).

Según Ramirez y Viña (1998), el valor límite de sólidos suspendidos totales (SST) para aguas de río en Colombia es de 150 mg/L, considerando los valores del Anexo 4, el agua del Santa Clara no supera este valor. No se encontraron datos de SST en ríos ecuatorianos no contaminados.

La normativa nacional mexicana (Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua CE-CCA-001-1989) establece para la conservación de la vida dulceacuícola, una concentración de fósforo total de hasta 0.1 mg/L en ríos y arroyos; y para la normativa China (Surface Water Environmental Quality Standard of China – GB3838-2002) el límite es 0.2 mg/L (LEGISMEX, 1989; Liu et al., 2018). La técnica utilizada tiene un límite de detección de 1.63 mg/L por lo tanto no se puede saber con exactitud si en los puntos P2 y P3 el fósforo excede el límite de calidad de agua. Sin embargo, en P1 se reporta una concentración de 5.3 mg/L, indicando la existencia de contaminación en este punto. En cuanto al nitrógeno total, la normativa china y la colombiana establecen un límite de 1 mg/L (DANE, 2011; Liu et al., 2018), superado en P1 (42 mg/L) e indeterminable en P2 y P3.

La eutrofización es un problema generalizado en ríos, lagos, estuarios y océanos costeros; las actividades agrícola, urbana e industrial constituyen la fuente de contaminación no puntual de N y P en EEUU y otros países (Carpenter et al., 1998). En el caso del río Santa Clara, la causa principal de las altas concentraciones de N y P totales podría ser la descarga de aguas residuales

domésticas. No se puede descartar el exceso de fertilizantes y estiércol arrastrados desde el suelo por el agua de lluvia, a lo largo de los campos de producción agropecuaria ubicados desde el Cotopaxi hasta el Valle de los Chillos.

En la normativa nacional (TULSMA, 2015), los criterios para la conservación de flora y fauna en aguas dulces frías no consideran los parámetros fisicoquímicos analizado. Los valores obtenidos en P1 son comparables con los límites máximos permisibles (LMP) establecidos para descarga en cuerpos de agua dulce (Tabla 11).

Si bien el muestreo no se realizó en ningún punto de descarga, se observa que el NT y los SST en el río sobrepasan el LMP, permitiendo suponer que los afluentes no cumplen con la normativa TULSMA.

Tabla 11

Comparación de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en P1 con los LMP para descarga en cuerpo de agua dulce (TULSMA)

Parámetro, mg/L	P1	TULSMA*
pH	7.78	5-9
DBO ₅	82.5	100
DQO	178	250
SST	70	100
NT	42	15
FT	5.3	10

Fuente: (TULSMA, 2015)

Aunque los coliformes pueden llegar de manera natural a los ríos, a partir de excrementos de aves y animales silvestres, también puede llegar por escorrentías agrícolas, pluviales y aguas residuales no tratadas. La contaminación fecal de las aguas superficiales es un problema directo para la salud humana, pues propicia la propagación de microorganismos patógenos como virus y bacterias (Kenia, et al., 2013). Durante el muestreo se visualizaron tres descargas directas de

aguas residuales domésticas en el río. No se realizó un recorrido a lo largo de toda la rivera así que no se debe descartar la existencia de más descargas.

En diferentes países, incluido Ecuador, la normativa sobre CF y sus LMP se encuentran determinados en función del uso del agua mas no de la fuente. Los datos del Anexo 1, muestran el número de CF expresados en UFC/mL, en la Tabla 12 se encuentran corregidos a NMP/100 mL y comparados con los diferentes LMP establecidos en TULSMA para coliformes fecales.

Tabla 12

Comparación de los valores obtenidos en cada punto de CF con los LMP de la normativa nacional

PUNTO	Coliformes Fecales		LMP – TULSMA, NMP/100 mL*		
	Prom UFC	Prom NMP	Preservación de flora y fauna	Uso pecuario	Descarga a cuerpo de agua dulce
P1	14 366,67	16 150,04			
P2	2 733,33	2 555,26	200	1000	3000
P3	1 186,67	1 011,14			

Fuente: (TULSMA, 2015)

A lo largo de todo el río se superan los LMP de CF para la preservación de flora y fauna natural, tampoco se podría emplear con finalidades pecuarias. Esto supone que las descargas individuales superan el LMP para descarga en cuerpo de agua dulce (Tabla 2), por lo tanto, se debería evaluar el número de CF en los efluentes a lo largo de todo el río.

