



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTUDIO DE AGENTES VIROLÓGICOS EXCRETADOS POR LA  
POBLACIÓN DE QUITO, MEDIANTE ANÁLISIS DE METAGENOMA DE  
AGUAS SUPERFICIALES URBANAS

AUTOR

Brigette Mishel Romero Carpio

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTUDIO DE AGENTES VIROLÓGICOS EXCRETADOS POR LA  
POBLACIÓN DE QUITO, MEDIANTE ANÁLISIS DE METAGENOMA DE  
AGUAS SUPERFICIALES URBANAS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

PhD. Laura Guerrero Latorre

Autora

Brigette Mishel Romero Carpio

Año

2018

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Estudio de agentes virológicos excretados por la población de Quito, mediante análisis de metagenoma de aguas superficiales urbanas, a través de reuniones periódicas con el estudiante Brigette Mishel Romero Carpio, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Laura Guerrero Latorre

Doctora en Microbiología Ambiental y Biotecnología

CI: 1758028896

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Estudio de agentes virológicos excretados por la población de Quito, mediante análisis de metagenoma de aguas superficiales urbanas, de la estudiante Brigitte Mishel Romero Carpio, en el semestre 2018-2, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

María Isabel Ballesteros Redondo

Doctora en Biología

CI: 1757168610

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Brigette Mishel Romero Carpio

CI: 2100567334

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la sabiduría y fortaleza necesaria para superar cada uno de los retos que se presentaron a lo largo de mi vida universitaria.

A mis padres por sus consejos y amor incondicional.

A la Dra. Laura Guerrero por darme la oportunidad de vincularme a este proyecto y por su apoyo absoluto durante el desarrollo del mismo.

## DEDICATORIA

A mis padres Grace y Edwin por apoyarme en todo lo que decido emprender y ser siempre mi soporte.

A mis hermanos por comprenderme y brindarme su alegría en los momentos difíciles.

A mis abuelitos porque a pesar de la distancia siempre están pendientes de mi y me alientan a seguir adelante.

Todo lo que he conseguido se los debo a ustedes, los amo.

## RESUMEN

La cobertura de saneamiento en Ecuador es limitada y únicamente el 28,8% de las aguas residuales del país reciben tratamiento, descargando el resto directamente a ríos. Estas descargas representan uno de los mayores problemas ambientales de Quito, al recibir el aporte de microbiota de cada uno de los 2,2 millones de habitantes. En las aguas residuales hay gran diversidad patogénica, entre ellos los virus que tienen un papel importante en muchas enfermedades. Este estudio pretende analizar por metagenómica las especies virales excretadas por la población en las aguas residuales urbanas descargadas en los ríos Machángara y Monjas de la ciudad de Quito. En este estudio se seleccionaron tres puntos representativos de los ríos Machángara y Monjas que recibieron las principales descargas del sistema de alcantarillado de Quito. Se tomaron muestras de agua de 500 mL y se concentraron mediante floculación de leche desnatada. Después, se analizó la calidad microbiológica y se procesaron las muestras para secuenciación *Illumina MiSeq*. Para el ensamblaje de las lecturas de viomas se empleó *CLC Genomics* y se consultó la similitud de los *contigs* contra 3 bases de datos: GenBank, NCBI y UniProt. Finalmente, se tipificaron especies de interés y se analizó la filogenia. En las aguas altamente contaminadas de la ciudad de Quito se encontraron dos mil secuencias asociadas a virus y dentro de la diversidad de huéspedes asociados a virus identificados, 9 familias y 26 especies se vincularon a humanos. Entre las especies detectadas, la mayoría de virus se relacionaron con gastroenteritis: Aichivirus, Mamastrovirus, Bufavirus, Bocavirus, Cosavirus, Virus Sapporo, Mastadenovirus F y Salivirus. Además, se detectaron Echovirus 25 causante de meningitis aséptica, Gammapapillomavirus relacionado con lesiones cutáneas, Parechovirus agente etiológico de deterioro neurológico y Poliomavirus 1 vinculado con afecciones del tracto urinario. Se determinó también que las cepas de Echovirus 25 y Bufavirus-1 proceden de China y Burkina Faso, respectivamente. De esta forma se revela la diversidad de virus que circulan dentro de la población Quiteña y se detallan agentes infecciosos descritos por primera vez en Ecuador y muy poco reportados en Latinoamérica.

**Palabras claves:** Metagenómica, virus humanos, ríos urbanos, Quito

## ABSTRACT

Sanitation coverage in Ecuador is limited and only 28,8% of the country's wastewater is treated, with the rest discharged directly to rivers. These discharges represent one of the biggest environmental problems of Quito, receiving the microbiota contribution from each of the 2,2 million inhabitants. In wastewater there is great pathogenic diversity, among them the viruses that have an important role in many diseases. Therefore, the intention of this study is to analyze by metagenomics the viral species excreted by the population in the urban wastewater discharged in the Machangara and Monjas rivers of the city of Quito. In this study, three representative points of the Machangara and Monjas rivers were selected, which received the main discharges from the Quito sewer system. Water samples of 500 mL were taken and concentrated by flocculation of skimmed milk. Subsequently, the microbiological quality was analyzed and the samples were processed for Illumina MiSeq sequencing. For the assembly of the reads CLC Genomics was used and the similarity of the contigs against 3 databases was consulted: GenBank, NCBI and UniProt. Finally, the species of interest were typified and the phylogeny was analyzed. In the highly polluted waters of the city of Quito two thousand of virus were found and within the diversity of identified host associated with viruses, 9 families and 26 species were linked to humans. Among the species detected, most viruses were related with gastroenteritis: Aichivirus, Mamastrovirus, Bufavirus, Bocavirus, Cosavirus, Sapporo Virus, Mastadenovirus F and Salivirus. In addition, Echovirus 25, which causes aseptic meningitis; Gammapapillomavirus related to skin lesions; Parechovirus etiological agent of neurological deterioration; and Polyomavirus 1 linked with urinary tract disorders were detected. It was also determined that strains of Echovirus 25 and Bufavirus-1 come from China and Burkina Faso, respectively. In this way, the diversity of viruses circulating within the population of Quito are revealed; infectious agents are also described for the first time in Ecuador which few cases have been reported in Latin America.

**Keywords:** Metagenomics, human viruses, urban rivers, Quito

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Objetivo general .....	6
1.4 Objetivos específicos .....	6
1.5 Justificación del trabajo .....	6
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Acceso a agua y saneamiento.....	8
2.1.1 Cobertura del agua y saneamiento a escala global.....	9
2.1.2 Infraestructuras de saneamiento en Quito .....	13
2.2 Contaminación microbiológica del Agua.....	18
2.2.1 Fuentes de contaminación .....	19
2.3 Aguas residuales.....	20
2.3.1 Microorganismos presentes en las aguas residuales.....	20
2.4 Virus entéricos .....	24
2.4.1 Enfermedades causadas por patógenos virales .....	25
2.4.2 Principales familias de virus patógenos humanos.....	26
2.4.3 Otros virus emergentes .....	38
2.5 Métodos para detección de virus en muestras ambientales...	39
2.5.1 Métodos de concentración .....	39
2.5.2 Métodos de detección .....	41

2.6 Metagenómica .....	46
2.6.1 Utilidades de la metagenómica .....	46
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL..	49
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS .....	51
4.1 Población y muestra .....	51
4.2 Muestreo .....	51
4.3 Análisis de calidad microbiológica.....	51
4.3.1 Cuantificación de Escherichia coli .....	52
4.3.2 Cuantificación de Adenovirus humano .....	52
4.4 Procesamiento de muestras para secuenciación Illumina MiSeq.....	54
4.4.1 Filtración y remoción de ADN libre .....	54
4.4.2 Extracción de ácidos nucleicos .....	55
4.4.3 Preparación de librerías .....	55
4.4.4 Secuenciación .....	56
4.5 Procesamiento bioinformático .....	56
4.5.1 Procesamiento pre-ensamblaje.....	58
4.5.2 Ensamblaje .....	58
4.5.3 Procesamiento post-ensamblaje .....	59
4.5.4 Análisis estadístico.....	61
4.6 Análisis genético de especies, tipificación y filogenias .....	61
4.6.1 Descripción viral .....	61

4.6.2 Tipificación de especies virales de interés .....	62
4.6.3 Análisis de filogenias.....	62
<b>5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
5.1 Muestreo .....	62
5.2 Análisis de calidad microbiológica .....	64
5.3 Datos resultantes de metagenómica.....	65
5.4 Descripción de familias virales.....	65
5.5 Patógenos virales potencialmente perjudiciales para humanos .....	69
5.6 Tipificación de especies virales humanas.....	77
5.7 Filogenia de especies virales humanas de interés .....	83
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>86</b>
6.1 Conclusiones.....	86
6.2 Recomendaciones .....	87
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>115</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cobertura regional de agua potable año 2015.....	10
Figura 2. Cobertura regional de saneamiento año 2015. ....	11
Figura 3. Cuencas de Aporte del Sistema de Alcantarillado de la Ciudad de Quito.....	16
Figura 4. Fuentes puntuales y difusas de contaminación microbiológica del agua. ....	20
Figura 5. Estructura del virión de Adenovirus humano.....	26
Figura 6. Estructura del virión de HPV y reconstrucción 3D.....	28
Figura 7. Comparación de los diez tipos oncogénicos de VPH más frecuentes en el Ecuador entre mujeres con cáncer cervical. ....	29
Figura 8. Incidencia de cáncer relacionada con el VPH en Ecuador (estimaciones para 2012). ....	30
Figura 9. Topología superficial de la cápside del virus adeno-asociado tipo 2 perteneciente a la familia Parvoviridae y al género Dependovirus. ....	30
Figura 10. Reconstrucción 3D de la cápside entera del virus de Norwalk.....	32
Figura 11. Estructura del virión de la familia Picornaviridae y reconstrucción 3D.....	34
Figura 12. Estructura del virión de la familia Astroviridae y su reconstrucción 3D.....	36
Figura 13. Objetivos de vigilancia en la cadena alimenticia para enfoques de secuenciación metagenómica. ....	48
Figura 14. Diagrama del diseño de plan experimental para analizar los virus presentes en muestras de agua tomadas de los ríos Monjas y Machángara a través de metagenómica. ....	50

Figura 15. Diagrama resumen del procesamiento bioinformático. ....	57
Figura 16. Proceso de ensamblaje utilizando el grafo de Bruijn.....	59
Figura 17. Clasificación de los contigs de acuerdo a familia y especie. ....	60
Figura 18. Condiciones de hit contra las tres bases de datos .....	60
Figura 19. Puntos de muestreo a lo largo de las parroquias urbanas del Distrito Metropolitano de Quito.. .....	63
Figura 20. Representación de la abundancia de especies virales a través de un mapa de calor, donde se ubican los 3 sitios de muestreo (M1=sur, M2=centro y M3=norte). .....	66
Figura 21. Clasificación de especies virales de acuerdo a su hospedero. ....	67
Figura 22. Descripción de patógenos virales humanos detectados en aguas superficiales y su asociación con los tejidos que infectan. ....	71
Figura 23. Árbol filogenético de Bufavirus humano empleando la secuencias forward de los contigs 78300 y 66586, la secuencia complementaria reversa del contig 34693 y las secuencias VP1 de Bufavirus humano genotipo 1, 2 y 3. ....	84
Figura 24. Árbol filogenético de Echovirus 25 empleando la secuencia forward del contig 47150 previamente tipificado y las secuencias VP2-VP3 de E24, E25, E26.....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de microorganismos en aguas residuales .....	21
Tabla 2. Diversidad de especies virales humanas en agua residual sin procesar y sus principales síntomas .....	22
Tabla 3. Métodos para la concentración de virus a partir de muestras de agua. ....	39
Tabla 4. Métodos para detección de virus a partir de fuentes ambientales.....	42
Tabla 5. Descripción de plataformas de secuenciación de primera, segunda y tercera generación. ....	44
Tabla 6. Secuencias de los cebadores empleados para la qPCR.....	53
Tabla 7. Cebadores empleados en retrotranscripción y PCR.....	55
Tabla 8. Condiciones de tiempo y temperatura para realizar la PCR.....	56
Tabla 9. Características de la muestra e indicadores microbiológicos .....	64
Tabla 10. Características genómicas por muestra. ....	65
Tabla 11. Familias y especies virales potencialmente patógenas para humanos detectadas en muestras de Quito.....	69
Tabla 12. Análisis de tipificación de especies virales humanas .....	78

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

De acuerdo a los últimos reportes, se estima que 2400 millones de individuos a nivel mundial carecen del servicio de saneamiento mejorado de agua potable, sin embargo, esta situación busca ser remediada para el año 2030 con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (Garn et al., 2017 y Pérez-Foguet et al., 2017). Cabe mencionar también que como resultado del saneamiento deficiente y suministro de agua inadecuado se producen pérdidas económicas significativas, que incluyen la falta de productividad y el costo de asistencia sanitaria. Por esta razón, el empleo de métodos de bajo costo puede ser opción adecuada, especialmente en las áreas rurales, para evitar principalmente prácticas como la defecación al aire libre (Dickin et al., 2017).

En cuanto a la cobertura de saneamiento en Ecuador, esta se puede considerar como limitada con base en los reportes estadísticos del Programa Conjunto de Monitoreo de Abastecimiento de Agua, Saneamiento e Higiene del año 2015 donde los porcentajes de saneamiento no mejorado, defecación abierta, saneamiento limitado, saneamiento básico y saneamiento manejado con seguridad fueron de 1,36%, 3%, 9,49%, 43,77% y 42,37%, respectivamente. Por otra parte, las aguas residuales del país son un aspecto importante para considerar puesto que del total únicamente el 28,8% recibe tratamiento y el porcentaje restante de las aguas residuales se disponen *in situ*. El tratamiento que se emplea para las aguas residuales es tratamiento biológico de lodos activados. Otro dato importante es que el porcentaje de tratamiento ha incrementado dado que en el año 2010 se reportó únicamente el 5% (*World Health Organization (WHO) y United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF), 2017a*).

En la actualidad, el grado de importancia de las aguas residuales que no reciben tratamiento es mayor, puesto que al ser descargadas en cuerpos de aguas superficiales cercanos a centros urbanos impactan el entorno natural y las actividades humanas, al considerar que la mayoría de la población está ubicada en este sector. Además, la importancia de las aguas residuales radica en que se

pueden conocer impactos de la contaminación, riesgos para la salud y posibles consecuencias futuras derivadas del impacto ambiental a través del análisis de su microbioma (McLellan et al., 2015).

Se debe considerar que la falta de saneamiento de las aguas residuales afecta la sostenibilidad ambiental y contribuye a la degradación de ecosistemas acuáticos por la cantidad de nutrientes, patógenos y materia orgánica presentes en este tipo de agua. Esta carencia de saneamiento también afecta al bienestar humano y la diarrea es una de las principales consecuencias derivadas del consumo de agua sin saneamiento, siendo la causante de altas tasas de mortalidad y morbilidad en niños. Además, contribuye a la propagación de distintas enfermedades como desnutrición, parasitosis, retraso de crecimiento, entre otras (Dickin et al., 2017).

En relación con lo anterior mencionado, el agua posee un rol fundamental en la transmisión de enfermedades y este hecho se puede asociar al inadecuado tratamiento de las aguas residuales y a la infraestructura deficiente. Otro factor que considerar es que para garantizar la seguridad microbiana del agua residual y de consumo se emplean únicamente indicadores bacterianos, los mismos que no contribuyen a la protección de la salud pública puesto que no revelan la presencia de protozoos o virus. Estos últimos se mantienen por períodos prolongados de tiempo en el agua a diferencia de los indicadores bacterianos (Gim et al., 2014).

En el agua residual se puede encontrar una gran diversidad de patógenos, sin embargo, los virus son los más difíciles de caracterizar y también los que representan mayor grado de peligrosidad. Especialmente en muestras ambientales impactadas por agua residual se pueden detectar especies virales tales como bacteriófagos, virus humanos y animales, al considerar que todas las entidades vivientes tienen al menos un virus asociado (Calgua et al., 2013 y O'Brien et al., 2017). Además, análisis metagenómicos continúan revelando especies virales nuevas y emergentes en aguas impactadas por agua residual tales como poliomavirus de células Merkel, klassevirus, virus parecido a asfarvirus, poliomavirus WU y KI (Calgua et al., 2013).

En cuanto a las tecnologías de detección microbiana, estas se encuentran cambiando constantemente y como ejemplo se pueden considerar las técnicas que se utilizan para detección de virus, principalmente PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y PCR de transcriptasa inversa. Estas técnicas no permiten identificar todos los virus de una muestra debido a que requieren conocer las secuencias de estos, sin embargo, se continúan empleando. Es por ello por lo que la metagenómica surge como una solución a estos inconvenientes, dado que no requiere conocer las secuencias y puede secuenciar genomas completos de microorganismos individuales o comunidades microbianas valiéndose de las tecnologías de secuenciación masiva (Gim et al., 2014). Además, la metagenómica supera la restricción de los métodos dependientes de cultivo, permitiendo la identificación de microorganismos no cultivables y facilitando el acceso a la diversidad funcional y filogenética de las comunidades microbianas (Bibby y Peccia, 2013 y Hazen et al., 2012).

Algunos estudios realizados en aguas residuales y en muestras ambientales en general han empleado la secuenciación masiva con el fin de analizar metagenomas virales, debido a que las valoraciones sobre la aparición viral son más conservadoras que las tasas detectadas por qPCR (PCR cuantitativa). Sin embargo, se debe mencionar que esta herramienta no permite evaluar la infectividad de los microorganismos presentes en muestras ambientales (O'Brien et al., 2017).

Al momento de emplear la metagenómica para análisis virológicos en muestras ambientales se presentan principalmente tres desafíos. Primeramente, de todos los ácidos nucleicos presentes en una muestra sola una pequeña fracción de ellos son de origen viral conocido, motivo por el cual es necesario realizar una purificación mecánica y enzimática. Además, antes de los procesos de extracción de ácidos nucleicos es necesario aplicar métodos de concentración viral, por ejemplo floculación orgánica con leche descremada, debido a que en muestras ambientales la concentración de partículas virales es baja. Finalmente, con el proceso de extracción de ácidos nucleicos se deben cubrir la diversidad tipos de genomas y estructuras virales (Hjelmsø et al., 2017).

## 1.2 Planteamiento del problema

Las descargas de aguas residuales son uno de los mayores problemas ambientales de la ciudad de Quito, puesto que los ríos y quebradas de la capital reciben la mayoría de las aguas residuales sin previo tratamiento. Únicamente se dispone de una planta de tratamiento en el sur de la ciudad, planta de tratamiento de aguas residuales Quitumbe (PTAR-Quitumbe), la misma que trata las aguas residuales con base en el tratamiento biológico de lodos activados. La planta empezó a funcionar a inicios del 2017 y tiene como objetivo recuperar las aguas residuales y aportarlas al río Machángara, el caudal de PTAR-Quitumbe es de 108 L/s (Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento de Quito (EPMAPS), 2016). Se debe mencionar también que esta planta no recibe el aporte de todos los habitantes del sur sino únicamente de 75 mil personas distribuidas entre 7 barrios, que incluyen los barrios: San Francisco del Sur, La Ecuatoriana, Manuelita Sáenz, Las Orquídeas, Nuevos Horizontes, San Alfonso, La Concordia, Los Arrayanes, Martha Bucaram de Roldós, Los Cóndores y Ninallacta (EPMAPS, 2016 y Rosales, 2017).

El impacto ambiental que sufren los ríos de la ciudad de Quito por las aguas residuales se debe al origen del sistema de alcantarillado, puesto que se rellenaron y entubaron algunas quebradas principalmente con el objetivo de unir los barrios de la ciudad y utilizar estas conexiones para descargar las aguas residuales, aguas lluvias y basura en las quebradas y ríos. Estas descargas afectan tanto el entorno natural como la salud de las poblaciones cercanas a dichos ríos dado que el agua de río se utiliza para fines recreativos, agrícolas, de consumo directo, entre otros (EPMAPS, 2011).

Se debe mencionar también que aproximadamente 33 quebradas y cauces atraviesan el Distrito Metropolitano de Quito, las mismas que han sido rellenadas mayoritariamente provocando la alteración del ecosistema natural. Además, con base en reportes de la EPMAPS se denota que los ríos Monjas, Machángara, San Pedro y Guayllabamba reciben un caudal de 0,64, 3,48 y 0,69 m<sup>3</sup>/s, respectivamente; este último valor engloba el caudal de San Pedro y

Guayllabamba. De esta forma se demuestra el impacto que sufren los ríos Machángara y Monjas mayoritariamente (EPMAPS, 2011).

En relación con esta información se debe mencionar que los ríos afluentes de la cuenca del río Guayllabamba conectan con el río Esmeraldas para descargar finalmente sus aguas en el Océano Pacífico, se estima que dichas descargas llevan un flujo de aproximadamente 1% de las aguas residuales provenientes de la capital. Por lo tanto, las aguas residuales se dispersan hacia otras provincias del país, incrementando el riesgo de exposición a patógenos dado que a partir del río Esmeraldas se proporciona el suministro de agua potable a la población de Esmeraldas. Además, estudios realizados en el río Esmeraldas manifiestan que este río presenta una elevada carga microbiana y contaminantes emergentes (EPMAPS, 2011 y Voloshenko-Rossin et al., 2015)

Por otra parte, se debe considerar que las aguas residuales, descargadas en los principales ríos, reciben el aporte de microbiota de aproximadamente 2,2 millones de habitantes que residen en el Distrito Metropolitano de Quito (Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), 2010). Se incluye también la infección de patógenos en este aporte de microbiota, dado que las aguas residuales contienen una mezcla de fluidos biológicos tanto de personas sanas como enfermas. Por lo tanto, las aguas residuales pueden albergar una población viral heterogénea, donde se pueden encontrar virus entéricos, respiratorios y oncogénicos, determinando así el potencial riesgo de contaminación de aguas destinadas para consumo, irrigación, recreativas y acuicultura con aguas residuales (Calgua et al., 2013 y Hjelmsø et al., 2017).

La contaminación microbiológica de las aguas representa un riesgo para la salud de las poblaciones, debido a que las enfermedades infecciosas causadas por virus se deben mayoritariamente al consumo de agua contaminada impactada por aguas residuales. En relación con ello, el tratamiento que en la actualidad se aplica para depurar las aguas residuales no garantiza la completa ausencia de patógenos virales posterior al proceso de tratamiento de las aguas residuales (Calgua et al., 2013).

### **1.3 Objetivo general**

Analizar por metagenómica las especies virales excretadas por la población en las aguas residuales urbanas descargadas en los ríos Machángara y Monjas de la ciudad de Quito.

### **1.4 Objetivos específicos**

- Caracterizar la contaminación fecal humana de los ríos Machángara y Monjas.
- Analizar por metagenómica los virus presentes en los principales puntos de descarga de aguas residuales en los ríos Machángara y Monjas.
- Determinar especies virales potencialmente perjudiciales para los habitantes del Distrito Metropolitano de Quito.

### **1.5 Justificación del trabajo**

En la actualidad continúan presentándose casos clínicos de enfermedades transmitidas por el agua y se estima que cada año alrededor de 2 a 12 millones de personas a nivel mundial fallecen por esta causa, específicamente estos brotes tienen su origen en virus entéricos diseminados en cuerpos de agua (O'Brien et al., 2017). Además, el problema de contaminación persiste a pesar de las tecnologías que se han implementado para el tratamiento de agua de consumo y agua residual, con base en que los virus a diferencia de las bacterias resisten mejor la eliminación y permanecen por largos períodos en el agua. Por ello, es de vital importancia determinar los microorganismos que están circulando en los cuerpos de agua (Gim et al., 2014).

Para evaluar la diversidad viral, las aguas residuales se han convertido en una matriz ideal puesto que contienen una diversidad de patógenos transportados a través de las excretas de miles de personas y entre ellos se incluyen también patógenos virales (Bibby, & Peccia, 2013).

Los virus entéricos son los más peligrosos y comunes, entre los patógenos transmitidos por el agua, por los brotes y enfermedades esporádicas que provocan. En relación con ello, la gastroenteritis es la principal enfermedad que

se vincula con estos virus, sin embargo, pueden relacionarse también con hepatitis, conjuntivitis, enfermedades crónicas, síntomas respiratorios y enfermedades asociadas al sistema nervioso central. Además, por su capacidad de adaptación a nuevos entornos, los virus pueden convertirse en patógenos emergentes usando mecanismos como mutaciones y recombinación (La Rosa et al., 2012).

De forma que, las aguas residuales pueden utilizarse como herramienta de vigilancia epidemiológica, es decir analizar los virus que circulan en la población, y proporcionar datos relevantes sobre el apareamiento de distintas formas patógenas del virus con base en la identificación de las fuentes de diversidad genética (Bijlsma et al., 2014 y Brinkman et al., 2017). Por lo tanto, con la presente investigación se busca comprender la diversidad de microorganismos provenientes del sistema de alcantarillado y alertar a las autoridades sobre la importancia de tomar medidas para evitar la exposición a estos contaminantes, por ejemplo, en caso de desbordamiento de ríos o alcantarillas, dado que es de conocimiento público que las aguas residuales de la ciudad de Quito se descargan sin ningún tratamiento previo en los ríos y quebradas (Fahrenfeld et al., 2016).

Por otra parte, se debe considerar que los métodos dependientes de cultivo dificultan la detección viral debido a que los virus experimentan mutación continua y son altamente diversos, además, estos métodos incrementan el tiempo y de forma particular los costos vinculados a identificación y cuantificación viral. Es por ello que la metagenómica tiene como objetivo superar estas limitaciones y detectar especies virales conocidas y descubrir también especies nuevas y emergentes. Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en la caracterización de virus, la mayoría de estudios metagenómicos se dedican al análisis de bacterias. Además, los beneficios de la metagenómica radican en que los análisis se realizan con base en mezclas de secuencias de ácidos nucleicos que se aíslan y secuencian, sin tener un conocimiento previo de las comunidades microbianas a las que pertenecen, directamente de muestras ambientales (Gim et al., 2014). Con esta herramienta se pretende analizar la diversidad de

patógenos, su prevalencia en el ambiente y los genotipos dominantes (Bibby y Peccia, 2013 y Hjelmsø et al., 2017).

## **2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Acceso a agua y saneamiento**

La definición de una fuente de agua mejorada implica que está se encuentre en las inmediaciones del hogar, que esté disponible en todo momento y además, esté libre de contaminación química y fecal (WHO, 2018). En la actualidad debido a las desigualdades económicas, geográficas y de tipo sociocultural, millones de personas tienen acceso limitado o nulo a fuentes mejoradas de agua potable. Existen otros niveles de servicio a parte del manejo de forma segura, tales como: básico, limitado, no mejorado y agua superficial. El servicio básico se refiere a que el agua se obtiene de una fuente mejorada, pero se debe realizar un viaje de no más de 30 minutos, que incluyen ida y vuelta, para conseguir el líquido vital. Mientras que el servicio limitado se refiere a obtener agua de una fuente segura y recorrer más de 30 minutos, en un viaje de ida y vuelta. El servicio no mejorado implica obtener agua potable de sitios sin protección, ya sea un manantial o un pozo excavado. Por último, el servicio denominado agua superficial se refiere a que el agua se obtiene de forma directa de un canal, río, lago, canal de irrigación, entre otros (WHO y UNICEF, 2017b).

El saneamiento es otro factor importante a tener en consideración puesto que implica que las excretas humanas se eliminan de forma segura, haciendo referencia a que se deben contener o tratar las deposiciones fuera del sitio, para evitar un efecto negativo en la salud de población en general (Mara et al., 2010). Además del servicio manejado con seguridad existen otros 4 servicios adicionales, como por ejemplo: básico, limitado, no mejorado y defecación abierta. El servicio básico se refiere a que las instalaciones mejoradas no tienen que compartirse con otras familias. Mientras que el servicio limitado es lo opuesto al básico y requiere que se compartan con dos o más familias las instalaciones mejoradas. Por su parte el servicio no mejorado hace referencia al uso de letrinas colgantes o letrinas que no posean losas o plataformas. El último servicio, defecación abierta, implica que la disposición de los excrementos humanos se

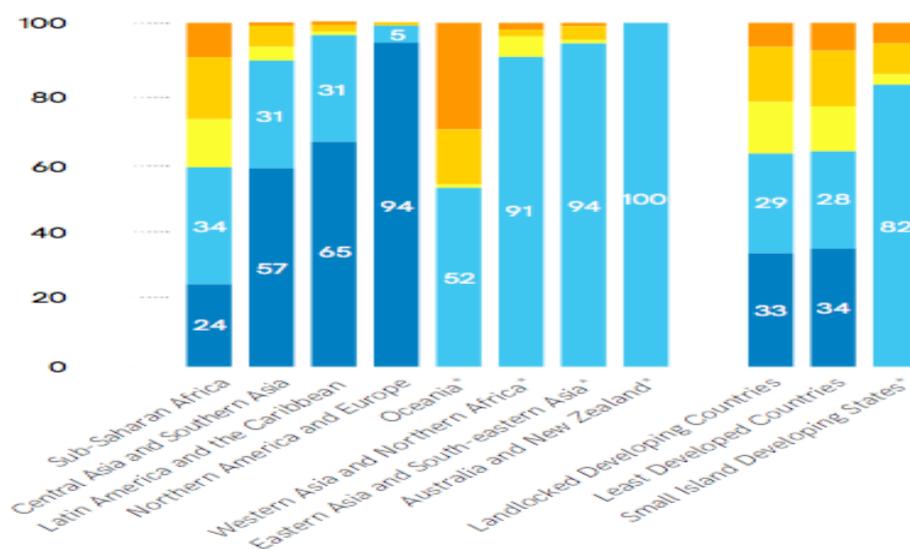
realiza en espacios, tales como bosques, arbustos, campos, entre otros (WHO y UNICEF, 2017b).

En consecuencia, se debe considerar que el saneamiento deficiente y el agua contaminada están relacionados de forma estrecha con la transmisión de enfermedades. Puesto que la salud de las personas se ve expuesta a riesgos debido a servicios de saneamiento y de agua ausentes o mal gestionados. Dentro de este manejo incorrecto se pueden encontrar a las aguas industriales, las aguas residuales urbanas y las agrícolas, debido a que en algunos lugares del mundo este tipo de agua entra en contacto con agua potable y pone en riesgo a cientos de millones de personas (WHO, 2018).

### **2.1.1 Cobertura del agua y saneamiento a escala global**

En 2015, se estimó que alrededor de 5,2 millones de personas, es decir el 71% de la población mundial, emplearon servicios de agua potable gestionados con seguridad (WHO y UNICEF, 2017b). Mientras que la población restante que no posee servicios gestionados de forma segura se divide en: 1,3 billones de personas con servicios básicos (17%), 263 millones de personas con servicios limitados (4%), 423 millones de personas con servicios no mejorados (6%) y 159 millones de personas (2%) que recolectan agua superficial (WHO, 2018).

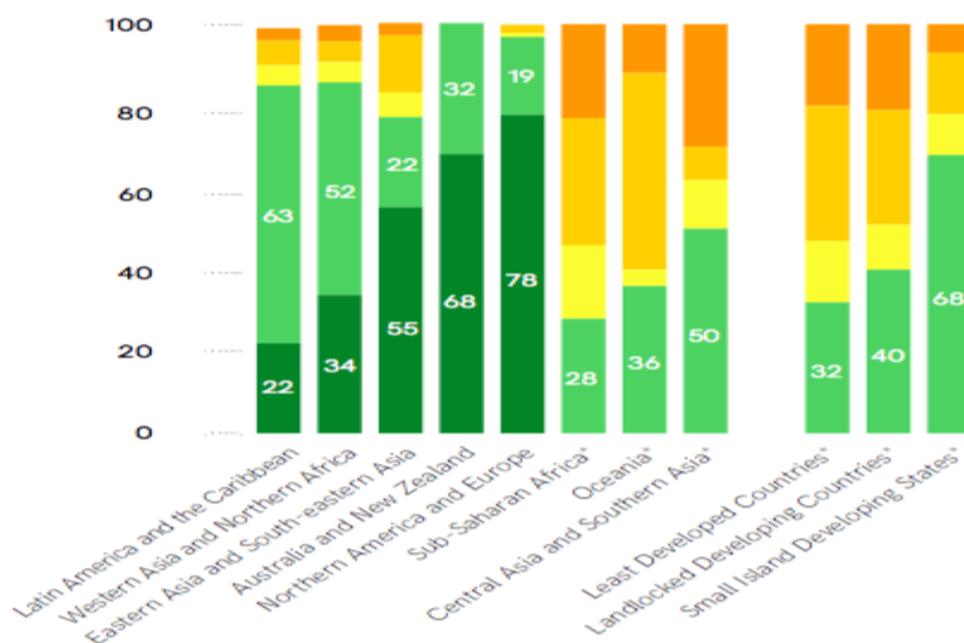
En la *figura 1* se puede observar como los niveles de cobertura de agua potable varían dependiendo de los países o regiones, por ejemplo en África subsahariana los servicios de agua potable gestionados de forma segura corresponde únicamente al 24% en comparación con Norteamérica y Europa que presenta un 94%. De igual forma, se puede visualizar como predomina el consumo de agua superficial en Oceanía en comparación de los países de Latinoamérica y el Caribe.



*Figura 1.* Cobertura regional de agua potable año 2015. Los niveles de cobertura se asignaron en base a una escala de color, anaranjado (agua superficial), mostaza (no mejorado), amarillo (limitado), celeste (básico) y azul (manejado de forma segura).

Tomado de (WHO y UNICEF, 2017b)

Mientras que con relación a saneamiento, se estima que 2900 millones de personas, es decir el 39% de la población mundial, emplean un servicio de saneamiento gestionado de forma segura. La población restante se encuentra distribuida en otros servicios, por ejemplo: 29% servicios básicos, 8% limitados, 12% no mejorados y 12% defecación abierta (WHO y UNICEF, 2017b). Por ejemplo en la *figura 2*, se señala como Norteamérica y Europa presentan un porcentaje de saneamiento manejado de forma segura (78%) más alto en comparación con Latinoamérica y el Caribe (22%). Además, en cuanto a los niveles de defecación abierta, los países que presentan los niveles más elevados son principalmente Oceanía, África subsahariana y países de Asia central y meridional.



*Figura 2.* Cobertura regional de saneamiento año 2015. Los niveles de saneamiento se establecieron en base a una escala de color, anaranjado (defecación abierta), mostaza (no mejorado), amarillo (limitado), verde claro (básico) y verde oscuro (manejado de forma segura).

Tomado de (WHO y UNICEF, 2017b).

Por otra parte, las conexiones de alcantarillado también son elementos fundamentales del saneamiento en contexto urbano y de acuerdo al último estudio realizado en 2015, alrededor del 38% de la población mundial, es decir dos de cada cinco personas en todo el mundo, usan conexiones de alcantarillado y el 38% de la población restante únicamente disponen de saneamiento *in situ* (WHO y UNICEF, 2017b).

Se conoce también que el 63% de la población que reside en zonas urbanas tiene acceso al alcantarillado y únicamente el 9% de los habitantes de zonas rurales disponen de este servicio. Basándose en esta información se debe considerar que no todas las aguas residuales terminan en una planta de tratamiento, puesto que las tuberías de los inodoros pueden estar conectadas a desagües abiertos o de forma directa a aguas superficiales. Otro de los posibles escenarios es que las aguas residuales pueden desbordarse de estaciones de

bombeo o de alcantarillas y de esa forma no llegar a las plantas de tratamiento. Por lo tanto, a nivel mundial se considera que solamente el 73% de las aguas residuales conectadas al sistema de alcantarillado reciben al menos un tratamiento secundario. Este tipo de tratamiento implica un tratamiento biológico u otro proceso que conlleve a una eliminación de demanda biológica de oxígeno y demanda química de oxígeno de 70% y 75%, respectivamente (WHO y UNICEF, 2017b).

### **2.1.1.1 América**

Conforme al estudio ejecutado entre 1990-2015, la región americana presentó un porcentaje de reducción de personas sin acceso a servicios mejorados de agua potable de 62%. Mientras que el porcentaje de descenso en cuanto a la población que no dispone servicio de saneamiento mejorado se ubica en 47%, es decir América aún se encuentra a mitad del camino debido a que el objetivo era alcanzar el 50% (WHO, 2016).

Específicamente en Latinoamérica y el Caribe, los porcentajes de cobertura de fuentes mejoradas de agua potable y de fuentes básicas se sitúan en 65% y 31%, respectivamente. Además, en relación con los servicios de saneamiento manejados de forma segura y servicios de saneamiento básico, sus porcentajes de cobertura se ubican en 22% y 63% con respecto a los servicios antes mencionados. Por consiguiente, se ha determinado que el 63% de la población tiene acceso a alcantarillado y el 27% disponen de saneamiento in situ. Sin embargo, únicamente el 37% de las aguas residuales conectadas a alcantarillado reciben tratamiento (WHO y UNICEF, 2017b).

En Ecuador, la cobertura de agua potable se distribuye de la siguiente forma: 74,36% manejada de forma segura, 18,25% básica, 0,49% limitada, 2,78% no mejorada y 4,13% agua superficial. Sin embargo, se considera que la cobertura de saneamiento en el país es limitada, puesto que al saneamiento manejado de forma segura le corresponde solamente el 42,37%; el porcentaje restante se subdivide en 43,77% para saneamiento básico, 9,49% limitado, 1,36% saneamiento no mejorado y 3% defecación abierta (WHO y UNICEF, 2017a).

Además, se estima que a nivel nacional solo el 28,8% de las aguas residuales reciben tratamiento biológico de lodos activados y el porcentaje restante se disponen *in situ*. Por otra parte, en las áreas rurales del Ecuador, el 86% de las instalaciones de saneamiento *in situ* nunca han sido vaciadas (WHO y UNICEF, 2017a).

De acuerdo a la Estrategia Nacional de Agua y Saneamiento se necesita una inversión de 7300 millones de dólares para garantizar una cobertura del 100% de los servicios de saneamiento y agua potable en todo el territorio nacional. Este plazo inició en el año 2014, por lo que el estado ecuatoriano está invirtiendo 350 millones de dólares por año, sin embargo, se deberán duplicar las inversiones para conseguir este propósito. Concretamente, se necesitan 2400 millones de dólares para el agua potable y 4900 millones de dólares para el saneamiento. Dentro del valor de saneamiento se incluye también el tratamiento de aguas residuales, específicamente la cobertura de 10 ciudades que constituyen el 38% de la población ecuatoriana. Finalmente, del valor total de \$7300 millones, se distribuirán cinco mil millones de dólares para necesidades urbanas y \$2300 millones para necesidades rurales (WHO, 2017b).

### **2.1.2 Infraestructuras de saneamiento en Quito**

La ciudad de Quito se ubica en la provincia de Pichincha y es a su vez la capital del Ecuador. Además, Quito se encuentra a 2805 msnm y tiene una extensión de 423000 hectáreas; esta ciudad tiene una población aproximada de 2,2 millones de habitantes y se prevé que para los años 2020 y 2040 la población incrementará a 3 millones y 4,2 millones, respectivamente. Dentro del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) se incluyen 33 parroquias y la ciudad de Quito (EPMAPS, 2011).

Por otra parte, el DMQ se caracteriza por ser una zona de montaña, cuyos ríos y quebradas atraviesan el distrito. Además, su cauce natural pertenece a la cuenca alta del denominado río Esmeraldas, el mismo que vierte sus aguas en el Océano Pacífico. El sistema hidrográfico que tiene mayor importancia para el área del DMQ se constituye por los ríos Pita, Machángara y Monjas, los mismos

que en su afluencia fundan el río San Pedro y luego el río Guayllabamba (EPMAPS, 2011).

