

## **Trabajo final de master:**

Pre-concentración de partículas víricas  
presente en muestras de heces para  
posterior secuenciación del viroma.

**Alumno:** Polina Kazakova.

**Tutor-director:** Helena Torrell Galceran.

**Tutor URV:** Antoni Romeu Figuerola.

**Centro:** Centre for Omic Sciences.



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

# Índice:

|   |    |
|---|----|
| <b>Resumen</b> .....  | 3  |
| <b>1. Introducción</b> .....  | 4  |
| <b>2. Objetivos</b> .....   | 12 |
| <b>3. Metodología</b> .....   | 12 |
| 3.1 <i>ENRIQUECIMIENTO VIRAL</i> .....  | 12 |
| Reactivos a preparar.....   | 14 |
| Protocolo A (Centrifugación + filtración + tratamiento nucleasas).....                      | 15 |
| Protocolo B (Centrifugación + filtración + precipitación + tratamiento nucleasas).....      | 15 |
| 3.2 <i>EXTRACCIÓN DE ARN Y ADN DE LAS PARTICULAS VIRALES [Iker et al., 2013]</i> .<br>..... | 16 |
| Reactivos necesarios.....   | 16 |
| Protocolo extracción.....   | 17 |
| 3.3 <i>PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA PARA LA ELECTROFORESIS</i> . .....                    | 17 |
| 3.4 <i>OBTENCIÓN DE LISADO FAGICO</i> . .....   | 18 |
| Obtención del lisado.....   | 18 |
| Limpieza del lisado obtenido.....   | 19 |
| Concentración de los fagos.....   | 19 |
| Titulación de los fagos.....  | 19 |
| 3.4 <i>SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS</i> . .....  | 20 |
| <b>4. Resultados y discusión</b> .....  | 20 |
| 4.1 <i>RESULTADOS DEL ENRIQUECIMIENTO VIRAL</i> .....                                       | 20 |
| Prueba N°1: .....   | 20 |
| Prueba N°2: .....   | 23 |
| Prueba N°3: .....   | 25 |
| 4.2 <i>COMPROVACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN EXTRAÍDO</i> .....                                | 26 |
| <b>5. Conclusiones</b> .....  | 28 |
| <b>6. Bibliografía</b> .....  | 29 |

## **Resumen.**

El viroma intestinal ha sido poco estudiado a diferencia del microbioma intestinal debido a que las bacterias se podían cultivar y el virus no, pero gracias a los nuevos avances en la ciencia de genética molecular se puede realizar estudios del viroma mediante la secuenciación del genoma viral.

Pero para poder realizar dicha secuenciación se requiere un tratamiento previo de la muestra fecal ya que hay diversos factores que dificultan dicho proceso, uno de los factores es que solo una pequeña parte de los ácidos nucleicos que se encuentran en las muestras es de origen viral, además hay una baja abundancia de partículas virales en las muestras por lo que se requiere un proceso de enriquecimiento viral previo a la extracción de los ácidos nucleicos.

Los estudios del viroma intestinal humano son importantes ya que es un campo con mucho potencial para relacionar la presencia de algún virus con algunas patologías además de estudiar la relación con la microbiota y el sistema inmune del huésped.

## **Abstract.**

The intestinal viroma has been little studied in contrast to the intestinal microbiome because they were unable to grow virus, but thanks to new advances in the science of molecular genetics the studies from virome can be made by the sequencing of the viral genome.

But in order to make such sequencing requires pre-treatment of fecal specimen as there are several factors that complicate this process one of the factors is one that is only a small part of nucleic acids that are found in the samples is from viral origin, in addition there is a low abundance of viral particles in the samples so it requires an enrichment process malware, prior to the extraction of nucleic acids.

The studies from human intestinal viroma are important since it is a field with great potential to relate the presence of any virus with certain pathologies as well as studying the relationship with microbiota and the immune system of the host.

## **1. Introducción.**

Las ciencias forenses son un conjunto de disciplinas científicas que ayudan a las autoridades policiales y judiciales a esclarecer las circunstancias de un presunto hecho delictivo y la identificación del individuo que ha realizado dichos hechos mediante la aplicación de métodos y técnicas científicas.

Los científicos aplican sus conocimientos al campo de la ciencia forense para proporcionar a los investigadores información crucial por lo que las ciencias forenses se han convertido en una parte esencial del sistema judicial.

Por estos motivos es importante la colaboración entre la comunidad científica y los laboratorios forenses porque la innovación científica que se encarga de desarrollar nuevas técnicas permite el avance en muchos ámbitos forenses, uno de ellos es la microbiología forense ya que las nuevas técnicas moleculares que se han ido desarrollando en los últimos años permiten una mejora en la identificación de microorganismos.

Esta identificación microbiana es importante en algunos aspectos ya que puede permitir la identificación de una población microbiana que podría determinar si un cadáver ha sido trasladado de un sitio a otro, además en el caso de que haya sido trasladado se podría determinar el lugar de la muerte en función de la población microbiana que se encuentre en el cadáver. También podría permitir la identificación del autor del crimen en el caso de que se detecten polimorfismos en el material genético de los microorganismos y virus.

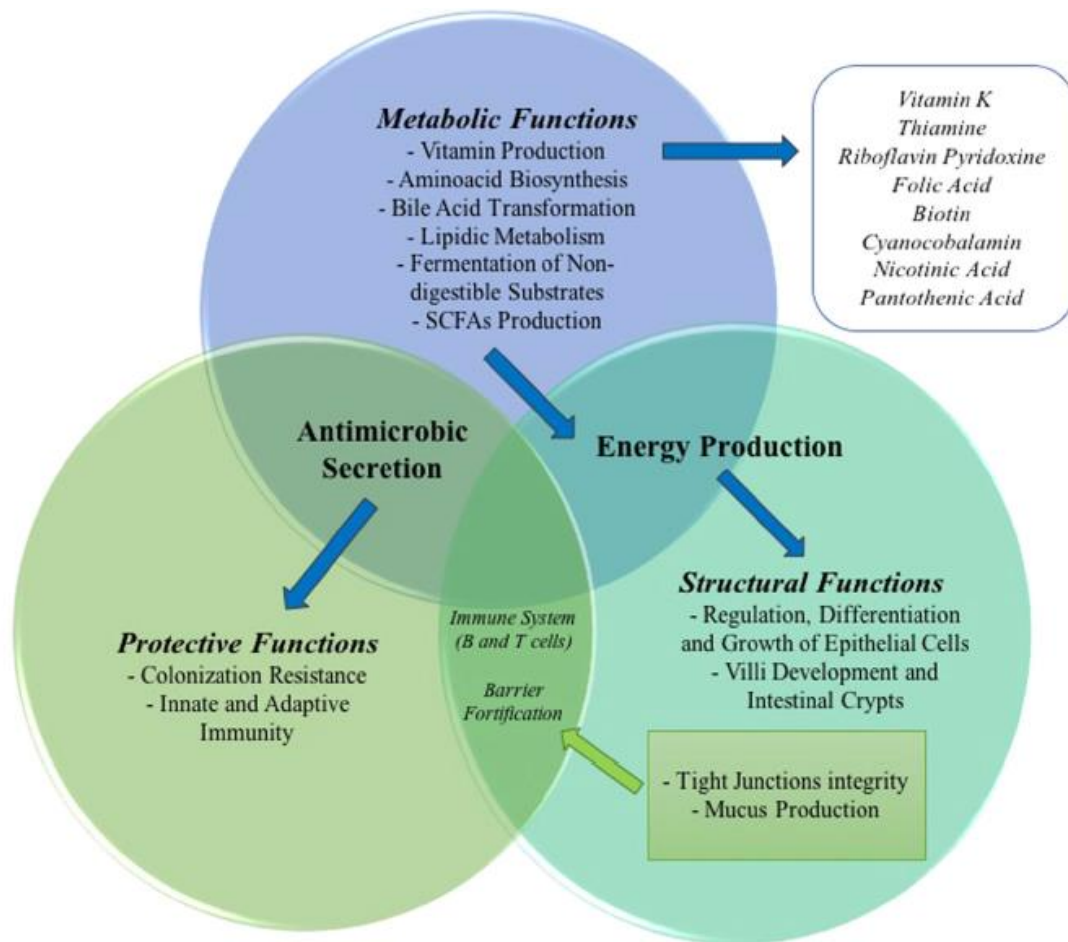
Otro punto donde es importante la identificación de los microorganismos y virus es la prevención de ataques de bioterrorismo o para paliar los efectos de un ataque ya realizado y para poder determinar cómo proseguir después de este, ej. saber cómo hay que descontaminar el área del ataque o determinar el tratamiento que hay que aplicar a las personas afectadas además de si se da el caso la aplicación de una cuarentena.

