



**Identificación molecular de SARS – CoV – 2 y concentración viral en aguas
residuales como componente de vigilancia ambiental de la enfermedad COVID-19 en la
ciudad de Ibarra – Imbabura**

Delgado Salgado, Patricio Andrés y Muñoz Vera, Cintia Estefanía

Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología

Centro de Posgrados

Maestría en Sistemas de Gestión Ambiental

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Magíster en Sistemas de Gestión
Ambiental

MSc. Koch Kaiser, Alma Rosel

16 de septiembre del 2021

Document Information

Analyzed document	antiplagioTesisMSG_A_Delgado_Muñoz_2021.docx (D112517169)
Submitted	9/13/2021 10:14:00 PM
Submitted by	
Submitter email	biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	ilbbiblioteca.GDC@analysis.orkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://theconversation.com/vigilancia-del-sars-cov-2-en-aguas-residuales-una-herramienta-de-alerta-rapida-137031 Fetched: 9/13/2021 10:17:00 PM		1
SA	TITULACION PLAGIO TESIS AQUINO & MOYANO.docx Document TITULACION PLAGIO TESIS AQUINO & MOYANO.docx (D80683044)		2
W	URL: https://www.researchgate.net/profile/Edison_Bonifaz3/publication/326550288_UDLA-EC-TIB-2018-16/links/5b5552940f7e9b240ffd7132/UDLA-EC-TIB-2018-16.pdf Fetched: 1/8/2020 5:02:45 PM		1
W	URL: http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/53459/1/TESIS%20ALANNIS%20DANIXA%20SUAR%20ABDO.pdf Fetched: 7/7/2021 4:12:47 AM		1
SA	TESIS CAÑARTE RUIZ.docx Document TESIS CAÑARTE RUIZ.docx (D112376657)		1
SA	Grupo Difusión Científica / Tesis FINAL Berenice Sarmiento.docx Document Tesis FINAL Berenice Sarmiento.docx (D62031663) Submitted by: jbolanos@difusion.com.mx Receiver: jbolanos.GDC@analysis.orkund.com		1

ALMA ROSEL
KOCH KAISER

Firmado digitalmente por ALMA ROSEL KOCH KAISER
DN: cn=ALMA ROSEL KOCH KAISER, o=SECURITY DATA S.A. 2
ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE INFORMACION
Motivo: Estoy aprobando este documento
Ubicación:
Fecha: 2021-09-14 09:27-05:00



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Identificación molecular de SARS – CoV – 2 y concentración viral en aguas residuales como componente de vigilancia ambiental de la enfermedad COVID-19 en la ciudad de Ibarra – Imbabura**” fue realizado por los señores Delgado Salgado Patricio Andrés y Muñoz Vera Cintia Estefanía el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad, por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 16 de septiembre de 2021

Firma:

ALMA
ROSEL
KOCH
KAISER

Firmado digitalmente
por ALMA ROSEL KOCH
KAISER
DN: cn=ALMA ROSEL
KOCH KAISER, o=EC
SECURITY DATA S.A.,
2.5#ENTIDAD DE
CERTIFICACION DE
INFORMACION
Motivo: Estoy aprobando
este documento
Ubicación:
Fecha: 2021-09-15
16:37:05.00

Koch Kaiser, Alma Rosel

Directora

C.C.: 1708880792



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotros, Delgado Salgado Patricio Andrés y Muñoz Vera Cintia Estefanía, con cédulas de ciudadanía N° 1719996058 y 1003550074 respectivamente, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Identificación molecular de SARS-CoV-2 y concentración viral en aguas residuales como componente de vigilancia ambiental de la enfermedad COVID-19 en la ciudad de Ibarra – Imbabura** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 16 de septiembre de 2021

Firmas:

Delgado Salgado, Patricio Andrés

C.C.: 1719996058

Muñoz Vera, Cintia Estefanía

C.C.: 1003550074



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

CENTRO DE POSGRADOS

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotros Delgado Salgado Patricio Andrés y Muñoz Vera Cintia Estefanía, con cédulas de ciudadanía N° 1719996058 y 1003550074 respectivamente, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Identificación molecular de SARS-CoV-2 y concentración viral en aguas residuales como componente de vigilancia ambiental de la enfermedad COVID-19 en la ciudad de Ibarra – Imbabura** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 16 de septiembre de 2021

Firmas:

Delgado Salgado, Patricio Andrés
C.C.: 1719996058

Muñoz Vera, Cintia Estefanía
C.C.: 1003550074

DEDICATORIA

A Dios, ya que, gracias a él, obtuve la vida, sabiduría y fuerza requerida, cualidades que las seguiré teniendo para salir adelante en mi vida.

A mis padres, Patricio y Carmita, los que han sido y serán, el pilar fundamental en mi desarrollo como ser humano siempre demostrando los valores con los que fui criado desde pequeño.

A mi hermana Sarita, la personas que me ha demostrado la valentía que se debe tener para enfrentar todas las adversidades de la vida.

A todas las personas que me brindan su apoyo en el día a día y comparten todas las facetas de mi vida: familia, trabajo, estudios, deporte, siempre agradecido de corazón.

PATRICIO ANDRÉS DELGADO SALGADO

DEDICATORIA

A mi padre, a pesar de que no se encuentra físicamente en los momentos de mis logros, siempre estará en mi mente, en mi corazón y en mi esencia, pues siempre fue la principal persona que fomentó en mí, el deseo de superación y de triunfo en la vida.

A mi madre, el pilar fundamental que me sostiene, la persona que a lo largo de mi vida ha velado por mi bienestar demostrándome su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, a ti dedico cada día de esfuerzo para lograr lo que hoy soy.

A mi hija Romina, mi muñequita, quien se convirtió en mi mayor motivación para nunca rendirme y poder llegar a ser un orgullo y ejemplo para ella todos los días de mi vida.

CINTIA ESTEFANÍA MUÑOZ VERA

AGRADECIMIENTO

A Dios quien nos dio la fe, la esperanza y la fortaleza para vencer todos los obstáculos desde el principio de nuestras vidas y así llegar hasta este momento tan importante de nuestra formación profesional.

A nuestras familias que, con su infinito amor, bendiciones y apoyo incondicional, nos enseñan que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de voluntad y dedicación.

A la MSc. Almita Koch, tutora de este proyecto de investigación, muchas gracias por su tiempo, asesoramiento, dedicación y apoyo para poder cumplir con un logro profesional más en nuestras vidas.

Un especial agradecimiento al Laboratorio de la EMAPA-I y al Laboratorio SALUDLAB por las facilidades otorgadas, su colaboración para la ejecución y culminación de este proyecto de Posgrado.

A la MSc. Eliana Champutiz por su asesoría en el campo de biología molecular y manejo de equipos de PCR.

Al Ing. Giovani Rivadeneira por la buena disposición de ayuda al compartir su conocimiento científico y direccionar nuestras ideas para el cumplimiento de los objetivos.

A mi compañero y gran amigo Pato Delgado, por tu apoyo y sobre todo por haber sido parte de una importante meta de superación, la cual quedará siempre en mis recuerdos, gracias por los instantes de alegría compartidos en todo momento y en cualquier circunstancia.

Siempre agradecido con mi fiel amiga de maestría y de toda mi vida universitaria, muchas gracias Cinty por compartir este tiempo y demostrar que ninguna adversidad nos logró vencer y llegamos a la meta con la excelencia académica que nos representa.

PATRICIO ANDRÉS DELGADO SALGADO

CINTIA ESTEFANÍA MUÑOZ VERA

Índice de contenido

Índice de contenido.....	9
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras	12
Resumen	14
Antecedentes.....	16
Planteamiento del problema	18
Macro	18
Meso	19
Micro	21
Objetivos del proyecto	22
Objetivo general del proyecto.....	22
Objetivos específicos del proyecto	22
Justificación, importancia y alcance del proyecto.....	22
Hipótesis.....	24
Marco teórico referencial.....	25
Marco Legal	25
Constitución de la República del Ecuador.....	25
Código Orgánico del Ambiente	26
Reglamento al Código Orgánico del Ambiente.....	27
Ministerio de Salud Pública – Plan anual comprometido 2019	27
Marco epistemológico	28
Marco conceptual.....	31
Diseño de la investigación	34

Localización geográfica del área en estudio y comportamiento epidemiológico de COVID-19.....	34
Muestreo de las aguas residuales	39
Determinación físicoquímica y bacteriológica de aguas residuales.....	42
Determinación molecular de virus SARS-CoV-2 en aguas residuales	42
Presencia de carga viral, cuantificada por <i>RT-PCR-Real Time</i>	46
Caracterización de las aguas residuales mediante parámetros físicos, químicos y bacteriológicos.....	50
Relación entre la presencia de carga viral y condiciones físicoquímicas y bacteriológicas de las aguas residuales.	52
Referencias bibliográficas	63

Índice de tablas

Tabla 1. Densidad poblacional de la zona urbana de Ibarra	36
Tabla 2. Cuantificación viral por Ct, en las aguas residuales de los colectores ubicados en la zona urbana de Ibarra	49
Tabla 3. Parámetros físico-químicos y bacteriológicos de las muestras de aguas residuales. Ibarra	51

Índice de figuras

Figura 1 Representación del Virus SARS-CoV-2.....	29
Figura 2 Fases del PCR para diagnóstico In vitro.....	30
Figura 4 Red de Alcantarillado de Ibarra	37
Figura 5. Casos confirmados de COVID-19 en la zona urbana de Ibarra, distribuido por parroquias.....	38
Figura 6 Puntos de toma de muestras.....	40
Figura 7. <i>Forma de recolección de muestra</i>	41
Figura 8 <i>Procesamiento físicoquímico y bacteriológico de las muestras de aguas residuales</i>	42
Figura 9 <i>Procesamiento molecular – fase de concentración del material genético</i>	43
Figura 11. Amplificación de carga viral de SARS-CoV-2 de muestras de agua residual, periodo 1 (febrero 2021).	47
Figura 12. Amplificación de carga viral de SARS-CoV-2 de muestras de agua residual, periodo 2 (marzo 2021).....	48
Figura 13 <i>Correlación entre la temperatura (°C) y carga viral (medidas de Ct)</i> ..	52
Figura 14. <i>Correlación entre el pH (upH) y carga viral (medidas de Ct)</i>	53

Figura 15. *Correlación entre OD (mg/L) y carga viral (medidas de Ct)54*

Figura 17. *Correlación entre E. coli (UFC) y carga viral (medidas de Ct)55*

Resumen

La Gestión Ambiental es parte del control de las actividades antropogénicas en la naturaleza. Se han desarrollado programas ambientales de apoyo epidemiológico, convirtiéndose en una verdadera herramienta de soporte, conocida como Vigilancia Ambiental o Centinela. En Europa se está aplicando la vigilancia ambiental para el seguimiento epidemiológico del SARS-CoV-2, el agente etiológico de la enfermedad pandémica actual, COVID-19. Considerando que las aguas residuales contienen fragmentos genéticos del virus procedente de las heces fecales de personas infectadas o portadoras, en el presente estudio descriptivo, se identificó con RT-q-PCR, la presencia del virus en aguas residuales de la ciudad de Ibarra, concordando con la incidencia y/o prevalencia de casos confirmados oficialmente. Además, ha sido posible estimar cuantitativamente la carga viral (entre un umbral de ciclo de Ct 20 a Ct 28), dónde la relación es estadísticamente significativa entre los parámetros físicoquímicos y bacteriológicos con la concentración viral, por lo que se determina que los mismos pueden influenciar en la permanencia del agente viral, conforme a estudios realizados a nivel mundial. La información aquí obtenida brinda datos relevantes que pueden colaborar en el planeamiento de estrategias de vigilancia ambiental del comportamiento epidemiológico de COVID-19, sobre todo en comunidades donde se hace difícil hacer un diagnóstico o seguimiento a toda su población.