Los LMP de *E. coli* en agua han sido determinados en función del riesgo que implica a la salud humana, por lo tanto, en función del uso (DES-NH, 2019). La dosis infectiva de los tipos patógenos de *E. coli* va desde $10 - 10^3$ células viables por mL de muestra dependiendo de la cepa y el serotipo (OPS/OMS, 2019). El número de esta bacteria en el río Santa Clara va de 8.33×10^2 a 6.63×10^3 UFC/mL indicando la contaminación fecal y consecuentemente posible riesgo para la salud humana.

Aunque se encontraron tres larvas de quironomidos en las muestras de agua, no se puede asegurar que fuesen las únicas, según Navarrete y colaboradores (2004), estos organismos pueden habitar aguas con elevada carga de materia orgánica. La cantidad de hemoglobina que acumulan (85%) les permite vivir en lugares con muy bajos niveles de oxígeno (Oviedo & Reinoso, 2018). No se cuantificó la cantidad de oxígeno disuelto en el agua del río, sin embargo, la presencia de estas larvas supone una baja cantidad del gas, además de confirmar la contaminación orgánica.

Existen varios protocolos de concentración de partículas virales. Según Guevara (2017), el método de leche descremada (SKM) es más sencillo, económico y provee más resultados positivos que la técnica de adsorción en lana de vidrio, al evaluarlos en la concentración de virus fitopatógenos. En esta investigación se empleó la SKM como agente floculante obteniéndose resultados satisfactorios en las cuatro muestras de agua analizadas.

Mediante técnicas moleculares y bioinformáticas se diferenciaron cuatro serotipos pertenecientes a cuatro especies de adenovirus (Figura 20), siendo: humano 31 (grupo A) y 41 (grupo F), porcino 5 (grupo C) y murino 2, se utilizó la herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos (BLAST) y proteínas (BLASTX), y los porcentajes de identidad (Tabla 13). Sin embargo, el criterio utilizado para separar las especies fue el establecido por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés).

Uno de los criterios de demarcación de especies en el género *Mastadenovirus* es que la distancia filogenética debe ser mayor a 0.1 (10%), el ICTV propone como genes taxonómicamente relevantes los del hexón, polimerasa, proteasa y pVIII (Fauquet, Mayo, Maniloff, Desselberger, & Ball, 2005), en esta investigación se utilizó el gen de la proteína del hexón, amplificado por dos reacciones consecutivas en una PCR anidada.

Como se observa en la Figura 18, la distancia entre adenovirus murino y porcino, es de 0.2405; entre humano y porcino, de 0.4801 y entre humano y murino, 0.2361. Por lo tanto, son especies diferentes de *Mastadenovirus*.

Entre los dos serotipos de HAdV, se observa también una distancia evolutiva mayor al 10% (16.97%), el HAdV 31 perteneciente al grupo A y el 41 al F. Como los siete grupos de HAdV son considerados especies diferentes entre sí (Çolak et al., 2017), se puede asegurar la existencia de dos especies de adenovirus humanos identificadas en el río Santa Clara.

Una vez identificados los adenovirus presentes en el río, corresponde determinar su relación con la contaminación por aguas residuales.

El adenovirus encontrado con mayor frecuencia en aguas residuales ha sido el HAdV-41 y de forma particular, existe información en Luxemburgo y EEUU sobre la presencia de este adenovirus en aguas residuales y ríos, mientras que en varios países de Europa incluso han sido reportados en aguas costeras y piscinas (Rames et al., 2016). Se conoce que los HAdV 40 y 41 son responsables del 1% al 20% de casos de diarrea infantil alrededor del mundo (Ramani & Kang, 2009).

Un estudio realizado con muestras de heces de niños con gastroenteritis en Turquía (n=180), identificó HAdV mediante PCR, dando como resultado el 64% positivo para HAdV-41 y el 8% para HAdV-31 (Çolak et al., 2017). En Guatemala se determinó la presencia de adenovirus 40 y 41 en el 15% de los casos de niños con diarrea (n=316) (Gaensbauer et al., 2019) y en Brasil, en el 2.5% (n=3003) (Primo et al., 2018). Demostrando que la incidencia de HAdV no es alta en América Latina.