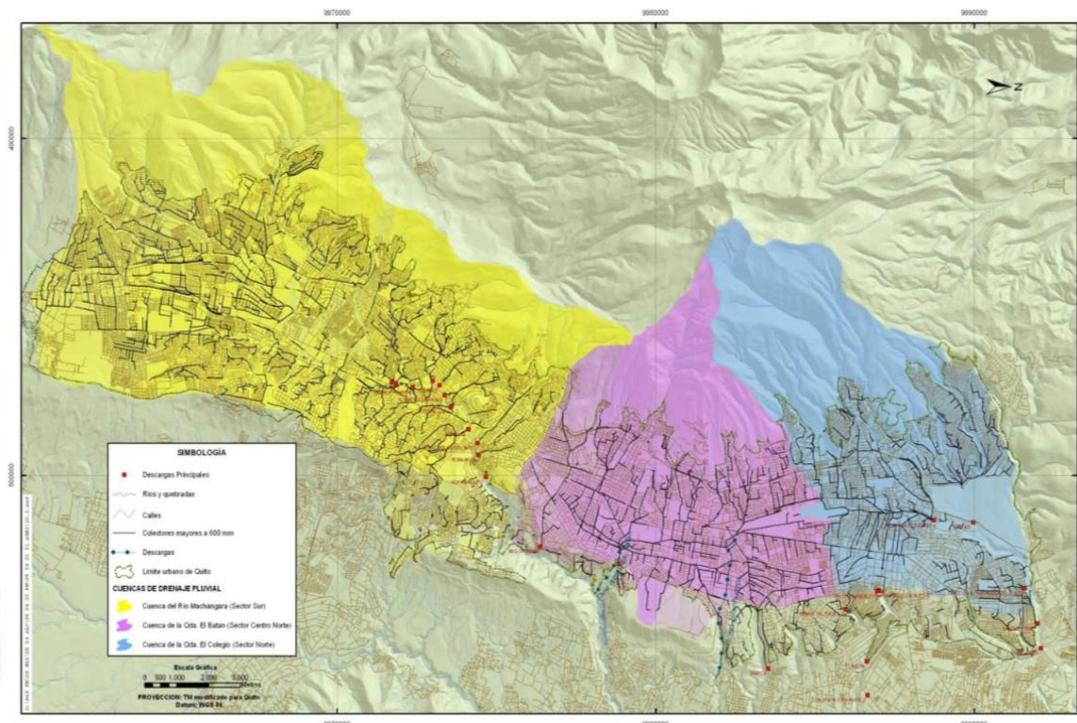
A principios del siglo XX, en los barrios del Centro Histórico se inició la construcción de sistemas que permitieron la recolección de aguas de tipo pluvial y residual. Por su parte, la canalización de quebradas y calles empezó a partir de los años 40 en las zonas sur y norte de la ciudad (EPMAPS, 2011). Desde este punto, los sistemas de alcantarillado de toda la ciudad de Quito están conectados a los principales Ríos y Quebradas, estableciendo de acuerdo a la orografía y topografía de la ciudad las principales cuencas de aporte aguas residuales (*Figura 3*), tales como:

- Cuenca del Río Machángara: Es en la actualidad la mayor cuenca del DMQ y tiene una dimensión de aportación urbana de 85 km<sup>2</sup>. Además, la contribución de zonas naturales tienen un área de 55 km<sup>2</sup>. Con base en estos datos, se estima que el servicio de alcantarillado domiciliario tiene una cobertura del 85%. Esta cuenca se ubica en el sur de la ciudad y a su vez recibe aportes de los sectores sur y de algunos sectores del centro y centro norte (EPMAPS, 2011).
- Cuenca de la Quebrada Anglo French: En el sector centro de la ciudad se ubica esta cuenca, la misma que abarca algunas parroquias tales como San Juan, Mariscal Sucre, Belisario Quevedo e Itchimbía. Además, esta cuenca tiene un área de aportación de 5,9 km<sup>2</sup> que pertenece a sectores urbanos y 2,6 km<sup>2</sup> que corresponde a áreas naturales; la cobertura para esta cuenca es del 99%. En la Quebrada Anglo French confluyen todas las aguas pertenecientes a esta cuenca, específicamente en el sector de la Vicentina (EPMAPS, 2011).
- Cuenca de la Quebrada El Batán: Se encuentra en los sectores centro y centro norte del DMQ y recibe un aporte parcial o total de las siguientes parroquias, Iñaquito, Belisario Quevedo, Cochapamba, Kennedy, Rumipamba, Mariscal Sucre, Concepción. Las aguas de esta cuenca terminan en la Quebrada El Batán, concretamente cerca de la vía que lleva a Tumbaco, y esta quebrada a su vez descarga sus aguas en el

sector de Guápulo específicamente el río Machángara. Además, el área de contribución urbana de la cuenca es de 33 km<sup>2</sup> y posee asimismo un área de aportación de 18 km<sup>2</sup> que corresponden a áreas naturales; de tal manera que la cobertura es del 97% (EPMAPS, 2011).

Por otra parte, debido a inundaciones de sectores bajos de la cuenca y a rebosamiento de agua de los colectores se han llevado a cabo obras de alivio en los últimos tramos del colector Central de Ñaquito (EPMAPS, 2011).

- Cuenca de la Quebrada El Colegio: Esta cuenca se ubica en los sectores centro norte y norte y la mayoría de sus aguas se descargan en la Quebrada El Colegio; aguas abajo esta quebrada cambia su nombre y se denomina río Monjas, el mismo que finalmente aporta al río Guayllabamba. Además, esta cuenca tiene un área de aporte de 21 km<sup>2</sup> de la zona urbana y un a contribución de 15,6 km<sup>2</sup> del área natural. Por lo tanto, la cobertura del sistema de alcantarillado es aproximadamente de 92%. Sin embargo, existen efectos ambientales negativos en sectores cercanos al Río Monjas debido a la falta de interceptores sanitarios y a que las aguas residuales se descargan sin ningún tratamiento (EPMAPS, 2011).



*Figura 3.* Cuencas de Aporte del Sistema de Alcantarillado de la Ciudad de Quito. En el área de color amarillo se ubican las cuencas del río Machángara (sector sur) y de la Quebrada Anglo French (sector centro). El área rosa corresponde a la cuenca de la Quebrada El Batán (sector centro-norte) y el área azul representa a la cuenca de la Quebrada El Colegio (sector norte).

Tomado de (EPMAPS, 2011).

Por lo tanto, los ríos Machángara, Monjas, San Pedro y Guayllabamba reciben un caudal de aguas residuales de 3,8, 0,64 y 0,69 m<sup>3</sup>/s, este último valor engloba las descargas tanto del río San Pedro como del río Guayllabamba. De tal forma que en los ríos de Quito se está descargando un total de 4,81 m<sup>3</sup>/s (EPMAPS, 2011).

En vista del impacto ambiental que han venido sufriendo los ríos y quebradas de la ciudad de Quito, la Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento ha establecido algunos proyectos que permitirán en el futuro la recuperación de los cuerpos receptores de las aguas residuales. Estos proyectos se enfocan en el tratamiento de las aguas residuales, por lo cual se necesitan

varias etapas, tales como: “captación, conducción, tratamiento y descarga” (EPMAPS, 2011).

La Planta de Tratamiento de Aguas Residuales denominada PTAR-Quitumbe entró en funcionamiento a inicios del año 2017 como parte del proyecto de la EPMAPS que busca descontaminar los ríos y quebradas de la ciudad. Esta planta se ubica en el Sur de Quito, ocupa un área de 1,5 hectáreas, y puede tratar un caudal de 108 L/s de aguas residuales (EPMAPS, 2016 y Rosales, 2017). PTAR-Quitumbe tiene como objetivo tratar las aguas residuales antes de que estas lleguen a Quebrada Calicanto, con el fin de recuperar ambientalmente el río Machángara. De esta forma, más de 75 mil habitantes de barrios del sur se benefician de esta planta de tratamiento (Rosales, 2017).

El proceso de tratamiento de las aguas residuales en PTAR-Quitumbe tiene su base en el tratamiento biológico denominado lodos activados con aireación extendida (Rosales, 2017). Además, como parte del proyecto de Recuperación de ríos y quebradas se han llevado a cabo algunas intervenciones en las quebradas que son afluentes del río Machángara y también se han realizado intervenciones en el Río Grande (Gómez, 2016). Por lo tanto, se espera que para mediados de 2019 se consiga el saneamiento de todos los cauces y quebradas del sector sur de la ciudad (Rosales, 2017).

La EPMAPS también tiene en consideración la construcción de PTAR-Vindobona, la misma que beneficiaría a 3 millones de habitantes y tendría un caudal promedio de aguas residuales de 7550 L/s para el año 2045. Además, esta planta de tratamiento captaría las descargas de 21 cuencas de drenaje de aguas residuales y captaría también las descargas de parroquias empleando una red de drenaje de aproximadamente 2500 km; las cuencas antes mencionadas aportan al río San Pedro, Monjas, Machángara y Guayllabamba, distribuidos en el norte, centro y sur de la ciudad (EPMAPS, 2016).

La PTAR-Vindobona empleará el tratamiento biológico denominado lodos activados con alimentación escalonada que permitirá remover nutrientes. Además, el tratamiento de las aguas residuales será similar al de la PTAR-Quitumbe (EPMAPS, 2016).

## 2.2 Contaminación microbiológica del Agua

A la contaminación microbiológica se le otorga tal grado de importancia debido a que se estima que el 3,2% de las muertes humanas se deben al consumo de agua insegura, puesto que en el agua pueden estar presentes bacterias y virus patógenos responsables de un sin número de enfermedades transmitidas por el agua (McAllister y Topp, 2012). Además, debido a la escasez de agua en algunas regiones de clima seco se ha planteado la reutilización del agua residual, posterior a un tratamiento específico, para irrigación de cultivos, agua potable, uso recreacional, acuicultura e industrial. Por lo tanto, se deben establecer algunos estándares puesto que la calidad del agua residual es un motivo de preocupación debido a la carga de contaminantes, especialmente contaminación microbiológica (Blumenthal et al., 2000 y WHO, 2017a).

La concentración y variedad de los contaminantes del agua varían dependiendo de los tipos de matrices de agua, tales como agua potable, agua recreativa, agua superficial, entre otros (ALS Environmental, 2017). Por lo tanto, en el agua se pueden encontrar contaminantes inorgánicos, productos químicos y microorganismos patógenos y no patógenos productos de la contaminación antropogénica (Fawell et al., 2003). Entre los distintos contaminantes que pueden estar presentes en las aguas, los microorganismos patógenos presentan algunas características que los diferencian de otros contaminantes. Por ejemplo, los patógenos son discretos y habitualmente se agregan o adhieren a los sólidos que se encuentran suspendidos en el agua, ocasionando de esta forma que las concentraciones de patógenos varíen con el tiempo. Además, algunos patógenos pueden multiplicarse en diferentes ambientes, tales como bebidas, alimentos o sistemas de agua caliente, incrementando la probabilidad de infección. En caso de establecerse la infección, los patógenos pueden multiplicarse en su huésped (WHO, 2011).

Por otra parte, la contaminación microbiológica del agua puede tener su origen en fuentes puntuales, como las descargas de desechos humanos e industriales, o fuentes difusas, tales como las actividades ganaderas y agrícolas (WHO, 2011).

### 2.2.1 Fuentes de contaminación

La contaminación microbiológica del agua se relaciona con animales silvestres, ganadería y humanos, al considerar que esta contaminación es frecuentemente de naturaleza fecal (Jung et al., 2014). Como fuentes puntuales de contaminación se encuentran las descargas de aguas residuales domésticas y de instalaciones industriales (*Figura 4*), las cuales que en algunos lugares del mundo reciben tratamientos deficientes o ningún tratamiento antes de liberarse a los cuerpos de agua. Esto significa que el riesgo de transmisión de patógenos es mayor, puesto que los desechos fecales humanos sin tratamiento pueden albergar una variedad de potenciales patógenos de tipo viral, bacteriano o protozoarios (WHO, 2011). Por lo tanto, se puede decir que las concentraciones de patógenos se correlacionan con las actividades urbanas (Jung et al., 2014).

Por otra parte, las letrinas y fosas sépticas también pueden ser una fuente importante de contaminación especialmente cuando se encuentran cerca de pozos (Fawell et al., 2003).

Especialmente en las áreas urbanas, la escorrentía de aguas pluviales en las alcantarillas y el desbordamiento de las mismas pueden contribuir a la contaminación fecal de diversas fuentes, como por ejemplo animales domésticos y la vida silvestre urbana (WHO, 2011). Además, algunos estudios han revelado que los animales domésticos, es decir las mascotas, contribuyen de forma significativa a la contaminación fecal de las fuentes de agua, a través del desbordamiento de pozos y a la diseminación de estiércol (Jung et al., 2014 y Wardrop et al., 2018).

Por otro lado, se puede considerar como fuentes difusas de contaminación a la ganadería y agricultura, puesto que se pueden usar los desechos del ganado y aplicar estiércol a las tierras agrícolas sin antes haber llevado a cabo un tratamiento de los desechos que reduzca el número de patógenos. De tal manera que el escurrimiento de las aguas superficiales y las malas prácticas agrícolas pueden estimular los flujos de contaminación fecal y patógenos (Fawell et al., 2003 y WHO, 2010).

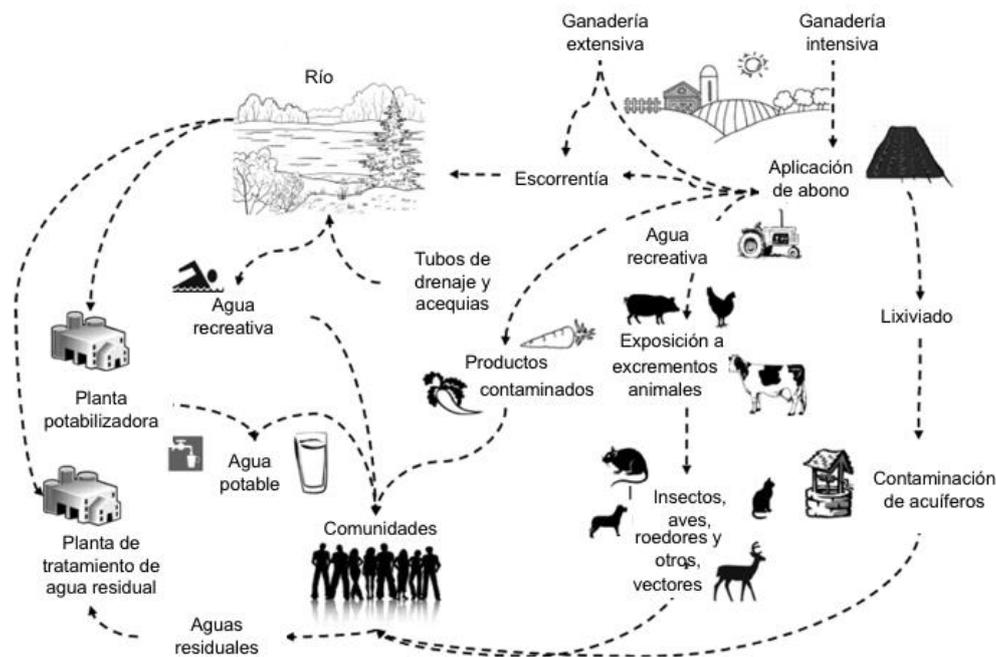


Figura 4. Fuentes puntuales y difusas de contaminación microbiológica del agua.

Tomado de (McAllister y Topp, 2012).

## 2.3 Aguas residuales

Las aguas residuales domésticas se componen principalmente por orina, heces humanas y aguas grises. El agua gris es producto de la preparación de las comidas, el lavado y el baño. Sin embargo, al sistema de alcantarillado también ingresa el agua de diversos negocios e industrias (Gerba y Pepper, 2009).

Los constituyentes principales de las aguas residuales domésticas se dividen en microorganismos (virus, bacterias, huevos de parásitos), materiales orgánicos (agotamiento de oxígeno), otros materiales orgánicos (aceites, detergentes, pesticidas), nutrientes (nitrógeno, amonio, fósforo), metales (mercurio, níquel, cromo, etc.), otros materiales inorgánicos. De tal manera que el principal contaminante de las aguas residuales es la materia orgánica (Henze y Comeau, 2008).

### 2.3.1 Microorganismos presentes en las aguas residuales

Los microorganismos en las aguas residuales representan una población heterogénea (Tabla 1), debido a que provienen de la industria alimentaria y

mayoritariamente de las excretas humanas (Henze y Comeau, 2008). En relación con ello, las heces representan el mayor peligro para la salud puesto que si se analiza un gramo de heces de una persona infectada se puede encontrar alrededor de  $10^6$ - $10^8$  patógenos bacterianos,  $10^6$  patógenos virales,  $10$ - $10^4$  huevos de helmintos y  $10^5$  quistes y ooquistes de protozoos (Mara et al., 2010).

Tabla 1.

*Concentración de microorganismos en aguas residuales (número de microorganismos por 100 mL).*

<i>Microorganismos</i>	<i>Alto</i>	<i>Bajo</i>
E. coli	$5 \times 10^8$	$10^6$
<i>Coliformes</i>	$10^{13}$	$10^{11}$
Cl. perfringens	$5 \times 10^4$	$10^3$
Fecal Streptococcus	$10^8$	$10^6$
Salmonella	300	50
Campylobacter	$10^5$	$5 \times 10^3$
Listeria	$10^4$	$5 \times 10^2$
Staphylococcus aureus	$10^5$	$5 \times 10^3$
<i>Colifagos</i>	$5 \times 10^5$	$10^4$
Giardia	$10^3$	$10^2$
<i>Lombriz intestinal</i>	20	5
Enterovirus	$10^4$	$10^3$
Rotavirus	100	20

Tomado de (Henze y Comeau, 2008).

Los niveles de contaminación microbiológica se han reducido de forma significativa con la implementación de normativas que implican el tratamiento de aguas residuales. No obstante, los virus humanos se continúan diseminando en el medio ambiente y específicamente en el agua mediante las descargas de agua residual tratada o no tratada, principalmente debido a que la mayoría de los países no incluyen a los virus en sus normativas y puesto que a través de procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales es complejo conseguir la eliminación completa de virus (Cantalupo et al., 2011 y Haramoto et al., 2018). Además, las plantas de tratamiento de aguas residuales se enfocan mayoritariamente en la eliminación de protozoos, helmintos, bacterias y en menor medida eliminación de virus (Rojas, 2002). Con base en algunos estudios metagenómicos se conoce que en las aguas residuales sin procesar se pueden encontrar varios tipos de virus humanos, pertenecientes a las familias *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Hepeviridae*, entre otros. En la tabla 2 se detallan los genomas y la sintomatología asociada a cada una de las familias virales.

Tabla 2.

*Diversidad de especies virales humanas en agua residual sin procesar y sus principales síntomas.*

<i>Familia</i>	Genoma	Principales síntomas
<i>Adenoviridae</i>	dsDNA	Infecciones respiratorias agudas, conjuntivitis y gastroenteritis infantil. En pacientes inmunocomprometidos causa neumonía fulminante mortal, hepatitis y/o encefalitis. Algunas especies generan tumores sólidos.
<i>Anelloviridae</i>	ssDNA(-)	Se han encontrado a altas frecuencias en una variedad de especímenes humanos, incluyendo secreciones respiratorias, heces y suero. Actualmente no hay una asociación conocida de la enfermedad para ninguno de los anellovirus.

## Continúa Tabla 2

<i>Familia</i>	Genoma	Principales síntomas
<i>Astroviridae</i>	ssRNA(+)	Causa diarrea viral en niños pequeños y brotes esporádicos de gastroenteritis. Además, afecta el sistema nervioso central y se asocia con enterocolitis necrotizante (ECN)
<i>Caliciviridae</i>	ssRNA(+)	Causan gastroenteritis aguda
<i>Coronaviridae</i>	ssRNA(+)	Infecciones del tracto respiratorio como neumonía grave, resfriado común, laringotraqueitis aguda. Además, se vincula con síndrome respiratorio agudo y grave (SARS)
<i>Flaviviridae</i>	ssRNA(+)	Causan fiebre, encefalitis y fiebres hemorrágicas, donde se incluyen las siguientes enfermedades: dengue, fiebre amarilla y hepatitis C. Además, produce carcinoma hepatocelular
<i>Hepeviridae</i>	ssRNA(+)	Causa hepatitis E. La mayoría de los pacientes experimentarán ictericia, anorexia y hepatomegalia. Aproximadamente la mitad de los pacientes experimentan dolor abdominal y sensibilidad, náuseas y vómitos, y fiebre.
<i>Herpesviridae</i>	dsDNA	Causa herpes, que incluye vesículas cutáneas o úlceras en la mucosa, carcinoma nasofaríngeo y linfoma de Burkitt.
<i>Papillomaviridae</i>	dsDNA	Inducen lesiones benignas de la piel (verrugas) y membranas mucosas (condilomas). También están implicados en el desarrollo de tumores malignos del epitelio, especialmente el cáncer del cuello uterino, otros tumores del tracto urogenital y los cánceres de las vías respiratorias superiores
<i>Parvoviridae</i>	ssDNA	Causa eritema en niños, poliartritis y artralgia, crisis aplásica transitoria, hidropesía fetal y anemia.
<i>Picobirnaviridae</i>	dsRNA	La patogenicidad no ha sido establecida. Los estudios realizados con personas inmunocomprometidas sugieren pueden causar diarrea.

## Continúa Tabla 2

<i>Familia</i>	Genoma	Principales síntomas
<i>Picornaviridae</i>	ssRNA(+)	Genera hepatitis A, poliomieltis, meningitis, gastroenteritis, parálisis flácida aguda, fiebre, vómito y diarrea, enfermedad respiratoria aguda, neumonía, poliomieltis flácida aguda, poliomieltis paralítica fatal, enfermedad de mano, pie y boca.
<i>Polyomaviridae</i>	dsDNA	Sarcoma de kaposi, carcinoma mamario, carcinoma de células de Merkel y tumores de glándula parótida, infección lítica de las células diana: en el cerebro, en el riñón, la vejiga y el uréter, y en la foliculitis del cabello.
<i>Reoviridae</i>	dsRNA	Causan gastroenteritis, enfermedades neurológicas y pulmonares
<i>Togaviridae</i>	ssRNA(+)	Generan encefalitis, artritis, fiebre, erupción cutánea y rubéola.

Adaptado de (Bibby y Peccia, 2013; Cantalupo et al., 2011; International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2012; Knipe y Howley, 2013 y Ng et al., 2012).

Nota: Dentro de este listado se incluyen algunos virus de transmisión conocida y otras vías no conocidas. ds=bicatenario y ss= monocatenario.

## 2.4 Virus entéricos

Los virus entéricos se excretan en considerables cantidades en las heces de personas infectadas y es por ello que su vía de transmisión es fecal-oral (WHO, 2001). De acuerdo a investigaciones, la infectividad de los virus entéricos, presentes en superficies, puede extenderse por períodos prolongados de tiempo (Turnage y Gibson, 2017). Asimismo, los virus entéricos son altamente resistentes en ambientes acuáticos y es por ello que a través de los procesos tradicionales de tratamiento de aguas residuales es difícil conseguir la eliminación total de los virus. Por lo tanto, los virus entéricos pueden persistir en el agua a pesar de los tratamientos anteriormente realizados (Haramoto et al., 2018 y Hellmér et al., 2014)

Por otra parte, se conoce que existen más de 100 tipos de virus entéricos, en los que se incluyen adenovirus, calicivirus, astrovirus, norovirus, rotavirus, enterovirus, entre otros (WHO, 2001). Estos virus pueden causar un sin número de enfermedades debido al consumo de alimentos o de agua contaminada por virus entéricos. Además, existe evidencia de que mediante fomites contaminados, por ejemplo ambientes de preparación de alimentos, se pueden transmitir los virus. Se conoce también que los virus más comunes por causar enfermedades transmitidas por alimentos son Hepatovirus A y virus tipo Norwalk (Turnage y Gibson, 2017).

#### **2.4.1 Enfermedades causadas por patógenos virales**

La enfermedad clínica puede variar dependiendo de los patógenos entéricos que la originan, pero de forma general incluye síntomas tales como vómitos, diarrea y fiebre, de distinta intensidad y duración. Además, desde 1970 se han reconocido algunos patógenos virales entéricos que corresponden esencialmente a cuatro familias *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae* y *Reoviridae*, estos virus generan cada año miles de millones de casos de infección viral entérica (Malik y Matthijnsens, 2014).

Entre las principales enfermedades causadas por patógenos virales se encuentra la gastroenteritis aguda y se conoce que existen alrededor de 31 agentes patógenos que la causan, entre los que se incluyen astrovirus, virus de tipo Norwalk, rotavirus y Hepatovirus A (Turnage y Gibson, 2017).

Por otra parte, los adenovirus, enterovirus, virus Aichi, virus de tipo Norwalk, Hepatovirus A y E, rotavirus, astrovirus y parechovirus pueden causar una amplia gama de síntomas, desde conjuntivitis, gastroenteritis leve a grave, enfermedad respiratoria, meningitis, hepatitis o parálisis (Hellmér et al., 2014).

Específicamente los enterovirus, que incluyen parechovirus y poliovirus, pueden provocar enfermedades graves, como encefalitis, parálisis y meningitis en niños, y una enfermedad febril leve. Mientras que los norovirus son causantes de gastroenteritis aguda y sus síntomas se caracterizan por ser leves y de una

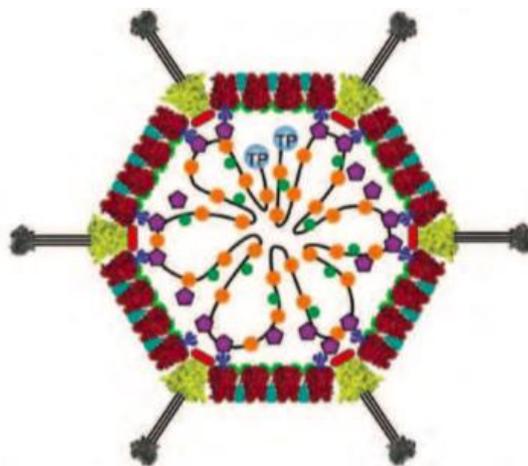
duración no mayor a tres días. No obstante, no se origina inmunidad protectora duradera tras la infección (WHO, 2001).

## 2.4.2 Principales familias de virus patógenos humanos

Las principales virus patógenos humanos causantes de enfermedades se agrupan en las siguientes familias Adenoviridae, Astroviridae, Caliciviridae, Papillomaviridae, Parvoviridae y Picornaviridae.

### 2.4.2.1 Adenoviridae

Los adenovirus son partículas icosaédricas, de un tamaño aproximado de 90 nm, y carentes de envoltura. Además, estos virus poseen un genoma de lineal que se encuentra encapsidado en un caparazón de proteína icosaédrica, el mismo que contiene fibras que se extienden desde los vértices del icosaedro (*Figura 5*). Por otra parte, se han reconocido hasta la actualidad 56 tipos de adenovirus humanos (HAdV), los cuales se clasifican en siete especies desde la A hasta la letra G. Estas especies se han aislado solo de vertebrados, una lista que contiene inclusive peces (Knipe y Howley, 2013).



*Figura 5.* Estructura del virión de Adenovirus humano.

Tomado de (Knipe y Howley, 2013).

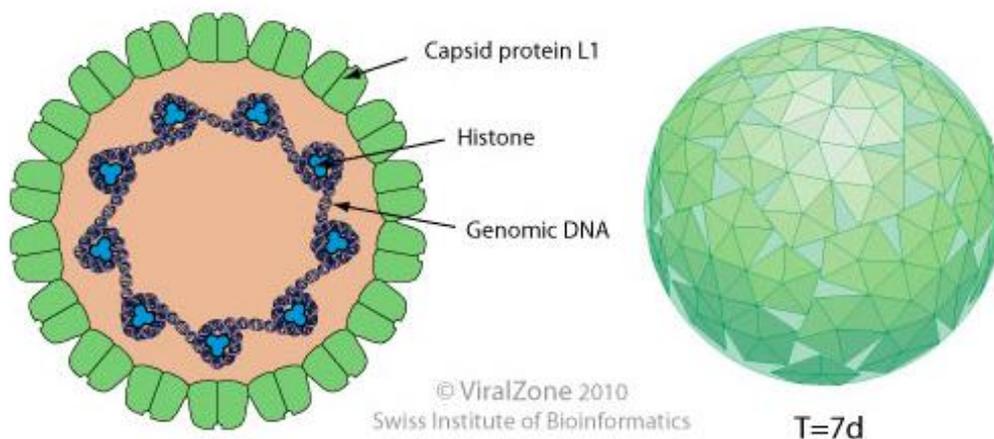
En los humanos, los adenovirus pueden causar algunas enfermedades como gastroenteritis infantil, enfermedad respiratoria y conjuntivitis. Específicamente,

las manifestaciones gastrointestinales se asocian mayoritariamente con Adenovirus humano F40 y F41. Por otra parte, los adenovirus habitualmente provocan una infección autolimitada y aguda leve en pacientes inmunocompetentes, mientras que en pacientes inmunosuprimidos y neonatos pueden ocasionar hepatitis, neumonía fulminante mortal y/o encefalitis (Knipe y Howley, 2013 y Lion, 2014).

Además, al realizar pruebas en animales se ha descubierto que el adenovirus humano tipo 12 induce tumores malignos pero no se pueden relacionar a los adenovirus con la enfermedad maligna en humanos debido a la ausencia de evidencia epidemiológica (no se ha encontrado ADN de adenovirus en tumores humanos), mientras que se detectó su ADN en tumores del sistema nervioso central (SNC) y en tejidos normales del SNC de los mismos pacientes pediátricos. Por lo tanto, el SNC puede ser un lugar habitual de infección de adenovirus en niños (Knipe y Howley, 2013).

#### **2.4.2.2 Papillomaviridae**

Los papilomavirus son virus epiteliotrópicos, cuyo genoma consiste de ADN bicatenario circular y no poseen envoltura (*Figura 6*). Además, estos virus se han aislados de aves, reptiles y mamíferos, pero hasta el momento no se han identificado en invertebrados. Algunos papilomavirus están involucrados en el desarrollo de tumores malignos del epitelio, específicamente en cáncer de cuello uterino, cáncer de las vías respiratorias superiores, y tumores del tracto urogenital. Pueden inducir también lesiones benignas en las membranas mucosas y en la piel, tales como condilomas y verrugas, respectivamente. Es por ello que se han desarrollado vacunas preventivas dirigidas contra los tipos del virus de papiloma humano que se localizan mayoritariamente en los cánceres (Knipe y Howley, 2013).



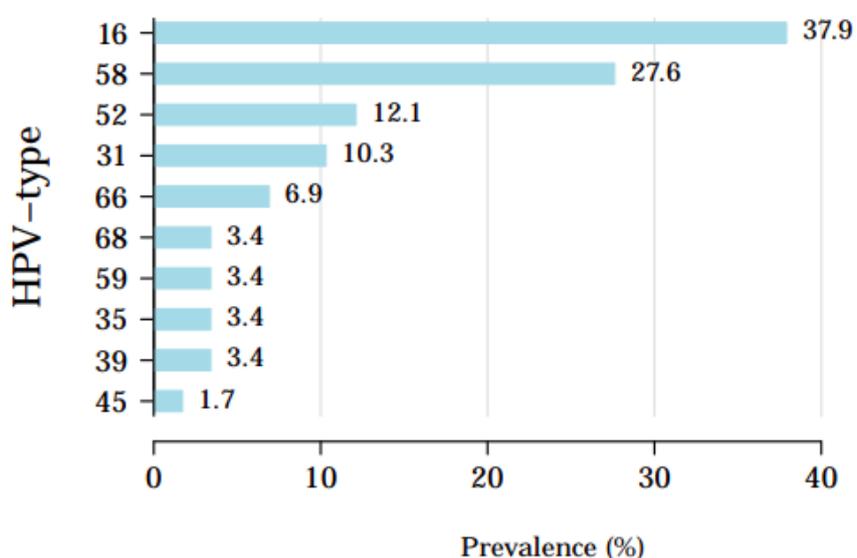
*Figura 6.* Estructura del virión de HPV y reconstrucción 3D.

Tomado de (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), 2010).

Por otra parte, los papilomavirus se clasifican en base a las especies hospedadoras que infectan y los tipos se denominan de acuerdo a su secuencia de ADN, es decir, se asigna un tipo distinto si la secuencia L1 de ADN es por lo menos un 10% distinta de los otros tipos de virus de papiloma humano (VPH). Los papilomavirus se dividen en 29 géneros, cada uno tiene designada una letra del alfabeto griego, de los cuales 24 pertenecen únicamente a animales y los 5 restantes a humanos alfa, beta, gamma, mu y nu. En base a esta clasificación, los miembros del género alfa son los de mayor importancia médica, puesto que infectan las superficies de la mucosa genital y no genital y los genitales externos, provocando de esta forma cánceres genitales y de la mucosa. Además, en este género se agrupan los tipos denominados de alto riesgo por su asociación con el cáncer de cuello uterino y se pueden encontrar las siguientes especies 5, 6, 7, 9 y 11. Por su parte, los virus de los 4 géneros restantes de VPH (beta, gamma, mu y un) también infectan la piel no genital (Knipe y Howley, 2013).

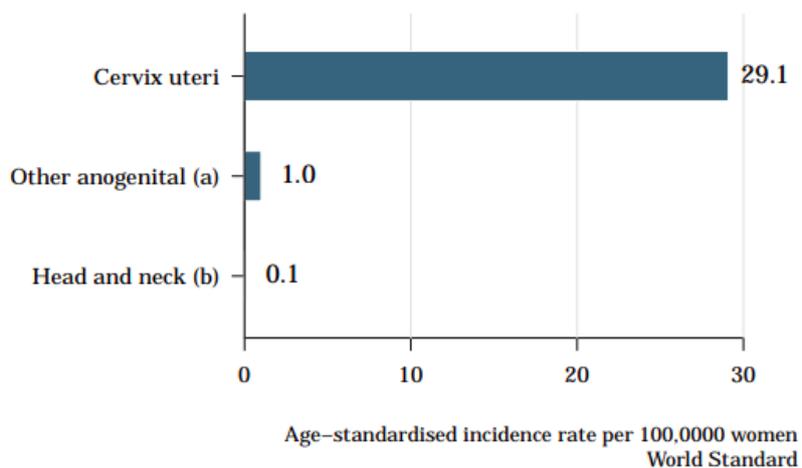
Los virus de papiloma humano están involucrados en cánceres epiteliales de la mucosa, pero también están involucrados en carcinomas anogenitales entre los que se incluye cáncer de pene, cáncer anal, cáncer vulvar y en otros tipos de cáncer como cánceres orofaríngeos y laríngeos. Además, el VPH puede estar relacionado en los cánceres cutáneos de células escamosas (Knipe y Howley, 2013).

Con base en estudios realizados a nivel mundial, se conoce que VPH 16 y 18 son los dos tipos que contribuyen a más del 70% de los casos de cáncer cervical. Después de los dos tipos de VPH mencionados, los seis tipos más comunes son 31, 33, 35, 45, 52 y 58. Por otra parte, específicamente en Ecuador se ha encontrado que existen 10 tipos oncogénicos de VPH que están presentes con mayor frecuencia entre mujeres con cáncer cervical, estos tipos son: 16, 58, 52, 31, 66, 68, 59, 35, 39, 45 (*Figura 7*). Además, en cuanto a la incidencia de cáncer relacionada con VPH, se ha encontrado que el cáncer de cuello uterino presenta mayor nivel en relación con los cánceres de tipo anogenital y de cabeza y cuello (*Figura 8*) (Bruni et al., 2017).



*Figura 7.* Comparación de los diez tipos oncogénicos de VPH más frecuentes en el Ecuador entre mujeres con cáncer cervical.

Tomado de (Bruni et al., 2017).

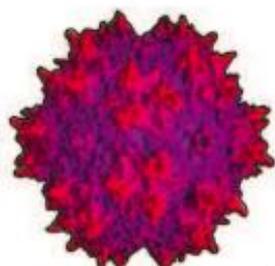


*Figura 8.* Incidencia de cáncer relacionada con el VPH en Ecuador (estimaciones para 2012).

Tomado de (Bruni et al., 2017).

#### 2.4.2.3 Parvoviridae

Los parvovirus son virus de tamaño pequeño, alrededor de 25 nm de diámetro, y su genoma es ADN monocatenario (ssDNA) lineal de 5000 bases aproximadamente (*Figura 9*). Además, únicamente se replican en células que están en división o en presencia de un virus auxiliar. La familia Parvoviridae se divide en dos subfamilias Parvovirinae y Densovirinae, la primera infecta a vertebrados y la segunda a invertebrados. Los Parvovirinae se subdivide en cinco géneros: Bocavirus, Amdovirus, Erythrovirus, Dependovirus y Parvovirus (Knipe y Howley, 2013).



*Figura 9.* Topología superficial de la cápside del virus adeno-asociado tipo 2 perteneciente a la familia Parvoviridae y al género Dependovirus.

Tomado de: (Knipe y Howley, 2013).

Las cápsides de estos virus se pueden transmitir por vía fecal-oral, respiratoria y urinaria, puesto que son estables en el ambiente, y pueden ingresar al cuerpo a través de infección de células linfoides o epiteliales que se encuentran en división de la orofaringe, el tracto respiratorio superior o el intestino (Knipe y Howley, 2013).

Existen algunos parvovirus humanos. Los que están relacionados con enfermedades primarias son eritrovirus y parvovirus B19, mientras que los virus que están vinculados con enfermedades que involucran infecciones mixtas con otros patógenos y presentan menor patogenicidad son el bocavirus humano y parvovirus humano 4. En cuanto al parvovirus B19, este virus se localiza en la nasofaringe y su infección puede ser subclínica, además puede ocasionar síntomas similares a la influenza, tales como malestar general, fiebre y mialgia. Este virus también genera aplasia de glóbulos rojos y puede ocasionar hidropesía fetal (Knipe y Howley, 2013).

Los parvovirus al parecer se encuentran diseminados y la mayoría puede circular de forma fácil especialmente entre personas susceptibles. Se conoce que casi todos los seres humanos han sido infectados por parvovirus B19 y los anticuerpos IgG (Inmunoglobulina G) habitualmente subsisten de por vida. Aproximadamente, a los 15 años de edad el 50% de los niños poseen anticuerpos anti-B19 y más del 90% de personas de edad avanzada. Por su parte, las infecciones por virus adeno-asociados (AAV) se desarrollan en presencia de adenovirus o herpesvirus, y su transmisión se vale de las vías respiratorias, sexual, conjuntival directa y fecal-oral. Además, se han obtenido AAV2, AAV3 y AAV5 de humanos en presencia de algunos serotipos de adenovirus (Knipe y Howley, 2013).

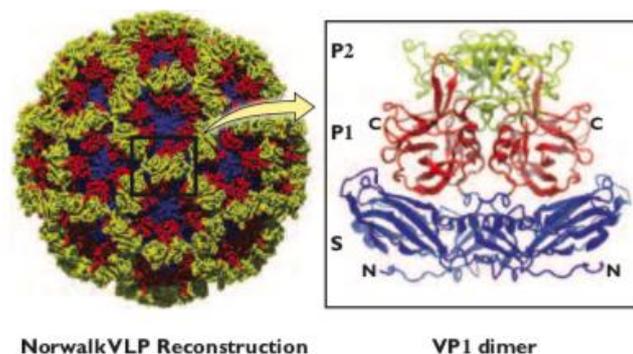
Además, otra de las especies pertenecientes a la familia *Parvoviridae* es Bocavirus humano, actualmente se conoce como Primate bocaparvovirus, y con base en investigaciones se sabe que Bocavirus humano 1 (HBoV1) está involucrado en infecciones del tracto respiratorio en niños (Väisänen et al., 2017). Mientras que Bocavirus humano 2 a 4 se ha detectado en heces de niños con diarrea y parálisis flácida aguda en Burkina Faso (Phan et al., 2012). Asimismo,

HBoV2 se ha detectado en Pakistán en muestras de heces de niños con parálisis flácida y HBoV3 se detectó en Australia (Romani et al., 2013).

Bufavirus (BuV), denominado como Primate protoparvovirus, también pertenece a la familia *Parvoviridae* y se ha asociado con síntomas gastrointestinales. Sin embargo, aún no se ha resuelto la función etiológica que este virus desempeña en la enfermedad humana. El ADN de BuV se ha detectado en muestras de heces de niños con diarrea en en Bhután, Burkina Faso, China, Finlandia, Tailandia, Túnez y Turquía, y de adultos en China, Finlandia, Países Bajos y Tailandia. Asimismo, se detectó recientemente BuV-3 en heces diarreicas de Perú (Väisänen et al., 2017).

#### 2.4.2.4 Caliciviridae

La familia Caliciviridae se compone por virus icosaédricos de tamaño pequeño, de 27 a 40 nm de diámetro (*Figura 10*), carecen de envoltura y poseen un genoma de ARN lineal de cadena simple de sentido positivo. Los géneros de esta familia son *Nebovirus*, *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* y *Sapovirus*, los dos últimos son los principales patógenos humanos causantes de gastroenteritis aguda (Knipe y Howley, 2013).



*Figura 10.* Reconstrucción 3D de la cápside entera del virus de Norwalk. La cápside está constituida por 90 dímeros de VP1 (Viral protein), con dominios P2, P1 y S resaltados con los colores amarillo, rojo y azul respectivamente.

Tomado de (Knipe y Howley, 2013).

Los norovirus ingresan al cuerpo a través de vía oral y de acuerdo a estudios epidemiológicos se sugiere que también pueden entrar valiéndose de aerosoles.

Estos virus son la segunda causa más importante de gastroenteritis aguda en niños pequeños y bebés, la primera causa es rotavirus. Además, en países en desarrollo se estima 200000 muertes por año en niños menores a 5 años. Los norovirus se han relacionado con enfermedades gastrointestinales en recién nacidos y en ancianos, y se estima que tienen una distribución a nivel mundial. Esta estimación se realiza con base en que la mayoría de individuos, de países desarrollados como en desarrollo, evidenciaron infección por norovirus previo a la edad adulta, reflejando de esta forma la naturaleza endémica de estos virus y su distribución global (Knipe y Howley, 2013).