Palabras Clave

- **AGUAS RESIDUALES**
- **COVID-19**
- **PRUEBAS MOLECULARES PARA SARS-COV-2**
- **VIGILANCIA AMBIENTAL EPIDEMIOLÓGICA**

Abstract

Environmental Management is part of the control of anthropogenic activities in nature. Environmental epidemiological support programs have been developed, becoming a true support tool, known as Environmental Surveillance or Sentinel. In Europe, environmental surveillance is being applied for the epidemiological monitoring of SARS-CoV-2, the etiological agent of the current pandemic disease, COVID-19. Considering that wastewater contains genetic fragments of the virus from the feces of infected or carriers, in this descriptive study, the presence of the virus in wastewater from the city of Ibarra was identified with RT-q-PCR, agreeing with the incidence and / or prevalence of officially confirmed cases. In addition, it has been possible to quantitatively estimate the viral load (between a cycle threshold of Ct 20 to Ct 28), where the relationship is statistically significant between the physicochemical and bacteriological parameters with the viral concentration, which is why it is determined that they can influence the permanence of the viral agent, according to studies carried out worldwide. The information obtained here provides relevant data that can collaborate in the planning of strategies for environmental surveillance of the epidemiological behavior of COVID-19, especially in communities where it is difficult to diagnose or monitor the entire population.

Keywords:

- **WASTEWATER**
- **COVID-19**
- **MOLECULAR TESTS FOR SARS-COV-2**
- **EPIDEMIOLOGICAL ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE**

CAPÍTULO 1

Antecedentes

El monitoreo ambiental con respecto a la calidad de aire, suelo o aguas ha sido una estrategia que ha tenido éxito en cuanto al rastreo de marcadores químicos y/o biológicos de la actividad humana. También ha servido para la detección de material genético (virus entéricos, hepatitis E y poliovirus) en aguas residuales para vigilancia y control de enfermedades virales (Xiao, 2020).

Investigaciones a nivel mundial muestran presencia de RNA de SARS-CoV-2 en aguas residuales, debido a la eliminación de carga viral en las heces de pacientes infectados, con o sin sintomatología, con una persistencia de entre 14 a 21 días y una variación de 10^2 a 10^8 copias de RNA por mililitro (Usman, Farooq & Hanna, 2020).

Aunque el SARS-CoV-2 se ha evidenciado en aguas residuales, los resultados de experimentos in vitro sugieren que la actividad del virus podría estar en estado infeccioso, especialmente en climas fríos. Sin embargo, el conocimiento actual es escaso (Carducci A, Federigi I, Liu D, Thompson J & Verani M, 2020).

En los Países Bajos, Medema et al., (2020) monitorearon muestras de aguas residuales y obtuvieron señales positivas en 14 (77,8%) de las 18 muestras recogidas tras la ocurrencia de los primeros casos de COVID-19; los análisis se realizaron por PCR en tiempo real, no obstante, conforme han avanzado las investigaciones, ha sido posible establecer correlación entre carga viral en aguas residuales y casos detectados en la comunidad.

En países europeos ha sido posible establecer una alta sensibilidad para la presencia del virus, incluso con prevalencia baja de la enfermedad, lo que ha permitido en España implementar vigilancia ambiental en aguas residuales, utilizando este procedimiento como indicador epidemiológico para la detección de la circulación del SARS-CoV-2 en la comunidad (Gonzales & Chiroles, 2010). Con base en el contexto anterior, se ha desarrollado un método estándar propuesto por VIARAL-CSIC (2020), como “Protocolo para la detección de SARS-CoV-2 en aguas residuales”, que puede ser aplicado, con las adaptaciones necesarias, para la vigilancia ambiental en varias regiones y/o comunidades.

En lo que respecta a diagnóstico oportuno en el Ecuador, se han implementado programas de detección y tamizaje para anticuerpos, así como identificación genética de regiones conservadas de genes virales por la técnica de RT-q-PCR para pacientes que presenten sintomatología sospechosa o personal de salud con contacto directo en ciudades grandes. Sin embargo, las áreas alejadas de las urbes han sufrido su ausencia. En varias localidades, donde se han detectado casos, generalmente el diagnóstico ha surgido cuando el paciente se ha trasladado a unidades de salud más cercanas de segundo nivel (ubicadas en los centros urbanos), lo que conlleva a una baja prevalencia (aparentemente falsa por la movilidad) y a una falta de atención.

En el Ecuador, no se han implementado técnicas de vigilancia ambiental frente a COVID-19, pero se han realizado estudios que muestran el uso de la cuantificación viral de Adenovirus Humano para la evaluación del impacto microbiano en aguas residuales (Bonifaz, 2018). Asimismo, Guerrero et al. (2020), determinaron la presencia de genes de la nucleocápside de SARS-CoV-2 en aguas residuales en la ciudad de Quito, en concentraciones relacionadas con los casos reportados y su epidemiología.

Bajo las circunstancias actuales, el método de vigilancia ambiental puede ser una herramienta eficaz para implementarse con los planes de vigilancia epidemiológica y coordinar estrategias de monitoreo sectorial, con respecto a rebrotes o donde la infección no ha sido detectada, sea por falta de diagnóstico o presencia de pacientes asintomáticos (Municipal Water Leader, 2020).

Planteamiento del problema

Macro

Los primeros casos de COVID-19 se identificaron a fines del año 2019 y en marzo del año 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la enfermedad COVID-19 como una pandemia a nivel mundial.

El virus SARS-CoV-2 produce la enfermedad COVID-19, de naturaleza principalmente respiratoria, Xiao y colaboradores (2020), posteriormente confirman la presencia de su material genético en las heces de individuos infectados, sus hallazgos indican la necesidad de proponer estudios que los relacionen con los casos activos de COVID-19 reportados.

Cualquier virus excretado fecalmente ineludiblemente alcanza las aguas residuales, y su presencia constituye una prueba de su circulación en la población si las aguas no son tratadas antes de su uso (Bosch, Sánchez, Pintó & Guis, 2020). Los resultados obtenidos en varias investigaciones realizadas en Europa revelan que las aguas que ingresan a las plantas de tratamiento de agua residual contienen ARN del SARS-CoV-2, pero el efluente tratado carece de él, debido a las tecnologías de desinfección de estas instalaciones (Sánchez, 2020).

La presencia de virus que pueden estar inactivados en las aguas servidas, más que mostrar una fuente de infección, ha servido para establecer planes de vigilancia ambiental con la finalidad de la implementación de políticas públicas para el control de la contaminación o indirectamente para monitorear y controlar actividades humanas ilícitas, peligrosas o de tipo sanitario como seguimiento de enfermedades víricas como polio, Hepatitis E, Adenovirus entérico, y actualmente SARS-CoV-2 (Municipal Water Leader, 2020).

Aún existe una brecha de conocimiento significativa con respecto a la transmisión, persistencia y destino del SARS-CoV-2 en las aguas residuales y el medio ambiente, lo que requiere una mayor comprensión de la dinámica ambiental. Se necesita investigación para entender las interacciones del virus con el medio ambiente, su destino y permanencia en el suelo, en el agua y potencialmente en la cadena alimentaria (Usman, Farooq & Hanna, 2020).

Meso

Si bien todavía no hay evidencia suficiente en países subdesarrollados para recomendar la vigilancia ambiental como un enfoque estándar para la epidemiología de Covid-19, los datos de investigaciones pueden contribuir al conocimiento sobre el virus mediante la dinámica de su diseminación y la contaminación ambiental. No obstante, se reconoce que el muestreo ambiental podría ayudar a saber dónde buscar el virus de una manera sostenible, con un costo razonable y sin que se colapse la capacidad de diagnóstico en los establecimientos de salud (Sánchez et al., 2020).

En Latinoamérica existen pocos estudios científicos sobre la presencia del virus en el agua y sus riesgos potenciales. Sin embargo, el tema cobra relevancia por su

relación con las descargas de aguas residuales (especialmente las no tratadas), a los ríos, arroyos, lagos, lagunas y embalses de presas, con riesgos potenciales para el medio ambiente y la salud humana (Mundo, 2020).

La Academia de Ciencias de Nicaragua, 2020, señala la necesidad de vincular la crisis del COVID-19 con el tema climático-ambiental, y dice que las medidas de respuesta no pueden ser solamente higiénico-sanitarias, sino también necesariamente ambientales, ya que sus recursos hídricos se encuentran afectados negativamente por las descargas de aguas residuales. Además, los retos más grandes que enfrenta el sistema de salud nicaragüense son la pobreza, la inequidad social y geográfica, así como la falta de recursos públicos para lograr la cobertura universal en salud de manera equitativa, realidad muy parecida a otros países latinos como el Ecuador.

Estudios hacen mención a la situación en Brasil, uno de los países más grandes de Sudamérica y el más afectado por la pandemia COVID-19, las limitaciones financieras y operativas en los sistemas de salud para la detección y vigilancia de la enfermedad han hecho que centros de investigación se sumen al uso de la epidemiología de alcantarillado como herramienta de diagnóstico colectivo, debido a la presencia del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales, considerándola una estrategia de fortalecimiento y menos costosa para el país (Souza et al., 2020).

En el Ecuador, el único estudio realizado en el 2020 por Guerrero y colaboradores, menciona la detección de cargas virales importantes de SARSCoV-2 en los arroyos urbanos de Quito, sugiriendo que el número de casos es probablemente mayor a los reportes oficiales, establece que la cobertura de tratamiento de aguas residuales es escasa y esta situación se convierte en un factor de contaminación ambiental en aumento.

Micro

La presente investigación es relevante, pues al momento no se ha desarrollado estudios de este tipo ni similares en el área a intervenir, además, en las últimas estadísticas epidemiológicas, Ibarra es una de las ocho ciudades con mayor tasa de crecimiento de infección (GAD Ibarra, 2020).

Con base a los datos del Ministerio de Salud Pública, hasta la fecha 27 de octubre de 2020 el porcentaje de positividad en Ibarra alcanzó el 52.86% estimando aproximadamente 2.324 casos confirmados por pruebas PCR, siendo el cantón con mayor número de casos positivos en la provincia de Imbabura.

Uno de los problemas que enfrentan las autoridades locales para evitar la proliferación del nuevo virus, especialmente en Ibarra, es la presencia masiva de comerciantes informales en las calles, la falta de cumplimiento de los protocolos de bioseguridad y el bajo control mediante pruebas de laboratorio para la oportuna detección de casos positivos (GAD Ibarra, 2020).

Sin embargo, la información oficial advierte que la variación de los casos no tiene relación con un crecimiento significativo de contagiados, sino con un aumento de los resultados de las pruebas de laboratorio ingresados al Sistema de Vigilancia Epidemiológica, se corre el riesgo, entonces, de no considerar a personas asintomáticas en los reportes oficiales, pero constituyen una fuente importante de propagación del virus.

Objetivos del proyecto

Objetivo general del proyecto

Identificar molecularmente SARS-CoV-2 y su concentración en aguas residuales como componente de vigilancia ambiental de la enfermedad COVID-19 en la ciudad de Ibarra.

Objetivos específicos del proyecto

- Determinar la presencia y carga viral (secuencia genética conservada del gen N, gen RdRP y del gen E) a través de la técnica de RT-q-PCR en las muestras de aguas residuales de los colectores establecidos.
- Caracterizar las muestras de aguas residuales mediante parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos, para determinar condiciones de permanencia del virus en los puntos de muestreo.
- Establecer la variabilidad de la presencia y concentración de SARS-CoV-2 en los diferentes puntos de muestreo (colectores de aguas residuales) como complemento a los datos de salud pública.

Justificación, importancia y alcance del proyecto

La emergencia actual del SARS-CoV-2 y su rápida propagación exige una atención prioritaria a todos sus componentes. La vigilancia epidemiológica se ha convertido en una herramienta primordial para el control de la pandemia, sin embargo, en países en desarrollo existen limitaciones tecnológicas, económicas y sociopolíticas que

impiden un buen desarrollo en las estrategias aplicadas como se ha hecho en regiones europeas (Gonzales & Chiroles, 2010).

Ciertas familias de virus, como los coronavirus, pueden afectar el tracto digestivo y son excretados en heces fecales por lo que llegan a aguas residuales, constituyendo su presencia la prueba de circulación de dicho virus en la comunidad. En los años 1955 se instauró por primera vez en Nueva Delhi, la caracterización molecular del rotavirus en aguas residuales, como predictor de la eficiencia de la vacunación, a partir de allí, el mensaje que llevan las aguas residuales ha podido contribuir al control de enfermedades virales como hepatitis A, poliomielitis, encefalitis e incluso la fiebre hemorrágica producida por Ébola (Sarmiento, 2019).