Los adenovirus identificados no solo permitieron confirmar existencia la contaminación fecal en el río Santa Clara debido a la descarga de aguas residuales, sino también la posible presencia de enfermedades diarreicas en la población.

El HAdV-31 también se encuentra asociado a obesidad, pues provoca la acumulación patológica de grasas y lípidos en los adipocitos (Bil-Lula et al., 2016). Su identificación en P1 demuestra la posible existencia de personas con sobrepeso habitando cerca del lugar.

La identificación de los adenovirus no fue cuantitativa, sin embargo, no se puede descartar la capacidad del río Santa Clara para transmitir enfermedades del tipo diarreicas asociadas a virus, considerando la prevalencia de al menos 132 días para los HAdV en aguas residuales (Rames et al., 2016).

Los PAdV fueron aislados por primera vez a partir de muestras rectales de lechones con diarrea (Haig et al., 1964). El PAdV-5 fue aislado originalmente en Japón en 1990 a partir de muestras nasales de cerdos con enfermedad respiratoria (Hirahara et al., 1990) posteriormente ha sido encontrado en muestras ambientales y de aguas residuales (Hundesha et al., 2006). En las muestras de agua del Santa Clara se encontró el PAdV-5 en los puntos P2 y P3 del río, suponiendo la presencia de criaderos o mataderos de cerdos en las cercanías.

Los PAdV son patógenos de bajo grado y especie-específicos, lo cual reduce la posibilidad de contagio de enfermedades a otros animales, incluido el hombre (Hammond & Johnson, 2005); sin embargo su presencia en el río Santa Clara permite identificar las fuentes de contaminación fecal. Según Haack y colaboradores (2015) al analizar un derrame de estiércol de cerdo en un río de EE. UU., los PAdV fueron detectados hasta 18 días después y 5.6 km aguas abajo. Por lo tanto, las descargas pudieron realizarse a lo largo de todo el río aunque el adenovirus fue detectado solamente en los puntos P2 y P3.

El MAdV-2 fue aislado por primera vez de heces de ratones domésticos aparentemente sanos, en Japón (Hashimoto, Sugiyama, & Sasaki, 1966). Infecta el tracto gastrointestinal y células renales sin causar la muerte (Hemmi et al., 2011). Estudios moleculares del serotipo (contenido de C+G), establecen como único hospedero al ratón (*Mus musculus*), siendo por lo tanto, un virus especie-específico (Benkö & Harrach, 2003). Con la evidencia descrita y la identificación molecular-bioinformática del MAdV-2 en P1 y P2 se verifica la presencia de ratones domésticos habitando en las cercanías del río Santa Clara.

En el momento del muestreo, en P1 se observaron fundas con basura doméstica y residuos de alimentos, en P2 solamente fundas plásticas vacías al igual que en P3. La existencia de ratones está fuertemente relacionada con la basura depositada en el río, pues les provee fuentes de alimento.

Cuando se realizan ensayos sobre trazado de contaminación microbiana, es importante seleccionar un gen objetivo específico del hospedero y aunque los virus entéricos son generalmente especie-específicos, estudios han detectado cepas muy similares de virus en diferentes especies de animales (Wong et al., 2012). El gen seleccionado en este estudio fue el de la proteína del hexón, recomendado por el ICTV (Fauquet et al., 2005) y cuya secuencia es altamente conservada. En la amplificación se emplearon dos juegos de cebadores, uno para adenovirus humanos y otro para porcinos; sin embargo, se identificó el MAdV-2.

Se han realizado pruebas de especificidad (E) y sensibilidad (S) sobre el juego de cebadores para PCR anidada y detección de adenovirus porcino, en muestras (*pool*) de heces humanas, ovinas, bovinas y aves (patos, gansos y cisnes) dando una S de hasta 70% y E del 100% (Wong et al., 2012), pero no se ha evaluado con muestras murinas. Además la S disminuye hasta

el 5% cuando se utilizan muestras de aguas residuales, en las cuales tampoco se contrastó con MAdV (Hundesda et al., 2006; Wong et al., 2012).

