



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

CARACTERIZACIÓN  
MICROBIOLÓGICA, GENÓMICA Y  
ESTRUCTURAL DE DOS  
BACTERIÓFAGOS ESPECÍFICOS DE  
*Salmonella enterica serovar Typhimurium*

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

RAÚL EDUARDO LAUREANO REVILLA

LIMA – PERÚ

2025



**ASESOR**

Dr. DANIEL GUERRA GIRALDEZ

**CO-ASESORES**

Dr. WILFREDO EVANGELISTA FALCON

Dr. JESUS HUMBERTO TAMARIZ ORTIZ

**JURADO DE TESIS**

DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

PRESIDENTE

DR. LUIS ESTEBAN CABRERA SOSA

VOCAL

MG. IRENE ROSA MARIA DELGADO DE LA FLOR MONTAUBAN

SECRETARIO (A)

## **DEDICATORIA**

A mis padres Hernán y Betty, por su apoyo incondicional y cariño.

A mis abuelos Olga y Lucho, que siempre creyeron en mí.

A *Forest*, que siempre estuvo a mi lado, inspirándome en los momentos difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores Dr. Daniel Guerra Giraldez, Dr. Wilfredo Evangelista y Dr. Jesús

Tamariz Ortiz, por su enseñanza, guía y valiosos consejos.

A los compañeros de los laboratorios de Moléculas Individuales y Resistencia antimicrobiana y Fagoterapia, por su apoyo constante y valiosas opiniones.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El proyecto “Amplifying RI impact with a global perspective: a Regional Hubs model”, con el contrato N° PE501080175-2022 financió el presente trabajo.



### DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	LAUREANO REVILLA RAÚL EDUARDO

Pertenecientes al programa de la **MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, autores del trabajo titulado: **CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA, GENÓMICA Y ESTRUCTURAL DE DOS BACTERIÓFAGOS ESPECÍFICOS DE *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium***, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el grado de **MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	GUERRA GIRALDEZ DANIEL	FACI	MAESTRÍA
2.	EVANGELISTA FALCON WILFREDO	FACI	MAESTRÍA
3.	TAMARIZ ORTIZ JESUS HUMBERTO	FACI	MAESTRÍA

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **4%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **2803810805**; fecha de entrega: **04-11-2025**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: Lima, 04 de noviembre de 2025

Firma del asesor

Daniel Guerra Giraldez, N° DNI: 10222064

ORCID: 0000-0002-2410-722X

Firma del Co-asesor

Wilfredo Evangelista Falcón  
N° DNI: 10137673

ORCID: 0000-0002-8957-6959

Firma del Co-asesor

N° DNI: 10431135

ORCID: 0000-0002-0827-8117

## ÍNDICE

Resumen	
Abstract	
I. Introducción .....	1
II. Marco teórico .....	4
i. Salmonelosis y resistencia antimicrobiana .....	4
ii. Bacteriófagos.....	5
iii. Clasificación de bacteriófagos .....	6
iv. Ciclo de vida de bacteriófagos líticos y lisogénicos.....	9
v. Bacteriófago FEX .....	11
vi. Caracterización microbiológica .....	13
vii. Caracterización genómica .....	14
viii. Caracterización estructural.....	14
III. Justificación.....	16
IV. Pregunta de investigación .....	17
V. Objetivos.....	17
i. Objetivo general.....	17
ii. Objetivos específicos.....	17
VI. Metodología .....	18
i. Cultivo de la cepa hospedera .....	18
ii. Obtención de poblaciones de bacteriófagos .....	18
iii. Amplificación y concentración del bacteriófago .....	20
iv. Determinación de la concentración de bacteriófagos .....	21
v. Determinación del rango de hospederos.....	22
vi. Determinación del MOI y curva de “un solo paso” .....	23
vii. Determinación de la estabilidad en función del pH y temperatura .....	24
viii. Pruebas estadísticas .....	25
ix. Extracción de ADN de los bacteriófagos.....	25
x. Secuenciación del genoma.....	26
xi. Ensamblaje y anotación del genoma .....	26
xii. Análisis bioinformático.....	27

xiii.	Visualización de los bacteriófagos por TEM.....	28
xiv.	Representación gráfica de la asignación proteínas estructurales .....	28
xv.	Consideraciones éticas .....	29
xvi.	Consideraciones de bioseguridad .....	30
	1. Grupo de riesgo del agente patógeno.....	30
	2. Infraestructura y nivel de seguridad .....	30
VII.	Resultados.....	31
	i. Caracterización microbiológica .....	31
	1. Aislamiento y fotografías por TEM.....	31
	2. Rango de hospederos.....	32
	3. Estabilidad según el pH y temperatura .....	33
	4. MOI y curva de un solo paso.....	35
	ii. Caracterización genómica .....	36
	1. Secuenciamiento y ensamblaje de genomas .....	36
	2. Caracterización genómica del fago FEX1 .....	42
	3. Caracterización genómica del fago FEX2 .....	46
	iii. Asignación de proteínas estructurales .....	49
	1. Asignación de proteínas estructurales de FEX1 .....	49
	2. Asignación de proteínas estructurales de FEX2 .....	60
VIII.	Discusión .....	63
IX.	Limitaciones del estudio .....	78
X.	Conclusiones .....	80
XI.	Referencias.....	82
XII.	Anexos	

## **Leyenda de abreviaturas**

**TEM:** Microscopía electrónica de transmisión

**MOI:** Índice de multiplicidad de infección

**PFU:** Unidades formadoras de placas

**CFU:** Unidades formadoras de colonias

**LB:** Luria-bertani

**SS:** Shigella-salmonella

**MF:** McFarland

**2X:** Indica que el medio tiene doble concentración.

**PEG:** Polietilenglicol

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**HGT:** Regiones de transferencia horizontal

**ARG:** Genes de resistencia antimicrobiana

**LPS:** Lipopolisacárido

**AMG:** Genes metabólicos auxiliares

**Abi:** Infección abortiva

**ARNbc:** ARN bicatenario

**NAD:** dinucleótidos de nicotinamida

**ARNt:** ARN de transferencia

## **Leyenda de tablas**

**Tabla N°1.** Espectro de hospederos de los fagos FEX1 y FEX2.

**Tabla N°2.** Determinación del MOI óptimo para los fagos FEX1 y FEX2. Se sombrea de gris los valores de (PFU/mL) más altos.

## **Leyenda de figuras**

**Figura N°1.** Relación filogenética y clasificación genómica de virus eucariotas y bacteriófagos basada en el tipo de ácido nucleico.

**Figura N.º 2.** Ciclos lítico y lisogénico de los bacteriófagos. El gráfico muestra las fases del ciclo reproductivo de un fago, desde la infección inicial hasta la liberación de nuevas partículas víricas o la integración del genoma viral al ADN bacteriano. Imagen elaborada por el autor, adaptación de *Campbell A., 2023*.

**Figura N°3.** Perfil lítico de bacteriófagos aislados a partir de muestras de *Cavia porcellus* provenientes de criaderos de cuyes en Lima. Se evaluaron contra 44 serotipos de *Salmonella typhimurium*.

**Figura N°4.** Curva de “un solo paso” para el bacteriófago FEX. En la escala inferior se tiene el tiempo tras la infección en minutos, mientras que en la escala superior se tiene la de producción de bacteriófagos (en función a PFU, unidades formadoras de placas).

**Figura N°5.** Procedimiento de obtención de cultivos de fagos de una sola especie.

**Figura N°6.** Esquema del procedimiento de purificación.

**Figura N°7.** Esquema del procedimiento de determinación de la concentración de bacteriófagos.

**Figura N°8.** Esquema del procedimiento de ensamblaje del genoma.

**Figura N°9.** Esquema del procedimiento de anotación de genes.

**Figura N°10.** Morfología de las placas de lisis formadas por los fagos FEX1 (A) y FEX2 (B) en agar LB. Las placas de lisis formadas por FEX1 son translúcidas que las de FEX2, sugiriendo una mayor actividad lítica.

**Figura N°11.** Fotografías obtenidas por medio de TEM de los fagos FEX1 (A) y

FEX2 (B). Se puede apreciar la morfología Siphoviridae y Myoviridae de FEX1 y FEX2 respectivamente.

**Figura N°12.** Estabilidad del fago FEX1 (A) y FEX2 (B) tras la incubación en diferentes pH. FEX2 es más estable que FEX1 en diferentes valores de pH.

**Figura N°13.** Estabilidad del fago FEX1 (A) y FEX2 (B) tras la incubación a diferentes temperaturas. FEX1 es más estable que FEX2 en temperaturas mayores a 50°C.

**Figura N°14.** Curva de “un solo paso” de los fagos FEX1 (A) y FEX2 (B). FEX1 presentó un periodo de latencia de 15 min. y un burst size de 109 fagos por bacteria, mientras que FEX2 presentó 20 min. y 196 fagos por bacteria.

**Figura N°15.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX1 (A y B respectivamente). Se observa un gran número de lecturas que se encuentran en las zonas de calidad intermedia y mala.

**Figura N°16.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX2 (A y B respectivamente). Se observa un gran número de lecturas que se encuentran en las zonas de calidad intermedia y mala.

**Figura N°17.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX1 (A y B respectivamente) tras la depuración con Trimmomatic. Se observa que la calidad de las lecturas ha mejorado.

**Figura N°18.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX2 (A y B respectivamente) tras la depuración con Trimmomatic. Se observa que la calidad de las lecturas ha mejorado.

**Figura N°19.** Resultados de la evaluación de la calidad de los ensamblajes de FEX1 y FEX2 (A y B, respectivamente) por medio de QUAST. El ensamblaje de FEX2

presenta una mayor calidad en términos de continuidad y menor fragmentación que el ensamblaje de FEX1.

**Figura N°20.** Análisis de similaridad intergenómica del fago FEX1. Se observa que presenta un porcentaje de similaridad menor a 95% con los demás fagos.

**Figura N°21.** Alineamiento genómico del fago FEX1 respecto a los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa una divergencia en el ordenamiento de los genes de FEX1 en comparación a los demás fagos.

