
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIÓFAGOS CON ACTIVIDAD EN
Staphylococcus aureus”

Realizado por:

DAYRA NOEMI VALLE COLLANTES

Director del proyecto:

Ing. Rubén Alexander Maldonado Orbe MSc

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 21 de marzo del 2025

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, DAYRA NOEMÍ VALLE COLLANTES, con cédula de identidad N° 0550298160, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado en ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Dayra Noemi Valle Collantes

C.I: 0550298160

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Ing. Rubén Alexander Maldonado Orbe MSc

LOS PROFESORES INFORMANTES:

JAIME DAVID ACOSTA ESPAÑA

MANUEL ANDRES HERRERA YELA

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como
apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.

Jaime David Acosta España MD MSc

Ing. Manuel Andrés Herrela Yela MSc

Quito, 21 de marzo del 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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



DAYRA NOEMI VALLE COLLANTES

C.I.: 0550298160

Artículo de tesis

Aislamiento y caracterización de bacteriófagos con actividad en *Staphylococcus aureus*

Dayra Valle¹, Alexander Maldonado^{1,2,3*}

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK (UISEK), Quito, Ecuador

² Enfermedades Desatendidas y Emergentes, Ecoepidemiología y Biodiversidad – GIEED, Universidad Internacional SEK (UISEK), Quito, Ecuador

³ Biomedicina Experimental y Aplicada – GIBEA, Universidad Internacional SEK (UISEK), Quito, Ecuador* Autor de

Correspondencia: ruben.maldonado@uisek.edu.ec.

Resumen: *Staphylococcus aureus* es un patógeno de alta peligrosidad debido a su capacidad para causar diversas enfermedades y su elevada morbilidad y mortalidad. Los bacteriófagos han surgido como una estrategia prometedora para combatir infecciones causadas por bacterias resistentes. Por ello, este estudio tiene como objetivo aislar y caracterizar bacteriófagos con actividad frente a *Staphylococcus aureus*, para evaluar sus características y potencial para ser evaluados en estudios futuros como alternativa a los antibióticos. Los fagos fueron aislados a partir de muestras de agua del río Machángara, en el sur de Quito. Primero, se realizó su enriquecimiento y purificación. La caracterización fenotípica incluyó técnicas microbiológicas como spot test, para verificar su presencia, y la técnica de doble capa de agar, para determinar el título fágico. También se evaluaron parámetros biológicos como estabilidad térmica, estabilidad a distintos niveles de pH y cinética de acción (tamaño de explosión, periodo de latencia y constante de adsorción). El análisis genómico se llevó a cabo mediante secuenciación del ADN y ensamblaje del genoma. Además, se realizó la caracterización filogenética y la anotación estructural y funcional. El análisis fenotípico del fago mostró un periodo de latencia corto y un tamaño de explosión relativamente bajo en comparación con otros fagos reportados para *Staphylococcus aureus*. En cuanto a su estabilidad en distintos ambientes, mantuvo actividad en todos los rangos de temperatura y pH evaluados. La caracterización genómica reveló la presencia de dos fagos: SV1, perteneciente al género *Silviavirus*, y SV2, del género *Rosenblumvirus*. La anotación funcional no identificó genes relacionados con la lisogenia. Estos resultados sugieren que los fagos aislados tienen la posibilidad de ser investigados en el futuro como una alternativa a los antibióticos.

Palabras clave: Bacteriófago, *Staphylococcus aureus*, caracterización genómica, caracterización biológica.

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a highly dangerous pathogen due to its ability to cause a wide range of diseases and its high morbidity and mortality rates. Bacteriophages have emerged as a promising strategy to combat infections caused by resistant bacteria. Therefore, the aim of this study is to isolate and characterize bacteriophages against *Staphylococcus aureus* to evaluate its characteristics and potential for future studies as an alternative to antibiotics. The phages were isolated from water samples collected from the Machángara River, located in southern Quito. Enrichment and purification were first carried out. The phenotypic characterization included microbiological techniques such as spot tests to verify their presence, and the double-layer agar method to determine the phage titer. Biological parameters such as thermal stability, pH stability, and action kinetics (burst size, latent period, and adsorption constant) were also evaluated. Genomic analysis was

conducted through DNA sequencing and genome assembly. Additionally, phylogenetic characterization and structural and functional annotation were performed. The phenotypic analysis of the phage revealed a short latent period, and a relatively low burst size compared to other phages reported for *Staphylococcus aureus*. Regarding its stability in various environments, the phage retained activity across all temperature and pH ranges tested. Genomic characterization revealed the presence of two phages: SV1, belonging to the genus *Silviavirus*, and SV2, from the genus *Rosenblumvirus*. Functional annotation did not identify genes associated with lysogeny. These results suggest that the isolated phages have the potential to be investigated in future studies as an alternative to antibiotics.

Keywords: Phage, *Staphylococcus aureus*, genomic characterization, biological characterization

1. Introducción

Staphylococcus aureus es una de las bacterias más prevalentes causantes de infecciones, abarcando desde lesiones cutáneas leves hasta complicaciones graves como bacteriemias y endocarditis (Cheung et al., 2021). Esta bacteria grampositiva es también responsable de neumonía, infecciones del tracto respiratorio, infecciones en sitios quirúrgicos y en prótesis articulares (Kwiecinski & Horswill, 2020). Su relevancia clínica es crítica, ya que provoca más muertes que el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la tuberculosis y la hepatitis viral combinados (Kwiecinski & Horswill, 2020). La capacidad de *S. aureus* para formar biofilms y evadir la respuesta inmune dificulta su erradicación, representando un reto significativo en el ámbito clínico (Cheung et al., 2021). Ante la creciente preocupación por el uso indiscriminado de antibióticos y sus consecuencias, los bacteriófagos han emergido como una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones bacterianas.

Los bacteriófagos son los agentes biológicos más abundantes en la Tierra y se replican exclusivamente en bacterias, siendo especialmente efectivos en su eliminación (Parmanik et al., 2022). Esta habilidad de los fagos para causar la muerte de bacterias se debe al ciclo lítico. En este ciclo, los fagos se adhieren a la célula bacteriana, inyectan su material genético y utilizan la maquinaria celular para replicarse. Esto resulta en la lisis de la célula hospedadora y la liberación de nuevos viriones (Jo et al., 2023). Gracias a esta capacidad, los fagos se posicionan como una alternativa prometedora para combatir infecciones bacterianas (Strathdee et al., 2023).

La terapia con fagos no es un concepto reciente, fue propuesta por primera vez en 1919 por Félix d'Hérelle para tratar disentería causada por *Shigella* (Aswani & Shukla, 2021). Aunque su desarrollo se detuvo con la introducción de los antibióticos, ha resurgido en las últimas décadas como una solución frente a la creciente resistencia bacteriana a los antimicrobianos (Hatfull et al., 2022). A diferencia de los antibióticos de amplio espectro, que pueden crear un desequilibrio en el microbiota y favorecer infecciones secundarias, los fagos son altamente específicos, eliminando únicamente las bacterias diana (Kebriaei et al., 2021).

Estudios recientes han demostrado la eficacia de cócteles de fagos, como AB-SA01, en infecciones por *S. aureus*, incluyendo ensayos clínicos para tratar rinosinusitis crónica y heridas infectadas (Petrovic Fabijan et al., 2020;

Rodriguez et al., 2022). Además, su combinación con antibióticos ha mostrado un efecto sinérgico, aumentando la eficacia de ambos (Gupta et al., 2019).

A pesar del creciente interés en los bacteriófagos, aún existen importantes vacíos en su investigación. En la plataforma PubMed, se registran 36,663 publicaciones relacionadas con bacteriófagos, de las cuales solo 407 provienen de autores de Latinoamérica (Rangel-Pineros et al., 2021). Entre estas, Brasil concentra el 33.3% de las publicaciones, seguido de Argentina (22%), México (15.8%), Chile (10.9%), Cuba (7.6%), Colombia (4.5%) y otros países (5.9%) (Rangel-Pineros et al., 2021). Estas cifras evidencian un vacío de información sobre bacteriófagos, especialmente en Ecuador. Además, los pocos estudios locales se han centrado principalmente en fagos dirigidos a enterobacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella*, mientras que *S. aureus* ha recibido escasa atención. Por ello, el objetivo de este trabajo es aislar y caracterizar bacteriófagos frente a *Staphylococcus aureus* a partir de aguas del río Machángara, utilizando técnicas microbiológicas y herramientas bioinformáticas. Este enfoque no solo amplía el conocimiento sobre la diversidad de fagos locales, sino que también contribuye al desarrollo de terapias contra *Staphylococcus aureus*. Los resultados podrían ser evaluados en estudios futuros como terapia alternativa a los antibióticos.