El monitoreo de aguas residuales ha sido una estrategia exitosa para rastrear marcadores químicos y biológicos de la actividad humana, incluidos adenovirus y genes de resistencia a los antimicrobianos. Las pruebas de aguas residuales se han sugerido como una herramienta de alerta temprana no invasiva para monitorear el estado de los cuerpos hídricos y la tendencia de la presencia de varios agentes patógenos humanos (IDEXX WATER, 2020).

La vigilancia de aguas residuales ciertamente no es un sustituto de las pruebas clínicas, pero es una gran manera de complementar la información con la finalidad de establecer posibles casos no detectados de COVID-19 en la comunidad, además permite analizar la circulación del virus en la población (Municipal Water Leader, 2020).

En el ámbito enunciado, el problema científico-técnico de estudio se encaminará a investigar la presencia de SARS-CoV-2 en las aguas residuales de las poblaciones del sector urbano de Ibarra, los resultados obtenidos permitirán establecer una vigilancia

ambiental de COVID-19 en aguas servidas. Consecuentemente, la investigación se orienta principalmente a dar respuesta a la siguiente interrogante: ¿Existe presencia del virus SARS-CoV-2 en las aguas residuales de la ciudad de Ibarra, su concentración y relación con los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos?

Hipótesis

La detección molecular de la presencia del virus SARS-CoV-2 y su concentración en aguas residuales, se usa como vigilancia ambiental a fin de dar un seguimiento de la enfermedad COVID-19 en la ciudad de Ibarra.

CAPÍTULO 2

Marco teórico referencial

Marco Legal

Constitución de la República del Ecuador

La revisión de la Constitución de la República del Ecuador (Registro Oficial 449 de 20-oct-2008), parte del Título II: DERECHOS en donde el capítulo segundo: Derechos del buen vivir, sección segunda, referente a Ambiente sano, **Art. 14.-** cita al reconocimiento del derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*. (...). El **Art. 66.-** del capítulo sexto: Derechos de libertad (literal 27), reconoce y garantiza a las personas: el derecho a vivir en un ambiente sano, ecológicamente equilibrado, libre de contaminación y en armonía con la naturaleza. Parte del **Art. 74.-** del capítulo sexto: derechos de la naturaleza, menciona que, los servicios ambientales no serán susceptibles de apropiación; su producción, prestación, uso y aprovechamiento serán regulados por el Estado. El capítulo séptimo el cual corresponde a “*derechos de la naturaleza*”, menciona que el Estado incentivará a las personas naturales y jurídicas, y a los colectivos, para que protejan la naturaleza, y promoverá el respeto a todos los elementos que forman un ecosistema.

En base al Título VII: RÉGIMEN DEL BUEN VIVIR, capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales, Sección primera referente a Naturaleza y ambiente se puede destacar los Artículos: **Art. 395.-** La Constitución reconoce los siguientes principios ambientales: Las políticas de gestión ambiental se aplicarán de manera transversal y serán de obligatorio cumplimiento por parte del Estado en todos sus niveles

y por todas las personas naturales o jurídicas en el territorio nacional (literal 2) y el Estado garantizará la participación activa y permanente de las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades afectadas, en la planificación, ejecución y control de toda actividad que genere impactos ambientales (literal 3). **Art. 396.-** El Estado adoptará las políticas y medidas oportunas que eviten los impactos ambientales negativos, cuando exista certidumbre de daño. En caso de duda sobre el impacto ambiental de alguna acción u omisión, aunque no exista evidencia científica del daño, el Estado adoptará medidas protectoras eficaces y oportunas (...). **Art. 397.-** se refiere a daños ambientales, en donde el Estado actuará de manera inmediata y subsidiaria para garantizar la salud y la restauración de los ecosistemas. Además de la sanción correspondiente, el Estado repetirá contra el operador de la actividad que produjera el daño las obligaciones que conlleve la reparación integral, en las condiciones y con los procedimientos que la ley establezca. La responsabilidad también recaerá sobre las servidoras o servidores responsables de realizar el control ambiental.

Además, para garantizar el derecho individual y colectivo a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, el Estado se compromete a: Regular la producción, importación, distribución, uso y disposición final de materiales tóxicos y peligrosos para las personas o el ambiente (literal 3).

Código Orgánico del Ambiente

El Código Orgánico del Ambiente (COA) el cual entró en vigencia en el año 2017, es considerado como una ley macro que regula el campo administrativo – ambiental, y que tiene por objeto garantizar: el derecho de las personas a un ambiente sano y equilibrado y los derechos de la Naturaleza.

El COA establece normativa para el control de calidad de agua en el **Art. 191.-** Del monitoreo de la calidad del aire, agua y suelo. “La Autoridad Ambiental Nacional o el Gobierno Autónomo Descentralizado competente, en coordinación con las demás autoridades competentes, según corresponda, realizarán el monitoreo y seguimiento de la calidad del aire, agua y suelo, de conformidad con las normas reglamentarias y técnicas que se expidan para el efecto. Se dictarán y actualizarán periódicamente las normas técnicas, de conformidad con las reglas establecidas en este Código. Las instituciones competentes en la materia promoverán y fomentarán la generación de la información, así como la investigación sobre la contaminación atmosférica, a los cuerpos hídricos y al suelo, con el fin de determinar sus causas, efectos y alternativas para su reducción”.

Reglamento al Código Orgánico del Ambiente

El Reglamento al Código Orgánico del Ambiente constituye una normativa de obligatorio cumplimiento para todas las entidades privadas y públicas, desarrolla y estructura la normativa necesaria para dotar de aplicabilidad a lo dispuesto en el Código Orgánico del Ambiente, tomando en cuenta de manera específica los artículos dispuestos en el capítulo II: Mecanismo de Control y Seguimiento Ambiental, **Art. 201.-** de la vigilancia ambiental, ciudadana o comunitaria.

Ministerio de Salud Pública – Plan anual comprometido 2019

Dentro de la gobernabilidad por resultados, el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, en su objetivo 20, alineado con el Plan Estratégico Institucional 2017-2021 y en respuesta al Objetivo 3 del Plan Nacional Toda una Vida 2017-2021, propone: Incrementar la calidad de la vigilancia y control sanitario en el Sistema Nacional de Salud.

Marco epistemológico

Ante la nueva enfermedad infecciosa de propagación a nivel mundial, con un brote inicial en China en diciembre de 2019, fue etiológicamente relacionada con una nueva cepa de coronavirus y por ello se la denominó COVID-19. Al 23 de octubre de 2020, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha notificado 41'570.883 casos confirmados y 1'134.940 muertes en todo el mundo; de estos, 156.451 casos han sido reportados en Ecuador con 12.500 muertes (<https://covid19.who.int/region/amro/country/ec>). A partir del 14 de septiembre, los COE cantonales asumen la responsabilidad del monitoreo con respecto a su comunidad, reportándose en el cantón Ibarra, provincia de Imbabura, 2303 casos, hasta el 27 de octubre de 2020 (Coordinación Zonal 1, 2020).

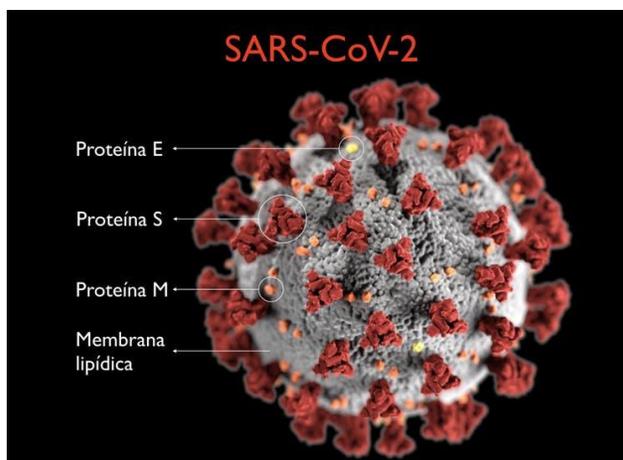
Los virus son agentes infecciosos ubicuos a nano escala que existen como partículas extracelulares, formados por un ácido nucleico (contiene la información genética) rodeado por una capa protectora o cápside. Algunos virus también pueden tener una capa lipídica la cual rodea la capa de proteína. El ácido nucleico puede ser ya sea ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). No pueden crecer fuera del organismo huésped (es decir, bacterias, plantas o animales) y no necesitan alimentos. Son capaces de sobrevivir durante largos períodos de tiempo, especialmente a bajas temperaturas en el medio ambiente (Henze, Loosdrecht, Ekama & Brdjanovic, 2008).

Los coronavirus (CoV) son virus monocatenarios, de ARN de sentido positivo, que varían de 60 a 220 nm de tamaño. El nombre deriva de las glicoproteínas puntiagudas dando una forma de corona. Estudios recientes han sugerido que la glicoproteína de pico de SARS-CoV-2 (Figura 2) se une a los receptores humanos con mayor afinidad que el

SARS-CoV-1, lo que da lugar a un virión más infeccioso (Bogler et al., 2020); actualmente etiológicamente relacionado con la infección pandémica de COVID-19.

Figura 1

Representación del Virus SARS-CoV-2



Nota: Representación gráfica del virus SARS-CoV-2, que muestra las espículas, principales estructuras antigénicas virales. Tomado de *Bogler et al., 2020*.

Con la comprobación previa de varios estudios realizados a nivel mundial, se conoce que los pacientes con la infección COVID-19 expulsan SARS-CoV-2 en las heces, en concentraciones relacionadas con su carga viral, independientemente de que presenten sintomatología, esas descargas ineludiblemente llegan a las aguas residuales de la localidad de su residencia, pudiendo ser identificados mediante pruebas genéticas que incluyen técnicas moleculares como Hibridación, Detección de Ácidos Nucleicos (NAT) y la más usada por su sensibilidad y especificidad, la Reacción en Cadena la Polimerasa en Tiempo Real por Retrotranscripción para casos de virus RNA (RT-q-PCR) (Bogler et al., 2020).

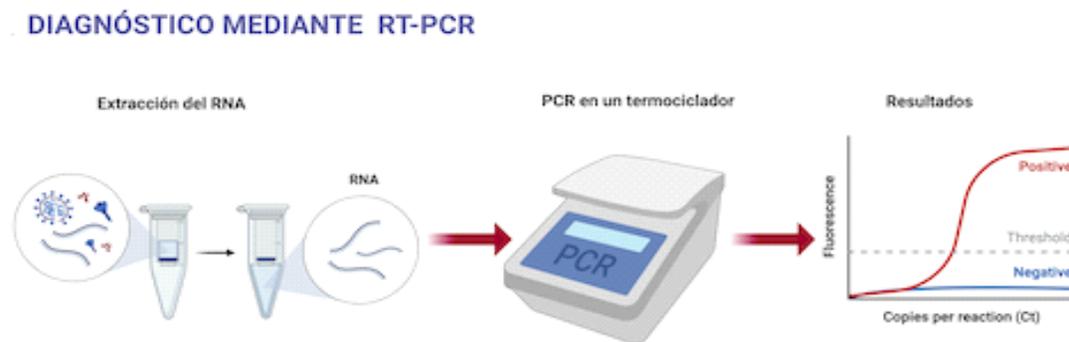
Aguilera y colaboradores (2014) mencionan que “la PCR en tiempo real, es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el

producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia” (Figura 2). Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10⁷ equivalentes genómicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior” p. 176.

Los enfoques moleculares se dirigen al ARN del SARS-CoV y pueden proporcionar estimaciones de la presencia y abundancia de copias (o fragmentos) de ARN en una muestra de agua. Varios países han incluido este método (detección molecular de SARS-CoV-2 en aguas residuales por RT-q-PCR) como predictor epidemiológico para COVID-19 (Bogler et al., 2020).

Figura 2

Fases del PCR para diagnóstico *In vitro*



Nota: Diferentes fases para la detección/cuantificación de RNA viral por medio de PCR. Tomado de *Aguilera et al.*, 2014.

Conforme a la bibliografía de sustento, es importante conocer factores que intervienen en el tiempo de supervivencia del virus, las temperaturas más altas, un pH

elevado o bajo y la luz solar facilitan la reducción de la cantidad de partículas virales (OMS, 2020).

Marco conceptual

La gestión ambiental es el conjunto de acciones pertinentes hacia el manejo integral del medio ambiente, con el fin de lograr una adecuada calidad de vida, previniendo o mitigando los problemas ambientales.

