



Universidad del  
**Rosario**



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA Y  
BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

## **Análisis Metagenómico del Viroma Intestinal en Pacientes Intrahospitalarios y de Unidad de Cuidados Intensivos de Bogotá, Colombia**

**Angie Lorena Ramírez Hernández**

**Universidad del Rosario  
Facultad de Ciencias Naturales  
Bogotá, Colombia  
2024**

**Análisis Metagenómico del Viroma Intestinal en Pacientes  
Intrahospitalarios y de Unidad de Cuidados Intensivos de Bogotá, Colombia**

**Angie Lorena Ramírez Hernández**

tesis presentada como requisito para obtener el título de:

**Magister en Ciencias Naturales**

Director

Juan David Ramírez, Ph.D.  
Profesor Titular  
Facultad de Ciencias Naturales  
Universidad del Rosario

Co-director

Marina Muñoz Díaz, Ph.D.  
Profesora Asociada  
Instituto de Biotecnología (IBUN)  
Universidad Nacional de Colombia

**Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias Naturales  
Universidad del Rosario  
Bogotá, Colombia  
2024**

## AGRADECIMIENTOS

*Mi más sincero agradecimiento a la Universidad del Rosario y a la Facultad de Ciencias Naturales, por proporcionarme el espacio y el apoyo necesario para llevar a cabo este proyecto. También agradezco al Hospital Mederi y a cada uno de los trabajadores y pacientes cuya colaboración hizo posible la materialización de este proyecto.*

*A mi director y co-directora, les agradezco profundamente por ser una fuente de inspiración, apoyo y guía en este camino para hacer ciencia. Gracias por enseñarme que no hay límites cuando se trata de perseguir nuestros sueños.*

*A mis compañeros y amigos, especialmente a Luisa, Carolina y Felipe, les agradezco no solo por su colaboración en los análisis, sino también por su apoyo y amistad.*

*Un agradecimiento especial a mi madre, cuyo amor incondicional, esfuerzo y motivación han sido mi mayor fortaleza para alcanzar este logro.*

*A mi pareja por estar siempre a mi lado, brindándome su apoyo y aliento para seguir adelante en los momentos más desafiantes.*

*Finalmente, dedico este trabajo a la memoria de mi padre, cuya ausencia física no ha sido obstáculo para que su recuerdo siga siendo una fuente de motivación para dar lo mejor de mí en cada paso que doy.*

## **Análisis Metagenómico del Viroma Intestinal en Pacientes Intrahospitalarios y de Unidad de Cuidados Intensivos de Bogotá, Colombia**

Angie L Ramírez<sup>1</sup>, Luisa Páez<sup>1</sup>, Laura Vega<sup>1</sup>, Viviana Aya<sup>1</sup>, Carolina Hernández<sup>1,3</sup>, Nicolas Luna<sup>1</sup>, Claudia Marina Muñoz<sup>2</sup>, Juan David Ramírez<sup>3\*</sup>

### **Afiliaciones:**

1. Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología-UR (CIMBIUR), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia
2. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
3. Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

\*Autor de correspondencia: [juand.ramirez@urosario.edu.co](mailto:juand.ramirez@urosario.edu.co),

[juan.ramirezgonzalez@mssm.edu](mailto:juan.ramirezgonzalez@mssm.edu)

### **RESUMEN**

El microbioma intestinal se encuentra ampliamente estudiado; sin embargo, el componente viral ha sido poco caracterizado a pesar de ser crucial en la homeostasis intestinal. Este estudio analizó el viroma intestinal de muestras fecales humanas ( $n=37$ ) de pacientes en Unidad de Cuidados Intensivos – “UCI” ( $n=10$ ), pacientes “hospitalizados” en servicios diferentes a UCI ( $n=13$ ), y en individuos de “comunidad” saludables ( $n=14$ ), utilizando secuenciación por Oxford Nanopore Technologies (ONT) e Illumina. En promedio, se obtuvo 161,855 lecturas por muestra usando secuenciación por ONT, de las cuales cerca del 0,03% correspondió a lecturas virales. Para el caso de Illumina, se obtuvo alrededor de 20.286.589 lecturas por muestra, donde alrededor del 0,1% fueron asignadas a virus. Se identificaron bacteriófagos del orden Caudovirales, incluyendo Myoviridae, Podoviridae y Siphoviridae como las principales familias virales. Aunque la mayoría de las familias virales se mantuvieron estables, se observó una disminución significativa de Microviridae en pacientes hospitalizados y de UCI, sugiriendo un desequilibrio asociado al ambiente intrahospitalario. De los profagos detectados en Genomas Ensamblados a partir de Metagenomas (MAGs) bacterianos, llamó la atención la presencia de dos familias virales (Myoviridae y Siphoviridae) en la misma especie bacteriana, *Alistipes putredinis*. Los resultados sugieren que las

interacciones bacteria-bacteriófago pueden no ser siempre específicas de especie, destacando la complejidad de las interacciones microbianas en el intestino humano. Estos hallazgos representan una línea base hacia la comprensión de la influencia de un ambiente intrahospitalario en la composición del viroma intestinal. Se necesitan investigaciones adicionales que permitan comprender a profundidad cómo estos cambios pueden afectar la salud del hospedero, especialmente en entornos clínicos.

**PALABRAS CLAVE:** Viroma intestinal, Microviridae, Metagenómica, Ambiente hospitalario, profagos

### **ABSTRACT**

The intestinal microbiome has been extensively studied; however, the viral component has been poorly characterized despite its crucial role in intestinal homeostasis. This study analyzed the intestinal virome of human fecal samples ( $n=37$ ) from patients in Intensive Care Units (ICU) ( $n=10$ ), patients "hospitalized" in non-ICU settings ( $n=13$ ), and healthy "community" individuals ( $n=14$ ), using sequencing by Oxford Nanopore Technologies (ONT) and Illumina. On average, 161,855 reads per sample were obtained using ONT sequencing, of which approximately 0.03% corresponded to viral reads. For Illumina, around 20,286,589 reads per sample were obtained, of which approximately 0.1% were assigned to viruses. Bacteriophages of the order Caudovirales, including Myoviridae, Podoviridae, and Siphoviridae, were identified as the main viral families. Although most viral families remained stable, a significant decrease in Microviridae was observed in hospitalized and ICU patients, suggesting an imbalance associated with the intrahospital environment. Of the prophages detected in Assembled Genomes from Bacterial Metagenomes (MAGs), the presence of two viral families (Myoviridae and Siphoviridae) in the same bacterial species, *Alistipes putredinis*, was noteworthy. The results suggest that bacteria-phage interactions may not always be species-specific, highlighting the complexity of microbial interactions in the human intestine. These findings represent a baseline for understanding the influence of an intrahospital environment on the composition of the intestinal virome. Further research is needed to fully understand how these changes may affect host health, especially in clinical settings.

**KEYWORDS:** Intestinal virome, Microviridae, Metagenomics, Hospital environment, prophages

## INTRODUCCIÓN

El microbioma intestinal está compuesto por arqueas, bacterias, eucariotas, virus, sus metabolitos y genes, todos ellos reconocidos como elementos clave para la homeostasis intestinal (1–4). La interacción hospedero-microbiota, a través de la producción de metabolitos, contribuye a la homeostasis metabólica, energética e inmune (1,5,6). Por esta razón, se considera un modulador clave en la salud humana en la que eventos de disbiosis, definidos como desequilibrios en la composición microbiana, representan un factor asociado a diversas enfermedades (7,8) incluyendo la enfermedad celiaca, el síndrome de intestino irritable, cáncer colorrectal, enfermedades hepáticas crónicas y trastornos pancreáticos (9–13). Muchas de estas enfermedades se relacionan con alteraciones en la abundancia de microorganismos comensales que termina favoreciendo la colonización por patógenos oportunistas (8,14).

Aunque la mayoría de estudios se han centrado en el componente bacteriano del microbioma, el entendimiento de las comunidades virales es un campo emergente (14,15). Específicamente, las comunidades virales en órganos implicados en los procesos de digestión resultan de particular interés (16–18). A este conjunto de virus se le conoce como viroma intestinal, el cual comprende virus que infectan bacterias (bacteriófagos) principalmente del orden Caudovirales y la familia Microviridae, así como virus que infectan células eucariotas, entre los que se incluyen los órdenes Herpesvirales, Picornavirales y Tymovirales (14,15,18,19).

Los bacteriófagos son el componente más representativo del viroma intestinal y desempeñan un papel crucial en el control de la diversidad y abundancia de especies bacterianas (20–24). Además de lisar bacterias, los bacteriófagos pueden modular la estructura genética poblacional bacteriana a través de la transferencia de genes, e incluso pueden llegar a codificar para funciones accesorias para sus hospederos (22,25,26). Por ejemplo, se ha encontrado que la presencia de profagos en bacterias puede facilitar la colonización, invasión celular y adhesión bacteriana (27) (28), permitir resistencia a fagocitosis (29), producir toxinas (30), y alterar la susceptibilidad a antibióticos (31).

En menor abundancia, el intestino humano también se encuentra colonizado por virus que infectan eucariotas, incluyendo a las familias Anelloviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Papillomaviridae, Polyomaviridae y Circoviridae (32–36). La colonización por estos virus también puede estar involucrada en el mantenimiento de la homeostasis intestinal

y la inmunidad del hospedero (37,38). Lo anterior ha sido investigado en ratones, donde la depleción de estos virus exacerba procesos de inflamación, mientras que el tratamiento con ligandos virales es un factor protector contra enfermedades (38).

Debido a la naturaleza e inestabilidad de su genoma, los virus de ARN son más difíciles de identificar, por lo cual han sido menos estudiados (39). Algunos de estos virus incluyen miembros de las familias Caliciviridae, Picornaviridae y Reoviridae (24,33,40). Uno de los mecanismos por los cuales podrían beneficiar su hospedero es a través de la interferencia con procesos biológicos de otros virus (34). Por ejemplo, la infección con el virus de la hepatitis G ha demostrado retrasar la progresión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a SIDA -síndrome de inmunodeficiencia adquirida- (41). Otra hipótesis plantea que algunos virus de ARN y ADN pueden favorecer la eliminación de patógenos por inmunidad cruzada. En un estudio realizado por Barton y colaboradores en 2007, la infección con el *herpesvirus gamma* murino confirió protección cruzada a los ratones contra bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* y *Yersinia pestis* (42). Sin embargo, el papel fisiológico definitivo de los virus de ARN y ADN en los humanos sigue siendo desconocido para la mayoría de las comunidades virales a nivel intestinal.