2. Metodología

Bacteria hospedadora

Como cepa hospedadora se utilizó *Staphylococcus aureus*, la cual fue donada por la Universidad San Francisco. Esta cepa fue aislada a partir de muestras nasofaríngeas en la Universidad de la Américas (Cabezas-Mera et al., 2023). La activación de SA se llevó a cabo mediante su cultivo en caldo triptona soja (TSB), utilizando una proporción de inoculación de 1:10. Posteriormente, se determinó la curva de cinética de crecimiento de la bacteria a lo largo del tiempo. Para ello, se midió la densidad óptica (OD600) en un espectrofotómetro a distintos intervalos de tiempo.

Toma de muestra

Se obtuvo una muestra de agua de río, recolectada del río Machángara, al sur de Quito - Ecuador. (-0°15'25.5"S 78°31'34.7"W). Para la recolección se utilizó una botella de plástico limpia, en la cual se recolectó directamente el agua del río. Posteriormente, se trasvasó el agua a una botella de vidrio autoclavada y se almacenó a 4°C por 24 horas para que precipite la materia orgánica.

Para garantizar que las condiciones se mantuvieran constantes y evitar contaminación adicional, se desinfectó todos los materiales antes de la manipulación, y se transportó la muestra en un recipiente aislado para minimizar la variación de temperatura.

Aislamiento y enriquecimiento del fago

En todos los casos, se utilizó una concentración de $1,5 \times 10^8$ cel/mL (McFarland 0,5) de la bacteria en fase exponencial. La concentración bacteriana se estableció utilizando un densitómetro, ajustando la turbidez de la suspensión bacteriana según la escala de McFarland. La fase exponencial de crecimiento se determinó previamente monitoreando la densidad óptica a 600 nm, identificando el intervalo de tiempo en el que la bacteria huésped alcanzaba dicha fase.

Para el aislamiento y verificación del fago se utilizó el protocolo mencionado por Tisalema-Guanopatín et al., (2023). Se filtró 50 mL de la muestra de agua de río. A continuación, se añadió 49 mL de Caldo de triptona soja (TSB) doblemente concentrado y suplementado con cloruro de calcio 5mM (TSBdCA) y 1 mL de la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* en fase exponencial. Se incubó por 24h a 37°C con agitación constante. Esta mezcla se centrifugó (MIKRO 220R) por 10 minutos a 4500 RPM. Se eliminó el precipitado (bacterias) y se conservó el sobrenadante (fagos), al cual se le realizó otro periodo de centrifugación bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se utilizó un filtro tipo jeringa de 0,22 μ m para eliminar cualquier bacteria presente en el sobrenadante. Con el filtrado se procedió a realizar las pruebas de verificación y cuantificación de fagos.

Confirmación de la presencia del fago

Se realizó la prueba de la gota (spot test), en placas de Triptona soya agar (TSA) suplementado cloruro de calcio 5mM (TSACa). En cada placa se realizó una extensión de la cepa huésped y se colocó una gota del filtrado obtenido anteriormente y como control negativo se colocó una gota de agua. Esta prueba se realizó para comprobar la existencia de fagos en el filtrado (Tisalema-Guanopatín et al., 2023).

Cuantificación o titulación de fagos

Para la cuantificación de los fagos, se empleó la técnica de doble capa de agar. Para el agar base y el agar de capa superior, se empleó agar nutritivo suplementado con 5 mM de calcio (ANCa).

En esta etapa se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-11} . En primer lugar, se añadieron 900 μ L de TSBdCA en tubos Eppendorf. En la primera dilución se colocó 100 μ L del filtrado y para las diluciones siguientes se agregó 100 μ L de la dilución previa. A continuación, en tubos Falcon se añadieron 100 μ L de SA y 100 μ L de la mezcla diluida, repitiendo este proceso para cada dilución. Posteriormente, se incorporaron 5 mL de ANCa en cada tubo Falcon. Finalmente, se vertió la mezcla de agar en placas Petri, incubándose durante 24 horas a 37°C (Tisalema-Guanopatín et al., 2023).

Purificación de fagos

Para el proceso de purificación, se seleccionaron las placas de lisis de las diluciones 10^{-5} a 10^{-8} y se colocaron en 1 mL de buffer sulfato de magnesio (SM) [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8 mM), Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM)]. Esta solución se inoculó por extensión en placas de TSACa. Para la capa superior, se añadieron 500 μL de la bacteria huésped en fase exponencial y 5 mL del mismo agar. Se incubó por 24 h a 37°C , las placas resultantes se suspendieron en 1 mL de buffer SM, obteniendo un stock de fagos.

Caracterización fenotípica

- *Cinética del fago (periodo de latencia y tamaño de explosión)*

Se realizó la curva de crecimiento del fago con modificaciones del protocolo de Rai & Khairnar, (2021). Se infectó 9 mL de la bacteria huésped con 1000 uL del stock de fagos, seguidamente de un periodo de incubación de 8 minutos a 37°C . Luego de este periodo, se centrifugó la mezcla a 4500 rpm durante 15 minutos y se resuspendió el pellet en 10 mL de TSB. Se realizó la técnica de doble capa por triplicado, se tomó alícuotas de 100 uL cada 15 minutos durante la primera hora y cada 20 minutos hasta llegar a los 120. El tamaño de explosión se determinó al dividir la cantidad final de fagos libres entre la cantidad inicial, lo que permitió calcular el número total de fagos liberados por cada célula bacteriana.

- *Constante de adsorción.*

Se añadió 1 mL de la bacteria huésped en fase exponencial con 10 uL del stock de fagos, se agitó durante 10 segundos y se incubó durante 1 hora a 37°C . En intervalos de 10 minutos se tomó una alícuota de 100 uL y se realizó la técnica de doble capa por triplicado. Para calcular la constante, se relacionó la concentración inicial y final de fagos mediante la siguiente fórmula:

$$k = \frac{2,3}{Bt} \log \frac{P_0}{P}$$

Ecuación 1 Fórmula de la constante de adsorción

Donde:

k: Constante de adsorción

B: Número de células huésped inicial

t: Intervalo de tiempo entre P_0 y P

P_0 : Concentración inicial de bacteriófagos

P: Concentración final de bacteriófagos

- *Estabilidad del fago*

Para evaluar la estabilidad del fago a distintas temperaturas se añadió 150 uL del filtrado purificado en un tubo Eppendorf y se conservó a una temperatura determinada (-16°C, 4°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C) durante una hora. Se calculó el título fágico mediante la técnica de doble capa por triplicado. Por otro lado, para evaluar la estabilidad en diferentes rangos de pH, se añadió 100 µL del fago en 900 µL de agua destilada ajustada a diferentes niveles de pH (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). Estas mezclas se incubaron durante 4 horas a 37 °C y se aplicó la técnica de doble capa por triplicado (Rai & Khairnar, 2021).

Caracterización genómica

- *Concentración de fagos*

Se extrajo las placas de lisis formadas en el agar luego de la purificación. Se colocó las placas en buffer SM en tubos Falcon de 15 mL. Se centrifugó los tubos a 4500 RPM por 20 min y se filtró a través de un filtro tipo jeringa de 0,22 µm para eliminar los restos bacterianos y obteniendo una solución concentrada de fagos lista para la extracción de ADN (Jakočiūnė & Moodley, 2018).

- *Extracción de ADN.*

La extracción del material genético del fago se realizó en base al protocolo de Jakočiūnė & Moodley (2018). En un tubo de 1.5 mL se añadió 50 µL del lisado con buffer DNasa I 10x, DNasa I (1 U/µL) y RNasa A (10 mg/mL) y se incubó durante 1,5 horas a 37°C. Luego, se colocó EDTA 0,5 M y Proteinasa K (20 mg/mL), se incubó durante 1,5 horas a 56°C.

En el proceso de purificación de ADN, se añadió el buffer AL a la mezcla anterior, se agitó con vórtex (1500 RPM) y se incubó por 10 minutos a 70°C. Posteriormente, se añadió etanol al 99.9% y se mezcló.

La mezcla se transfirió a una columna de centrifugado DNeasy Mini y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 RPM, se desechó el efluente.