Según Castro (2016), la gestión ambiental es una estrategia para la determinación de parámetros controlados con carácter de vigilancia, es decir que permite alertar respecto de una variación significativa en su concentración y por lo tanto detectar alteraciones en los indicadores fisicoquímicos y microbiológicos.

El Sistema Nacional de Vigilancia de Aguas Residuales de Estados Unidos (NWSS), por sus siglas en inglés) ha hecho que el análisis de aguas residuales a lo largo de un período logre aportar datos de tendencias que pueden complementar otros datos de vigilancia como base para la toma de decisiones de salud pública.

La vigilancia de enfermedades transmitidas por aguas residuales es una ciencia de rápido desarrollo, los datos generados a través del NWSS (2020), ayudarán a los funcionarios de salud pública a comprender mejor en qué medida se propaga en las comunidades ciertas infecciones causadas por virus excretados en heces. Actualmente analizar los restos de ARN en las aguas residuales para detectar SARS-CoV-2, el virus que causa el COVID-19, puede ser el principal indicador de los cambios en la carga de COVID-19 en una comunidad, dentro de la vigilancia ambiental.

Las aguas residuales se pueden definir como aquellas que, por uso del hombre, representan un peligro y deben ser desechadas, porque contienen gran cantidad de sustancias y/o microorganismos. Estas aguas residuales pueden incluir diversos orígenes (Espigares & Pérez, 1985).

Las aguas residuales han llegado a ser consideradas como un recurso importante que puede ser utilizado sin limitaciones siempre y cuando se establezca las medidas necesarias para proteger la salud y el ambiente. El uso de aguas residuales en cultivos es cada vez más común, ya que contienen nutrientes para el desarrollo de las plantas. Sin embargo, cuando su calidad no es la adecuada existe el riesgo de la transmisión de enfermedades relacionadas con nemátodos intestinales, bacterias fecales y agentes virales a consumidores y agricultores (Gonzales & Chiroles, 2010).

Las aguas residuales pueden contar una historia importante sobre la salud de una comunidad. En el marco de COVID-19, el material genético del coronavirus es ARN, presente en cada virus individual y, a menudo, permanece mucho tiempo después de que el virus ya no es capaz de infectar a un huésped y causar una enfermedad, por lo que la idea básica de la vigilancia ambiental no es buscar virus activos en aguas residuales, sino el material genético que prueba que el virus está o estaba presente en una comunidad (Municipal Water Leader, 2020).

Los coronavirus son una amplia familia de virus que normalmente afectan sólo a los animales. Algunos tienen la capacidad de transmitirse de los animales a las personas. Producen cuadros clínicos que van desde el resfriado común hasta enfermedades más graves y la muerte. El SARS-CoV-2 es un nuevo tipo de coronavirus que puede afectar de diferentes formas a las personas y fue detectado por primera vez en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, en China y produce la enfermedad COVID-

19 (Organización Mundial de las Salud, 2020) para diseminarse por todo el planeta en 2020.

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 cebadores para la detección de adenovirus, por al menos 20 años, ha permitido su uso exhaustivo hasta la actualidad (Allar et al., 2001; De Giglio et al., 2017; Iaconelli et al., 2017).

Más recientemente, la vigilancia de aguas residuales se ha propuesto por un lado la detección temprana de brotes virales, así como la persistencia de indicadores virales en el medio acuático. El método mayor utilizado es la PCR (qRT-PCR) ya que esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad en la detección de regiones genómicas conservadas permitiendo determinar el agente viral el cual se está analizando.

CAPÍTULO 3

Diseño de la investigación

La investigación está enfocada a la vigilancia ambiental, con una aproximación al uso de análisis moleculares para identificar la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales de locaciones urbanas de Ibarra, Provincia de Imbabura-Ecuador.

A través de la aplicación de un método descriptivo de carácter cuali-cuantitativo, mediante el análisis de los resultados, es posible cumplir con los objetivos planteados.

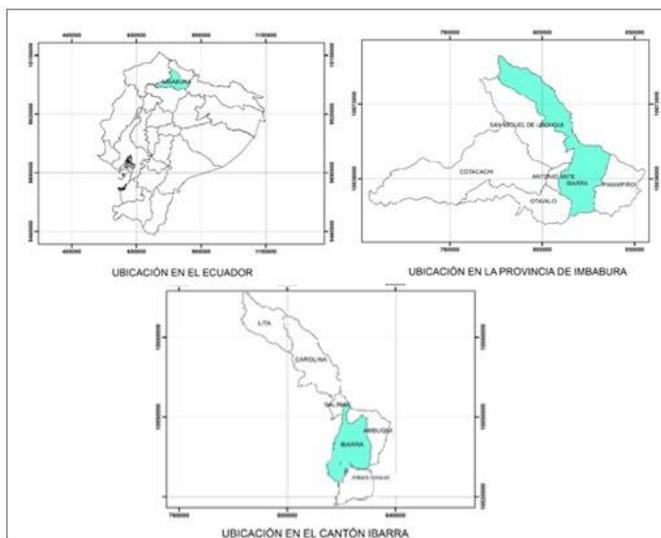
Para sustentar científicamente el desarrollo de este estudio, se requirió una exhaustiva investigación documental, revisión y análisis de artículos y documentos relacionados con el tema, utilizando herramientas informáticas como Google académico, NCBI, biblioteca virtual ESPE para consultar en revistas indexadas, libros, manuales, y/o tesis, información relevante sobre determinación de virus en agua por técnicas moleculares.

Localización geográfica del área en estudio y comportamiento epidemiológico de COVID-19

El área geográfica del estudio, corresponde al área urbana del cantón Ibarra – Provincia de Imbabura, Ecuador (Figura 3); la selección se hizo en base a la prevalencia y comportamiento epidemiológico de COVID-19 y por las facilidades de acceder a realizar la mencionada investigación.

Figura 3

Localización geográfica de la zona de estudio



Nota: El gráfico representa la ubicación de la zona de estudio, siendo la ciudad de Ibarra, Provincia de Imbabura.

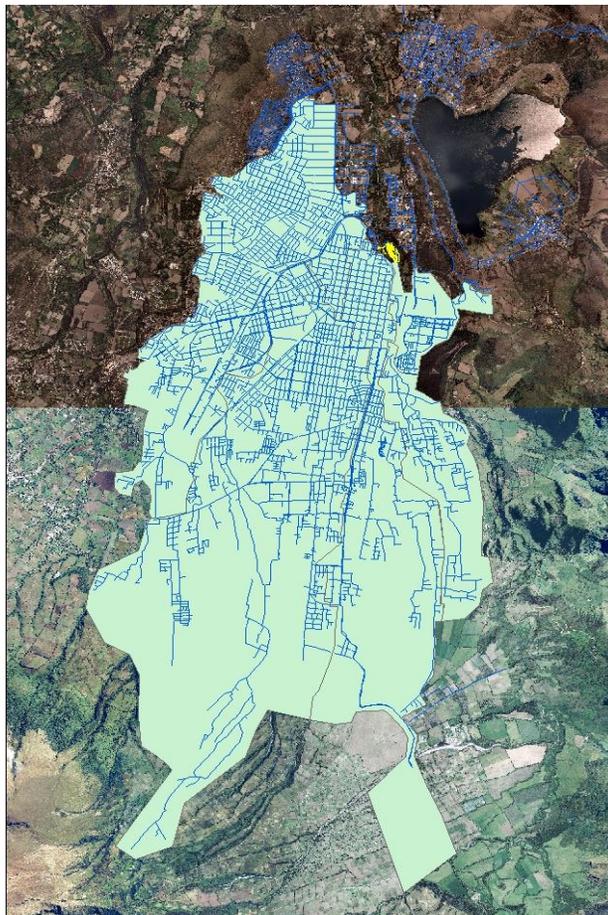
Ibarra tiene una población de 170.549 habitantes (proyección a 2020, según INEC), la zona urbana está conformada de 5 parroquias: EL Sagrario, San Francisco, Alpachaca, Caranqui y Priorato y cuentan con el 77,21% de la Población Económicamente Activa (PCA); este sector urbano tiene una extensión aproximada de 242,09 Km² y una población de 170.548,69 habitantes. En la tabla 1, se muestra la densidad poblacional por parroquia.

Tabla 1*Densidad poblacional de la zona urbana de Ibarra*

Parroquia	Densidad poblacional	Barrios
Caranqui	758,25 hab/km ²	25
Alpachaca	3.693 hab/km ²	23
Priorato	1.238,02 hab/km ²	12
Sagrario	1.460,06 hab/km ²	45
San Francisco	1.333,06 hab/km ²	11

Nota: Esta tabla muestra los datos de densidad poblacional de la ciudad de Ibarra sectorizado. Tomado de *Actualización del Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Ibarra, 2020*.

Los colectores han sido colocados conforme a la demanda en función de la densidad poblacional, sin embargo, la red de alcantarillado (Figura 4) tiene algo más de 10 años y en ciertos sectores se están presentando inundaciones pues ciertos colectores no abastecen para el flujo, especialmente en épocas de precipitaciones, que ocurren en marzo y abril preponderantemente.

Figura 3*Red de Alcantarillado de Ibarra*

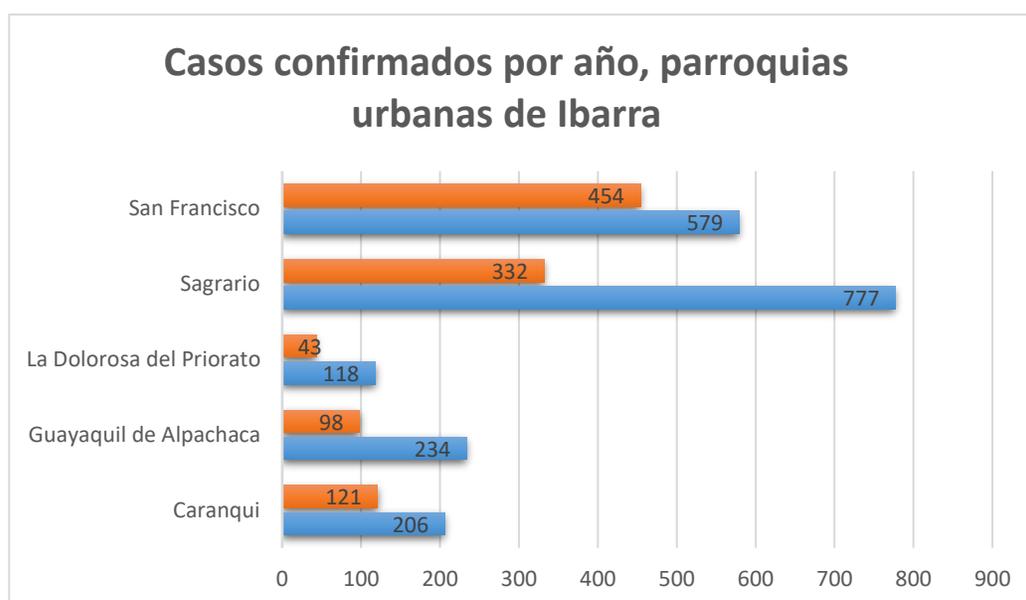
Nota: Este gráfico presenta como se encuentra establecida la red de alcantarillado en la zona urbana de Ibarra. Tomado del *plan maestro de alcantarillado de la EMAPA-I*, 2021.

Los datos epidemiológicos por parroquia, en el caso del cantón Ibarra han sido difíciles de conseguir pues no están disponibles en la web. Sin embargo, se ha logrado conseguir información estadística que sirve para establecer datos referenciales del comportamiento epidemiológico en función de las parroquias, con lo que es posible también, relacionar la presencia del virus y su concentración viral aproximada. En la figura

5, se muestra una comparación en la presentación de casos por parroquias urbanas de Ibarra. Esta figura permite visualizar el número de casos que es proporcional a los periodos de corte. La barra naranja consolida los casos del año 2021, a corte de 30 de abril y barra azul presenta el número de casos al corte de 30 de octubre de 2020.

Figura 4.

Casos confirmados de COVID-19 en la zona urbana de Ibarra, distribuido por parroquias.