En individuos saludables, se ha descrito que los bacteriófagos son principalmente lisogénicos, proceso durante el cual pueden integrar su material genético al genoma de su hospedero, manteniéndose en estado de latencia como profagos (43,44). En ausencia de enfermedad, las poblaciones de bacteriófagos entéricos son temporalmente estables; sin embargo, frente a estímulos estresantes como la exposición a antibióticos, pueden inducir el cambio a ciclos líticos, afectando la composición bacteriana intestinal y dando lugar a estados de disbiosis (39,44–49).

La diarrea es una de las condiciones en la que se generan eventos de disbiosis que afectan la riqueza y diversidad microbiana (50–53). En hospitales, la alta incidencia de episodios de diarrea puede relacionarse con infecciones adquiridas durante la estancia intrahospitalaria (54,55). Estas infecciones generan como consecuencia disbiosis intestinal que puede favorecer la adquisición de infecciones secundarias o el desarrollo de enfermedades (46,47,56). Frente a esto, una de las terapias que se ha planteado es el uso de trasplantes de microbiota fecal como estrategia para reconstituir la composición de procariontes a nivel intestinal (57,58). Sin embargo, investigaciones recientes apuntan a que virus constituyentes de una microbiota saludable también pueden favorecer el restablecimiento del estado de homeostasis (47,59–61). Por ejemplo, en un estudio realizado por Ott y colaboradores, se encontró que los bacteriófagos de filtrados estériles de heces

de donantes de microbiota intestinal (FFT) pueden revertir la disbiosis asociada con la infección por *Clostridioides difficile* (CDI). Esto puede ocurrir mediante la transferencia de partículas virales en los FFTs o por transducción, lo que podría contribuir a una resolución de la disbiosis (60).

En Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) se estima que alrededor del 40% de los pacientes desarrollan diarrea de origen infeccioso (55,62). Como consecuencia, estas infecciones son tratadas con antibióticos que puede potenciar la alteración de la composición de la microbiota intestinal (63,64). El impacto de dichas alteraciones sobre la composición del microbioma viene siendo abordado principalmente a nivel de bacterias, para las cuales existe una gran cantidad de estudios en pacientes con diarrea; mientras que las afectaciones en el viroma siguen siendo desconocidas. Sin embargo, es plausible pensar que cambios en la estructura de las comunidades virales pueden ser secundarias al uso de antibióticos (31,65,66).

Considerando que: i) los virus son importantes como constituyentes de un viroma intestinal en la homeostasis intestinal, ii) las alteraciones en las comunidades virales pueden afectar otros componentes del microbioma, iii) el viroma representa un potencial emergente para el restablecimiento de la homeostasis posterior a la disbiosis intestinal causada por patógenos y, iv) existe un desconocimiento de las comunidades virales en episodios de diarrea; en este estudio nos propusimos caracterizar el viroma intestinal de pacientes en tres grupos: UCI, hospitalizados en servicios hospitalarios diferentes a UCI y en individuos saludables de comunidad, usando una estrategia metagenómica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Consideraciones éticas**

La colecta de muestras y datos clínicos se llevaron a cabo en el marco del proyecto “*Descripción del Metagenoma intestinal de pacientes con diarrea atendidos en el hospital Universitario Mayor Méderi*” bajo la aprobación DVO005 1856-CV1493 del comité de ética en investigación de la Universidad del Rosario (CEI-UR).

Este proyecto es considerado de riesgo mínimo según lo establecido en la resolución 008430 de 1993 sobre las “normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”. Las muestras fecales fueron recolectadas con el consentimiento explícito de cada paciente.

### **Toma de muestras y criterios de inclusión**

Se recolectaron un total de 23 muestras de heces humanas de pacientes provenientes del Hospital Universitario Mayor – Méderi en Bogotá, Colombia. Estos pacientes compartían la característica común de sufrir de diarrea, definida como una evacuación de tres o más heces no formadas en un periodo de 24 horas consecutivas o menos (67). Se estableció la población intrahospitalaria cuando el paciente permaneció dos días o más en los diferentes servicios dentro del centro de salud, como se describió anteriormente (68). Las muestras intrahospitalarias se dividieron en dos grupos: 10 muestras provenientes de pacientes en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y 13 muestras de pacientes “hospitalizados” que permanecieron en servicios diferentes a UCI. La información clínica se recolectó individualmente para cada paciente y fue aprobada por el comité de ética. Los datos se consolidaron y se detallan en la tabla suplementaria 1.

Por otro lado, se incluyeron 14 muestras adicionales de individuos de comunidad aparentemente saludables (en adelante comunidad) que no presentaban enfermedades crónicas o agudas como parte del proyecto. Para la selección de estos individuos, se consideraron los siguientes criterios de inclusión: i) ausencia de episodios de diarrea, ii) no haber consumido medicamentos, antibióticos, desparasitantes o laxantes en las últimas 12 semanas, y iii) tener hábitos intestinales consistentes, entendidos como evacuaciones regulares.

### **Extracción de ácidos nucleicos y secuenciación de lecturas largas y cortas**

Con el objetivo de identificar secuencias virales, se llevó a cabo la extracción de ARN/ADN viral de las 37 muestras fecales colectadas usando el kit Quick-DNA/RNA MagBead (Zymo Research, Irvine, California, Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se procesó 250 mg de heces por muestra con perlas de disrupción mecánica en 200µL de buffer de lisis viral. las muestras se homogeneizaron durante 5 minutos a 30 Hz utilizando un disruptor TissueLyser II y fueron procesadas en el Hamilton Genomic Starlet, siguiendo el protocolo de extracción del kit.

Posteriormente, los ácidos nucleicos extraídos fueron procesados con el objetivo de sintetizar cDNA. Para ello, se utilizó el protocolo de Random Hexámeros con Super Script IV (Invitrogen). La cuantificación del material genético se realizó antes y después del procedimiento utilizando el Qubit 3.0 (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, se llevó a cabo secuenciación por ONT, para lo cual se llevó a cabo la reparación de extremos de los fragmentos de cDNA obtenido del paso anterior usando el módulo NEBNext® Ultra™

II End Repair/dA-Tailing (New England Biolabs). Cada muestra fue luego marcada con un barcode único para su identificación como paso previo al multiplexado durante la secuenciación, y como estrategia para recuperar los datos individuales a nivel bioinformático, para lo cual se usó el Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114.96), compatible con la química R10.4.1 de ONT. Los pasos de limpieza de secuencias a las que no se unieron los barcodes o los adaptadores fueron realizados usando perlas AMPure XP de Beckman Coulter (69). Las librerías se cargaron al MinION en una celda de flujo FLO-MIN114 compatible con la química del Kit 14 de ONT, la cual genera datos con una precisión de lectura Q20+ (99%) (70,71). La secuenciación se llevó a cabo por 72 horas y se visualizó en tiempo real a través del software MinKNOW V23.07.12.

De forma paralela, con el objetivo de identificar profagos en especies bacterianas, se llevó a cabo una extracción de ADN en las muestras fecales usando el Stool DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canada). Las muestras de ADN fueron enviadas a Novogene (Sacramento, California, USA) para la secuenciación metagenómica a través de la plataforma NovaSeq 6000, empleando lecturas pareadas de 150pb obteniendo una cantidad promedio de 4Gb de datos por muestra.

Previo a la secuenciación por cualquiera de las plataformas, se evaluó la cantidad de los ácidos nucleicos extraídos) usando el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), se calculó la relación de absorbancia 260/280 para determinar índices de calidad de las extracciones y se realizó la evaluación de integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

### **Pre-procesamiento bioinformático**

Para las lecturas obtenidas por ONT, se realizó el basecalling de los archivos Fast5 desde el MinION usando la opción High Accuracy en el software Guppy V.7.1.4 con el objetivo de transformar las señales eléctricas en bases translocadas durante la secuenciación. El demultiplexing se llevó a cabo en el software Guppy V.7.1.4 donde se filtraron lecturas de baja calidad ( $Q < 7$ ). El conjunto de lecturas obtenido se sometió a análisis estadístico de la secuenciación para determinar los puntajes de calidad y longitud promedio utilizando la herramienta NanoStat (<https://github.com/wdecoster/nanostat>).

Por otra parte, las lecturas cortas de Illumina fueron procesadas para verificar la calidad de los reads usando las herramientas FastQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) y MultiQC

(<https://github.com/MultiQC/MultiQC>). Los adaptadores fueron removidos y se eliminaron las lecturas de baja calidad usando Trimmomatic V.0.38.

Con el objetivo de remover secuencias correspondientes al hospedero, se llevó a cabo un mapeo al genoma de referencia humano (Refseq GCF\_000001405.40) en las lecturas obtenidas de ambas plataformas de secuenciación, utilizando el software Minimap2 V.2.24 (<https://github.com/lh3/minimap2>) para ONT y Bowtie2 V.2.4.4 para Illumina. Además, se realizó un mapeo a la base de procariotas SILVA\_138.1 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-1381/>), con el fin de remover secuencias bacterianas. Las lecturas filtradas fueron empleadas en análisis posteriores.

## **Análisis basado en Reads**

### **Perfilamiento taxonómico**

Se utilizó el clasificador de secuencias Centrifuge (72) para asignar taxonómicamente las lecturas obtenidas por ONT e Illumina. Para esto, se empleó la base de datos de referencia del clasificador, la cual incluye secuencias virales, procariotas y eucariotas. Para este análisis se consideró una única asignación para cada lectura y se aplicó un filtro a través del cual se buscaba una coincidencia mínima de 100 ( $\text{HitLength} > 100$ ) entre la lectura secuenciada y la de la base de referencia siguiendo la estructura de comando "centrifuge -p 8 --min-hitlen 100 -k 1 -x" (73). Los resultados obtenidos por centrifuge fueron convertidos a formato kraken usando el comando Centrifuge-kreport y se visualizaron a través de la herramienta en línea Pavian (<https://fbreitwieser.shinyapps.io/pavian/>). Las lecturas asignadas a familias y géneros virales fueron convertidas a recuentos en valores de abundancia relativa, definida como la proporción de la familia/género viral de interés respecto al total de familias/géneros virales, para la evaluación de su presencia a nivel de cada muestra. Los gráficos de barras de abundancia se generaron y visualizaron utilizando el paquete ggplot2 en RStudio (<http://www.rstudio.com/>). Se evaluaron las diferencias en abundancias relativas de familias virales usando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, en la que se consideraron diferencias significativas cuando el *p-value* era menor a 0.05. Para evaluar diferencias pareadas entre grupos, se realizaron pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney en la que se consideraron diferencias significativas cuando el *p-value* era menor a 0.05.