También es importante en la Paleomicrobiología forense ya que se estudia las enfermedades infecciosas y parasitarias de manera retrospectiva, esto es importante para conocer la evolución de las enfermedades y la prevalencia de las enfermedades a lo largo de la historia.

Por el tipo de muestras que se tratan es difícil de obtener el material genético íntegro y que pueda ser empleado para los estudios necesarios por ello, es un punto limitante a la hora de realizar los análisis. Por este motivo es importante el tratamiento previo de las muestras para la obtención del material genético, así como la propia recuperación de este, ya que si estos dos pasos previos a la secuenciación fallan no se puede hacer la secuenciación y no se obtendrán resultados, lo cual es muy importante en las ciencias forenses.

Actualmente en el ámbito científico se están realizando estudios novedosos sobre al microbiota y viroma intestinal, estos estudios podrían tener alguna aplicación forense en algún momento por los motivos mencionados anteriormente y otros ya que para realizar dichos estudios se emplean técnicas de concentración y extracción de ácidos nucleicos que podrían ser empleados en el ámbito forense.

**La microbiota intestinal** es el conjunto de microorganismos (bacterias, protozoos y hongos) que coloniza el nicho intestinal, se ha visto que aproximadamente el 70% de la microbiota que habita en el intestino es beneficiosa para el huésped ya que juega un papel importante en el metabolismo como es la síntesis de vitamina K, absorción de calcio, magnesio y hierro, y está involucrada en la biotransformación de los ácidos biliares y en la homeostasis de lípidos ya que durante la fermentación genera ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son importantes para proporcionar energía a los colonocitos y por otra parte estimula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales del intestino, además tiene una función de protección frente a patógenos porque una vez estos llegan al intestino tienen que competir por la superficie de adhesión y los nutrientes del intestino con la microbiota que ya está instalada en este, por lo que es más difícil de que se establezcan, además hay bacterias que inducen la secreción de mucina que es una sustancia capaz de inhibir la adhesión bacteriana a las células epiteliales, otras segregan péptidos antimicrobianos y factores de trébol los cuales participan en la reparación de la superficie de la mucosa.

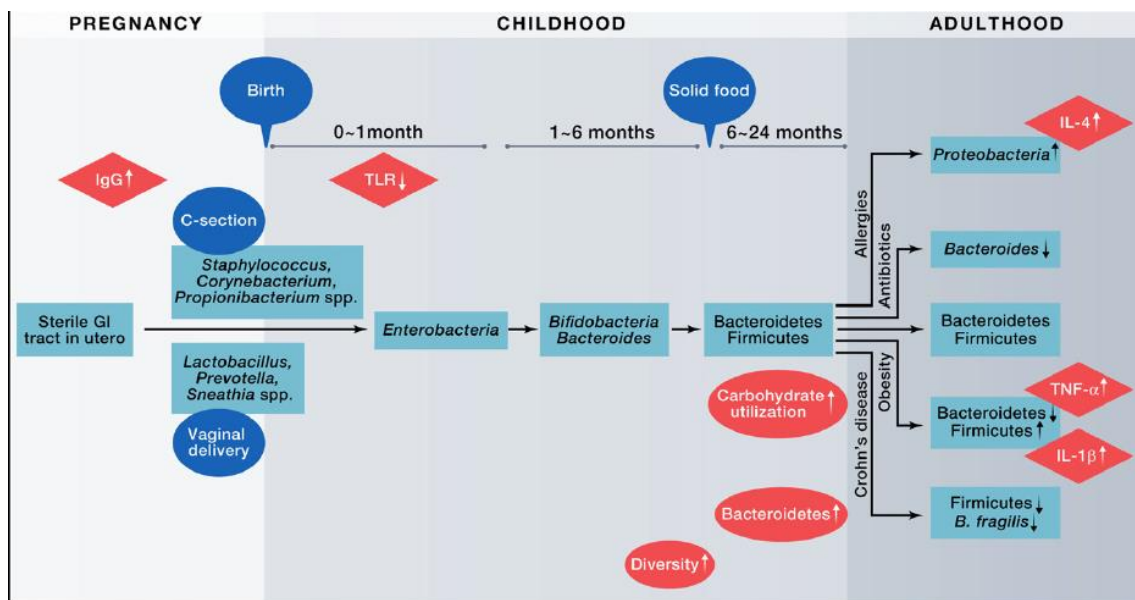


**Figura 1:** funciones de la microbiota intestinal. [Pascale et al., 2018]

Por estos motivos es importante que la microbiota intestinal este en equilibrio y no haya disbiosis (desequilibrio de la composición de la microbiota).

Se ha visto que la microbiota se empieza a adquirir desde que el individuo nace, pero la parte más importante se adquiere durante los primeros meses de vida. El tipo de vía de nacimiento (nacimiento natural o vía cesárea) y el tipo de lactancia que se administra al infante durante los primeros meses de vida (24 meses) tiene una estrecha relación con el tipo de microbiota que se va adquiriendo. A partir de los 24 meses de vida la microbiota es más o menos estable hasta la vejez del individuo donde se ha visto que la diversidad de la microbiota empieza a decrecer [Clemente et al., 2012]. Hay ciertos factores que pueden hacer que haya una variación de la microbiota como es el caso de la dieta ya que una dieta rica en hidratos de carbono o de lípidos puede favorecer la aparición de una disbiosis, hay estudios en el caso de los pacientes con celiaquía que después de implantarse una dieta libre en gluten

se recuperan parcialmente de la disbiosis que presentaban antes, otro factor es la toma de algún tipo de antibióticos o inmunomodulador que también pueden favorecer la aparición de la disbiosis, ya que a la hora de la toma de antibióticos estos no solo actúan en la zona de infección, sino también puede afectar a las bacterias del tracto gastrointestinal pudiendo eliminar una parte de la población microbiana que es beneficiosa para el huésped y el lugar que deja libre esta puede ser ocupada por otra que puede ser patógena. También se ha visto que otros factores extrínsecos como el tabaco pueden influir sobre la composición de la microbiota intestinal.



**Figura 2:** Tipo de bacterias que se van adquiriendo desde el parto hasta la adultez y como el tipo de microbiota adquirida puede influir en el desarrollo de ciertas enfermedades. [Imagen obtenida de Clemente et al., 2012]

Muchos estudios [Chang et al., 2016] han demostrado que la microbiota juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades sobre todo en las enfermedades donde esté involucrado el sistema inmune ya que hay mucho mecanismo que pueden ser influenciados y modulados como es el caso de la transferencia de material genético entre las bacterias y virus con las células intestinales, este material genético puede tener efecto anti-inflamatorio. También se han visto péptidos producidos por las bacterias que son antagonistas de la

Zonulina que está involucrada en la regulación de la permeabilidad de las células del epitelio intestinal, dichos antagonistas disminuyen la permeabilidad y como consecuencia de ello la respuesta inmune es menor. Otros casos son las infecciones con helmintos que han podido producir un cambio en el tipo de respuesta inmune de un Th1 a una Th2 al alterar la producción de citoquinas esto tiene un efecto favorables al reducirse el daño que se produce en las células intestinales. Y por último hay algunas infecciones víricas (EBV, HBV y CMV) que pueden provocar la apoptosis de las células T autoreactivas por lo que la respuesta autoinmunitaria se reduce.