Nota: La línea azul son los casos del año 2021 a corte de 30 de abril del 2021 y la línea naranja son los casos al corte de 30 de octubre de 2020, por parroquias urbanas de Ibarra. Tomado de *Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica MSP*, disponible en https://public.tableau.com/profile/direcci.n.nacional.de.vigilancia.epidemiol.gica.msp#!/vizhome/COVID19ecu_MSP_DNVE/COVID-19MSP.

Muestreo de las aguas residuales

La red de alcantarillado de la zona urbana de Ibarra fluye a 6 colectores estratégicamente ubicados (Figura 6), desembocando todos los efluentes en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) de Ibarra; es a partir de estos colectores que se proyectó realizar el muestreo de sus aguas residuales; la información requerida para esta actividad fue proporcionada por la Empresa Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Ibarra EMAPA-I, con ayuda de herramientas de información geográfica se establecieron los puntos de colección de acuerdo al área de aportación de aguas residuales que genera la población.

Figura 5

Puntos de toma de muestras



Nota: Red de alcantarillado y disposición geográfica de los colectores del área urbana de Ibarra. Tomado de la EMAPA-I, 2021

Las muestras se tomaron en dos tiempos (10 de febrero y 10 de marzo del 2021) y la cantidad fue proporcional a la cantidad de flujo de cada uno, garantizando de esta forma que la cantidad de aguas residuales de cada hogar fuera comparable entre los dos periodos de muestreo, considerando que la variación del flujo en gran medida está dada por la precipitación.

Se realizó la toma de muestras (Figura 7) siguiendo el protocolo para la detección de aguas residuales de VIARAL-CSIC; este protocolo recomienda hacer las tomas

durante el momento más representativo del día donde existiera mayor concentración de partículas virales que, para esta investigación se consideró que las partículas virales se excretan con las heces, siendo el horario de muestreo entre las 7h00 y 10h00.

Las muestras colectadas tuvieron 1250 mL aproximadamente en promedio por cada colector. Se trasladaron 250 mL hasta el laboratorio de la EMAPA-I manteniendo la cadena de frío (4 - 8 °C), para realizar la caracterización físicoquímica y bacteriológica en el mismo laboratorio. El volumen restante fue transportado y conservado en congelación (-20 °C) hasta el procesamiento por técnicas moleculares, en el Laboratorio particular que colaboró en el estudio.

Figura 6.

Forma de recolección de muestra



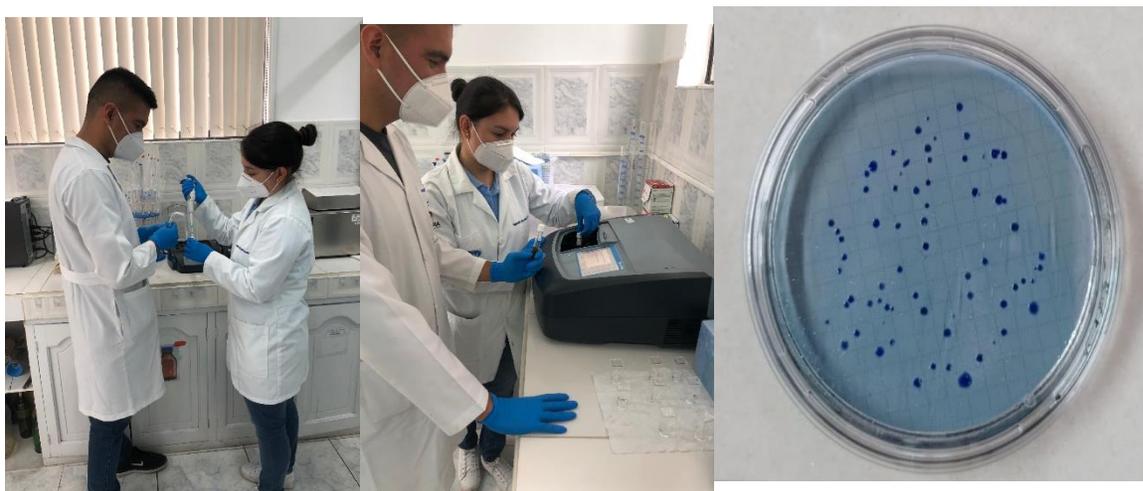
Nota: El gráfico muestra la recolección de las muestras de aguas residuales en el colector correspondiente para analizar en laboratorio.

Determinación físicoquímica y bacteriológica de aguas residuales

Para determinar la supervivencia y persistencia del SARS CoV-2 en las aguas residuales, se caracterizaron mediante parámetros físicos como: pH, temperatura, conductividad y oxígeno disuelto (todos evaluados *in situ*), químicos (DQO) y bacteriológicos (*E. coli*) en el Laboratorio EMAPA-I (Figura 8), mediante técnicas analíticas establecidas en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de la American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation versión 23, año 2017.

Figura 7

Procesamiento físicoquímico y bacteriológico de las muestras de aguas residuales



Nota: El gráfico muestra el procesamiento de las muestras de aguas residuales colectadas en laboratorio.

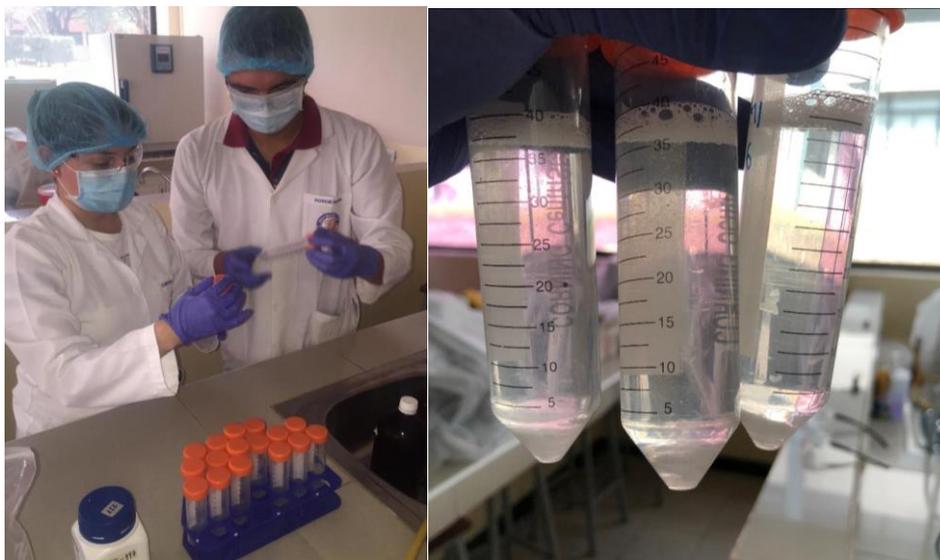
Determinación molecular de virus SARS-CoV-2 en aguas residuales

Las aguas residuales fueron conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. La concentración viral de las muestras de aguas residuales (Figura 9) se hizo a través de la metodología de precipitación con polietilenglicol (PEG 8000) de acuerdo al protocolo

propuesto por IDEXX WATER (2020). Con el concentrado se procedió a determinar la presencia y concentración de partículas virales a través de la técnica molecular *RT-PCR-Real Time* (Reacción en Cadena de la Polimerasa por retrotranscripción en tiempo real), usando para la extracción de ARN, el kit de BIOCOTMMA, el cual usa una membrana de sílica para la adsorción en columnas apto para extracción de DNA/RNA en varias muestras, incluyendo muestras ambientales; para la amplificación/detección se usó el kit de GeneProof®, de regiones conservadas del virus del gen N (específico de SARS-CoV-2), gen RdRp (específico de SARS) y gen E (específico de Coronavirus) en un primer policlonal, con una sensibilidad de 66,19 copias/mL, una característica particular para haber seleccionado este reactivo, fue que el mismo viene preparado el Master Mix, reduciendo al máximo los errores clásicos de la fase de preparación de este, incrementando así la sensibilidad. El equipo para la lectura de la fluorescencia fue el Equipo eQ164 *Real-Time PCR*.

Figura 8

Procesamiento molecular – fase de concentración del material genético



Nota: El gráfico muestra el procesamiento para la concentración del virus en las muestras de aguas residuales colectadas.

La extracción de ácidos nucleicos (Figura 10) se hizo conforme a las instrucciones del fabricante. Para la amplificación se usó un control positivo por cada corrida de muestras (periodo1 y periodo 2). Las muestras fueron codificadas al azar por un tercero, para evitar posibles sesgos de manipulación durante el proceso.

Figura 10

Procesamiento molecular – fase de determinación molecular por PCR



Nota: El gráfico muestra el procesamiento molecular (PCR en tiempo real) de las muestras de aguas residuales colectadas.

Mediante el Sistema eQ164CP Real-Time PCR se interpretó los resultados que se dieron en base a la amplificación de las secuencias virales target, determinadas en función del Ct (Umbral del ciclo), que es la intersección entre la curva de amplificación y una línea umbral, esta es una medida relativa de la concentración del gen (o genes)

amplificado en la reacción diana y ayuda a dar una cuantificación en relación con la muestra analizada; mientras más cercano esté al valor de corte de la técnica ($Ct=38$) se considera menor concentración de carga viral. Sin embargo, este valor no es comparable directamente, pues puede verse afectado por diferentes condiciones; para hacer lo más útil posible al Ct , se han realizado las corridas de PCR de las muestras de aguas residuales bajo las condiciones más similares posible, haciendo el mismo día, al mismo momento, con los mismos lotes de reactivos y el mismo operador.

CAPÍTULO 4

Resultados, análisis e interpretación

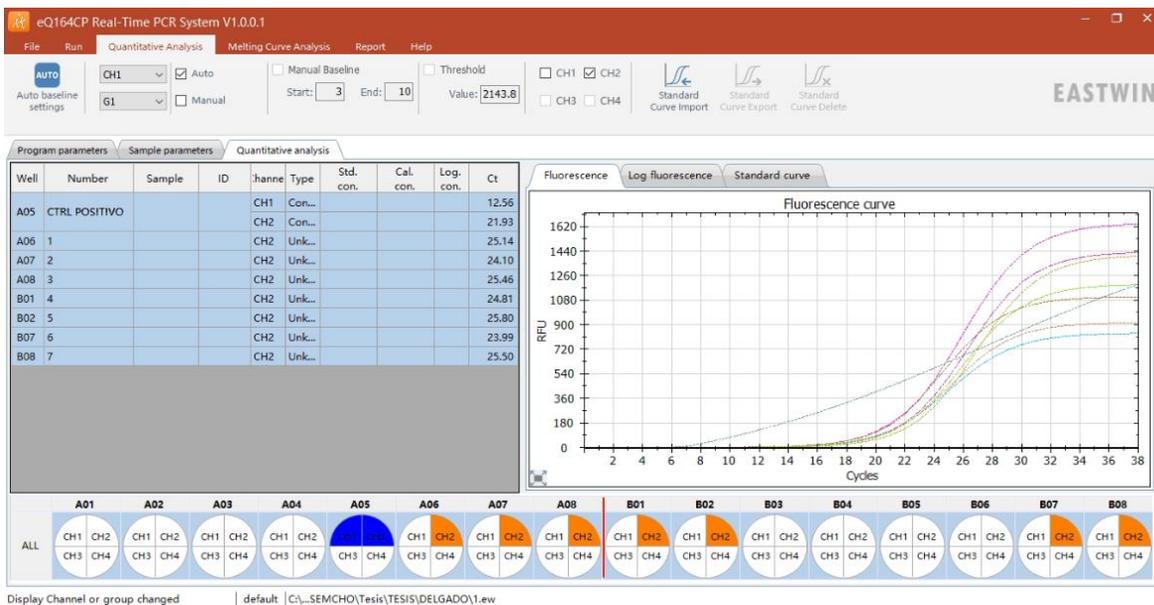
Los resultados de la investigación serán expuestos conforme al planteamiento de los objetivos, primero se presentan los resultados de la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales y su cuantificación determinada por el umbral de ciclo (Ct), en los diferentes colectores. A continuación, se muestran los resultados del análisis de los parámetros físicoquímicos y bacteriológicos, de cada muestra de aguas residuales de los colectores. Finalmente, se muestran los datos más relevantes en cuanto a carga viral de SARS-CoV-2, correlación entre factores físicoquímicos y bacteriológicos y el comportamiento epidemiológico de COVID-19 en la zona urbana de Ibarra.