## **Análisis basado en Ensamblajes**

### **Ensamblajes virales a partir de lecturas largas**

Se llevaron a cabo ensamblajes de genomas virales a partir de lecturas obtenidas por ONT concatenando los reads de acuerdo con cada uno de los grupos: UCI, hospitalizados y comunidad. Los ensamblajes virales fueron construidos usando la herramienta en línea Genome Detective Virus (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/virus/>), a partir de la cual se seleccionaron ensamblajes de buena calidad considerando como parámetros el porcentaje de identidad de nucleótidos >80% y una cobertura >75% respecto al genoma de referencia de la especie viral (74). Los ensamblajes parciales fueron visualizados usando la herramienta en línea Proksee (<https://proksee.ca/>).

### **Análisis filogenéticos**

Se realizó un análisis filogenético de los genomas virales ensamblados con Genome Detective que fueron identificados en más de uno de los grupos de estudio, con el objetivo de investigar las relaciones entre estas secuencias y otras taxonómicamente cercanas disponibles en repositorios de datos públicos. Para esto, se descargaron secuencias del gen de la subunidad grande de la terminasa, un gen utilizado tradicionalmente para revelar relaciones taxonómicas y evolutivas entre bacteriófagos (75), consignadas en NCBI para la subfamilia Crudevirinae, así como para la clase Caudoviricetes. En este último, para una mejor visualización de las relaciones filogenéticas, se seleccionaron secuencias representativas de los géneros más cercanos a *Mushuvirus* encontrado en dos de los grupos evaluados. Las secuencias fueron alineadas usando MAFFT V7.407 con la opción “—auto” con el objetivo de determinar la mejor configuración de alineación de acuerdo con la longitud, divergencia evolutiva y tamaño de las secuencias de entrada. El alineamiento fue empleado para la construcción de un árbol de máxima verosimilitud (ML) en IQ-TREE multicore (v1.6.12), utilizando el mejor modelo de sustitución y otros parámetros con valores predeterminados. El árbol filogenético fue visualizado y representado gráficamente usando Interactive Tree Of Life (iTOL) v5.

### **Ensamblaje de MAGs e identificación de profagos**

Se llevó a cabo el ensamblaje *de novo* de MAGs bacterianos usando los reads obtenidos por Illumina usando MetaSPAdes V.3.15.3. Para esto, se realizó el agrupamiento de secuencias por similitud o binning, haciendo uso de MetaBAT (<https://github.com/linsalrob/ComputationalGenomicsManual/blob/master/CrossAssembly/Meta>

bat.md), Concoct (<https://github.com/BinPro/CONCOCT>) y MaxBin (<https://github.com/metagenomics/metagenomics-workshop/blob/master/docs/binning/maxbin.rst>). Los bins generados fueron refinados usando DASTool ([https://github.com/cmks/DAS\\_Tool](https://github.com/cmks/DAS_Tool)) con el objetivo de mejorar la calidad y estimar la abundancia de los genomas representados en cada bin. Posteriormente, se evaluó la integridad y calidad de los bins usando CheckM. Los bins de alta calidad (completitud >90% y contaminación <5%) fueron filtrados y empleados en los análisis posteriores. La asignación taxonómica de los bins bacterianos se realizó usando el software GTDB-TK (<https://github.com/GenomeTools/GTDBTK>) y fueron filtrados para búsqueda de profagos. La visualización de los MAGs obtenidos fue realizada a través de la herramienta en línea Proksee (<https://proksee.ca/>), donde se realizó la búsqueda de profagos usando Phigaro (<https://github.com/bobeobibo/phigaro>). Los profagos identificados fueron corroborados por BLASTn usando los siguientes parámetros: porcentaje de identidad >80%, cobertura >75%, valor E  $\leq 0,0$ . Para esta búsqueda se seleccionó el método optimizado para secuencias muy similares (megablast), dirigido a Virus (taxid:10239).

## RESULTADOS

### Extracción de ácidos nucleicos y obtención de lecturas virales

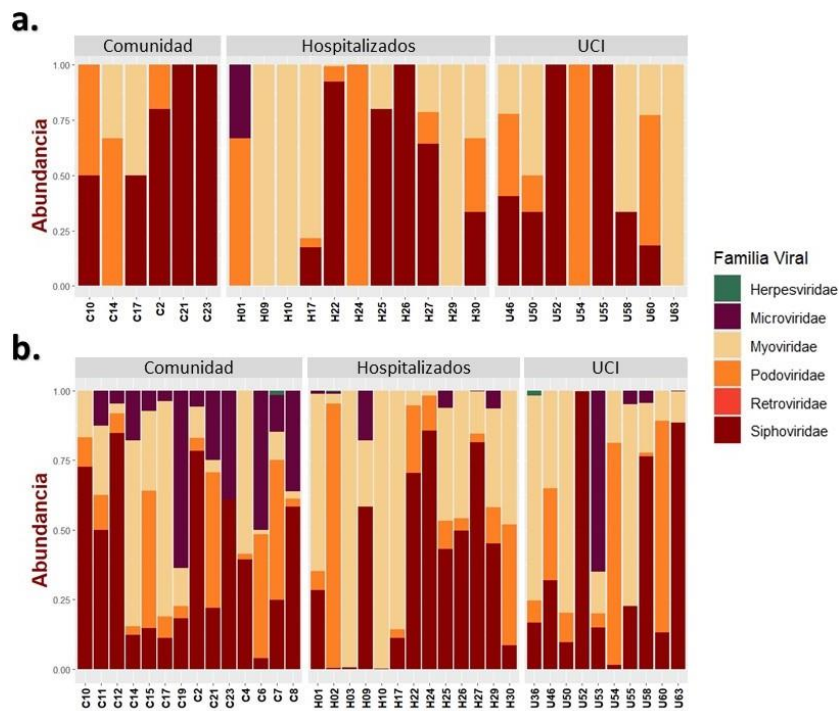
Se realizó la extracción ARN/ADN de 37 muestras fecales humanas procedentes de tres grupos de estudio: UCI, hospitalizados y comunidad, para los cuales se describió la composición del viroma intestinal a partir de dos tecnologías de secuenciación (ONT e Illumina).

En promedio, se obtuvo alrededor de 161,855 lecturas por muestra usando la tecnología de ONT, con una longitud y calidad promedio de 315.6 y 14.7, respectivamente. Se realizó una limpieza de las lecturas bacterianas y del hospedero, seguida de la asignación taxonómica y la visualización de los datos a través de Pavian. Tras este proceso, se logró obtener en promedio 109,867 lecturas por muestra de las cuales alrededor el 0.03% correspondió a lecturas virales (~234 lecturas,  $SD=244$ ). Por otro lado, para la secuenciación con Illumina, se obtuvo en promedio alrededor de 20,286,589 lecturas por muestra de alta calidad (Phred score > 30). Se realizó la limpieza de las lecturas del hospedero y se asignó taxonómicamente los datos usando Pavian. Tras el proceso de asignación, se obtuvo alrededor del 22.8% de lecturas bacterianas y cerca del 0.1% de lecturas virales (~771,109 lecturas,  $SD = 104,219$ ).

## Asignación taxonómica

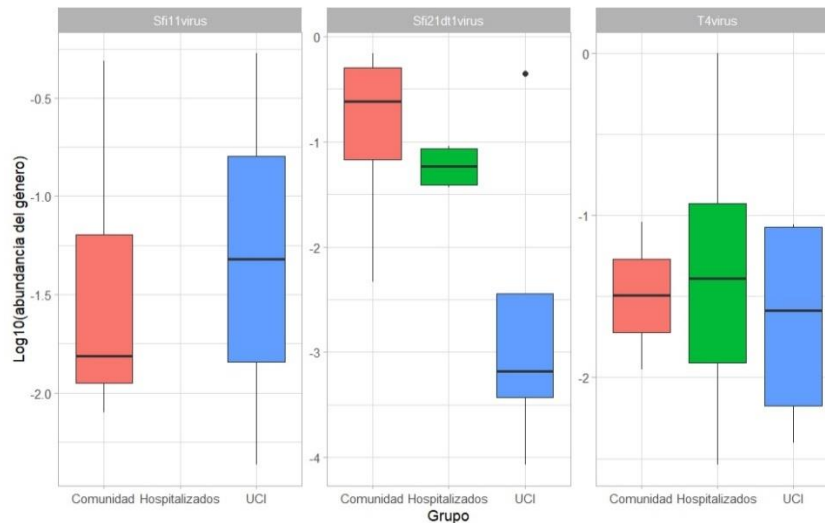
Las familias virales más abundantes para los tres grupos de estudio fueron clasificadas y graficadas considerando las dos tecnologías de secuenciación usadas (Figura 1). Durante el análisis, se observó una mayor dominancia de ciertas familias virales, especialmente aquellas asociadas a bacteriófagos. Entre los virus de ADN de cadena doble (dsDNA), se identificaron las familias Siphoviridae, Myoviridae, Podoviridae y Herpesviridae (Figura 1a y 1b). También se detectó la presencia de la familia de ADN monocatenario Microviridae. La asignación taxonómica mediante ambas tecnologías de secuenciación fue concordante; no obstante, Illumina permitió la identificación de un mayor número de familias virales.

En general, las abundancias estuvieron dirigidas hacia bacteriófagos, destacando la mayor abundancia de Siphoviridae (~38%), seguida de Myoviridae (~32%), Podoviridae (~19%) y Microviridae (~10%). Sin embargo, únicamente la familia Microviridae mostró una reducción estadísticamente significativa en los grupos de hospitalizados y UCI en comparación con el grupo de comunidad (prueba de Kruskal-Wallis,  $p$ -value = 0.0089). Respecto a los virus de ARN, se logró detectar la familia viral Retroviridae (ssRNA-RT), pero esta no presentó diferencias significativas entre los grupos (Figura 1b).