**Figura N°22.** Comparación proteómica del fago FEX1 respecto a los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa una distribución heterogénea de los porcentajes de identidad del proteoma de FEX1 con respecto a los demás fagos.

**Figura N°23.** Análisis de similaridad intergenómica del fago FEX2. Se observa que presenta un porcentaje de similaridad menor a 95% con los demás fagos, a excepción de uno (KP143762.1).

**Figura N°24.** Alineamiento genómico del fago FEX2 respecto a los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa un ordenamiento de genes más conservado con respecto a los demás fagos.

**Figura N°25.** Comparación proteómica del fago FEX2 contra los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa un alto porcentaje de identidad a lo largo de gran parte del proteoma.

**Figura N°26.** Alineamiento estructural entre la proteína mayor de la cápside de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.653 Å tras alinear 1689 átomos.

**Figura N°27.** Alineamiento estructural entre la proteína portal de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con

un RMSD de 1.423 Å tras alinear 2209 átomos.

**Figura N°28.** Alineamiento estructural entre la proteína de cierre de la cápside de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 2.510 Å tras alinear 1174 átomos.

**Figura N°29.** Alineamiento estructural entre la proteína completamiento de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.158 Å tras alinear 985 átomos.

**Figura N°30.** Alineamiento estructural entre la proteína de medida de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 8.826 Å tras alinear 584 átomos.

**Figura N°31.** Alineamiento estructural entre la proteína tubular de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.338 Å tras alinear 2430 átomos.

**Figura N°32.** Alineamiento global entre la proteína lateral de la cola A de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa que no hay relación de homología entre las proteínas.

**Figura N°33.** Alineamiento estructural entre la proteína central de la base de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 2.290 Å tras alinear 5230 átomos.

**Figura N°34.** Alineamiento estructural entre la proteína lateral de la cola C de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 0.709 Å tras alinear 802 átomos.

**Figura N°35.** Alineamiento estructural entre la proteína central de la punta de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre

ambas estructuras, con un RMSD de 1.381 Å tras alinear 1947 átomos.

**Figura N°36.** Alineamiento estructural entre la proteína distal de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 0.985 Å tras alinear 1357 átomos.

**Figura N°37.** Alineamiento estructural entre la proteína de la fibra recta de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa que hay relación de homología entre las proteínas.

**Figura N°38.** Asignación estructural de las proteínas del fago FEX1 utilizando como referencia el fago DT57C. Los valores de identidad y similitud entre las proteínas estructurales de FEX1 y DT57C se muestran en los recuadros correspondientes. La proteína lateral de la cola A (cuadro en rojo) no muestra relación de homología con su contraparte en DT57C, con un porcentaje de identidad del 28.6% y similitud del 39.5%.

**Figura N°39.** Alineamiento estructural entre la proteína mayor de la cápside de FEX2 (magenta) y Sf14 (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 0.402 Å tras alinear 2124 átomos.

**Figura N°40.** Asignación estructural de las proteínas del fago FEX2 utilizando como referencia el fago Sf14. Los valores de identidad y similitud entre la proteína estructural de FEX2 y Sf14 se muestra en el recuadro correspondiente. Solo se considera a la proteína principal de la cápside dado que única sección del fago que ha sido elucidado tridimensionalmente.**Figura N°41.** Mapa filogenético de los fagos con genoma ADNbc. Con estrella roja se marcaron los fagos con estructura conocida por medio de Cryo-EM. Con un círculo rojo se marcó la ubicación de FEX1 y FEX2.

## Resumen

Los bacteriófagos han surgido como una alternativa prometedora para combatir bacterias resistentes a los antibióticos, un problema de salud global cuyo control requiere un abordaje integral. Este estudio se centra en la caracterización microbiológica, genómica y estructural de dos bacteriófagos, FEX1 y FEX2, seleccionados por su actividad lítica contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. La caracterización microbiológica reveló que FEX1 presenta una morfología siphoviral, un período de latencia de 15 minutos y un tamaño de explosión de 109 PFU/célula, mientras que FEX2 exhibe una morfología myoviral, un período de latencia de 20 minutos, pero con un mayor tamaño de explosión (196 PFU/célula). La determinación del MOI indicó que FEX1 y FEX2 alcanzaron su máxima producción a 0.01 y 0.001, respectivamente. Los ensayos de estabilidad mostraron que FEX1 fue más resistente al estrés térmico, mientras que FEX2 mostró una mayor tolerancia a condiciones alcalinas. El análisis genómico identificó a FEX1 como un nuevo miembro del género *Tequintavirus* y a FEX2 como un miembro de *Felixounavirus*. Ambos genomas carecen de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia. El mapeo estructural, utilizando herramientas bioinformáticas y microscopía electrónica de transmisión (TEM), sugirió similitudes entre FEX1 y el fago DT57C, mientras que la estructura de la cápside de FEX2 se asemejó a la del fago Sf14. Estos hallazgos contribuyen a la comprensión de la biología de los bacteriófagos y respaldan el potencial de FEX1 y FEX2 como candidatos para la fagoterapia contra *Salmonella*.

**Palabras clave:** Bacteriófago, *Salmonella*, genoma, Siphovirus, Myovirus, *Tequintavirus*, *Felixounavirus*.

## **Abstract**

Bacteriophages have emerged as a promising alternative to combat antibiotic-resistant bacteria, a global health issue that requires a comprehensive approach. This study focuses on the microbiological, genomic, and structural characterization of two bacteriophages, FEX1 and FEX2, selected for their lytic activity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiological characterization revealed that FEX1 exhibits a siphoviral morphology, a latent period of 15 minutes, and a burst size of 109 PFU/cell, while FEX2 displays a myoviral morphology, a 20-minute latent period, but a higher burst size (196 PFU/cell). The determination of the MOI indicated that FEX1 and FEX2 reached their maximum production at 0.01 and 0.001, respectively. Stability assays showed that FEX1 was more resistant to thermal stress, whereas FEX2 demonstrated greater tolerance to alkaline conditions. Genomic analysis identified FEX1 as a novel member of the Tequintavirus genus and FEX2 as a member of Felixounavirus. Both genomes lack antibiotic resistance genes and virulence factors. Structural mapping, using bioinformatics tools and transmission electron microscopy (TEM), suggested similarities between FEX1 and phage DT57C, while the capsid structure of FEX2 resembled that of phage Sf14. These findings contribute to the understanding of phage biology and support the potential of FEX1 and FEX2 as candidates for phage therapy against *Salmonella*.

**Keywords:** Bacteriophage, *Salmonella*, genome, Siphovirus, Myovirus, *Tequintavirus*, *Felixounavirus*.

## I. Introducción

Los bacteriófagos, virus que infectan bacterias específicas, constituyen una de las entidades biológicas más abundantes y diversificadas en la Tierra, desempeñando un papel crucial en la regulación de las poblaciones y ecosistemas microbianos (1-3). Aunque fueron descubiertos ya en el siglo XX, en la actualidad se ha abierto nuevas rutas de investigación y desarrollo, especialmente debido a que la resistencia a los antibióticos emerge como una amenaza global para la salud pública (4,5). Este fenómeno ha impulsado la reevaluación de los bacteriófagos como agentes terapéuticos, marcando un renacimiento en la investigación de fagos y su aplicación potencial en la biotecnología y la medicina (6-8).

En el contexto de la resistencia antibiótica, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (en adelante S. Typhimurium) es un patógeno particularmente desafiante, asociado con enfermedades zoonóticas graves y brotes de infección alimentaria en todo el mundo (9-12). La adaptabilidad y resistencia de esta bacteria a múltiples fármacos resaltan la urgencia de explorar alternativas terapéuticas eficaces. Los bacteriófagos específicos contra *Salmonella* ofrecen una solución prometedora, dado su mecanismo de acción específico y su capacidad para coevolucionar con sus huéspedes bacterianos, superando así las limitaciones de los tratamientos antibióticos convencionales (13, 14).

El estudio del desempeño de los bacteriófagos en el tratamiento de infecciones bacterianas no es algo reciente. Un estudio realizado por Alisky et al. (1998), recopiló publicaciones desde 1966 a 1996, dejando en evidencia que la terapia

fágica en humanos obtuvo un éxito del 80-95% en infecciones provocadas por bacterias patógenas de los géneros *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomona* y *Salmonella* (15). Tras ello diversos estudios muestran el potencial terapéutico de los bacteriófagos y constituyen una alternativa para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por cepas antibiótico-resistentes (16-18).

Como aporte a esta línea de investigación, en un estudio previo realizado por el Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos y Fagoterapia (Universidad Peruana Cayetano Heredia, UPCH) se aislaron 6 bacteriófagos con actividad lítica significativa a *S. Typhimurium* (ATCC 14028), reportando que el fago denominado provisionalmente como “FEX” presentaba mejores propiedades fenotípicas entre ellas su capacidad lítica. El estudio se limitó a la caracterización microbiológica del fago aislado y un abordaje terapéutico a nivel preclínico en el modelo animal *Cavia porcellus* (19). Otros estudios destacan no solo la capacidad de los bacteriófagos para actuar como agentes antibacterianos naturales sino también su potencial para ser desarrollados como tratamientos específicos para patógenos resistentes a los medicamentos, y como componente fundamental de cocteles de bacteriófagos destinados a tratar salmonelosis (20, 21).

Inicialmente, el objetivo de este trabajo consistía en llevar a cabo una caracterización genómica y mapeo estructural detallado del fago FEX. No obstante, durante el proceso de secuenciación y análisis genómico, se detectó que la muestra originalmente descrita no correspondía a una población homogénea de un solo fago, sino que se componía de al menos dos fagos distintos. Este descubrimiento planteó

nuevas preguntas, ya que cada uno de estos fagos podría presentar propiedades microbiológicas y genéticas únicas. A partir de este hallazgo, el propósito de la presente investigación se reformuló para abordar la caracterización integral de ambas entidades fágicas, denominadas de ahora en adelante como fagos FEX1 y FEX2. Así, el trabajo no solo busca describir las características genómicas y estructurales de cada fago, sino también realizar una nueva caracterización microbiológica individual, con el fin de comprender sus diferencias fenotípicas, sus posibles interacciones y su potencial aplicación en ámbitos clínicos o industriales (22).