El estudio de los MAdV no ha sido muy amplio, se ha visto enfocado en la secuenciación de su genoma y la clasificación correcta de los serotipos (grupos A, B y C) (Hashimoto et al., 1966; Benkő, 2015; Hemmi et al., 2011). El análisis del genoma completo del MAdV-2 ha identificado al adenovirus murino como el miembro más viejo del género *Mastadenovirus* (Hemmi et al., 2011). Con estas consideraciones y los resultados bioinformáticos (Figura 18) se podría explicar por qué se logró detectarlo sin cebadores específicos. Sin embargo, se deberían realizar más ensayos para confirmar la presencia de MAdV-2 en el río Santa Clara.

Aunque no se consideren el LMP y el conteo de CF (Tabla XV), las aguas del río Santa Clara no deberían usarse con fines agropecuarios, por seguridad de los animales y consecuentemente, de las personas. Si fuera la única fuente, el agua debería pasar por cloración, los adenovirus son susceptibles a hipoclorito de sodio al 0.5% (Robinson & Echavarría, 2007).

Los adenovirus son persistentes en cuerpos de agua, por eso se han empleado como indicadores y para rastrear la contaminación fecal de animales bovinos y porcinos (Maluquer et al., 2004), aunque se necesita analizar grandes números de muestras para un trazado correcto, los ocho virus identificados permiten conocer el estado del río. No se utilizaron cebadores específicos para la identificación de AdV bovinos.

Los adenovirus descritos mediante esta investigación proceden de aguas residuales por lo tanto, tienen origen fecal. Los HAdV han sido propuestos y utilizados como indicadores de contaminación (Pina et al., 1998; Girones & Bofill-Mass, 2013) y los AdV animales como los porcinos, empleados para rastrear sus fuentes (Maluquer et al., 2004; Wong et al., 2012). Por lo

tanto, en Ecuador también se pueden aplicar técnicas moleculares para evaluar la calidad del agua, identificar los virus e implementarlos como indicadores de polución fecal.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Mediante biología molecular y bioinformática se detectó la presencia de adenovirus humanos, porcinos y murinos, pertenecientes al género *Mastadenovirus*. Se identificaron cuatro especies: Adenovirus Humanos 31 y 41, Adenovirus Porcino 5 y Adenovirus Murino 2 en los tres puntos de muestreo de agua del río Santa Clara, confirmando contaminación de origen fecal.

Las partículas virales presentes en el río Santa Clara fueron concentradas eficientemente mediante el método de floculación con leche descremada y muestras de agua de 10 litros cada una.

Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos confirmaron la contaminación del río Santa Clara, al comparar los resultados con la normativa nacional, TULSMA, y con parámetros internacionales de calidad de agua de ríos.

La descarga directa de aguas residuales en las aguas del río ha producido la acumulación de materia orgánica, incluyendo bacterias y virus perjudiciales para personas y animales.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Utilizar metodologías más avanzadas como secuenciación masiva y PCR en tiempo real, para detectar y cuantificar otros virus entéricos, adenovirus bovinos, aviares y poliomavirus.

Evaluar la presencia de virus en otros ríos de Pichincha y plantas de tratamiento de aguas residuales del país.

La normativa nacional, TULSMA (2015), establece los LMP para la descarga de aguas residuales en ríos. Se debe verificar el cumplimiento de la norma y evaluar la calidad de los afluentes para evitar la acumulación de la contaminación y el colapso de los ríos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed-Hamza, I., Jurzik, L., Uberla, K., & Wilhelm, M. (2011). Evaluation of pepper mild mottle virus , human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Research*, 5(45), 1358–1368.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A., & Gardner, T. (2010). Human and bovine adenoviruses for the detection of source-specific fecal pollution in coastal waters in Australia. *Water Research*, 44(16), 4662–4673.
- Allard, A., Albinsson, B., & Wadell, G. (2001). Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 498–505.
- Alonso, L., & Poveda, J. (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3MTM para el análisis de alimentos*. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá.
- Bartram, J., Ballance, R., World Health Organization, & United Nations Environment Programme. (1996). *Water Quality Monitoring-A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*. Londres.
- Benkő, M. (2015). *Adenoviruses: Pathogenesis ☆. Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier Inc.
- Benkő, M., & Harrach, B. (2003). Molecular Evolution of Adenoviruses. In *Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions* (pp. 3–35). Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-05597-7_1
- Best, G. A., Bogacka, T., & Niemirycz, E. (1997). *International river water quality : pollution*

and restoration (1era ed.). Londres: E & FN Spon.