Los norovirus se clasifican en genogrupos desde GI hasta GV con base en la proteína de la cápside VP1. En relación a ello, existe mayor prevalencia de anticuerpos contra los virus GII que la de los virus GI. Sin embargo, esto no ocurre en todos los estudios, pero se refleja el predominio de las cepas GII circulantes. Además, esta prevalencia incrementó mayoritariamente en países desarrollados respecto a los países en desarrollo (Knipe y Howley, 2013).

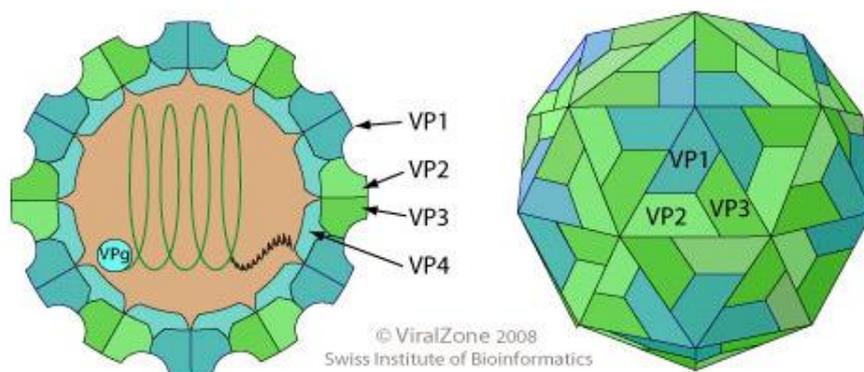
En Latinoamérica los norovirus que predominan pertenecen al genogrupo II genotipo 4. Además, existen otros norovirus del genogrupo II, incluye GII.3 y GII.7, virus recombinantes (GII.P7/GII.6; GII.P7/GII.20, GII.P2/GII.3 y GI.P2/GI.6, GII.P4/GII.1) (da Silva et al., 2016). Asimismo, en un estudio realizado en la ciudad de Quinindé, Ecuador, se encontró que la mayoría de las muestras fueron positivas para GII y el genotipo más común fue GII.4 (Sidney), seguido por GII.1, GI.3, GII.2 y un nuevo genotipo experimental GII (GII.23) (Lopman et al., 2015). En otro estudio realizado en Quinindé, con mayor frecuencia se detectó el genogrupo GII.6, seguido de GI.3 y GII.16 (Gastañaduy et al., 2015).

El cuanto a sapovirus, el genotipo detectado con mayor frecuencia fue GI.1, el mismo que se asocia con casos de gastroenteritis esporádica. Además, en Europa, Asia y América del Norte han ocurrido varios brotes de GI.2, este genotipo se considera como emergente. En muestras de heces de niños Filipinos también se encontraron algunos genotipos de sapovirus, GI.1, GI.2, GII.1, GII.4 y GV (Liu et al., 2015). Igualmente, estudios realizados en Nicaragua revelaron que los sapovirus fueron la segunda causa de gastroenteritis pediátrica y se

detectaron los siguientes genotipos en muestras de niños: GI.1, GI.2, GII.2, GII.3, GIV (Bucardo et al., 2014). Mientras que en Brasil se encontraron GI.1, GI.7, GII.1 y GV.2 (Prado et al., 2017).

#### 2.4.2.5 Picornaviridae

Los viriones de picornavirus poseen un diámetro de 30 nm aproximadamente y son esféricos. Las partículas son simples y consisten en una capa de proteínas que envuelve el genoma desnudo de ARN de cadena simple de polaridad positiva (*Figura 11*). Además, estas partículas carecen de envoltura lipídica y su infectividad es insensible a los disolventes orgánicos. Entre sus numerosos miembros hay patógenos humanos y animales importantes (Knipe y Howley, 2013).



*Figura 11.* Estructura del virión de la familia Picornaviridae y reconstrucción 3D. La cápside está conformada por VP1, VP2, VP3 y VP4, la última (VP4) se ubica en el lado interno de la cápside.

Tomado de (SIB, 2008).

La familia Picornaviridae comprende 12 géneros, entre los que se incluyen virus que infectan vertebrados, tales como género Alphavirus, Cardiovirus, Enterovirus, Hepatovirus, Parechovirus, Erbovirus, Kobovirus, Teschovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Rinovirus, Tremovirus. Los miembros del género enterovirus incluyen Poliovirus, Coxsackievirus, Echovirus, Enterovirus humano (Knipe y Howley, 2013).

Los virus resistentes al pH bajo son cardiovirus, hepatovirus, enterovirus y parechovirus, y es por ello que pasan por el estómago para acceder al intestino. Estos virus son estables a los ácidos y en rangos de pH de 3,0 y menos pueden conservar su infectividad. Mientras que los rinovirus son lábiles en ácido y son importantes agentes del resfriado común puesto que se replican en la nasofaringe (Knipe y Howley, 2013).

Los enterovirus (EV) infectan principalmente el tracto gastrointestinal y se pueden diseminar a otros lugares, algunos enterovirus han mostrado tropismo específico por el tracto respiratorio. Con base en estudio realizado en Latinoamérica, dentro de esos países Ecuador, se detectaron los siguientes enterovirus usando hisopos nasofaríngeos: EV-A, -B, -C (EV-C99, EV-C104, EV-C109, Coxsackievirus (CV)-A21, Poliovirus (PV)-1), -D (Garcia et al., 2013). Se conoce también que CV-A1, CV-A19 y CV-A22 han estado implicados en enfermedades neurológicas y entéricas, y especialmente CV-A19 y CV-A22 se han relacionado con la meningitis aséptica. (Tokarz et al., 2013). Asimismo, en muestras de heces de niños filipinos que presentaban un tipo de parálisis flácida aguda se han detectado CV-A19 y EV-C99 (Apostol et al., 2012).

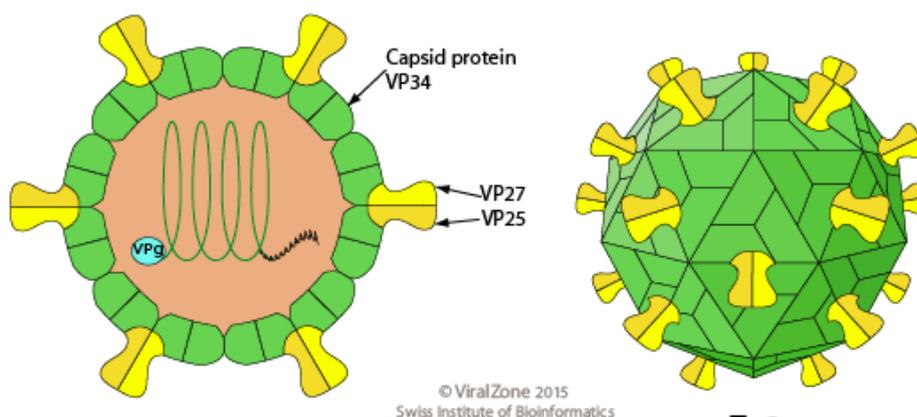
Por su parte, el género Hepatovirus posee sola al patógeno humano virus de la hepatitis A y estos viriones son estables y tienen la capacidad de resistir al pH como se mencionó anteriormente y a elevadas temperaturas (60°C por 10 minutos). Especialmente, el virus infecta los hepatocitos y las células epiteliales del intestino delgado (Knipe y Howley, 2013). Además, se conoce que a nivel mundial el genotipo I es el más prevalente y el subgenotipo IA se reporta con mayor frecuencia que IB. Mientras que el subgenotipo IIIA es más prevalente en Asia Central. Cabe resaltar también que en áreas de baja endemicidad, incluye Europa occidental y Estados Unidos, predomina el subgenotipo IA (Desbois et al., 2010).

La enfermedad vírica, Hepatitis A, causada por el virus de la Hepatitis A (Hepatovirus A) afecta a los humanos nivel mundial y es endémica en los países en desarrollo, donde la mayoría de las personas están expuestas a este virus durante la infancia (Rodríguez-manzano et al., 2010).

Por otro lado, el género Parechovirus contiene dos especies, incluyen parecovirus humano y virus Ljungan. Los parecovirus se vinculan con enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Asimismo, el género Kobovirus contiene dos especies, virus Aichi causante de gastroenteritis en humanos y virus Kobovirus bovino (Knipe y Howley, 2013).

#### 2.4.2.6 Astroviridae

Los astrovirus muestran morfología icosaédrica y tienen un genoma de ARN de cadena simple de polaridad positiva (*Figura 12*). Además, la familia *Astroviridae* se divide en dos géneros: Mamastrovirus y Avastrovirus. En particular se conoce que los astrovirus humanos (HAstV), pertenecientes al género Mamastrovirus, son la segunda o tercera causa más común de diarrea viral en niños pequeños y ocasiona brotes esporádicos de gastroenteritis. Los HAstV (Mamastrovirus 1) comprenden 8 genotipos y se caracterizan por ser patógenos gastrointestinales y transmitirse a un huésped mediante la ruta fecal-oral, pero puede a su vez transmitirse de persona a persona (Knipe y Howley, 2013).



*Figura 12.* Estructura del virión de la familia Astroviridae y su reconstrucción 3D.

Tomado de (SIB, 2015).

Especialmente, los astrovirus de mamíferos afectan las células epiteliales del tracto intestinal y se ha encontrado también en el sistema nervioso central (SNC) de un paciente que murió de encefalitis. Esta cepa humana asociada con

encefalitis se relacionó genéticamente con la cepa VA1 (Virginia). Además, se ha encontrado que las infecciones por HAstV están diseminadas en todo el mundo, mayoritariamente en niños pequeños con diarrea y también en pacientes inmunocomprometidos, adultos, niños prematuros con enterocolitis necrosante (Knipe y Howley, 2013).

Estudios en diferentes poblaciones han revelado que los HAstV son la segunda causa de gastroenteritis en niños, con incidencias que van desde 4,2% y 7,3%. No obstante, también se han reportado incidencias menores al 1%. Además, con base en un estudio realizado en España se conoce que aproximadamente el 80% de las infecciones causadas por astrovirus ocurrieron en niños menores de 3 años. La mayoría de las infecciones por astrovirus en humanos se detectan en los meses de invierno en las regiones templadas y en la lluviosa en climas más tropicales (Knipe y Howley, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la especie Mamastrovirus 1 comprende ocho genotipos de astrovirus humanos clásicos (HAstV-1 a HAstV-8) y se ha informado una prevalencia que varía entre 2 y 9% en países en desarrollo y desarrollados (Lizasoain et al., 2015). En general, el serotipo 1 de HAstV es el tipo más común encontrado en niños, pero el serotipo predominante puede variar con el tiempo y la ubicación (Knipe y Howley, 2013). El serotipo 3 se asoció con una gastroenteritis más grave (Bosch et al., 2014).

Además de los HAstV clásicos, las infecciones causadas por los otros dos tipos novedosos de HAstV no clásicos (HAstV-MLB (*Melbourne*) y HAstV-VA / HMO (*Virginia/Human-Mink-Ovine-like*)) también se asocian generalmente con gastroenteritis, pero su papel patogénico en la salud humana no se ha demostrado claramente (Bosch et al., 2014). Los virus HAstV-MLB también están ampliamente distribuidos en la población (Knipe y Howley, 2013).

En muestras de heces de niños de Brasil se detectaron los genotipos de astrovirus: HAstV-1 (identificado con mayor frecuencia), HAstV-3, HAstV-6, HAstV-2, HAstV-4, HAstV-8 y MLB-1 (Xavier et al., 2015). Mientras que en China, los genotipos más comunes fueron HAstV-1 y -5 (Zhou et al., 2014).

Por otra parte, los anticuerpos frente a HAstV tienden a adquirirse en la primera infancia, concordando de esta forma con la edad a la que los niños están infectados principalmente. Una encuesta realizada en niños menores de 10 años del Reino Unido reveló que la prevalencia de anticuerpos incrementa rápidamente del 7% en bebés de 6 a 12 meses de edad al 70% en edad escolar. Además, un estudio de seroprevalencia entre niños tratados en un hospital en el Reino Unido encontró tasas del 86% para el serotipo 1 y en menor porcentaje para los otros serotipos (Knipe y Howley, 2013).

Por otra parte, datos epidemiológicos indican que los alimentos contaminados son la principal fuente de infección por HAstV. HAstV se ha detectado en moluscos bivalvos y en el agua de diferentes orígenes, se incluye ríos, agua potable, represas, aguas residuales y efluentes de plantas de tratamiento de agua (Knipe y Howley, 2013).

#### **2.4.3 Otros virus emergentes**

Los virus por su nivel de adaptación pueden convertirse en patógenos emergentes, puesto que se valen de mutación, recombinación y reordenamiento para adaptarse a distintos entornos y poder infectar nuevos hospederos. Entre los virus emergentes se incluyen bocavirus, coronavirus, klassevirus, papilomavirus, poliomavirus, picobirnavirus, virus de la hepatitis E. Estos patógenos se han detectado en aguas superficiales y aguas residuales (Bibby y Peccia, 2013 y La Rosa et al., 2012).

Entre los virus mencionados anteriormente, parechovirus, y bocavirus se asocian con infecciones respiratorias y gastrointestinales (Sedmak et al., 2010) y (Blinkova et al., 2009). Klassevirus aún está en discusión si es un patógeno humano, virus comensal humano o se adquiere a través de la dieta, pero posiblemente se puede asociar como causante de gastroenteritis (Holtz et al., 2009).

El norovirus humano se encuentra también entre las especies emergentes debido a la aparición de cepas recombinantes, tales como GII.P16/GII.4 Sydney 2012, GII.P4 New Orleans 2009/GII.4 Sydney 2012 y otras tres cepas

emergentes GII.P16 / GII.2 y GII .17, GII.P12 / GII.3 (La Rosa et al., 2012 y Lun et al., 2018).

Otro de los virus emergentes es el virus torque teno, el mismo que se ha descubierto en personas sanas y en pacientes con hepatitis por lo que aún no está claro su papel como agente patógeno (Vecchia et al., 2012).

## **2.5 Métodos para detección de virus en muestras ambientales**

Hasta la actualidad algunos estudios se han enfocado en la detección de virus en muestras ambientales, como aguas superficiales, agua de mar, agua subterránea, aguas residuales sin tratar y tratadas e incluso agua potable (Fongaro et al., 2015; Kunze et al., 2015; Lodder et al., 2015; Myrmel et al., 2015 y Sun et al., 2014). Pero debido a que los virus se encuentran por lo general en concentraciones relativamente bajas y de manera heterogénea en muestras ambientales es necesario llevar a cabo procesos de concentración que contribuyan a la detección de los distintos virus empleando ensayos basados en cultivo o técnicas moleculares (Haramoto et al., 2018).

### **2.5.1 Métodos de concentración**

Dependiendo de los tipos de agua la concentración de virus puede variar, por ejemplo, en el caso de aguas residuales o muestras de lodos se pueden detectar altas concentraciones de virus en volúmenes relativamente pequeños (<100 mL). Mientras que para la detección de virus aguas recreativas, superficiales y agua potable donde se requieren grandes volúmenes (10-1000 L o más) debido a que las concentraciones virales son menores. Por lo mencionado, la mayoría de estudios virológicos necesitan emplear métodos de concentración, tomando en consideración el volumen de la muestra, la calidad del agua y las técnicas de detección aguas abajo (Haramoto et al., 2018 y Rames et al., 2016).

Para la concentración de virus se pueden emplear métodos físicos y métodos basados en adsorción-elución, puesto que se conoce que las cápsides virales están conformadas por proteínas las cuales varían su carga dependiendo del pH del medio (Wu et al., 2011). En la *tabla 3* se describen las ventajas y desventajas de algunos métodos de concentración de virus.

Tabla 3.

*Métodos para la concentración de virus a partir de muestras de agua.*

Método	Ventajas	Desventajas
Ultrafiltración	El método es adaptable a la recolección de campo y se ve menos afectado por la turbidez	Inhibición del análisis molecular por el uso de polifosfato de sodio y atrapamiento de virus en la superficie del filtro
Ultracentrifugación	Fraccionamiento de diversos tipos de virus posibles	Únicamente se utiliza para volúmenes pequeños, implica costo prohibitivo y excesivos tiempos de procesamiento
Separación de dos fases de polímero acuoso	Bajas multiplicidades de virus detectadas	Únicamente se usa para volúmenes pequeños y puede provocar la inactivación de algunos virus
Sales precipitables, óxidos de hierro, polielectrolitos	Habilidad para procesar grandes volúmenes de agua	Aguas turbias requieren prefiltración y no se puede aplicar a todos los tipos de virus debido a variaciones de superficie e inactivación
Fibras de gasa de algodón	Económico y se pueden procesar grandes volúmenes de agua	Pobre adsorción de virus
Adsorción-elución usando filtros electropositivos o electronegativos	Se pueden procesar grandes muestras de agua o muestras pequeñas (10L) únicamente cambiando los filtros de cartucho a filtros de disco	Baja recuperación de virus debido a mala elución de HAdV e inactivación de virus cuando se utilizan filtros electronegativos y bajo pH

Continúa Tabla 3

Método	Ventajas	Desventajas
Floculación con leche descremada	Es un método de bajo costo que se basa en la adsorción de los virus a los flóculos de leche desnatada. Presenta altas tasas de recuperación de virus con baja variabilidad a partir de muestras de 5 a 10 L	Las proteínas pueden interferir con los análisis aguas abajo. Además, debido a la impracticabilidad de sedimentar y eliminar el sobrenadante no se emplean muestras de volúmenes más grandes, lo que limita la utilidad de esta técnica para estudios de campo

Adaptado de (Calgua et al., 2013; Ikner et al., 2012; Haramoto et al., 2018 y Rames et al., 2016).

## 2.5.2 Métodos de detección

Los métodos de detección de virus han mejorado con el pasar del tiempo. Históricamente, el cultivo celular era el método estándar para la detección de virus, sin embargo, con la aparición de los métodos moleculares esto ha cambiado porque con esta metodología los tiempos de detección son más cortos y los niveles de sensibilidad y especificidad son altos. En la actualidad, las técnicas antes mencionadas están siendo reemplazadas por la tecnología de secuencia masiva en cuanto a la determinación de la diversidad genética de los virus en el ambiente (Haramoto et al., 2018).

### 2.5.2.1 Cultivo celular

La técnica de cultivo celular consiste en inocular muestras concentradas en líneas celulares específicas para cada tipo de virus, con el fin detectar y cuantificar virus infecciosos en muestras ambientales. Esta técnica continúa siendo la mejor para aislar y determinar la infectividad de virus. No obstante, el principal inconveniente de emplear esta metodología es que requiere largo tiempo de incubación y varios pasajes para confirmar resultados. Otras desventajas de esta metodología consisten en que es relativamente más costosa que la PCR convencional y no todos los virus pueden crecer en cultivo celular

dado que no se ha establecido una línea celular universal que sirva para cultivar todos los virus (Fong y Lipp, 2005 y Staggemeier et al., 2011).

### 2.5.2.2 PCR

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una de las técnicas moleculares más utilizadas que se basa en la detección de porciones altamente conservadas del genoma viral. Este método ofrece algunas ventajas sobre la técnica de cultivo celular puesto que es más sensible, específico y rápido. En cuanto a su sensibilidad, se puede detectar la presencia del virus aunque su concentración en la muestra sea pequeña. Sin embargo, se puede presentar algún grado de inhibición de PCR debido a los reactivos empleados en los procesos de concentración de virus (Staggemeier et al., 2011 ). Además, una importante limitación de esta técnica es la imposibilidad de determinar la infectividad de las partículas virales, de tal manera que no se puede discernir entre partículas infecciosas y no infecciosas (Fong y Lipp, 2005).

Actualmente, existen otras técnicas basadas en el método de PCR para la detección de virus, tales como RT-PCR, PCR anidada, PCR en tiempo real, entre otras (*Tabla 4*).

Tabla 4.

*Métodos para detección de virus a partir de fuentes ambientales.*

Método	Ventajas	Desventajas
PCR (RT-PCR)	Técnica rápida, con mayor sensibilidad y especificidad en comparación con el cultivo celular	No proporciona datos cuantitativos solo indica presencia o ausencia. Además, no puede determinar la infectividad. Los inhibidores presentes en muestras ambientales pueden interferir con la amplificación por PCR

## Continúa Tabla 4

Método	Ventajas	Desventajas
PCR anidada	Posee mayor sensibilidad en comparación con la PCR convencional y puede reemplazar los pasos de confirmación de PCR, como la hibridación.	Existe potencial riesgo de contaminación al transferir productos de PCR
PCR múltiple	Ahorra tiempo y costo debido a que es posible detectar varios tipos, grupos o especies de virus en una sola reacción	Se pueden producir amplificaciones inespecíficas en muestras ambientales y es complejo conseguir la misma sensibilidad para todas los grupos, especies o tipos de virus específicos
PCR en tiempo real	Proporciona datos cuantitativos y ahorra tiempo puesto que no es necesaria la confirmación de los productos de PCR. Además, reduce el riesgo de contaminación en comparación con la PCR anidada debido a que se puede hacer en un sistema cerrado	Se requiere un equipo costoso y ocasionalmente puede ser menos sensible que la PCR convencional y la PCR anidada
ICC-PCR	Mejora la detección de patógenos virales infecciosos y proporciona resultados en la mitad del tiempo requerido para el cultivo celular convencional	En términos de tiempo es menos eficiente y es más costosa que la detección por PCR. Además, se puede detectar ADN de virus inactivados inoculados en células cultivadas.

Tomado de: (Fong y Lipp, 2005).

### 2.5.2.3 Secuenciación masiva

Las plataformas de secuenciación masiva o secuenciación de alto rendimiento tienen la capacidad de secuenciar en paralelo millones de pequeños fragmentos

de ADN y mediante análisis bioinformáticos unir estos fragmentos para crear los *contigs* (piezas ensambladas de secuencias superpuestas de ADN) . Además, se pueden emplear para secuenciar desde genes individuales, áreas de interés específicas hasta genomas completos (Behjati y Tarpey, 2013).

La secuenciación masiva ha evolucionado rápidamente y ha transformado la mayoría de los campos de investigación biológica debido a que pueden secuenciar una mezcla de materiales genéticos a partir de una mezcla muy heterogénea y no requieren conocer previamente la secuencia. Otros beneficios de emplear estas plataformas son su alta sensibilidad y que a partir de concentraciones relativamente pequeñas se pueden recuperar rápidamente secuencias de virus casi completas. La secuenciación masiva es el enfoque más rápido disponible puesto que la identificación se puede realizar en días o incluso en algunas horas y en cuanto a su rango de detección dinámica, este es extremadamente amplio. Por lo mencionado, esta metodología es idónea para el descubrimiento de nuevos virus y para la detección de patógenos durante los brotes (Datta et al., 2015).

Actualmente, existen algunas plataformas de secuenciación masiva, tales como Illumina, Roche 454, entre otras, por lo que es importante saber escoger la correcta antes de iniciar un proyecto metagenómico (Datta et al., 2015). En la *tabla 5* se comparan plataformas de secuenciación de primera, segunda (secuenciación masiva) y tercera generación.

Tabla 5.

*Descripción de plataformas de secuenciación de primera, segunda y tercera generación.*

Plataformas de secuenciación	Mecanismo de secuenciación	Nº Reads	Longitud Reads	Duración de corrida	Costo x Mpb	Ventajas	Desventajas
Sánger	Terminación de cadena dideoxy	-	400-900 pb	20 minutos- 3 horas	\$2400	Alta calidad y reads largos	Altos costos debido a que permite secuenciar una secuencia por reacción
454 GS Junior	Pirosecuenciación	$1 \times 10^6$	700 pb	24 horas	\$10	Rápido y reads largos	Costoso, de bajo rendimiento y errores de homopolímeros
SOLID	Secuenciación por ligación	$1,2 \times 10^9 \sim 1,4 \times 10^9$	50+35 pb 50+50 pb	7 -14 días	\$0,13	Exactitud	Costoso, mayor tiempo de ejecución
Ion Torrent	Secuenciación por síntesis basado en semiconductores	$4 \times 10^6 - 5,5 \times 10^6$	200 - 400 pb	3 horas	\$1	Bajo costo, corto tiempo de ejecución y altamente escalable	Alta tasa de errores
Illumina MiniSeq		$25 \times 10^6$	2 x 150 pb	4 - 24 horas	\$0,07- \$0,5	Bajo costo, alto rendimiento y menos cantidad de errores	Lecturas cortas y largo tiempo de ejecución
Illumina MiSeq	Secuenciación por síntesis	$25 \times 10^6$	2 x 300 pb	4 - 55 horas			
Illumina NextSeq		$4 \times 10^8$	2 x 150 pb	12 - 30 horas			
Illumina HiSeq		$1 \times 10^{12}$	2 x 150 pb	1 - 3.5 días			
PacBio	Secuenciación <i>Single Molecule Real Time</i> (tecnología SMRT)	$\sim 50 \times 10^4$	10 - 15 kb	4 horas	\$400 por corrida	Baja sensibilidad de amplificación	Bajo número de lecturas

Adaptado de (Allali et al., 2017; Liu et al., 2012; Loman et al., 2012; Pillai et al., 2017; Illumina, 2015; Pacific Biosciences, 2015).

## 2.6 Metagenómica

La metagenómica aplica las herramientas de secuenciación masiva para secuenciar todos los ácidos nucleicos presentes en una muestra, independientemente de su origen, con el fin de analizar comunidades microbianas (Cao et al., 2017 y Kelly et al., 2017).

Dentro de las aplicaciones genómicas a gran escala, la metagenómica es cada vez más popular debido a que detalla al mismo tiempo todos los genes y genomas de una comunidad microbiana mixta sin tener que recurrir a la clonación o a la secuenciación de genes particulares. Además, es una poderosa herramienta que permite acceder a la fisiología y la genética de organismos no cultivados, puesto que los productos resultantes de la secuenciación, lecturas individuales o *contigs* de secuencia ensamblados, se asignan a grupos taxonómicos o secuencias genómicas conocidas a través de la utilización de herramientas bioinformáticas (Fricke et al., 2011; Kelly et al., 2017 y Singh et al., 2009).

### 2.6.1 Utilidades de la metagenómica

La metagenómica se ha aplicado en distintos campos de estudio con el objetivo de conocer la constitución y complejidad de ecosistemas completos basándose en la secuenciación de ácidos nucleicos. Los datos metagenómicos permiten comparar la abundancia relativa de los organismos presentes en el microbioma y estudiar la composición taxonómica de los mismos (Buermans y den Dunnen, 2014 y Cao et al., 2017). De tal manera que la metagenómica permite estudiar la composición taxonómica y funcional de comunidades microbianas a partir de distintos entornos tales como muestras ambientales, clínicas y agrícolas (Fricke et al., 2011 y Singh et al., 2009).

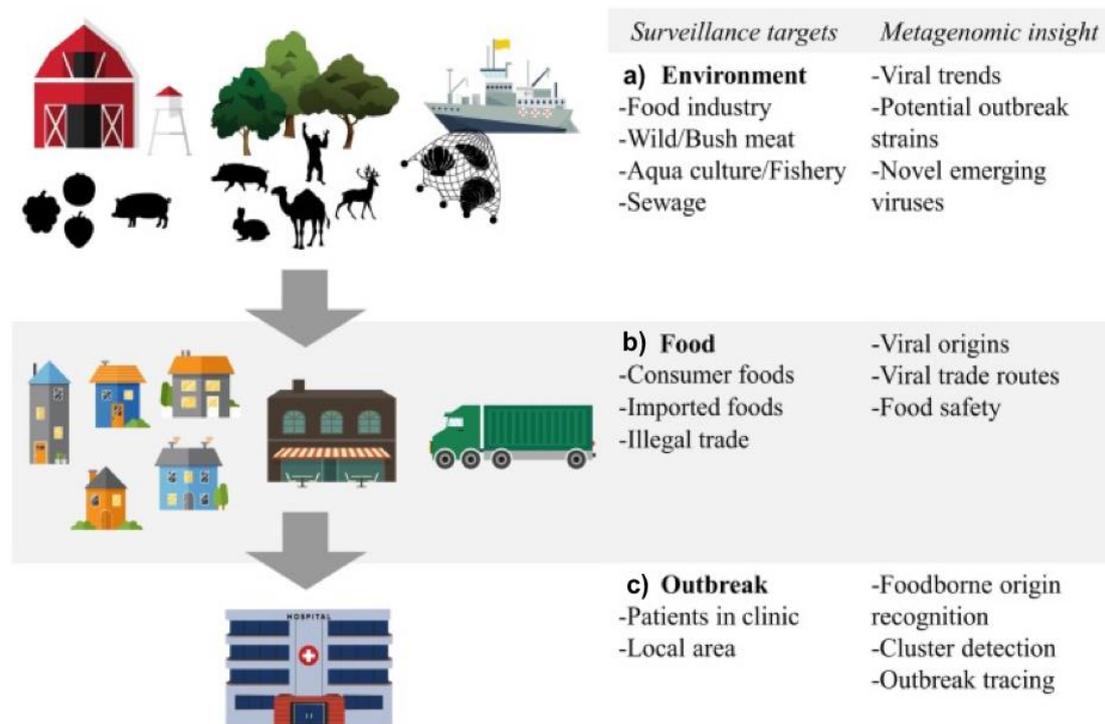
Un ejemplo de ello es el estudio que se realiza en aguas residuales con el fin de monitorear e identificar patógenos virales que circulan entre la población, contribuyendo de esta forma a vigilar la salud pública. Por ejemplo, en Barcelona se utilizó la metagenómica para analizar los virus circulantes en la población y determinar los cambios que experimentan dependiendo de la estación, a través

del estudio de muestras de agua residual sin tratar colectadas en primavera, invierno y verano (Fernández-Cassi et al., 2018).

Otra de sus aplicaciones es la metagenómica clínica que busca identificar patógenos y los genotipos responsables del brote de una enfermedad sin importar cuán similares sean entre sí. Además, tiene como objetivo determinar mutaciones, genes de virulencia, variantes de nucleótidos, entre otros (Fricke et al., 2011 y Ruppé et al., 2017). El estudio realizado por Cantalupo, Katz y Pipas (2018) ejemplifica la utilidad de la metagenómica al comparar datos NGS (secuenciación de próxima generación) de tejidos normales y tumorales. En este estudio se identifican los virus presentes en los distintos tejidos y se establecen perfiles mutacionales de algunos virus que conducen a tumorigénesis.

El enfoque metagenómico también se ha utilizado en estudios de muestras de animales para demostrar la etiología de algunas enfermedades y para identificar virus emergentes y zoonóticos (Malik y Matthijnsens, 2014). Por ejemplo, Ng y colaboradores (2015) emplearon la metagenómica para identificar virus asociados con la enfermedad respiratoria bovina (BRD), debido a las importantes pérdidas económicas que implica esta enfermedad, logrando identificar virus conocidos y no caracterizados previamente a través de la secuenciación de ácidos nucleicos virales obtenidos de hisopos nasales de vacas con síntomas de BRD.

La metagenómica también puede ser de gran utilidad en la vigilancia de virus en la cadena alimentaria mundial por su amplio rango de detección, sensibilidad e información detallada del virus detectado. Este proceso de vigilancia inicia con el análisis de entornos asociados a la ruta de alimentos y el agua que se emplea para el cultivo (*Figura 13*).



*Figura 13.* Objetivos de vigilancia en la cadena alimentaria para enfoques de secuenciación metagenómica.

Tomado de (Nieuwenhuijse y Koopmans, 2017).

- a) Vigilancia ambiental de la industria alimentaria.
- b) Vigilancia de alimentos de consumo e importados.
- c) Vigilancia de brotes causados por alimentos y agua.

Los alimentos son también un objeto importante de vigilancia metagenómica debido a las prácticas de procesamiento de alimentos, hábitos alimenticios y a su relación con el comercio internacional que facilitan la propagación de virus a través de los alimentos y el agua (Nieuwenhuijse y Koopmans, 2017). En relación a esta información, se puede mencionar un estudio que realizaron Zhang y colaboradores (2014) en Estados Unidos, donde a partir de metagenómica se detectaron secuencias virales conocidas y emergentes en carne de res, cerdo y pollo comprados en tiendas en San Francisco, USA. Además, en otro estudio se analizaron las comunidades víricas no cultivadas de alimentos fermentados a través de pirosecuenciación de alto rendimiento, encontrando que las

comunidades virales de los alimentos virales son menos complejas que las encontradas en agua de mar, suelo, heces humanas (Park et al., 2011).

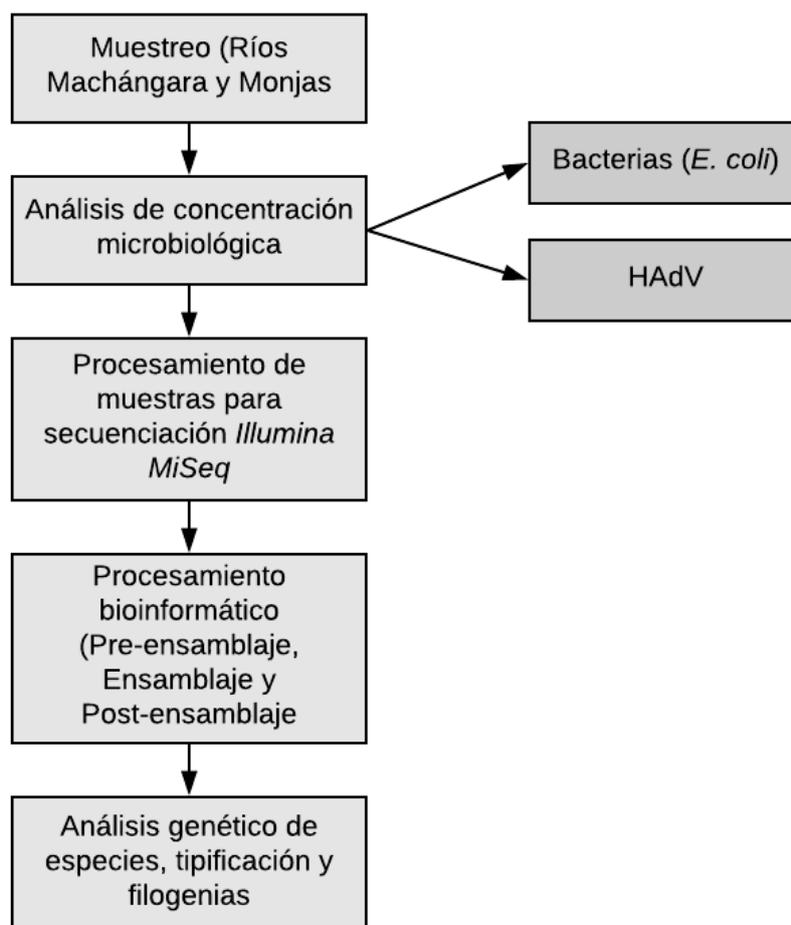
Finalmente, se puede también rastrear un brote causado por el consumo de algún alimento basándose en el análisis metagenómico (Nieuwenhuijse y Koopmans, 2017).

### 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

Para desarrollar el presente trabajo de investigación se consideraron los puntos que reciben mayor impacto por las aguas residuales del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ), para lo cual se muestrearon tres puntos a lo largo de los ríos Machángara y Monjas. Estas muestras se tomaron en el centro, norte y sur del DMQ para tener conocimiento de los virus que se encuentran circulando en las zonas antes mencionadas. A continuación, se analizó la concentración de indicadores microbiológicos, tales como adenovirus humano (HAdV) y *Escherichia coli*, como se observa en la *figura 14*. Para el análisis de HAdV se empleó el concentrado viral, razón por la cual las muestras se sometieron, previo a este análisis, a un proceso de floculación con leche descremada con el fin de concentrar las partículas virales.

Posteriormente, a partir del concentrado viral se realizaron procedimientos de filtración y remoción de ADN libre. A continuación se realizó la extracción de ácidos nucleicos y luego la preparación de las librerías empleando cebadores *random*. A partir de las librerías generadas se llevó a cabo la secuenciación con la plataforma *Illumina MiSeq* y con base en las secuencias obtenidas se procedió con el procesamiento bioinformático, que consiste en pre-ensamblaje, ensamblaje y post-ensamblaje. Para el ensamblaje de los *reads* (lecturas de viomas) se utilizó *CLC Genomics Workbench*. Una vez obtenidos los *contigs* (producto del ensamblaje) se contrastó su similitud contra tres bases de datos: GenBank, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y UniProt, obteniendo de esta forma la asignación de cada *contig* a una especie.

Por último se realizó la tipificación de especies de interés y se analizó la filogenia con base en secuencias de referencia y en las regiones de tipificación de cada una de las especies virales.



*Figura 14.* Diagrama del diseño de plan experimental para analizar los virus presentes en muestras de agua tomadas de los ríos Monjas y Machángara a través de metagenómica.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1 Población y muestra

Las aguas superficiales de los ríos urbanos Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) se consideraron como la población de estudio para esta investigación. De acuerdo al último reporte de la EPMAPS se estima que en la ciudad se generan 171 millones de metros cúbicos de agua residual por año, aguas que posteriormente terminan en los ríos y quebradas de la ciudad sin tratamiento previo (EPMAPS, 2017).

En cuanto a las muestras, se seleccionaron tres puntos de muestreo de agua, distribuidos de forma estratégica en los principales puntos de descarga de la zona sur, centro y norte de la ciudad de Quito.

### 4.2 Muestreo

Antes de proceder a la recolección de muestras, los envases empleados para este proceso se sometieron a varios lavados y enjuagues para evitar la presencia de algún agente contaminante ajeno a la muestra a analizar. Una vez finalizada esta etapa, en los tres puntos de la ciudad de Quito previamente elegidos se recolectaron 500 mL de agua de río y de forma adicional en recipientes estériles se recolectaron 100 mL de agua por duplicado. Estas muestras se trasladaron al laboratorio para llevar a cabo el análisis bacteriológico. Cabe mencionar también que en cada punto de muestreo se empleó un medidor de pH y concentración iónica (Mettler Toledo) para evaluar los parámetros fisicoquímicos tales como pH, sólidos disueltos totales (TDS) y conductividad.

### 4.3 Análisis de calidad microbiológica

Como parte de los indicadores microbiológicos de contaminación fecal se tomaron en consideración *Escherichia coli* y Adenovirus humano para evaluar la contaminación fecal humana en los ríos Machángara y Monjas.

#### **4.3.1 Cuantificación de *Escherichia coli***

En cada una de las muestras se cuantificó la concentración de *Escherichia coli*, como bacteria indicadora de contaminación fecal, y de coliformes fecales. Para lo cual, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-9}$  y se plaquearon 100  $\mu\text{L}$  en agar cromogénico (Chromocult, Merck). Posteriormente, se incubaron las placas a 37 °C durante 18 horas y una vez finalizado ese tiempo se procedió al conteo y cálculo.

#### **4.3.2 Cuantificación de Adenovirus humano**

La evaluación de concentración de trazadores virales como Adenovirus humano requiere un previo paso de concentración de muestra debido a su distribución heterogénea en las matrices de agua. Por lo tanto, en primer lugar se realizó la concentración de partículas virales en las tres muestras antes de realizar la qPCR (Fernandez-Cassi et al., 2018).

##### **4.3.2.1 Concentración de partículas virales**

En vista que los ríos urbanos de Quito tienen mayor similitud con aguas residuales que con aguas dulces, se escogió un protocolo de concentración viral para muestras de agua residual sin procesar (Fernandez-Cassi et al., 2018). Por consiguiente, los 500 mL del agua recolectada se concentraron utilizando el método de floculación con leche descremada. De modo que se realizó el preacondicionamiento de las muestras a pH 3,5 y una conductividad mayor a 1,5 mS/cm<sup>2</sup>. Posteriormente, se añadieron 5 mL, a cada muestra, de solución de leche desnata pre-floculada, esta solución se preparó con anterioridad. Una vez transcurridas las 8 horas de agitación, las muestras se centrifugaron durante 40 minutos a 8000  $\times g$  y el pellet (sedimento) resultante de la centrifugación se resuspendió en 4 mL de tampón fosfato. Finalmente, se almacenó el concentrado viral a -80°C hasta su posterior uso.

##### **4.3.2.2 Extracción de ácidos nucleicos y qPCR**

Antes de realizar la qPCR, se llevó a cabo la extracción de ácidos nucleicos utilizando Qiagen RNA Viral Mini Kit (cat no. 22906, Qiagen, Valencia, CA, USA)

sin el transportador de ARN. Los ácidos nucleicos de cada concentrado viral se eluyeron empleando 60  $\mu\text{L}$  de tampón AVE.

A través de la PCR cuantitativa (qPCR) se evaluó la concentración de Adenovirus humano, dado que este virus es un indicador de contaminación fecal humana. Para este procedimiento se empleó la tecnología TaqMan, por lo cual se utilizaron dos cebadores específicos (*forward* y *reverse*) y una sonda fluorogénica (Hernroth et al., 2002). Las secuencias de los cebadores y sonda se describen en *tabla 6*.

Tabla 6.