Al caracterizar aisladamente a los bacteriófagos FEX1 y FEX2 que evidencian potencial lítico para la bacteria *S. Typhimurium* ATCC 14028, esta investigación proporciona una base sólida para el desarrollo de innovaciones biotecnológicas específicas que puedan ser aplicadas no solo en el tratamiento de la salmonelosis sino también en la prevención de contaminación por *Salmonella* en productos alimenticios y las consecuencias que pueden derivarse de esta (23,24).

## II. Marco teórico

### i. Salmonelosis y resistencia antimicrobiana

La circulación de serovares de *Salmonella enterica* en alimentos de origen animal presenta patrones definidos por matriz y región. Estudios recopilatorios identifican a *S. Typhimurium* como un serovar de distribución cosmopolita presente en múltiples matrices, mientras que *S. Enteritidis* se asocia de manera persistente con productos avícolas. Otros serovares muestran afinidades particulares, como *S. Anatum* en carne de res y *S. Weltevreden* en productos marinos, junto con la emergencia de *Derby*, *Agona*, *Infantis* y *Kentucky* (25).

Más allá de la cadena alimentaria, los hospederos animales cercanos a humanos pueden participar en la ecología de *Salmonella*. En mascotas se han documentado aislamientos con multiresistencia fenotípica, con perfiles que incluyen resistencia a estreptomicina, cotrimoxazol, tetraciclina y ceftriaxona. A nivel genómico, estos aislamientos portan genes de resistencia como *floR*, *blaCTX-M-15* y *blaCTX-M-55*, y un repertorio diverso de plásmidos, tales como IncA/C2, IncFII(S), IncX1, IncFIB(S) y IncQ1 (26).

En sistemas pecuarios específicos, como la crianza de cuyes, la caracterización genómica de *S. Typhimurium* ha mostrado la coexistencia de dos linajes diferenciados pertenecientes al ST19, separados por un gran número de SNPs. Uno de ellos corresponde a una variante monofásica en la que los genes *fliA* y *fliB* están ausentes por inserción de secuencias fágicas. En estos aislamientos se detectó de forma consistente un plásmido de virulencia tipo pSLT con el operón *spvRABCD* y

un repertorio de profagos distribuidos según su linaje. Aunque la mayoría de los aislamientos de cuy no presentaron múltiples genes de resistencia, se identificó un cassette con *ant(3')-Ia*, *dfrA15*, *qacE* y *sulI* insertado en un plásmido de tipo IncII. En paralelo, aislamientos humanos filogenéticamente próximos portaron determinantes clínicamente relevantes como *blaCTX-M-65* y *mcr-1*, y agruparon dentro de los mismos clústeres que los de cuy, mostrando el potencial de infección cruzada entre hospederos (27).

## ii. Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan específicamente a las bacterias, actuando como agentes de lisis y control de poblaciones bacterianas en diversos ecosistemas (1). Estructuralmente cuentan con una cápside de naturaleza proteica que encapsula el material genético del bacteriófago. También cuentan con una estructura portal, que permite el paso del material genético tras la adhesión a la bacteria (28). Algunos fagos cuentan con una cola que separa a la cápside de la base del bacteriófago, la cual en algunos casos se contrae cuando se da la inyección del material genético al hospedero (29). Dada su complejidad biológica, los fagos se les clasifican en base a su morfología, composición genética y el tipo de ciclo de vida que adoptan, distinguiendo entre los que siguen un ciclo lítico, que destruye la célula bacteriana, y aquellos con un ciclo lisogénico, integrando su material genético en el huésped sin causar daño inmediato (1, 2). Esta dualidad en los mecanismos de acción subraya la adaptabilidad y la evolución de los bacteriófagos, facilitando su persistencia en entornos cambiantes y su uso en aplicaciones biotecnológicas, dada su capacidad para seleccionar específicamente

sus huéspedes bacterianos (30).

### iii. Clasificación de bacteriófagos

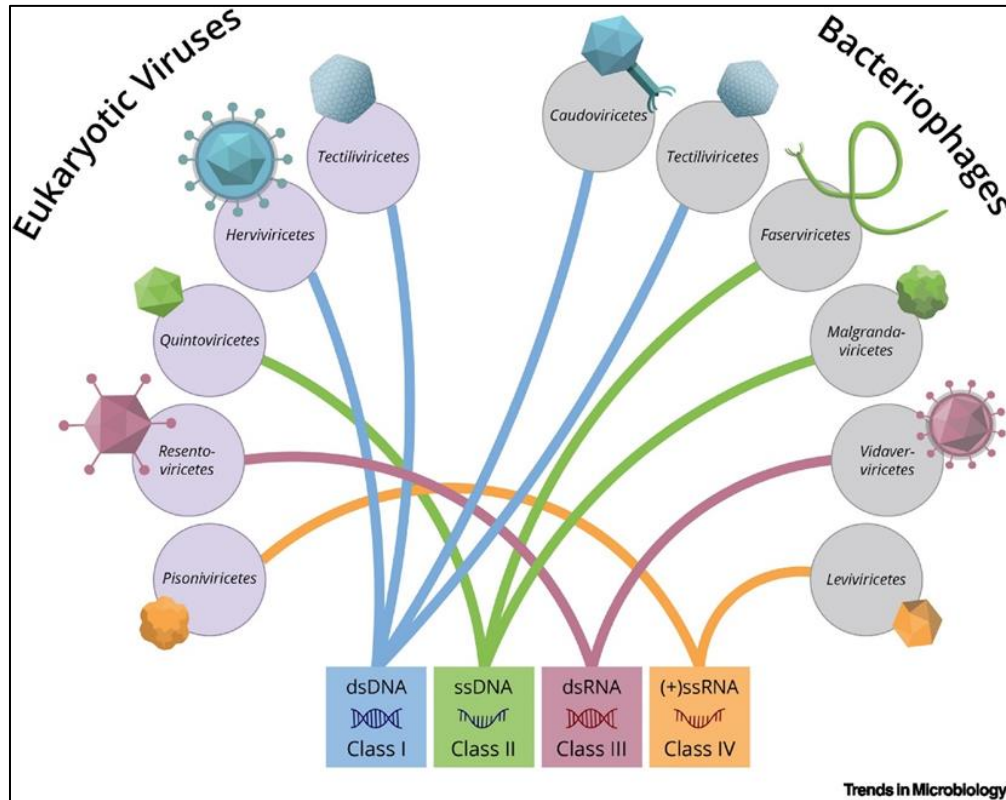
Hasta el año 2022, la clasificación de bacteriófagos se basaba principalmente en su morfología. Se establecieron familias en base a su estructura y naturaleza del material genético. Los bacteriófagos de ADN de cadena simple estaban compuestas por las familias *Microviridae* y *Inoviridae*, mientras que los que son de ARN de cadena simple pertenecían a la familia *Leviviridae*. Los que contaban con ARN de doble cadena eran de la familia *Cystoviridae*. Por último, los que contaban con ADN de doble cadena se clasificaban por tener cola en su morfología. Las familias que contaban con cola eran *Siphoviridae*, *Ackermanviridae*, *Podoviridae* y *Myoviridae*, mientras que las familias que no contaban con cola eran *Tectiviridae*, *Corticoviridae* y *Plasmaviridae* (31).

Tras las actualizaciones ratificadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en 2022, se abolió oficialmente la clasificación morfológica de los bacteriófagos, lo que implicó la eliminación de las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, así como del orden *Caudovirales*. En su lugar, se adoptó una clasificación basada en relaciones filogenéticas a nivel genómico, estableciendo la clase *Caudoviricetes* para agrupar todos los virus bacterianos y arqueanos con cápside icosaédrica y genoma de ADN de doble cadena. Como resultado de esta reestructuración, se crearon o redefinieron un orden, 22 familias, 30 subfamilias, 321 géneros y 862 especies, conforme al listado taxonómico aprobado (MSL37). Además, se instauró un sistema binomial libre para la denominación de especies, consistente en un nombre de género seguido de un

epíteto específico, alineado con las normas taxonómicas del resto de los organismos biológicos. Esta nueva nomenclatura fue aplicada a más de 2,500 especies de virus bacterianos, muchas de las cuales adoptaron el nombre del virus ejemplar correspondiente. Si bien los términos morfológicos como "Siphovirus", "Myovirus" o "Podovirus" se mantienen como descriptores informales, estos ya no poseen validez taxonómica oficial (32). Los fagos siphovirus presentan una cápside isométrica y una cola larga, delgada y flexible de tipo no contráctil, formada por un tubo proteico principal y un conjunto terminal sencillo compuesto por fibras cortas para el anclaje al hospedero. Carecen de vaina contráctil y la estructura caudal mantiene su longitud durante el proceso de adsorción. En contraste, los fagos myovirus exhiben una cápside isométrica y una cola robusta provista de una vaina contráctil que rodea el tubo central, acompañada de una placa basal compleja con fibras largas de reconocimiento. Tras el anclaje, la vaina se contrae y expone el tubo interno, diferenciándose así de la cola contráctil característica de los siphovirus. Por último, los fagos podovirus presentan solamente la cápside como estructura principal. Estos no cuentan con una cola, en su lugar cuentan con una estructura que se limita al rol de inyección del material genético. (31, 32)

Los avances recientes en la comprensión de la diversidad viral han permitido establecer paralelismos entre virus eucariotas y bacteriófagos, especialmente en cuanto a su composición genómica y estructural. A partir de criterios de clasificación basados en el sistema de Baltimore, se ha propuesto una organización filogenética que distribuye a todos los virus conocidos, incluidos los bacteriófagos, en clases según el tipo de ácido nucleico que poseen. En este contexto, los

bacteriófagos pueden agruparse principalmente en las clases I (ADN de doble cadena), II (ADN de cadena sencilla), III (ARN de doble cadena) y IV (ARN monocatenario de sentido positivo). La clase I está dominada por la clase *Caudoviricetes*, compuesta por fagos con cápside icosaédrica y cola, que son los más abundantes en el cuerpo humano. Le siguen, en menor proporción, los *Tectiliviricetes*, también con genoma de ADN bicatenario. Dentro de la clase II se encuentran los fagos filamentosos de las órdenes *Faserviricetes* y *Malgrandaviricetes*, mientras que en la clase III destaca el orden *Vidaverviricetes*, compuesto por fagos de ARN de doble cadena. Finalmente, la clase IV incluye a los *Leviviricetes*, fagos con genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Esta clasificación subraya la estrecha relación evolutiva entre los virus bacterianos y eucariotas, sino que también sugieren posibles mecanismos compartidos de reconocimiento inmunológico. La representación esquemática de esta distribución taxonómica puede observarse en la **Figura N°1**, donde se ilustran los principales grupos virales junto con sus estructuras representativas y su correspondiente clasificación por tipo de material genético.