En cuanto al **viroma intestinal** [Scarpellini et al., 2015] es un término relativamente nuevo esto es debido a que antiguamente solo se podía hacer estudios de la microbiota ya que solo las bacterias se podían cultivar en cambio los virus no, pero actualmente con las nuevas tecnologías desarrolladas en el ámbito de la genética molecular se puede hacer estudios de los virus que están presentes en el tracto intestinal mediante la secuenciación del genoma de estos. Por los motivos mencionados los estudios que relacionan el viroma con alguna patología o que estudien el papel que tienen en la salud intestinal humana son escasos, por ello es un campo que tiene mucho potencial.

En el viroma intestinal hay que diferenciar como puede encontrarse el ácido nucleico ya que este puede encontrarse encapsidado en una capsida con o sin envuelta o puede estar libre. También se tiene que hacer una diferencia de los virus bacterianos (bacteriófagos) ya que de por si ellos aportan información relevante sobre la microbiota, se ha visto que los bacteriófagos que están presentes en la flora intestinal son mayoritariamente atemperados este dato es importante para explicar la relación microbiana con los bacteriófagos y como dicha relación pueden influir en el huésped en el que habita, además de poder aportar información para el desarrollo de futuras terapias fágica. También se pueden encontrar capsides de virus que se han ingerido o inhalado y que pasan al tracto gastrointestinal y que solo están de “paso” ya que serán eliminadas con las heces y no producirán ninguna patología como es el caso de alguna capsida de algún virus vegetal que se pueden ingerir con la comida, y por último se pueden

encontrar virus que producen algún tipo de patología gástrica e intestinal como es el caso de una gastritis vírica.

Al realizar los estudios de la secuenciación del viroma intestinal hay que tener en cuenta que hay una gran diversidad viral además de una continua mutación de las especies víricas lo que puede dificultar los estudios, por ello se opta por la utilización de las NGS (Next Generation Sequencing) ya que estas permiten la detección de todas las especies víricas conocidas, así como el descubrimiento de especies nuevas y emergentes. Otro factor que hay que tener en cuenta es que se analizan todo tipo de ácidos nucleicos (ssDNA, dsDNA, ssRNA y dsRNA) para obtener la máxima información posible, pero a la vez esto supone un problema ya que solo una pequeña parte de los ácidos nucleicos que se encuentran en las muestras es de origen viral, además hay una baja abundancia de partículas virales en las muestras por lo que se requiere un proceso de enriquecimiento viral previo a la extracción de los ácidos nucleicos y por último hay un problema a la hora de realizar la extracción de los ácidos nucleicos, actualmente se dispone de un gran número de kits comerciales para realizar la extracción pero se ha visto que en muchos de ellos durante el protocolo de extracción se utilizan reactivos que posteriormente pueden tener un efecto contaminante de las muestras [Hjelmsø et al., 2017] y enmascarar los resultados de la extracción un ejemplo es el fenol empleado en algunos de los Kits comerciales.

En cuanto a **la técnica de secuenciación** hasta hace unos años se basaba en la utilización de la tecnología Sanger que tiene diversos factores limitantes, uno de ellos es que solo permite realizar 96 o 384 reacciones en paralelo lo que hace que el tiempo necesario para la realización de un experimento sea muy larga y el precio sea elevado, pero en los últimos años se han ido desarrollando nuevas tecnologías que utilizan estrategias novedosas en el campo de la secuenciación y que permiten la secuenciación de millones de fragmentos de ADN de forma paralela a un precio muy inferior a Sanger.

Este desarrollo de las nuevas tecnologías se ha podido hacer por diversos motivos uno de ellos es que se ha producido un aumento en cuanto a los métodos

moleculares que utilizan la secuenciación como técnica principal (expresión de RNA, variación genética, etc.).

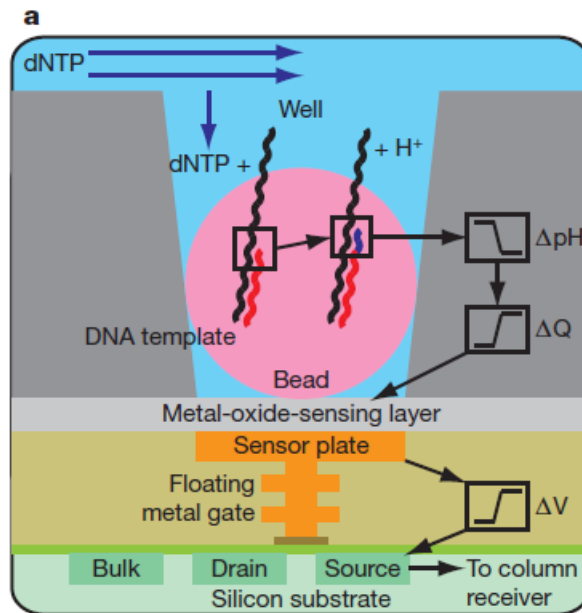
Las nuevas tecnologías desarrolladas tienen un tamaño de reads pequeño por lo que solo se puede secuenciar secuencias cortas, en el pasado hubiera supuesto un problema pero actualmente se dispone de genomas completos que permiten el ensamblaje sobre ellos de las secuencias cortas, estos genomas están al dominio público y se obtuvieron gracias a diversos proyectos donde se secuenciaron el genoma humano y genomas de diversos organismos modelo.

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva pueden detectar un gran número de variaciones que se produzcan en el genoma como es el caso de SNPs (cambio de un único nucleótido), variaciones estructurales como son las inversiones y translocaciones y también las deleciones y las inserciones.

El esquema de trabajo de las diversas técnicas de secuenciación masiva se puede simplificar ya que tienen una idea conceptual similar. El primer paso es la fragmentación del ADN y posteriormente se añaden unos adaptadores a los extremos, estos adaptadores son los que posteriormente permitirán la identificación de cada uno de los fragmentos porque son secuencias tipo barcode, una vez los adaptadores están ligados cada uno de los fragmentos es amplificado de manera clonal para tener muchas copias del mismo fragmento, y posteriormente se pasa al paso de secuenciación.

**Ion torrent** es una técnica de secuenciación no óptica, por lo que la matriz que se utiliza no capta fotones sino monitoriza el cambio de pH que se produce al liberarse iones de hidrogeno.

La técnica se sustenta en un chip que contiene óxido de tantalio que es el que da la sensibilidad a los protones. Este chip está compuesto por celdas las cuales están conectadas a sensores. Cada celda contiene un bead en el que se realizara la amplificación clonal del fragmento de ADN que es ligado previamente con adaptadores.



**Figura 3.** Dibujo del esquema del bead y del sensor. Esta imagen representa como se libera un protón cuando se une un nucleótido y como este produce un cambio de pH que a su vez produce un cambio en el potencial del metal que será detectado por el sensor. Imagen obtenida de [Rothberg et al., 2011].

Posteriormente de la amplificación se realiza la secuenciación, en este proceso se van añadiendo de manera secuencial los cuatro nucleótidos no marcados, cada vez que se produzca la unión de un nucleótido que sea complementario a la secuencia de ADN se producirá la hidrólisis de trifosfato, esta reacción libera el protón que es el encargado del cambio de pH que será detectado por el sensor, este convertirá la señal en voltaje que posteriormente será digitalizada. El exceso de nucleótidos será eliminado mediante un lavado y se añadirá el siguiente nucleótido.