*Secuencias de los cebadores empleados para la qPCR.*

Cebadores	Secuencias
<i>Forward</i>	5'- CWTACATGCACATCKCSGG - 3'
<i>Reverse</i>	5'- CRCGGGCRAAYTGCACCAG -3'
Sonda	5'-6FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-BHAQ1-3'

Tomado de (Hernroth et al., 2002).

En cuanto a las reacciones de amplificación, se preparó un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  que está conformado por 15  $\mu\text{L}$  de una *mix solution* y 10  $\mu\text{L}$  de muestra. La *mix solution* se preparó con volúmenes determinados de reactivos del kit TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (cat no. 4396838, Applied Biosystems) en combinación con cebadores y sonda, los cebadores a una concentración de 0,9  $\mu\text{M}$  y la sonda a 0,225  $\mu\text{M}$ . Cabe mencionar también que el kit está conformado por AmpliTaq Gold® DNA polimerasa, ROX™ referencia pasiva, buffers optimizados, dNTPs con dUTPs, y en adición al kit se empleó AmpErase™ Uracil N-Glycosylase (cat not. N8080096, Applied Biosystems).

El ensamblaje de las reacciones de amplificación se llevó a cabo en un cuarto específico para ensamblaje de PCR, en el cual no se pueden ingresar muestras

ni amplificados. De tal manera que las muestras fueron cargadas en una sección distinta, donde se realizan actividades como carga y manipulación de ADN, y para evitar contaminación los estándares se cargaron en otra área.

Para el análisis se utilizó un termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad), donde se programaron las condiciones de PCR: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos (alternando entre 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C) (Hernroth et al., 2002). Se debe mencionar también que en cada corrida se emplearon 2 controles negativos, 3 reacciones de muestras (1 directa y 2 de dilución) y 4 puntos correspondientes al estándar por duplicados ( $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^3$  y  $10^6$ ).

Se realizó también una curva de calibrado para lo cual se hicieron diluciones del estándar de DNA por triplicado, de a GC/10  $\mu$ L, y para este proceso se empleó de forma exclusiva una pipeta y un área donde se pueda aplicar UV con el fin de limpiar el material y eliminar ADN.

#### **4.4 Procesamiento de muestras para secuenciación Illumina MiSeq**

Para la secuenciación Illumina MiSeq, los concentrados virales se sometieron a varios procedimientos que permitieron la remoción de ADN libre en la muestra. Además, a partir de las muestras tratadas se realizó la extracción de ácidos nucleicos de cada una de ellas y finalmente se prepararon las librerías con cebadores *random* empleando los ácidos nucleicos obtenidos previamente.

##### **4.4.1 Filtración y remoción de ADN libre**

Para eliminar células eucariotas y procariotas, los concentrados virales se filtraron empleando un filtro (Millipore) de 0.45  $\mu$ m. A continuación, basándose en los procedimientos anteriormente descritos por Fernandez-Cassi et al., 2018, se procesaron las muestras filtradas para el análisis metagenómico conteniendo teóricamente solo partículas víricas.

Además, para reducir el ADN libre que comúnmente se deriva de genomas grandes se aplicó el tratamiento con DNAsa a cada una de las muestras. De modo que, se incubaron 160 U de Turbo DNase (Ambion Cat no. AM1907, Ambion) con 300  $\mu$ L de cada uno de los concentrados filtrados a 37°C durante 1 hora, con el fin de eliminar el DNA libre. Posteriormente, se inactivaron las

enzimas y se procedió a centrifugar durante 1,5 minutos a 10000  $\times$ g. Una vez concluido este proceso, los sobrenadantes se almacenaron a 4°C.

#### 4.4.2 Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos se emplearon 280  $\mu$ L de las muestras tratadas previamente con DNAsa empleando el kit de Qiagen RNA Viral Mini Kit (cat no. 22906, Qiagen, Valencia, CA, USA). En este procedimiento no se empleó el transportador de ARN para evitar interferencias con el análisis metagenómico. Finalmente, se emplearon 60  $\mu$ L del tampón AVE para eluir los ácidos nucleicos de cada muestra.

#### 4.4.3 Preparación de librerías

El material genético de los virus puede estar compuesto por ADN o ARN. Es por esta razón que las muestras se sometieron a un proceso de retrotranscripción, en donde se utilizaron nonámeros aleatorios. Siguiendo este proceso, las plantillas de ARN se retrotranscribieron, es decir sufrieron un proceso de transcripción inversa, empleando SuperScript III (cat no. 18080093, Life Technologies) y *Primer A* para un cebado aleatorio puesto que contiene 9 nucleótidos aleatorios y 17 nucleótidos específicos (*Tabla 7*). Posteriormente, se usó Sequenase 2.0 (cat no. USBM70775Y200UN, USB/Affymetrix, Cleveland, OH, USA) para construir la segunda cadena de cDNA.

Tabla 7.

#### *Cebadores empleados en retrotranscripción y PCR*

Cebadores	Secuencias
<i>Primer A</i> (RT-PCR)	5'-GTTTCCCAGTCACGATANNNNNNNNN- 3'
<i>Primer B</i> (PCR)	5'-GTTTCCCAGTCACGATA-3'

Para la preparación de librerías es necesario obtener suficiente ADN, razón por la cual se realizó un paso de amplificación por PCR empleando AmpliTaqGold

(cat no. 4311806, Life Technologies, Austin, Texas, USA) y *Primer B* (Tabla 7). El programa de la PCR se encuentra descrito en la *Tabla 8*.

Tabla 8.

*Condiciones de tiempo y temperatura para realizar la PCR*

Ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Activación ADN polimerasa	95 °C	10 min.
30	Denaturación	94 °C	30 seg.
	Hibridación	40 °C	30 seg.
	Elongación	50 °C	30 seg.
1	Elongación final	72 °C	60 seg.

Posteriormente, se purificaron y concentraron los productos de PCR en un pequeño volumen de 15  $\mu$ L, valiéndose del limpiador y concentrador Zymo DNA (D4013, Zymo research, USA). A continuación, se cuantificó el ADN amplificado de cada una de las muestras empleando Qubit 2.0 (nº de catálogo Q32854, Life Technologies, Oregon, EE. UU.). Finalmente, conforme a las instrucciones del fabricante se construyeron las librerías, empleando Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina Inc).

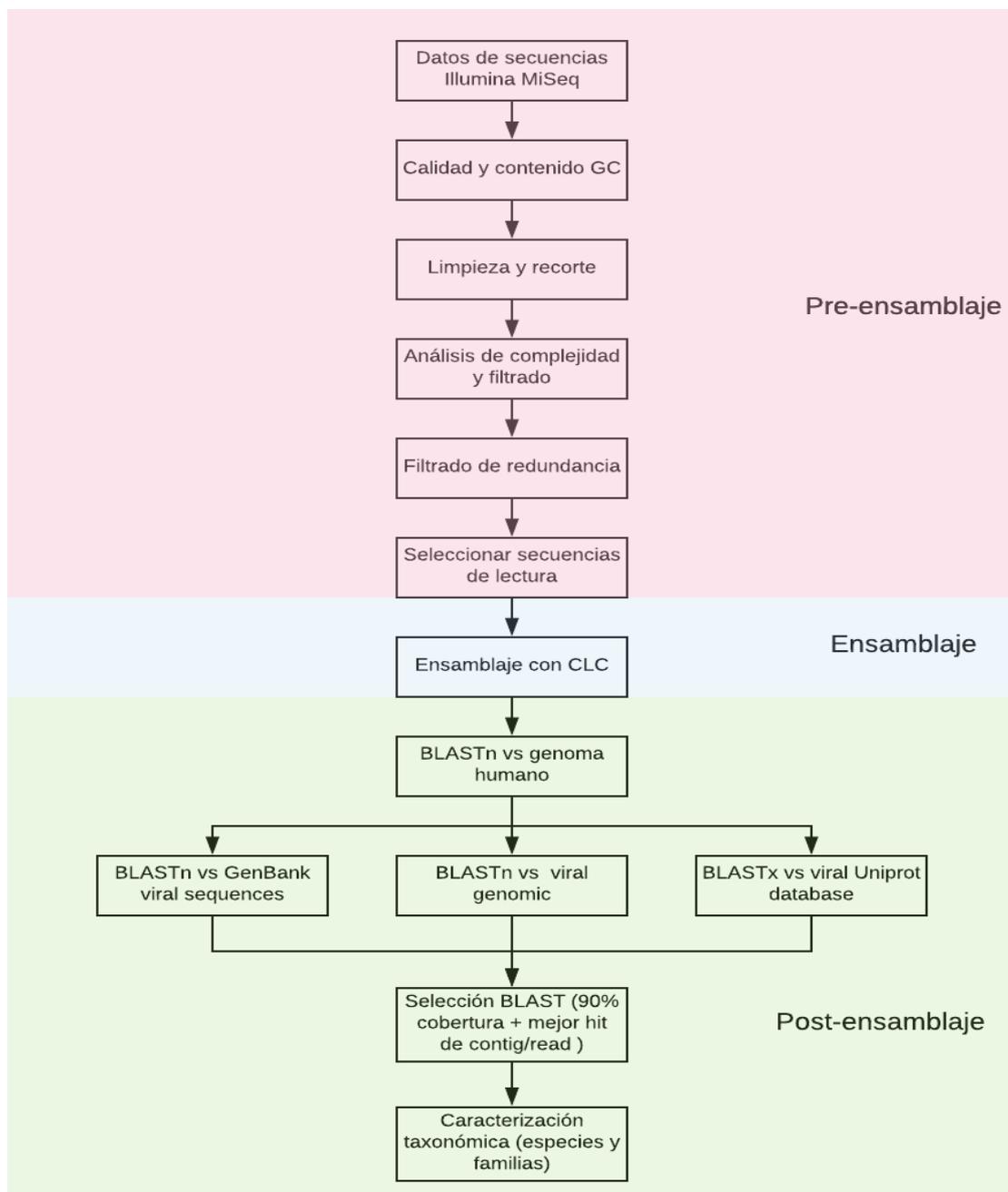
#### 4.4.4 Secuenciación

Las muestras M1, M2 y M3 se secuenciaron utilizando la plataforma *Illumina MiSeq* 2  $\times$  250 bp y 2  $\times$  300 bp, produciendo de esta forma lecturas finales pareadas.

#### 4.5 Procesamiento bioinformático

Para el procesamiento de los datos, que se obtuvieron de la secuenciación *MiSeq*, se estableció un protocolo que se divide en pre-ensamblaje, ensamblaje

y post-ensamble. En el diagrama que se presenta a continuación se muestra un resumen del protocolo antes mencionado (*Figura 15*).



*Figura 15.* Diagrama resumen del procesamiento bioinformático.

Adaptado de (Timoneda, 2017).

#### 4.5.1 Procesamiento pre-ensamblaje

Este pre-procesado tiene como finalidad eliminar secuencias repetidas o de baja calidad, es decir eliminar aquello que entorpezca el proceso de ensamblaje. Es por ello, que primeramente se analizó la calidad de las secuencias valiéndose del software FASTX-Toolkit, versión 0.0.14 (Hannon Lab, <http://www.hannonlab.org>). Este software utilizó los ficheros FASTQ, generados por el secuenciador, para analizar la composición nucleotídica y proporcionar porcentajes de las bases (A, T, G, C o N) en cada una de las posiciones. Además, se eliminaron algunas posiciones con base en el valor de calidad Phred, puesto que estos valores indican la probabilidad de que una base sea errónea (Timoneda, 2017).

Además, utilizando el programa Trimmomatic se eliminaron los cebadores empleados en la amplificación, los códigos de barras derivados de la secuenciación o de la creación de las librerías. Asimismo, se eliminaron secuencias de baja complejidad y sesgadas, debido a la presencia de secuencias repetitivas, basándose en el modelo lineal de la Complejidad Lingüística de Trifonov. Finalmente, se detectaron y eliminaron secuencias duplicadas (Timoneda, 2017).

#### 4.5.2 Ensamblaje

Para el ensamblaje de las lecturas de viromas se utilizó *CLC Genomics Workbench* 4.4 (CLC bio USA, Cambridge, MA) y para ello se tomó en consideración el 90% de identidad y un valor mínimo de 50% de largo de las lecturas (*reads*) (Fernandez-cassi et al., 2017). Además, este programa utilizó el grafo de Bruijn para el ensamblaje de los *reads*. En la *figura 16* se puede observar como las lecturas se van solapando entre sí, permitiendo de esta forma la obtención de los respectivos *contigs* (Timoneda, 2017).

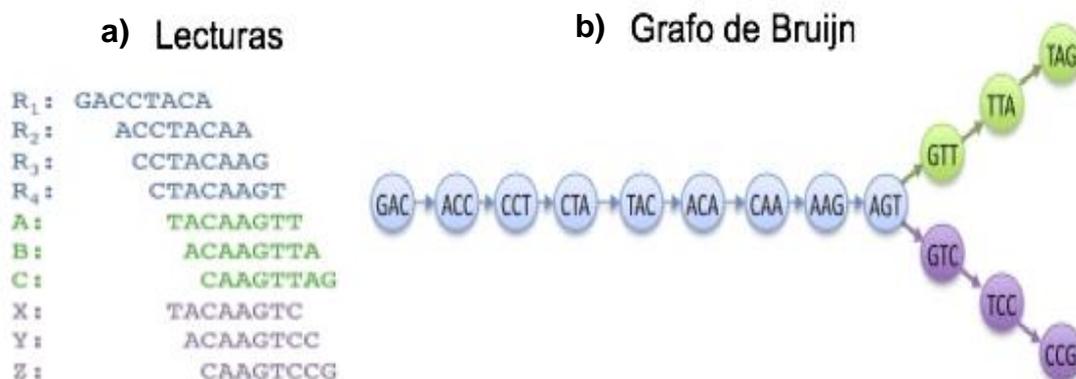


Figura 16. Proceso de ensamblaje utilizando el grafo de Bruijn.

Adaptado de (Schatz, Delcher y Salzberg, 2010).

a) Conjunto de lecturas de 8 pb.

b) Grafo de Bruijn que representa la unión de pequeños fragmentos de los lecturas para formar un contig.

#### 4.5.3 Procesamiento post-ensamblaje

Valiéndose del programa Bowtie2, se realizó un alineamiento de los *contigs* obtenidos en el proceso anterior contra una base de datos de genoma viral (versión hg18). De esta forma se eliminaron las secuencias que poseían al menos un hit (Timoneda, 2017). Además, empleando los *contigs*, que presentaron un tamaño mayor a 100 pb, se consultó su similitud de secuencia empleando BLASTN y BLASTX contra tres bases de datos: división viral de la base de datos nucleotídica GenBank, base de datos de genomas completos virales NCBI y secuencias virales proteicas de UniProt (Fernandez-cassi et al., 2017).

Al momento de realizar alineamientos se obtuvieron segmentos emparejados de alta puntuación, denominados HSPs o High-scoring Segment Pairs. Por lo tanto, para seleccionar el mejor HSP de cada una de las secuencias se tomaron

en consideración parámetros tales como un E-value de  $10^{-5}$  y un largo mínimo de 100 pb. Además, para clasificar a cada secuencia en un grupo taxonómico específico se consideró el mejor resultado de BLAST y el 90% de corte de cobertura. Conforme a los estándares de la base de datos de taxonomía de NCBI se realizó la clasificación y nomenclatura de las especies (Fernandez-cassi et al., 2017 y Timoneda, 2017).

Por otra parte, en la *figura 17* se puede observar como los *contigs* se clasificaron de acuerdo a familia y especies, y partiendo de esta información, se pudo conocer si las secuencias tenían hit o no con alguna de las tres bases de bases. Además, en la *figura 18* se visualizan las condiciones de hit de cada uno de los *contigs*, las condiciones que tomaron en cuenta fueron: largo del hit, largo del *contig* y porcentaje de identidad (Timoneda, 2017).

Taxon	NCBI	Hits	Fasta	Blast	Min_b	Med_b	Max_b	Min_s	Med_s	Max_s	Min_h	Med_h	Max_h
dsDNA		4319											
Poxviridae	10240	4											
Fowlpox virus	10261	1			348	348	348	416	416	416	52.54	52.54	52.54
Salmon gill poxvirus	1680908	1			669	669	669	710	710	710	32.14	32.14	32.14
Turkeypox virus	336486	1			498	498	498	704	704	704	31.14	31.14	31.14
Anomala cuprea entomopoxvirus	62099	1			417	417	417	519	519	519	34.04	34.04	34.04
Herpesviridae	10292	25											
Baculoviridae	10442	1											

*Figura 17.* Clasificación de los *contigs* de acuerdo a familia y especie.

Family: [Astroviridae](#)

[ BACK ]

Specie: [Mamastrovirus 1](#)

Contig	Fasta	Blast	UP.sp	UP.sco	CG.sp	CG.sco	VP.sp	VP.sco
contig_13401			Human astrovirus-8	741 796 100.00	Human astrovirus	780 796 91.79	HAstV-4	782 796 97.31
contig_17759			Human astrovirus-1	396 399 97.73	Human astrovirus	399 399 95.24	HAstV-1	399 399 97.49
contig_28105			Human astrovirus-4	351 392 100.00	Human astrovirus	392 392 81.89	Human astrovirus	392 392 99.23
contig_31067			Human astrovirus-4	720 723 98.35	Human astrovirus	693 723 72.29	HAstV-4	710 723 97.75

*Figura 18.* Condiciones de hit contra las tres bases de datos

#### **4.5.4 Análisis estadístico**

A través de la utilización del Catchall software, versión 4.0, se calcularon los índices de riqueza viral. Además, para este fin se escogió el modelo no paramétrico Chao1, el mismo que forma parte del paquete y proporcionó los mejores resultados (Allen et al., 2013).

#### **4.6 Análisis genético de especies, tipificación y filogenias**

En este apartado, se realizó en primer lugar la descripción viral de cada una de las muestras para denotar la abundancia o ausencia de algunas familias virales. De igual forma, se clasificaron las especies virales de acuerdo a su hospedero, para conocer que tipos de virus predominan en el ambiente. Además, se realizó la tipificación de virus de interés, es decir, virus potencialmente perjudiciales para los seres humanos. A continuación se realizó el análisis de filogenias de determinadas especies.

##### **4.6.1 Descripción viral**

Para la descripción viral se utilizó un mapa de calor, el mismo que se generó a través del empleo de ggplot2 R graphics library (Kolde, 2015). Se consideraron las especies cuyo porcentaje de identidad fue mayor o igual a 90% contra bases de datos de genoma completo, para la generación del mapa de calor . De igual forma, se realizó la clasificación de las especies virales en base a su hospedero.

Además, para la clasificación de las especies virales potencialmente perjudiciales para humanos se estableció como límite un porcentaje de identidad mayor o igual a 70% contra tres bases de datos: división viral de la base de datos nucleotídica GenBank, base de datos de genomas completos virales NCBI y secuencias virales proteicas de UniProt. Para confirmar la identidad de cada uno de los *contigs* se empleó NCBI-BLASTn y del conjunto de secuencias confirmadas se seleccionaron las longitudes y homologías máximas. Para la nomenclatura y clasificación de cada una de las especies se tomó como referencia a la base de datos de taxonomía de NCBI y a la última revisión de

taxonomía de ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) (Fernandez-Cassi et al., 2017).

#### **4.6.2 Tipificación de especies virales de interés**

Para la tipificación de especies de interés se empleó la región de tipificación de los diferentes virus y únicamente cuando los *contigs* se ubicaban en dicha región se continuaba con el procedimiento, es decir, para conocer la posición del *contig* se realizaba el alineamiento del mismo contra secuencias de referencia empleando MEGA7 (Faleye et al., 2017). Por su parte, en el caso de enterovirus y norovirus se utilizó una herramienta de genotipado automático, la cual proporcionaba de forma inmediata el genotipo y subtipo de cada especie (Kroneman, et al., 2011).

#### **4.6.3 Análisis de filogenias**

En cuanto al análisis de filogenias, se construyeron árboles filogenéticos valiéndose del software MEGA7. Para ello, se empleó el método *Neighbor joining*, conocido también como método de unión de vecinos, con 1000 repeticiones Bootstrap (Wang et al., 2016 y Kumar et al., 2016).

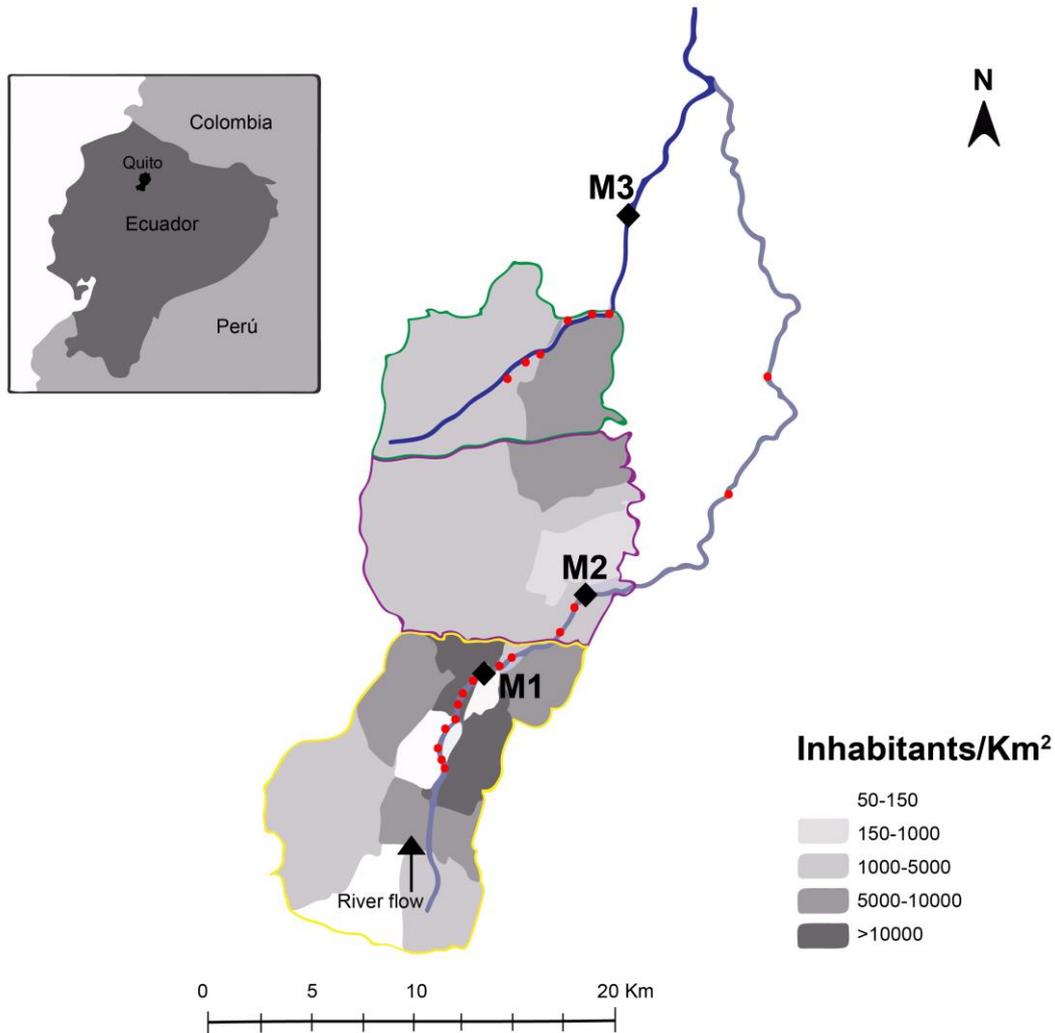
## **5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Todos los resultados de este trabajo han sido adaptados en formato de artículo científico para la publicación en revistas de alto impacto y actualmente el manuscrito se encuentra publicado en la revista *Science of the Total Environment* (Anexo 2).

### **5.1 Muestreo**

En junio de 2017, se recolectaron muestras de agua en tres puntos de la ciudad de Quito altamente impactados por contribuciones de aguas residuales, donde además se encuentran los tres principales sistemas de alcantarillado y puntos de descarga de agua residual (EPMAPS, 2011). Los puntos antes mencionados se ubican en el Sur (M1), Centro (M2) y Norte (M3) de Quito. De forma específica,

las muestras M1 y M2 se obtuvieron del río Machángara y M3 se adquirió del río Monjas como se observa en la figura 19.



*Figura 19.* Puntos de muestreo a lo largo de las parroquias urbanas del Distrito Metropolitano de Quito. En color azul se denotan los ríos Machángara y Monjas, los mismos que reciben los aportes de agua residual (puntos rojos) durante su paso a través de la ciudad. En el distrito sur (amarillo) se recolectó M1, en el distrito central (rosa) se recolectó M2 y en el distrito norte de Quito (verde) se recolectó finalmente M3.

## 5.2 Análisis de calidad microbiológica

Los análisis realizados para medir la calidad microbiológica fueron la cuantificación de *Escherichia coli* y adenovirus humano. Estos estudios revelaron concentraciones de  $8,48E+06$ ,  $7,21E+06$  y  $5,30E+06$  ufc *E. coli* / L para M1, M2 y M3 respectivamente (Tabla 9). Los valores obtenidos sobrepasan la concentración máxima permitida de *E. coli* para verter efluentes de aguas residuales en cuerpos naturales, la concentración máxima establecida por la normativa ecuatoriana es de  $2E+04$  ufc *E. coli* / L.

Respecto a la evaluación de Adenovirus humano, indicador de contaminación fecal humana, se encontraron las siguientes concentraciones para M1, M2 y M3:  $6,20E+04$ ,  $1,42E+05$  y  $8,22E+05$  GC HAdV/L, respectivamente (Tabla 9). Al comparar estas concentraciones con valores promedio de adenovirus humano en agua dulce ( $9,1E+03$  GC HAdV/L) y agua de mar ( $5,6E+02$  GC HAdV/L) se encontró que las concentraciones obtenidas en este estudio sobrepasan los valores promedio antes mencionados (Bofill-Mas et al., 2010). Sin embargo, al realizar la comparación con agua residual, las concentraciones de HAdV de las tres muestras se ubican en el rango designado para agua residual que parte de  $1E+03$  a  $1E+08$  GC HAdV/L (Rames et al., 2016). Por lo tanto, esta semejanza se puede deber a que las muestras fueron tomadas de ríos que reciben el impacto de aguas residuales.

Tabla 9.

### *Características de la muestra e indicadores microbiológicos*

Locación	Fecha	pH	Cond ( $\mu$ S)	TDS (mg/L)	E.coli (ufc/L)	HAdV (GC/L)
M1		7,99	587	293	$8,48E+06$	$6,20E+04$
M2	15/5/17	8,23	596	298	$7,21E+06$	$1,42E+05$
M3		8	557	279	$5,30E+06$	$8,22E+05$

### 5.3 Datos resultantes de metagenómica

Los procedimientos que se llevaron a cabo para la obtención de las secuencias fueron principalmente secuenciación empleando la plataforma *Illumina MiSeq* y ensamblaje con *CLC Genomics Workbench*.

Posterior al proceso de secuenciación, las 3 bibliotecas obtuvieron un promedio de 2,8 millones de secuencias por muestra (*Tabla 10*). Además, cada una de las muestras M1, M2 y M3 obtuvieron 105311, 91245 y 36275 *contigs*, respectivamente, luego de los procedimientos de limpieza y ensamblaje por CLC.

Únicamente el 2,2% (1745 *contigs*) corresponde al porcentaje medio que se asignó a cualquier familia viral taxonómica. Por su parte, los valores de riqueza viral de M1, M2 y M3 fueron de 580,8, 391,1 y 321,9, respectivamente. Siendo el valor de M1 el más elevado.

Tabla 10.

*Características genómicas por muestra. Composición del viroma total de acuerdo a lo determinado por similitud con secuencias virales conocidas.*

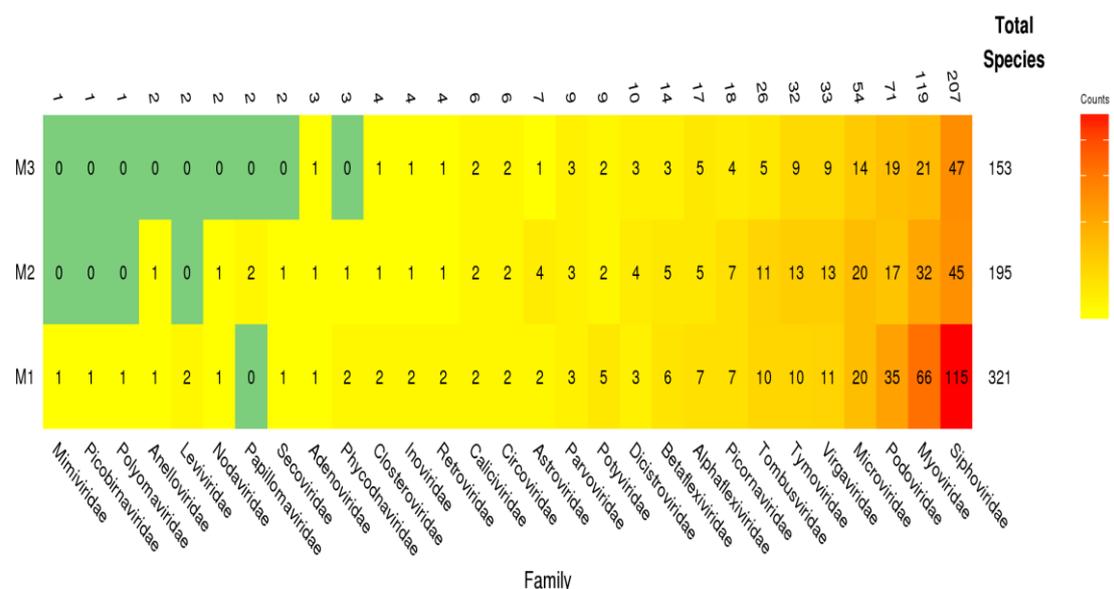
	M1	M2	M3
No. de nucleótidos obtenidos de MiSeq	777.067.620	1.044.712.606	734.755.448
No. de secuencias obtenidos de MiSeq	2.581.620	3.470.806	2.441.048
No. de <i>contigs</i> ensamblados	105.311	91.245	36.275
Longitud media del <i>contig</i> (min-max)	538,72 (200-15.975)	475,82 (200-5.524)	459,57 (200-6.695)
Valor estimado de riqueza (SE)	580,8 (45,9)	391,1 (39,9)	321,9 (42,3)
No. secuencias virales putativas (% de <i>contigs</i> totales)	2.943 (2,79%)	1.574 (1,7%)	745 (2,05%)

### 5.4 Descripción de familias virales

Para la descripción viral se utilizó un mapa de calor, tomando como base las especies que coincidieron con un porcentaje de identidad mayor o igual a 90%

contra bases de datos de genoma completa. Además, a partir de estas especies se realizó su clasificación en base a su hospedero.

El mapa de calor de la *figura 20* muestra el número de especies virales obtenidas por familia y por muestra, resultando de esta forma en un total de 29 familias virales y 669 especies.



*Figura 20.* Representación de la abundancia de especies virales a través de un mapa de calor, donde se ubican los 3 sitios de muestreo (M1=sur, M2=centro y M3=norte). La fila superior indica el conteo total de especies virales por cada una de las 29 familias y la columna derecha muestra el total de especies virales por muestra. Los datos comprendieron una escala de colores desde verde (no detectado) hasta rojo (alta abundancia).

Las familias que presentaron mayor abundancia de especies fueron *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae*, familias asociadas a bacteriófagos es decir virus que infectan bacterias. Estas familias abundantes de bacteriófagos coinciden con diversos estudios de microbioma, ya que son las entidades biológicas más abundantes en la biosfera y se pueden encontrar en cualquier lugar donde exista vida bacteriana, por ejemplo, en agua de mar, agua dulce (ríos, lagos, entre otros), y en el intestino humano (Clokie et al., 2011 y Hayes et al., 2017).

Además, los resultados también coinciden con estudios precedentes, donde las familias *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae* son las primeras en detectarse y sus especies son las más abundantes en muestras ambientales de virus (Fernandez-Cassi et al., 2018 y Tamaki et al., 2012)

Después de los bacteriófagos, las familias vinculadas a patógenos de plantas fueron las más abundantes. En los últimos años se han encontrado alguna familias virales patógenas de plantas (*Tombusviridae*, *Alphaflexiviridae*, *Virgaviridae* y *Bromoviridae*) en diferentes sitios, tales como en ríos, canales, arroyos, lagos, océanos y lagunas (Mehle y Ravnkar, 2012). Estas familias se corresponde mayoritariamente con las encontradas en este análisis.

Por otra parte, basándose en todos los *contigs* que se relacionan con secuencias virales putativas, un total de 5262 *contigs*, se encontró que un 87,9% (4630 *contigs*) pertenece a especies virales que infectan huéspedes conocidos.

Partiendo de esta información, se constató que 2624 *contigs* (60,18%) fueron virus que infectan procariontas y 798 *contigs* (18,3%) se relacionaron con virus que infectan a plantas. El porcentaje restante se dividió en un pequeño número de virus que infectan vertebrados, invertebrados, protistas y hongos (7,75%, 3,03%, 1,47%, 0,09% respectivamente). De tal manera que el porcentaje de virus que infectan a humanos fue de 9,17%, es decir 400 *contigs* (Figura 21).

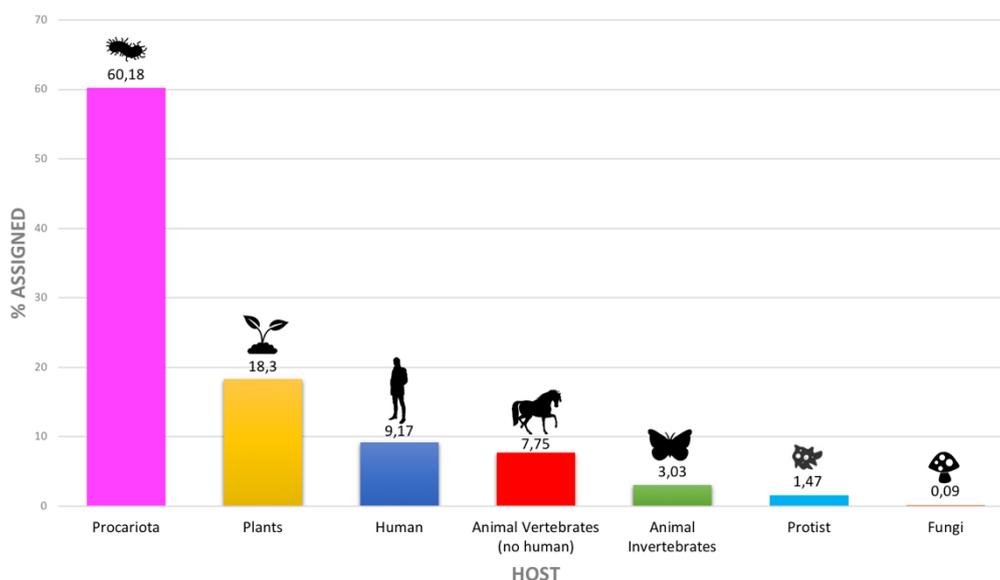


Figura 21. Clasificación de especies virales de acuerdo a su hospedero. Diagrama representa la abundancia relativa (%) de los hospederos virales.

Se observa tal diversidad de hospederos virales en las muestras de este estudio debido a que las bacterias, hongos, plantas, insectos y animales pueden albergar numerosos virus. Además, estudios metagenómicos de océanos, lagos, ríos, muestras de heces y otros entornos sugieren que los virus se pueden encontrar en gran cantidad y en lugares insospechados (Cantalupo et al., 2011).

Por otra parte, los virus que infectan procariontes y plantas representaron los mayores porcentajes debido a que los bacteriófagos son los organismos que más abundan en la Tierra como se mencionó anteriormente y los virus de plantas se han encontrado en cantidades considerables en aguas ambientales, en heces de humanos y otros animales (Clokier et al., 2011 y Roossinck, 2015).

La presencia de virus de plantas en estas muestras proviene mayoritariamente del agua residual a través de la dieta, puesto que estos virus se asocian con productos consumibles tales como frutas, vegetales, cereales y tabaco, y emplean este medio para dirigirse como viriones infecciosos a través del tracto gastrointestinal, donde se replican y mediante las heces se liberan en aguas residuales y llegan finalmente a aguas superficiales. Cabe mencionar también que el aporte de virus de plantas a cuerpos de agua dulce se puede deber a plantas infectadas que crecen cerca del agua o a material vegetal en descomposición o lesionado (Carding et al., 2017 y Mehle y Ravnkar, 2012).

Por otra parte, los virus humanos se ubicaron en tercer lugar respecto a la abundancia en las muestras porque mediante las descargas de agua residual, que contienen las excretas de millones de personas incluyendo agentes infecciosos, se pueden diseminar los virus humanos a cuencas fluviales y al agua costera (Cantalupo et al., 2011). En especial, los puntos de muestreo de este estudio corresponden a los principales puntos de descarga de aguas residuales en ríos de la ciudad de Quito.

Además, los datos presentados anteriormente se asemejan al típico viroma que encontramos en el intestino humano, puesto que está dominado principalmente por virus procariontes (bacteriófagos o fagos) y seguido por virus de células animales, retrovirus endógenos, virus patógenos de plantas y virus que ocasionan infecciones latentes y persistentes. En relación con ello, se conoce

que el viroma de un individuo está influenciado por la dieta, la salud, el estado nutricional entre otros (Carding et al., 2017 y Ogilvie y Jones, 2015).

De tal manera que los virus que se encontraron con mayor abundancia, es decir los virus con hospederos procariontes, plantas y humano, tienen su origen en dieta y los virus restantes son de origen ambiental.

### 5.5 Patógenos virales potencialmente perjudiciales para humanos

Para la clasificación de las especies virales potencialmente perjudiciales para humanos se estableció como límite igual o mayor 70% de identidad contra tres bases de datos y se confirmó la identidad de cada uno de los *contigs* empleando NCBI-BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool).

De forma general se detectaron 26 especies, las cuales correspondieron a 9 diferentes familias, como Adenoviridae, Polyomaviridae, Papillomaviridae, Parvoviridae, Circoviridae, Picobirnaviridae, Caliciviridae, Picornaviridae y Astroviridae (*Tabla 11*).

*Tabla 11.*

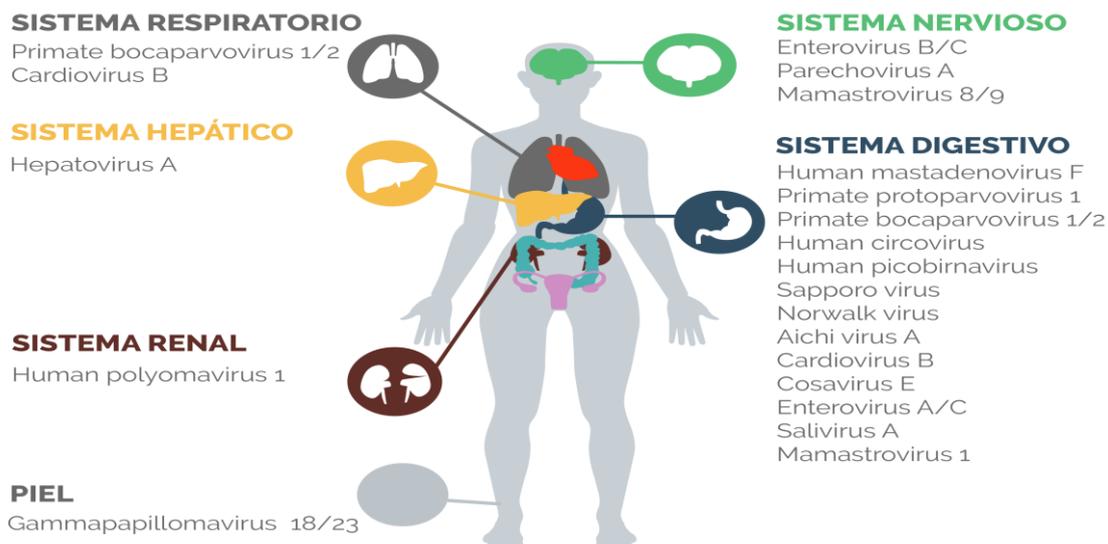
*Familias y especies virales potencialmente patógenas para humanos detectadas en muestras de Quito.*

Familia viral	Especies virales	Muestra			Número total de secuencias	Largo máximo	Homología máxima
		M1	M2	M3			
<i>Adenoviridae</i>	Human mastadenovirus F	1	1	3	5	706	100%
<i>Polyomaviridae</i>	Human polyomavirus 1	2	0	0	2	822	99%
<i>Papillomaviridae</i>	Gamma papillomavirus 18	0	1	0	1	365	73%
	Gamma papillomavirus 23	0	1	0	1	849	78%
<i>Parvoviridae</i>	Primate protoparvovirus 1	1	2	1	4	1147	100%
	Primate bocaparvovirus 1	5	3	2	10	1333	100%
	Primate bocaparvovirus 2	1	3	2	6	840	100%
<i>Circoviridae</i>	Human circovirus VS6600022	2	4	6	12	1119	99%
	Circovirus like	2	3	4	9	795	99%
<i>Picobirnaviridae</i>	Human picobirnavirus	3	0	0	3	874	98%
<i>Caliciviridae</i>	Sapporo virus	18	9	1	28	1154	98%
	Norwalk virus	21	20	3	44	1191	99%

Continúa Tabla 11

Familia viral	Especies virales	Muestra			Número total de secuencias	Largo máximo	Homología máxima
		M1	M2	M3			
<i>Adenoviridae</i>	Human mastadenovirus F	1	1	3	5	706	100%
<i>Polyomaviridae</i>	Human polyomavirus 1	2	0	0	2	822	99%
<i>Papillomaviridae</i>	Gammapapillomavirus 18	0	1	0	1	365	73%
	Gammapapillomavirus 23	0	1	0	1	849	78%
<i>Parvoviridae</i>	Primate protoparvovirus 1	1	2	1	4	1147	100%
	Primate bocaparvovirus 1	5	3	2	10	1333	100%
	Primate bocaparvovirus 2	1	3	2	6	840	100%
<i>Circoviridae</i>	Human circovirus VS660022	2	4	6	12	1119	99%
	Circovirus like	2	3	4	9	795	99%
<i>Picobirnaviridae</i>	Human picobirnavirus	3	0	0	3	874	98%
<i>Caliciviridae</i>	Sapporo virus	18	9	1	28	1154	98%
	Norwalk virus	21	20	3	44	1191	99%
<i>Picornaviridae</i>	Aichivirus A	0	6	0	6	581	98%
	Cardiovirus B	1	0	0	1	636	97%
	Cosavirus A	0	3	0	3	602	88%
	Cosavirus E	0	0	1	1	325	91%
	Enterovirus A	1	0	3	4	525	91%
	Enterovirus B	3	1	0	4	622	89%
	Enterovirus C	22	23	7	52	1348	97%
	Hepatovirus A	2	0	0	2	588	99%
	Parechovirus A	2	2	1	5	805	91%
	Salivirus A	2	8	0	10	1123	97%
<i>Astroviridae</i>	Mamastrovirus 1	29	26	7	62	3415	99%
	Mamastrovirus 6	6	4	0	10	2046	99%
	Mamastrovirus 8	0	2	0	2	411	97%
	Mamastrovirus 9	0	2	0	2	734	99%

En la *figura 22* se asocian los patógenos virales humanos detectados en las aguas superficiales de Quito (ríos Machángara y Monjas) con los principales tejidos que infectan, se incluyen los sistemas digestivo, hepático, nervioso, renal y respiratorio. Se conoce también que algunos virus provocan lesiones en la piel.