**Figura N°1.** Relación filogenética y clasificación genómica de virus eucariotas y bacteriófagos basada en el tipo de ácido nucleico (33).

#### iv. Ciclo de vida de bacteriófagos líticos y lisogénicos

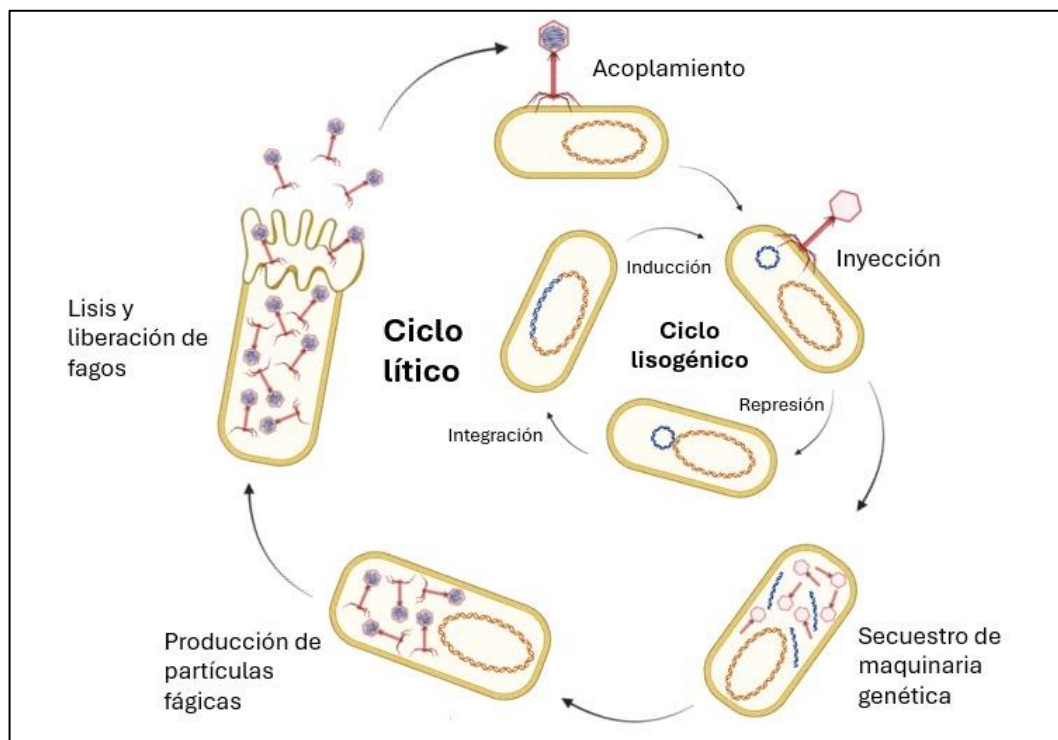
Los bacteriófagos pueden seguir dos estrategias principales de replicación dentro de sus huéspedes: el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. En el ciclo lítico, los fagos infectan bacterias para multiplicarse rápidamente y provocar la lisis celular, liberando gran cantidad de partículas virales. En cambio, en el ciclo lisogénico, el virus se integra al cromosoma de la bacteria para ser transmitido verticalmente en su linaje, por generaciones. Ambos ciclos comparten las etapas iniciales de infección, las cuales se describen a continuación (34). Primero se da el contacto: en este paso el fago busca una célula hospedera adecuada. Los bacteriófagos son muy selectivos con respecto a las bacterias que pueden infectar, generalmente guiados por la estructura de receptores específicos en la superficie de la célula bacteriana

(35). Luego del primer contacto, el bacteriófago se adhiere firmemente a la superficie de la bacteria huésped mediante interacciones físico-químicas entre sus proteínas y los receptores ubicados en la membrana bacteriana. Esta unión asegura que el bacteriófago esté correctamente posicionado para el siguiente paso. Una vez que el bacteriófago está firmemente unido, introduce su material genético dentro de la bacteria huésped. En algunos bacteriófagos, la vaina de la cola se contrae, forzando la penetración de la cubierta celular y permitiendo que el ácido nucleico del bacteriófago (ADN o ARN) fluya hacia el interior de la célula (36).

Tras la inyección del material genético, el fago puede optar por continuar con el ciclo lítico o entrar en un estado lisogénico, dependiendo del tipo de fago y las condiciones del entorno. Dentro del ciclo lítico, el material genético del bacteriófago secuestra la maquinaria celular del huésped, redirigiéndola para sintetizar componentes virales: proteínas de cápside, ácido nucleico y otras proteínas necesarias para formar nuevos bacteriófagos. Estos componentes se ensamblan en nuevas partículas víricas en el citoplasma de la bacteria. Finalmente, al acumularse un número suficiente de nuevos bacteriófagos dentro de la célula huésped, se sintetizan endolisinas que debilitan y rompen la pared celular bacteriana desde dentro (37). Esto causa la liberación de nuevos bacteriófagos que pueden infectar a otras células bacterianas cercanas, repitiendo el ciclo.

En contraste, en el ciclo lisogénico, el ADN viral se integra en el genoma de la célula bacteriana, formando un profago. En esta fase, el material genético viral permanece en estado latente y se replica junto con el ADN del huésped durante la

división celular, sin provocar daño inmediato. Esta relación puede mantenerse durante múltiples generaciones bacterianas (38). Sin embargo, ciertos factores ambientales o condiciones de estrés pueden inducir al profago a salir de su estado latente e ingresar al ciclo lítico, reanudando la producción activa de nuevos viriones y culminando en la lisis celular (39). Ambos ciclos, lítico y lisogénico, están representados esquemáticamente en la **Figura N°2**, la cual ilustra las principales etapas del proceso infeccioso de los bacteriófagos.

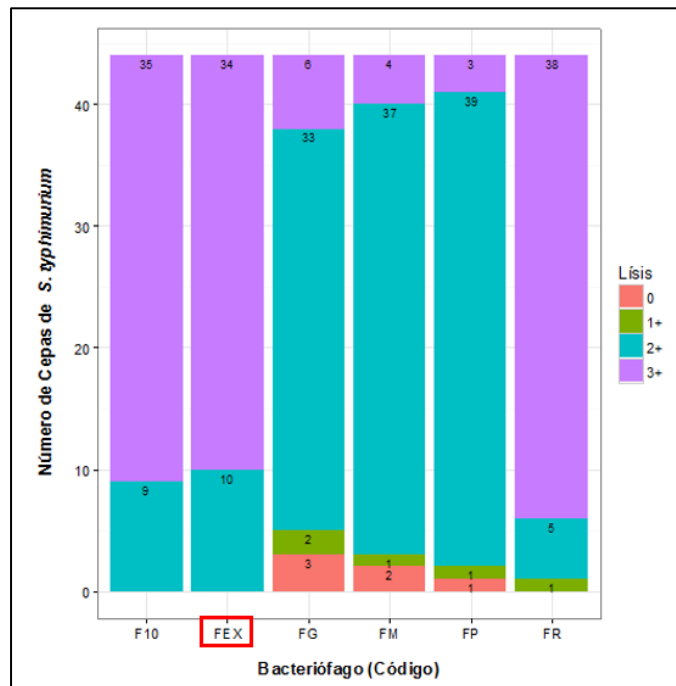


**Figura N.º 2.** Ciclos lítico y lisogénico de los bacteriófagos. El gráfico muestra las fases del ciclo reproductivo de un fago, desde la infección inicial hasta la liberación de nuevas partículas víricas o la integración del genoma viral al ADN bacteriano. Imagen elaborada por el autor, adaptación de *Campbell A., 2023* (40)

## v. Bacteriófago FEX

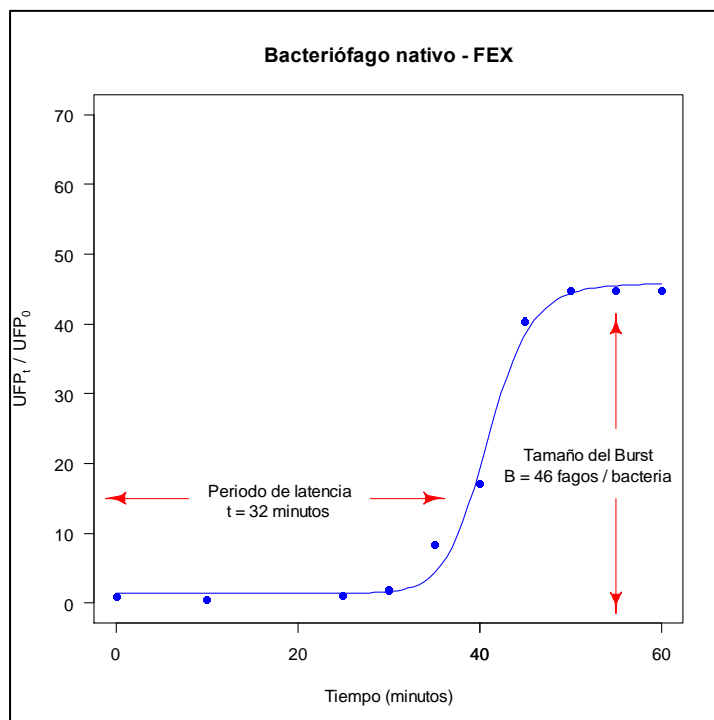
El bacteriófago inicialmente denominado como FEX fue aislado a partir de muestras fecales de *Cavia porcellus* provenientes de criaderos de cuyes en Lima.