- Bil-Lula, I., Krzywonos, A., Sawicki, G., & Woźniak, M. (2016). An infection of human adenovirus 31 affects the differentiation of preadipocytes into fat cells, its metabolic profile and fat accumulation. *Journal of Medical Virology*, 88(3), 400–407. <https://doi.org/10.1002/jmv.24362>
- Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., & Girones, R. (2013). Quantification of Human and Animal Viruses to Environmental Samples. *BioMed Research International*, 2013, 192089.
- Bofill-Mas, S., Clemente, P., Albiñana, N., Maluquer, C., Hundesa, A., & Girones, R. (2005). Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Revista Española de Salud Pública*, 79(2), 253–269.
- Caini, S., de Mora, D., Olmedo, M., Portugal, D., Becerra, M. A., Mejía, M., ... Bruno, A. (2019). The epidemiology and severity of respiratory viral infections in a tropical country: Ecuador, 2009–2016. *Journal of Infection and Public Health*, 12(3), 357–363. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2018.12.003>
- Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V. A., Bofill-Mas, S., ... Girones, R. (2013). Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Research*, 7(47), 2797–2810.
- Carpenter, S., Caraco, N., Correll, D., Howarth, R., Sharpley, A., & Smith, V. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8(3), 559–568.
- Çolak, M., Bozdayi, G., Altay, A., Yalaki, Z., Ahmed, K., & Özkan, S. (2017). Detection and

- molecular characterisation of adenovirus in children under 5 years old with diarrhoea. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47, 1463–1471. <https://doi.org/10.3906/sag-1510-94>
- Cyprowski, M., Stobnicka, A., Ławniczek, A., Bakal, A., Gołofit, M., & Górny, R. (2018). Anaerobic bacteria in wastewater treatment plant. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 91(5), 571–579. <https://doi.org/10.1007/s00420-018-1307-6>
- DANE. (2011). *FICHA TECNICA Nitrógenos totales*. Bogotá.
- De Giglio, O., Caggiano, G., Bagordo, F., Barbuti, G., Brigida, S., Lugoli, F., ... Montagna, M. T. (2017). Enteric Viruses and Fecal Bacteria Indicators to Assess Groundwater Quality and Suitability for Irrigation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(558), 1–13.
- De La Lanza, G., Hernández, S., & Carbajal, J. (2000). *Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación*. Mexico DF: Plaza y Valdés.
- DES-NH. (2019). *Bacteria in Surface Waters*. Concord. Retrieved from <http://des.nh.gov/organization/commissioner/pip/factsheets/wmb/documents/wmb-17.pdf>
- Dwumfour, B., Adantey, P., Nyarko, K. B., & Appiah, E. (2017). Greywater characterization and handling practices among urban households in Ghana: the case of three communities in Kumasi Metropolis. *Water Science and Technology*, 76(4), 813–822. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.229>
- Escobar, J. (2002). *La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar*. Santiago de Chile: Naciones Unidas.
- Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, U. (2005). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; 8th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Elsevier/Academic Press.