Algo a tener en cuenta es que el cambio de pH es proporcional al número de nucleótidos que se incorporan pero a partir de cierto número de repeticiones deja de serlo por lo que pueden haber problemas a la hora de secuenciar regiones polinucleotídicas.

## **2. Objetivos.**

Optimización del proceso de concentración viral para obtener una mejor representación de la población vírica en heces a la hora de hacer la secuenciación masiva de las muestras y obtener un viroma lo más completo posible, para ello se diseñan dos protocolos diferentes de enriquecimiento viral, dicho diseño se basa en la búsqueda bibliográfica, posteriormente se testan ambos protocolos para ver con cual se obtiene un mejor resultado mediante la cuantificación de ácidos nucleicos extraídos después de realizar todo el proceso de enriquecimiento viral.

## **3. Metodología.**

### ***3.1 ENRIQUECIMIENTO VIRAL.***

Al trabajar con muestras fecales, las cuales pueden contener un gran número de contaminantes, se tiene que eliminar todo tipo de células, residuos y los ácidos nucleicos humanos y bacterianos a la vez que se hace una pre-concentración de las partículas virales contenidas en la muestra, para ello se han descrito diversas formas para hacerlo entre las cuales predominan los métodos de centrifugación a bajas revoluciones, filtración y tratamiento con nucleasas, también se puede utilizar la combinación de varios de los métodos mencionados [Hall et al., 2014].

La centrifugación es muy útil para la eliminar las partículas más grandes de la muestra como las células humanas. En el caso de la filtración se puede realizar utilizando filtros de diferente tamaño de poro los más utilizados son los de 0.45µm y de 0.22 µm, en el caso del poro de 0.45µm puede dejar pasar algunas bacterias por ello, se escoge el filtro con un tamaño de poro de 0.22 µm el cual elimina las bacterias pero puede no dejar pasar a alguna partícula vírica de mayor tamaño [Aggarwala et al., 2017]. Por último se puede utilizar un tratamiento con nucleasas para eliminar los ácidos nucleicos libres.

Se ha visto que la centrifugación con gradiente de densidad con CsCl [Reyes et al., 2013] es un método muy efectivo para la eliminación de las bacterias pero, es un método muy laborioso y que requiere mucho tiempo de trabajo por lo que a la hora

de trabajar con muchas muestras a la vez es un método que requeriría mucho tiempo y ralentecería el trabajo global del proyecto.

Por los motivos mencionados anteriormente se quiere poner a punto una metodología de concentración de partículas víricas, para ello se requiere la comprobación de las dos metodologías de recuperación y purificación de partículas víricas escogidas después de revisar la bibliografía, para poder hacerlo se llevará a cabo un estudio donde se emplean las dos metodologías y posteriormente se realizará una cuantificación de las partículas víricas recuperadas para poder calcular el rendimiento de dicha recuperación y así poder tomar la decisión de manera objetiva.

El primer tipo de metodología implica tres procesos diferentes [Li et al., 2015, KramnaL et al., 2015, van Leeuwen et al., 2010], el primer paso es la centrifugación a bajas revoluciones para eliminar las partículas de gran tamaño que contengan las muestras fecales, posteriormente el sobrenadante obtenido se filtra utilizando un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para eliminar las bacterias y células eucariotas y por último el filtrado se trata con nucleasas para eliminar los ácidos nucleicos que puedan quedar libres y pueden contaminar la muestra ya que solo se quiere obtener el ácido nucleico viral contenido en las VLP (Virus-like particle).

El segundo tipo de metodología implica cuatro procesos diferentes, al igual que en el primer caso primero se realiza una centrifugación a bajas revoluciones y luego se produce una filtración, a partir de este punto el proceso varía ya que el filtrado se trata con una solución de polietilenglicol para precipitar las partículas víricas [Leiner et al., 2015, Qiu Y et al., 2017] y por último el precipitado obtenido se redisuelve y se trata con nucleasas.

La cuantificación de las partículas se realiza mediante la extracción del ácido nucleico [Thurber et al., 2009] y posterior cuantificación de este mediante la utilización de un equipo llamado NanoDrop el cual basa su medición en la espectrofotometría UV.

Se escogerá la metodología que haya obtenido un mayor rendimiento y es la que se empleara para el tratamiento de las muestras del estudio.

### **Reactivos a preparar.**

#### Preparación polietilenglicol 50% (p/v):

Se prepararan 5mL ya que se necesitaran como máximo 3mL (se emplea un 1/10 en volumen de polietilenglicol para la precipitación de cada muestra cuyo volumen máximo es de 10mL).

1. Pesar 2.5g de polietilenglicol.
2. Enrasar el matraz aforado a 5mL con agua mili-Q.

#### Preparación de PBS.

Se necesitara un volumen de 81mL (9mL para la suspensión de cada una de las muestras de heces y 9mL como máximo para redissolver cada muestra que se haya precipitado).

1. Verter el contenido del sobre en un vaso de precipitados.
2. Utilizar  $\frac{3}{4}$  partes del volumen total (750mL) para disolver el sólido.
3. Verter el contenido en el matraz aforado.
4. Enrasar el matraz aforado a 1L.
5. Homogenizar bien por inversión.
6. Pasar el contenido a una botella de laboratorio.

Suspensión de las muestras en PBS: Paso común para las dos metodologías de preconcentración.

La muestra fecal se resuspende en PBS (phosphate buffered solution pH 7.2) hasta un 10% en peso.

1. Pesar 1 g de la muestra fecal.
2. Pipetear 9 mL de PBS estéril.
3. Homogenizar bien la muestra.

### **Protocolo A (Centrifugación + filtración + tratamiento nucleasas).**

1. Centrifugar cada muestra a una velocidad de 4800g durante 10 minutos a 4°C.
2. Recolectar el sobrenadante en un contenedor que sea fácil de aspirar el sobrenadante con la jeringa y filtrarlo utilizando un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (volumen máximo que se puede tratar es de 200mL).
3. Medir el volumen del filtrado y pipetear una alícuota de 176 $\mu\text{L}$  de cada una de las muestra en tubos nuevos.
4. Tratar cada alícuota con 2U de DNasa I (1U/  $\mu\text{L}$ , Invitrogen) y con 20U de RNasa one (10U/ $\mu\text{L}$ , Promega). Para ello se pipetea los volúmenes de la tabla siguiente:

#### **5. Tabla 1: volúmenes a pipetear.**

|                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| Buffer DNasa 10X             | 20 $\mu\text{L}$  |
| DNasa 1U/ $\mu\text{L}$      | 2 $\mu\text{L}$   |
| RNasa One 10U/ $\mu\text{L}$ | 2 $\mu\text{L}$   |
| Muestra                      | 176 $\mu\text{L}$ |
| Volumen total                | 200 $\mu\text{L}$ |

6. Incubar a 37°C durante 1 hora y media. (una vez realizado este paso se puede pasar a protocolo de extracción de los ácidos nucleicos de las capsides sin la necesidad de desactivar las nucleasas ya que estas serán desactivadas en el paso dos cuando se añade PV1/  $\beta\text{ME}$ ).

### **Protocolo B (Centrifugación + filtración + precipitación + tratamiento nucleasas).**

1. Centrifugar la muestra a una velocidad de 4800 g durante 10 minutos a 4°C.
2. Recolectar el sobrenadante en un contenedor que sea fácil de aspirar el sobrenadante con la jeringa y filtrarlo utilizando un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (volumen máximo que se puede tratar es de 200mL).
3. Precipitación del filtrado empleando 1/10 en volumen de polietilenglicol a una concentración de 50% (p/v), la precipitación se lleva a cabo a 4°C durante 2 horas.