Este bacteriófago demostró elevada capacidad lítica contra cepas de *S. Typhimurium*, siendo fuertemente lítico contra 34/44 (72.3%) cepas de esta bacteria y moderadamente lítico frente a 10/44 (27.7%) cepas. (**Figura N°3**).



**Figura N°3.** Perfil lítico de bacteriófagos aislados de muestras fecales de *Cavia porcellus* provenientes de criaderos de cuyes en Lima. Se evaluaron 44 aislamientos de *S. Typhimurium*. (19)

Tras la evaluación de su capacidad lítica, realizaron la “curva de un solo paso”, encontrando que el bacteriófago FEX presentaba un periodo de latencia de 32 minutos y una producción máxima de bacteriófagos (46 bacteriófagos por bacteria) a los 45 minutos (**Figura N°4**). Estas características en conjunto posicionaron al fago como un buen candidato para Fagoterapia, lo que ameritaba profundizar los estudios genómicos y estructurales, que son el objetivo del presente estudio.



**Figura N°4.** Curva de “un solo paso” para el bacteriófago FEX. En el eje horizontal se señala el tiempo en minutos, mientras que en el eje vertical se encuentra la producción de bacteriófagos (en función a PFU, unidades formadoras de placas).

Sin embargo, dados los hallazgos posteriores de la verdadera composición de la comunidad fágica, se requiere caracterizar microbiológica y molecularmente a los 2 fagos, FEX1 y FEX2.

#### vi. Caracterización microbiológica

La caracterización microbiológica de bacteriófagos involucra la determinación de parámetros fenotípicos que son característicos de los fagos evaluados. Dentro de estos parámetros encontramos a la diversidad de bacterias hospederas, que proporciona información valiosa sobre la selectividad del fago al momento de infectar a su hospedero. Se evalúan factores como la multiplicada de infección (MOI), que se refiere al ratio óptimo de fagos (en términos de unidades formadores de placa, PFU) y bacterias (en términos de unidades formadoras de colonia, CFU)

que permite maximizar la producción de partículas virales. A su vez, la curva “de un solo paso” permite determinar aspectos como el periodo de latencia del virus, que se refiere al periodo de tiempo que pasa desde la infección hasta la lisis de la bacteria, también permite obtener el “burst size” o tamaño de explosión, que indica cuantas partículas virales (en términos de PFU) se produjeron por bacteria infectada por un fago. Por último, se pueden evaluar estabilidad del fago en un espectro amplio de pH y T°, con el fin de conocer las limitaciones físicas del fago que afecten directamente su viabilidad.

#### **vii. Caracterización genómica**

La caracterización genómica de bacteriófagos proporciona información sobre su diversidad, estructura genética y mecanismos de replicación. Avances en técnicas de secuenciación han permitido una exploración detallada de genomas fágicos, revelando genes críticos para la infección fágica y la interacción con sus hospederos bacterianos (30). Además, ha permitido el refinamiento de los principios de ordenamiento taxonómico que ahora toma en consideración aspectos genómicos y no morfológicos para la clasificación taxonómica (41). Otro aspecto funcional de estos genes es determinar la estabilidad del bacteriófago en el medio en el que se encuentra (37). Esta información es invaluable para aplicaciones prácticas, como la ingeniería de bacteriófagos para terapias específicas o como herramientas biotecnológicas en diversas industrias (42,43).

#### **viii. Caracterización estructural**

Empleando microscopía electrónica se puede determinar la conformación estructural de los bacteriófagos, detallando la organización de sus cápsides, la

estructura de sus colas y sus aparatos de inyección de ADN (22). Esta comprensión estructural no solo es fundamental para comprender los mecanismos de infección, sino que también facilita el diseño racional de cócteles de bacteriófagos en aplicaciones biotecnológicas, permitiendo además la propuesta de modificaciones específicas que pueden optimizar su eficacia, estabilidad y especificidad (30). Ante la eventual falta de información estructural de alta resolución, las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM), pueden permitir un mapeo tomando como referencia estructuras tridimensionales elucidadas de fagos genéticamente cercanos. Esto se refiere a la asignación de las proteínas estructurales del fago a las del fago de referencia, teniendo en cuenta que haya una relación de homología significativa, y una localización posible en un modelo de baja resolución.

### III. Justificación

El propósito de este estudio se centra en la identificación y caracterización microbiológica, genómica y estructural, de los bacteriófagos FEX1 y FEX2 previamente aislados que demostraron capacidad lítica contra *S. Typhimurium*. Este enfoque se alinea con el objetivo principal de comprender a fondo las propiedades y el potencial uso de estos bacteriófagos específicos, contemplando su aplicación como tratamiento para infecciones por cepas resistentes a antibióticos. La importancia de este estudio radica en la necesidad de ampliar nuestro conocimiento científico sobre los bacteriófagos, organismos que presentan una diversidad biológica inmensa y un potencial significativo en biotecnología. La caracterización de estos bacteriófagos nos ha permitido generar información valiosa sobre su comportamiento microbiológico, genoma y estructura. Además, la caracterización microbiológica, genómica y estructural de estos bacteriófagos contribuirá significativamente a ampliar la base de datos global de bacteriófagos, facilitando comparaciones genéticas y funcionales con otros bacteriófagos y ayudando a formar un panorama evolutivo y ecológico de estos virus.

La relevancia de este estudio también se sustenta en el potencial biotecnológico de estos bacteriófago, considerando su efectividad comprobada contra *S. Typhimurium*. Aunque el proyecto no se enfoque en la aplicación terapéutica directa, el entendimiento profundo de las características del bacteriófago puede abrir puertas a futuras investigaciones y aplicaciones biotecnológicas, incluyendo, pero no limitándose, al control de enfermedades bacterianas en diversos contextos.

#### **IV. Pregunta de investigación**

¿Cuáles son las características microbiológicas, genómicas y estructurales específicas de los bacteriófago FEX1 y FEX2 previamente aislados que demostraron eficacia lítica contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium?

#### **V. Objetivos**

##### **i. Objetivo general**

Caracterizar microbiológica, genómica y estructuralmente los bacteriófagos FEX1 y FEX2 específicos para *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

##### **ii. Objetivos específicos**

- Determinar parámetros microbiológicos de los fagos FEX1 y FEX2, tales como el MOI, la curva de un solo paso, espectro de hospederos y estabilidad en función al pH y temperatura.
- Caracterizar el genoma de los bacteriófagos FEX1 y FEX2 específicos para *S. Typhimurium*.
- Identificar la estructura de los bacteriófagos FEX1 y FEX2 específicos para *S. Typhimurium* por medio de TEM.
- Realizar una representación gráfica de la asignación de proteínas estructurales de los bacteriófagos FEX1 y FEX2.

## **VI. Metodología**

### **i. Cultivo de la cepa hospedera**

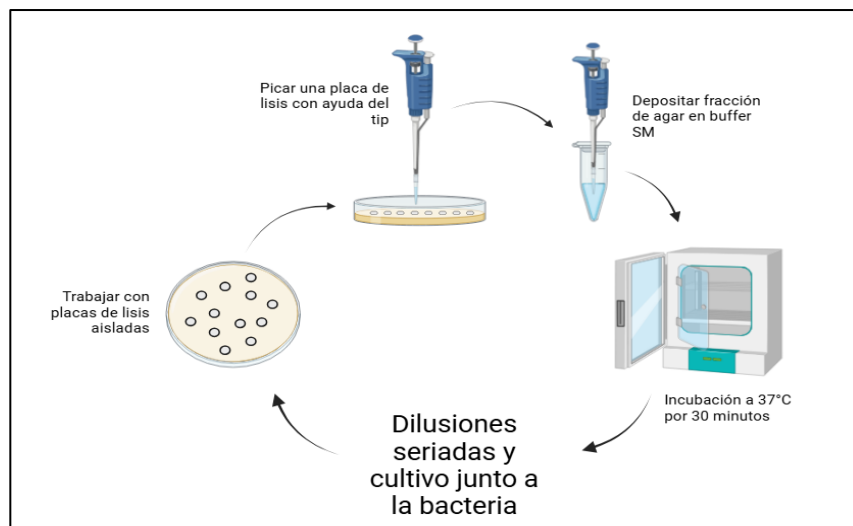
Se empleó la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028 como hospedero para el bacteriófago. Para su reactivación se empleó caldo LB (Luria-Bertani, HiMedia, India) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, del caldo se sembró en agar LB (Luria-Bertani, HiMedia, India) y se incubó de la misma forma. Una vez culminada la incubación se sembró en agar selectivo SS (salmonella-shigella, Merck, Alemania) con el objetivo de asegurar la pureza del cultivo. Después de esto se volvió a sembrar a partir de la placa de SS a una placa con agar LB, del cual se tomaron las colonias con las cuales se trabajó (pasando a denominarse “cepa de trabajo”). Estos dos últimos pasos se repitieron en un intervalo de 1 semana para mantener la cepa de trabajo libre de contaminación bacteriana.

### **ii. Obtención de poblaciones de bacteriófagos**

Para asegurar el aislamiento de una sola especie de bacteriófagos y no una comunidad de ellos, se realizó el procedimiento de siembras de calvas consecutivas descrito en la **Figura N°5**. Primero se preparó una suspensión de la cepa de trabajo a una concentración equivalente a la escala 0.5 de Mc Farland (MF) la cual se empleó posteriormente para el inóculo bacteriano. Luego, se realizaron diluciones seriadas de 1 en 10 hasta la dilución  $10^{-10}$  a partir de la suspensión inicial de bacteriófagos. Estas diluciones se realizaron empleando NaCl al 0.9% como diluyente. Para permitir la interacción de los fagos con la bacteria, se mezclaron 300uL de la dilución de fagos correspondiente con 600uL del inóculo

bacteriano. Esta mezcla se dejó incubar a 37°C por 10 minutos. Luego, todo el volumen se agregó a un tubo con 5 mL de “soft-agar” LB (7 g/L de agar agar). La mezcla fue vertida sobre la placa previamente preparada con agar LB, formando una bicapa. La placa se incubó a 37°C por 24 horas teniendo cuidado al invertir las placas para reducir el riesgo de desprendimiento de la capa superior de agar.