- Fong, T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 69(2), 357–371.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., & Treviño, E. (2009). *Diagnóstico Microbiológico* (12ava ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Gaensbauer, J., Lamb, M., Calvimontes, D., Asturias, E., Kamidani, S., Contreras, I., ... Melgar, M. (2019). Identification of Enteropathogens by Multiplex PCR among Rural and Urban Guatemalan Children with Acute Diarrhea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(3), 534–540. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0962>
- García, M., Martínez, F., Utrilla, A., Morillo, R., Alés, M., Junquera, C., ... Muñoz, D. (2006). *ATS/DUE Personal Laboral de la Comunidad Autonoma de Extremadura* (2da ed.). Sevilla: MAD.
- Girones, R., & Bofill-Mass, S. (2013). Virus indicators for food and water. In *Viruses in Food and Water: Risks, Surveillance and Control* (1era ed., pp. 484–501). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- González, J., Barat, R., Pachés, M., Murgui, M., Seco, A., & Ferrer, J. (2018). Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae–bacteria culture: effect of light and temperature on the microalgae–bacteria competition. *Environmental Technology*, 39(4), 503–515. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1305001>
- Gutierrez, N., & Jimenez, S. (2005). *El financiamiento del desarrollo sostenible en el Ecuador*. Santiago de Chile: United Nations Publications.
- Haack, S., Duris, J., Kolpin, D., Fogarty, L., Johnson, H., Gibson, K., ... Foreman, W. (2015). Genes indicative of zoonotic and swine pathogens are persistent in stream water and

- sediment following a swine manure spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(10), 3430–3441.
- Hahn-vonHessberg, C., Toro, D., Grajales, A., Duque, G., & Serna, L. (2009). Determinación de la calidad del agua mediante indicadores biológicos y fisicoquímicos, en la estación piscícola, Universidad de Caldas, Municipio de Palestina, Colombia. *Boletín Científico Del Museo de Historia Natural*, 13(2), 89–105.
- Haig, D., Clarke, M., & Pereira, M. (1964). Isolation of an adenovirus from a pig. *Journal of Comparative Pathology*, 74, 81–84.
- Hammond, J., & Johnson, M. (2005). Porcine adenovirus as a delivery system for swine vaccines and immunotherapeutics. *The Veterinary Journal*, 169(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.007>
- Hashimoto, K., Sugiyama, T., & Sasaki, S. (1966). An Adenovirus Isolated from the Feces of Mice: I. Isolation and Identification. *Japanese Journal of Microbiology*, 10(2), 115–125. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1966.tb00298.x>
- Healy, J., Lee, S., Mouhaman, A., Garabed, R., Moritz, M., Piperata, B., & Lee, J. (2016). Neighborhood diversity of potentially pathogenic bacteria in drinking water from the city of Maroua, Cameroon. *Journal of Water and Health*, 14(3), 559–570. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.204>
- Hemmi, S., Vidovszky, M., Ruminska, J., Ramelli, S., Decurtins, W., Greber, U., & Harrach, B. (2011). Genomic and phylogenetic analyses of murine adenovirus 2. *Virus Research*, 160(1–2), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.05.023>
- Henry, G., & Heinke, G. (1999). *Ingeniería ambiental* (2nd ed.). Juárez: Prentice Hall.
- Hirahara, T., Yasuhara, H., Matsui, O., Yamakana, M., Tanaka, M., Fukuyama, S., ... Sasaki, N.

- (1990). Isolation of Porcine Adenovirus from Respiratory Tract of Pigs in Japan. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 52(2), 407–409.
- Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C., Torvela, N., Heikinheimo, A., & Hänninen, M. (2004). Campylobacter spp., Giardia spp., Cryptosporidium spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 87–95. <https://doi.org/10.1128/aem.70.1.87-95.2004>
- Hundesda, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., & Girones, R. (2006). Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7886–7893. <https://doi.org/10.1128/AEM.01090-06>
- Iaconelli, M., Valdazo, B., Equestre, M., Ciccaglione, A., Marcantonio, C., Della Libera, S., & La Rosa, G. (2017). Molecular characterization of human adenoviruses in urban wastewaters using next generation and Sanger sequencing. *Water Research*, 21(2017), 240–247.
- Jacquet, S., Miki, T., Noble, R., Peduzzi, P., & Wilhelm, S. (2010). Advances in Oceanography and Limnology Viruses in aquatic ecosystems : important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology. *Advances in Oceanography and Limnology*, 1(1), 97–141.
- Jerman, U., Kolenc, M., Steyer, A., Veranič, P., Prijatelj, M., & Kreft, M. (2014). A novel strain of porcine adenovirus detected in urinary bladder urothelial cell culture. *Viruses*, 6(6), 2505–2518.
- Jiang, S. (2006). Human Adenoviruses in Water : Occurrence and Health Implications : A Critical Review †. *Environmental Science and Technology*, 40(23), 7132–7140.