Luego, se añadió el buffer AW1 y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 RPM, se descartó el efluente. Después, se añadió buffer AW2 y se centrifugó durante 3 minutos a 11000 RPM. Se desechó el efluente y se centrifugó durante un minuto adicional a 11000 RPM.

Finalmente, se colocó la columna de centrifugado en un tubo de microcentrífuga estéril y se añadió buffer AE, se incubó a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó a 8000 RPM por el mismo tiempo, para eluir el ADN.

La cuantificación de la muestra se llevó a cabo utilizando el fluorómetro Qubit 2.0, conforme al protocolo recomendado por el fabricante. El ADN purificado se almacenó a -20 °C para su posterior análisis de secuenciación. La secuenciación de genoma completo se realizó mediante tecnología NGS de Illumina.

- ***Análisis filogenético y anotación del genoma***

Los resultados de la secuenciación generaron archivos paired-end: uno de lectura forward y otro de lectura reverse. Los análisis bioinformáticos iniciales se realizaron en la plataforma Galaxy Phage (Abueg et al., 2024). En primer lugar, la calidad de las secuencias crudas se evaluó con FastQC (Abueg et al., 2024). Posteriormente, las secuencias fueron ensambladas utilizando la herramienta SPAdes (Abueg et al., 2024), configurada con valores personalizados de kmers (21, 33, 55, 77, 99, 127) y una cobertura mínima de 100x, lo que permitió generar contigs a partir de los datos procesados. La calidad de estos contigs se evaluó con QUAST (Abueg et al., 2024).

Tras el ensamblaje, se procedió al binning para separar y agrupar los fragmentos genómicos, utilizando la plataforma del Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC). La calidad de los bins obtenidos fue verificada con CheckV (Nayfach et al., 2021). Una vez confirmada su calidad, se elaboró un árbol filogenético. Para ello, se realizó un alineamiento con MAFFT (Abueg et al., 2024) utilizando secuencias de genomas completos descargadas de las bases de datos de NCBI. Luego, se construyó el árbol filogenético con IQ-TREE (Nguyen et al., 2015), empleando el algoritmo de máxima verosimilitud para analizar las relaciones evolutivas. Finalmente, se llevó a cabo la anotación funcional y estructural del genoma mediante Viral Genome ORF Reader (Wang et al., 2010) en BV-BRC.

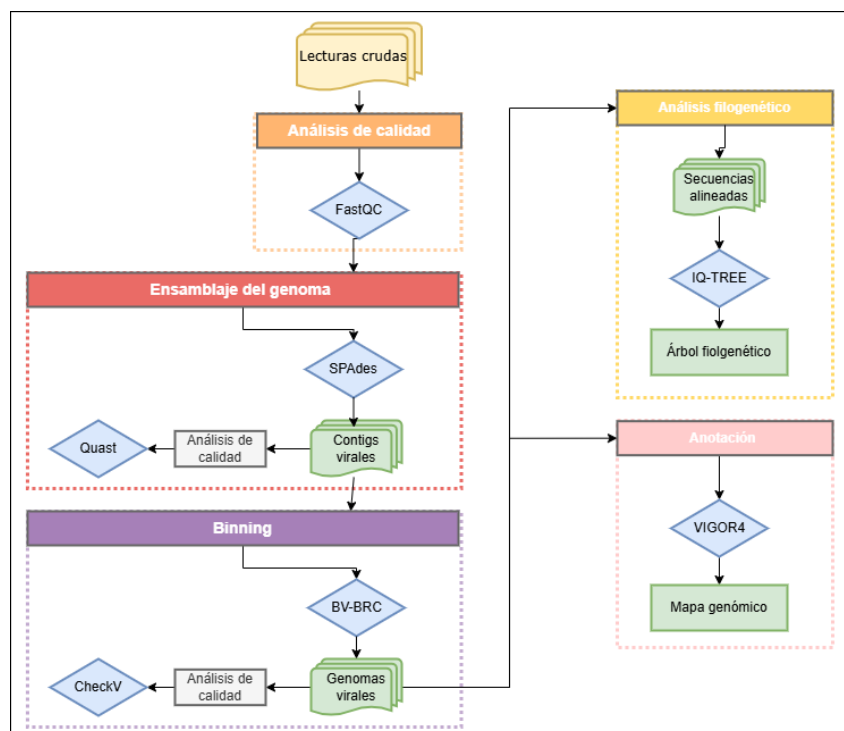


Figura 1 Esquema del flujo de trabajo del análisis bioinformático, que se divide en cinco etapas. La primera etapa es el análisis de calidad, seguido por el ensamblaje del genoma, binning, y finalmente, el análisis filogenético y la anotación. Los rombos indican las herramientas utilizadas, mientras que los recuadros verdes muestran los resultados de cada etapa.

3. Resultados

Los resultados obtenidos incluyeron el análisis del perfil de resistencia de la cepa bacteriana hospedadora y la caracterización fenotípica y genómica del bacteriófago aislado. Este enfoque permitió una evaluación completa de la interacción entre el bacteriófago y su huésped, así como del potencial terapéutico del fago frente a *Staphylococcus aureus*.

Perfil biológico del fago

En el spot test, se evidenció la inhibición del crecimiento bacteriano en la zona donde se aplicó la gota de lisado, confirmando la presencia del bacteriófago en la muestra recolectada del río Machángara. Este halo de inhibición demuestra la actividad lítica del fago sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* (Figura 3A, 3B). Durante el proceso de titulación, se observaron halos de lisis translúcidos con diámetros que oscilaron entre 1 y 2 mm (Figura 3C), y alcanzando un título máximo de 4×10^{10} UFP/mL.

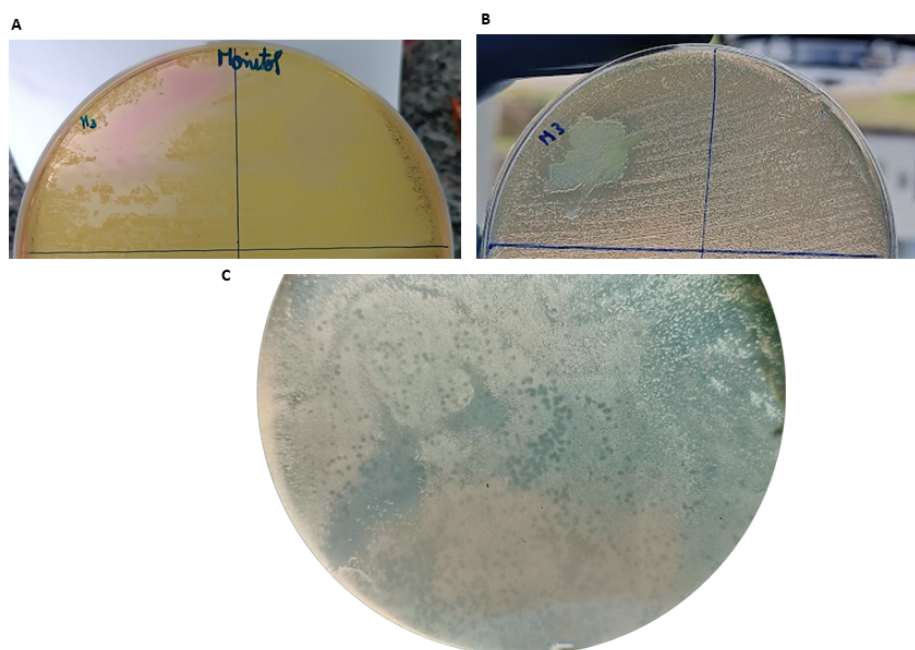


Figura 2 Evaluación de la presencia del fago. Se realizó la prueba del spot test en agar Manitol Salado (A) y Mueller-Hinton (B) utilizando SA como hospedador. Además, se aplicaron diluciones seriadas del lisado fágico (C) desde 10^0 hasta 10^{-10} . Se observaron halos de lisis tanto en las diluciones, como en el spot test, confirmando la actividad del fago frente a la bacteria huésped.

- Cinética del fago y constante de adsorción

Con el objetivo de caracterizar las diferentes fases del ciclo infeccioso del fago, se evaluó la cinética de replicación mediante una curva de crecimiento de un solo paso. Los resultados revelaron un periodo de latencia de aproximadamente 15 minutos, lo que indica una interacción rápida y eficiente entre el fago y su bacteria hospedadora. Asimismo, durante la fase de liberación se observó una producción de 30 unidades formadoras de placa (UFP) por célula infectada tras la lisis bacteriana.