Terminada la incubación, se apreció la formación de zonas circulares traslucidas en las cuales no había crecimiento bacteriano (placas de lisis o “calvas”). Se registró la forma de las calvas y con ayuda de un tip estéril de 200uL se picó una calva (colectando la sección de agar correspondiente a la calva). Esta porción de agar fue depositada en 500uL de buffer SM (200 mM NaCl/ 50 mM Tris-HCl/ 10 Mm MgSO<sub>4</sub>, pH: 7.5) y se dejó incubar a 37°C por 30 minutos para permitir la liberación de las particulas virales del agar al buffer. Este procedimiento se repitió unas dos veces más a fin de obtener una sola especie de bacteriófagos (44).



**Figura N°5.** Procedimiento de obtención de cultivos de fagos de una sola especie.

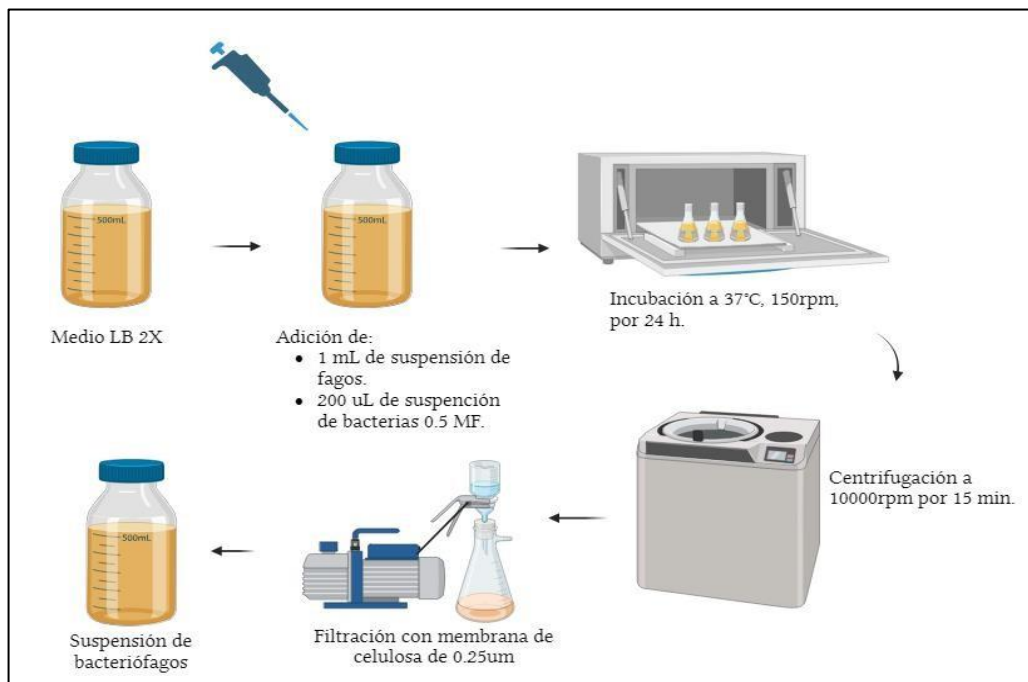
### iii. Amplificación y concentración del bacteriófago

El proceso de amplificación viral consiste aumentar exponencialmente la cantidad de bacteriófagos empleando a la bacteria hospedero como sistema de replicación, dicho procedimiento se representa gráficamente en la **Figura N°6**. Para tal fin se empleó caldo LB 2X (medio LB con el doble de concentración, 90mL), en el cual se inoculó 1mL de una suspensión de bacterias a una concentración equivalente al tubo de 0.5 de MF. En forma paralela se inoculó también 200uL de suspensión de bacteriófagos (previamente aislados y purificados). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas en agitación a 150 rpm.

A este punto del proceso, los bacteriófagos se encontraban suspendidos en el medio. Para separarlos de las bacterias se centrifugó el medio a 10000 rpm por 10 min. con el fin de precipitar la biomasa suspendida en el medio mientras que los bacteriófagos se mantendrían en el sobrenadante. Se separó cuidadosamente esta porción y se sometió a filtración empleando filtros de nylon con poros de diámetro de 0.22um.

El siguiente paso fue concentrar la suspensión de bacteriófagos, para lo cual se empleó Polietilenglicol (PEG) 8000, recomendado para precipitar bacteriófagos a partir de una suspensión líquida (45). Se preparó una solución de PEG al 10% m/v empleando la suspensión de bacteriófagos como solvente y se incubó a 4°C por 24 horas. La incubación en frío facilitó la precipitación de los bacteriófagos, aspecto crucial durante todo el proceso. Tras la incubación se centrifugó a 10000 rpm a 4°C por 15 min. para completar la precipitación (Sorvall, Estados Unidos). La

presencia de un pellet pequeño de color blanquecino en el fondo del tubo, indica la presencia de bacteriófagos. Seguidamente se suspendió el pellet en un volumen de buffer SM (200 mM NaCl/ 50 mM Tris-HCl/ 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH: 7.5) 10 veces menor al volumen inicial. El buffer SM fue empleado para la dilución y almacenamiento de bacteriófagos (46).

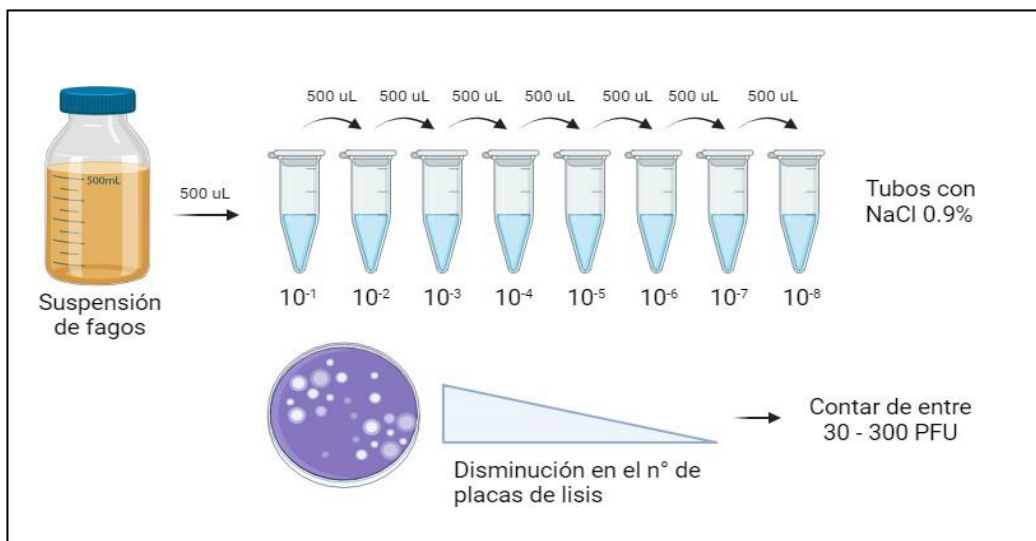


**Figura N°6.** Esquema del procedimiento de purificación

#### iv. Determinación de la concentración de bacteriófagos

Se empleó el método de cuantificación por conteo de placas de lisis en medio sólido, mostrado en la **Figura N°7**. Primero se preparó una suspensión de la cepa de trabajo a una concentración equivalente a 0.5 MF la cual se empleó para el inóculo bacteriano. A partir de la suspensión concentrada de bacteriófagos se realizaron diluciones seriadas al décimo empleando NaCl al 0.9% hasta la dilución  $10^{-10}$ . De cada dilución se tomó un volumen de 100 uL y se mezcló con 5 mL de

“soft-agar” LB. Seguidamente, se agregó 100 uL del inóculo bacteriano previamente preparado. La mezcla fue vertida sobre la placa previamente preparada con agar LB, formando una bicapa. La placa se incubó a 37°C por 24 horas teniendo cuidado al invertirlas para evitar el riesgo de desprendimiento de la capa superior de agar. Terminada la incubación, se apreció la formación de placas de lisis en la superficie de la placa. Basándose en el número de placas de lisis que se pudieron contar y tomando en cuenta la dilución de donde proviene el inóculo de bacteriófagos se pudo determinar la concentración de la suspensión de bacteriófagos original en unidades formadoras de placas por mililitro (unidades formadoras de placas o PFU/mL).



**Figura N°7.** Esquema del procedimiento de determinación de la concentración de bacteriófagos.

#### v. Determinación del rango de hospederos

Se evaluó la capacidad lítica de los fagos FEX1 y FEX2 frente a otras serovariedades de *Salmonella enterica*: *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Infantis y

*Salmonella* Enteritidis, para lo cual se empleó el método de spot test. Empleando solución salina al 0.9%, se prepararon suspensiones bacterianas de los serovares de *Salmonella* a una concentración equivalente a la escala 0.5 MF. Con ayuda de un hisopo estéril, se propagaron estas suspensiones en la superficie de una placa de agar LB. Tras esperar que las placas sequen, se inoculó un volumen de 5 uL de la suspensión de fago en la superficie de la placa. Después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C, se evaluó la presencia de zonas de inhibición de crecimiento donde se aplicaron la suspensión de fagos, evidenciando la actividad lítica de los fagos.

#### **vi. Determinación del MOI y curva de “un solo paso”**

Para determinar el índice de multiplicidad de infección (MOI) se partió de una suspensión de la bacteria hospedero en solución salina al 0,9% a una concentración equivalente a la escala 0.5 MF ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL). Esta suspensión se mezcló con un filtrado de fagos concentrados obteniendo MOIs de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100. Las mezclas resultantes se incubaron a 37°C durante 5 horas, tras lo cual los fagos se filtraron usando filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0,22 µm. La cuantificación de los fagos producidos se llevó a cabo mediante el conteo de placas de lisis, realizado por duplicado. El MOI óptimo se definió como aquel que generó el mayor número de PFU.