**Figura 1.** Abundancias relativas de las familias virales más representativas del viroma intestinal, identificadas a partir de a) ONT y b) Illumina, asociadas a diferentes grupos de estudio: hospitalizados, UCI y comunidad. Para visualizar esta figura en alta resolución, dar click en el siguiente enlace: [Figuras](#)

El análisis de la abundancia relativa a un nivel taxonómico menor reveló diferencias significativas en tres géneros virales. Entre estos, el género *T4 virus* (Prueba Kruskal-Wallis,  $p$ -value = 0.02792) mostró una mayor abundancia en el grupo de hospitalizados respecto a los grupos de UCI y comunidad. Adicionalmente, a pesar de ser uno de los géneros más abundantes, *Sfi11virus* solo fue detectado en las muestras comunidad y UCI mas no en el grupo de hospitalizados. En el grupo de UCI este género presentó una mayor abundancia respecto al grupo de comunidad (Prueba Kruskal-Wallis,  $p$ -value = 0.02163). Finalmente, se encontraron cambios en las abundancias del género *Sfi21dt1virus* entre los grupos. En particular, se observó una reducción en la abundancia de este género en los grupos de hospitalizados y UCI respecto al grupo de comunidad (Prueba Kruskal-Wallis,  $p$ -value = 0.03864)

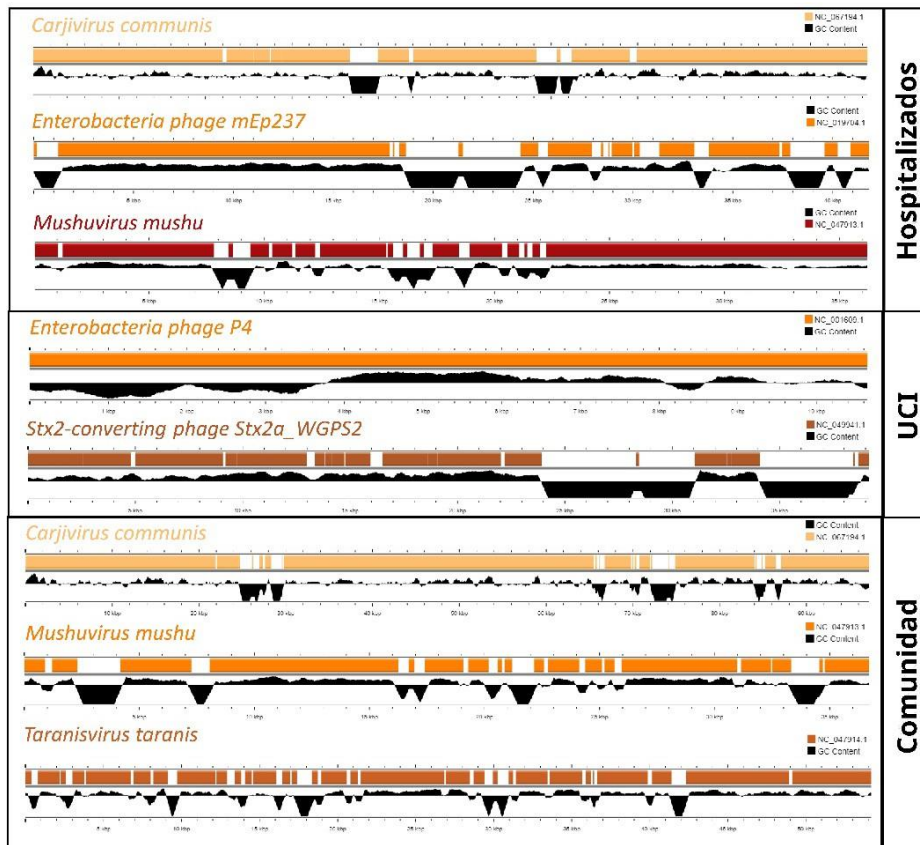


**Figura 2.** Boxplots de los géneros más abundantes encontrados en los tres grupos de estudio: comunidad, hospitalizados y UCI. Para visualizar esta figura en alta resolución, dar click en el siguiente enlace: [Figuras](#)

### Ensamblajes virales a partir de lecturas de ONT

Aprovechando la extensa longitud de algunas de las lecturas obtenidas por ONT, se utilizó la herramienta en línea Genome Detective para realizar el ensamblaje de genomas virales. Con el objetivo de aumentar el número de lecturas disponibles y, en consecuencia, mejorar la calidad de los ensamblajes, las muestras se agruparon de acuerdo con los grupos de estudio (Figura 3). Como

resultado, se lograron ensamblar genomas de alta calidad en los tres grupos (UCI, Hospitalizados, Comunidad), con un porcentaje de identidad de nucleótidos superior al 80% y una cobertura superior al 75%.



**Figura 3.** Ensamblajes virales obtenidos a través de Genome Detective para cada uno de los grupos de estudio. En la parte superior izquierda se indica la especie viral ensamblada. La cobertura del genoma es representada en colores de acuerdo con el genoma de referencia empleado para realizar el ensamblaje. Para visualizar esta figura en alta resolución, dar click en el siguiente enlace: [Figuras](#)

Del grupo de comunidad, se logró ensamblar el genoma de *Carjivirus communis* (anteriormente conocido como p-crAssphage) con un porcentaje de identidad respecto al genoma de referencia de la misma especie viral (NC\_067194.1) del 94,3% y una cobertura del genoma del 90,1%. Este virus es el bacteriófago más frecuentemente asociado a humanos, constituyendo el componente más destacado del viroma intestinal humano saludable (16). Además, dentro de este mismo grupo de individuos de comunidad, se recuperó el genoma del virus *Mushuvirus mushu*, un bacteriófago de bacterias comensales como *Faecalibacterium prausnitzii* (76) con un porcentaje de identidad del 94.2% y una cobertura del 79.9% respecto al genoma de referencia de la misma especie viral

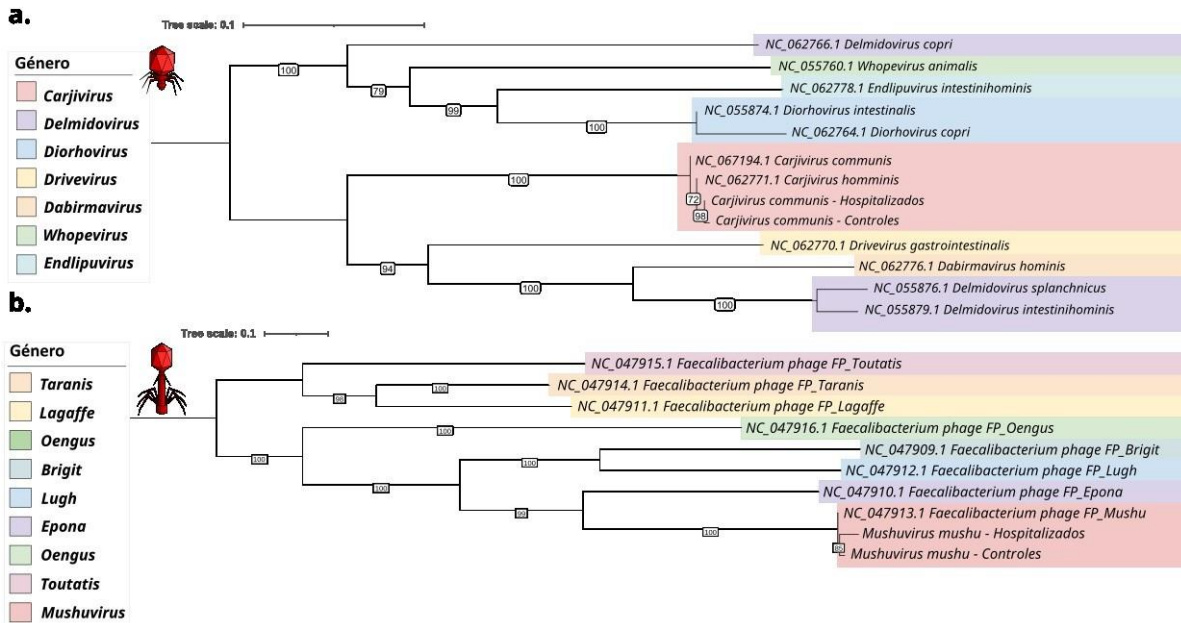
(NC\_047913.1). Por último, se ensambló el genoma del *Taranisvirus taranis* o *Faecalibacterium virus Taranis* (77) con un porcentaje de identidad del 85.7% y una cobertura del 86.5%.

En el grupo de hospitalizados, al igual que en el grupo de comunidad, se logró ensamblar los genomas del virus *Carjivirus communis* con una identidad del 92,4% y una cobertura del 94,5%, y el genoma del virus *Mushuvirus mushu* con una identidad del 91,6% y una cobertura del 86,6%. Además, se logró reconstruir el genoma de *Enterobacteria phage mEp237* con una identidad del 90,7% y una cobertura del 76,4%.

En el grupo de UCI, solo se lograron recuperar dos genomas asociados a bacteriófagos de Enterobacterias, posiblemente debido al menor número de lecturas por la cantidad de muestras incluidas en comparación con los otros dos grupos. El primer ensamblaje obtenido fue asignado al virus *Enterobacteria phage P4* (porcentaje de identidad = 93,8%, cobertura del genoma = 91,2%), mientras que el segundo MAG recuperado correspondió al *Stx2-converting phage Stx2a\_WGPS2* (identidad = 82,2%, cobertura = 80,2%).

Se realizó la reconstrucción filogenética para los MAGs virales obtenidos por Genome Detective a partir de secuencias parciales del gen de la subunidad grande de la terminasa (Figura 4). Se evaluó las relaciones filogenéticas respecto a otros géneros pertenecientes a rangos taxonómicos representativos de cada una de las especies virales encontradas aquí. Para el caso de *Carjivirus communis*, se obtuvieron dos ensamblajes del genoma viral en los grupos comunidad y hospitalizados. Se evaluaron las relaciones filogenéticas usando como ventana de observación el gen codificante para la subunidad grande de la terminasa, cuyas secuencias fueron extraídas de los MAGs obtenidos y comparadas con respecto a secuencias públicamente disponibles para otros géneros pertenecientes a la subfamilia Crudevirinae (Figura 4a). Se observó que las secuencias obtenidas en este estudio están estrechamente relacionadas entre sí, y estas, a su vez, se agruparon con otras secuencias del género *Carjivirus*, con un buen soporte de nodo (Bootstrap >75).