4. Centrifugar la solución a 4800 g durante 1 hora a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
5. El precipitado se redisuelve en un volumen parecido al volumen obtenido en el filtrado en el protocolo A (aprox. 8 mL) de PBS.
7. Tratar una alícuota de cada una de las muestras con 2U de DNasa I (1U/  $\mu$ L, Invitrogen) y con 20U de RNasa One (10U/ $\mu$ L, Promega). Para ello se pipetea en un tubo nuevo los volúmenes de la tabla siguiente:

**8. Tabla 2:** volúmenes a pipetear.

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| Buffer DNasa 10X       | 20 $\mu$ L  |
| DNasa 1U/ $\mu$ L      | 2 $\mu$ L   |
| RNasa One 10U/ $\mu$ L | 2 $\mu$ L   |
| Muestra                | 176 $\mu$ L |
| Volumen total          | 200 $\mu$ L |

9. Incubar a 37°C durante 1 hora y media. (una vez realizado este paso se puede pasar a protocolo de extracción de los ácidos nucleicos de las capsides sin la necesidad de desactivar las nucleasas ya que estas serán desactivadas en el paso dos cuando se añade PV1/  $\beta$ ME).

### ***3.2 EXTRACCIÓN DE ARN Y ADN DE LAS PARTICULAS VIRALES [Iker et al., 2013].***

#### **Reactivos necesarios.**

- $\beta$ ME ( $\beta$ -mercaptoetanol).
- PowerViral Environmental RNA/DNA Isolation kit

#### Preparación PV1/ $\beta$ ME (preparar fresco cada vez).

1. Poner el PV1 a 55°C durante 10 min. Utilizar cuando este templado.
2. Anadir  $\beta$ ME a PV1 hasta llegar a una concentración de 10 $\mu$ L/mL. (volumen a preparar depende de la cantidad de muestras, 600  $\mu$ L por muestra: 594 $\mu$ l de PV1 + 6  $\mu$ l de  $\beta$ ME).

### **Protocolo extracción.**

1. Dispensar 200  $\mu$ L de muestra líquida en un 2ml Collection Tube.
2. Añadir 600  $\mu$ L de PV1/ $\beta$ ME, vortexar 30 segundos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente
3. Añadir 150  $\mu$ L de IRS, vortexar e incubar a 4°C durante 5min.
4. Centrifugar a 13000g durante 1min.
5. Transferir el sobrenadante a un collection tube de 2.2mL. (no transferir más de 700  $\mu$ L).
6. Añadir 600  $\mu$ L de PV3 y 600  $\mu$ L de PV4, vortexar el tubo.
7. Pipetear 625  $\mu$ L de la mezcla anterior y depositarla en Spin Filter.
8. Centrifugar a 13000g durante 1min.
9. Agitar PV5 y añadir 600  $\mu$ L sobre el filtro.
10. Centrifugar a 13000g durante 1min. Cambiar de collection tube.
11. Añadir 600  $\mu$ L de PV4.
12. Centrifugar a 13000g durante 1min. Cambiar de collection tube.
13. Centrifugar a 13000g durante 2min.
14. Poner el filtro en un tubo nuevo.
15. Añadir 100  $\mu$ L de RNase-Free Water (solución de elución) al centro del filtro y dejar 1min a temperatura ambiente.
16. Centrifugar 13000g durante 1min.
17. Descartar el filtro y quedarse con el líquido filtrado.

### ***3.3 PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA PARA LA ELECTROFORESIS.***

1. Preparar 1L de TBE 1X partiendo de TBE 10X, para ello en una probeta de 1L se pone 100mL de TBE 10X y se enrasa con agua destilada a 1L, posteriormente se homogeniza por inversión tapando la boca de la probeta con parafilm.
2. Preparar 50mL de gel de agarosa, para ello se pesa 2.5g de agarosa y se añade 50mL de TBE 1X, posteriormente se calienta en el microondas y se va mezclando hasta que quede completamente transparente. Añadir 5 $\mu$ L de SYBR Safe DNA gel (se añade 1 $\mu$ L de SYBR Safe por cada 10mL de agarosa) este se utiliza para visualizar del ADN en el gel mediante la irradiación de luz fluorescente.

Posteriormente se vierte el gen en la cubeta y se coloca el peine para generar los pocillos

3. Para cargar las muestras de ADN previamente se añade un patrón de carga a cada una de las muestras (15 $\mu$ L de muestra y 3 $\mu$ L de patrón de carga), se homogeniza y se carga en el gel.
4. Posteriormente se pone a correr el gel aproximadamente 45min (hay que ir mirando el frente de migración).
5. Visualización de los resultados.

### ***3.4 OBTENCIÓN DE LISADO FAGICO.***

Para la realización de una prueba conceptual de ver cuál de los protocolos de enriquecimiento viral es mejor también se prueba a realizar los protocolos con muestras enriquecidas con partículas fágica y así tener un control al saber la cantidad de partículas que se añaden a cada una de las muestras. Para ello se genera una muestra artificial que simule el viroma intestinal añadiendo  $8.3 \times 10^8$  PFU de un bacteriófago en 2.7g de heces de rata que están libres de gérmenes.

Para poder realizar dichas muestras artificiales se requieren partículas fágica las cuales se compran y posteriormente se aumenta su número mediante la obtención de un lisado fágico el cual se limpia, concentra y cuantifica mediante el protocolo siguiente (Bonilla et al., 2016):

#### **Obtención del lisado.**

1. Sembrar E.coli en 1mL de LB líquido e incubar durante una noche a 37°C.
2. Preparar 100mL de LB y autoclavarlo, hay que suplementarlo con CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> 0.001M.
3. Añadir 0.1 volumen del cultivo de E.coli al medio de cultivo preparado en el paso anterior.
4. Incubar con agitación durante 1h a 37°C.
5. Añadir 100 $\mu$ L del lisado de fagos con un título alto ( $> 10^8$  PFU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>).
6. Incubar con agitación a 37°C aproximadamente unas 5h hasta que el medio de cultivo se aclare.
7. Recolectar el lisado y guardarlo a 4°C.

### **Limpieza del lisado obtenido.**

1. Alicuotar el lisado en tubos falcon estériles y centrifugarlo a 4000g durante 20min.
2. Recolectar el sobrenadante en un tubo falcon nuevo.
3. Filtrar el sobrenadante con un filtro de 0.22 $\mu$ m para eliminar los restos celulares.
4. Añadir 0.1V de cloroformo, vortexar e incubar a temperatura ambiente durante 10min.
5. Centrifugar a 4000g durante 5min a 25 °C.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo estéril y guardarlo a 4°C.

### **Concentración de los fagos.**

1. Pipetear 15mL del lisado en un tubo Amicon y centrifugar a 4000g durante 5min.
2. Eliminar el volumen filtrado y repetir el paso anterior.
3. Repetir los dos primeros pasos para tratar todo el volumen de lisado del que se dispone.
4. Añadir 15mL de SM buffer y centrifugar a 4000g durante 5min a 25 °C para lavar los fagos.
5. Repetir el paso anterior.
6. Recolectar con la ayuda de una pipeta el lisado que se ha quedado en el reservorio superior del tubo.

### **Titulación de los fagos.**

1. Sembrar E.coli en 1mL de LB líquido e incubar durante una noche a 37°C.
2. Hacer un banco de diluciones decimales del bacteriófago, para las diluciones se utiliza LB líquido.
3. Preparar LB agar para ello se pesa 25g de LB, 15g de Agar y enrasar a 1L con agua destilada posteriormente hay que autoclavar el medio, y preparar placas con este.
4. En un tubo nuevo mezcla 1mL del cultivo de E.coli que se ha dejado una noche cultivándose y 1mL de la dilución del bacteriófago.