Para comprender la eficacia del fago con respecto a *S. aureus*, se evaluó la velocidad de adsorción del fago a los receptores bacterianos durante la etapa inicial de su ciclo infeccioso. La tasa de adsorción del bacteriófago fue determinada en $3,62 \times 10^{-10}$ mL/min, observándose que en un intervalo de 10 minutos se adsorbió el 93% de las partículas virales. Estos datos reflejan una interacción eficiente entre el fago y los receptores bacterianos.

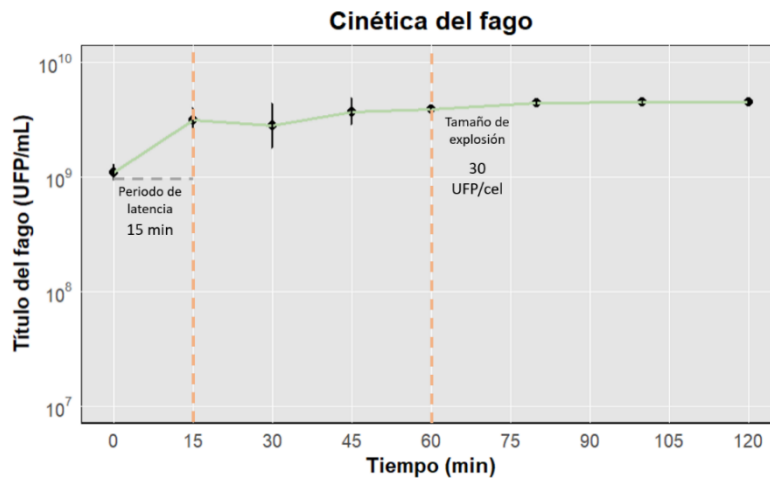


Figura 3 Curva de crecimiento de un solo paso del bacteriófago. El eje x muestra el tiempo (minutos) en el que se realizaron las mediciones, mientras que el eje y indica la concentración de unidades formadoras de placa (UFP/mL). Cada punto de la curva representa el promedio de tres experimentos, y las barras de error corresponden a la media $\pm$ la desviación estándar. Estos resultados reflejan las dinámicas del ciclo de infección del fago, incluyendo el período de latencia y el tamaño de explosión.

- Estabilidad del fago a diferentes temperaturas y nivel de pH

Se evaluaron diversas características del bacteriófago para comprender su comportamiento en diferentes condiciones ambientales. El fago presenta actividad en todos los rangos evaluados, teniendo valores de UFP más altos en un rango de pH entre 3 y 10, con un rendimiento máximo a pH 7, donde alcanzó $1,3 \times 10^8$ UFP/mL. En contraste, en condiciones alcalinas (pH 12), la eficiencia de formación de halos de lisis disminuyó a $3,3 \times 10^6$ UFP/mL.

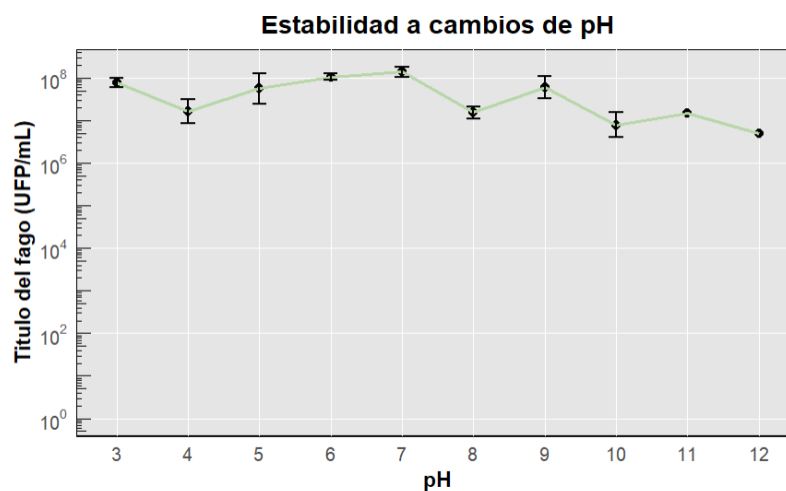


Figura 4 Estabilidad y actividad del fago a diferentes niveles de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). En el eje x se representan el nivel de pH, y en el eje y, la actividad del fago expresada en unidades formadoras de placa (UFP/mL). Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden a la media $\pm$ la desviación estándar.

De igual manera que en el pH, se reportó actividad en todos los rangos de temperatura evaluados, teniendo un mejor rendimiento en un rango de -16°C a 50°C, siendo la temperatura óptima de 4°C, donde se registró una producción de 1,27x10⁹ UFP/mL. En contraste, a 70°C se observó una significativa reducción en la formación de placas, con solo 4x10⁶ UFP/mL, lo que sugiere que temperaturas elevadas afectan su capacidad replicativa.

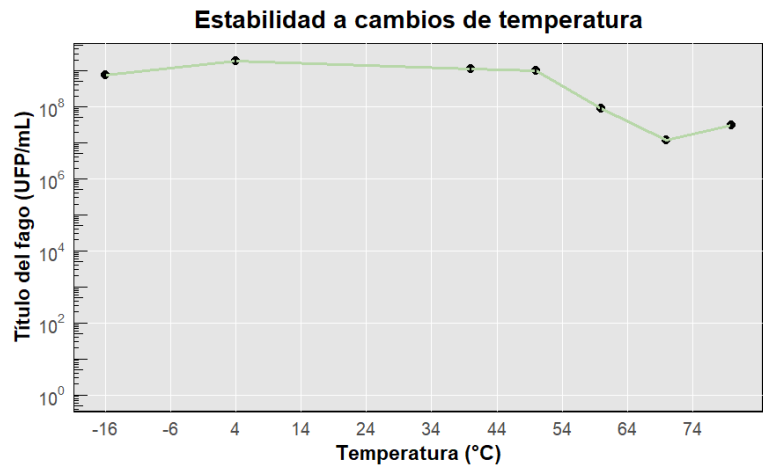


Figura 5 Estabilidad y actividad del fago a diferentes niveles de temperatura (-16°C, 4°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C). En el eje x se representan las temperaturas, y en el eje y, la actividad del fago expresada en unidades formadoras de placa (UFP/mL). Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

A continuación, se presenta una tabla que sintetiza las características fenotípicas del bacteriófago aislado, proporcionando información clave para comprender su comportamiento frente a diversas condiciones. Los aspectos analizados incluyen elementos del ciclo viral, como la constante de adsorción, el periodo de latencia y el tamaño de explosión, además de su estabilidad frente a distintos niveles de pH y temperatura.

Tabla 1 Características fenotípicas del bacteriófago aislado frente a *Staphylococcus aureus*

Característica	Resultado
Cepa huésped	<i>Staphylococcus aureus</i>
Título máximo (UFP/mL)	4 x10 ¹⁰
Características fenotípicas	
Tamaño de explosión (UFP/cel)	30
Periodo de latencia (min)	15
Constante de adsorción (mL/min)	3,62 x10 ⁻¹⁰
Adsorción en el minuto 10 (%)	93

pH	3 a 10
Temperatura (°C)	-16 a 60

Perfil genómico

Obtención del genoma

- Análisis de calidad

Los resultados de la evaluación de la calidad de la secuenciación revelaron un puntaje PHRED mínimo de 31 y un máximo de 37.

- Ensamblaje

El ensamblaje metagenómico generó un total de 31 contigs, de los cuales 18 presentaron una longitud igual o superior a 1000 pares de bases (bp). Al menos el 50% del ensamblaje está compuesto por contigs con una longitud aproximada de 143406 bp (N50), mientras que el contig más largo alcanzó 56992 bp. El contenido de GC fue del 29.82%, y no se detectaron malos emparejamientos en los contigs. La baja proporción de errores respalda la calidad del ensamblaje.

Tabla 2 Métricas del análisis de calidad del ensamblaje

Parámetro	Resultado
Contig más largo (pb)	56 992
Longitud total (>= 0 bp)	169 085
N50 (pb)	17 444
GC%	29.82

- Binning

El proceso de binning generó dos bins. El primero (SV1) consta de 15 contigs con una longitud total de 137,385 pares de bases, una completitud del 98.77%, un porcentaje de error del 1.45% y una cobertura promedio de 213.1x. El segundo bin (SV2) está formado por un único contig de 17,081 pares de bases, con una completitud del 95% y una cobertura promedio de 73.54x. El análisis de calidad de los bins reveló un porcentaje mínimo de contaminación (0.01%), considerado insignificante, lo que indica que los genomas obtenidos corresponden al fago y no a la bacteria huésped.