*Figura 22.* Descripción de patógenos virales humanos detectados en aguas superficiales y su asociación con los tejidos que infectan.

Cabe recalcar que en todas las muestras se detectaron mastadenovirus humano F (denominado adenovirus humano F hasta 2013). Estos resultados coinciden con otros estudios de matrices de agua altamente impactadas con desechos humanos, donde se encontró que mastadenovirus F está ampliamente distribuido en matrices de agua a nivel mundial. Además, a partir de estos estudios se conoce que esta especie viral es un buen indicador de contaminación fecal humana debido a que presenta mayor abundancia que otros virus entéricos y sobretodo es específico para huésped humano (Rames et al., 2016). En el apartado de análisis de calidad microbiológica, previo al análisis metagenómico, se empleó adenovirus humano como un indicador de contaminación fecal humana, detectando altas concentraciones en las tres muestras (valor medio  $3,42E + 05$  GC / L) como resultado del impacto de las aguas residuales en los cuerpos de agua dulce. Por otra parte, se debe mencionar también que Mastadenovirus F se asocia con manifestaciones gastrointestinales (Lion, 2014).

Poliomavirus humano 1, conocido también como Polioma virus humano BK (BKPyV), se detectó solo en la muestra que corresponde al sur de la ciudad de Quito (M1). Esta especie se ha asociado con enfermedades del tracto urinario puesto que los virus se diseminan mayoritariamente al riñón, y de forma

particular en pacientes inmunosuprimidos, pueden causar cistitis hemorrágica, nefropatía por poliomavirus y estenosis ureteral (Bofill-Mas et al., 2000 y Helle et al., 2017). Además, BKPyV es un virus posiblemente carcinogénico para los seres humanos, clasificado en el Grupo 2B, puesto que se ha encontrado en neoplasias tubulares renales y uroteliales y en otros tumores tales como cáncer de páncreas, de próstata, entre otros (Fratini et al., 2014). Estudios realizados en Europa han reportado la presencia de estos virus en el ambiente debido a que las infecciones que provocan persisten de forma indefinida y es razonable encontrar BKPyV en muestras ambientales puesto que se excretan en la orina (Bofill-Mas et al., 2000). Específicamente en Latinoamérica existen pocos estudios sobre poliomavirus, únicamente en Brasil y en Argentina se han reportado BKPyV en receptores de trasplante renal (Schiavelli et al., 2014 y Zalona et al., 2011). En Argentina además se han reportado BKPyV en muestras de agua de río y agua residual (Torres et al., 2016).

Gammapapilomavirus se encontraron de forma particular en M2, punto de muestreo que corresponde a la zona centro de Quito. Con base en bibliografía se conoce que los miembros pertenecientes a este género infectan únicamente humanos y causan en ellos lesiones de la piel (Li et al., 2009). Además, estas especies se han vinculado al desarrollo de células escamosas (CCS) de la piel, pero se ha encontrado el ADN de tipos de papilomavirus humano en individuos sanos y en pacientes con CCS cutáneo por lo que se requiere más investigación para llegar a una conclusión (Waterboer et al., 2008). Por otra parte, cabe mencionar que las especies de Gammapapilomavirus que se detectaron en este estudio fueron 18 (VPH 156) y 23 (VPH 175), las mismas que se han detectado en lesiones cutáneas en Argentina y Suecia, respectivamente (Chouhy et al., 2013 y Johansson et al., 2013). En relación con las identidades de los dos *contigs*, estas fueron las más bajas que se reportaron hacia las bases de datos, con 73 y 78%, lo que sugiere que dichas secuencias pueden pertenecer a un nuevo tipo de virus de papiloma humano (de Villiers et al., 2004).

Además, en el último estudio de VPH en Ecuador, el mismo que empleó muestras clínicas de mujeres con lesiones cervicales precancerosas de bajo y alto grado y cáncer invasivo de cuello uterino, únicamente se reportaron virus de

tipo alfa altamente oncogénicos tales como VPH tipo 16, 58, 52, 31, 66, entre otros. La presencia de virus tipo alfa concuerda con el tejido del que fueron aislado, es por ese motivo que los virus tipo gamma no se encontraron en este estudio debido a que tenían que ser aislados de lesiones cutáneas para su detección (Bruni et al., 2017).

En cuanto a la familia Parvoviridae se detectaron 3 especies, Parvovirus primate 1, Bocaparvovirus primate 1 y Bocaparvovirus primate 2, las cuales estuvieron presentes en las tres muestras y el número total de secuencias fue de 4, 10 y 6 secuencias, respectivamente. En cuanto a Primate protoparvovirus 1, esta especie está conformada por tres cepas de bufavirus (bufavirus 1a, 1b y 2) y fue descubierta en el 2012 durante un análisis metagenómico llevado a cabo en muestras heces de niños con diarrea en Burkina Faso (Phan et al., 2012). Desde su descubrimiento, los bufavirus se han reportado en casos humanos esporádicos de diarrea en Túnez, Bután, Finlandia, China y Países Bajos. De tal manera que se requieren más estudios para determinar si los miembros de esta especie se asocian con diarrea u otros síntomas (Huang et al., 2015 y Phan et al., 2012).

Bocaparvovirus primate 1 y 2 están conformados por virus de gorila y mayoritariamente virus humanos. En el 2005, bocavirus humano 1 fue descrito por primera vez al ser encontrado en muestras nasofaríngea y por ello viene su vinculación como causante de infección respiratoria (Allander et al., 2005). Sin embargo, aún no está claro el papel que desempeña en la enfermedad debido a que la frecuencia de codetecciones con otros virus es alta. Además, se ha detectado su ADN en muestras de heces de pacientes con o sin síntomas respiratorios concomitantes y en sangre de pacientes con infección respiratoria (Schildgen et al., 2008). Hace poco, otros tipos de bocavirus humano (HBoV2, HBoV3 y HBoV4) se han vinculado a síntomas de diarrea, confirmando así su replicación entérica y su propagación mediante las heces dado que estos tipos fueron detectados principalmente en heces humanas (Guido et al., 2016). En relación a su circulación en Latinoamérica, se ha informado de su presencia principalmente en heces de pacientes que presentaban gastroenteritis agua y en muestras de agua residual en países como Brasil, Argentina, México, Perú,

Paraguay y Uruguay (Guido et al., 2016; Proenca-Modena et al., 2013; Salvo et al., 2018 y Santos et al., 2010).

Dos especies pertenecientes a la familia Circoviridae se detectaron en todas las muestras analizadas. Los circovirus infectan algunas especies de aves, pero solo se han documentado dos circovirus que se replican en mamíferos, Circovirus porcino 1 y 2. El primero no es considerado patógeno, mientras que el segundo puede causar varias enfermedades y síndromes, siendo el más importante el síndrome de desmedro multisistémico postdestete (PMWS) porque ocasiona lesiones inflamatorias sistémicas y afecta la tasa de crecimiento (Delwart and Li, 2011 y Seo et al., 2014). En relación con las secuencias que coincidieron con el Circovirus humano VS6600022, aquellas mostraron una relación estrecha (una homología máxima de 99%) con una secuencia que se obtuvo en muestras de heces de pacientes en los Países Bajos que presentaron gastroenteritis aguda de causa desconocida (Smits et al., 2014). Mientras que otro grupo de *contigs* coincidieron como una secuencia de tipo circo humano, la cual fue detectada durante un análisis de metagenómica llevado a cabo en heces de niños peruanos con diarrea inexplicada. Además, está relacionado de forma lejana con la familia Circoviridae y en vinculación al país donde fue descubierto se le otorgó el nombre de Pecovirus (virus de tipo circo asociados a las heces peruanas). Cabe mencionar también que se ha detectado el ADN de Pecovirus en muestras de diarrea inexplicada en Nicaragua y Chile (Phan et al., 2016a).

En cuanto a Picobirnavirus humano, esta especie solo estuvo presente en M1 y específicamente tres *contigs* coincidieron con una secuencia detectada en muestras de heces de niños de 3 años de edad de China que presentaban diarrea idiopática. Esta secuencia con la que coincidieron fue detectada a través de un análisis de metagenómica viral (Sun et al., 2016). Cabe mencionar también que se han detectado picobirnavirus en muestras ambientales y en distintas muestras de especies hospedadoras y con base en los últimos estudios, se sugiere que los picobirnavirus podrían ser un bacteriófago (Kattor et al., 2016 y Krishnamurthy y Wang., 2018).

Dos especies de la familia Caliciviridae, virus Sapporo y virus de tipo Norwalk, fueron detectadas en las tres muestras. Al comparar el número total de secuencias, se encontró que la primera especie presentó 28 secuencias y la última especie 44 secuencias, siendo las secuencias del virus de tipo Norwalk más abundantes. Esta familia es una de las más importantes causantes de diarrea a nivel mundial y su vía de transmisión es fecal-oral. Se conoce también que los síntomas clínicos de gastroenteritis son indistinguibles entre ambas especies, de tal manera que es necesario el diagnóstico de laboratorio para identificar al patógeno (Brown et al., 2016 y Oka et al., 2015).

Un amplio número de especies pertenecientes a la familia *Picornaviridae* se detectaron en las muestras de Quito. Aichivirus A se detectó solo en M2 que corresponde al centro de Quito. Esta especie se asocia con gastroenteritis humana, cuya vía de transmisión es fecal-oral, y está distribuido de forma global en distintas muestras ambientales (Kitajima y Gerba, 2015). Aichivirus A fue detectado por primera vez en 1989 en la Prefectura de Aichi en Japón y se ha encontrado también en otras partes del mundo. Sin embargo, Aichivirus A se ha detectado solamente en Brasil a partir de niños con gastroenteritis y en muestras de agua residual de Venezuela y Uruguay (Alcalá et al., 2010; Burutarán et al., 2016 y Santos et al., 2010).

Virus Scaffold (SAFV), miembro de la especie *Cardiovirus B*, fue detectado sólo en una muestra y presentó alta similitud genómica (97% de identidad) con una cepa Peruana aislada en 2012 de una niña de 2 años de edad (Leguia et al., 2015). SAFV es ubicuo y se ha vinculado principalmente con infecciones respiratorias y gastrointestinales. Sin embargo, se han asociado recientemente con otros síntomas clínicos, tales como sistema cardiovascular, endocrino y neurológico (Kai et al., 2016). En América del Sur, se ha detectado SAFV en muestras clínicas de Bolivia, Brasil y Perú (Drexler et al., 2008; Leguia et al., 2015 y Nix et al., 2013).

Cosavirus A y E se detectaron en las muestras de Quito, específicamente en M2 y M3 respectivamente. Estas especies infectan humanos y fueron descritas por primera vez en 2008 en heces de controles sanos y niños del sur de Asia que

padecían Parálisis flácida agua no polio, y se han detectado además en muestras clínicas de Brasil y en agua residual en Estados Unidos. De tal manera que es complejo establecer su asociación con enfermedades, dado que la frecuencia de detección en sujetos sintomáticos y asintomáticos es similar. (Stöcker et al., 2012 y Tapparel et al., 2013).

Otros miembros importantes de la familia *Picornaviridae* son los enterovirus, mismos que fueron detectados en todas las muestras analizadas. Se detectaron Enterovirus A, B y C, siendo Enterovirus C la especie más detectada. Sin embargo, en este estudio no se encontraron especies de poliovirus siendo esto inesperado puesto que generalmente se detectan cepas atenuadas en los sitios donde ocurre la inmunización (WHO, 2003).

Hepatovirus A (denominado Hepatitis A hasta 2013) se detectó solo en M1 con una homología máxima de 99%. La cepa detectada debe corresponder probablemente a una cepa salvaje, debido a que en Ecuador no se han realizado campañas de inmunización, al considerarse un país endémico intermediario (Jacobsen y Wiersma, 2010).

Parechovirus A (denominado Parechovirus Humano hasta 2014) fue encontrado en todas las muestras con una homología máxima de 91%. Estos virus pueden afectar principalmente a niños pequeños causando enfermedades gastrointestinales o respiratorias y en bebés ocasionan una enfermedad similar a la sepsis. Esta última afecta el sistema nervioso central, de tal manera que los bebés pueden presentar convulsiones o deterioro neurológico. Además, las infecciones por parechovirus se han detectado en todo el mundo y las tasas de prevalencia varían dependiendo de la edad y de los sitios elegidos para el muestreo (Jung et al., 2016 y Olijve et al., 2018).

Salivirus A, miembro de la familia *Picornaviridae*, fue detectado únicamente en M1 y M2. Esta especie fue descubierta en 2009 al analizar muestras de heces por técnicas de secuenciación de última generación. Desde entonces, Salivirus A se ha vinculado con gastroenteritis agua y se incluyen síntomas como vómitos, diarrea y fiebre. Por ello se presumen que la transmisión es principalmente por ruta fecal-oral (Reuter et al., 2017). Específicamente en Latinoamérica, Salivirus

A fue detectado en Brasil y Bolivia a partir de muestras clínicas (Nix et al., 2013 y Santos et al., 2015).

Como parte del análisis, se detectaron algunas especies de la familia *Astroviridae*, tales como Mamastrovirus 1 (MastV 1), MastV 6, MastV 8 y MastV 9, con una homología máxima de 99%, 99%, 97% y 99%, respectivamente. Siendo Mamastrovirus 1 la especie a la que más número de *contigs* se asignó en este estudio, este resultado se esperaba puesto que MastV 1 es ubicua y se encuentra especialmente en niños (Vu et al., 2017). En cuanto a Mamastrovirus 6, aún no se conoce claramente el rol que juega en la enfermedad y su primer reporte en Sudamérica fue en 2015 a partir de muestras de agua residual de Uruguay (Lizasoain et al., 2015). MastV 8 y MastV 9 fueron las últimas especies en detectarse, las mismas que se han reportado en pacientes con parálisis flácida aguda no polio y encefalitis (Vu et al., 2016). Cabe mencionar también que esta investigación es la primera en evidenciar la presencia de MastV 8 y MastV 9 en Latinoamérica.

Finalmente, en este estudio no se detectó ninguna especie perteneciente a la familia *Reoviridae* posiblemente debido a su estacionalidad o baja prevalencia. Se podría vincular también esta información con la reducción de cobertura del programa de vacunación contra el rotavirus en Ecuador, se redujo al 80% en 2016 mientras que durante 2010-2012 alcanzó una cobertura de 100% (Pan American Health Organization (PAHO), 2018). Otros estudios metagenómicos de igual forma no detectaron rotavirus en áreas endémicas (Ng et al., 2012).

## **5.6 Tipificación de especies virales humanas**

Para la tipificación de especies de interés se realizó el alineamiento de los *contigs* contra secuencias de referencias empleando MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y herramientas de genotipado automático.

Las especies virales humanas que se tipificaron pertenecen a las familias *Adenoviridae*, *Papillomaviridae*, *Parvoviridae*, *Caliciviridae*, *Picornaviridae* y *Astroviridae* (Tabla 12)

Tabla 12.

**Análisis de tipificación de especies virales humanas. A partir de los contigs ubicados en la región de tipificación se detallan el genotipo, el tipo o los serotipos.**

Family	Specie	% typified contigs	Typing region	Position	Length	Blast identity (%)	Acc. Number	Genotype and subtype
Adenoviridae	Human mastadenovirus F	40% (2/5)	Hexon protein	17643-20414 <sup>a</sup>	698	99	<a href="#">KU162869.1</a>	Human adenovirus F serotype 40
	Contig_56367			19053-19750				
	Contig_19441			18990-19217	227	99	<a href="#">KY316164.1</a>	Human adenovirus F serotype 41
Papillomaviridae	Gamma papillomavirus 18	100% (1/1)	L1 protein	4917-6581 <sup>b</sup>	849	74	<a href="#">JX429973.1</a>	Human papillomavirus type 156
	Contig_49803			6099-7011				
Parvoviridae	Primate parvovirus 1	75% (3/4)	VP1	2397-4495 <sup>c</sup>	562	99	<a href="#">KU362763.1</a>	Human bufavirus genotype 1
	Contig_78300			2934-3496	1147	99	<a href="#">KX856937.1</a>	Human bufavirus genotype 1
	Contig_66586			3059-4205	481	99	<a href="#">KX856937.1</a>	Human bufavirus genotype 1
	Contig_34693			2086-2602	507	99	<a href="#">KM624026.1</a>	Human bocavirus genotype 3
	Primate bocaparvovirus 1	50% (5/10)	VP1	3023-5029 <sup>d</sup>	435	99	<a href="#">JN086998.1</a>	Human bocavirus genotype 3
	Contig_61389			2675-3182	639	99	<a href="#">GU048665.1</a>	Human bocavirus genotype 3
	Contig_79350			4796-5230	303	100	<a href="#">KM624026.1</a>	Human bocavirus genotype 3
	Contig_46837			2631-3296	592	99	<a href="#">FJ948861.1</a>	Human bocavirus genotype 3
	Contig_81024			2857-3159	658	99	<a href="#">KY050744.1</a>	Human bocavirus genotype 2
	Contig_25624			3670-4298	638	100	<a href="#">KY050744.1</a>	Human bocavirus genotype 2
	Primate bocaparvovirus 2	83% (5/6)	VP1	2961-4964 <sup>e</sup>	840	99	<a href="#">JQ964115.1</a>	Human bocavirus genotype 2
	Contig_48745			3891-4548	452	99	<a href="#">KY050744.1</a>	Human bocavirus genotype 2
	Contig_54132			3836-4506	326	87	<a href="#">HQ871668.1</a>	Human bocavirus genotype 2
Caliciviridae	Sapporo virus	39% (11/28)	VP1	5173-6855 <sup>f</sup>	357	96	<a href="#">KP298674.1</a>	Human sapovirus GI.1
	Contig_100319			6171-6565	453	96	<a href="#">KP298674.1</a>	Human sapovirus GI.1
	Contig_27454			5338-5820	473	96	<a href="#">AB455796.1</a>	Human sapovirus GI
	Contig_42602			6520-6995	269	91	<a href="#">EU124657.1</a>	Human sapovirus GI.2
	Contig_47189			6146-6442	450	94	<a href="#">KM092508.1</a>	Human sapovirus GI.2
	Contig_21513			5653-6101				

Continúa Tabla 12

Family	Specie	% typified contigs	Typing region	Position	Length	Blast identity (%)	Acc. Number	Genotype and subtype
	Contig_42601			6035-6620	540	91	<a href="#">EU124657.1</a>	Human sapovirus GI.2
	Contig_42600			6157-6620	33	91	<a href="#">EU124657.1</a>	Human sapovirus GI.2
	Contig_104232			5916-6494	531	95	<a href="#">AY237420.2</a>	Human sapovirus GI
	Contig_36335			4529-5544	903	97	<a href="#">AB924385.1</a>	Human sapovirus GV
	Contig_64244			6393-7186	791	97	<a href="#">AB924385.1</a>	Human sapovirus GV
	Contig_89839			6713-6960	245	98	<a href="#">AB924385.1</a>	Human sapovirus GV
	Norwalk virus	30% (13/43)	ORF1 ORF2	3572-5101 <sup>g</sup> 5085-6692 <sup>g</sup>				
	Contig_14305			5764-6077	319	98	<a href="#">KT732280.1</a>	Norovirus GI.6
	Contig_89122			5113-5431	318	98	<a href="#">KF944271.2</a>	Norovirus GI.1
	Contig_15510			5417-6204	787	99	<a href="#">KY806294.1</a>	Norovirus GI.2
	Contig_27177			5513-5934	421	99	<a href="#">MG002630.1</a>	Norovirus GI.4
	Contig_23524			6269-6853	584	99	<a href="#">KY905335.1</a>	Norovirus GI.4
	Contig_58560			5524-5847	323	99	<a href="#">KM386681.1</a>	Norovirus GI.5
	Contig_14582			4935-5677	739	99	<a href="#">KM267742.1</a>	Norovirus GI.6
	Contig_38983			5678-5932	254	99	<a href="#">KM036375.1</a>	Norovirus GI.6
	Contig_34549			6111-6484	373	95	<a href="#">KY424344.1</a>	Norovirus GI.6
	Contig_6769			4469-4713	244	100	<a href="#">KY485110.1</a>	Norovirus GI.P16
	Contig_6008			3858-4515	657	99	<a href="#">KY421159.1</a>	Norovirus GI.P16
	Contig_6009			3858-4515	656	99	<a href="#">KY421177.1</a>	Norovirus GI.P16
	Contig_100782			4185-4745	560	95	<a href="#">MF668937.1</a>	Norovirus GI.Pg
Picornaviridae	Enterovirus A	50% (2/4)	VP2 VP3	955-1728 <sup>h</sup> 1729-2460 <sup>h</sup>				
	Contig_23332			1408-1689	281	92	<a href="#">AY697471.1</a>	Enterovirus A76
	Contig_23329			1703-1978	275	91	<a href="#">AY697468.1</a>	Enterovirus A76
	Enterovirus B	50% (2/4)	VP2 VP3	949-1737 <sup>i</sup> 1738-2451 <sup>i</sup>				
	Contig_46549			1847-2274	427	89	<a href="#">KJ957190.1</a>	Echovirus 25
	Contig_47150			1401-1859	458	87	<a href="#">HM031191.1</a>	Echovirus 25
	Enterovirus C	44% (22/50)	VP1 VP2 VP3	2480-3385 <sup>j</sup> 950-1765 <sup>j</sup> 1766-2479 <sup>j</sup>				
	Contig_91322			957-1447	490	86	<a href="#">JX174177.1</a>	Coxsackievirus A1
	Contig_2722			693-1864	1171	89	<a href="#">KC785529.1</a>	Coxsackievirus A1
	Contig_56536			2671-3670	996	82	<a href="#">JX174176.1</a>	Coxsackievirus A1
	Contig_61167			1022-1733	708	80	<a href="#">DQ995637.1</a>	Coxsackievirus A13

Continúa Tabla 12

Family	Specie	% typified contigs	Typing region	Position	Length	Blast identity (%)	Acc. Number	Genotype and subtype
	Contig_80491			2690-2983	296	93	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_54025			2937-3620	880	89	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_35788			1384-2726	1342	90	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_67125			2675-3543	868	90	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_89878			2579-3151	575	93	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_10091			2936-3225	289	93	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_19652			836-1711	872	89	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_81902			1944-2472	528	89	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_12945			1544-1874	330	88	<a href="#">AB828288.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_9842			1933-2395	462	91	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_70355			2693-3265	572	89	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
	Contig_65082			910-1443	532	82	<a href="#">KJ183495.1</a>	Coxsackievirus A24
	Contig_39567			1428-2577	1146	80	<a href="#">EF015033.1</a>	Coxsackievirus A24
	Contig_79066			2186-2702	519	79	<a href="#">EF015033.1</a>	Coxsackievirus A24
	Contig_56057			2850-4002	1152	81	<a href="#">EF555644.1</a>	Enterovirus C99
	Contig_66760			2820-3827	1009	83	<a href="#">EF015011.1</a>	Enterovirus C99
	Contig_34711			1861-2459	595	83	<a href="#">EF555644.1</a>	Enterovirus C99
	Contig_38531			2815-3775	963	83	<a href="#">KF129411.1</a>	Enterovirus C99
	Hepatovirus A	50% (1/2)	VP1	2208-3107 <sup>k</sup>				
	Contig_99111			3003-3307	305	99	<a href="#">MF175366.1</a>	Hepatovirus genotype IA
Astroviridae	Mamastrovirus 1	23% (14/62)	ORF2	4289-6673 <sup>i</sup>				
	Contig_92012			6266-6673	456	97	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
	Contig_63238			4450-4696	241	93	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
	Contig_44034			5514-5810	297	99	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
	Contig_4556			4789-5558	724	98	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
	Contig_258			2696-5935	3003	98	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
	Contig_59279			4412-4674	263	98	<a href="#">KX932051.1</a>	Human astrovirus genotype 2
	Contig_7859			4649-5169	481	98	<a href="#">JX087964.1</a>	Human astrovirus genotype 2
	Contig_97655			5076-5896	606	99	<a href="#">KF668570.1</a>	Human astrovirus genotype 3c
	Contig_11722			4237-4553	317	100	<a href="#">KJ318561.1</a>	Human astrovirus genotype 4
	Contig_31067			4840-5558	640	98	<a href="#">AB025812.1</a>	Human astrovirus genotype 4
	Contig_26370			6072-6474	409	96	<a href="#">KF039913.1</a>	Human astrovirus genotype 4
	Contig_21700			4425-5056	608	98	<a href="#">AB025806.1</a>	Human astrovirus genotype 4
	Contig_31066			4701-4951	243	98	<a href="#">AB025812.1</a>	Human astrovirus genotype 4
	Contig_11721			4180-4553	373	99	<a href="#">AF292073.1</a>	Human astrovirus genotype 8

Nota: a NC\_001454.1; b NC\_008189.1; c JX027295.1; d NC\_012564.1; e NC\_012042.1; f NC\_006554.1; g NC\_029646.1; h AY697458.1; i NC\_001472.1; j NC\_002058.3; k NC\_001489.1; l NC\_030922.1

Dos *contigs* de Mastadenovirus F ubicados en la región del hexón coincidieron a los serotipos 40 y 41, consiguiendo así un porcentaje de tipificación de 40%. Estos serotipos son los principales causantes de gastroenteritis infantil a nivel mundial y se encuentran de forma común en matrices de agua residual y superficial (Iaconelli et al., 2017 y Osborne et al., 2015).

En cuanto a las secuencias de Gammapapillomavirus, sólo se tipificó una secuencia como virus de papiloma humano tipo 156 con un porcentaje de identidad de 74%. Esta cepa fue detectada por primera vez en 2010 en Argentina, en una muestra de piel de un individuo de 82 años con carcinoma de células basales en el labio superior (Chouhy et al., 2010). Sin embargo, esta cepa también fue encontrada en pacientes sanos, de tal manera que no está claro su rol en la patogénesis y se sugiere a VPH-156 como un agente comensal (Chouhy et al., 2013).

Se consiguió la tipificación de 75% para secuencias de Parvovirus primate 1, específicamente tres *contigs* coincidieron a bufavirus humano genotipo 1. Este genotipo se ha relacionado como causante de gastroenteritis en varios estudios, sin embargo, se requiere más investigación para confirmar su papel patogénico en humanos (Väisänen et al., 2017). En América, no se ha informado sobre la presencia este genotipo y únicamente en Perú se reportó Bufavirus humano genotipo 3 (Phan et al., 2016a).

Otra de las especies tipificadas de la familia Parvoviridae fueron bocaparvovirus primate 1 y 2, las cuales se asignaron a Bocavirus humano 3 y 2, respectivamente. Estos resultados están acordes a estudios previos, puesto que los genotipos 2 y 3 se detectaron por primera vez en muestras de heces humanas y es por esta razón también que se asocian a infecciones gastrointestinales (Salvo et al., 2018).

En relación a la familia Caliciviridae se detectaron dos especies, Sapporo virus (SaV) y Norovirus, denominado también virus de tipo Norwalk (NoV). En cuanto a la primera especie, los genogrupos que se detectaron fueron GI, GI.1, GI.2, GII y GV. Estos genogrupos concuerdan con estudios previos realizados en Perú y Brasil, donde GI fue el más abundante (Costa et al., 2017 y Sánchez et al.,

2018). En cuanto a virus de tipo Norwalk se encontró una gran variedad de genotipos tales como, GI.6 y GII.1, GII.2, GII.4, GII.5, GII.6, GII.P16 y GII.Pg. Los resultados se relacionan con estudios previos realizados en Ecuador, donde se detectaron los siguientes genogrupos: GI.3, GII.1, GII.4, GII.6 y GII.16 (Gastañaduy et al., 2015 y Lopman et al., 2015).

En relación a Enterovirus C, se detectó un gran grupo de cepas en el que se incluyen Coxsackievirus A1, CA13, CA19, CA24. De acuerdo a estudios, estos subtipos se han detectado mayoritariamente en pacientes sanos (Faleye et al., 2016). Sin embargo, Enterovirus C99 detectado con un homología de secuencia de 83% ha sido aislado eventualmente de niños con parálisis flácida aguda en África Occidental y es por ello que se vincula a esta enfermedad (Fernandez-Garcia et al., 2017).

Se identificó sólo una cepa, Enterovirus 76, correspondiente a Enterovirus A. Esta cepa fue descubierta en 1991 durante un brote de gastroenteritis y se aisló a partir de una muestra clínica de un recluta francés que padecía la enfermedad antes mencionada (Oberste et al., 2005). En cuanto a Enterovirus B, únicamente se detectó Echovirus 25 (E-25), la misma que se asocia a distintos síndromes clínicos que incluye encefalitis, parálisis flácida aguda, herpangina menor, meningitis aséptica y erupción cutánea de mano, pie y boca (Li et al., 2015). Además, se conoce que E-25 está diseminado en todo el mundo y específicamente en Latinoamérica, esta cepa se detectó a partir de fluido cerebroespinal de pacientes que presentaban Meningitis en Perú (dos Santos et al., 2006).

Para la última especie de la familia Picornaviridae, Hepatovirus A, se empleó la región VP1 y al realizar el alineamiento se demostró que el *contig* tiene una cobertura parcial de la región antes mencionado con un porcentaje de identidad de 99% para la el genotipo IA. En relación con estudios previos, este genotipo es prevalente en Latinoamérica y se ha detectado en muestras clínicas y en muestras de agua residual urbana en Venezuela y Brasil, respectivamente. No obstante, en Ecuador es la primera vez que ha sido reportado (Prado et al., 2012 y Sulbaran et al., 2010).

En cuanto a la especie Mamastrovirus 1 se empleó la región ORF2 para la tipificación, encontrando Astrovirus humanos tipo 1, 2, 3, 4 y 8, vinculados con gastroenteritis y especialmente el serotipo 3 se asocia a gastroenteritis más severa (Bosch et al., 2014). Estos serotipos han sido previamente detectados en otros países de Latinoamérica, por ejemplo en Brasil y Venezuela en muestras clínicas y en Argentina y Uruguay en muestras de agua residual (González et al., 2011; Lizasoain et al., 2015; Masachessi et al., 2018; Resque et al., 2007 y Siqueira et al., 2017).

### **5.7 Filogenia de especies virales humanas de interés**

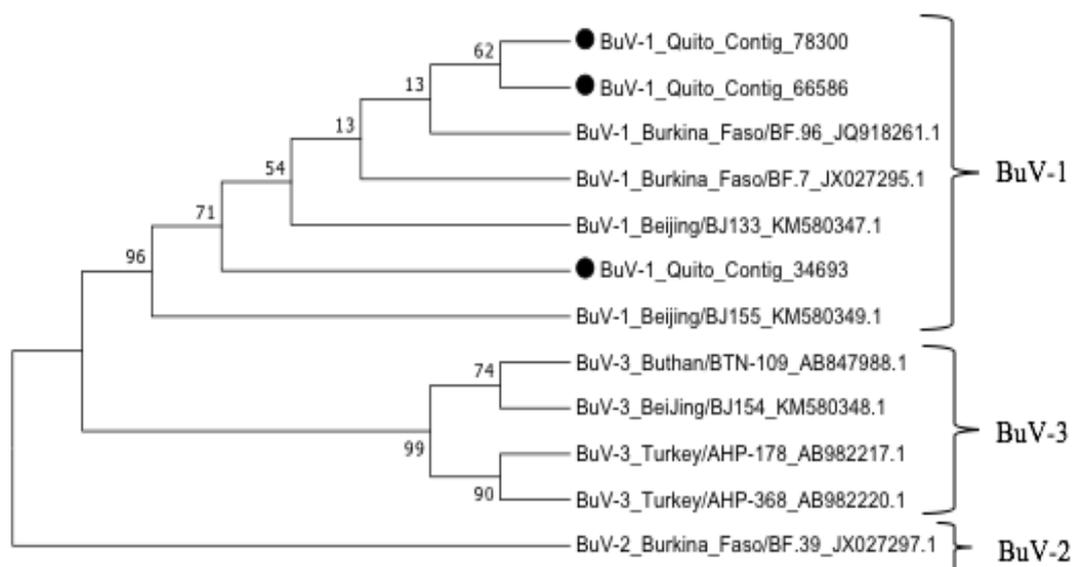
En cuanto al análisis de filogenias se seleccionaron dos especies, bufavirus genotipo 1 y echovirus 25, para las cuales se construyeron árboles filogenéticos basándose en método de unión de vecinos (*Neighbor joining*) con 1000 replicaciones *Bootstrap*.

Bufavirus genotipo 1 se escogió debido a su prevalencia en muestras clínicas a nivel mundial y dado que no existen reportes de este virus en el país. En cuanto a Latinoamérica, únicamente en Perú se reportó bufavirus genotipo 3 (Väisänen et al., 2017). Cabe mencionar también que esta especie se asocia con diarrea y otros síntomas, pero se requieren más estudios para confirmar su papel en la enfermedad (Phan et al., 2012). En relación con esta información, se debe considerar que en Ecuador la tasa de enfermedades diarreicas (tasa por 100.000 habitantes) incrementó de 181 en 2015 a 1643 en 2016 de acuerdo a los últimos reportes. La tasa de síndrome diarreico agudo (tasa por 100.000 habitantes) de igual forma incrementó de 0,5 en 2014 a 52,8 en 2016. De tal manera que las enfermedades diarreicas en Ecuador han incrementado sin conocerse de forma específica los agentes patógenos que las causan, puesto que únicamente se identifican a las bacterias dejando de lado a los virus causantes de infecciones gastrointestinales (Granda, 2016).

Para conocer la procedencia de las secuencias de bufavirus humano en Quito se construyeron árboles filogenéticos empleando la región VP1, puesto que la clasificación de los tres genotipos de bufavirus se realiza con base en esta región (Phan et al., 2016b). En la *figura 23* se puede observar como los *contigs* 78300

y 66586 presentaron mayor cercanía a las cepas de bufavirus humano de Burkina Faso, mientras que el *contig* 34693 fue más cercano a las cepas de Beijing. Estos resultados se pueden deber a que bufavirus se encuentra distribuido a nivel mundial, siendo Burkina Faso el primer lugar donde se detectó esta especie en muestras de heces de niños con diarrea. Además, bufavirus se ha detectado en otros países asiáticos siendo China uno de ellos (Huang et al., 2015 y Phan et al., 2012).

En la *figura 23* se puede visualizar también que los *contigs* se agruparon en el clúster de Bufavirus humano genotipo 1, lo que confirma los resultados obtenidos previamente en la tipificación.



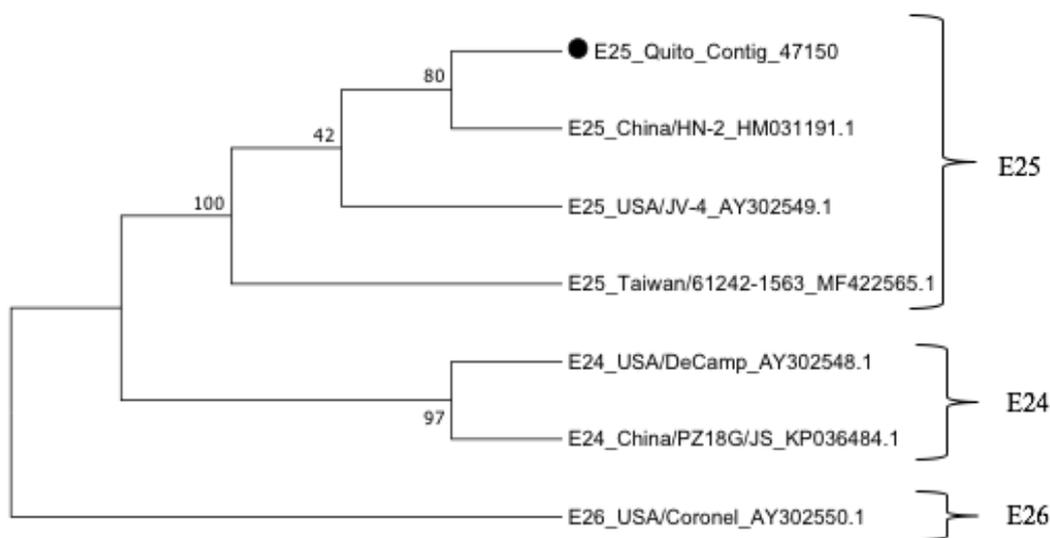
*Figura 23.* Árbol filogenético de Bufavirus humano empleando la secuencias forward de los *contigs* 78300 y 66586 (●), la secuencia complementaria reversa del *contig* 34693 (●) y las secuencias VP1 de Bufavirus humano genotipo 1, 2 y 3.

Echovirus 25 es otra de las especies seleccionadas debido a su asociación con diferentes síndromes clínicos tales como erupción cutánea de manos, pies y boca, parálisis flácida aguda, meningitis aséptica y herpangina menor (Li et al., 2015). Específicamente en relación el síndrome manos, pies y boca, se detectaron 2 casos en el mes de junio de 2017 en Pichincha, fecha que coincide

con el muestreo realizado para este estudio, y a nivel nacional se detectaron 7 casos. De tal manera que es importante estudiar la procedencia de este virus, puesto que cada vez surgen más casos (Ministerio de Salud Pública, 2017).

Por ello, se construyó un árbol filogenético basándose en las regiones VP2 y VP3, que fueron los sitios donde se ubicó el *contig* previamente. Además, se emplearon estas regiones debido a que VP2 y VP3 al igual que VP1 se encuentran en la superficie de la cápside viral y permiten tipificar los enterovirus a nivel de serotipo (Nasri et al., 2007 y Perera et al., 2010). En la *figura 24* se puede observar el *contig* 47150 presentó mayor cercanía a la cepa de Echovirus 25 de China. La razón de esta cercanía puede ser debido al movimiento poblacional, puesto que de los países Asiáticos el que presentó mayor ingreso de sus ciudadanos a Ecuador fue China con 17.433 personas de acuerdo a datos estadísticos del 2015 (INEC, 2015 y Soto, 2009).

En la *figura 24* se puede visualizar también como el *contig* 47150 se agrupó en el clúster de las secuencias de E25, lo que corrobora los resultados obtenidos previamente en la tipificación.



*Figura 24.* Árbol filogenético de Echovirus 25 empleando la secuencia forward del *contig* 47150 (●) previamente tipificado y las secuencias VP2-VP3 de E24, E25, E26.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

Las aguas superficiales urbanas de Quito, aguas de los ríos Machángara y Monjas, están contaminadas a niveles que superan los valores permitidos de *Escherichia coli* (valor promedio  $8,48E+06$  ufc/L) para verter aguas residuales en cuerpos naturales. Además, la contaminación detectada tiene un gran componente de carácter fecal humano al emplear Adenovirus humano como indicador de este tipo de contaminación y obtener concentraciones (valor promedio  $3,42E+05$  GC/L) que sobrepasan los valores promedio en cuerpos de agua dulce. Las concentraciones de HAdV se asemejan a concentraciones detectadas en agua residual de algunos estudios previos, revelando de esta forma el alto impacto antropogénico que sufren los ríos de Quito por las descargas de aguas residuales.