5. Añadir 3mL de agar templado a la mezcla anterior y homogenizar.
6. Verter rápidamente la mezcla anterior sobre una placa de agar LB y distribuir la mezcla por la superficie. Dejar que solidifique.
7. Invertir la placa una vez el agar se haya solidificado e incubar toda la noche a 37°C.
8. Contar las calvas y calcular los PFU según la fórmula siguiente:

**PFU/mL**=calvas por placa **X** volumen de la placa **X** factor de dilución

### ***3.4 SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS.***

Para poder secuenciar las muestras hay que realizar dos librerías las cuales corresponden a los ácidos nucleicos extraídos, una librería del ARN extraído y otra del ADN extraído. Una vez se tenga la librería se pasa al paso de clonación donde se obtienen copias clónales de los fragmentos, este paso se realiza mediante la utilización de Ion Chef y posteriormente se pasa a la secuenciación mediante la utilización del equipo Ion Torrent S5 system.

El protocolo de trabajo está descrito en el manual MAN0016855 de Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef.

## **4. Resultados y discusión.**

### ***4.1 RESULTADOS DEL ENRIQUECIMIENTO VIRAL.***

#### **Prueba N°1:**

Para realizar esta prueba se trataran 6 muestras totales de las cuales tres se llevaran a cabo con el protocolo A y tres con el protocolo B.

El volumen filtrado obtenido y el volumen de polietilenglicol utilizado de cada una de las muestras es el de la siguiente tabla:

**Tabla 3:** volúmenes del filtrado obtenido y volumen de polietilenglicol empelado para el tratamiento de precipitación.

| Nombre muestra | V filtrado (mL) | V polietilenglicol (mL) |
|----------------|-----------------|-------------------------|
| <b>A1</b>      | 8               | -                       |
| <b>A2</b>      | 8               | -                       |
| <b>A3</b>      | 8               | -                       |
| <b>B1</b>      | 8               | 0.89                    |
| <b>B2</b>      | 8               | 0.89                    |
| <b>B3</b>      | 8               | 0.89                    |

Una vez realizados ambos protocolos de enriquecimiento viral se pasa a la extracción de los ácidos nucleicos mediante el protocolo correspondiente.

Una vez se han extraído los ácidos nucleicos de cada una de las muestras se cuantifican utilizando un equipo de espectrofotometría llamado NanoDrop obteniendo los resultados mostrados en las tablas siguientes:

**Tabla 4:** concentración, tipo de ácido nucleico su concentración y las ratios 260/280 y 260/230.

| Muestra   | Concentración ng/μl | Ratio 260/280 | Ratio 260/230 | Tipo de muestra |
|-----------|---------------------|---------------|---------------|-----------------|
| <b>1A</b> | 2.8                 | 2.54          | 0.24          | DNA             |
| <b>2A</b> | 2.7                 | 2.14          | 0.46          | DNA             |
| <b>3A</b> | 4.4                 | 2.22          | 0.35          | DNA             |
| <b>1B</b> | 1.7                 | 4.02          | 0.2           | DNA             |
| <b>2B</b> | 0.6                 | -3.17         | 0.26          | DNA             |
| <b>3B</b> | 1.6                 | 7.84          | 0.13          | DNA             |

**Tabla 5:** concentración, tipo de ácido nucleico su concentración y las ratios 260/280 y 260/230

| <b>Muestra</b> | <b>Concentración<br/>ng/μl</b> | <b>Ratio<br/>260/280</b> | <b>Ratio<br/>260/230</b> | <b>Tipo de<br/>muestra</b> |
|----------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>1A</b>      | 1.9                            | 1.79                     | 0.21                     | RNA                        |
| <b>2A</b>      | 1                              | -2.51                    | 0.29                     | RNA                        |
| <b>3A</b>      | 2                              | 7.11                     | 0.24                     | RNA                        |
| <b>1B</b>      | 1.9                            | 1.3                      | 0.22                     | RNA                        |
| <b>2B</b>      | -0.3                           | 0.32                     | -0.48                    | RNA                        |
| <b>3B</b>      | 1.6                            | 1.7                      | 0.15                     | RNA                        |
| <b>Agua</b>    | 1.2                            | 2.2                      | 0.77                     | RNA                        |
| <b>1A</b>      | 3.9                            | 1.45                     | 0.35                     | RNA                        |
| <b>2A</b>      | 3.4                            | 1.68                     | 0.91                     | RNA                        |
| <b>3A</b>      | 4.6                            | 1.92                     | 0.43                     | RNA                        |
| <b>1B</b>      | 0.3                            | -0.67                    | 0.06                     | RNA                        |
| <b>2B</b>      | 0.1                            | -0.77                    | 0.15                     | RNA                        |
| <b>3B</b>      | 2.4                            | 1.68                     | 0.23                     | RNA                        |

La cuantificación de RNA se realizó dos veces porque el primer blanco se realiza para el DNA pero se realiza la cuantificación tanto para el DNA como el RNA por ello posteriormente se pasa el blanco para el RNA para ver si se obtienen resultados mejores.

Se puede ver que las muestras 1A, 2A y 3A que han sido procesadas con el procedimiento A tienen una mayor concentración de DNA y RNA que las otras muestras procesadas con el procedimiento B.

En cuanto a la ratio 260/280 se puede observar que en el caso del DNA todas las muestras a excepción de la 2B tienen una ratio superior a 1.8 lo que indica que hay una mayor presencia de RNA que de DNA en las muestras, en el caso de RNA se observa que son bastante inferiores a 2.0 con excepción la muestra 3A que tiene 1.92 de ratio, todo esto indica que las muestras presentan contaminantes que absorben a 280nm.

En cuanto a la ratio 260/230 tendría que estar entre 2.9-2.2 pero se puede ver que está muy por debajo lo que también indica presencia de contaminantes que absorben a 230nm.

Observando los resultados obtenidos en la cuantificación se puede decir que las dos metodologías de enriquecimiento viral no son lo suficientemente buenas ya que se han obtenido concentraciones muy pobre de ácidos nucleicos en ambos casos, los motivos de esto pueden ser debido a que solo se procede a la extracción de ácidos nucleicos de una pequeña alícuota (200  $\mu$ L) cuando en verdad se dispone de 8mL de muestra tanto del protocolo A como del B por ello no se obtiene una representación real ya que de antemano se parte de una muestra diluida. Otro posible motivo por el cual se ha obtenido una concentración baja de ácidos nucleicos es que se ha utilizado un volumen de elución grande (100  $\mu$ L).

Para paliar los posibles problemas se podría probar ha eluir con un volumen inferior por ejemplo 25  $\mu$ L, además de probar en el protocolo B redissolver el precipitado en un volumen inferior (ej 176  $\mu$ L) ya que es el volumen que se utiliza posteriormente para realizar la extracción de los ácidos nucleicos. En el caso de que esto no funcione se podría probar a dejar más tiempo la precipitación y posteriormente realizar una centrifugación más prolongada.

### **Prueba N°2:**

A la vista de los resultados de la primera prueba se hace otra donde el pellet que se obtiene después de la precipitación se resuspende en un volumen lo más pequeño posible, para ello se tratan dos muestras. Además se realiza una modificación del protocolo de la extracción de los ácidos nucleicos a la hora de tratar la muestra 3Af donde se repite tres veces los pasos n° 7 y 8 para poder tratar todo el volumen que se genera en el paso n° 6. Además las muestras se eluyen con un volumen de 25  $\mu$ L y se dejan incubar 5 min para ver si la concentración de ácidos nucleicos es mayor al no diluir tanto la muestra.

Además en esta segunda prueba se realiza la extracción de ácidos nucleicos a una muestra que no ha sido tratada con nucleasas para ver si realmente este tratamiento funciona y elimina los ácidos nucleicos libres de la muestra.