En la reconstrucción filogenética para visualizar las relaciones entre los virus *Mushuvirus mushu* ensamblados en este estudio y otros Caudoviricetes, se destacó un comportamiento similar (Figura 4b). Las secuencias aquí reportadas mostraron una estrecha relación con *Faecalibacterium phage mushu* (bootstrap >90), un bacteriófago de *Faecalibacterium prausnitzii* (78).



**Figura 4.** Relaciones filogenéticas para a) *Carjivirus communis* y b) *Mshuvirus mshu* encontrados en este estudio a partir del gen de la subunidad grande de la terminasa. Para visualizar esta figura en alta resolución, dar click en el siguiente enlace: [Figuras](#)

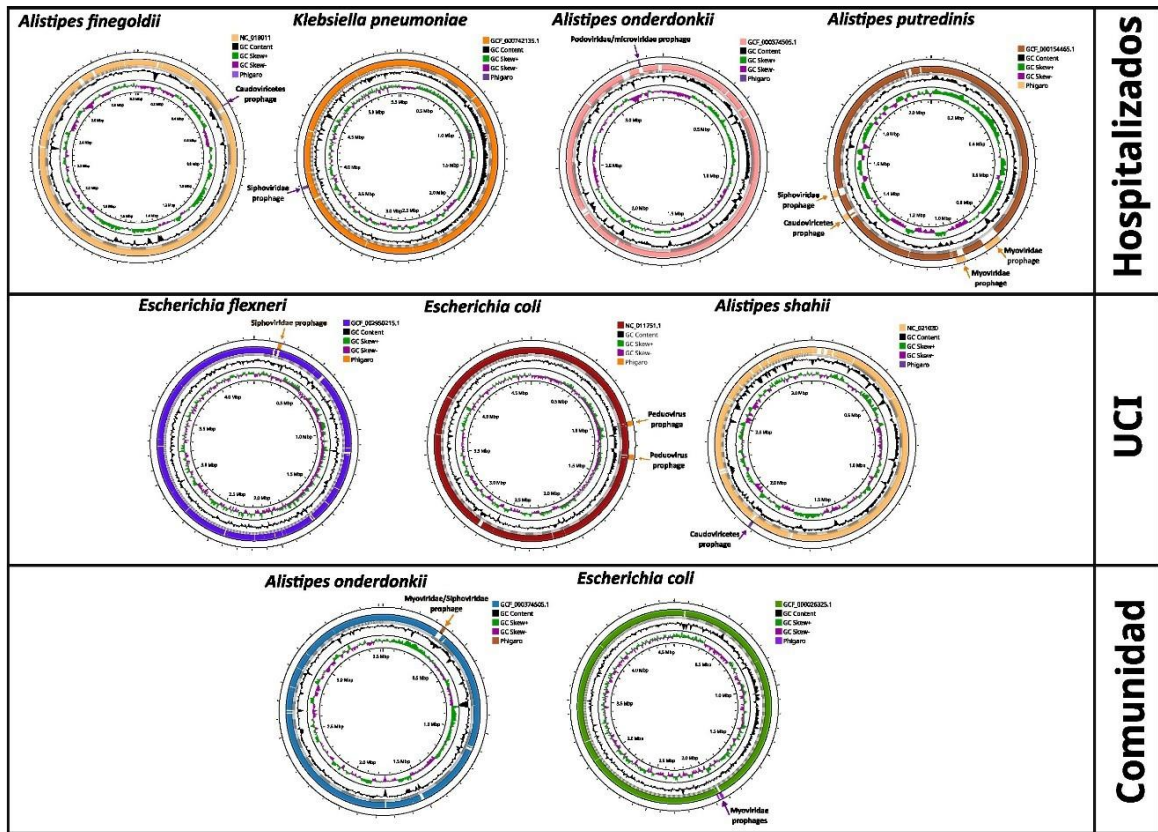
### Ensamblajes de genomas bacterianos para identificación de profagos

Se realizaron ensamblajes de genomas bacterianos obtenidos de lecturas cortas con el objetivo de identificar regiones de profagos (Figura 5). Los MAGs de alta calidad fueron filtrados (completitud > 90% y contaminación < 5%) y se seleccionaron genomas asignados a nivel de especie.

Los MAGs bacterianos se asignaron taxonómicamente y agruparon según el grupo de estudio (Figura 5). Se encontró que el género *Alistipes* fue ubicuo para los tres grupos, aunque la especie fue diferente de acuerdo con la condición de cada muestra: hospitalizado, UCI o comunidad. Por ejemplo, en hospitalizados se ensamblaron MAGs de *Alistipes finegoldii*, *Alistipes onderdonkii* y *Alistipes putredinis*, mientras que en UCI se identificó *Alistipes shashii* y en comunidad *Alistipes onderdonkii*.

Dentro de los MAGs bacterianos, se recuperaron secuencias correspondientes a profagos. Aunque para algunas regiones virales se logró realizar la asignación a nivel de género, en la mayoría solo se logró una asignación a nivel de familia o en algunos casos a nivel de clase (Figura 5). En el grupo de UCI se logró la mayor resolución taxonómica, donde se identificaron dos secuencias de profagos asociadas al género *Peduvirus* en *E. coli* que fueron concordantes con las secuencias de profagos encontradas en el MAG de comunidad las cuales fueron asignadas a la misma familia viral.

Se observó que las secuencias de profagos encontradas en los MAGs bacterianos fueron consistentes con las familias virales más abundantes identificadas durante el perfilamiento taxonómico realizado a partir de reads, como Siphoviridae y Myoviridae. Sin embargo, en algunos casos no fue posible determinar la familia viral, siendo asignados a la clase Caudoviricetes.



**Figura 5.** Mapa de genomas bacterianos ensamblados a partir de muestras de pacientes hospitalizados, en unidad de cuidados intensivos (UCI) y comunidad sanos. Las regiones asociadas a profagos fueron detectadas usando Phigaro y se indican con flechas en la posición en el genoma encontradas. Para visualizar esta figura en alta resolución, dar click en el siguiente enlace: [Figuras](#)

A pesar de tratarse del mismo género bacteriano, se identificaron secuencias de profagos de más de una familia viral, lo que podría sugerir que los fagos podrían no ser especie-específicos. Por ejemplo, en *Alistipes putredinis*, se detectaron cuatro regiones asociadas a profagos: dos concordantes con profagos de la familia Myoviridae, una asociada a Siphoviridae y otra sin una asignación taxonómica precisa, asociada a la clase Caudoviricetes. Sin embargo, en la mayoría de los casos la identificación de la familia de profagos asociada a la secuencia encontrada en cada MAG fue específica para la especie. Por ejemplo, en los grupos de UCI y de comunidad, se ensamblaron MAGs asignados taxonómicamente a *Escherichia coli*, en los cuales se identificaron profagos de la

familia Myoviridae. No obstante, los resultados sugieren que la familia viral puede no ser específica para el género bacteriano, ya que, en el grupo de UCI, se ensambló un MAG asociado a *Escherichia flexneri*, para el cual se identificó una región asociada a profagos de la familia Siphoviridae.

## DISCUSIÓN

A la fecha, este es el primer estudio dirigido a caracterizar los cambios en comunidades virales asociadas a pacientes con diarrea en condiciones intrahospitalarias en comparación con individuos de comunidad saludables. Para esto, se empleó una aproximación metagenómica dual usando secuenciación por ONT e Illumina, ofreciendo una visión detallada de los virus presentes en cada condición.

Los bacteriófagos son clave para regular la diversidad y abundancia bacteriana mediante ciclos líticos y lisogénicos (45,66). Esta dualidad permite que estas poblaciones virales modulen dinámicamente las comunidades bacterianas, influyendo así en la estabilidad y la ecología del microbioma (26). Por esta razón, no sorprende que la mayoría de los virus identificados en este estudio correspondieran a bacteriófagos, principalmente representados por las familias Siphoviridae, Myoviridae, Podoviridae y Microviridae independientemente de si se trataba de un paciente en condiciones intrahospitalarias o un paciente de comunidad aparentemente sano. Dicho resultado puede atribuirse a la amplia gama de hospederos potenciales en el ambiente intestinal, lo que favorece la alta presencia de estos virus que interactúan con las bacterias modulando su abundancia (47,66). Adicionalmente, este hallazgo coincide con investigaciones previas, en las que se reporta que el “viroma core” o viroma constitutivo de individuos sanos se encuentra principalmente compuesto por bacteriófagos cuyos procesos de replicación se relacionan a las poblaciones bacterianas (47,79–81).

Los microvirus son los bacteriofagos de ADN monocatenario más comúnmente encontrados en el intestino, desempeñando un papel crucial en la homeostasis intestinal, razón por la que se han propuesto como indicadores de eubiosis (43,82). En enfermedades intestinales y extraintestinales, como la diabetes pediátrica tipo 1 y la enfermedad inflamatoria intestinal, se ha observado una disminución drástica en su abundancia relativa (46,83,84). Este cambio en la composición del viroma intestinal se considera un factor de riesgo para enfermedades inflamatorias, donde la expansión de los fagos Caudovirales y la disminución de Microviridae son indicativos de desequilibrio (83). En pacientes UCI y hospitalizados, también se observó una reducción significativa de Microviridae en

comparación con el grupo de comunidad (Figura 1a y 1b), lo que sugiere una alteración en la estructura viral que podría contribuir a la progresión de infecciones o al desarrollo de enfermedades. Sin embargo, se requiere más investigación para determinar si la reducción de Microviridae es una consecuencia de las alteraciones en las poblaciones bacterianas y si estas comunidades virales están directamente implicadas en el desarrollo de enfermedades (24,85). Estudios *in vivo* con la manipulación controlada del viroma en modelos animales podrían proporcionar información sobre el papel de estos virus en la progresión de enfermedades y guiar futuras estrategias terapéuticas dirigidas a familias virales específicas.