Análisis metagenómicos revelan que la mayor parte de virus presentes en las aguas superficiales de Quito son de procariotas, seguido de virus que infectan plantas, humanos, vertebrados, invertebrados, protistas y hongos. Siendo las familias *Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae* las que presentan mayor abundancia de especies, asociadas a bacteriófagos.

En cuanto a las familias virales que infectan humanos, se detectaron patógenos importantes pertenecientes a las familias *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Papillomaviridae*, *Parvoviridae*, *Picobirnaviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae*. Logrando la tipificación de la mayor parte de los virus, a excepción de las familias *Circoviridae* y *Picobirnaviridae*.

Entre los virus que se detectaron, descritos por primera vez en Ecuador, se incluyen mayoritariamente virus causantes de gastroenteritis tales como Aichivirus, Astrovirus, Bufavirus, Bocavirus, Cosavirus, Virus Sapporo, Mastadenovirus F, Salivirus y Virus Scaffold.

Otros virus detectados en el país y que presentan importantes síndromes clínicos son Echovirus 25, Enterovirus C99, Gammapapillomavirus, Parechovirus A y Poliomasvirus humano 1 (BKPyV), los mismos que se asocian a meningitis

aséptica, parálisis flácida aguda, lesiones cutáneas, deterioro neurológico y afecciones del tracto urinario, respectivamente. Se evidencia por primera vez en Latinoamérica la presencia de Bufavirus humano genotipo 1 y Mamastrovirus 8 y 9.

Las especies de Bufavirus humano genotipo 1 y Echovirus 25 detectadas en las aguas superficiales de Quito presentaron cercanía con cepas de Burkina Faso y China, respectivamente, denotando la procedencia de estos virus. Por otra parte, se relaciona la detección de Echovirus 25 con brotes del síndrome manos, pies y bocas en Pichincha durante el período de muestreo.

## **6.2 Recomendaciones**

Con base en los niveles de contaminación y diversidad de patógenos virales humanos detectados, a lo largo de la cuenca del río Guayllabamba, se recomienda el planteamiento urgente de programas de saneamiento de las aguas superficiales urbanas de la ciudad de Quito. Esta recomendación tiene como objetivo evitar el riesgo de transmisión viral a la población a través de agua de riego, aguas recreacionales y de consumo cuenca abajo.

Se recomienda realizar un monitoreo metagenómico en el río Esmeraldas, específicamente en la entrada de aguas al sistema de agua potable de la Esmeraldas proveniente del río Esmeraldas, debido al alto impacto de la contaminación humana en los ríos Machángara y Monjas de la cuenca del río Guayllabamba que son afluentes del río Esmeraldas. Con ello se busca conocer el destino de los virus detectados en Quito y determinar si podrían llegar a afectar a la población de Esmeraldas.

Se recomienda realizar estudios poblacionales que permitan profundizar en el papel que desempeñan los virus por primera vez descritos en Ecuador, analizar la prevalencia de los mismos en la población y cuantificar el impacto de estas cepas, por ejemplo, se podría iniciar con el análisis de diarreas no diagnosticadas considerando la diversidad de virus causantes de gastroenteritis detectados en este estudio.

Se recomienda que el personal clínico tome en consideración las cepas virales encontradas para otorgar a los pacientes un diagnóstico diferencial de un cuadro clínico y que esta información se contemple delante del diagnóstico de cuadros clínicos gastrointestinales, de afectación del sistema nerviosos y de riñón, lesiones cutáneas, puesto que se han detectado virus relacionados con los cuadros clínicos antes mencionados.

Se recomienda utilizar la metagenómica para control epidemiológico, permitiendo descartar agentes etiológicos en casos de diagnósticos diferenciales e identificar virus emergentes vinculados a brotes. Con esta herramienta se pretende establecer un sistema de vigilancia de circulación de virus y conocer si un virus que se encuentra circulando por Latinoamérica ingresa a la población o no, y dependiendo de los resultados tomar medidas urgentes.

## REFERENCIAS

- Alcalá, A., Vizzi, E., Rodríguez-Díaz, J., Zambrano, J., Betancourt, W., & Liprandi, F. (2010). *Molecular Detection and Characterization of Aichi Viruses in Sewage-Polluted Waters of Venezuela*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 4113–4115. <http://doi.org/10.1128/AEM.00501-10>
- Allali, I., Arnold, J. W., Roach, J., Cadenas, M. B., Butz, N., Hassan, H. M., ... Azcarate-Peril, M. A. (2017). *A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome*. *BMC Microbiology*, 17, 194. <http://doi.org/10.1186/s12866-017-1101-8>
- Allander, T., Tammi, M. T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., & Andersson, B. (2005). *Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12891–12896. <http://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>
- Allard, A., Albinsson, B., Wadell, G., Albinsson, B.O., 2001. *Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 498–505. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.498>
- Allen, H. K., Bunge, J., Foster, J. A., Bayles, D. O., & Stanton, T. B. (2013). *Estimation of viral richness from shotgun metagenomes using a frequency count approach*. *Microbiome*, 1(1), 5. <http://doi.org/10.1186/2049-2618-1-5>
- ALS Environmental. (2017). *Water matrix classification summary*. Recuperado el 30 de abril del 2018 de [https://www.alsenvironmental.co.uk/media-uk/pdf/quality/water-matrix-clasificacion\\_uk\\_12-10-2017.pdf](https://www.alsenvironmental.co.uk/media-uk/pdf/quality/water-matrix-clasificacion_uk_12-10-2017.pdf)
- Apostol, L. N., Suzuki, A., Bautista, A., Galang, H., Paladin, F. J., Fuji, N., ... Oshitani, H. (2012). *Detection of Non-Polio Enteroviruses From 17*

*Years of Virological Surveillance of Acute Flaccid Paralysis in the Philippines. Journal of Medical Virology*, 84, 624–631. <http://doi.org/10.1002/jmv>

- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). *What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. <http://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Bibby, K., & Peccia, J. (2013). *Identification of Viral Pathogen Diversity in Sewage Sludge by Metagenome Analysis. Environmental Science & Technology*, 47, 1945–1951. <http://doi.org/10.1021/es305181x>
- Bijlsma, L., Castiglioni, S., Covaci, A., de Voogt, P., Emke, E., Hernández, F., ... Thomas, K. (2014). *Wastewater-based epidemiology for public health monitoring. Water & Sewerage Journal*, 25–26.
- Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., ... Delwart, E. (2009). *Frequent Detection of Highly Diverse Variants of Cardiovirus, Cosavirus, Bocavirus, and Circovirus in Sewage Samples Collected in the United States. Journal of Clinical Microbiology*, 47(11), 3507–3513. <http://doi.org/10.1128/JCM.01062-09>
- Blumenthal, U. J., Mara, D. D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G., & Stott, R. (2000). *Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agriculture : recommendations for revising WHO guidelines. Bulletin of the World Health Organization*, 78(9), 1104–1116. Recuperado el 15 de abril del 2018 de <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/268224/PMC2560847.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1>
- Bofill-Mas, S., Calgua, B., Clemente-Casares, P., La Rosa, G., Iaconelli, M., Muscillo, M., ... Girones, R. (2010). *Quantification of Human Adenoviruses in European Recreational. Food and Environmental Virology*, 2(2), 101–109. <http://doi.org/10.1007/s12560-010-9035-4>
- Brinkman, N., Fout, S., & Keely, S. (2017). *Retrospective Surveillance of Wastewater To Examine Seasonal Dynamics of Enterovirus*

- Infections. American Society for Microbiology Journals*, 2(3), 1–16.  
<http://doi.org/10.1128/mSphere.00099-17>
- Brown, J. R., Shah, D., & Breuer, J. (2016). *Viral gastrointestinal infections and norovirus genotypes in a paediatric UK hospital , 2014 – 2015. Journal of Clinical Virology*, 84, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.08.298>
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., ... de Sanjosé, S. (2017). *Human Papillomavirus and Related Diseases in Ecuador*. Recuperado el 21 de abril del 2018 de <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/ECU.pdf>
- Bucardo, F., Reyes, Y., Svensson, L., & Nordgren, J. (2014). *Predominance of Norovirus and Sapovirus in Nicaragua after Implementation of Universal Rotavirus Vaccination. PLOS ONE*, 9(5), 1–8. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098201>
- Buermans, H. P. J., & den Dunnen, J. T. (2014). *Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Burutarán, L., Lizasoain, A., García, M., Tort, L., Colina, R., & Victoria, M. (2016). *Detection and Molecular Characterization of Aichivirus 1 in Wastewater Samples from Uruguay. Food and Environmental Virology*, 8(1), 13–17. <http://doi.org/10.1007/s12560-015-9217-1>
- 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*, 47(8), 2797–2810. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.043>
- Cantalupo, P. G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A. D., Katz, J. P., & Grabe, M. (2011). *Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations. American Society for Microbiology Journals*, 2(5), 1–11. <http://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>

- Cantalupo, P. G., Katz, J. P., & Pipas, J. M. (2018). *Viral sequences in human cancer*. *Virology*, 513, 208–216. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.017>
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). *A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1829. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>
- Carding, S., Davis, N., & Hoyles, L. (2017). *Review article : the human intestinal virome in health and disease*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 46(9), 800–815. <http://doi.org/10.1111/apt.14280>
- Chouhy, D., Bolatti, E. M., Piccirilli, G., Sánchez, A., Fernandez Bussy, R., & Giri, A. (2013). *Identification of human papillomavirus type 156 , the prototype of a new human gammapapillomavirus species , by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments*. *Journal of General Virology*, 94, 524–533. <http://doi.org/10.1099/vir.0.048157-0>
- Chouhy, D., Gorosito, M., Sánchez, A., Serra, E. C., Bergero, A., Fernandez Bussy, R., & Giri, A. A. (2010). *New generic primer system targeting mucosal/genital and cutaneous human papillomaviruses leads to the characterization of HPV 115, a novel Beta-papillomavirus species 3*. *Virology*, 397(1), 205–216. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.020>
- Clokier, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). *Phages in nature*. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. <http://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>
- Costa, L., Monteiro, J., Portal, T., Costa, E., da Costa, A., Gabbay, Y., & Resque, H. (2017). *Major Article Detection and genotyping of human adenovirus and sapovirus in children with acute gastroenteritis in Belém , Pará , between 1990 and 1992 : first detection of GI . 7 and GV . 2 sapoviruses in Brazil*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(5), 621–628. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0198-2017>

- da Silva Poló, T., Peiró, J., Nogueira, L., Ludwig, L., de Oliveira-Filho, E., Bucardo, F., Huynen, P., Melin, P., Thiry, E., Mauroy, A. (2016). *Human norovirus infection in Latin America. Journal of Clinical Virology*, 78, 111–119. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.03.016>
- Datta, S., Budhauriya, R., Das, B., Chatterjee, S., Vanlalhmuaaka, & Veer, V. (2015). *Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. World Journal of Virology*, 4(3), 265–276. <http://doi.org/10.5501/wjv.v4.i3.265>
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). *Classification of papillomaviruses. Virology*, 324(1), 17–27. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Delwart, E., & Li, L. (2012). *Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. Virus Research*, 164(1), 114–121. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.021>
- Desbois, D., Couturier, E., Mackiewicz, V., Graube, A., Letort, M., Dussaix, E., & Roque, A. (2010). *Epidemiology and Genetic Characterization of Hepatitis A Virus Genotype IIA. Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3306–3315. <http://doi.org/10.1128/JCM.00667-10>
- Dickin, S., Bisung, E., & Savadogo, K. (2017). *Sanitation and the commons: The role of collective action in sanitation use. Geoforum*, 86, 118–126. <http://doi.org/10.1016/j.geoforum.2017.09.009>
- dos Santos, G., Skraba, I., Oliveira, D., Lima, A., de Melo, M., Kmetzsch, C. I., ... da Silva, E. (2006). *Enterovirus Meningitis in Brazil , 1998 – 2003. Journal of Medical Virology*, 78, 98–104. <http://doi.org/10.1002/jmv.20509>
- Drexler, J. F., De Souza, L., Stöcker, A., Silva, P., Medrado, T., Petersen, N., ... Drosten, C. (2008). *Circulation of 3 Lineages of a Novel Saffold Cardiovirus in Humans. Emerging Infectious Disease Journal*, 14(9), 1398–1405. <http://doi.org/10.3201/eid1409.080570>

- Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento. (2011). Estudios de Actualización del Plan Maestro Integrado de Agua Potable y Alcantarillado para el DMQ. Recuperado el 4 de febrero del 2018 de [https://www.aguaquito.gob.ec/sites/default/files/documentos/plan\\_maestro\\_agua\\_potable.pdf](https://www.aguaquito.gob.ec/sites/default/files/documentos/plan_maestro_agua_potable.pdf)
- Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento. (2016). *Programa para la descontaminación de los ríos de Quito*. Recuperado el 4 de febrero del 2018 de [http://www.aguaquito.gob.ec/sites/default/files/documentos/r\\_ejecut\\_vindob\\_31may16\\_rev\\_tg\\_0.pdf](http://www.aguaquito.gob.ec/sites/default/files/documentos/r_ejecut_vindob_31may16_rev_tg_0.pdf)
- Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento. (2017). Memoria de Sostenibilidad 2016. Recuperado el 10 de febrero del 2018 de <http://www.aguaquito.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/MEMORIA-DE-SOSTENIBILIDAD-AGUA-DE-QUITO-2016.pdf>
- Fahrenfeld, N., & Bisceglia, K. (2016). *Environmental Science Emerging investigators series: sewer surveillance*. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2, 788–799. <http://doi.org/10.1039/C6EW00158K>
- Faleye, T., Adewumi, M., Japhet, M. David, O., Oluyeye, A., & Adeniji, J. (2017). *Non-polio enteroviruses in faeces of children diagnosed with acute flaccid paralysis in Nigeria*. *Virology Journal*, 14(175), 1–14. <http://doi.org/10.1186/s12985-017-0846-x>
- Faleye, T., Adewumi, M., Coker, B., Nudamajo, F., & Adeniji, J. (2016). *Direct Detection and Identification of Enteroviruses from Faeces of Healthy Nigerian Children Using a Cell-Culture Independent RT-Seminested PCR Assay*. *Advances in Virology*, 2016, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2016/1412838>.

- Fawell, J., & Nieuwenhuijsen, M. J. (2003). *Contaminants in drinking water* *Environmental pollution and health. British Medical Bulletin*, 68(1), 199–208. <http://doi.org/10.1093/bmb/ldg027>
- Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Gonzales-Gustavson, E., Abril, J. F., Bofill-Mas, S., & Girones, R. (2017). *A metagenomic assessment of viral contamination on fresh parsley plants irrigated with fecally tainted river water. International Journal of Food Microbiology*, 257, 80–90. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.001>
- Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Rodríguez-Manzano, J., Figuerola, N., ... Girones, R. (2018). *Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. Science of The Total Environment*, 618, 870–880. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.249>
- Fernandez-Garcia, M. D., Kebe, O., Fall, A. D., & Ndiaye, K. (2017). *Identification and molecular characterization of non-polio enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in West Africa , 2013 – 2014. Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-03835-1>
- Fong, T., & Lipp, E. (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. <http://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005>
- Fongaro, G., Padilha, J., Schissi, C. D., Nascimento, M. A., Bampi, G. B., Viancelli, A., & Barardi, C. R. M. (2015). *Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 20060–20066. <http://doi.org/10.1007/s11356-015-5196-x>
- Fratini, M., Di Bonito, P., & La Rosa, G. (2014). *Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for*

*Waterborne Transmission? Food and Environmental Virology*, 6(1), 1–12. <http://doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>

Garcia, J., Espejo, V., Nelson, M., Sovero, M., Villaran, M. V, Gomez, J., ... Gonzales, M. S. (2013). *Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America*. *Virology Journal*, 10(305), 1–12. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-10-305>

Fricke, W. F., Cebula, T. A., & Ravel, J. (2011). *Genomics*. In S. Schutzer, R. Breeze, P. Keim, & S. Morse (Eds.), *Microbial Forensics (Second edi*, pp. 479–492). San Diego: Academic Press. Recuperado el 3 de abril del 2018 de <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-382006-8.00028-1>

Garn, J. V, Sclar, G. D., Freeman, M. C., Penakalapati, G., Alexander, K. T., Brooks, P., ... Clasen, T. F. (2017). *International Journal of Hygiene and The impact of sanitation interventions on latrine coverage and latrine use: A systematic review and meta-analysis*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220, 329–340.

Gastañaduy, P., Vicuña, Y., Salazar, F., Broncano, N., Gregoricus, N., Vinjé, J., & Lopman, B. (2015). *Transmission of norovirus within households in Quininde, Ecuador*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(9), 1031–1033. <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000000783>.TRANSMISSION

Gerba, C. P., & Pepper, I. L. (2009). *Wastewater Treatment and Biosolids Reuse*. In *Environmental Microbiology (Second*, pp. 503–530). San Diego: Academic Press.

Gim, T., Howe, A., & Rose, J. B. (2014). *Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater*. *Journal of Virological Methods*, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.09.017>

Gómez, L. (2016). Programa para la descontaminación de los ríos de quito. Recuperado el 16 de abril del 2018 de

[http://www.aguaquito.gob.ec/sites/default/files/documentos/programa\\_para\\_la\\_descontaminacion\\_de\\_rios\\_ene\\_2016.pdf](http://www.aguaquito.gob.ec/sites/default/files/documentos/programa_para_la_descontaminacion_de_rios_ene_2016.pdf)

- González, G. G., Liprandi, F., & Ludert, J. E. (2011). *Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. Journal of Medical Virology*, 83(11), 1972–1982. <http://doi.org/10.1002/jmv.22185>
- Granda, J. (2016). Enfermedades transmitidas por agua y alimentos. Recuperado el 28 de mayo del 2018 de <https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/ETAS-2014/ANUARIO>
- Guido, M., Tumolo, M.R., Verri, T., Romano, A., Serio, F., De Giorgi, M., De Donno, A., Bagordo, F., Zizza, A. (2016). *Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. World J. Gastroenterol*, 22, 8684–8697. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8684>
- Gupta, N., Pandey, P., & Hussain, J. (2017). *Effect of physicochemical and biological parameters on the quality of river water of Narmada, Madhya Pradesh, India. Water Science*, 31(1), 11–23. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wsj.2017.03.002>
- Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J. R., Masago, Y., Sano, D., & Katayama, H. (2018). *A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. Water Research*, 135, 168–186. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>
- Hayes, S., Mahony, J., Nauta, A., & Sinderen, D. Van. (2017). *Metagenomic Approaches to Assess Bacteriophages in Various Environmental Niches. Viruses*, 9(6), 1–22. <http://doi.org/10.3390/v9060127>
- Hazen, T. C., Rocha, A. M., & Techtmann, S. M. (2012). *Advances in monitoring environmental microbes. Current Opinion in Biotechnology*, 24, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.020>

- Helle, F., Brochot, E., Handala, L., Martin, E., Castelain, S., Francois, C., & Duverlie, G. (2017). *Biology of the BKPyV: An Update*. *Viruses*, 9(11), 1–18. <http://doi.org/10.3390/v9110327>
- Hellmér, M., Paxéus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., ... Norder, H. (2014). *Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6771–6781. <http://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>
- Henze, M., & Comeau, Y. (2008). *Wastewater Characterization*. In M. Henze, M. van Loosdrecht, G. Ekama, & D. Brdjanovic (Eds.), *Biological Wastewater Treatment: Principles Modelling and Design*. London: IWA Publishing. Recuperado el 27 de mayo del 2018 de [https://ocw.un-ihe.org/pluginfile.php/462/mod\\_resource/content/1/Urban\\_Drainage\\_and\\_Sewerage/5\\_Wet\\_Weather\\_and\\_Dry\\_Weather\\_Flow\\_Characterisation/DWF\\_characterization/Notes/Wastewater\\_characterization.pdf](https://ocw.un-ihe.org/pluginfile.php/462/mod_resource/content/1/Urban_Drainage_and_Sewerage/5_Wet_Weather_and_Dry_Weather_Flow_Characterisation/DWF_characterization/Notes/Wastewater_characterization.pdf)
- Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A.-C., Rehnstam-Holm, A.-S., Girones, R., & Allard, A. K. (2002). *Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, Mytilus edulis: the First Scandinavian Report*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4523–4533. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4523-4533.2002>
- Hjelmsø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., ... Schultz, A. C. (2017). *Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing*. *PLOS ONE*, 12(1), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>
- Holtz, L. R., Finkbeiner, S. R., Zhao, G., Kirkwood, C. D., Girones, R., Pipas, J. M., & Wang, D. (2009). *Klassevirus 1, a previously undescribed member of the family Picornaviridae, is globally widespread*. *Virology Journal*, 6(1), 86. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-6-86>

- Huang, D., Wang, W., Lu, Q., Zhao, J., Guo, C., Wang, H.-Y., ... Cao, W.-C. (2015). *Identification of Bufavirus-1 and Bufavirus-3 in Feces of Patients with Acute Diarrhea , China. Scientific Reports*, 5, 1–4. <http://doi.org/10.1038/srep13272>
- Iaconelli, M., Valdazo-González, B., Equestre, M., Ciccaglione, A. R., 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*, 121, 240–247. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.039>
- Ikner, L. A., Gerba, C. P., & Bright, K. R. (2012). *Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. Food and Environmental Virology*, 4(2), 41–67. <http://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>
- Illumina. (2015). *Illumina sequencing platforms*. Recuperado el 2 de junio del 2018 de <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2015). *Entradas y Salidas Internacionales*. Recuperado el 28 de mayo del 2018 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/entrada-y-salidas-internacionales/>
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2012). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. (A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz, Eds.). San Diego: Elsevier Inc.
- Jacobsen, K. H., & Wiersma, S. T. (2010). *Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. Vaccine*, 28(41), 6653–6657. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.037>
- Johansson, H., Bzhalava, D., Ekström, J., Hultin, E., Dillner, J., & Forslund, O. (2013). *Metagenomic sequencing of “HPV-negative” condylomas detects novel putative HPV types. Virology*, 440(1), 1–7. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.01.023>

- Jung, A.-V., Le Cann, P., Roig, B., Thomas, O., Baurès, E., & Thomas, M.-F. (2014). *Microbial Contamination Detection in Water Resources: Interest of Current Optical Methods, Trends and Needs in the Context of Climate Change*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 4292–4310. <http://doi.org/10.3390/ijerph110404292>
- Jung, H. J., Lee, J. K., Kim, H.-S., Choi, E. H., & Lee, H. J. (2016). *Human Parechovirus as an Important Cause of Central Nervous System Infection in Childhood*. *Open Forum Infectious Diseases*, 3, 153. <http://doi.org/10.1093/ofid/ofw172.21>
- Kai, S., Yi, M., & Prabakaran, M. (2016). *Saffold virus, an emerging human cardiovirus*. *Reviews in Medical Virology*, 27(1), 1–11. <http://doi.org/10.1002/rmv.1908>
- Kattor, J., Sincar, S., Saurab, S., Subramaniyan, S., Dhama, K., & Singh, Y. (2016). *Picobirnavirus: A Putative Emerging Threat to Humans and Animals*. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(6), 327–331. <http://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.6.327.331>
- Kelly, D., Yang, L., & Pei, Z. (2017). *A Review of the Oesophageal Microbiome in Health and Disease*. In C. B. Harwood (Ed.), *The Human Microbiome* (Vol. 44, pp. 19–35). London: Academic Press. Recuperado el 27 de mayo del 2018 de <http://doi.org/10.1016/bs.mim.2017.08.001>
- Kitajima, M., & Gerba, P. C. (2015). *Aichi Virus 1: Environmental Occurrence and Behavior*. *Pathogens*. <http://doi.org/10.3390/pathogens4020256>
- Knipe, D., & Howley, P. (Eds.). (2013). *Fields Virology* (Sixth edit). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kolde, R. (2015). *Pheatmap: Pretty Heatmaps*. Recuperado el 3 de abril del 2018 de <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/pheatmap.pdf>
- Krishnamurthy, S. R., & Wang, D. (2018). *Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses*. *Virology*,

516, 108–114.  
<http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.006>

Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H. v. d., Peñaranda, S., Oberste, M. S., ... Koopmans, M. (2011). *An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. Journal of Clinical Virology*, 51(2), 121–125. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Kunze, A., Pei, L., Elsässer, D., Niessner, R., & Seidel, M. (2015). *High performance concentration method for viruses in drinking water. Journal of Virological Methods*, 222, 132–137. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.06.007>

La Rosa, G., Fratini, M., Libera, S., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2012). *Emerging and potentially emerging viruses in water environments. Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 48(4), 397–406. [http://doi.org/10.4415/ANN\\_12\\_04\\_07](http://doi.org/10.4415/ANN_12_04_07)

Leguia, M., Loyola, S., Rios, J., Juarez, D., Guevara, C., Silva, M., ... Bausch, G. D. (2015). *Full Genomic Characterization of a Saffold Virus Isolated in Peru. Pathogens*. <http://doi.org/10.3390/pathogens4040816>

Li, L., Barry, P., Yeh, E., Glaser, C., Schnurr, D., & Delwart, E. (2009). *Identification of a novel human gammapapillomavirus species. Journal of General Virology*, 90, 2413–2417. <http://doi.org/10.1099/vir.0.012344-0>

Lion, T. (2014). *Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 441–462. <http://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., ... Law, M. (2012). *Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–11. <http://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, X., Yamamoto, D., Saito, M., Imagawa, T., Ablola, A., Tandoc, A. O., ... Oshitani, H. (2015). *Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. Journal of Clinical Virology*, 68, 83–88. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.001>
- Lizasoain, A., Tort, L. F. L., García, M., Gomez, M., Leite, J. P. G., Miagostovich, M. P., ... Victoria, M. (2015). *Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. Journal of Applied Microbiology*, 119, 859–867. <http://doi.org/10.1111/jam.12856>
- Lodder, W. J., Schijven, J. F., Rutjes, S. A., de Roda Husman, A. M., & Teunis, P. F. M. (2015). *Enterovirus and parechovirus distributions in surface water and probabilities of exposure to these viruses during water recreation. Water Research*, 75, 25–32. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.024>
- Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., Wain, J., & Pallen, M. J. (2012). *Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nature Biotechnology*, 30, 434. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2198>
- Lopman, B. A., Trivedi, T., Vicuña, Y., Costantini, V., Collins, N., Gregoricus, N., ... Cooper, P. J. (2015). *Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort : Association of Certain Norovirus Genotypes With Host FUT2 Secretor Status. Journal of Infectious Diseases*, 211, 1813–1821. <http://doi.org/10.1093/infdis/jiu672>
- Lun, J. H., Hewitt, J., Sitabkhan, A., Eden, J.-S., Enosi Tuipulotu, D., Netzler, N. E., ... White, P. A. (2018). *Emerging recombinant noroviruses identified by clinical and waste water screening. Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 50. <http://doi.org/10.1038/s41426-018-0047-8>

- Malik, Y. S., & Matthijnssens, J. (2014). *Enteric viral infection in human and animal. Virus Disease*, 25(2), 145–146. <http://doi.org/10.1007/s13337-014-0224-x>
- Mara, D., Lane, J., Scott, B., & Trouba, D. (2010). *Sanitation and Health. PLoS Medicine*, 7(11), e1000363. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000363>
- Masachessi, G., Pisano, M. B., Prez, V. E., Martínez, L. C., Michelena, J. F., Martínez-Wassaf, M., ... Réa, V. (2018). *Enteric Viruses in Surface Waters from Argentina: Molecular and Viable-Virus Detection. Applied and Environmental Microbiology*, 84(5), 1–12.
- McAllister, T. A., & Topp, E. (2012). *Role of livestock in microbiological contamination of water: Commonly the blame, but not always the source. Animal Frontiers*, 2(2), 17–27. <http://dx.doi.org/10.2527/af.2012-0039>
- McLellan, S., Fisher, J., & Newton, R. (2015). *The microbiome of urban waters. International Microbiology*, 18, 141–149. <http://doi.org/10.2436/20.1501.01.244>.
- Mehle, N., & Ravnkar, M. (2012). *Plant viruses in aqueous environment e Survival, water mediated transmission and detection. Water Research*, 46(16), 4902–4917. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.027>
- Ministerio de Salud Pública. (2017). Gaceta epidemiológica semanal No 22. Recuperado el 28 de mayo del 2018 de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/GACETA-GENERAL-SE-22.pdf>
- Myrmel, M., Lange, H., & Rimstad, E. (2015). *A 1-Year Quantitative Survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and Hepatitis E Viruses in Raw and Secondarily Treated Sewage from Two Plants in Norway. Food and Environmental Virology*, 7(3), 213–223. <http://doi.org/10.1007/s12560-015-9200-x>
- Nasri, D., Bouzlama, L., Omar, S., Saoudin, H., Bourlet, T., Aouni, M., ... Pillet, S. (2007). *Typing of Human Enterovirus by Partial Sequencing of VP2.*

*Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2370–2379.  
<http://doi.org/10.1128/JCM.00093-07>

- Ng, T., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., ... Delwart, E. (2012). *High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage*. *Journal of Virology*, 86(22), 12161–12175. <http://doi.org/10.1128/JVI.00869-12>
- Nieuwenhuijse, D. F., & Koopmans, M. P. G. (2017). *Metagenomic Sequencing for Surveillance of Food- and Waterborne Viral Diseases*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00230>
- Nix, W. A., Khetsuriani, N., Pen, S., Maher, K., Freire, M. C., Cisterna, D., ... Oberste, M. S. (2013). *Diversity of picornaviruses in rural Bolivia*. *Journal of General Virology*, 94, 2017–2028. <http://doi.org/10.1099/vir.0.053827-0>
- O'Brien, E., Munir, M., Marsh, T., Heran, M., Lesage, G., Tarabara, V. V., & Xagorarakis, I. (2017). *Diversity of DNA viruses in effluents of membrane bioreactors in Traverse City, MI (USA) and La Grande Motte (France)*. *Water Research*, 111, 338–345. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.014>
- Oberste, M. S., Maher, K., Michele, S. M., Uddin, M., & Pallansch, M. A. (2005). *Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A*. *Journal of General Virology*, 86, 445–451. <http://doi.org/10.1099/vir.0.80475-0>
- Ogilvie, L. A., & Jones, B. V. (2015). *The human gut virome: a multifaceted majority*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–12. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00918>
- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., & Saif, L. J. (2015). *Comprehensive Review of Human Sapoviruses*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 32–53. <http://doi.org/10.1128/CMR.00011-14>
- Olijve, L., Jennings, L., & Wallsa, T. (2018). *Human Parechovirus: an Increasingly Recognized Cause of Sepsis-Like Illness in Young*

- Infants. Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), 1–17.  
<http://doi.org/10.1128/CMR.00047-17>
- Osborne, C. M., Montano, A. C., Robinson, C. C., Schultz-cherry, S., & Dominguez, S. R. (2015). *Viral Gastroenteritis in Children in Colorado 2006 – 2009. Journal of Medical Virology*, 87(6), 931–939.  
<http://doi.org/10.1002/jmv.24022>
- Pacific Biosciences. (2015). *Revolutionize Genomics with SMRT® Sequencing*. Recuperado el 2 de junio del 2018 de [https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/PacBio\\_RS\\_II\\_Brochure.pdf](https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/PacBio_RS_II_Brochure.pdf)
- Pan American Health Organization. (2018). *IM Coverage*. Recuperado el 21 de mayo del 2018 de [http://ais.paho.org/imm/IM\\_JRF\\_COVERAGE-web.asp](http://ais.paho.org/imm/IM_JRF_COVERAGE-web.asp)
- Park, E., Kim, K., Abell, G., Kim, M., Roh, S., & Bae, J. (2011). *Metagenomic Analysis of the Viral Communities in Fermented Foods. Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1284–1291.  
<http://doi.org/10.1128/AEM.01859-10>
- Perera, D., Shimizu, H., Yoshida, H., Tu, P. Van, Ishiko, H., McMinn, P. C., & Cardosa, M. J. (2010). *A Comparison of the VP1 , VP2 , and VP4 Regions for Molecular Typing of Human Enteroviruses. Journal of Medical Virology*, 82, 649–657. <http://doi.org/10.1002/jmv>
- Pérez-Foguet, A., Giné-Garriga, R., & Ortego, M. (2017). *Compositional data for global monitoring: The case of drinking water and sanitation. Science of the Total Environment*, 1–12.  
<http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.220>
- Phan, T. G., da Costa, A. C., del Valle Mendoza, J., Bucardo-Rivera, F., Nordgren, J., O’Ryan, M., ... Delwart, E. (2016a). *The fecal virome of South and Central American children with diarrhea includes small circular DNA viral genomes of unknown origin. Archives of Virology*, 161(4), 959–966. <http://doi.org/10.1007/s00705-016-2756-4>

- Phan, T. G., Dreno, B., da Costa, A. C., Li, L., Orlandi, P., Deng, X., ... Delwart, E. (2016b). *A new protoparvovirus in human fecal samples and cutaneous T cell lymphomas (mycosis fungoides)*. *Virology*, 496, 299–305. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.013>
- Phan, T. G., Vo, N. P., Bonkougou, I. J. O., Kapoor, A., Barro, N., Ryan, M. O., & Kapusinszky, B. (2012). *Acute Diarrhea in West African Children: Diverse Enteric Viruses and a Novel Parvovirus Genus*. *Journal of Virology*, 86(20), 11024–11030. <http://doi.org/10.1128/JVI.01427-12>
- Pillai, S., Gopalan, V., & Lam, A. K. (2017). *Critical Reviews in Oncology / Hematology Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas*. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 116, 58–67. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.05.005>
- Prado, L., Monteiro, J., Portal, T., Costa, E., da Costa, A., Gabbay, Y., & Resque, H. (2017). *Major Article Detection and genotyping of human adenovirus and sapovirus in children with acute gastroenteritis in Belém, Pará, between 1990 and 1992: first detection of GI . 7 and GV . 2 sapoviruses in Brazil*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(5), 621–628. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0198-2017>
- Prado, T., Fumian, T. M., Miagostovich, M. P., Maria, A., & Gaspar, C. (2012). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(2), 104–109. <http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.005>
- Proenca-Modena, J., Martínez, M., Amarilla, A., Espínola, E., Galeano, M., Fariña, N., ... Arruda, E. (2013). *Viral load of human bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay*. *Epidemiology and Infection*, 141(12), 2576–2580. <http://doi.org/10.1017/S095026881300023X>

- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., & Macdonald, J. (2016). *Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator*. *Water Research*, 96, 308–326. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.042>
- Resque, H. R., Munford, V., Castilho, J. G., Schmich, H., Ramos, T., & Rácz, M. L. (2007). *Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(8), 969–974. <http://doi.org/10.1590/S0074-02762007000800012>
- Reuter, G., Pankovics, P., & Boros, Á. (2017). *Saliviruses — the first knowledge about a newly discovered human picornavirus*. *Reviews in Medical Virology*, 27(1), 1–10. <http://doi.org/10.1002/rmv.1904>
- Rodriguez-manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-casares, P., Carratala, A., Buti, M., ... Girones, R. (2010). *Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples*. *Journal of Water and Health*, 8(2), 346–355. <http://doi.org/10.2166/wh.2009.042>
- Rojas, R. (2002). Conferencia Eliminación de Mircroorganismos por diversos Procesos de Tratamiento. Recuperado el 30 de abril del 2018 de <http://www.bvsde.paho.org/bvsaar/e/fulltext/gestion/micro.pdf>
- Romani, S., Mohebbi, S. R., Khanyaghma, M., Azimzadeh, P., Bozorgi, S. M., Damavand, B., & Jadali, F. (2013). *Detection of human Bocavirus 1 , 2 and 3 from patients with acute gastroenteritis*. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench.*, 6, 1–5.
- Roossinck, M. J. (2015). *Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism*. *Virology*, 479–480, 271–277. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.041>
- Rosales, E. (2017). *Termina la construcción de Planta de Tratamiento de Aguas Residuales -PTAR- Quitumbe*. Recuperado el 9 de abril del 2018 de <http://www.aguaquito.gob.ec/?p=2934>

- Ruppé, E., Lazarevic, V., Girard, M., Mouton, W., Ferry, T., Laurent, F., & Schrenzel, J. (2017). *Clinical metagenomics of bone and joint infections: a proof of concept study*. *Scientific Reports*, 7(1), 7718. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-07546-5>
- Salvo, M., Lizasoain, A., Castells, M., Bortagaray, V., Castro, S., Colina, R., ... Victoria, M. (2018). *Human Bocavirus: Detection, Quantification and Molecular Characterization in Sewage and Surface Waters in Uruguay*. *Food and Environmental Virology*, 10(2), 193–200. <http://doi.org/10.1007/s12560-017-9334-0>
- Sánchez, G. J., Mayta, H., Pajuelo, M. J., Neira, K., Xiaofang, L., Cabrera, L., ... Group, S. W. (2017). *Epidemiology of sapovirus infections in a birth cohort in Peru*. *Clinical Infectious Diseases*. <http://doi.org/10.1093/cid/cix1103>
- Santos, N., Mendes, G. S., Silva, R. C., Pena, G. A., Rojas, M., Amorim, A. R., & Lima, D. P. (2015). *Salivirus and aichivirus A infections in children with gastroenteritis in Brazil*. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(8), 799.e1-799.e3. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.004>
- Santos, N., Peret, T., Humphrey, C., Albuquerque, M., Silva, R., Benati, F., ... Erdman, D. (2010). *Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil*. *Journal of Clinical Virology*, 48(2), 127–130. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.03.014>
- Schatz, M. C., Delcher, A. L., & Salzberg, S. L. (2010). *Assembly of large genomes using second-generation sequencing*. *Genome Research*, 20(9), 1165–1173. <http://doi.org/10.1101/gr.101360.109>
- Schiavelli, R., Bonaventura, R., Rial, M. C., Petrone, H., Pujol, G. S., Gaité, L. J., ... Freire, M. C. (2014). *First Epidemiologic Study in Argentina of the Prevalence of BK Viruria in Kidney Transplant Patients*. *Transplantation Proceedings*, 46(9), 3010–3014. <http://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.07.009>

- Schildgen, O., Mu, A., Allander, T., Mackay, I. M., Völz, S., Kupfer, B., & Simon, A. (2008). *Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections? Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 291–304. <http://doi.org/10.1128/CMR.00030-07>
- Sedmak, G., Nix, W. A., Jentzen, J., Haupt, T. E., Davis, J. P., Bhattacharyya, S., ... Oberste, M. S. (2010). *Infant Deaths Associated with Human Parechovirus Infection in Wisconsin. Clinical Infectious Diseases*, 50(3), 357–361. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1086/649863>
- Seo, H. W., Park, C., Han, K., & Chae, C. (2014). *Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2-viremic piglets after experimental PCV2 challenge. Veterinary Research*, 45(1), 13. <http://doi.org/10.1186/1297-9716-45-13>
- Singh, J., Behal, A., Singla, N., Joshi, A., Birbian, N., Singh, S., ... Batra, N. (2009). *Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. Biotechnology Journal*, 4(4), 480–494. <http://doi.org/10.1002/biot.200800201>
- Siqueira, J. A. M., Oliveira, D. de S., Carvalho, T. C. N. de, Portal, T. M., Justino, M. C. A., da Silva, L. D., ... Gabbay, Y. B. (2017). *Astrovirus infection in hospitalized children: Molecular, clinical and epidemiological features. Journal of Clinical Virology*, 94, 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.014>
- Smits, S. L., Schapendonk, C. M. E., Beek, J. van, Vennema, H., Schürch, A. C., Schipper, D., ... Koopmans, M. P. (2014). *New Viruses in Idiopathic Human Diarrhea Cases, the Netherlands. Emerging Infectious Disease Journal*, 20(7), 1218. <http://doi.org/10.3201/eid2007.140190>
- Soto, S. M. (2009). *Human migration and infectious diseases. Clinical Microbiology and Infection*, 15, 26–28. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02694.x>

- Staggemeier, R., Almeida, S. E. M., & Spilki, F. R. (2011). *Methods of virus detection in soils and sediments. Virus Reviews and Research*, 16, 16–22. <http://doi.org/10.17525/vrr.v16i1-2.50>
- Stöcker, A., Souza, B. F. de C. D., Ribeiro, T. C. M., Netto, E. M., Araujo, L. O., Corrêa, J. I., ... Drexler, J. F. (2012). *Cosavirus Infection in Persons with and without Gastroenteritis, Brazil. Emerging Infectious Disease Journal*, 18(4), 656. <http://doi.org/10.3201/eid1804.111415>
- Sulbaran, Y., Gutierrez, C. R., Marquez, B., Rojas, D., Sanchez, D., Navas, J., ... Pujol, F. H. (2010). *Hepatitis A Virus Genetic Diversity in Venezuela : Exclusive Circulation of Subgenotype IA and Evidence of Quasispecies Distribution in the Isolates. Journal of Medical Virology*, 1834(April), 1829–1834. <http://doi.org/10.1002/jmv>
- Sun, G., Xiao, J., Wang, H., Gong, C., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2014). *Efficient purification and concentration of viruses from a large body of high turbidity seawater. MethodsX*, 1, 197–206. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.09.001>
- Sun, G., Zang, Q., Gu, Y., Niu, G., Ding, C., & Zhang, P. (2016). *Viral metagenomics analysis of picobirnavirus-positive feces from children with sporadic diarrhea in China. Archives of Virology*, 161(4), 1–5. <http://doi.org/10.1007/s00705-015-2726-2>
- Swiss Institute of Bioinformatics. (2008). *Picornaviridae*. Recuperado el 13 de mayo del 2018 de <https://viralzone.expasy.org/33>
- Swiss Institute of Bioinformatics. (2010). *Papillomaviridae*. Recuperado el 13 de mayo del 2018 de <https://viralzone.expasy.org/5>
- Swiss Institute of Bioinformatics. (2015). *Astroviridae*. Recuperado el 13 de mayo del 2018 de <https://viralzone.expasy.org/27>
- Tamaki, H., Zhang, R., Angly, E., Nakamura, S., Hong, P., Yasunaga, T., ... Liu, W. (2012). *Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. Environmental Microbiology*, 14(2), 441–452. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x>

- Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T. J., & Kaiser, L. (2013). *Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases*. *Infection, Genetics and Evolution*, 14, 282–293. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016>
- Timoneda, N. (2017). *Mètodes computacionals per a la identificació de virus emergents analitzats per seqüenciació en massa en aigua i aliments* (Tesis doctoral). Universitat de Barcelona. Recuperado el 1 de abril del 2018 de <http://www.tesisenred.net/handle/10803/406955>
- Tokarz, R., Haq, S., Sameroff, S., Howie, S. R. C., & Lipkin, W. I. (2013). *Genomic analysis of coxsackieviruses A1 , A19 , A22 , enteroviruses 113 and 104 : viruses representing two clades with distinct tropism within enterovirus C*. *Journal of General Virology*, 94, 1995–2004. <http://doi.org/10.1099/vir.0.053462-0>
- Torres, C., Barrios, M., Cammarata, R., Cisterna, D., Estrada, T., Martini, S., ... Mbayed, V. (2016). *Science of the Total Environment High diversity of human polyomaviruses in environmental and clinical samples in Argentina : Detection of JC , BK , Merkel-cell , Malawi , and human 6 and 7 polyomaviruses*. *Science of The Total Environment*, 542, 192–202. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.047>
- Turnage, N. L., & Gibson, K. E. (2017). *Sampling methods for recovery of human enteric viruses from environmental surfaces*. *Journal of Virological Methods*, 248, 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.06.008>
- Väisänen, E., Fu, Y., Hedman, K., & Söderlund-Venermo, M. (2017). *Human Protoparvoviruses*. *Viruses*, 9(354), 1–13. <http://doi.org/10.3390/v9110354>
- Vecchia, A. D., Fleck, J. D., Kluge, M., Comerlato, J., Bergamaschi, B., Luz, R. B., ... Spilki, F. R. (2012). *Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, southern Brazil*. *Brazilian Journal of Biology*, 72, 839–846. <http://doi.org/10.1590/S1519-69842012000500009>

- Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, G., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., ... Lev, O. (2015). *Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro–Guayllabamba–Esmeraldas rivers. Environmental Science: Processes & Impacts*, 17, 41–53. <http://doi.org/10.1039/C4EM00394B>
- Vu, D.-L., Bosch, A., Pintó, M. R., & Guix, S. (2017). *Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. Viruses*. <http://doi.org/10.3390/v9020033>
- Vu, D.-L., Cordey, S., Brito, F., & Kaiser, L. (2016). *Novel human astroviruses: Novel human diseases? Journal of Clinical Virology*, 82, 56–63. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.004>
- Wang, H.-C., Susko, E., & Roger, A. J. (2016). *Split-specific bootstrap measures for quantifying phylogenetic stability and the influence of taxon selection. Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 114–125. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.08.017>
- Wardrop, N. A., Hill, A. G., Dzodzomenyo, M., Aryeetey, G., & Wright, J. A. (2018). *Livestock ownership and microbial contamination of drinking-water: Evidence from nationally representative household surveys in Ghana, Nepal and Bangladesh. International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(1), 33–40. <http://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.09.014>
- Waterboer, T., Abeni, D., Sampogna, F., Rother, A., Masini, C., Sehr, P., ... Pawlita, M. (2008). *Serological association of beta and gamma human papillomaviruses with squamous cell carcinoma of the skin. British Journal of Dermatology*, 159(2), 457–459. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08621.x>
- World Health Organization and United Nations International Children's Emergency Fund. (2017a). *Ecuador- coverage of drinking water, sanitation and hygiene*. Recuperado el 9 de abril del 2018 de <https://washdata.org/data#!/dashboard/1392>

World Health Organization and United Nations International Children's Emergency Fund. (2017b). *Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene: 2017 update and SDG baselines*. Geneva: World Health Organization (WHO) and the United Nations Children's Fund (UNICEF).