**Tabla 6:** concentración, tipo de ácido nucleico su concentración y las ratios 260/280 y 260/230

| <b>Muestra</b>     | <b>Concentración<br/>ng/μl</b> | <b>Ratio<br/>260/280</b> | <b>Ratio<br/>260/230</b> | <b>Tipo de<br/>muestra</b> |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>2.2Af</b>       | 1.3                            | 1.26                     | 0.16                     | DNA                        |
| <b>3.2Af</b>       | 6.2                            | 0.69                     | 0.11                     | DNA                        |
| <b>Nonucleasas</b> | 12.4                           | 0.73                     | 0.13                     | DNA                        |
| <b>2.2Af</b>       | 1.3                            | 2.9                      | 0.24                     | RNA                        |
| <b>3.2Af</b>       | 4.4                            | 0.7                      | 0.1                      | RNA                        |
| <b>Nonucleasas</b> | 9.3                            | 0.75                     | 0.12                     | RNA                        |

Se puede observar que la muestra que no ha sido trata con nucleasas contiene una mayor concentración tanto de DNA como de RNA esto indica que el paso de tratamiento con nucleasas es importante porque elimina los ácidos nucleicos libres ya que se quiere obtener solamente el ácido nucleico contenido en las VLP.

En cuanto a las dos muestras se puede ver que la muestra 3.2Af que es en la que se ha realizado la modificación en el protocolo para pasar todo el volumen tiene una mayor concentración de ácidos nucleicos con respecto a la muestra 2.2Af donde solo se pasa 625 μL del volumen que se genera en el paso nº 6.

En el ratio 260/280 se puede observar que en el caso del DNA la ratio es inferior a 1.8 lo que puede indicar presencia de contaminantes que absorben a 280nm como es el caso de proteínas, fenol, etc. En el caso de RNA se puede ver que la ratio de las muestras 3.2Af y Nonucleasas es inferior a 2.0 que también indica la presencia de contaminantes.

En cuanto a la ratio 260/230 tendría que estar entre 2.9-2.2 pero se puede ver que está muy por debajo en ambos tipos de ácido nucleico lo que también indica presencia de contaminantes que absorben a 230nm.

### Prueba N°3:

En esta tercera prueba se intenta obtener una mayor concentración de ácidos nucleicos extraídos para ello se lleva a cabo la suspensión de las muestras mediante el seguimiento del protocolo de enriquecimiento viral pero donde para dos de las muestras se pesa 1g y se resuspenden en 4mL de PBS y otras dos muestras se pesa 2g y se resuspenden en 4mL de PBS, estas dos últimas muestras se prueba a resuspender en 3mL pero las muestras quedaban demasiado espesas para proseguir con el procedimiento

Cuando se ha realizado la filtración en las muestras 2.1 y 2.2 se ha tenido que utilizar dos filtros en vez de uno como en el resto de las muestras.

Posteriormente se pasado al realizar el protocolo B donde se añade los volúmenes siguientes de polietilenglicol para realizar la precipitación.

**Tabla 7:** Nombre de las muestras, volumen del filtrado y volumen de polietilenglicol empleado para la precipitación.

| Nombre | V muestra (mL) | V polietilenglicol (mL) |
|--------|----------------|-------------------------|
| 1.1    | 2.5            | 0.278                   |
| 1.2    | 3              | 0.330                   |
| 2.1    | 2.5            | 0.278                   |
| 2.2    | 2.5            | 0.278                   |

Una vez realizado el protocolo de enriquecimiento viral se pasa al protocolo de extracción de ácidos nucleicos pero con pequeñas modificaciones en el tratamiento de las muestras 1.2 y 2.2 ya que se repite tres veces los pasos n° 7 y 8 para poder tratar todo el volumen que se genera en el paso n° 6. Además todas las muestras se eluyen con un volumen de 25µL y se incuban 5min en vez de 1min.

Posteriormente se realiza la cuantificación de los ácidos nucleicos obteniendo los resultados de la tabla siguiente:

**Tabla 8:** concentración, tipo de ácido nucleico su concentración y las ratios 260/280 y 260/230.

| <b>Muestra</b> | <b>Concentración<br/>ng/μl</b> | <b>Ratio<br/>260/280</b> | <b>Ratio<br/>260/230</b> | <b>Tipo de<br/>muestra</b> |
|----------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>1.1</b>     | 2.4                            | 1.11                     | 0.12                     | DNA                        |
| <b>1.2</b>     | 2.3                            | 1.1                      | 0.23                     | DNA                        |
| <b>2.1</b>     | 18.7                           | 1.84                     | 0.53                     | DNA                        |
| <b>2.2</b>     | 5.7                            | 1.38                     | 0.13                     | DNA                        |
| <b>1.1</b>     | 3.1                            | 1.16                     | 0.18                     | RNA                        |
| <b>1.2</b>     | 3.2                            | 1.11                     | 0.36                     | RNA                        |
| <b>2.1</b>     | 2.1                            | 1.3                      | 0.39                     | RNA                        |
| <b>2.2</b>     | 4.1                            | 1.56                     | 0.12                     | RNA                        |

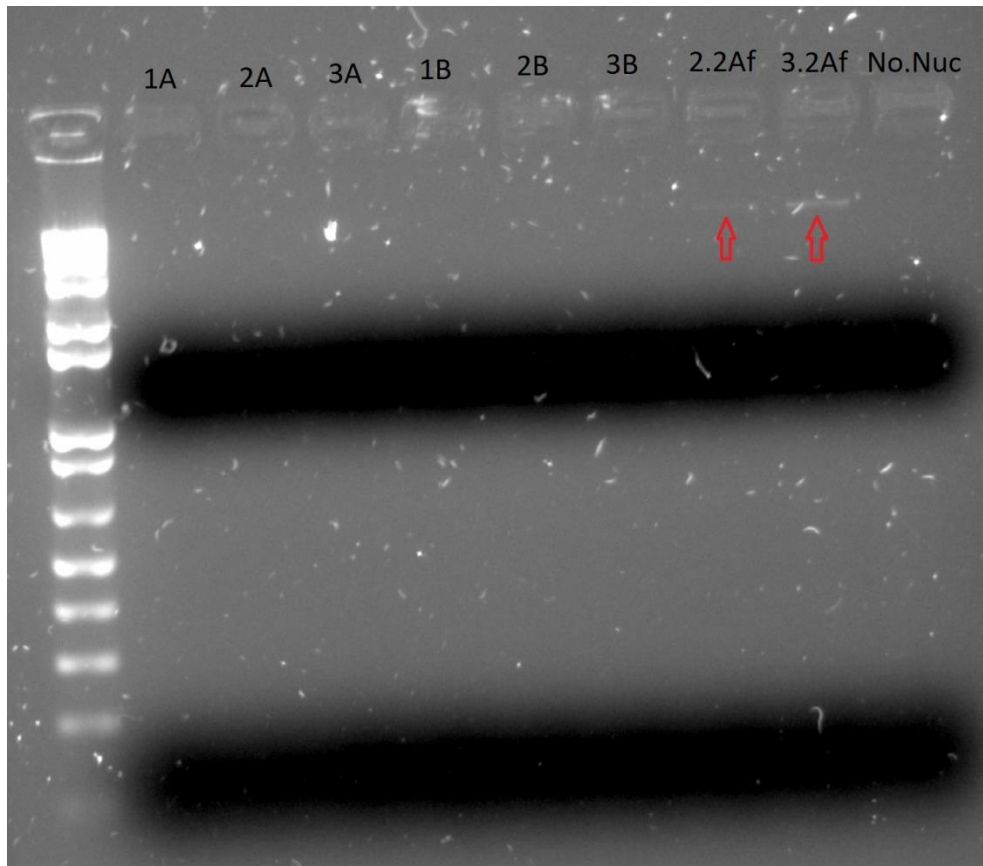
Se puede observar que la concentración de ADN es baja a excepción de la muestra 2.1 en la cual no se ha realizado la modificación en el protocolo de extracción de los ácidos nucleicos previamente mencionado. Las concentraciones de ARN son bajas en las cuatro muestras.