Filogenia

Se realizó el alineamiento de genomas completos de ADN, comparando los genomas de SV1 y SV2 con fagos específicos para *Staphylococcus aureus* disponibles en la base de datos GenBank del NCBI. La cobertura de los genomas obtenidos estuvo entre el 95 % y el 99 %. Para determinar las relaciones filogenéticas entre los fagos, se construyó un árbol filogenético empleando el método de Máxima Verosimilitud.

En la Figura 7 se presentan las relaciones filogenéticas de los fagos aislados, en comparación con 14 genomas de fagos relacionados. Todas las ramas del árbol filogenético mostraron un nivel de confiabilidad del 100 %, lo que respalda la calidad del análisis. El genoma correspondiente al SV1 mostró una relación filogenética cercana con el fago *Staphylococcus* phage vB_Sau-RP15, aunque se encuentra ubicado en un clado distinto. Los genomas evaluados junto con SV1 comparten una notable similitud con fagos de *Staphylococcus aureus* del género *Silviavirus*, lo que sugiere que SV1 pertenece a este género.

Por otro lado, el genoma del SV2 presentó una mayor similitud con el fago *Staphylococcus* phage SA03-CTH2, también ubicado en un clado diferente. Ambos fagos se agrupan en un clado independiente, lo que indica una distancia evolutiva significativa entre los fagos analizados de *S. aureus* y aquellos referenciados en el análisis BLAST. Este fago muestra relación con secuencias de fagos para *S. aureus* del género *Rosenblumvirus*, lo que permite inferir que pertenece a este género.

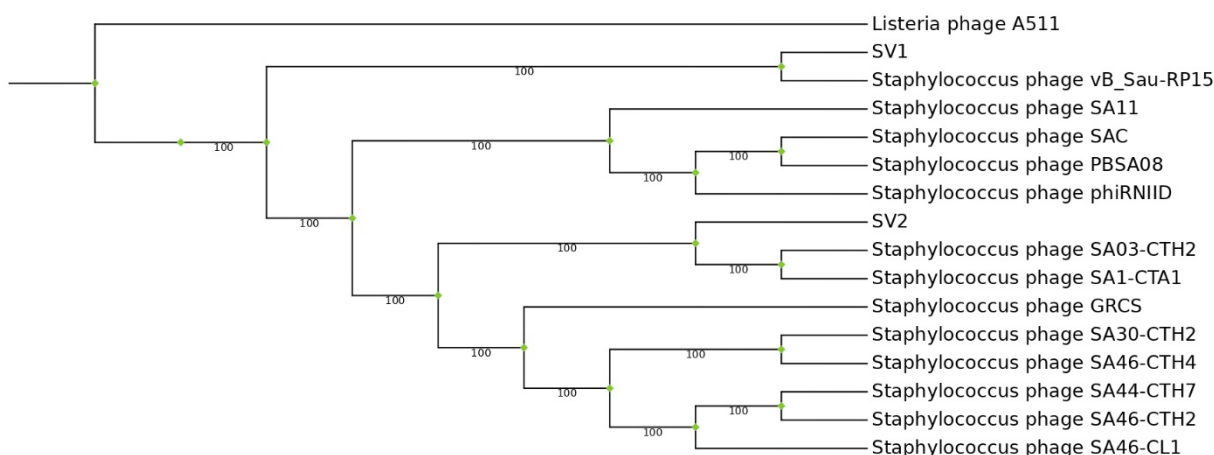


Figura 6 Árbol filogenético basado en las secuencias completas de los genomas de los fagos, construido mediante el método de máxima verosimilitud con IQ-TREE. El análisis incluye las secuencias genómicas completas de los fagos, donde SV1 y SV2. Como outgroup, se utilizó el fago *Listeria* A511.

Para identificar correctamente los fagos, se calculó el porcentaje de identidad nucleotídica utilizando la herramienta VIRIDIC, con los genomas completos obtenidos de BLASTn (Figura 8). En el SV1, el fago SA11 presentó la mayor identidad nucleotídica (90.3%), mientras que la menor correspondió al fago phiRNIID

(81.6%). Para el SV2, el fago SA03-CTH2 alcanzó la mayor identidad (94.5%), y el fago LSA2366 obtuvo la más baja (83.1%).

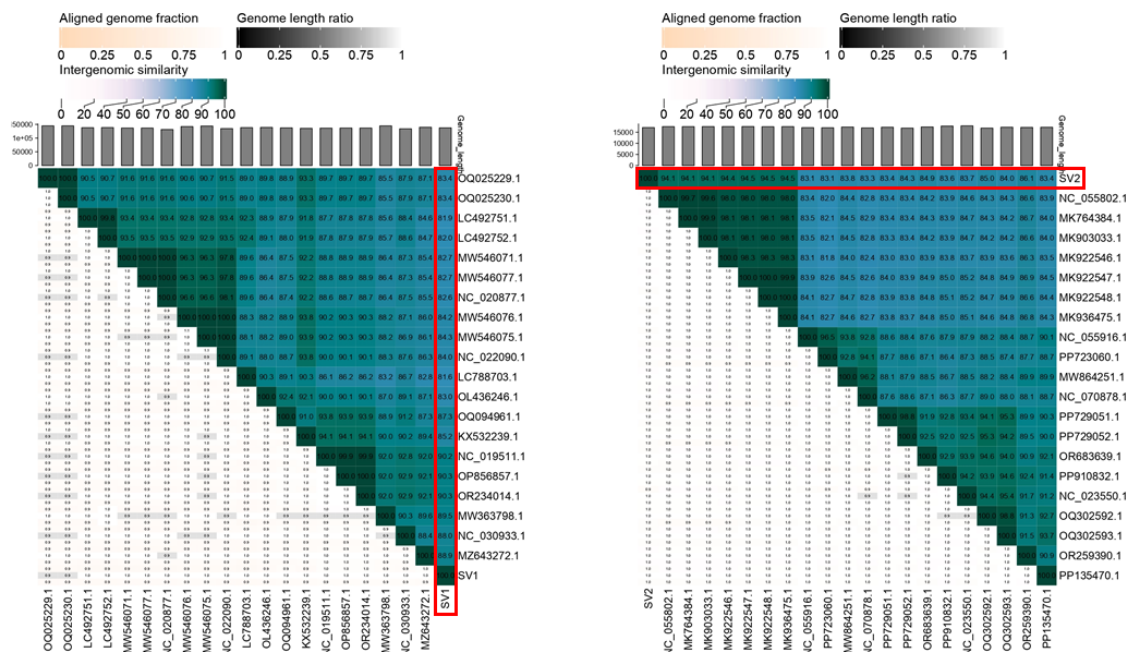


Figura 7 Mapa de calor que compara los genomas completos obtenidos en BLASTn con los genomas ensamblados. El mapa de la izquierda corresponde a SV1 y el de la derecha a SV2. La visualización fue generada con la herramienta VIRIDIC, utilizando un umbral de diferenciación de especies del 95%.

Anotación

El genoma del SV1 (Figura 9) está compuesto por ADN lineal de doble cadena, con una longitud de 137,385 pares de bases y un contenido de guanina-citocina del 29.86%. La anotación estructural identificó 233 marcos abiertos de lectura (ORF), de los cuales 214 son regiones codificantes (CDS), 18 son regiones repetitivas y 1 corresponde a un ARNt. De los ORFs, 195 se transcriben en la hebra positiva, mientras que 38 lo hacen en sentido inverso.

En cuanto a las regiones codificantes, 122 corresponden a proteínas hipotéticas y 74 a proteínas con funciones conocidas.

Las proteínas conocidas se clasificaron en varias categorías según su función (Figura 9): estructura y ensamblaje (azul), lisis (verde), replicación y metabolismo (naranja), y otras funciones (morado).

En la categoría de estructura y ensamblaje, se identificaron 38 genes, que incluyen 10 proteínas de cola, 6 de cápside, 2 de baseplate, 6 relacionadas con la membrana y 8 proteínas estructurales del virión. Destacan, dentro de esta categoría, la proteína principal de la cápside de los Caudovirales (ORF 157) y la proteína portal (ORF 149). Esta es la categoría más numerosa, lo que subraya la importancia de los genes estructurales en el ciclo de vida del fago.