La curva de “un solo paso”, se realizó en base a los resultados del procedimiento anterior, usando el MOI óptimo resultante, esta mezcla se incubó durante 15 minutos a 37°C en un agitador a 100 rpm. Finalizada la incubación, se centrifugó a 3000 rpm en dos ciclos de 10 minutos cada uno. Se separó el sobrenadante y el

sedimento (células y fagos adsorbidos) se re-suspendió en 1 mL de caldo LB. A continuación, se tomaron 100  $\mu$ L de esta suspensión y se incorporaron a 50 mL de caldo LB mantenido a 37°C. Este punto se consideró tiempo cero, a partir del cual se tomaron muestras de 1 mL cada 10 minutos, durante un total de 110 minutos, obteniendo duplicados para cada intervalo temporal. Las muestras recolectadas se utilizaron para conteo de placas en agar, en diluciones seriadas desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-8}$ .

#### **vii. Determinación de la estabilidad en función del pH y temperatura**

La estabilidad del bacteriófago frente a diferentes valores de pH se evaluó mediante la preparación de soluciones de buffer SM ajustadas a valores de pH entre 2 y 10. A cada tubo de ensayo estéril se adicionaron 9 mL del tampón correspondiente, y posteriormente se agregó 1 mL de la suspensión fágica ( $10^9$  PFU/mL), manteniendo una proporción 1:10 (fago: buffer). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 1 hora en agitación a 210 rpm. Finalizada la incubación, la actividad lítica residual se evaluó mediante el ensayo de formación de placas en agar, cuantificando las unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL).

Para la evaluación de la estabilidad térmica, se preparó una mezcla en proporción 1:10 entre la suspensión fágica ( $10^9$  PFU/mL) y solución salina al 0.9%. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora a diferentes temperaturas: 4, 25, 37, 50, 65 y 80 °C. La viabilidad fágica tras cada tratamiento térmico fue determinada mediante el mismo procedimiento de cuantificación descrito anteriormente.

### **viii. Pruebas estadísticas**

Para evaluar la significancia estadística de las diferencias de supervivencia entre las condiciones de pH y temperatura, se empleó el programa R (versión 4.4.2). Primero la prueba de Kruskal-Wallis para la identificación de diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ). Se empleó esta prueba dada la naturaleza no paramétrica de los datos. Tras la identificación de diferencias significativas, se aplicó la prueba post-hoc de Dunn (paquete *dunn.test*, versión 1.3.6), donde se identifica cuál de los grupos es el diferente. Las gráficas fueron elaboradas mediante el paquete *ggplot2* (versión 3.5.2).

### **ix. Extracción de ADN de los bacteriófagos**

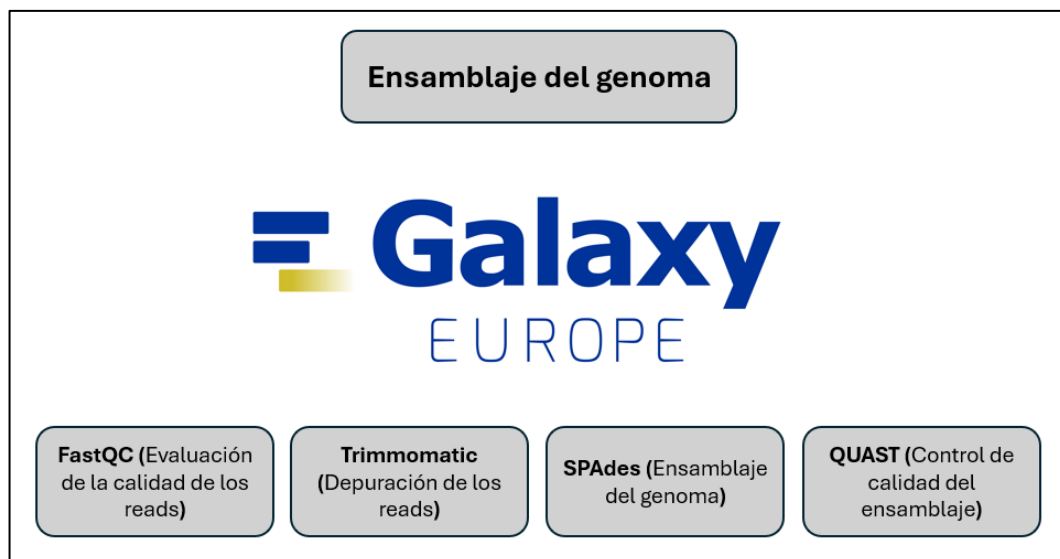
Se siguió la metodología para la extracción de ADN de virus, con un paso adicional consistente en el tratamiento con endonucleasas (ADNasa I y ARNasa I) con el propósito de eliminar cualquier traza de material genético proveniente de la bacteria hospedera. Obviar este paso podría generar resultados aberrantes al momento de realizar la secuenciación. Seguidamente se procedió con la extracción del ADN para lo cual se empleó perlas magnéticas tras un proceso de lisis de la arquitectura viral empleando proteinasa K. El ADN resultante se evaluó en términos de concentración, pureza y fragmentación. Para evaluar la concentración y pureza se empleó el equipo Qubit4, mientras que la fragmentación se evaluó mediante electroforesis usando un gel de agarosa con la concentración adecuada. El ADN se mantuvo en almacenamiento en agua milliQ ya que el buffer TE contiene ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), componente que no es compatible con la plataforma de secuenciación de Illumina.

## x. Secuenciación del genoma

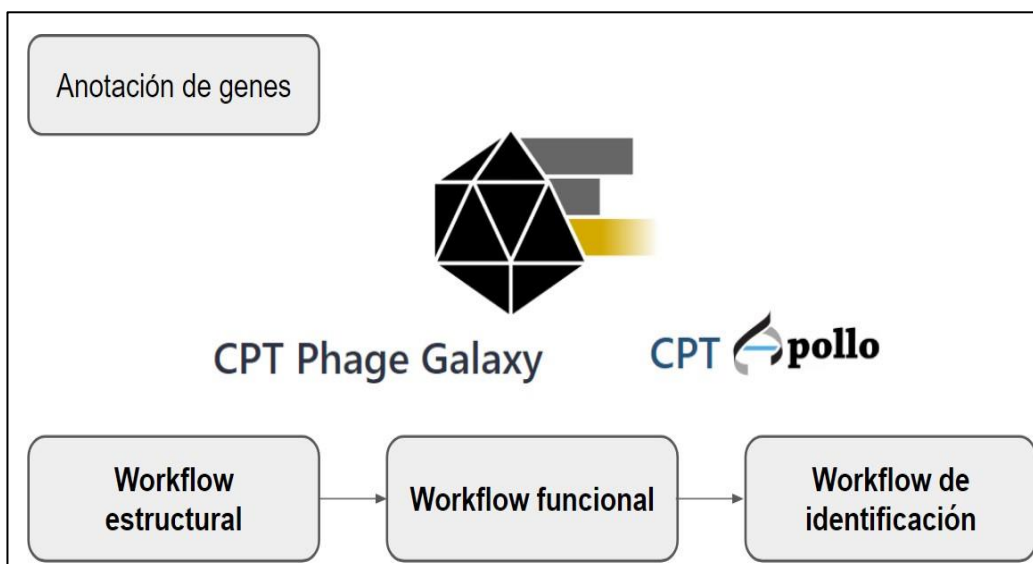
Tras verificar la integridad del ADN extraído, se procedió con la secuenciación genómica. Se empleó la plataforma Illumina Miseq. El kit de preparación de librería fue “Illumina Microbioal Amplicon Library Prep”. Se empleó el “PhiX Control v3” como la librería control. Finalmente se empleó el kit de secuenciación “MiSeq Reagent Kits v2”.

## xi. Ensamblaje y anotación del genoma

Los archivos FASTQC generados fueron analizados y ensamblados en la plataforma en línea “Galaxy” (<https://usegalaxy.eu/>) (47), siguiendo el procedimiento mostrado en la **Figura N8**. Se empleó la herramienta FastQC (versión 0.12.1) para evaluar la calidad de los reads, luego se empleó la herramienta Trimmomatic (versión 0.39) para el recorte de los adaptadores y de las zonas de bajo índice de calidad (48,49). Tras estos pasos se procedió con el ensamblaje empleado la herramienta Spades (versión 4.1.0) (50). Una vez finalizado el proceso se obtuvo un archivo FASTA con los contigs y scaffolds generados, tras lo cual se empleó la herramienta QUAST (versión 5.3.0) para evaluar la calidad de los ensamblajes (51). Para la anotación del genoma se empleó la plataforma “Galaxy CPT” (<https://cpt.tamu.edu/galaxy-pub>) que pertenece al Center for Phage Technology, parte de Texas A&M University. En esta plataforma ya en encuentran establecidos flujos de trabajos disponibles en línea para la anotación estructural y funcional del bacteriófago (52), los cuales se muestran en la **Figura N°9**.



**Figura N°8.** Esquema del procedimiento de ensamblaje del genoma.



**Figura N°9.** Esquema del procedimiento de anotación de genes.

## xii. Análisis bioinformático

Tras contar con el genoma ensamblado y anotado, se procedió con la identificación de genes de resistencia antimicrobiana y de factores de virulencia. Con este fin se empleó la herramienta AMRFinderPlus v3.12.8 para la identificación y caracterización de los genes de resistencia (53). Para la identificación de factores de virulencia se empleó la base de datos VFDB (base

de datos versión 6.0) (54). La clasificación taxonómica se realizó empleando las herramientas TaxMyPhage v0.3.3 y Phabox v2.0, las cuales emplean una base de datos curada de genomas de fagos (55,56). Se empleó la herramienta VIRIDIC para realizar el análisis de similaridad intergenómica (57). Para realizar los alineamientos genómicos y la comparación proteómica se empleó las herramientas disponibles en BV-BRC (58).