En cuanto a las ratios 260/280 se puede observar que en el caso del DNA son malas a excepción de la muestra 2.1, lo que puede indicar presencia de contaminantes en las tres muestras (1.1 1.2 y 2.2). En el caso de RNA se puede ver que las ratio de las muestras es inferior a 2.0 lo que también indica la presencia de contaminantes.

En cuanto a la ratio 260/230 tendría que estar entre 2.9-2.2 pero se puede ver que está muy por debajo en ambos tipos de ácido nucleico lo que también indica presencia de contaminantes que absorben a 230nm

#### **4.2 COMPROVACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN EXTRAÍDO.**

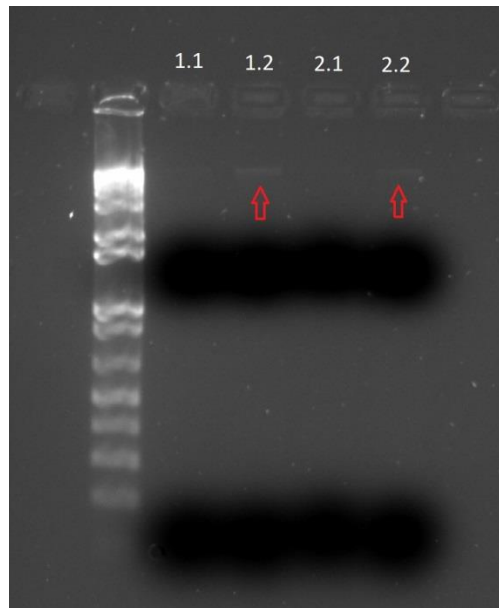
A la vista de los resultados de las pruebas N<sup>o</sup>1 y 2 con concentraciones bajas de ADN y ARN y unas ratios malas se realiza una electroforesis en un gel de agarosa para comprobar la calidad del ADN extraído de las muestras tratadas en dichas pruebas (1A, 2A, 3A, 1B, 2B, 3B, 2.2Af, 3.2Af y Nonucleasas).



**Imagen 1:** gel de agarosa para ver la calidad del ADN extraído de las VLP.

Se puede observar en la fotografía del gel las muestras 2.2Af y 3.2Af tienen una banda tenue lo que indica presencia de ADN integro en estas muestras.

Posteriormente también se realiza una electroforesis en gel de agarosa de las muestras tratadas en la prueba 3.



**Imagen 2:** gel de agarosa para ver la calidad del ADN extraído de las VLP.

Como se puede observar en la fotografía del gel electroforético las muestras 1.2 y 2.2 son en las que se presenta una banda definida pero tenue, estas muestras son en las que se ha realizado una modificación en el protocolo de extracción de ácidos nucleico para tratar todo el volumen que se genera en el paso nº 6. En cambio en las muestras 1.1 y 2.1 no se puede apreciar ninguna banda, estos resultados no concuerdan con los obtenidos en el NanoDrop ya que la muestra 2.1 es la que según la medida de este tiene mayor cantidad de ADN pero en el gel de agarosa no se observa ninguna banda por lo que podemos deducir que la muestra puede contener ADN que está degradado y no aparece una banda integra.

## 5. Conclusiones.

A la vista de los resultados obtenidos durante las diferentes pruebas realizadas de enriquecimiento viral se puede decir que la mejor metodología para la concentración de partículas víricas es la metodología B donde se emplea el polietilenglicol para la precipitación de las partículas víricas.

Pero tampoco se puede decir que se hayan obtenido buenos resultados en general ya que a la hora de hacer la cuantificación del ADN y ARN extraídos las cantidades de estos ácidos nucleicos ha sido muy pobre, otro factor que hay que tener en

cuenta es que el aparato empleado para la cuantificación de los ácidos nucleicos (NanoDrop) no es suficientemente sensible y su límite de detección es inferior a otras técnicas como es la qPCR (límite de detección 0.01 ng/ $\mu$ L.) por lo cual al cuantificar cantidades tan pequeñas no podemos afirmar que la concentración que nos da sea la correcta.

Analizando los posibles motivos por los cuales se hayan obtenido una extracción baja de ácidos nucleicos se puede decir que uno de ellos puede ser la escasez de partículas víricas en la muestra, por ello se pretende hacer un control. Para realizar el control se compra un bacteriófago y se amplifica para posteriormente elaborar muestras artificiales añadiendo una cantidad conocida de fago y proceder con las dos metodologías de enriquecimiento viral y posterior extracción de ácidos nucleicos.

En un principio se podría pensar que otro de los posibles motivos por el que se obtiene una mala cuantificación sea el kit empleado para la extracción de los ácidos nucleicos, ya que este puede no ser efectivo o también que alguno de los reactivos empleados durante la extracción este contaminando la muestra a la hora de hacer la cuantificación y enmascaren los resultados, pero al observar los resultados en el gel de agarosa se puede ver que no es el caso ya que en muy pocas muestras se observa una banda de ADN.

## **6. Bibliografía.**

- Aggarwala, V., Liang, G., & Bushman, F. D. (2017). Viral communities of the human gut: metagenomic analysis of composition and dynamics. *Mobile DNA*, 8(1), 12.
- Bonilla, N., Rojas, M. I., Cruz, G. N. F., Hung, S. H., Rohwer, F., & Barr, J. J. (2016). Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ*, 4, e2261.
- Chang, C., & Lin, H. (2016). Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 3-15.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270
- Hall, R. J., Wang, J., Todd, A. K., Bissielo, A. B., Yen, S., Strydom, H., ... & Peacey, M. (2014). Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of

- viruses prior to metagenomic virus discovery. *Journal of virological methods*, 195, 194-204.
- Heider, S., & Metzner, C. (2014). Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology*, 462, 199-206.
- Hjelmsø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., ... & Abril, J. F. (2017). Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PloS one*, 12(1), e0170199.
- Iker, B. C., Bright, K. R., Pepper, I. L., Gerba, C. P., & Kitajima, M. (2013). Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples. *Journal of virological methods*, 191(1), 24-30.
- Kim, M. S., Park, E. J., Roh, S. W., & Bae, J. W. (2011). Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), 8062-8070.
- Kleiner, M., Hooper, L. V., & Duerkop, B. A. (2015). Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC genomics*, 16(1), 7.
- Kramná, L., Kolářová, K., Oikarinen, S., Pursiheimo, J. P., Ilonen, J., Simell, O., ... & Cinek, O. (2015). Gut virome sequencing in children with early islet autoimmunity. *Diabetes care*, 38(5), 930-933.
- Li, L., Deng, X., Mee, E. T., Collot-Teixeira, S., Anderson, R., Schepelmann, S., ... & Delwart, E. (2015). Comparing viral metagenomics methods using a highly multiplexed human viral pathogens reagent. *Journal of virological methods*, 213, 139-146.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31.
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., ... & Stappenbeck, T. S. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, 160(3), 447-460.
- Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., ... & Gazzaruso, C. (2018). Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*, 1-15. 1
- Qiu, Y., Chen, J. M., Wang, T., Hou, G. Y., Zhuang, Q. Y., Wu, R., & Wang, K. C. (2017). Detection of viromes of RNA viruses using the next generation sequencing libraries prepared by three methods. *Virus research*, 237, 22-26.

- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13(1), 341.
- Reyes, A., Semenkovich, N. P., Whiteson, K., Rohwer, F., & Gordon, J. I. (2012). Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 607.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., ... & Hoon, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348.
- Scarpellini, E., Ianiro, G., Attili, F., Bassanelli, C., De Santis, A., & Gasbarrini, A. (2015). The human gut microbiota and virome: potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*, 47(12), 1007-1012
- Thurber, R. V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L., & Rohwer, F. (2009). Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nature protocols*, 4(4), 470.
- van Leeuwen, M., Williams, M. M., Koraka, P., Simon, J. H., Smits, S. L., & Osterhaus, A. D. (2010). Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples. *Journal of clinical microbiology*, 48(5), 1787-1794.