Tabla 3 Clasificación de los genes anotados del genoma de los fagos según su función biológica y estructural.

Tipo de gen	SV1	SV2
Estructura y ensamblaje	38	5
Lisis	8	2
Replicación	18	4
tRNA	1	-
Repeat region	18	-
Hipotético	159	8
Otras	9	1

En la categoría de replicación y metabolismo, se encontraron proteínas necesarias para la replicación del ADN fágico, tales como polimerasas (ORF 34, 37) y helicasas (ORF 8, 10, 12). También se identificaron proteínas reguladoras de la transcripción, como metiltransferasas (ORF 15, 18) y proteínas de unión al ADN, así como enzimas de reparación del ADN, como exonucleasas (ORF 19, 21, 49). Además, se detectaron genes implicados en la transcripción, incluyendo ARN polimerasas (ORF 129).

Por último, en la categoría de genes de lisis, se identificaron proteínas clave para el ciclo de infección del fago. Entre ellas destacan las adhesinas (ORF 193, 197), que facilitan la adsorción del fago, y proteínas involucradas en el secuestro de la maquinaria celular del huésped, como el factor de integración a la célula huésped (ORF 33). Asimismo, se encontraron lisinas (ORF 99, 100, 115, 135), que contribuyen a la etapa de lisis celular durante la liberación de los nuevos viriones. No se identificaron proteínas asociadas con lisogenia, resistencia a antibióticos ni transposones.

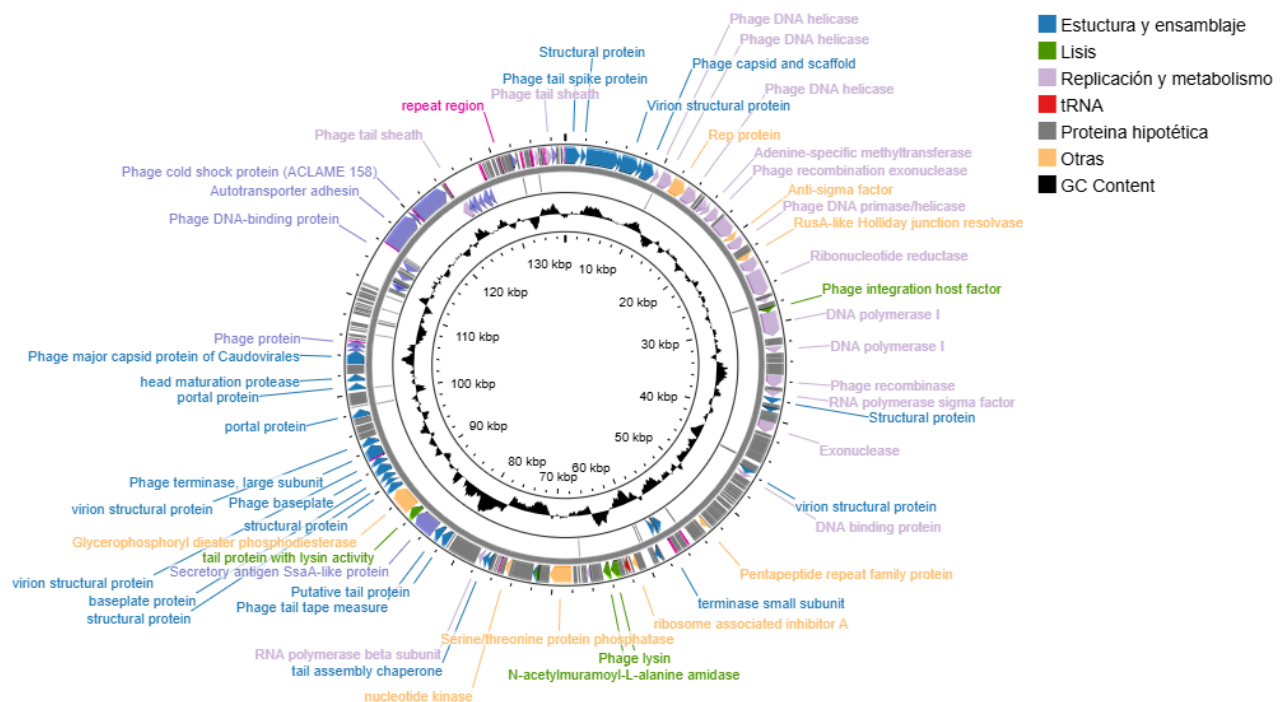


Figura 8 Mapa anotado del genoma del fago SV1, con identificación de genes funcionales y estructurales. Los dos anillos exteriores muestran las direcciones de transcripción de los genes, representadas por flechas, así como la longitud de cada gen. El anillo interno indica el porcentaje de contenido de guanina-citosina (GC) a lo largo del genoma.

El genoma del SV2 (Figura 10) tiene una longitud de 17,081 pares de bases y un contenido de guanina-citocina del 28.86%. Se identificaron 20 ORFs, todos correspondientes a regiones codificantes. De estos ORFs, 11 se transcriben en la hebra positiva, mientras que 9 lo hacen en sentido inverso. De las CDS, 12 corresponden a proteínas con función conocida y 8 a proteínas hipotéticas. No se detectó ARN de transferencia (ARNt).

En términos de funcionalidad, se identificaron proteínas estructurales asociadas a la cola y la cápside del fago, así como genes que codifican proteínas implicadas en la replicación y la lisis, específicamente holinas (ORF 10) y lisinas (ORF 7). No se identificaron proteínas asociadas con lisogenia, resistencia a antibióticos ni transposones.

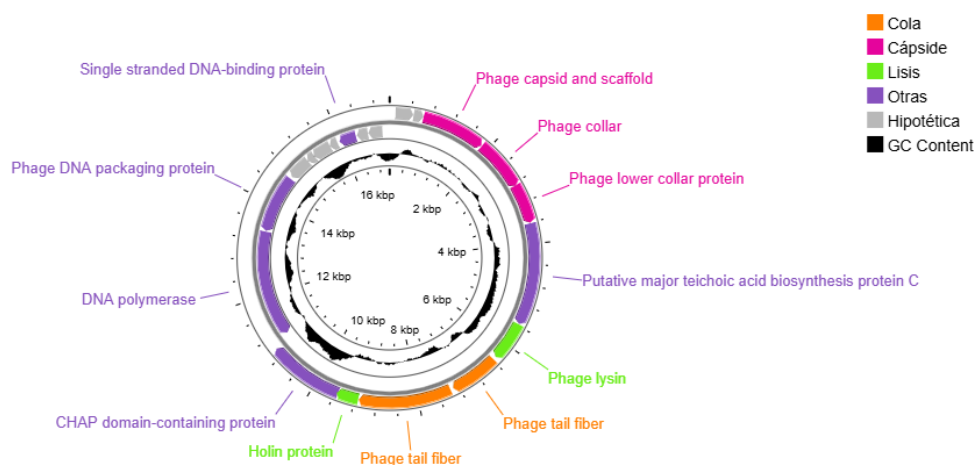


Figura 9 Mapa anotado del genoma del fago SV2, con identificación de genes funcionales y estructurales. Los dos anillos exteriores muestran las direcciones de transcripción de los genes, representadas por flechas, así como la longitud de cada gen. El anillo interno indica el porcentaje de contenido de guanina-citosina (GC) a lo largo del genoma.

4. Discusión

Staphylococcus aureus pertenece al grupo de patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.*), conocidos por causar infecciones tanto nosocomiales como comunitarias. Este grupo de patógenos es especialmente preocupante debido a su resistencia a múltiples antibióticos (Santajit & Indrawattana, 2016), por lo que las infecciones son difíciles de tratar. En este contexto, los fagos se presentan como una alternativa viable para tratar las infecciones en lugar de antibióticos.

En este trabajo, se aislaron y caracterizaron bacteriófagos con actividad frente a *Staphylococcus aureus*, cuyas características lo destacan en comparación con fagos previamente descritos, sugiriendo su potencial para el establecimiento de futuros estudios que permitan evaluar su uso como un agente terapéutico.