- Jones, M., Harrach, B., Ganac, R., Gozum, M., De la Cruz, W., Riedel, B., ... Schnurr, D. (2007). New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *Journal of Virology*, 81(11), 5978–5984.
- Jones, T. H., & Muehlhauser, V. (2017). F-coliphages, porcine adenovirus and porcine teschovirus as potential indicator viruses of fecal contamination for pork carcass processing. *International Journal of Food Microbiology*, 241.
- Kenia, B., Chacón, L. M., Solano, M., & Achí, R. (2013). Contaminación fecal del agua superficial de la microcuenca del río Purires, Costa Rica, 2010-2011. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(1), 40–45.
- La Hora. (2019, January 20). Niños obligados a utilizar mascarilla por contaminación de quebrada. *La Hora*. Retrieved from <https://www.lahora.com.ec/noticia/1102216320/ninos-obligados-a-utilizar-mascarilla-por-contaminacion-de-quebrada>
- LEGISMEX. (1989). *Acuerdo de Criterios Ecológicos de Calidad del Agua*. Mexico DF.
- Liu, Y., Zhu, Y., Qiao, X., Zheng, B., Chang, S., & Fu, Q. (2018). Investigation of nitrogen and phosphorus contents in water in the tributaries of Danjiangkou Reservoir. *Royal Society Open Science*, 5(1), 170624. <https://doi.org/10.1098/rsos.170624>
- López, S., & Martín, S. (2017). *UF1666 - Depuración de aguas residuales* (5ta ed.). Madrid: Elearning SL.
- Lupolova, N., Dallman, T., Holden, N., & Gally, D. (2017). Patchy promiscuity: machine learning applied to predict the host specificity of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Microbial Genomics*, 3(10), e000135. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000135>
- Maluquer, C., Clemente, P., Hundesa, A., Martín, M., & Girones, R. (2004). Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination. *Applied and*

Environmental Microbiology, 70(3), 1448–1454.

McQuaig, S., Scott, T., Harwood, V., Farrah, S., & Lukasik, J. (2006). Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7567–7574.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01317-06>

Morcillo, G., Cortés, E., & García, J. (2013). *Biotechnología y alimentación*. Madrid: Editorial UNED.

National Research Council. (2004). *Indicators for Waterborne Pathogens*. Washington DC: National Academies Press.

Navarrete, N., Fernández, E., & Contreras, G. (2004). Abundancia de Quironómidos (Diptera: Chironomidae) en el bordo “JC” del norte del Estado de México en el periodo de secas. *Hidrobiológica*, 14(2), 157–160.

NPTEL. (2013). Adenovirus. Retrieved April 25, 2019, from <https://nptel.ac.in/courses/102103041/13>

Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2008). *Genética en Medicina* (7ma ed.). Barcelona: Elsevier España.

Ogorzaly, L., Walczak, C., Galloux, M., Etienne, S., Gassilloud, B., & Cauchie, H. (2015). Human Adenovirus Diversity in Water Samples Using a Next-Generation Amplicon Sequencing Approach. *Food and Environmental Virology*, 7(2), 112–121.

Olalemi, A., Purnell, S., Caplin, J., Ebdon, J., & Taylor, H. (2016). The application of phage-based faecal pollution markers to predict the concentration of adenoviruses in mussels (*Mytilus edulis*) and their overlying waters. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 1152–1162.

- OMS. (1979). *Human viruses in water, wastewater and soil*. Génova.
- OPS/OMS. (2019). OPS/OMS | Peligros: Introducción. Retrieved August 29, 2019, from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10835:2015-peligros-introduccion&Itemid=41449&lang=es
- Organización Panamericana de la Salud. (2001). *Desigualdades en el acceso, uso y gasto con el agua potable en América Latina y el Caribe*. Washington DC: OMS.
- Oviedo, N., & Reinoso, G. (2018). Aspectos ecológicos de larvas de Chironomidae (Diptera) del río Opia (Tolima, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 44(1), 101–109. <https://doi.org/10.25100/socolen.v44i1.6546>
- Paz, J. (1971). *La contaminación ambiental y sus problemas*. Madrid: Real Academia Nacional de Medicina.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998). Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3376–3382.
- Primo, D., Pacheco, G., Timenetsky, M., & Luchs, A. (2018). Surveillance and molecular characterization of human adenovirus in patients with acute gastroenteritis in the era of rotavirus vaccine, Brazil, 2012–2017. *Journal of Clinical Virology*, 109, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.10.010>
- Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G., & Girones, R. (1994). Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by Nested PCR Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2963–2970.
- Puruncajas, J. (2015). *Identificación etiológica de la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños de dos meses a cinco años de edad en el servicio de emergencia de la Novaclínica Santa*