Presencia de carga viral, cuantificada por *RT-PCR-Real Time*.

En las figuras 11 y 12 se observa las curvas de amplificación de cada muestra con su correspondiente Ct, realizadas en dos corridas por separado, de acuerdo a cada periodo de toma de muestra siendo febrero y marzo del año 2021.

Figura 11.

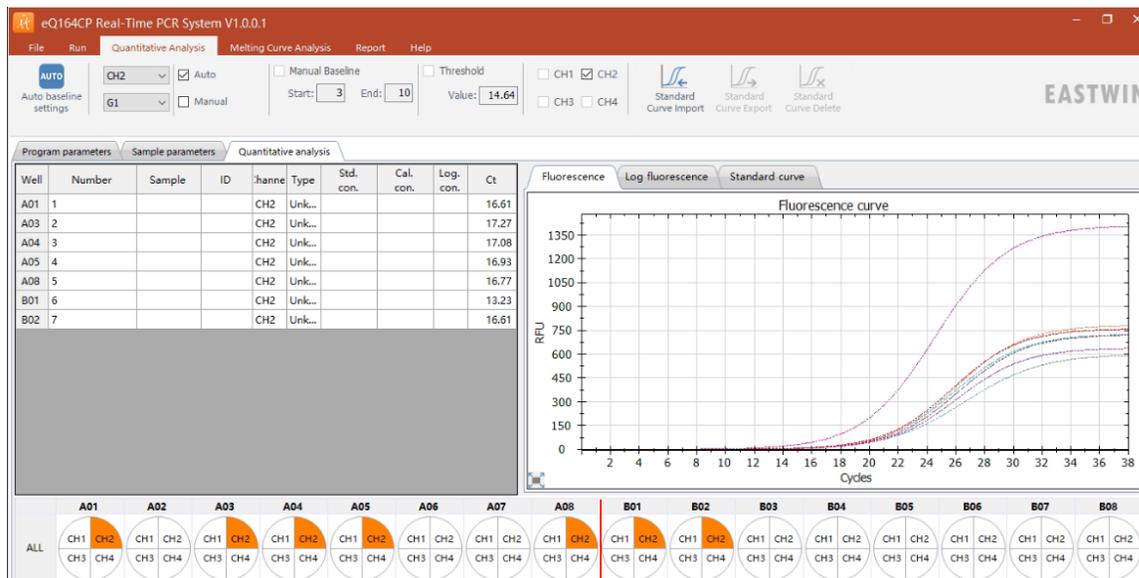
Amplificación de carga viral de SARS-CoV-2 de muestras de agua residual, periodo 1 (febrero 2021).



Nota: La codificación está en función de los colectores testeados. El pocillo A05 muestra la validación de la técnica a través del control positivo utilizado (CH2) y control interno de validación de la extracción (CH1). Tomado del Sistema eQ164CP Real-Time V1.0.0.1, de la plataforma del Laboratorio privado colaborador en el estudio, 2021.

Figura 12.

Amplificación de carga viral de SARS-CoV-2 de muestras de agua residual, periodo 2 (marzo 2021).



Nota: La codificación está en función de los colectores testeados. Tomado del Sistema eQ164CP Real-Time V1.0.0.1, de la plataforma del Laboratorio privado colaborador en el estudio, 2021.

La expresión de la curva de amplificación del control positivo junto al control interno de validación de la técnica, propio del kit, nos permite determinar que la técnica aplicada RT-qPCR es confiable, mostrando una sensibilidad alta del proceso (aproximadamente del 95%), por lo que las curvas de amplificación adicionales nos demuestran la presencia del agente viral en las 14 muestras de agua residual analizadas.

En concordancia con el análisis bibliográfico que realizó Carducci y colaboradores (2020), en donde contrasta diferentes técnicas de biología celular y molecular, concluye que el método más sensible para la detección de coronavirus es la RT-qPCR, pudiendo así establecer sistemas de vigilancia ambiental mediante el monitoreo de aguas residuales y determinar la potencial circulación de virus.

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos en el análisis molecular, en primera instancia indica positivo en la detección viral del material genético de regiones conservadas de SARS-CoV-2 (gen N, gen RdRP y gen E) y en segunda instancia indica la carga viral cuantificada en función de su Ct, en los dos periodos, en todas las muestras analizadas.

Tabla 2

Cuantificación viral por Ct, en las aguas residuales de los colectores ubicados en la zona urbana de Ibarra.

Fecha	Área de aporte (m ²)	Origen de la muestra (colector)	Detección viral (gen N, gen RdRP y gen E)	Umbral de ciclos (Ct)
10/2/2021	134000,00	Alpargate	+	23,99
	1550133,91	La Victoria	+	24,10
	9758093,43	Av. Carchi	+	25,84
	9529464,50	Ajaví 1	+	25,46
	19473398,52	Ajaví 2	+	25,14
	2886676,69	Piedra Chapetona	+	25,50
	43331767,04	Entrada PTAR	+	24,81
10/3/2021	134000,00	Alpargate	+	13,23
	1550133,91	La Victoria	+	17,27
	9758093,43	Av. Carchi	+	16,13
	9529464,50	Ajaví 1	+	17,08
	19473398,52	Ajaví 2	+	16,61
	2886676,69	Piedra Chapetona	+	16,61
	43331767,04	Entrada PTAR	+	16,77

Nota: Se presenta los valores numéricos obtenidos por RT- qPCR por cada colector. Tomado del *Sistema eQ164CP Real-Time V1.0.0.1, de la plataforma del Laboratorio privado colaborador en el estudio, 2021*

Varios autores entre ellos Kitajima et al. (2020), Foladori et al. (2020) y Al Huraimel et al., (2020), mencionan sobre los blancos moleculares de detección de SARS-CoV-2 más usados, siendo el gen E (envoltura) y el gen N (nucleocápside), los cuales han sido utilizado para el diseño de primers, si estos genes dan positivo, se continua con las siguientes pruebas confirmatorias usando el gen RdRP (RNA polimerasa dependiente de RNA).

De tal forma que, en este estudio se confirma la presencia y circulación del agente viral SARS-CoV-2 en aguas residuales domésticas de la zona urbana de la ciudad de Ibarra.

Caracterización de las aguas residuales mediante parámetros físicos, químicos y bacteriológicos.

Los análisis físicoquímicos y bacteriológicos de las aguas residuales se resumen en la tabla 3. Como se observa, los valores obtenidos de los análisis a parámetros físicos (medidos *in situ*), como temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto, oscilan entre 18.7°C y 23.1°C, 6.79 upH y 8.09 upH, 713 uS/cm y 1225.5 uS/cm y 0.61 mg/L y 4.9 mg/L respectivamente.

Los valores obtenidos de los análisis a parámetros químicos y bacteriológicos, analizados en laboratorio, como DQO (Demanda Química de Oxígeno) oscilan entre 345 y 700 mg/L O₂, mientras que los resultados de *Escherichia coli* (*E. coli*) oscilan entre 12000 UFC y 84000 UFC, respectivamente.

Tabla 3

Resultados de los análisis físicoquímicos y bacteriológicos de las muestras colectadas

<i>Fecha</i>	<i>Origen de la muestra (colector)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH (upH)</i>	<i>Conductividad (uS/cm)</i>	<i>Oxígeno Disuelto (mg/L)</i>	<i>DQO (mg/L)</i>	<i>E. coli (UFC)</i>
10/2/2021	Alpargate	22,6	6,99	1225,5	1,42	700	42400
	La Victoria	22,3	7,06	1106	0,61	503	58000
	Av. Carchi	21,5	7,22	956	2,97	594	65000
	Ajaví 1	21,7	7,31	842	0,84	490	84000
	Ajaví 2	20,8	6,79	741	1,41	629	15000
	Piedra Chapetona	21,5	7,44	1081	0,9	561	51000
	Entrada PTAR	20,9	7,33	810	3,11	474	42000
10/3/2021	Alpargate	18,7	8,09	896	3,98	601	24000
	La Victoria	19,8	7,59	872	1,82	422	45000
	Av. Carchi	23,1	7,73	778	4,54	373	22000
	Ajaví 1	20,1	7,56	819	4,49	345	12000
	Ajaví 2	19,6	6,82	713	3,22	376	18000
	Piedra Chapetona	20,6	7,68	906	2,42	502	35000
	Entrada PTAR	23,1	7,81	783	4,89	366	33000

Nota: Datos obtenidos a partir de los análisis realizados a las 14 muestras en el Laboratorio de la EMAPA – I, para los periodos de febrero y marzo 2021.

Bilal y colaboradores (2020) mencionan en su investigación, que la supervivencia y persistencia del SARS CoV-2 en las aguas residuales, depende en gran medida de las características que éstas tienen. Es así que, en esta investigación, los resultados de la caracterización nos confirman que las muestras tomadas presentan características propias de aguas residuales domésticas.

Es importante mencionar que las aguas residuales domésticas producidas por los habitantes de la ciudad de Ibarra, desembocan en la planta de tratamiento de aguas residuales, una vez tratadas son descargadas (cumpliendo la legislación ambiental TULSMA, 2015) a un cuerpo de agua dulce, siendo el río Tahuando (EMAPA-I, 2020).

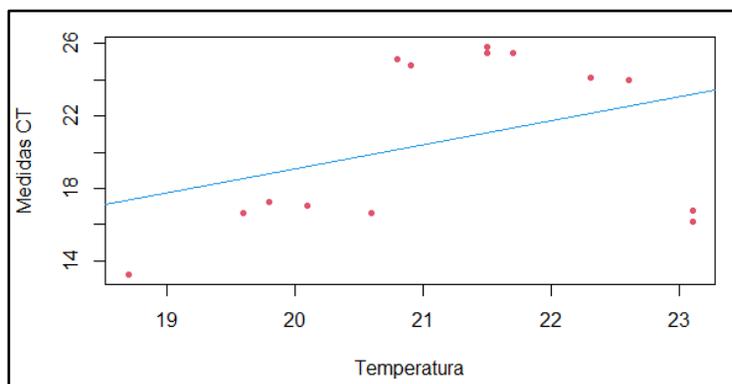
Esta información sirve de base, para dar continuidad a la presente investigación, frente a la efectividad de los procesos de tratamiento en una PTAR para reducir el virus en aguas residuales, considerando que, las aguas residuales provenientes de sitios domésticos fluyen a lo largo de la red de alcantarillado con un tiempo de retención hidráulica de algunas horas y logran llegar a las PTAR (Foladori *et al.*, 2020). Además, la presencia de ARN viral en muestras de aguas residuales no implica infectividad ni tampoco integridad como lo menciona Serra-Compte y demás autores (2021).

Relación entre la presencia de carga viral y condiciones físicoquímicas y bacteriológicas de las aguas residuales.

Con la información obtenida mediante la caracterización de las aguas residuales y el uso de la herramienta estadística R-Studio, ha sido posible determinar una correlación entre los indicadores de calidad y la concentración de carga viral de SARS-CoV-2.

Figura 13

Correlación entre la temperatura (°C) y carga viral (medidas de Ct)

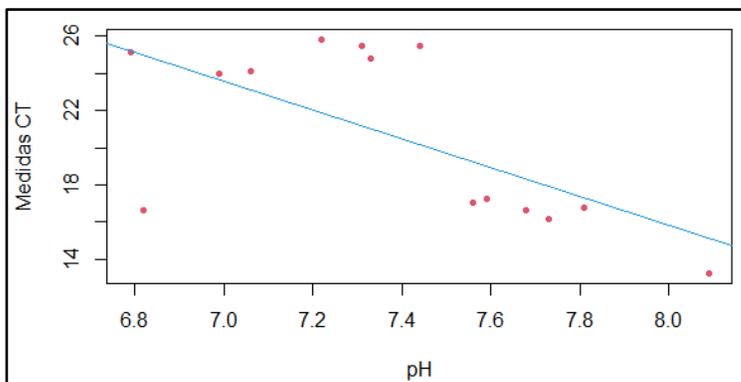


La figura 13 muestra la correlación existente entre la temperatura y la carga viral, a través de las medidas de Ct. La tendencia de los valores nos muestra que la temperatura es directamente proporcional ($r=0.38$), por lo tanto, a mayor temperatura mayor medidas de Ct; es decir menor concentración viral.