World Health Organization. (2001). *Guidelines , Standards and Health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. (L. Fewtrell & J. Bartram, Eds.). London: IWA Publishing. Recuperado el 10 de abril del 2018 de <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42442/924154533X.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

World Health Organization. (2003). *Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation*. Recuperado el 7 de junio del 2018 de [http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO\\_V-B\\_03.03\\_eng.pdf](http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/WHO_V-B_03.03_eng.pdf)

World Health Organization. (2010). *Safe Management of Shellfish and Harvest Waters*. London: IWA Publishing. Recuperado el 7 de mayo del 2018 de [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44101/9789241563826\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44101/9789241563826_eng.pdf?sequence=1)

World Health Organization. (2011). *Guidelines for Drinking-water Quality (Fourth Edi)*. Geneva: WHO Press. Recuperado el 7 de mayo del 2018 de [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151\\_eng.pdf;jsessionid=398D7DC5A169546F2E8771318CEABCF6?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf;jsessionid=398D7DC5A169546F2E8771318CEABCF6?sequence=1)

World Health Organization. (2016). *Achievement of the Health-related Millennium Development Goals in the Western Pacific Region 2016 : Transitioning to the Sustainable Development Goals*. Recuperado el 7 de abril del 2018 de <http://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/13441/WPR-2016-DHS-011-en.pdf>

- World Health Organization. (2017a). *Potable reuse: Guidance for producing safe drinking-water*. Geneva: World Health Organization. Recuperado el 2 de abril del 2018 de <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258715/9789241512770-eng.pdf;jsessionid=5617F97FC2AB82FE1A6E6E8CF62CDF81?sequence=1>
- World Health Organization. (2017b). *UN-Water global analysis and assessment of sanitation and drinking-water (GLASS) 2017 report: financing universal water, sanitation and hygiene under the sustainable development goals*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2018). *Drinking water*. Recuperado el 5 de abril <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en/>
- Wu, J., Rodriguez, R. A., Stewart, J. R., & Sobsey, M. D. (2011). *A simple and novel method for recovering adenovirus 41 in small volumes of source water*. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1332–1340. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04987.x>
- Zalona, A., Lopes, G., Schrago, C., Gonçalves, R., Zalis, M., & Varella, R. (2011). *Molecular Characterization of BK Polyomavirus Subtypes in Renal Transplant Recipients in Brazil*. *Journal of Medical Virology*, 83, 1401–1405. <http://doi.org/10.1002/jmv.22117>
- Zhang, W., Li, L., Deng, X., Kapusinszky, B., & Delwart, E. (2014). *What's for dinner?: viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken*. *Virology*, 0, 303–310. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.025>

## ANEXOS

## Anexo 1

### Lista de abreviaturas empleadas en este trabajo

<b>AAV:</b>	Virus adeno-asociados
<b>BKPyV:</b>	Poliomavirus humano BK
<b>BRD:</b>	Enfermedad respiratoria bovina
<b>BuV:</b>	Bufavirus
<b>CCS:</b>	Células escamosas
<b>CV:</b>	Coxsackievirus
<b>DMQ:</b>	Distrito Metropolitano de Quito
<b>dsDNA:</b>	ADN bicatenario
<b>E-25:</b>	Echovirus 25
<b>EPMAPS:</b>	Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento de Quito
<b>EV:</b>	Enterovirus
<b>HAdV:</b>	Adenovirus humano
<b>HAstV:</b>	Astrovirus humano
<b>HBoV:</b>	Bocavirus humano
<b>ICTV:</b>	<i>International Committee of Viruses</i> (Comité Internacional de Virus)
<b>INEC:</b>	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
<b>MastV:</b>	Mamastrovirus
<b>NCBI:</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
<b>NGS:</b>	<i>Next Generation Sequencing</i> (Secuenciación de próxima generación)
<b>NoV:</b>	Virus de tipo Norwalk
<b>PAHO:</b>	<i>Pan American Health Organization</i> (Organización Panamericana de la Salud)
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PMWS:</b>	Síndrome de desmedro multisistémico posdestete
<b>PTAR:</b>	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
<b>PV:</b>	Poliovirus

<b>qPCR:</b>	PCR cuantitativa
<b>SAFV:</b>	Virus Scaffold
<b>SaV:</b>	Sapporo virus
<b>SIB:</b>	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i> (Instituto Suizo de Bioinformática)
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central
<b>ssDNA:</b>	ADN monocatenario
<b>TDS:</b>	<i>Total Dissolved Solids</i> (Sólidos disueltos totales)
<b>UNICEF:</b>	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i> (Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia)
<b>VP:</b>	<i>Viral protein</i> (Proteína viral)
<b>VPH:</b>	Virus del papiloma humano
<b>WHO:</b>	<i>World Health Organization</i> (Organización Mundial de la Salud)

Anexo 2

El presente artículo científico se adaptó con base en los resultados de este trabajo y se titula:

***Quito's virome: metagenomic analysis of viral diversity  
in urban streams of Ecuador's capital city***

Laura Guerrero-Latorre, **Brigette Romero**, Edison Bonifaz, Natalia Timoneda, Marta Rusiñol, Rosina Girones, Blanca Rios-Touma.

Manuscrito publicado en la revista *Science of the Total Environment*.



## Quito's virome: Metagenomic analysis of viral diversity in urban streams of Ecuador's capital city

Laura Guerrero-Latorre <sup>a,\*</sup>, Brigette Romero <sup>a</sup>, Edison Bonifaz <sup>a</sup>, Natalia Timoneda <sup>b</sup>, Marta Rusiñol <sup>b</sup>, Rosina Girones <sup>b</sup>, Blanca Rios-Touma <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Grupo de investigación Biodiversidad, Medio Ambiente y Salud (BIOMAS), Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas (FICA), Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Américas, Quito, Ecuador

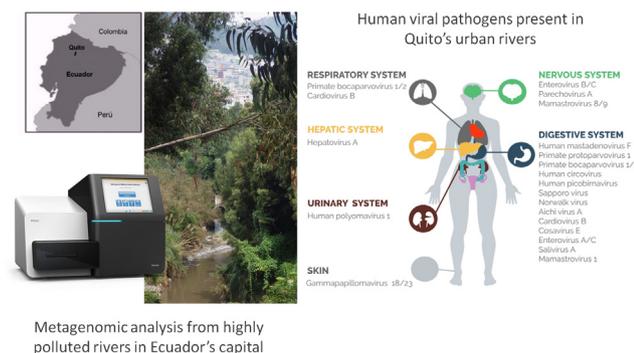
<sup>b</sup> Laboratory of Virus Contaminants of Water and Food, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>c</sup> Grupo de investigación Biodiversidad, Medio Ambiente y Salud (BIOMAS), Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas (FICA), Ingeniería Ambiental, Universidad de las Américas, Quito, Ecuador

### HIGHLIGHTS

- First viral metagenomic study of highly impacted surface waters in Latin America
- The study describes human viral pathogens present in urban rivers of Quito.
- Several viral families detected containing emergent species firstly reported in Ecuador.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 May 2018

Received in revised form 16 July 2018

Accepted 16 July 2018

Available online xxx

Editor: Frederic Coulon

#### Keywords:

Urban river

Virome

Human viruses

Public health

Surface water quality

### ABSTRACT

In Quito, the microbiological contamination of surface water represents a public health problem, mainly due to the lack of sewage treatment from urban wastewater. Contaminated water contributes to the transmission of many enteric pathogens through direct consumption, agricultural and recreational use. Among the different pathogens present in urban discharges, viruses play an important role on disease, being causes of gastroenteritis, hepatitis, meningitis, respiratory infections, among others.

This study analyzes the presence of viruses in highly impacted surface waters of urban rivers using next-generation sequencing techniques. Three representative locations of urban rivers, receiving the main discharges from Quito sewerage system, were selected. Water samples of 500 mL were concentrated by skimmed-milk flocculation method and the viral nucleic acid was extracted and processed for high throughput sequencing using Illumina MiSeq.

The results yielded very relevant data of circulating viruses in the capital of Ecuador. A total of 29 viral families were obtained, of which 26 species were associated with infections in humans. Among the 26 species identified, several were related to gastroenteritis: Human Mastadenovirus F, Buvavirus, Sapporovirus, Norwalk virus and Mammastrovirus 1. Also detected were: Gammapapillomavirus associated with skin infections, Polyomavirus 1 related to cases of kidney damage, Parechovirus A described as cause of neonatal sepsis with neurological affectations and Hepatovirus A, the etiologic agent of Hepatitis A. Other emergent viruses identified, of which its pathogenicity remains to be fully clarified, were: Bocavirus, Circovirus, Aichi Virus and Cosavirus.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [laura.guerrero.latorre@gmail.com](mailto:laura.guerrero.latorre@gmail.com) (L. Guerrero-Latorre), [bmromero@udlanet.ec](mailto:bmromero@udlanet.ec) (B. Romero), [ebonifaz@udlanet.ec](mailto:ebonifaz@udlanet.ec) (E. Bonifaz), [mrusinol@ub.edu](mailto:mrusinol@ub.edu) (M. Rusiñol), [rgirones@ub.edu](mailto:rgirones@ub.edu) (R. Girones), [blanca.rios@udla.edu.ec](mailto:blanca.rios@udla.edu.ec) (B. Rios-Touma).

The wide diversity of species detected through metagenomics gives us key information about the public health risks present in the urban rivers of Quito. In addition, this study describes for the first time the presence of important infectious agents not previously reported in Ecuador and with very little reports in Latin America.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Next generation sequencing studies have revealed the widespread of viruses in air, soil and water ecosystems, pointing out that viruses are the most abundant biological entities on Earth (Rastrojo and Alcamí, 2017; Rosario et al., 2018; Williamson et al., 2017). Although they are considered the simplest life forms, viral agents play an important role in human bodies as a part of our microbiome and being involved in acute infections and chronic diseases (Zárate et al., 2018). The interaction of humans with the surrounding environment (habitat, sanitation infrastructures, diet, leisure practices, etc.) has an impact on their viral exposure and at the same time, human viral excreta have also an impact on the environment polluting natural streams. Important viral pathogens causing diarrhoea, hepatitis, meningitis or associated to cancer are reported to be excreted by infected people during several days or even months, disseminating viruses in sanitation infrastructures (Rusiñol and Girones, 2017). Due to the representativeness of a specific human population, sewage, that collects excreta of thousand city's inhabitants, have been proposed as a tool for surveillance and monitoring of enteric viral pathogens among populations (Fernandez-Cassi et al., 2017b).

Latin America sanitation systems have improved last decades, however sewerage coverage is low, and <30% of wastewater is treated, causing severe microbial contamination in natural streams and increasing health risk for downstream populations (UNEP, 2016).

Quito is an example of a rapidly growing city (Ecuadorian human development index 0.789) but it still has very poor sanitation systems. Quito is the capital city of Ecuador, with a reported population of 2,597,989 inhabitants in 2016, expecting an increase of up to 7% by 2020 (INEC, 2016). The city is located 2800 m.a.s.l. and is crossed by several rivers that collect the urban sewage (93% coverage) without any treatment. As a big city, Quito produces 171 million m<sup>3</sup> of sewage per year at a mean flow of discharge 5413 L/s (EMAPS, 2016). Non-treated Quito wastewater contributes to the largest Ecuador's watershed, Esmeraldas river basin, that before ending up in the Pacific Ocean becomes the source of drinking water of Esmeraldas city (with approx. 160,000 inhabitants). It has been calculated that around 1% of the total Quito wastewater discharge impacts into the drinking water system source of Esmeraldas city (Voloshenko-Rossin et al., 2015).

Recent studies have used metagenomic platforms to describe viral pathogens in clinical samples from Peru, Chile, and Brazil. Two studies from Peruvian diarrheic children have shown the presence of circular Rep-encoding ssDNA (CRESS-DNA) viruses although the clinical association remains unclear (Altan et al., 2017; Phan et al., 2016). Also, studies in Brazil used metagenomic methods to analyze viral coinfections in Zika infected patients and revealed the presence of chikungunya virus and hepatitis A virus in different cases (Conteville et al., 2018; Sardi et al., 2016). Another study in Chile analysing the viral diversity in nasopharyngeal aspirates from acute lower respiratory tract infections, pointed out the extended presence of cyclovirus, anellovirus and adeno-associated viruses in these clinical samples (Phan et al., 2014).

Next generation sequencing of the viral population present in streams of Quito can give epidemiological data about waterborne viruses circulating among the capital's population and could identify reference pathogens and emerging strains. This information would also point out the importance of adapting treatment wastewater treatment systems and would enable the evaluation of potential health risks associated with using the downstream as a drinking water source.

The information obtained from these metagenomic studies has contributed to public health data, as many enteric diseases aetiologies are not usually reported. There are few studies describing enteric viruses among Ecuador's population but these have only reported Norovirus and Rotavirus prevalence in small populations (Gastañaduy et al., 2015; Vasco et al., 2014) and a small report about prevalence of Human Papillomavirus among women attended in a hospital of Southern Ecuador (Dalgo Aguilar et al., 2017). There are currently no reports on the presence, especially in the aquatic environment, about the presence of some and emerging enteric viruses related to human disease in the families *Picornaviridae*, *Astroviridae*, *Circoviridae*, and *Parvoviridae*.

In this study, we describe for the first time, the viral diversity in surface waters highly polluted by sewage discharge in an important Latin American city.

## 2. Methods

### 2.1. Sampling

In June 2017, during the dry season, 1 L of surface water was collected in three locations along urban streams of Quito. The water samples were taken with sterile bottles collecting in the middle of the riverbed at an average height of 50 cm (average river depth of 1.5 m). The location of the selected points was aimed to be representative of south (M1), centre (M2) and north (M3) parts of the city and its sewage contributions. The population density, the three sampling points located in the three principal sewage systems of the city and its main discharging points along the urban rivers Machangara and Monjas are shown in Fig. 1.

### 2.2. Concentration method and microbiological indicators analysis

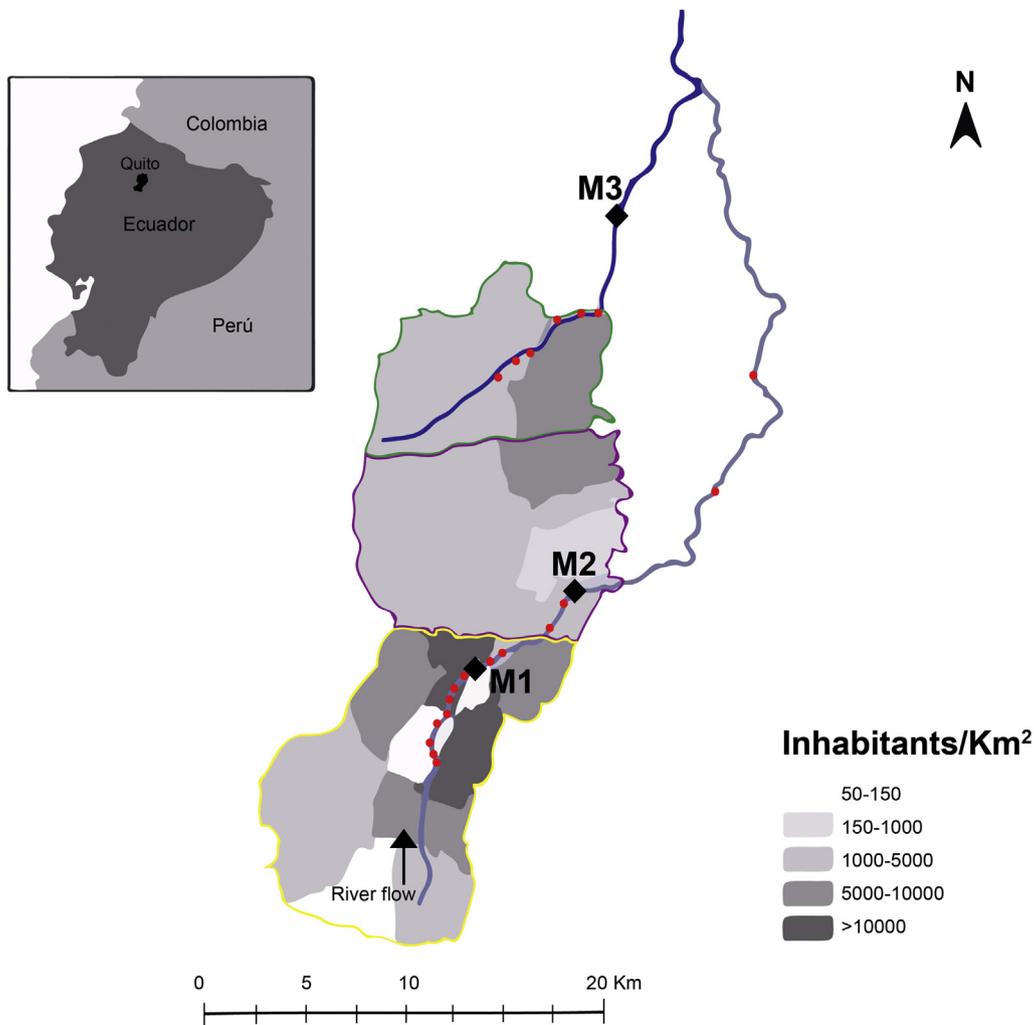
A protocol for raw sewage viral concentration previously described was chosen for Quito urban rivers, as they are more similar to sewage matrices than freshwater. Collected water was concentrated for viral analysis using an adapted Skimmed Milk Flocculation using 500 mL of water (Fernandez-Cassi et al., 2017b). Briefly, the sample was preconditioned at pH 3.5 and conductivity above 1.5 mS/cm<sup>2</sup>. Then, 5 mL of pre-flocculated skimmed milk solution were added. After 8 h of stirring, flocks were centrifuged at 8000 ×g for 40 min, and the pellet was suspended in 4 mL of phosphate buffer. The viral concentrate was kept at −80 °C until further use. Viral concentrates were used to analyze Human Adenovirus concentration by qPCR as a microbial indicator of human faecal contamination (Hernroth et al., 2002).

Additionally, *Escherichia coli* were quantified in each sample as faecal indicator bacteria (FIB) using serial dilutions on chromogenic agar (Chromocult, Merck).

### 2.3. Free DNA removal, nucleic acid extraction, library preparation and sequencing

Concentrates were firstly filtered through a 0.45-µm filter (Millipore) to remove bacterium-sized particles. Afterwards, filtered samples were processed for metagenomic analysis following previously described procedures (Fernandez-Cassi et al., 2017a).

DNase treatment was applied to reduce free-DNA usually coming from great size genomes. For that purpose, 300 µL of each filtered concentrates were treated with 160 U of Turbo DNase Ambion™ (Thermo



**Fig. 1.** Sampling locations along Quito. Urban rivers (blue) collecting all sewage discharges (red points) are represented in the map. M1 was collected in south district (yellow), M2 was collected in center district (pink) and M3 was collected after north district (green) of Quito. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fisher Scientific, Massachusetts, USA) for 1 h at 37 °C to remove free DNA, then inactivated by incubating 10 min at 75 °C and centrifuged at 10,000 ×g for 1.5 min. Supernatants were kept at 4 °C.

Then, 280 µL of DNase treated sample was extracted using Qiagen RNA Viral Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) without the RNA carrier. Nucleic acids of each sample were eluted using 60 µL of AVE buffer from the same kit used for extraction.

In order to amplify DNA and RNA viruses, samples were retrotranscribed using random nonamer. Briefly, RNA templates were reverse transcribed using SuperScript III® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) Life Technologies and Primer A, which contains a 17-nucleotide-specific sequence followed by 9 random nucleotides for random priming (5'-GTTTCCAGTCACGATANNNNNNNNN'-3). A second cDNA strand was constructed using Sequenase 2.0 (USB/Affymetrix, Cleveland, OH, USA). To obtain sufficient DNA for library preparation, a PCR amplification step using Primer B (5'-GTTTCCAGTCACGATA'-3) and AmpliTaqGold (Life Technologies, Austin, Texas, USA) was performed. After 10 min at 95 °C to activate DNA polymerase, the following PCR programme was used: 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 40 °C, and 30 s at 50 °C with a final step of 60 s at 72 °C. PCR products were cleaned and concentrated in a small volume (15 µL) using the Zymo DNA clean and concentrator (Zymo research, USA). Amplified DNA samples were quantified using Qubit 2.0 (Life Technologies, Oregon, USA). The efficiency of the NA extraction and PCR amplification is

controlled by running a gel electrophoresis to ensure a high quality and correct DNA concentration that has to overcome 1 µg/µL for library preparation.

Finally, libraries were constructed using a Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina Inc) according to the manufacturer's instructions. Samples were sequenced on Illumina MiSeq 2 × 250 bp and 2 × 300 bp, producing paired end reads.

#### 2.4. Bioinformatic pipeline and quality filtering

The quality of raw and clean read sequences was assessed using the FASTX-Toolkit software, version 0.0.14 (Hannon Lab, <http://www.hannonlab.org>). Read sequences were cleaned and low complexity sequences discarded following previous protocols (Fernandez-Cassi et al., 2017a). Virome reads were assembled based on 90% identity over a minimum of 50% of the read length using CLC Genomics Workbench 4.4 (CLC bio USA, Cambridge, MA), and the resulting contig spectra were used as the primary input for the index.

Richness ratios were calculated using the Catchall software, version 4.0 (Allen et al., 2013). Of the models included in the package, the non-parametric model Chao1 was chosen, which was the model that provided the best results for the datasets. Heatmaps were generated using ggplot2 R graphics library (Kohde, 2015).

## 2.5. Viral description and typification analysis

Afterwards, contigs longer than 100 bp were queried for sequence similarity using BLASTN and BLASTX (Altschul et al., 1990) against the NCBI viral complete genomes database (Brister et al., 2015), the viral division from GenBank nucleotide database (Benson et al., 2017), and the viral protein sequences from UniProt (UniProt Consortium 2015, [ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current\\_release](ftp://ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release)). The species nomenclature and classification were performed according to the NCBI Taxonomy database standards. High-scoring pairs (HSPs) considered for taxonomical assessment had an *E*-value of 10<sup>-5</sup> and minimum length of 100 bp. Based on the best BLAST result and 90% coverage cut-off, each sequence was classified into its likely taxonomic group.

Finally, viral sequences matching human viral species were analysed for typification when contigs were located in the typification regions established for this purpose due to its high genomic variability. The viral role on disease from the identified species was assessed and discussed based on the existing literature.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Microbial contamination indicators

Three locations sampled along Quito rivers were highly impacted by microbial pollutants. Faecal indicator bacteria (FIB) values in M1, M2 and M3 locations exceeded the *E. coli* concentrations permitted for wastewater discharging effluents in natural water bodies (max. 2E +04 ufc *E. coli*/L) (Table 1) established by the Ecuadorian Ministry of Environment (MAE, 2015). Human Adenovirus, used as an indicator of human faecal contamination, was present in high and increasing concentrations along the riverflow, ranging from 6.2E+04, up to 8.22E +05 HAdV GC/L.

### 3.2. Metagenomic data

The 3 libraries analysed by MiSeq platform gave between 2.5 and 3.4 million sequences in each sample (Table 2). After cleaning and assembling by CLC the number of contigs obtained in M1, M2 and M3 were 105,311, 91,245 and 36,275, respectively. From those, the mean percentage which was assigned to any taxonomic viral family was 2.2%. Richness values, parameter that indicates the abundance and diversity of species detected per sample, were 580.8, 391.1 and 321.9 for M1, M2 and M3 respectively.

### 3.3. Viral families

Heatmap represented in Fig. 2 shows number of species from each viral family detected with at least 90% of identity towards the NCBI-complete genome database. A total of 29 viral families and 669 species matched with >90% identity towards complete viral genome databases. *Siphoviridae*, *Myoviridae* and *Podoviridae* were the most detected families, as previously reported in other viral sewage metagenomic studies (Cantalupo et al., 2011; Fernandez-Cassi et al., 2017b; Tamaki et al., 2012).

From all assembled contigs (232831), 5262 matched putative viral sequences (2.3%). Among viral sequences a 87,9% (4630 contigs) was assigned to species infecting known hosts (Fig. 3). From those contigs, 2624 were viruses infecting prokaryote (60,18%), 798 were viruses

infecting plants (18,3%), 400 were viruses infecting humans (9,17%), 338 were viruses infecting other vertebrate animals (7,75%), followed that a short number of invertebrate, prokaryotes and fungi viruses (3,03%, 1,47%, 0,09% respectively) (Table 2).

### 3.4. Human viral pathogens

Regarding potentially pathogenic humans viruses, 27 different pathogenic viral species included in 9 different families were detected (Table 3).

Human Mastadenovirus F (until 2013 assigned as Human adenovirus F) was detected in all samples, as expected because its previously reported ubiquity worldwide, being used as a human faecal indicator in several studies (Rames et al., 2016). Moreover, Human Mastadenovirus F includes human adenovirus (HAdV) 40 and 41 and are known to be one of the main causes of gastroenteritis in children worldwide (Brown et al., 2016; Osborne et al., 2015). However, there is not published data reporting gastroenteritis cases caused by adenovirus in Ecuador. Actually, we have detected high concentrations of Human Adenovirus in the three samples previously to metagenomic analysis, using it as a human faecal indicator (mean value 3,42E+05 GC/L).

Human polyomavirus 1 (also known as BKPyV) was detected only in M1. Infection with Human polyomavirus has been associated with diseases of the urinary tract including hemorrhagic cystitis and ureteral stenosis, especially in immunosuppressed patients (Helle et al., 2017). Its presence in the environment has been previously reported in Europe due to its capacity to cause lifelong chronic infections (Bofill-Mas et al., 2000). Regarding Latin America it has been only reported in Argentina and Brazil among kidney transplant recipients (Schiavelli et al., 2014; Zalona et al., 2011).

Gamapapillomavirus were detected in M2 sample, corresponding with central area of Quito. This genus of papillomavirus, infecting only humans, has been associated to skin infections (Li et al., 2009). The species matched correspond to a recently described papillomaviruses in Argentina and Sweden related to skin lesions (Chouhy et al., 2013; Johansson et al., 2013). Identities from the two contigs detected were the lowest reported towards databases (73 and 78%), indicating that genomes found in Quito could be a new HPV type (de Villiers et al., 2004). However, its presence was confirmed by nested-PCR using previously described primers set for HPV (Forslund et al., 1999).

Primate protoparvovirus 1, Primate bocaparvovirus 1 and 3 were detected in all samples analysed by several contigs and high identities. Primate protoparvovirus 1 specie, consists of three strains of bufavirus (bufavirus 1a, 1b and 2), which were identified initially by deep sequencing in childhood diarrhoea cases from Burkina Faso in 2012 (Phan et al., 2012). Bufavirus has been reported in sporadic human cases of diarrhoea in Tunisia, Bhutan, Finland, China and the Netherlands (Huang et al., 2015). Primate bocaparvovirus 1 and 3 include gorilla and human viruses. Its presence was firstly found in nasopharyngeal sample, so it was associated to respiratory infection (Allander et al., 2005). However, their role on gastrointestinal disease is still unclear as its prevalence is similar between patients with symptoms and healthy controls in most studies and double-infections caused by other viral agents are frequently seen (Ong et al., 2016). More recently, other types of human bocavirus have been associated to diarrhoea symptoms, confirming its enteric replication and spread via feces (Guido et al., 2016). Regarding its circulation in Latin America, many countries have reported its presence previously including Argentina, Mexico, Uruguay, Paraguay and Brazil in stool samples from acute gastroenteritis patients and sewage samples (Adamo, 2017; Martínez et al., 2015; Proenca-Modena et al., 2013; Salvo et al., 2018; Santos et al., 2010).

Two species related to *Circoviridae* family were detected in all samples analysed by multiple contigs. Circovirus infect several species of vertebrates although only the Porcine Circovirus 2 cause disease, the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) which affects

**Table 1**  
Sample characteristics and microbial indicators.

Location	Date	pH	Cond (µS)	TDS (mg/L)	E.coli (ufc/L)	HAdV (GC/L)
M1	15/5/17	7,99	587	293	8,48E+06	6,20E+04
M2		8,23	596	298	7,21E+06	1,42E+05
M3		8	557	279	5,30E+06	8,22E+05

**Table 2**  
Genomic characteristics per sample. Composition of the total viromes as determined by similarity to known viral sequences.

	M1	M2	M3	Total
No. of nucleotides obtained MiSeq	777,067,620	1,044,712,606	734,755,448	2,556,535,674
No. of sequences obtained MiSeq	2,581,620	3,470,806	2,441,048	8,493,474
No. of assembled contigs	105,311	91,245	36,275	232,831
Mean contig length (min-max)	538,72 (200–15.975)	475,82 (200–5.524)	459,57 (200–6.695)	
Richness estimated value (SE)	580,8 (45,9)	391,1 (39,9)	321,9 (42,3)	
No. Putative viral sequences (% from total contigs)	2,943 (2,79%)	1,574 (1,7%)	745 (2,05%)	5262 (2,3%)
No. viral sequences with known host (% assigned)		4360 (87,9%)		
Human		400 (9,2%)		
Animal vertebrates (no human)		338 (7,6%)		
Animal invertebrates		132 (3%)		
Plants		798 (18,3%)		
Fungi		4 (0,1%)		
Procariota		2624 (60,2%)		
Protist		64 (1,5%)		

growth rate and produces systemic inflammatory lesions (Delwart and Li, 2011). Sequences matching Human Circovirus VS6600022 were highly related to a sequence obtained in diarrhoea samples from patients in the Netherlands with not identified aetiology (Smits et al., 2014). Another group of contigs matched with 99% identity a human circo-like sequence detected in Peruvian children with unexplained diarrhoea. The virus discovered in Peru was distantly related to the *Circoviridae* family and authors referred to it as pecoviruses (Peruvian stool-associated circo-like viruses) (Phan et al., 2016).

Three other contigs matched towards a Human Picobirnavirus recently detected in 3 years old children with idiopathic diarrhoea from China by metagenomic analysis (Sun et al., 2016). Recent studies however, suggest that picobirnavirus could be a bacteriophage (Krishnamurthy and Wang, 2018).

*Caliciviridae*, one of the most important families of viruses causing diarrhoea worldwide, was present by matching 72 contigs with Sapporo virus and Norwalk virus species. Both species indistinguishably cause gastrointestinal symptoms including diarrhoea and vomiting (Oka et al., 2015).

Furthermore, a great group of species belonging to *Picornaviridae* family were detected as well in Quito. Firstly, Aichi virus A, a highly widespread waterborne virus that seems to play a role causing gastroenteritis (Kitajima and Gerba, 2015). Aichi virus, firstly described in Japan in 1989, has been detected in many areas of the world, but regarding Latin America, only in Brazil from children with gastroenteritis and in sewage samples from Venezuela and Uruguay (Alcalá et al., 2010; Burutarán et al., 2016; Santos et al., 2010).

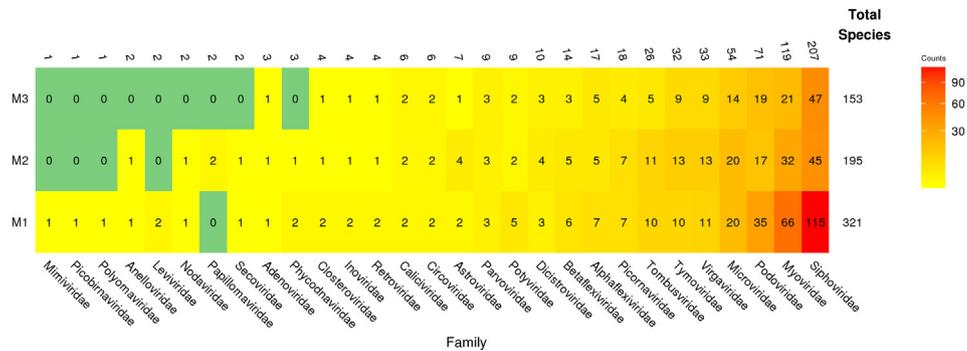
Scaffold virus (SAFV), a member of *Cardiovirus B* specie, was detected in one sample with a high genomic similarity (identity 97%) to a Peruvian strain isolated from a 2 year old child in 2012 (Leguia et al., 2015). SAFVs have been associated to respiratory and gastrointestinal infections and are present in many populations studied around the

world including Peru, Brazil and Bolivia (Drexler et al., 2008; Leguia et al., 2015; Nix et al., 2013). Cosavirus A and E, infecting humans, were detected in Quito samples. Human cosavirus were firstly described in 2008 among south asian children and have been highly detected in the feces of symptomatic and asymptomatic subjects, being unclear its role in human enteric disease (Stöcker et al., 2012; Tapparel et al., 2013).

Enteroviruses, important members of *Picornaviridae* family, were also detected in all samples analysed. Among the three human enterovirus species found, Enterovirus C was the most detected, however non poliovirus species were found, unexpected because attenuated poliovirus strains are usually detected where immunization takes places (WHO, 2003). Hepatovirus A (until 2014 assigned as Hepatitis A virus) was detected in one sample. The strain detected is probably a wild strain, because there are not immunization campaigns implemented in Ecuador for Hepatovirus A, as it is considered a intermedium endemic country (Jacobsen and Wiersma, 2010).

Parechovirus A (until 2014 assigned as Human Parechovirus) was detected in all samples analysed. Although most of the infections as for the enterovirus are subclinical, these viruses may affect mainly young children causing a sepsis-like illness that can lead to seizures or significant neurological impairment (Olijve et al., 2017).

*Mamastrovirus* genera associated to human disease is subdivided into four divergent species: *MastV 1*, *MastV 6*, *MastV 8* and *MastV 9*. In Quito the highest number of contigs reported were associated to *MastV 1* (classical human astrovirus), expected as *MastV 1* is the most common specie of Mamastrovirus found, especially in children (Vu et al., 2017). Although the pathogenic *MastV 6* role in human health has not been clearly demonstrated, 10 sequences were detected firstly in Ecuador. The first description of *MastV 6* in Latin American was first reported in 2011 in children presenting acute diarrhoea (Xavier et al., 2015) and it has also been described in sewage samples from Uruguay



**Fig. 2.** Heatmap representing the abundance of viral families in the 3 city sites analysed (M1: south, M2: center, M3: north). The top row indicates the count sums of viral species classified by 29 families and the right column correspond to the count sums of viral species based on each sample. Data spanned from green (not detected) to red (high relative abundance), as illustrated by the colour scale. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

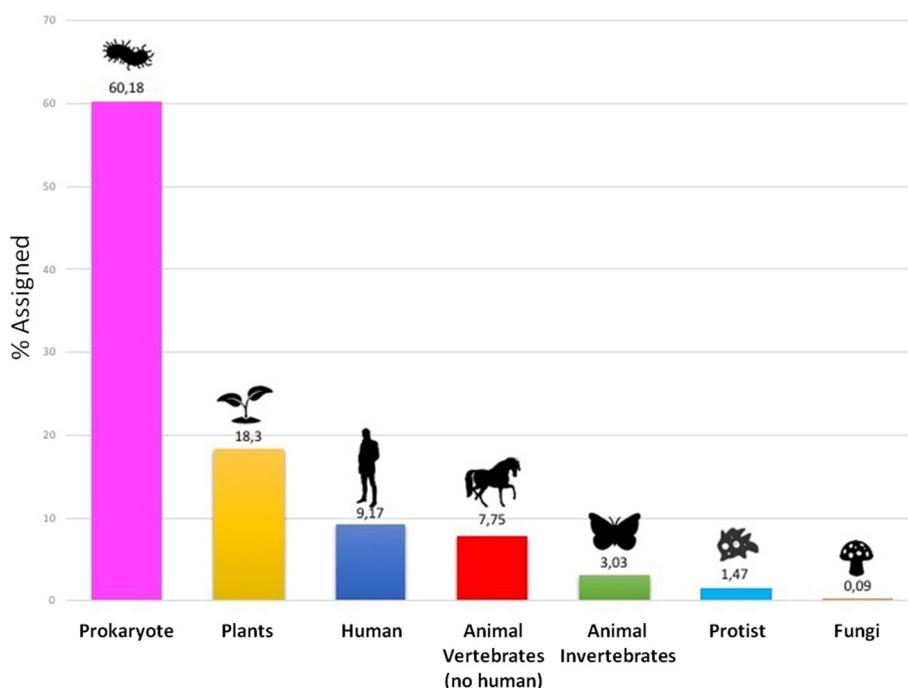


Fig. 3. Diagram representing relative abundance (%) of viral hosts from viral species detected in all samples analysed.