- Cecilia en el periodo de mayo a diciembre del 2013*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Ramani, S., & Kang, G. (2009). Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22(5), 477–482. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328330662f>
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., & Macdonald, J. (2016). Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Research*, 96(2016), 308–326.
- Ramírez, A., & Viña, G. (1998). *Limnología Colombiana: aportes a su conocimiento y estadísticas de análisis*. (Centro Editorial Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Ed.) (1era ed.). Bogotá: Panamericana Editores.
- Ríos, S., Agudelo, R., & Gutiérrez, L. (2017). Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Revista de La Facultad Nacional de Salud Pública*, 35(2), 236–247.
- Robinson, C., & Echavarria, M. (2007). Adenovirus. In P. Murray, E. Baron, J. Jorgensen, M. Landry, & M. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., p. 1598). ASM Press.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana* (3era ed.). México DF: Editorial Médica Panamericana.
- Rueda, D. (2011). *Botánica Sistemática* (4ta ed.). Quito.
- Rux, J., Kuser, P., & Burnett, R. (2003). Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. *Journal of Virology*, 77(17), 9553–9566.
- Sanitaria. (2018). Ministerio de Salud reporta más de 15.400 casos de conjuntivitis. Retrieved

April 2, 2019, from <https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/ministerio-de-salud-reporta-m-s-de-15-400-casos-de-conjuntivitis-91750>

Sawyer, C., & McCarty, P. (1988). *Chemistry For Environmental Engineering* (5ta ed.). Singapore: McGraw Hill Book Company.

Shinagawa, M., Matsuda, A., Ishiyama, T., Goto, H., & Sato, G. (1983). A Rapid and Simple Method for Preparation of Adenovirus DNA from Infected Cells. *Microbiology and Immunology* |, 27(9), 817–822.

Slováčková, H. (2008). *Study of the Ecological Role of Viruses and Bacteria in Aquatic Ecosystems*. Masaryk University.

Sotelo, R., Cupul, A., & Rodriguez, A. (2014). Primer registro del género *Clunio* (Diptera: Chironomidae) asociado a las comunidades coralinas de islas Marietas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 14–23. <https://doi.org/10.7550/rmb.38165>

Sun, S., Shi, Y., Tong, H. I., Kang, W., Wang, Z., Allmann, E., & Lu, Y. (2016). Effective concentration, recovery, and detection of infectious adenoviruses from environmental waters. *Journal of Virological Methods*, 229. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.01.002>

Terneus, E., & Yanez, P. (2018). Principios fundamentales en torno a la calidad del agua, el uso de bioindicadores acuáticos y la restauración ecológica fluvial en Ecuador. *La Granja*, 27(1), 26–50.

ThermoFisher. (2016). PCR Methods. Retrieved April 25, 2019, from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html>

TULSMA. (2015). *Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente*.

Quito.

- Wen, Y., Schoups, G., & Van De Giesen, N. (2017). Organic pollution of rivers: Combined threats of urbanization, livestock farming and global climate change. *Scientific Reports*, 7(January), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep43289>
- WHO. (1993). *Guidelines for drinking water quality*. Geneva.
- Winn, W., Koneman, E., Allen, S., Procop, G., Janda, W., & Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico* (6ta ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Wong, K., Fong, T., Bibby, K., & Molina, M. (2012). Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environment International*, 45, 151–164.
- World Water Assessment Programme. (2003). *Water for People Water for Life*. París.
- Zhi, S., Li, Q., Yasui, Y., Edge, T., Topp, E., & Neumann, N. (2015). Assessing host-specificity of *Escherichia coli* using a supervised learning logic-regression-based analysis of single nucleotide polymorphisms in intergenic regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.007>

ANEXOS