Esta afirmación se contrasta con varios estudios realizados en el año 2020 en los cuales han concluido que la temperatura es el factor más influyente para la supervivencia viral en aguas residuales (Muhammad et al., 2020), donde las temperaturas del agua más altas disminuyen la tasa de supervivencia del virus debido a la desnaturalización de las proteínas y la actividad de las enzimas extracelulares (Al Huraimel et al., 2020).

Figura 14.

Correlación entre el pH (upH) y carga viral (medidas de Ct)

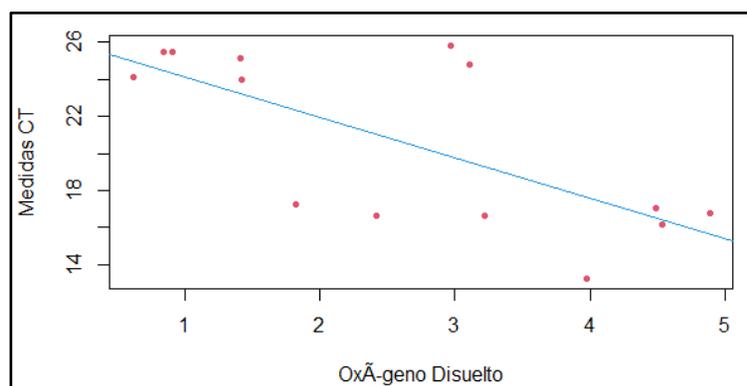


Con respecto a la correlación existente entre el pH y la concentración de carga viral por medio de su Ct, la figura 14 muestra que hay una relación inversamente proporcional ($r=-0.64$), por lo tanto, a mayor pH menor medidas de Ct, es decir mayor concentración viral; sugiriendo que la concentración viral es más alta en aguas alcalinas.

Bogler y colaboradores (2020), mencionan que se han determinado factores que afectan la persistencia del SARS-CoV-2, entre ellos el pH de la solución. Sin embargo, aún no hay suficiente evidencia que demuestre como interviene el pH en la supervivencia del virus en aguas residuales, debido a que los estudios realizados han sido en heces fecales de pacientes infectados.

Figura 15.

Correlación entre OD (mg/L) y carga viral (medidas de Ct)

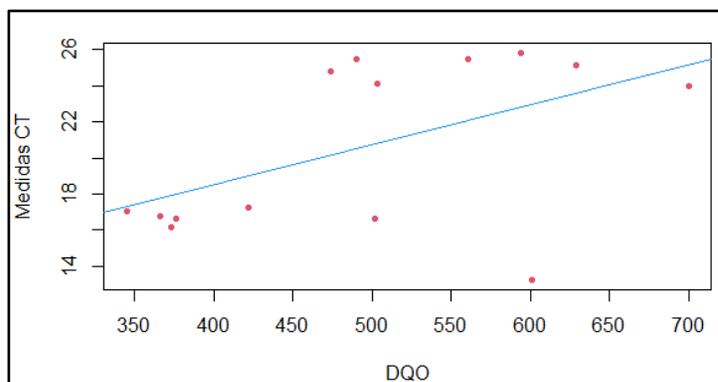


En la figura 13, se observa que existe una correlación inversamente proporcional ($r=-0.70$) entre la medida de Ct y el Oxígeno Disuelto, esto indica que, a menor OD mayor medidas de Ct, es decir menor concentración viral; sugiriendo que, en aguas con menos oxígeno disuelto la carga viral disminuye.

Para este parámetro hay que considerar que los valores obtenidos son bajos, debido a que son muestras de aguas residuales, a diferencia de la cantidad de OD que hay en aguas superficiales como ríos. Con base en la investigación de Carraturo y col. (2020), puede suponerse que la persistencia del SARS-CoV-2 en las aguas superficiales es mayor que en aguas residuales, considerando también otros parámetros importantes que influyen en su presencia.

Figura 16

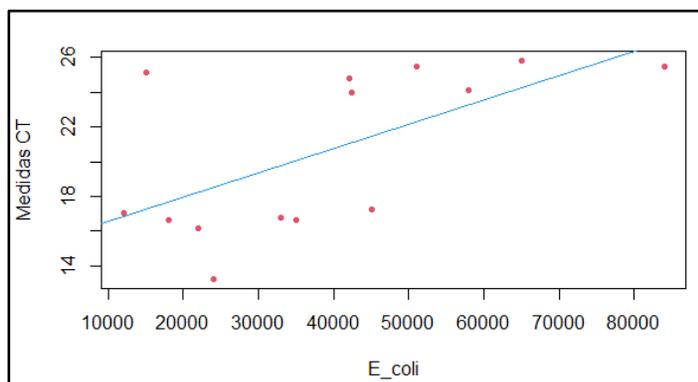
Correlación entre DQO (mg/L) y la carga viral (medidas de Ct)



La figura 16 presenta la correlación entre el DQO (Demanda Química de Oxígeno) y las medidas de Ct, la tendencia muestra una correlación directamente proporcional ($r=0.53$), por lo que se establece que a mayor DQO mayor medidas de Ct, es decir, menor concentración viral. Indicando que la persistencia del virus disminuye en entornos con mayor contenido de materia orgánica; considerando que el DQO determina el contenido de materia orgánica en el agua residual como marcador indirecto.

Figura 17.

Correlación entre E. coli (UFC) y carga viral (medidas de Ct)



Finalmente, en la figura 17 se observa la correlación entre *E. coli* como indicador bacteriológico y las medidas de Ct, la cual es directamente proporcional ($r=0.62$), es decir que a mayor carga bacteriana mayor medidas de Ct, por lo tanto, menor carga viral.

Estos dos últimos parámetros van relacionados cuando se tratan de aguas residuales. Los estudios disponibles sobre los SARS-CoV-2, sugieren que la población bacteriana y la materia orgánica tienen un gran impacto en la supresión del virus cuando es envuelto, siendo el caso del SARS-CoV-2, en comparación a los virus no envueltos (Serra-Compte *et al*, 2021). Esto puede deberse a la presencia de bacterias antagonistas como *Escherichia coli*, que pueden inactivar los virus a través de la actividad enzimática extracelular (Bogler *et al*, 2020).

De esta manera los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten inferir que varios factores principales como temperatura, materia orgánica y la aparición de bacterias competidoras, afectan a la persistencia del SARS-CoV-2.

Variabilidad de la presencia y concentración de SARS-CoV-2 en los diferentes puntos de muestreo.

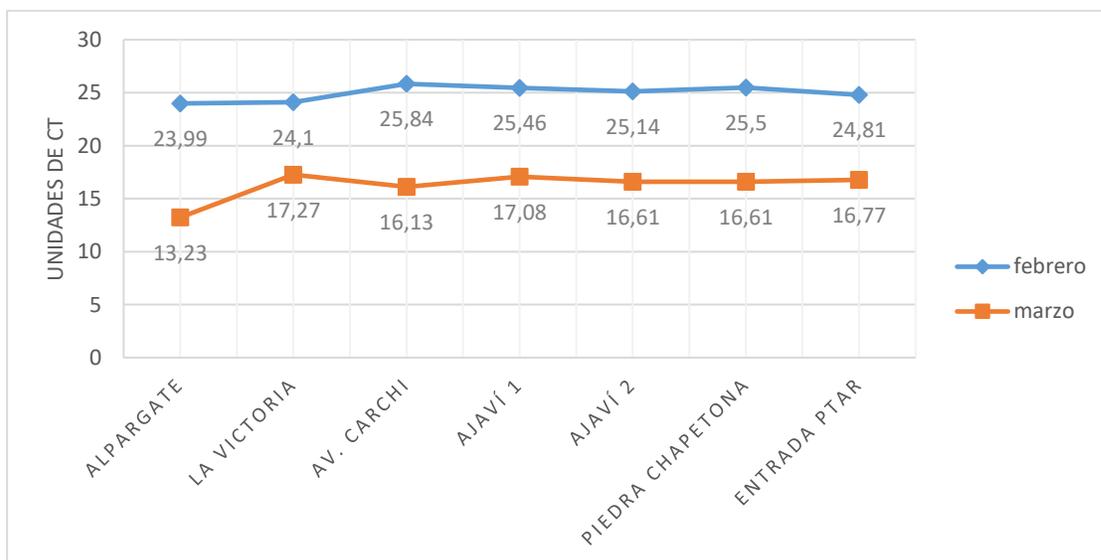
Con los resultados expuestos en la Tabla 2, se estableció la diferencia de la presencia y concentración del virus en cada colector muestreado para febrero y marzo 2021.

Por un lado, en relación con la presencia de SARS-CoV-2, se determinó que no existe variabilidad, ya que se comprobó por medio de la técnica RT-qPCR la presencia de material genético del virus, en todos los colectores considerados dentro de la toma de muestra: Alpargate, La Victoria, Piedra Chapetona, Av. Carchi, Ajaví 1, Ajaví 2 y Entrada PTAR.

Por otro lado, la Figura 18 muestra la tendencia lineal y la variación que hay frente a la concentración de SARS-CoV-2 por cada colector muestreado. Los datos en base al Ct revelan que, para febrero los valores oscilan entre 23 y 26; claramente se contempla la presencia de carga viral con una concentración relativamente moderada, mientras que para marzo los valores de oscilan entre 13 y 17, es decir, una elevada concentración, considerando que el límite superior de sensibilidad de la prueba es Ct = 38 (carga viral con Ct mayor a 38, indica una concentración menor a 10 copias por uL).

Figura18

Variación de la concentración viral por cada colector en los periodos 1 y 2



Concentración viral en aguas residuales con respecto a casos confirmados de COVID-19.

Para complementar el análisis entre la concentración viral y los casos confirmados con COVID-19 en la ciudad de Ibarra, se consideró los valores promedios de las concentraciones virales en función de su Ct, de todos los colectores muestreados en febrero y marzo. Así mismo, se tomaron los datos oficiales reportados por el Ministerio de

Salud Pública con corte 10 de febrero y 10 de marzo del 2021. Los valores se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

Datos para la relación entre la concentración viral y casos por COVID-19

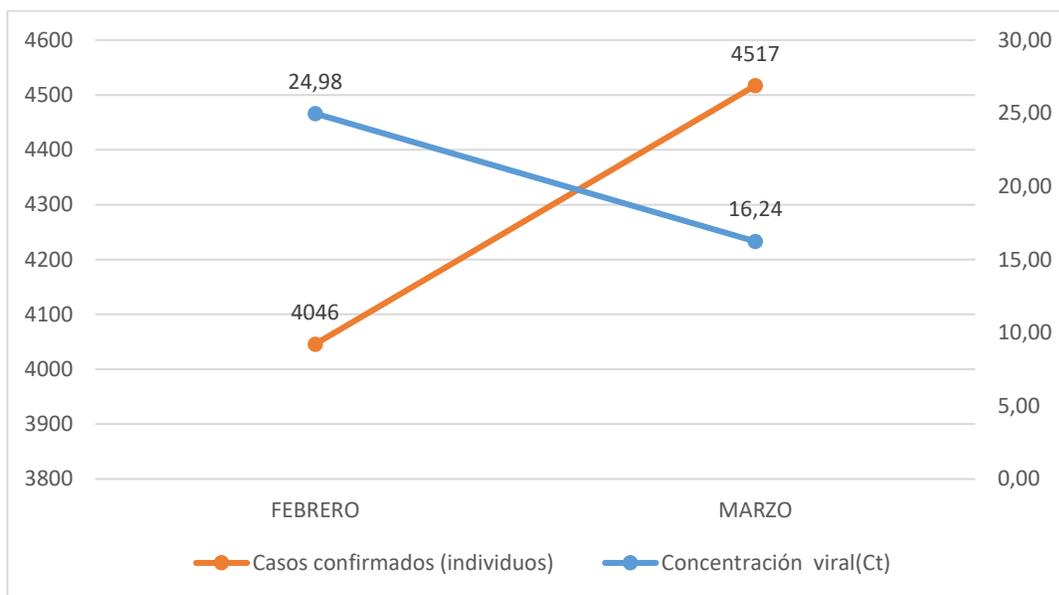
Fechas de muestreo	10 de Febrero	10 de Marzo
Concentración viral (Ct)	24,98	16,24
Casos confirmados (individuos)	4046	4517

Nota: Los datos están expresados en función de los resultados obtenidos en la investigación y en los datos obtenidos por las infografías N° 349 y N° 377 presentadas por el Ministerio de Pública para el año 2021.