La comprensión de las comunidades virales a un nivel taxonómico más preciso, idealmente hasta el nivel de especie, es esencial para identificar cambios específicos que puedan ser indicativos de condiciones de salud o enfermedad. Acá, se analizaron los géneros virales más representativos en el intestino, identificándose tres con diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se observó que el género *T4virus* presentaba una mayor abundancia en el grupo de pacientes hospitalizados en comparación con los grupos de UCI y comunidad (Figura 2). Aunque algunos estudios han asociado este género con bacteriófagos constitutivos de la mucosa rectal sana (86,87), otros sugieren una posible relación con enfermedades como la colitis ulcerativa. Por ejemplo, una investigación realizada por Zuo y colaboradores en individuos chinos, demostró que los pacientes con colitis ulcerativa tienen un aumento en la abundancia de bacteriófagos *T4virus*, así como una disminución en la diversidad y riqueza de Caudovirales en comparación con los controles sanos (88). Por lo tanto, la mayor abundancia de este género en el grupo de pacientes hospitalizados podría indicar un desequilibrio asociado típicamente con enfermedades intestinales.

Aunque las poblaciones virales suelen variar de un individuo a otro, el "viroma core" permanece estable (43,66,79). En este estudio, a pesar de las alteraciones en algunas comunidades virales, como la familia Microviridae, el resto se mantuvo invariable entre los grupos evaluados, independientemente de la condición (Figura 1b). Esto sugiere que, aunque las comunidades microbianas pueden ser afectadas por el uso de medicamentos y antibióticos en pacientes intrahospitalarios, la mayoría de las comunidades virales se mantienen estables. Sin embargo, es posible que una exposición prolongada a estas condiciones estresantes pueda provocar cambios adicionales que no fueron documentados debido a la naturaleza transversal del estudio.

Uno de los fagos más comúnmente encontrado en el viroma intestinal es el bacteriófago *crAssphage*, recientemente nombrado *Carjivirus communis*. Los Crassvirales, a los que pertenece, son frecuentes en el microbioma intestinal, representando hasta el 99% de las lecturas metagenómicas virales (89). Estos fagos son esenciales para el equilibrio del viroma intestinal, y su alteración se ha asociado con diversas enfermedades intestinales (81,90). En estudios de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y colitis ulcerosa, se ha observado una disminución de fagos similares a CrAss y Microviridae, identificados como componentes críticos del viroma intestinal en individuos sanos (91,92). Por lo tanto, la identificación del genoma de *Carjivirus communis* en el grupo de comunidad (Figura 3) no es sorprendente, considerando que hacen parte del viroma core intestinal humano (66,81). Sin embargo, llamó la atención que también se detectó en el grupo de hospitalizados, lo que llevó a investigar su relación con el ensamblaje obtenido del grupo de comunidad y con otras secuencias virales taxonómicamente cercanas. Se encontró que las especies virales identificadas en ambos grupos de estudio estuvieron más estrechamente relacionadas entre sí que con otros *Carjivirus* (Figura 4a), lo cual respalda la hipótesis de estabilidad del viroma core. Esta estabilidad se ha corroborado en estudios que han encontrado las mismas poblaciones virales hasta 4 años después del muestreo original (93). Además, estudios de colonización del viroma después del trasplante fecal (TMF) han demostrado que los crAssphages pueden establecerse y persistir a largo plazo en el intestino del receptor (94). Esto sugiere que estas poblaciones virales son lo suficientemente consistentes como para mantenerse incluso en el entorno intrahospitalario. Los resultados subrayan la importancia de identificar miembros constitutivos del viroma core, como los CrAssphages, para futuras aplicaciones terapéuticas, como la restauración de la homeostasis intestinal mediante FMT (92,93,95).

Una de las formas más fiables de confirmar la presencia de un virus en un grupo de estudio mediante secuenciación metagenómica es ensamblando parcial o completamente su genoma viral. En este estudio, se logró ensamblar el genoma de *Mushuvirus mushu*, un virus que infecta bacterias comensales intestinales, principalmente *Faecalibacterium prausnitzii*, una bacteria utilizada en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (96), en los mismos dos grupos anteriormente mencionados (97). Se realizó una reconstrucción filogenética para comprender las relaciones entre este virus y otros géneros de la clase Caudoviricetes (Figura 4b). Los resultados indican que los genomas de *Mushuvirus mushu* aislados de ambas condiciones estudiadas están estrechamente relacionados, lo que sugiere su invariabilidad a lo largo del tiempo. Se ha observado que, a pesar de 1300 años de evolución, el antiguo genoma de *Mushuvirus* comparte un 97.7% de identidad de

nucleótidos con su contraparte moderna (98). Sin embargo, actualmente, más allá de saber que es un bacteriófago de bacterias comensales, se desconoce el rol exacto de este fago en el viroma intestinal y si podría estar relacionado con enfermedades o formar parte del viroma core. Por lo anterior, se necesitan de investigaciones adicionales que confirmen su papel a nivel del viroma intestinal humano.

A nivel intestinal, los bacteriófagos suelen permanecer como profagos, lo que limita la producción de nuevos virus y favorece la homeostasis en las interacciones bacteriófago-bacteria (43,44). Para explorar esta dinámica, identificamos la presencia de profagos en los genomas bacterianos de los tres grupos estudiados (Figura 5), revelando una interacción generalizada entre bacteriófagos y bacterias a nivel intestinal. Una observación interesante fue la detección de secuencias de profagos de diferentes familias en una misma especie bacteriana. Particularmente, se encontraron regiones de profagos asociadas a las familias Siphoviridae y Myoviridae presentes en el MAG de *Alistipes putredinis* en el grupo de hospitalizados (Figura 5). Este hallazgo sugiere que las infecciones por bacteriófagos podrían no ser siempre especie-específicas (99,100). Es posible que la exposición a antibióticos y otros medicamentos presentes en un ambiente intrahospitalario genere condiciones de estrés sobre las poblaciones de fagos. De hecho, investigaciones en ratones han demostrado que el tratamiento con antibióticos amplía las interacciones entre fagos y bacterias, facilitando el intercambio de genes y la resistencia a antibióticos dentro de la población microbiana (101–103). Por lo tanto, el estrés al que son sometidas las poblaciones virales en condiciones intrahospitalarias podría inducir una mayor capacidad adaptativa para ampliar su rango de hospederos, permitiendo que los fagos infecten una variedad más amplia de bacterias. Sin embargo, esta hipótesis se basa en datos metagenómicos, lo que subraya la importancia de llevar a cabo más investigaciones para respaldar los hallazgos presentados aquí (104).

Cuando las bacterias son lisadas por antibióticos, las poblaciones de bacteriófagos experimentan cambios estructurales (47,103). Inicialmente, la diversidad viral aumenta con la liberación de virus de las bacterias lisadas, para luego disminuir en respuesta a la pérdida de sus hospederos (105). Además, los bacteriófagos hacen una transición a ciclos líticos, reduciendo las poblaciones bacterianas y promoviendo un estado de disbiosis intestinal (47,106). Este proceso se ha documentado en bacterias que residen en humanos (47) y cerdos (65,65). Interesantemente, el comportamiento observado en este estudio es contrario donde se identificó un mayor número de regiones asociadas a profagos en los genomas bacterianos de los grupos de pacientes UCI y

hospitalizados en comparación con el grupo de comunidad (Figura 5). Este resultado puede ser consecuencia de que la exposición a antibióticos aumente la tasa de transferencia horizontal de genes entre bacterias (47,107), incluyendo las regiones asociadas a profagos. Por lo tanto, la presencia aumentada de profagos en estos grupos intrahospitalarios podría no deberse necesariamente a una mayor actividad lítica, sino más bien a un aumento en la transferencia horizontal de genes entre bacterias debido a la presión selectiva de los antibióticos en el ambiente hospitalario.

En conclusión, aunque la mayoría de las familias virales se mantienen estables en pacientes intrahospitalarios, se observan desequilibrios en algunos miembros virales clave, como la familia Microviridae, asociada con enfermedades intestinales como la colitis ulcerosa (88). Estos hallazgos podrían sugerir un estado de disbiosis en estos pacientes, aunque es importante interpretar estos resultados con cautela, dado que las observaciones realizadas no implican necesariamente causalidad. Como perspectiva futura, proponemos investigar los mecanismos subyacentes de estas asociaciones mediante estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, evaluando cambios en familias virales específicas frente a entornos estresantes y su relación con el desarrollo de enfermedades.

Investigaciones futuras deberían dirigir sus esfuerzos hacia la inclusión de un mayor número de muestras para corroborar el panorama presentado. Esto también permitiría obtener un mayor número de MAGs bacterianos y, por consiguiente, un mayor grado de superposición en los MAGs identificados para cada grupo experimental.

Este estudio representa la primera descripción completa del viroma intestinal en entornos intrahospitalarios, ofreciendo una visión inicial de posibles biomarcadores virales asociados con ciertas condiciones clínicas. Estas observaciones tienen implicaciones significativas para el diagnóstico y tratamiento futuro de enfermedades intestinales.

**Contribuciones específicas del estudiante dentro de la investigación llevada a cabo:**

- La concepción del proyecto de investigación ( )
- El diseño del estudio ( x )
- La adquisición de los datos a través de la experimentación ( x )
- Análisis e interpretación de los datos ( x )
- Elaboración del borrador del artículo ( x )
- Revisión y aprobación definitiva de la versión que se presenta ( )

## REFERENCIAS

1. Ding R xue, Goh WR, Wu R na, Yue X qing, Luo X, Khine WWT, et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. *J Food Drug Anal.* 2019;27(3):623-31.
2. Grace-Farfaglia P, Frazier H, Iversen MD. Essential Factors for a Healthy Microbiome: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health.* 8 de julio de 2022;19(14):8361.
3. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* julio de 2006;7(7):688-93.
4. Wang MY, Sang LX, Sun SY. Gut microbiota and female health. *World J Gastroenterol.* 28 de marzo de 2024;30(12):1655-62.
5. Koh A, Vadder FD, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2 de junio de 2016;165(6):1332-45.
6. Tilg H, Moschen AR. Food, Immunity, and the Microbiome. *Gastroenterology.* 1 de mayo de 2015;148(6):1107-19.
7. Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT, et al. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Front Microbiol [Internet].* 26 de septiembre de 2022 [citado 8 de abril de 2024];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.999001/full>
8. de Vos WM, Tilg H, Van Hul M, Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut.* mayo de 2022;71(5):1020-32.
9. Adolph TE, Mayr L, Grabherr F, Schwärzler J, Tilg H. Pancreas–Microbiota Cross Talk in Health and Disease. *Annu Rev Nutr.* 21 de agosto de 2019;39(Volume 39, 2019):249-66.
10. Leonard MM, Valitutti F, Karathia H, Pujolassos M, Kenyon V, Fanelli B, et al. Microbiome signatures of progression toward celiac disease onset in at-risk children in a longitudinal prospective cohort study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 de julio de 2021;118(29):e2020322118.
11. Mars RAT, Yang Y, Ward T, Houtti M, Priya S, Lekatz HR, et al. Longitudinal Multi-omics Reveals Subset-Specific Mechanisms Underlying Irritable Bowel Syndrome. *Cell.* 12 de noviembre de 2020;183(4):1137-40.
12. Schwenger KJ, Clermont-Dejean N, Allard JP. The role of the gut microbiome in chronic liver disease: the clinical evidence revised. *JHEP Rep.* 31 de julio de 2019;1(3):214-26.
13. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell.* 11 de junio de 2018;33(6):954-64.
14. Santiago-Rodriguez TM, Hollister EB. Human Virome and Disease: High-Throughput Sequencing for Virus Discovery, Identification of Phage-Bacteria Dysbiosis and Development

of Therapeutic Approaches with Emphasis on the Human Gut. *Viruses*. julio de 2019;11(7):656.