(Lizasoain et al., 2015). MAsTV 8 and MastV 9, viruses isolated in children presenting non-polio acute flaccid paralysis or encephalitis (Vu et al., 2016), were also detected. This is the first evidence of those strains in Latin America.

Finally, any specie of *Reoviridae* family was detected in an endemic area of rotavirus maybe due to its low prevalence or seasonality. Although Rotavirus vaccination program established in 2007 in Ecuador reached the 100% coverage during 2010–2012, in the last years the immunization program has reduced significantly its coverage, and it

dropped to 80% in 2016 (PAHO, 2018). Other metagenomic studies failed to detect rotavirus in endemic areas (Ng et al., 2012).

### 3.5. Typification of viral human species

In order to classify human viruses found into genotypes, we analysed viral contigs located into the typifying regions described for each viral specie (Table 4). This approach should also be considered as viruses can only be classified by genotype if we study

Table 3  
Potentially pathogenic human viral families and species detected in Quito samples.

Viral family	Viral species	Sample			Total number of sequences	Maximum length	Maximum homology	
		M1	M2	M3				
<i>Adenoviridae</i>	Human mastadenovirus F	1	1	3	5	706	100%	
<i>Polyomaviridae</i>	Human polyomavirus 1	2	0	0	2	822	99%	
<i>Papillomaviridae</i>	Gammmapapillomavirus 18	0	1	0	1	365	73%	
	Gammmapapillomavirus 23	0	1	0	1	849	78%	
<i>Parvoviridae</i>	Primate protoparvovirus 1	1	2	1	4	1147	100%	
	Primate bocaparvovirus 1	5	3	2	10	1333	100%	
	Primate bocaparvovirus 2	1	3	2	6	840	100%	
<i>Circoviridae</i>	Human circovirus	2	4	6	12	1119	99%	
	VS6600022							
	Circovirus like	2	3	4	9	795	99%	
<i>Picobirnaviridae</i>	Human picobirnavirus	3	0	0	3	874	98%	
<i>Caliciviridae</i>	Sapporo virus	18	9	1	28	1154	98%	
	Norwalk virus	21	20	3	44	1191	99%	
<i>Picornaviridae</i>	Aichivirus A	0	6	0	6	581	98%	
	Cardiovirus B	1	0	0	1	636	97%	
	Cosavirus A	0	3	0	3	602	88%	
	Cosavirus E	0	0	1	1	325	91%	
	Enterovirus A	1	0	3	4	525	91%	
	Enterovirus B	3	1	0	4	622	89%	
	Enterovirus C	22	23	7	52	1348	97%	
	Hepatovirus A	2	0	0	2	588	99%	
	Parechovirus A	2	2	1	5	805	91%	
	Salivirus A	2	8	0	10	1123	97%	
	<i>Astroviridae</i>	Mamastrovirus 1	29	26	7	62	3415	99%
		Mamastrovirus 6	6	4	0	10	2046	99%
		Mamastrovirus 8	0	2	0	2	411	97%
Mamastrovirus 9		0	2	0	2	734	99%	

**Table 4**

Typification analysis of human viral species. Genotype, type or serotypes are listed from contigs located into the typing region determined for each viral specie.

Family Specie	% typified contigs	Typing region	Position	Length	Blast identity (%)	Acc. Number	Genotype and subtype
<i>Adenoviridae</i>							
Human mastadenovirus F	40% (2/5)	Hexon protein	<b>17643-20414</b> <sup>a</sup>				
Contig_56367			19053-19750	698	99	<a href="#">KU162869.1</a>	Human adenovirus F serotype 40
Contig_19441			18990-19217	227	99	<a href="#">KY316164.1</a>	Human adenovirus F serotype 41
<i>Papillomaviridae</i>							
Gammapapillomavirus 18	100% (1/1)	L1 protein	<b>4917-6581</b> <sup>b</sup>				
Contig_49803			6099-7011	849	74	<a href="#">JX429973.1</a>	Human papillomavirus type 156
<i>Parvoviridae</i>							
Primate protoparvovirus 1	75% (3/4)	VP1	<b>2397-4495</b> <sup>c</sup>				
Contig_78300			2934-3496	562	99	<a href="#">KU362763.1</a>	Human bufavirus genotype 1
Contig_66586			3059-4205	1147	99	<a href="#">KX856937.1</a>	Human bufavirus genotype 1
Contig_34693			2086-2602	481	99	<a href="#">KX856937.1</a>	Human bufavirus genotype 1
Primate bocaparvovirus 1	50% (5/10)	VP1	<b>3023-5029</b> <sup>d</sup>				
Contig_61389			2675-3182	507	99	<a href="#">KM624026.1</a>	Human bocavirus genotype 3
Contig_79350			4796-5230	435	99	<a href="#">JN086998.1</a>	Human bocavirus genotype 3
Contig_46837			2631-3296	639	99	<a href="#">GU048665.1</a>	Human bocavirus genotype 3
Contig_81024			2857-3159	303	100	<a href="#">KM624026.1</a>	Human bocavirus genotype 3
Contig_25624			3670-4298	592	99	<a href="#">FJ948861.1</a>	Human bocavirus genotype 3
Primate bocaparvovirus 2	83% (5/6)	VP1	<b>2961-4964</b> <sup>e</sup>				
Contig_48745			3891-4548	658	99	<a href="#">KY050744.1</a>	Human bocavirus genotype 2
Contig_54132			3836-4506	638	100	<a href="#">KY050744.1</a>	Human bocavirus genotype 2
Contig_63255			2630-3469	840	99	<a href="#">JQ964115.1</a>	Human bocavirus genotype 2
Contig_31575			3626-4077	452	99	<a href="#">KY050744.1</a>	Human bocavirus genotype 2
Contig_29823			3461-3786	326	87	<a href="#">HQ871668.1</a>	Human bocavirus genotype 2
<i>Caliciviridae</i>							
Sapporo virus	39% (11/28)	VP1	<b>5173-6855</b> <sup>f</sup>				
Contig_100319			6171-6565	357	96	<a href="#">KP298674.1</a>	Human sapovirus GI.1
Contig_27454			5338-5820	453	96	<a href="#">KP298674.1</a>	Human sapovirus GI.1
Contig_42602			6520-6995	473	96	<a href="#">AB455796.1</a>	Human sapovirus GI
Contig_47189			6146-6442	269	91	<a href="#">EU124657.1</a>	Human sapovirus GI.2
Contig_21513			5653-6101	450	94	<a href="#">KM092508.1</a>	Human sapovirus GI.2
Contig_42601			6035-6620	540	91	<a href="#">EU124657.1</a>	Human sapovirus GI.2
Contig_42600			6157-6620	33	91	<a href="#">EU124657.1</a>	Human sapovirus GI.2
Contig_104232			5916-6494	531	95	<a href="#">AY237420.2</a>	Human sapovirus GII
Contig_36335			4529-5544	903	97	<a href="#">AB924385.1</a>	Human sapovirus GV
Contig_64244			6393-7186	791	97	<a href="#">AB924385.1</a>	Human sapovirus GV
Contig_89839			6713-6960	245	98	<a href="#">AB924385.1</a>	Human sapovirus GV
Norwalk virus	30% (13/43)	ORF1 ORF2	<b>3572-5101</b> <sup>g</sup> <b>5085-6692</b> <sup>g</sup>				
Contig_14305			5764-6077	319	98	<a href="#">KT732280.1</a>	Norovirus GI.6
Contig_89122			5113-5431	318	98	<a href="#">KF944271.2</a>	Norovirus GII.1
Contig_15510			5417-6204	787	99	<a href="#">KY806294.1</a>	Norovirus GII.2
Contig_27177			5513-5934	421	99	<a href="#">MG002630.1</a>	Norovirus GII.4
Contig_23524			6269-6853	584	99	<a href="#">KY905335.1</a>	Norovirus GII.4
Contig_58560			5524-5847	323	99	<a href="#">KM386681.1</a>	Norovirus GII.5
Contig_14582			4935-5677	739	99	<a href="#">KM267742.1</a>	Norovirus GII.6
Contig_38983			5678-5932	254	99	<a href="#">KM036375.1</a>	Norovirus GII.6
Contig_34549			6111-6484	373	95	<a href="#">KY424344.1</a>	Norovirus GII.6
Contig_6769			4469-4713	244	100	<a href="#">KY485110.1</a>	Norovirus GII.P16
Contig_6008			3858-4515	657	99	<a href="#">KY421159.1</a>	Norovirus GII.P16
Contig_6009			3858-4515	656	99	<a href="#">KY421177.1</a>	Norovirus GII.P16
Contig_100782			4185-4745	560	95	<a href="#">MF668937.1</a>	Norovirus GII.Pg
<i>Picornaviridae</i>							
Enterovirus A	50% (2/4)	VP2 VP3	<b>955-1728</b> <sup>h</sup> <b>1729-2460</b> <sup>h</sup>				
contig_23332			1408-1689	281	92	<a href="#">AY697471.1</a>	Enterovirus A76
contig_23329			1703-1978	275	91	<a href="#">AY697468.1</a>	Enterovirus A76
Enterovirus B	50% (2/4)	VP2 VP3	<b>949-1737</b> <sup>i</sup> <b>1738-2451</b> <sup>i</sup>				
contig_46549			1847-2274	427	89	<a href="#">KJ957190.1</a>	Echovirus 25
contig_47150			1401-1859	458	87	<a href="#">HM031191.1</a>	Echovirus 25
Enterovirus C	44% (22/50)	VP1 VP2 VP3	<b>2480-3385</b> <sup>j</sup> <b>950-1765</b> <sup>j</sup> <b>1766-2479</b> <sup>j</sup>				
contig_91322			957-1447	490	86	<a href="#">JX174177.1</a>	Coxsackievirus A1
contig_2722			693-1864	1171	89	<a href="#">KC785529.1</a>	Coxsackievirus A1
Contig_56536			2671-3670	996	82	<a href="#">JX174176.1</a>	Coxsackievirus A1
contig_61167			1022-1733	708	80	<a href="#">DQ995637.1</a>	Coxsackievirus A13
Contig_80491			2690-2983	296	93	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
Contig_54025			2937-3820	880	89	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
Contig_35788			1384-2726	1342	90	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
Contig_67125			2675-3543	868	90	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
Contig_89878			2579-3151	575	93	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
Contig_10091			2936-3225	289	93	<a href="#">KX932039.1</a>	Coxsackievirus A19
contig_19652			836-1711	872	89	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19

Table 4 (continued)

Family Specie	% typed contigs	Typing region	Position	Lenght	Blast identity (%)	Acc. Number	Genotype and subtype
contig_81902			1944-2472	528	89	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
contig_12945			1544-1874	330	88	<a href="#">AB828288.1</a>	Coxsackievirus A19
contig_9842			1933-2395	462	91	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
Contig_70355			2693-3265	572	89	<a href="#">AB828290.1</a>	Coxsackievirus A19
Contig_65082			910-1443	532	82	<a href="#">KU183495.1</a>	Coxsackievirus A24
contig_39567			1428-2577	1146	80	<a href="#">EF015033.1</a>	Coxsackievirus A24
Contig_79066			2186-2702	519	79	<a href="#">EF015033.1</a>	Coxsackievirus A24
Contig_56057			2850-4002	1152	81	<a href="#">EF555644.1</a>	Enterovirus C99
Contig_66760			2820-3827	1009	83	<a href="#">EF015011.1</a>	Enterovirus C99
contig_34711			1861-2459	595	83	<a href="#">EF555644.1</a>	Enterovirus C99
Contig_38531			2815-3775	963	83	<a href="#">KF129411.1</a>	Enterovirus C99
Hepatovirus A	50% (1/2)	VP1	<b>2208-3107</b> <sup>k</sup>				
Contig_99111			3003-3307	305	99	<a href="#">MF175366.1</a>	Hepatovirus genotype IA
<i>Astroviridae</i>							
Mamastrovirus 1	23% (14/62)	ORF2	<b>4289-6673</b> <sup>1</sup>				
Contig_92012			6266-6673	456	97	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
Contig_63238			4450-4696	241	93	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
Contig_44034			5514-5810	297	99	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
Contig_4556			4789-5558	724	98	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
Contig_258			2696-5935	3003	98	<a href="#">HQ398856.2</a>	Human astrovirus genotype 1
Contig_59279			4412-4674	263	98	<a href="#">KX932051.1</a>	Human astrovirus genotype 2
Contig_7859			4649-5169	481	98	<a href="#">JX087964.1</a>	Human astrovirus genotype 2
Contig_97655			5076-5696	606	99	<a href="#">KF668570.1</a>	Human astrovirus genotype 3c
Contig_11722			4237-4553	317	100	<a href="#">KU318561.1</a>	Human astrovirus genotype 4
Contig_31067			4840-5558	640	98	<a href="#">AB025812.1</a>	Human astrovirus genotype 4
Contig_26370			6072-6474	409	96	<a href="#">KF039913.1</a>	Human astrovirus genotype 4
Contig_21700			4425-5056	608	98	<a href="#">AB025806.1</a>	Human astrovirus genotype 4
Contig_31066			4701-4951	243	98	<a href="#">AB025812.1</a>	Human astrovirus genotype 4
Contig_11721			4180-4553	373	99	<a href="#">AF292073.1</a>	Human astrovirus genotype 8

a NC\_001454.1; b NC\_008189.1; c JX027295.1; d NC\_012564.1; e NC\_012042.1; f NC\_006554.1; g NC\_029646.1; h AY697458.1; i NC\_001472.1; j NC\_002058.3; k NC\_001489.1; l NC\_030922.1

annealings in the specific typing region determined for its high genomic variability.

Mastadenovirus F contigs located into hexon region were matching to type 40 and 41, strains associated with acute gastroenteritis and very common found in sewage matrices (Iaconelli et al., 2017).

Regarding sequences from Gammmapapillomavirus, only one sequence could be confirmed as a Human Papilloma type 156. The strain was first identified in 2010 in Argentina, from a 83-year-old male skin sample with basal cell carcinoma in the upper lip (Chouhy et al., 2010). However, the same strain was found in healthy skin subjects so its role in pathogenesis is still unclear (Chouhy et al., 2013).

Three contigs related to protoparvovirus species were assigned to Human Bufavirus 1 genotype (BuV1). This genotype has been associated to gastroenteritis in several studies although many authors suggest that more studies need to be conducted to better characterise their pathogenic role in humans (Ayouni et al., 2016; Väisänen et al., 2017). The presence of this genotype has not been reported before in America, as only BuV3 was reported in a Peruvian study (Phan et al., 2016).

Primate bocaparvovirus 1 and 3 were assigned to Human Bocavirus 2 and 3 respectively. This is likely to occur since Human Bocavirus subtypes 2, 3 are associated to gastrointestinal infections; therefore they are excreted from the gastrointestinal tract (Salvo et al., 2018).

Among the Calicivirus detected in samples analysed, Sapporo virus (SaV) genogroups I, II and V, were detected in Quito according to previous studies in Latin America (Costa et al., 2017; Sánchez et al., 2018). Regarding Norovirus or Norwalk virus (NoV) genotypes, high diversity was observed in sewage samples, with NoV GI.6 and GII.1, GII.2, GII.4, GII.5, GII.6 and GII.p16. Two other studies in Ecuador reported NoV genotype description including GI.3, GII.1, GII.4, GII.6 and G.16 genotypes (Gastañaduy et al., 2015; Lopman et al., 2015).

A great group of Enterovirus C strains were reported, mostly found in healthy patients (CA1, CA13, CA19, CA24) (Faleye et al., 2016). However, Enterovirus C99, found in 4 sequences (81–83% identity), seems to

be related with Acute Flacid Paralysis cases in children from West Africa (Fernandez-Garcia et al., 2017).

From Enterovirus A we identified EV-76 strain, firstly found in France (1991) from a patient suffering of gastroenteritis (Oberste et al., 2005) Finally, the unique Enterovirus B strain identified, Echovirus 25 (E-25), has been associated to important clinical symptoms ranging from minor herpangina, skin rash, hand, foot, and mouth disease (HFMD), severe acute flaccid paralysis (AFP), and encephalitis to aseptic meningitis (Li et al., 2015). Regarding Latin America, E-25 has been only reported in few cerebrospinal fluid specimens from meningitis cases in Brazil (dos Santos et al., 2006).

A partial sequence in VP1 from Hepatovirus A matched with IA genotype with an identity of 99%. This is the first evidence of IA genotype in Ecuador, but it has already been reported as the most abundant genotype in Latin America (Prado et al., 2012; Sulbaran et al., 2010).

Human Astrovirus types 1,2,3,4 and 8 were detected in Quito, showing a great diversity among this important gastroenteritis viral specie. This genotype characterization is firstly described in Ecuador but strains have been previously detected in other Latin American countries among clinical specimens in Brazil and Venezuela as well as in environmental waters from Argentina and Uruguay (González et al., 2011; Lizasoain et al., 2015; Masachessi et al., 2018; Resque et al., 2007; Siqueira et al., 2017).

#### 4. Conclusions

Among the human viral families detected in Quito's urban streams, important human pathogens have been detected, including members of the *Parvoviridae*, *Caliciviridae*, *Adenoviridae*, *Polyomaviridae*, *Papillomaviridae*, *Picornaviridae* and *Astroviridae* families.

The detection of the wide diversity of viral species and genotypes described in Quito urban streams is a very useful information to health practitioners in order to consider more aetiological agents circulating among patients.

The results obtained describe for the first time the circulation in Ecuador of a great variety of viral species causing gastroenteritis: Mastadenovirus F, Human Bocavirus, Human Bufavirus, Cosavirus, Sappovirus, Aichi Virus and Astrovirus. Other virus newly detected in Ecuador are associated to important clinical syndromes affecting urinary tract, skin tissues, and meningitis by Human Polyomavirus 1 (BKPyV), Gammapapillomavirus, Parechovirus A and Echovirus 25 respectively.

Moreover, the information produced on the long list of important viral pathogens and emerging viral strains present in urban rivers of Ecuador's capital city should contribute to alert local governments and to establish sanitation measures to prevent viral transmission across the river basin.

This study provides more evidence on the benefits of the metagenomics public health surveillance systems based on excreted viruses in sewage and superficial waters and the viability of developing data bases of the viruses circulating in different human populations.

## Acknowledgements

This work was supported by the Universidad de las Americas, Quito-Ecuador (Dirección de Investigaciones, AMB·BRT.17.01). Special thanks to Xavier Amigo and Nature Experience for its invaluable service during the sampling campaign.

## References

- Adamo, M.P., 2017. Human Bocavirus 1: role in the acute respiratory infection and epidemiology in Cordoba, Argentina. *Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Cordoba* 74, 134–143.
- Alcalá, A., Vizzi, E., Rodríguez-Díaz, J., Zambrano, J.L., Betancourt, W., Liprandi, F., 2010. Molecular detection and characterization of Aichi viruses in sewage-polluted waters of Venezuela. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4113–4115. <https://doi.org/10.1128/AEM.00501-10>.
- Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Andersson, B., 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12891–12896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>.
- Allen, H.K., Bunge, J., Foster, J.A., Bayles, D.O., Stanton, T.B., 2013. Estimation of viral richness from shotgun metagenomes using a frequency count approach. *Microbiome* 1, 5. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-5>.
- Altan, E., Del Valle Mendoza, J., Deng, X., Phan, T.G., Sadeghi, M., Delwart, E.L., 2017. Small circular rep-encoding single-stranded DNA genomes in Peruvian diarrhea virome. *Genome Announc.* 5 (e00822-17). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00822-17>.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Ayouni, S., Estienney, M., Hammami, S., Neji Guediche, M., Pothier, P., Aouni, M., Belliot, G., de Rougemont, A., 2016. Cosavirus, Salivirus and Bufavirus in diarrheal Tunisian infants. *PLoS One* 11 (e0162255). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162255>.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, L., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2017. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 45 (D37–D42). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1070>.
- Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 238–245.
- Brisler, J.R., Ako-adjee, D., Bao, Y., Blinkova, O., 2015. NCBI viral genomes resource. *Nucleic Acids Res.* 43 (D571–D577). <https://doi.org/10.1093/nar/gku1207>.
- Brown, J.R., Shah, D., Breuer, J., 2016. Viral gastrointestinal infections and norovirus genotypes in a paediatric UK hospital, 2014–2015. *J. Clin. Virol.* 84, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.08.298>.
- Burutarán, L., Lizasoain, A., García, M., Victoria, M., 2016. Detection and molecular characterization of aichivirus 1 in wastewater samples from Uruguay. *Food Environ. Virol.* 8, 13–17. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9217-1>.
- Cantalupo, P.G., Calgua, B., Zhao, G., 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio* 2, 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>. Editor.
- Chouhy, D., Gorosito, M., Sánchez, A., Serra, E.C., Bergero, A., Fernandez Bussy, R., Giri, A.A., 2010. New generic primer system targeting mucosal/genital and cutaneous human papillomaviruses leads to the characterization of HPV 115, a novel Beta-papillomavirus species 3. *Virology* 397, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.020>.
- Chouhy, D., Bolatti, E.M., Piccirilli, G., Sanchez, A., Fernandez Bussy, R., Giri, A.A., 2013. Identification of human papillomavirus type 156, the prototype of a new human gammapapillomavirus species, by a generic and highly sensitive PCR strategy for long DNA fragments. *J. Gen. Virol.* 94, 524–533. <https://doi.org/10.1099/vir.0048157-0>.
- Contevelle, L.C., de Filippis, A.M.B., Nogueira, R.M.R., de Mendonça, M.C.L., Vicente, A.C.P., 2018. Metagenomic analysis reveals hepatitis A virus in suspected yellow fever cases in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 66–67. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170260>.
- Costa, L.C.P. das N., Siqueira, J.A.M., Portal, T.M., Sousa Júnior, E.C., da Linhares, A.C., Gabbay, Y.B., Resque, H.R., 2017. Detection and genotyping of human adenovirus and sapovirus in children with acute gastroenteritis in Belém, Pará, between 1990 and 1992: first detection of GL7 and GV.2 sapoviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 621–628. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0198-2017>.
- Dalgo Aguilar, P., Loján González, C., Córdova Rodríguez, A., Acurio Páez, K., Arévalo, A.P., Bobokova, J., 2017. Prevalence of high-risk genotypes of human papillomavirus: women diagnosed with premalignant and malignant pap smear tests in Southern Ecuador. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/8572065>.
- Delwart, E., Li, L., 2011. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other Rep encoding small circular ssDNA genomes. *Virus Res.* 164, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.11.021>.
- dos Santos, G.P.L., Skrabala, I., Oliveira, D., Lima, A.A.F., de Melo, M.M.M., Kmetzsch, C.I., da Costa, E.V., da Silva, E.E., 2006. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998–2003. *J. Med. Virol.* 78, 98–104. <https://doi.org/10.1002/jmv.20509>.
- Drexler, J.F., Luna, L.K. de S., Stöcker, A., Almeida, P.S., Ribeiro, T.C.M., Petersen, N., Herzog, P., Pedrosa, C., Huppertz, H.I., Ribeiro, H. da C., Baumgarte, S., Drosten, C., Drosten, C., 2008. Circulation of 3 lineages of a novel Saffold cardiovirus in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1398–1405. <https://doi.org/10.3201/eid1409.080570>.
- EMAPS, 2016. *Memoria de Sostenibilidad*. Quito.
- Faleye, T.O.C., Adewumi, M.O., Coker, B.A., Nudamajo, F.Y., Adeniji, J.A., 2016. Direct detection and identification of enteroviruses from faeces of healthy Nigerian children using a cell-culture independent RT-seminested PCR assay. *Adv. Virol.* 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/1412838>.
- Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Gonzales-Gustavson, E., Abril, J.F., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2017a. A metagenomic assessment of viral contamination on fresh parsley plants irrigated with fecally tainted river water. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.001>.
- Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Martínez-Puchol, S., Ruisñol, M., Rodríguez-Manzano, J., Figuerola, N., Bofill-Mas, S., Abril, J.F., Girones, R., 2017b. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. *Sci. Total Environ.*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.249>.
- Fernandez-García, M.D., Kebe, O., Fall, A.D., Ndiaye, K., 2017. Identification and molecular characterization of non-polio enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in West Africa, 2013–2014. *Sci. Rep.* 7 (3808). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03835-1>.
- Forslund, O., Antonsson, A., Stenquist, B., Göran Hansson, B., Nordin, P., 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.* 80, 2437–2443. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2437>.
- Gastañaduy, P.A., Vicuña, Y., Salazar, F., Broncano, N., Gregoricus, N., Vinjé, J., Chico, M., Parashar, U.D., Cooper, P.J., Lopman, B., 2015. Transmission of norovirus within households in Quininde, Ecuador. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, 1031–1033. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000783>.
- González, G.G., Liprandi, F., Ludert, J.E., 2011. Molecular epidemiology of enteric viruses in children with sporadic gastroenteritis in Valencia, Venezuela. *J. Med. Virol.* 83, 1972–1982. <https://doi.org/10.1002/jmv.22185>.
- Guido, M., Tumolo, M.R., Verri, T., Romano, A., Serio, F., De Giorgi, M., De Donno, A., Bagordo, F., Zizza, A., 2016. Human bocavirus: current knowledge and future challenges. *World J. Gastroenterol.* 22, 8684–8697. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8684>.
- Helle, F., Brochot, E., Handala, L., Martin, E., Castelain, S., Francois, C., Duverlie, G., 2017. Biology of the BKPyV: an update. *Viruses* 9, 327. <https://doi.org/10.3390/v9110327>.
- Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.-C., Rehnstam-Holm, A.-S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4523–4533.
- Huang, D.-D., Wang, W., Lu, Q.-B., Zhao, J., Guo, C.-T., Wang, H.-Y., Zhang, X.-A., Tong, Y.-G., Liu, W., Cao, W.-C., 2015. Identification of Bufavirus-1 and Bufavirus-3 in feces of patients with acute diarrhea, China. *Sci. Rep.* 5 (13272). <https://doi.org/10.1038/srep13272>.
- Iaconelli, M., Valdazo-González, B., Equestre, M., Ciccaglione, A.R., Marcantonio, C., Della Libera, S., La Rosa, G., 2017. Molecular characterization of human adenoviruses in urban wastewaters using next generation and sanger sequencing. *Water Res.* 121, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.039>.
- INEC, 2016. INEC presenta sus proyecciones poblacionales cantonales|Instituto Nacional de Estadística y Censos. WWW Document. URL: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/inec-presenta-sus-proyecciones-poblacionales-cantonales/> (accessed 11.28.17).
- Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28, 6653–6657. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.037>.
- Johansson, H., Bzhhalava, D., Ekström, J., Hultin, E., Dillner, J., Forslund, O., 2013. Metagenomic sequencing of “HPV-negative” condylomas detects novel putative HPV types. *Virology* 440, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.01.023>.
- Kitajima, M., Gerba, C.P., 2015. Aichi virus 1: environmental occurrence and behavior. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 4, 256–268. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020256>.
- Kolde, R., 2015. CRAN – Package Pheatmap. WWW Document. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>.
- Krishnamurthy, S.R., Wang, D., 2018. Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses. *Virology* 516, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.006>.
- Leguia, M., Loyola, S., Rios, J., Juarez, D., Guevara, C., Silva, M., Prieto, K., Wiley, M., Kasper, M.R., Palacios, G., Bausch, D.G., 2015. Full genomic characterization of a Saffold virus

- isolated in Peru. *Pathog. (Basel, Switzerland)* 4, 816–825. <https://doi.org/10.3390/pathogens4040816>.
- Li, L., Barry, P., Yeh, E., Glaser, C., Schnurr, D., Delwart, E., 2009. Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *J. Gen. Virol.* 90, 2413–2417. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012344-0>.
- Li, H., Meng, Y., Pang, L., Liang, J., Lu, H., Wang, Q., Liang, P., Cao, J., Liu, S., Cheng, J., 2015. Complete genome sequence of a new recombinant echovirus 25 strain isolated from a neonatal patient with hand, foot, and mouth disease complicated by encephalitis in Beijing, China. *Virus Genes* 50, 505–508. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1186-9>.
- Lizasoain, A., Tort, L.F.L.F.L., García, M., Gómez, M.M.M., Leite, J.P.G.P.G., Miagostovich, M.P.P., Cristina, J., Colina, R., Victoria, M., 2015. Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. 119. <https://doi.org/10.1111/jam.12856>.
- Lopman, B.A., Trivedi, T., Vicuña, Y., Costantini, V., Collins, N., Gregoricus, N., Parashar, U., Sandoval, C., Broncano, N., Vaca, M., Chico, M.E., Vinjé, J., Cooper, P.J., 2015. Norovirus infection and disease in an Ecuadorian birth cohort: association of certain norovirus genotypes with Host FUT2 secretor status. *J. Infect. Dis.* 211, 1813–1821. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu672>.
- MAE, 2015. Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso de agua. Ministerio del Ambiente Ecuatoriano, pp. 1–37.
- Martínez, M.A., de los Dolores Soto-del Río, M., Gutiérrez, R.M., Chiu, C.Y., Greninger, A.L., Contreras, J.F., López, S., Arias, C.F., Isa, P., 2015. DNA microarray for detection of gastrointestinal viruses. *J. Clin. Microbiol.* 53, 136–145. <https://doi.org/10.1128/JCM.01317-14>.
- Masachessi, G., Pisano, M.B., Prez, V.E., Martínez, L.C., Michelena, J.F., Martínez-Wassaf, M., Giordano, M.O., Isa, M.B., Pavan, J.V., Welter, A., Nates, S.V., Ré, V., 2018. Enteric viruses in surface waters from Argentina: molecular and viable-virus detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (e02327-17). <https://doi.org/10.1128/AEM.02327-17>.
- Ng, T.F.F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., Oderinde, B.S., Wommack, K.E., Delwart, E., 2012. High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. *J. Virol.* 86, 12161–12175. <https://doi.org/10.1128/JVI.00869-12>.
- Nix, W.A., Khetsuriani, N., Penaranda, S., Maher, K., Venczel, L., Cselko, Z., Freire, M.C., Cisterna, D., Lema, C.L., Rosales, P., Rodriguez, J.R., Rodriguez, W., Halkyer, P., Ronveaux, O., Pallansch, M.A., Oberste, M.S., 2013. Diversity of picornaviruses in rural Bolivia. *J. Gen. Virol.* 94, 2017–2028. <https://doi.org/10.1099/vir.0.053827-0>.
- Oberste, M.S., Maher, K., Michele, S.M., Belliot, G., Uddin, M., Pallansch, M.A., 2005. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species human enterovirus A. *J. Gen. Virol.* 86, 445–451. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80475-0>.
- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., Saif, L.J., 2015. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 32–53. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14>.
- Olijve, L., Jennings, L., Walls, T., 2017. Human Parechovirus: an increasingly recognized cause of Sepsis-like illness in young infants. *Clin. Microbiol. Rev.* 31 (e00047-17). <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-17>.
- Ong, D.S.Y., Schuurman, R., Heikens, E., 2016. Human bocavirus in stool: a true pathogen or an innocent bystander? *J. Clin. Virol.* 74, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.11.027>.
- Osborne, C.M., Montano, A.C., Robinson, C.C., Schultz-Cherry, S., Dominguez, S.R., 2015. Viral gastroenteritis in children in Colorado 2006–2009. *J. Med. Virol.* 87, 931–939. <https://doi.org/10.1002/jmv.24022>.
- PAHO, 2018. IM Coverage. WWW Document. URL: [http://ais.paho.org/imm/IM\\_JRF\\_COV-ERAGE-web.asp](http://ais.paho.org/imm/IM_JRF_COV-ERAGE-web.asp) (accessed 2.15.18).
- Phan, T.G., Vo, N.P., Bonkoungou, I.J.O., Kapoor, A., Barro, N., O’Ryan, M., Kapusinszky, B., Wang, C., Delwart, E., 2012. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. *J. Virol.* 86, 11024–11030. <https://doi.org/10.1128/JVI.01427-12>.
- Phan, T.G., Luchsinger, V., Avendano, L.F., Deng, X., Delwart, E., 2014. Cyclovirus in nasopharyngeal aspirates of Chilean children with respiratory infections. *J. Gen. Virol.* 95, 922–927. <https://doi.org/10.1099/vir.0.061143-0>.
- Phan, T.G., da Costa, A.C., Mendoza, J. del V., Bucardo-Rivera, F., Nordgren, J., Ryan, M.O., Deng, X., Delwart, E., da Costa, A.C., del Valle Mendoza, J., Bucardo-Rivera, F., Nordgren, J., O’Ryan, M., Deng, X., Delwart, E., 2016. The fecal virome of South and Central American children with diarrhea includes small circular DNA viral genomes of unknown origin. *Arch. Virol.* 161, 959–966. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2756-4>.
- Prado, T., Fumian, T.M., Miagostovich, M.P., Gaspar, A.M.C., 2012. Monitoring the hepatitis A virus in urban wastewater from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.005>.
- Proenca-Modena, J.L., Martínez, M., Amarilla, A.A., Espinola, E.E., Galeano, M.E., Fariña, N., Russomando, G., Aquino, V.H., Parra, G.I., Arruda, E., 2013. Viral load of human bocavirus-1 in stools from children with viral diarrhoea in Paraguay. *Epidemiol. Infect.* 141, 2576–2580. <https://doi.org/10.1017/S095026881300023X>.
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., Macdonald, J., 2016. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res.* 96, 308–326. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.042>.
- Rastrojo, A., Alcamí, A., 2017. Aquatic viral metagenomics: lights and shadows. *Virus Res.* 239, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.021>.
- Resque, H.R., Munford, V., Castilho, J.G., Schmich, H., Caruzo, T.A.R., Rác, M.L., 2007. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 969–974.
- Rosario, K., Fierer, N., Miller, S., Luongo, J., Breitbart, M., 2018. Diversity of DNA and RNA viruses in indoor air as assessed via metagenomic sequencing. *Environ. Sci. Technol.* 52, 1014–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04203>.
- Rusiñol, M., Girones, R., 2017. Summary of excreted and waterborne viruses/global water pathogen project. In: Rose, J.B., Jiménez-Cisneros, B. (Eds.), *Global Water Pathogens Project (Global Water Pathogen Project)*.
- Salvo, M., Lizasoain, A., Castells, M., Bortagaray, V., Castro, S., Colina, R., Tort, F.L., Victoria, M., 2018. Human Bocavirus: detection, quantification and molecular characterization in sewage and surface waters in Uruguay. *Food Environ. Virol.* 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9334-0>.
- Sánchez, G.J., Mayta, H., Pajuelo, M.J., Neira, K., Xiaofang, L., Cabrera, L., Ballard, S.B., Crabtree, J.E., Kelleher, D., Cama, V., Bern, C., Oshitani, H., Gilman, R.H., Saito, M., Sapovirus Working Group, 2018. Epidemiology of sapovirus infections in a birth cohort in Peru. *Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1093/cid/cix1103>.
- Santos, N., Peret, T.C.T., Humphrey, C.D., Albuquerque, M.C.M., Silva, R.C., Benati, F.J., Lu, X., Erdman, D.D., 2010. Human bocavirus species 2 and 3 in Brazil. *J. Clin. Virol.* 48, 127–130. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.03.014>.
- Sardi, S.I., Somasekar, S., Naccache, S.N., Bandeira, A.C., Tauro, L.B., Campos, G.S., Chiu, C.Y., 2016. Coinfections of Zika and Chikungunya viruses in Bahia, Brazil, identified by metagenomic next-generation sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2348–2353. <https://doi.org/10.1128/JCM.00877-16>.
- Schiavelli, R., Bonaventura, R., Rial, M.C., Petrone, H., Pujol, G.S., Gaité, L.J., Acosta, M., Gutierrez, A., Acosta, F., Valdez, G., Raffaele, P., Chanta, G., Perez, M., Potes, L., Suso, E., Cremades, G., Ibañez, J., Imperiali, N., Luxardo, R., Castellanos, M., Maggiora, E., Carreño, C.A., Cobos, M., Marinic, K., Sinchi, J.L., Otero, A.B., Freire, M.C., 2014. First epidemiologic study in Argentina of the prevalence of BK viruria in kidney transplant patients. *Transplant. Proc.* 46, 3010–3014. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.07.009>.
- Siqueira, J.A.M., Oliveira, D. de S., de Carvalho, T.C.N., Portal, T.M., Justino, M.C.A., da Silva, L.D., Resque, H.R., Gabbay, Y.B., 2017. Astrovirus infection in hospitalized children: molecular, clinical and epidemiological features. *J. Clin. Virol.* 94, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.014>.
- Smits, S.L., Schapendonk, C.M.E., van Beek, J., Vennema, H., Schürch, A.C., Schipper, D., Bodewes, R., Haagmans, B.L., Osterhaus, A.D.M.E., Koopmans, M.P., 2014. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 20. <https://doi.org/10.3201/eid2007.140190>.
- Stöcker, A., de Carvalho Dominguez Souza, B.F., Ribeiro, T.C.M., Netto, E.M., Araujo, L.O., Corrêa, J.I., Almeida, P.S., Peixoto de Mattos, A., Ribeiro, H., Da, C., Pedral-Sampaio, D.B., Drosten, C., Drexler, J.F., 2012. Cosavirus infection in persons with and without gastroenteritis. *Brazil. Emerg. Infect. Dis.* 18, 656–659. <https://doi.org/10.3201/eid1804.111415>.
- Sulbaran, Y., Gutierrez, C.R., Marquez, B., Rojas, D., Sanchez, D., Navas, J., Rovallo, E., Pujol, F.H., 2010. Hepatitis A virus genetic diversity in Venezuela: exclusive circulation of subgenotype IA and evidence of quaspecies distribution in the isolates. *J. Med. Virol.* 82, 1829–1834. <https://doi.org/10.1002/jmv.21856>.
- Sun, G., Qinbo Zang, B., Yu, Gu, Guoping Niu, B., Chen Ding, B., Peiying Zhang, B., 2016. Viral metagenomics analysis of picobirnavirus-positive feces from children with sporadic diarrhea in China. *Arch. Virol.* 161, 971–975. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2726-2>.
- Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F.E., Nakamura, S., Hong, P.Y., Yasunaga, T., Kamagata, Y., Liu, W.T., 2012. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environ. Microbiol.* 14, 441–452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02630.x>.
- Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T.J., Kaiser, L., 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect. Genet. Evol.* 14, 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.imeegid.2012.10.016>.
- UNEP, 2016. A Snapshot of the World’s Water Quality: Towards a Global Assessment. Nairobi, Kenya.
- Väisänen, E., Fu, Y., Hedman, K., Söderlund-Venermo, M., 2017. Human protoparvoviruses. *Viruses* 9, 354. <https://doi.org/10.3390/v9110354>.
- Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvoña, M., Cevallos, W., Andrade, T., Eguiguren, M., Eisenberg, J.N.S., 2014. Identifying etiological agents causing diarrhea in low income Ecuadorian communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91, 563–569. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0744>.
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
- Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., Sarabia, F., Ojeda, F., Lev, O., 2015. Emerging pollutants in the Esmeraldas watershed in Ecuador: discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro–Guayllabamba–Esmeraldas rivers. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 41–53. <https://doi.org/10.1039/C4EM00394B>.
- Vu, D.-L., Cordey, S., Brito, F., Kaiser, L., 2016. Novel human astroviruses: novel human diseases? *J. Clin. Virol.* 82, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.004>.
- Vu, D.-L., Bosch, A., Pintó, R., Guix, S., 2017. Epidemiology of classic and novel human astrovirus: gastroenteritis and beyond. *Viruses* 9, 33. <https://doi.org/10.3390/v9020033>.
- WHO, 2003. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. *Vaccine Assess. Monit. Dep. Vaccines Biol.* 3.
- Williamson, K.E., Fuhrmann, J.J., Wommack, K.E., Radosevich, M., 2017. Annual review of virology viruses in soil ecosystems: an unknown quantity within an unexplored territory. *Annu. Rev. Virol.* 4, 201–219. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology>.
- Xavier, M. da P.T.P., Carvalho Costa, F.A., Rocha, M.S., de Andrade, J. da S.R., Diniz, F.K.B., de Andrade, T.R., Miagostovich, M.P., Leite, J.P.G., Volotão, E. de M., 2015. Surveillance of human Astrovirus infection in Brazil: the first report of MLB1 Astrovirus. *PLoS One* 10 (e0135687). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135687>.
- Zalona, A.C.J., Lopes, G.S., Schrago, C.G., Gonçalves, R.T., Zalis, M.G., Varella, R.B., 2011. Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil. *J. Med. Virol.* 83, 1401–1405. <https://doi.org/10.1002/jmv.22117>.
- Zárate, S., Taboada, B., Yocupicio-Monroy, M., Arias, C.F., 2018. The human virome. *Arch. Med. Res.* 0. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.01.005>.