El fago aislado mostró una alta afinidad por su bacteria huésped, evidenciada en su capacidad de adsorción. Durante los primeros 10 minutos, el 93% de las partículas virales se adsorbieron a las células bacterianas, indicando una interacción eficiente entre el fago y su hospedador. Este comportamiento es comparable con estudios previos en fagos aislados para *S. aureus*, donde se reportó una adsorción del 92% en 15 minutos (Elsayed et al., 2024), y en el caso del fago VB_SauS_SH-St 15644, un 80% de las partículas virales se adsorbieron en solo 4 minutos (Ji et al., 2020). Estos datos sitúan al fago aislado dentro del rango esperado para otros fagos dirigidos contra *S. aureus*. La rápida tasa de adsorción resalta la alta eficacia de unión que tiene el fago por la bacteria, este valor es importante ya que es el paso crucial para iniciar el proceso de infección (Lerdsittikul et al., 2024).

El ciclo de vida del fago aislado comparte similitudes con otros fagos descritos para *S. aureus*. Aunque su tamaño de explosión es inferior al de fagos como ARW1 (200 UFP/célula) (Rai & Khairnar, 2021) o vB_SauP_P992 (65.8 UFP/célula) (Agbo et al., 2022), es consistente con reportes de fagos con tamaños de explosión de 32, 25 y 13 UFP/célula (Elsayed et al., 2024; Ji et al., 2020; Zhao et al., 2024). El bajo tamaño de explosión puede presentarse como un problema en la fagoterapia. Sin embargo, se debe tener en cuenta otros aspectos como la rapidez de adsorción del fago y el periodo de latencia (Rai & Khairnar, 2021). En cuanto al periodo de latencia establecido en 15 minutos, se observa que la corta duración de este representa una ventaja frente a fagos con periodos más prolongados, como ASUmr123. Este fago requiere de un periodo de 55 minutos para comenzar su actividad viral (El-Tawab et al., 2024). El corto intervalo permite al fago actuar de manera rápida y efectiva, lo cual es crucial para su uso terapéutico (Samir et al., 2022). En conjunto, las características de este fago, como su alta afinidad con el huésped y su breve periodo de latencia, lo posicionan como un candidato prometedor para evaluar su potencial terapéutico.

La estabilidad del fago aislado frente a distintas temperaturas y niveles de pH es importante para evaluar su potencial uso en el tratamiento de infecciones bacterianas (Lerdsittikul et al., 2024). El pH influye en la coagulación y precipitación del fago, lo que produce una reducción en su actividad (Jończyk et al., 2011; Ranveer et al., 2024). En este estudio, el fago mantuvo actividad en todos los rangos de pH evaluados (3 a 10), lo que quiere decir que el fago es capaz de soportar ambientes extremos. Los fagos reportados muestran actividad limitada en rangos extremadamente ácidos y básicos de pH, por ejemplo: el fago StaP1 tiene actividad en un rango de 4 a 8 (Lu et al., 2023), ya que, en valores superiores a ese rango, el fago se inactiva completamente. El rango de actividad más parecido al fago aislado es el de vB_SauM_VL10, el cual tiene actividad en un rango de 4 a 11 (Lerdsittikul et al., 2024).

La temperatura es un factor para tomar en cuenta, ya que regula la fijación y el ciclo de replicación viral, las temperaturas altas pueden alargar el periodo de latencia en algunos casos (Jończyk et al., 2011). El fago aislado demostró ser más resistente que fagos reportados previamente, manteniendo su actividad hasta los 80 °C. En comparación, otros fagos pierden su viabilidad a temperaturas superiores a 60 °C (Elsayed et al., 2024; Lu et al., 2023; Zhao et al., 2024). Esta característica resalta el potencial del fago aislado para aplicaciones en condiciones extremas o procesos que requieran estabilidad térmica.

Por otro lado, la caracterización genómica del fago es importante para conocer con precisión sus características y evaluar su potencial como terapia alternativa a los antibióticos. En primer lugar, los fagos reportados pueden ser categorizados como especies distintas a las reportadas hasta el momento. Esto, según los criterios del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), el cual menciona que un genoma puede considerarse como una nueva especie si la homología con otros virus es inferior al 95 %. Por un lado, SV1 se clasifica dentro de la familia *Herelleviridae*, subfamilia *Twortvirinae*, y género *Silviavirus*. Este género se caracteriza por poseer genomas de entre 130 y 140 kpb (ICTV, n.d.), lo que encaja con la descripción de SV1(137 385 bp). Por otro

lado, SV2 pertenece a la familia *Rountreeviridae*, subfamilia *Rakietenvirinae*, y género *Rosenblumvirus*. Inicialmente, este género formaba parte de la familia *Podoviridae*, pero en 2019 el ICTV lo reclasificó dentro de *Rountreeviridae* (Łobocka M et al., 2022).

El análisis bioinformático permitió identificar los genes presentes en cada fago y su función, información clave para evaluar su aplicabilidad como alternativa terapéutica. En este contexto, se analizó la presencia o ausencia de genes específicos para determinar si los fagos son líticos o lisogénicos. En primer lugar, ambos fagos poseen genes que codifican lisinas. Estas enzimas son responsables de degradar el peptidoglicano de la pared celular, provocando la lisis bacteriana (Lerdsittikul et al., 2024). Un criterio esencial para clasificar a un fago como lítico es la ausencia de genes lisogénicos, como los que codifican la enzima integrasa. Esta enzima se encarga de la integración del material genético viral en el genoma del huésped (Lerdsittikul et al., 2024; Mohaisen et al., 2020). La inserción de genes virales presenta un desafío para la fagoterapia, ya que la bacteria puede adquirir resistencia a fagos similares (Zhang et al., 2022), comprometiendo el éxito de esta. Además, la eficacia de la terapia con un fago temperado es menor en comparación con un fago estrictamente lítico, ya que existe la posibilidad de entrar en el ciclo lisogénico evadiendo la lisis celular (Agbo et al., 2022). Por estas razones es imprescindible que el fago realice solamente el ciclo lítico. En el caso de los dos fagos analizados, no se identificaron genes que codifiquen enzimas integrasas, lo que confirma su carácter lítico.

En cuanto a las proteínas estructurales, destaca la recombinasa, una enzima involucrada en la reparación del ADN y en la correcta replicación del fago (Pan et al., 2023). En SV1, esta enzima está codificada en el ORF 41, pertenece al tipo *UvsX* y se encuentra comúnmente en fagos que infectan *S. aureus* (Lerdsittikul et al., 2024). Otra proteína esencial en el ensamblaje de fagos de ADN de doble cadena es la proteína portal, imprescindible para la formación de la cápside (Dedeo et al., 2019). En SV1, esta proteína está codificada en el ORF 46. Por otro lado, SV2 presenta un genoma más simple en comparación con SV1. No obstante, contiene todos los componentes esenciales para el ensamblaje, replicación viral y lisis bacteriana. En contraste con otros virus del mismo género, como *Staphylococcus* phage GRCS, que posee 21 genes y carece de ARNt (Swift & Nelson, 2014), SV2 mantiene una organización genómica completa para su ciclo infeccioso.

5. Conclusión

En este trabajo se logró aislar bacteriófagos a partir de muestras de agua del río Machángara. El análisis fenotípico mostró que el fago mantiene su actividad en un amplio rango de temperaturas y pH, a diferencia de otros fagos reportados que pierden completamente su actividad en condiciones extremas. Además, presentó un corto período de latencia y una alta afinidad por su bacteria huésped, características clave para su potencial terapéutico, ya que favorecen la eficacia del tratamiento. Por su parte, el análisis genómico confirmó que los fagos tienen un ciclo de replicación lítico, pues no se detectaron genes asociados a la lisogenia. Esto es crucial para evitar la integración del genoma viral en la bacteria, asegurando su efecto lítico sin riesgo de transferencia genética. Las características descritas sugieren que los fagos aislados podrían ser estudiados

en el futuro para su uso contra cepas de *S. aureus*. Para lo cual, se requieren estudios *in vivo* para confirmar la eficacia y eficiencia de la terapia. También es necesario realizar ensayos de evaluación del espectro de acción y su estabilidad a largo plazo.

6.- Recomendaciones

- Para la recolección de muestras, se recomienda evitar los días lluviosos, ya que la lluvia puede diluir la muestra.
- Es fundamental mantener condiciones de asepsia en el lugar de trabajo para prevenir la contaminación de las muestras o del filtrado.