15. Bai GH, Lin SC, Hsu YH, Chen SY. The Human Virome: Viral Metagenomics, Relations with Human Diseases, and Therapeutic Applications. *Viruses*. 28 de enero de 2022;14(2):278.
16. Koonin EV, Dolja VV, Krupovic M. The healthy human virome: from virus–host symbiosis to disease. *Curr Opin Virol*. 1 de abril de 2021;47:86-94.
17. Nishijima S, Nagata N, Kiguchi Y, Kojima Y, Miyoshi-Akiyama T, Kimura M, et al. Extensive gut virome variation and its associations with host and environmental factors in a population-level cohort. *Nat Commun*. 6 de septiembre de 2022;13:5252.
18. Pavia G, Marascio N, Matera G, Quirino A. Does the Human Gut Virome Contribute to Host Health or Disease? *Viruses*. 17 de noviembre de 2023;15(11):2271.
19. Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol*. marzo de 2020;18(3):125-38.
20. Avellaneda-Franco L, Dahlman S, Barr JJ. The gut virome and the relevance of temperate phages in human health. *Front Cell Infect Microbiol*. 27 de julio de 2023;13:1241058.
21. Carding SR, Davis N, Hoyles L. Review article: the human intestinal virome in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. noviembre de 2017;46(9):800-15.
22. Gorski A, Dabrowska K, Switala-Jeleń K, Nowaczyk M, Weber-Dabrowska B, Boratynski J, et al. New insights into the possible role of bacteriophages in host defense and disease. *Med Immunol*. 14 de febrero de 2003;2:2.
23. Jahn MT, Arkhipova K, Markert SM, Stigloher C, Lachnit T, Pita L, et al. A Phage Protein Aids Bacterial Symbionts in Eukaryote Immune Evasion. *Cell Host Microbe*. 9 de octubre de 2019;26(4):542-550.e5.
24. Liang G, Bushman FD. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(8):514-27.
25. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*. septiembre de 2004;68(3):560-602.
26. Ogilvie LA, Jones BV. The human gut virome: a multifaceted majority. *Front Microbiol*. 11 de septiembre de 2015;6:918.
27. Vica Pacheco S, García González O, Paniagua Contreras GL. The lom gene of bacteriophage lambda is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1 de noviembre de 1997;156(1):129-32.

28. Stanley TL, Ellermeier CD, Slauch JM. Tissue-Specific Gene Expression Identifies a Gene in the Lysogenic Phage Gifsy-1 That Affects *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Survival in Peyer's Patches. *J Bacteriol.* agosto de 2000;182(16):4406-13.
29. Spanier JG, Cleary PP. Bacteriophage control of antiphagocytic determinants in group A streptococci. *J Exp Med.* 1 de noviembre de 1980;152(5):1393-406.
30. Karaolis DK, Somara S, Maneval DR, Johnson JA, Kaper JB. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature.* 27 de mayo de 1999;399(6734):375-9.
31. Lekunberri I, Subirats J, Borrego CM, Balcázar JL. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ Pollut.* 1 de enero de 2017;220:981-4.
32. Kapusinszky B, Minor P, Delwart E. Nearly constant shedding of diverse enteric viruses by two healthy infants. *J Clin Microbiol.* noviembre de 2012;50(11):3427-34.
33. Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM, et al. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med.* octubre de 2015;21(10):1228-34.
34. Rascovan N, Duraisamy R, Desnues C. Metagenomics and the Human Virome in Asymptomatic Individuals. *Annu Rev Microbiol.* 8 de septiembre de 2016;70:125-41.
35. Reyes A, Blanton LV, Cao S, Zhao G, Manary M, Trehan I, et al. Gut DNA viromes of Malawian twins discordant for severe acute malnutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 de septiembre de 2015;112(38):11941-6.
36. Wylie KM, Mihindukulasuriya KA, Zhou Y, Sodergren E, Storch GA, Weinstock GM. Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults. *BMC Biol.* 10 de septiembre de 2014;12:71.
37. Focà A, Liberto MC, Quirino A, Marascio N, Zicca E, Pavia G. Gut inflammation and immunity: what is the role of the human gut virome? *Mediators Inflamm.* 2015;2015:326032.
38. Neil JA, Cadwell K. The Intestinal Virome and Immunity. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de septiembre de 2018;201(6):1615-24.
39. Li R, Wang Y, Hu H, Tan Y, Ma Y. Metagenomic analysis reveals unexplored diversity of archaeal virome in the human gut. *Nat Commun.* 29 de diciembre de 2022;13(1):7978.
40. Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SWL, et al. RNA Viral Community in Human Feces: Prevalence of Plant Pathogenic Viruses. *PLoS Biol.* enero de 2006;4(1):e3.
41. Bhattarai N, Stapleton JT. GB virus C: the good boy virus? *Trends Microbiol.* marzo de 2012;20(3):124-30.
42. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature.* 17 de mayo de 2007;447(7142):326-9.

43. Minot S, Bryson A, Chehoud C, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. Rapid evolution of the human gut virome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de julio de 2013;110(30):12450-5.
44. Waller AS, Yamada T, Kristensen DM, Kultima JR, Sunagawa S, Koonin EV, et al. Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes. *ISME J*. julio de 2014;8(7):1391-402.
45. Mukhopadhyay I, Segal JP, Carding SR, Hart AL, Hold GL. The gut virome: the «missing link» between gut bacteria and host immunity? *Ther Adv Gastroenterol*. 2019;12:1756284819836620.
46. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*. 29 de enero de 2015;160(3):447-60.
47. Pargin E, Roach MJ, Skye A, Papudeshi B, Inglis LK, Mallawaarachchi V, et al. The human gut virome: composition, colonization, interactions, and impacts on human health. *Front Microbiol*. 24 de mayo de 2023;14:963173.
48. Shkoporov AN, Clooney AG, Sutton TDS, Ryan FJ, Daly KM, Nolan JA, et al. The human gut virome is highly diverse, stable and individual-specific [Internet]. *bioRxiv*; 2019 [citado 17 de abril de 2024]. p. 657528. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/657528v1>
49. Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis*. febrero de 2000;181(2):664-70.
50. Monaghan TM, Sloan TJ, Stockdale SR, Blanchard AM, Emes RD, Wilcox M, et al. Metagenomics reveals impact of geography and acute diarrheal disease on the Central Indian human gut microbiome. *Gut Microbes*. 12(1):1752605.
51. Zhan K, Wu H, Xu Y, Rao K, Zheng H, Qin S, et al. The function of the gut microbiota–bile acid–TGR5 axis in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *mSystems*. 9(3):e01299-23.
52. Li Y, Xia S, Jiang X, Feng C, Gong S, Ma J, et al. Gut Microbiota and Diarrhea: An Updated Review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:625210.
53. Li YD, Liu BN, Zhao SH, Zhou YL, Bai L, Liu EQ. Changes in gut microbiota composition and diversity associated with post-cholecystectomy diarrhea. *World J Gastroenterol*. 7 de febrero de 2021;27(5):391-403.
54. Helou M, Nasr J, Hajjar M, Bourji A, Feghaly R, Jabbour E, et al. Epidemiology of pathogens causing acute diarrhea in patients presenting to the emergency departments in 4 hospitals in Lebanon. *Medicine (Baltimore)*. 1 de marzo de 2024;103(9):e37316.
55. Ramírez-Rosales A, Cantú-Llanos E. [Intrahospital mortality in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea infection]. *Rev Gastroenterol Mex*. 2012;77(2):60-5.

56. Broecker F, Russo G, Klumpp J, Moelling K. Stable core virome despite variable microbiome after fecal transfer. *Gut Microbes*. 4 de mayo de 2017;8(3):214-20.
57. Conover KR, Absah I, Ballal S, Brumbaugh D, Cho S, Cardenas MC, et al. Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridioides difficile* Infection in Immunocompromised Pediatric Patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1 de abril de 2023;76(4):440-6.
58. Ramay FH, Amoroso A, von Rosenvinge EC, Saharia K. Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Severe, Recurrent, and Refractory *Clostridium difficile* Infection in a Severely Immunocompromised Patient. *Infect Dis Clin Pract*. julio de 2016;24(4):237.
59. Aira A, Rubio E, Vergara Gómez A, Fehér C, Casals-Pascual C, González B, et al. rUTI Resolution After FMT for *Clostridioides difficile* Infection: A Case Report. *Infect Dis Ther*. junio de 2021;10(2):1065-71.
60. Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, Moltzau-Anderson J, Bharti R, Grasis JA, et al. Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology*. 1 de marzo de 2017;152(4):799-811.e7.
61. Zuo T, Wong SH, Lam K, Lui R, Cheung K, Tang W, et al. Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection is associated with treatment outcome. *Gut*. abril de 2018;67(4):634-43.
62. Bhuiyan MU, Luby SP, Zaman RU, Rahman MW, Sharker MAY, Hossain MJ, et al. Incidence of and Risk Factors for Hospital-Acquired Diarrhea in Three Tertiary Care Public Hospitals in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg*. 2 de julio de 2014;91(1):165-72.
63. Herrera G, Paredes-Sabja D, Patarroyo MA, Ramírez JD, Muñoz M. Updating changes in human gut microbial communities associated with *Clostridioides difficile* infection. *Gut Microbes*. 13(1):1966277.
64. Li H, Li H, Wang J, Guo L, Fan H, Zheng H, et al. The altered gut virome community in rhesus monkeys is correlated with the gut bacterial microbiome and associated metabolites. *Virology*. 19 de agosto de 2019;16(1):105.
65. Allen HK, Looft T, Bayles DO, Humphrey S, Levine UY, Alt D, et al. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes. *mBio*. 2011;2(6):e00260-11.
66. Townsend EM, Kelly L, Muscatt G, Box JD, Hargraves N, Lilley D, et al. The Human Gut Phageome: Origins and Roles in the Human Gut Microbiome. *Front Cell Infect Microbiol*. 4 de junio de 2021;11:643214.
67. Muñoz M, Ríos-Chaparro DI, Herrera G, Soto-De Leon SC, Birchenall C, Pinilla D, et al. New Insights into *Clostridium difficile* (CD) Infection in Latin America: Novel Description of Toxigenic Profiles of Diarrhea-Associated to CD in Bogotá, Colombia. *Front Microbiol*. 30 de enero de 2018;9:74.
68. Muñoz M, Restrepo-Montoya D, Kumar N, Iraola G, Camargo M, Díaz-Arévalo D, et al. Integrated genomic epidemiology and phenotypic profiling of *Clostridium difficile* across

intra-hospital and community populations in Colombia. *Sci Rep.* 5 de agosto de 2019;9(1):11293.