En base a los datos, podemos expresar una relación porcentual para las dos variables entre febrero y marzo, distinguiendo un aumento del 12% en los casos de COVID-19 y un decrecimiento del 35% en las medidas de Ct, dando como resultado el aumento de la carga viral.

Figura 19

Diferencia de casos totales confirmados de COVID-19 y concentración viral entre los periodos de toma muestra y análisis.



De igual manera la Figura 19, nos permite cimentar el aumento de casos y concentración viral de febrero a marzo, tomando en cuenta el comportamiento epidemiológico del COVID-19 con respecto a los casos identificados confirmados, más no a posibles casos y/o por longitud temporal.

Esto permite definir que la concentración viral para SARS CoV-2 en aguas residuales de una zona, está directamente relacionada con la presencia de casos de infección por COVID-19. Demostrando, que es posible usar este procedimiento, como una estrategia de vigilancia ambiental para hacer un seguimiento del comportamiento de la enfermedad y la identificación oportuna de rebrotes, fundamentado la hipótesis de la presente investigación.

CAPÍTULO 5

Conclusiones y Recomendaciones

En el presente estudio, se ha podido demostrar que existe presencia de material genético viral en las aguas residuales en poblaciones epidemiológicamente activas (casos confirmados de COVID-19). Sin embargo, esto no significa una potencial fuente de infección, ya que la inactivación viral puede darse por características propias de las aguas residuales, así como la distancia de circulación por los sistemas de alcantarillado.

Con respecto al desarrollo técnico, en esta investigación, así como en otros estudios internacionales, se concluye que las técnicas de detección y cuantificación del virus en aguas residuales, especialmente los métodos de concentración y amplificación por PCR, y su validación internacional, son factores clave para implementar la vigilancia ambiental, sin embargo es necesario desarrollar protocolos estandarizados principalmente con respecto al muestreo, como equipos de protección, horas de colecta, cantidad y número de muestras, características físicas, químicas, biológicas, hidrostáticas e hidrodinámicas, aumentando la efectividad del diagnóstico.

No obstante, los métodos que se elijan deben ser sensibles y eficaces, en la presente investigación, se estableció la presencia del virus y una carga viral estimada en aguas residuales, pero aún es necesario profundizar más investigaciones al respecto en áreas locales, que permitan un conocimiento más extenso acerca del comportamiento de permanencia, calidad, cantidad. Además, en regiones donde la red de alcantarillado no es sectorizada o llegan a un punto donde se mezclan las recogidas en diferentes sectores, como en nuestro caso, no puede hacerse un claro seguimiento epidemiológico a través de la vigilancia ambiental.

Se ha logrado establecer que las características de las aguas residuales como microorganismos antagonistas, condiciones ambientales como temperatura, el pH del medio acuoso, presencia de materia orgánica, entre los más importantes, tienen relación con la persistencia y concentración de SARS CoV-2, lo cual se concuerdan con estudios en varios países, convirtiendo esta información en conocimiento con respecto al comportamiento viral, y que de alguna manera puede aprovecharse para implantar métodos de detección.

Tal como otros estudios lo han demostrado, la interacción entre la gestión ambiental y la salud pública se ha convertido en la herramienta del futuro con base en la vigilancia ambiental, logrando mejores estrategias para el análisis de pandemias, epidemias y contaminación del agua, identificando oportunamente infecciones activas por virus respiratorios o de otros tipos, a nivel local, regional y mundial. Esta metodología también abarata costos y proporciona un método de alerta temprana para brotes de COVID-19. Incluso, es posible que este método de detección molecular de SARS CoV-2, pueda ser usado en aquellas poblaciones donde otros métodos diagnósticos no se pudieran aplicar.

En el contexto de la realidad actual, es necesario incentivar y potencializar investigaciones sobre la vigilancia ambiental en aguas residuales como herramienta clave, no solo para gestionar la pandemia, sino también para determinar con mayor rapidez nuevas cepas circulantes del virus, así como la eficacia de las metodologías de erradicación del virus como la vacunación.

En otros estudios se ha encontrado una relación existente entre la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales con otros virus contaminantes, por lo que se hace necesario evaluar el papel que este desempeña en la contaminación ambiental, ya que

en la actualidad la normativa ambiental ecuatoriana no considera la presencia de virus como indicador de contaminación en el agua.

Todo lo descrito apunta a la oportunidad existente para el desarrollo de estudios interdisciplinarios que incluyan interacción epidemiológica con ambiente y sociedad, considerando el factor económico; esto abrirá una amplia información para estrategias más adecuadas en esta nueva normalidad y una adaptación óptima a la misma.

Referencias bibliográficas

Academia de Ciencias de Nicaragua (2020). COVID-19, el caso de Nicaragua. Aportes para enfrentar la pandemia. Academia de Ciencias de Nicaragua. 2° Ed.

Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J.W., Choi, P.M., Kitajima, M., Simpson, S.L., Li, J., Tscharke, B., Verhagen, R., Smith, W.J.M., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K.V., Mueller, J.F., (2020). First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: a proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci. Total Environ.* 138764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>

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.

Almeida, L. (2014). Revisión de la evaluación de la calidad de los ríos de la provincia de Imbabura. Universidad Particular de Loja, Loja, Recuperado de: <http://repositorio.utpl.edu.ec/handle/123456789/415>

Alvarado, D., & Cárdenas, C. (2015). Sistematización de la información de las plantas de depuración de aguas residuales del sector rural del cantón Cuenca. Universidad de Cuenca, Cuenca, Recuperado de: <http://repo.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/1774>

Arslan, M., Xub, B., Gamal, M. (2020). Transmission of SARS-CoV-2 via fecal-oral and aerosols-borne routes: Environmental dynamics and implications

for wastewater management in underprivileged societies *Science of the Total Environment*. Vol 743. P: 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140709>

Bogler, A., Packman, A., Furman, A., Gross, A., Kushmaro, A., Ronen, A. (2020). Rethinking wastewater risks and monitoring in light of the COVID-19 pandemic. *Nature Sustainability*. P: 1-19. doi: <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00605-2>

Bonifaz, E. (2018). Evaluación de la contaminación fecal de origen humano y animal en la cuenca alta del río Guayllabamba mediante inidcadores virales. Universidad de las Américas. Ecuador. Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/9234/1/UDLA-EC-TIB-2018-16.pdf>

Bosch, A., Sánchez, G., Pinto, R., Guix, S. (2020). Vigilancia del SARS-CoV-2 en aguas residuales: una herramienta de alerta rápida. Universidad de Barcelona. España. Recuperado de: <https://theconversation.com/vigilancia-del-sars-cov-2-en-aguas-residuales-una-herramienta-de-alerta-rapida-137031>

Burbano, L., & Pijal, A. (11-12-13 de diciembre de 2012). I Congreso Científico Internacional de la Universidad Regional Autónoma de los Andes "Uniandes". La sustentabilidad y los derechos de la naturaleza del río Tahuando, Ecuador, Imbabura. Ibarra, Ecuador.

Carducci, A., Federigi, I., Liu, D., Thompson, J. & Verani, M., (2020). Making Waves: Coronavirus detection, presence and persistence in the water environment: State of the art and knowledge needs for public health. *Water Research*, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899>. P.2-9

Castro, J. (2016). Correspondencia entre indicadores físico-químicos y biológicos para el monitoreo sistemático de la contaminación en el río Tahuando, Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Recuperado de: <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/7680>

Código Orgánico Del Ambiente. Registro Oficial Suplemento 983 de 12-abr.-2017

Constitución Política de la República del Ecuador. Registro Oficial 449 de 20-oct-2008. Última modificación: 13-jul-2011

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.

Empresa Municipal de Agua Potable y Alcantarillado de Ibarra EMAPA-I (2019). Informe de rendición de cuentas 2018-2019

Espigares, M., & Pérez, J. (1985). Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Universidad de Granada. Servicio de Publicaciones. Granada

Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de San Miguel de Ibarra (2015). Actualización Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Ibarra 2015-2023. Ibarra: Autor.

González, M., & Chiroles, S. (2010). Uso seguro y riesgos microbiológicos del agua residual para la agricultura, *Revista Cubana de Salud Pública*, p. 61-73.

Guerrero, L., Ballesteros, I., Villacrés, I., Granda, M., Freire, B. & Ríos, B. (2020). SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries, Ecuador, Rev. ELSEVIER, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140832>, p. 2-5.

Hagedorn, C., Blanch A. R., & Harwood, V. J. (2011). Microbial source tracking: Methods, applications and cases studies. New York United States of America.

Henze, M., Loosdrecht, V., Brdjanovic, G. (2008). Biological Wastewater Treatment Principles, Modelling and Design. Cambridge. ISBN: 1843391880

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.

IDEXX WATER, (2020). Monitoreo de Aguas residuales. México, Recuperado de: <https://www.idexx.com.mx/waterSARS-CoV-2.RT-PCR-test/>

Instituto Nacional de estadísticas y Censos INEC. (2016). Estadística de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados

Municipales 2015 (Agua y Alcantarillado). Ecuador. Recuperado de: www.ecuadorencifras.gob.ec

Ley Orgánica de Recursos Hídricos, usos y aprovechamiento del agua (2014). Registro Oficial, 305. 6 de agosto de 2014.

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

Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., (2020). Presence of SARS Coronavirus- 2 in sewage. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.

Ministerio del Ambiente. Texto Unificado de la Legislación ambiental (TULAS). Libro VI de la Calidad Ambiental. Registro Oficial Edición Especial N°270. 13 de febrero de 2015.

Municipal Water Leader (2020). Wastewater Testing as a COVID-19 Early Warning System. Interview Water Research Foundation. Recuperado de: <https://municipalwaterleader.com/wastewater-testing-as-a-covid%e2%80%9119-early-warning-system/>

Ontiveros, G. (2015). Evaluación de tratamientos para aguas residuales contaminadas. Tesis de Doctorado. Argentina. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11185/675>

Organización Mundial de la Salud, (2020). Water, sanitation, hygiene, and waste water management for the COVID-19 virus: interim guidance.

Peláez, D., Guzmán, B., Rodríguez, J., Acero, F., Nava, G. Presencia de virus entéricos en muestras de agua para el consumo humano en Colombia: desafíos de los sistemas de abastecimiento. Vol 36(Supl.2):169-78 doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2987>

Perero, G. A., Díaz, J.R., & Litardo, C.A. (2018). Contribución a la gestión ambiental sostenible en Ecuador. Rev. Cubana de Ingeniería. Vol. (10) 42 - 50.

Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G. 2020. SARSCoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. Water Research 181: 115942 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>

Reglamento Al Código Orgánico Del Ambiente”. Registro Oficial Suplemento 507 de 12-jun.-2019.

Rimoldi, S. G. (2020). Presence and vitality of SARS CoV-2 virus in wastewaters and rivers, medRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20086009>.

Sánchez, J. (2020). COVID-19 en aguas residuales y potables: análisis de la situación actual. Universidad Surcolombiana. Colombia. P: 2-4.

Shutler, J., Zaraska, K., Holding, T., Machnik, M., Uppuluri, K., Ashton, I., Migdal, T., & Dahiya, R. (2020). Risk of SARS-CoV-2 infection from contaminated 1 water systems. medRxiv preprint. P: 1-18. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.17.20133504>

Tejada et al. (2014). Emerging contaminants in water: Pharmaceutical residues. A Review. Facultad de Ciencias Básicas, 10, 80-101.

Torres, P., Cruz, C., & Patiño, P. (2009). Índices de calidad de agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano. Una revisión crítica. REVISTA Ingenierías, Medellín, volumen 8 (15 Sup. 1), 79-94.

Usman, M., Farooq, M., & Hanna J. (2020). Existence of SARS-CoV 2 in Wastewater: Implications for Its Environmental Transmission in Developing Communities. Environmental Science & Technology 2020 54 (13), 7758-7759 DOI: 10.1021/acs.est.0c02777.

Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J.M., Moulin, L., (2020). Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.

Xiao, F., Sun, J., Xu, Y., Li, F., Huang, X., Li, H., Zhao, J., Huang, J. & Zhao J., (2020). Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19, 1920-1921, DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2608.200681>