Agradecimientos: Agradezco a mi familia, por su amor incondicional y por recordarme siempre que los desafíos son solo parte del camino. Su confianza en mí ha sido mi mayor motivación. A mis amigos, por su ayuda y compañía durante el proceso. A mis profesores, por sus valiosas enseñanzas, que han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo. Finalmente, a la UISEK por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Abueg, L. A. L., Afgan, E., Allart, O., Awan, A. H., Bacon, W. A., Baker, D., Bassetti, M., Batut, B., Bernt, M., Blankenberg, D., Bombarely, A., Bretaudeau, A., Bromhead, C. J., Burke, M. L., Capon, P. K., Čech, M., Chavero-Díez, M., Chilton, J. M., Collins, T. J., ... Zoabi, R. (2024). The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W83–W94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae410>
- Agbo, E., Ye, Z., Tang, Z., Chen, Y., Wang, T., & Fu, Q. (2022). Isolation and Analysis of the Biological Characteristics of a Novel Bacteriophage vB_SauP_P992 Against *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 15(3). <https://doi.org/10.5812/jjm-121670>
- Aswani, V. H., & Shukla, S. K. (2021). An early history of phage therapy in the united states: Is it time to reconsider? *Clinical Medicine and Research*, 19(2). <https://doi.org/10.3121/cmr.2021.1605>
- Cabezas-Mera, F. S., Atiencia-Carrera, M. B., Villacrés-Granda, I., Proaño, A. A., Debut, A., Vizuete, K., Herrero-Bayo, L., Gonzalez-Paramás, A. M., Giampieri, F., Abreu-Naranjo, R., Tejera, E., Álvarez-Suarez, J. M., & Machado, A. (2023). Evaluation of the polyphenolic profile of native Ecuadorian stingless bee honeys (Tribe: Meliponini) and their antibiofilm activity on susceptible and multidrug-resistant pathogens: An exploratory analysis. *Current Research in Food Science*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100543>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. In *Virulence* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>

- Dedeo, C. L., Cingolani, G., & Teschke, C. M. (2019). Portal Protein: The Orchestrator of Capsid Assembly for the dsDNA Tailed Bacteriophages and Herpesviruses. *Annual Review of Virology*, 6. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015819>
- Elsayed, M. M., Elkenany, R. M., EL-Khateeb, A. Y., Nabil, N. M., Tawakol, M. M., & Hassan, H. M. (2024). Isolation and encapsulation of bacteriophage with chitosan nanoparticles for biocontrol of multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from broiler poultry farms. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55114-5>
- El-Tawab, A. K. A., Othman, B. A., Sharaf, A., El-Masry, S. S., & El-Arabi, T. F. (2024). Characterization and complete genome sequence of highly lytic phage active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Egypt. *Virology Journal*, 21(1), 284. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02554-0>
- Gupta, P., Singh, H. S., Shukla, V. K., Nath, G., & Bhartiya, S. K. (2019). Bacteriophage Therapy of Chronic Nonhealing Wound: Clinical Study. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 18(2). <https://doi.org/10.1177/1534734619835115>
- Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. In *Annual Review of Medicine* (Vol. 73). <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208>
- Jakočiūnė, D., & Moodley, A. (2018). A rapid bacteriophage dna extraction method. *Methods and Protocols*, 1(3). <https://doi.org/10.3390/mps1030027>
- Ji, J., Liu, Q., Wang, R., Luo, T., Guo, X., Xu, M., Yin, Q., Wang, X., Zhou, M., Li, M., & He, P. (2020). Identification of a novel phage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* In vitro and In vivo. *Microbial Pathogenesis*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104317>
- Jo, S. J., Kwon, J., Kim, S. G., & Lee, S. J. (2023). The Biotechnological Application of Bacteriophages: What to Do and Where to Go in the Middle of the Post-Antibiotic Era. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092311>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages-review. In *Folia Microbiologica* (Vol. 56, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Kebriaei, R., Lev, K. L., Stamper, K. C., Lehman, S. M., Morales, S., & Rybak, M. J. (2021). Bacteriophage AB-SA01 cocktail in combination with antibiotics against mrsa-visa strain in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01863-20>
- Kwieceński, J. M., & Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.005>
- Lerdsittikul, V., Apiratwarrasakul, S., Atitthep, T., Withatanung, P., Indrawattana, N., Pumirat, P., Chaiwat-tanarungruengpaisan, S., & Thongdee, M. (2024). Isolation and characterisation of a novel Silviavirus bacteriophage promising antimicrobial agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Scientific Reports*, 14(1), 9251. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59903-w>

- Łobocka M, Stefańczyk E, Adriaenssens EM, Kropinski AM, & Turner D. (2022). Create one new species in the genus *Rosenblumvirus* and two new species in the genus *Andhravirus* of *Rakietenvirinae* subfamily (Caudoviricetes: Rountreeviridae).
- Lu, Y., Lu, Y., Li, B., Liu, J., Wang, L., Zhang, L., Li, Y., & Zhong, Q. (2023). StAP1 phage: an effective tool for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267786>
- Mohaisen, M. R., McCarthy, A. J., Adriaenssens, E. M., & Allison, H. E. (2020). The Site-Specific Recombination System of the *Escherichia coli* Bacteriophage Φ 24B. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.578056>
- Nayfach, S., Camargo, A. P., Schulz, F., Eloë-Fadrosch, E., Roux, S., & Kyrpides, N. C. (2021). CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nature Biotechnology*, 39(5). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00774-7>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1). <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Pan, Y., Xie, N., Zhang, X., Yang, S., & Lv, S. (2023). Computational Insights into the Dynamic Structural Features and Binding Characteristics of Recombinase UvsX Compared with RecA. *Molecules*, 28(8). <https://doi.org/10.3390/molecules28083363>
- Parmanik, A., Das, S., Kar, B., Bose, A., Dwivedi, G. R., & Pandey, M. M. (2022). Current Treatment Strategies Against Multidrug-Resistant Bacteria: A Review. In *Current Microbiology* (Vol. 79, Issue 12). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03061-7>
- Petrovic Fabijan, A., Lin, R. C. Y., Ho, J., Maddocks, S., Ben Zakour, N. L., Iredell, J. R., Khalid, A., Venturini, C., Chard, R., Morales, S., Sandaradura, I., & Gilbey, T. (2020). Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Microbiology*, 5(3). <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0634-z>
- Rai, A., & Khairnar, K. (2021). Isolation and Characterization of Bacteriophage Against Wastewater Isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 14(9). <https://doi.org/10.5812/JJM.119291>
- Rangel-Pineros, G., Sicheritz-Pontén, T., & Clokie, M. R. J. (2021). inPhocus: “Virus Amigos?” The Journey of the Development of Phage-Based Biocontrol in the Latin American Poultry and Aquaculture Industries. *PHAGE*, 2(1). <https://doi.org/10.1089/phage.2021.29012.grp>
- Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, M. F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, V., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D. V., Khedkar, G. D., Raposo, A., Han, H., & Puniya, A. K. (2024). Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. In *npj Science of Food* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8>
- Rodriguez, J. M., Woodworth, B. A., Horne, B. A., Fackler, J., & Brownstein, M. J. (2022). Case Report: successful use of phage therapy in refractory MRSA chronic rhinosinusitis. *International Journal of Infectious Diseases*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.04.049>

- Samir, S., El-Far, A., Okasha, H., Mahdy, R., Samir, F., & Nasr, S. (2022). Isolation and characterization of lytic bacteriophages from sewage at an Egyptian tertiary care hospital against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.03.019>
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Silviavirus* | ICTV. (n.d.). Retrieved October 3, 2024, from https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Myoviridae
- Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. In *Cell* (Vol. 186, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017>
- Swift, S. M., & Nelson, D. C. (2014). Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* phage GRCS. *Genome Announcements*, 2(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00209-14>
- Tisalema-Guanopatín, E., Cabezas-Mera, F., Nolivos-Rodríguez, K., Fierro, I., Pazmiño, L., Garzon-Chavez, D., Debut, A., Vizuite, K., & Reyes, J. A. (2023). New Bacteriophages Members of the Ackermannviridae Family Specific for *Klebsiella pneumoniae* ST258. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*, 4(2). <https://doi.org/10.1089/phage.2022.0039>
- Wang, S., Sundaram, J. P., & Spiro, D. (2010). VIGOR, an annotation program for small viral genomes. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-451>
- Zhang, L., Shahin, K., Soleimani-Delfan, A., Ding, H., Wang, H., Sun, L., & Wang, R. (2022). Phage JS02, a putative temperate phage, a novel biofilm-degrading agent for *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 75(3). <https://doi.org/10.1111/lam.13663>
- Zhao, P., Zhao, W., Zhai, X., He, Y., Shu, W., & Qiao, G. (2024). Biological characterization and genomic analysis of a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage, SauPS-28. *Microbiology Spectrum*, 12(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00295-23>