69. Bloemen B, Gand M, Vanneste K, Marchal K, Roosens NHC, De Keersmaecker SCJ. Development of a portable on-site applicable metagenomic data generation workflow for enhanced pathogen and antimicrobial resistance surveillance. *Sci Rep.* 11 de noviembre de 2023;13:19656.
70. Bogaerts B, Van den Bossche A, Verhaegen B, Delbrassinne L, Mattheus W, Nouws S, et al. Closing the gap: Oxford Nanopore Technologies R10 sequencing allows comparable results to Illumina sequencing for SNP-based outbreak investigation of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol.* 5 de marzo de 2024;0(0):e01576-23.
71. Oxford Nanopore Technologies. Oxford Nanopore broadens its Q20+ Early Access Programme and releases new nanopore, R10.4, into this early access programme. 2021 [citado 26 de abril de 2024]. Oxford Nanopore broadens its Q20+ Early Access Programme and releases new nanopore, R10.4, into this early access programme. Disponible en: <https://nanoporetech.com/news/news-oxford-nanopore-broadens-its-q20-early-access-programme-and-releases-new-nanopore>
72. Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res.* diciembre de 2016;26(12):1721-9.
73. Medina JE, Castañeda S, Páez-Triana L, Camargo M, Garcia-Corredor DJ, Gómez M, et al. High prevalence of Enterovirus E, Bovine Kobuvirus, and Astrovirus revealed by viral metagenomics in fecal samples from cattle in Central Colombia. *Infect Genet Evol.* 1 de enero de 2024;117:105543.
74. Vilsker M, Moosa Y, Nooij S, Fonseca V, Ghysens Y, Dumon K, et al. Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 1 de marzo de 2019;35(5):871-3.
75. Evseev P, Shneider M, Miroshnikov K. Evolution of Phage Tail Sheath Protein. *Viruses.* junio de 2022;14(6):1148.
76. Cornuault JK, Petit MA, Mariadassou M, Benevides L, Moncaut E, Langella P, et al. Phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii* belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes. *Microbiome.* 3 de abril de 2018;6:65.
77. Zhang F, Gia A, Chen G, Gong L, Behary J, Hold GL, et al. Critical Assessment of Whole Genome and Viral Enrichment Shotgun Metagenome on the Characterization of Stool Total Virome in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Viruses.* 24 de diciembre de 2022;15(1):53.
78. Baykov IK, Tikunov AY, Babkin IV, Fedorets VA, Zhirakovskaia EV, Tikunova NV. Tentaclins—A Novel Family of Phage Receptor-Binding Proteins That Can Be Hypermutated by DGR Systems. *Int J Mol Sci.* enero de 2023;24(24):17324.

79. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* octubre de 2011;21(10):1616-25.
80. Reyes A, Semenkovich NP, Whiteson K, Rohwer F, Gordon JI. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat Rev Microbiol.* septiembre de 2012;10(9):607-17.
81. Smith L, Goldobina E, Govi B, Shkoporov AN. Bacteriophages of the Order Crassvirales: What Do We Currently Know about This Keystone Component of the Human Gut Virome? *Biomolecules.* abril de 2023;13(4):584.
82. Kirchberger PC, Martinez ZA, Ochman H. Organizing the Global Diversity of Microviruses. *mBio.* 2 de mayo de 2022;13(3):e00588-22.
83. Jansen D, Matthijssens J. The Emerging Role of the Gut Virome in Health and Inflammatory Bowel Disease: Challenges, Covariates and a Viral Imbalance. *Viruses.* 6 de enero de 2023;15(1):173.
84. Zhao G, Vatanen T, Droit L, Park A, Kostic AD, Poon TW, et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 de julio de 2017;114(30):E6166-75.
85. Ezzatpour S, Mondragon Portocarrero ADC, Cardelle-Cobas A, Lamas A, López-Santamarina A, Miranda JM, et al. The Human Gut Virome and Its Relationship with Nontransmissible Chronic Diseases. *Nutrients.* 15 de febrero de 2023;15(4):977.
86. Lawal SA, Voisin A, Olof H, Bording-Jorgensen M, Armstrong H. Diversity of the microbiota communities found in the various regions of the intestinal tract in healthy individuals and inflammatory bowel diseases. *Front Immunol [Internet].* 2 de noviembre de 2023 [citado 18 de abril de 2024];14. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1242242/full>
87. Zeng S, Almeida A, Li S, Ying J, Wang H, Qu Y, et al. A metagenomic catalog of the early-life human gut virome. *Nat Commun.* 29 de febrero de 2024;15(1):1864.
88. Zuo T, Lu XJ, Zhang Y, Cheung CP, Lam S, Zhang F, et al. Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut.* julio de 2019;68(7):1169-79.
89. Ramos-Barbero MD, Gómez-Gómez C, Sala-Comorera L, Rodríguez-Rubio L, Morales-Cortes S, Mendoza-Barberá E, et al. Characterization of crAss-like phage isolates highlights Crassvirales genetic heterogeneity and worldwide distribution. *Nat Commun.* 18 de julio de 2023;14(1):4295.
90. Cervantes-Echeverría M, Gallardo-Becerra L, Cornejo-Granados F, Leyva AO. A loss of crAssphage stability in the human gut virome is associated with obesity and metabolic syndrome [Internet]. *bioRxiv; 2022* [citado 9 de abril de 2024]. p. 2022.06.15.496347. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.06.15.496347v1>

91. Clooney AG, Sutton TDS, Shkoporov AN, Holohan RK, Daly KM, O'Regan O, et al. Whole-Virome Analysis Sheds Light on Viral Dark Matter in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Host Microbe*. 11 de diciembre de 2019;26(6):764-778.e5.
92. Draper LA, Ryan FJ, Smith MK, Jalanka J, Mattila E, Arkkila PA, et al. Long-term colonisation with donor bacteriophages following successful faecal microbial transplantation. *Microbiome*. 10 de diciembre de 2018;6(1):220.
93. Gulyaeva A, Garmaeva S, Ruigrok RAAA, Wang D, Riksen NP, Netea MG, et al. Discovery, diversity, and functional associations of crAss-like phages in human gut metagenomes from four Dutch cohorts. *Cell Rep*. 11 de enero de 2022;38(2):110204.
94. Siranosian BA, Tamburini FB, Sherlock G, Bhatt AS. Acquisition, transmission and strain diversity of human gut-colonizing crAss-like phages. *Nat Commun*. 15 de enero de 2020;11:280.
95. Scanlan PD. Bacteria-Bacteriophage Coevolution in the Human Gut: Implications for Microbial Diversity and Functionality. *Trends Microbiol*. agosto de 2017;25(8):614-23.
96. Al-Fakhrany OM, Elekhrawy E. Next-generation probiotics: the upcoming biotherapeutics. *Mol Biol Rep*. 2024;51(1):505.
97. Wang L, Yao H, Morgan DC, Lau KS, Leung SY, Ho JWK, et al. Altered human gut virome in patients undergoing antibiotics therapy for *Helicobacter pylori*. *Nat Commun*. 17 de abril de 2023;14(1):2196.
98. Rozwalak P, Barylski J, Wijesekara Y, Dutilh BE, Zielezinski A. Ultraconserved bacteriophage genome sequence identified in 1300-year-old human palaeofaeces. *Nat Commun*. 23 de enero de 2024;15(1):495.
99. Cao Z, Sugimura N, Burgermeister E, Ebert MP, Zuo T, Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *eBioMedicine*. 23 de junio de 2022;81:104113.
100. Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann ML, Brüssow H. Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *J Bacteriol*. junio de 2004;186(12):3677-86.
101. Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, Iguchi A, et al. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog*. mayo de 2009;5(5):e1000408.
102. Kang K, Imamovic L, Misiakou MA, Bornakke Sørensen M, Heshiki Y, Ni Y, et al. Expansion and persistence of antibiotic-specific resistance genes following antibiotic treatment. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1-19.
103. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 11 de julio de 2013;499(7457):219-22.

104. Hosokawa M, Nishikawa Y. Tools for microbial single-cell genomics for obtaining uncultured microbial genomes. *Biophys Rev.* 1 de febrero de 2024;16(1):69-77.
105. Sutcliffe SG, Shamash M, Hynes AP, Maurice CF. Common Oral Medications Lead to Prophage Induction in Bacterial Isolates from the Human Gut. *Viruses.* 11 de marzo de 2021;13(3):455.
106. Mirzaei MK, Maurice CF. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. *Nat Rev Microbiol.* julio de 2017;15(7):397-408.
107. Sugimoto R, Nishimura L, Nguyen PT, Ito J, Parrish NF, Mori H, et al. Comprehensive discovery of CRISPR-targeted terminally redundant sequences in the human gut metagenome: Viruses, plasmids, and more. *PLoS Comput Biol.* 21 de octubre de 2021;17(10):e1009428.