### **xiii. Visualización de los bacteriófagos por TEM**

Para visualizar el bacteriófago se empleó microscopía electrónica de transmisión. Como soluciones de tinción se emplearon molibdato de amonio al 2% (pH: 7.0) y acetato de uranilo al 2% (pH: 4.0). Para el soporte de las muestras se emplearon gradillas de carbono recubiertas con cobre 400 Mesh (con 400 celdas) de grosor de 10nm. Para la hidrofiliación de superficie de la gradilla se la sumergió en peróxido de hidrógeno al 50% a temperatura ambiente durante 30 min. aproximadamente. Se empleó un microscopio TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión) Talos F200i (Thermo Fisher Scientific, USA), del Centro de Microscopia Electrónica de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa (UNSA).

### **xiv. Representación gráfica de la asignación proteínas estructurales**

Se comenzó con la identificación de las proteínas que constituyen la estructura del bacteriófago. Este proceso implica determinar y catalogar proteínas como las de la cápside, la cola y las fibras, entre otras. La cápside es la envoltura proteica que protege el material genético del fago, mientras que la cola y las fibras son

esenciales para la adsorción y penetración del bacteriófago en la célula bacteriana. La secuenciación del genoma del bacteriófago permitió obtener las secuencias de estas proteínas para luego comparar los datos obtenidos con bases de datos de proteínas conocidas, determinando así la identidad y características de las proteínas estructurales. Se realizó una búsqueda de estructuras tridimensionales completas publicadas obtenidas a partir de Cryo-EM de bacteriófagos filogenéticamente cercanos a los bacteriófagos FEX1 y FEX2. Con este fin se emplearon en conjunto la base de datos de EMDB (<https://www.ebi.ac.uk/emdb/>) y la herramienta ViPTree (versión 4.0) (<https://www.genome.jp/viptree/>) (59). Se emplearon BLASTp de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y EMBOSS Needle para los alineamientos globales a nivel de aminoácidos (60,61). Para la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas se empleó Alphafold 3 (62). La visualización de las estructuras de proteínas se realizó con PyMOL (versión 3.1.3), para asegurar una correcta asignación estructural y calcular el RMSD como medida de divergencia especial de las secciones alineadas (63).

#### **xv. Consideraciones éticas**

El presente trabajo se encuentra registrado en el SIDISI (Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la investigación) bajo el código N° 213712. A su vez tras una revisión por la DUARI (Dirección Universitaria de Asuntos Regulatorios de la Investigación), se concluyó que, dadas las características del trabajo, este no requiere de evaluación por el “Comité Institucional de Ética en Investigación en Humanos” ni por el “Comité Institucional de Ética para Uso de Animales”. Esta designación se encuentra en el documento emitido por la DUARI

con el código CAR-DUARI-O-317-24.

## **xvi. Consideraciones de bioseguridad**

### **1. Grupo de riesgo del agente patógeno**

El agente patógeno *S. Typhimurium* pertenece al Grupo de riesgo 2, clasificación basada en las características del agente, que presenta un riesgo limitado para el personal de laboratorio y el medio ambiente. No se espera una exposición significativa a la comunidad si se implementan las medidas de bioseguridad adecuadas. Los bacteriófagos FEX1 y FEX2 por su lado pertenecen al grupo de riesgo 1, ya que no son capaces de causar enfermedades a formas de vida eucariontes. Este agente biológico infecta exclusivamente a bacterias del género *Salmonella* (64).

### **2. Infraestructura y nivel de seguridad**

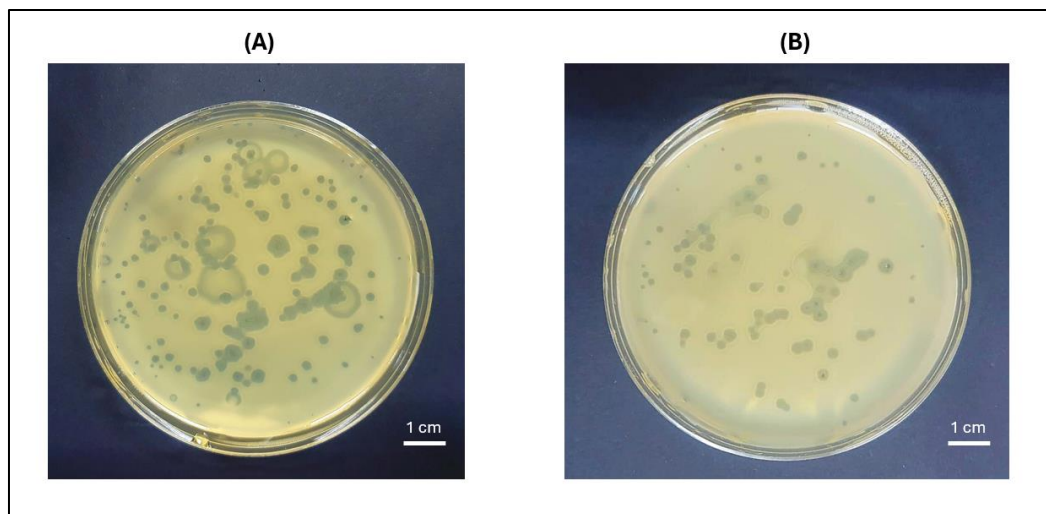
Los procedimientos microbiológicos descritos en el presente trabajo de tesis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos y Fagoterapia de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID - 405) de la UPCH, que cumple con los estándares de bioseguridad del Nivel 2 (BSL-2) (65,66).

## VII. Resultados

### i. Caracterización microbiológica

#### 1. Aislamiento y fotografías por TEM

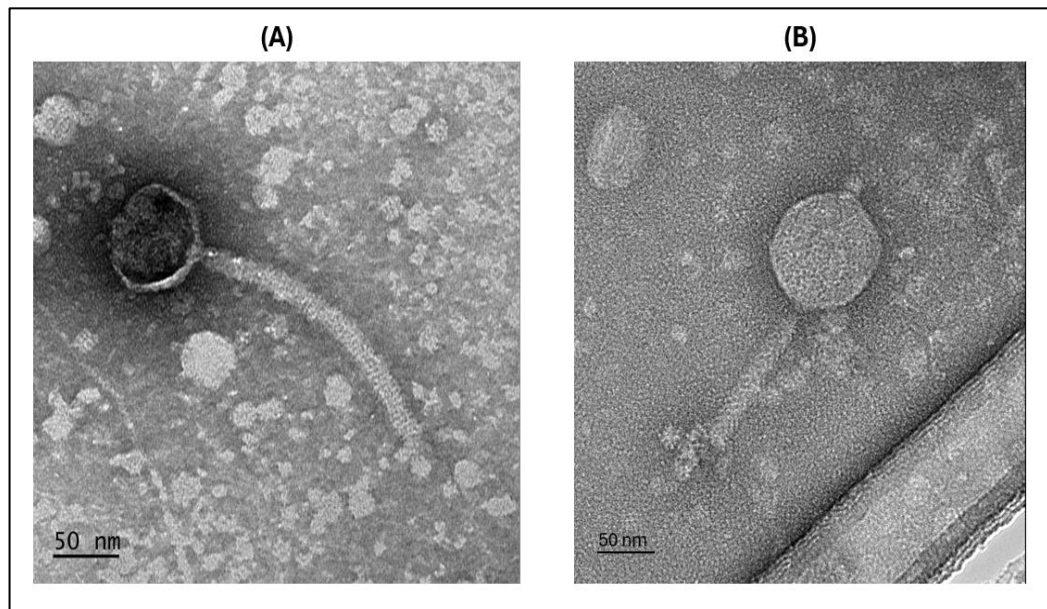
A partir de una muestra de bacteriófagos colectada de muestras fecales de cuyes (19) y almacenada por 6 años, procedió con el aislamiento y obtención de poblaciones homogéneas. Se obtuvieron exitosamente dos poblaciones aisladas denominadas FEX1 y FEX2, en la **Figura N°10** se pueden apreciar la morfología de las placas de lisis que forman sobre un césped de *S. Typhimurium*. Se puede notar una mayor actividad lítica en el caso del fago FEX1 al que las placas son mucho más translúcidas que las de FEX2.



**Figura N°10.** Morfología de las placas de lisis formadas por los fagos FEX1 (A) y FEX2 (B) en agar LB. Las placas de lisis formadas por FEX1 son translúcidas que las de FEX2, sugiriendo una mayor actividad lítica.

En la **Figura N°11** se muestran las micrografías obtenidas por TEM de los fagos FEX1 y FEX2. FEX1 presenta una cápside de morfología isométrica con un

diámetro aproximado de 65 nm, unida a una cola larga, delgada y flexible de aproximadamente 220 nm de longitud. En el extremo distal se pueden distinguir fibras cortas que son estructuras de anclaje al hospedero. Estas características corresponden a una morfología de tipo siphoviral. En contraste, FEX2 presenta una cápside isométrica de mayor tamaño, cercana a los 100 nm de diámetro, asociada a una cola robusta de aproximadamente 150 nm de longitud. La cola se observa rodeada por una estructura más densa compatible con una vaina contráctil, acompañada de fibras caudales que parten de una base más densa. Dichas características corresponden a la morfología myoviral.



**Figura N°11.** Fotografías obtenidas por medio de TEM de los fagos FEX1 (A) y FEX2 (B). Se puede apreciar la morfología Siphoviridae y Myoviridae de FEX1 y FEX2 respectivamente.

## 2. Rango de hospederos

En las evaluaciones realizadas con diferentes serovares de *Salmonella*, se observó una notable actividad lítica en las cepas *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Enteritidis. En contraste, el fago FEX1 mostró una actividad

lítica menos pronunciada en la cepa *Salmonella* Infantis, como se puede apreciar en el **Anexo N°1**, donde se observa un halo de menor translucidez en comparación con las cepas previamente mencionadas. Este comportamiento no se replicó con el fago FEX2, el cual mantuvo su actividad lítica consistente en todas las pruebas realizadas. Los resultados de este ensayo se resumen en la **Tabla N°1**, mientras que las imágenes de las placas se encuentran en el **Anexo N°1**.

**Tabla N°1.**

Espectro de hospederos de los fagos FEX1 y FEX2.

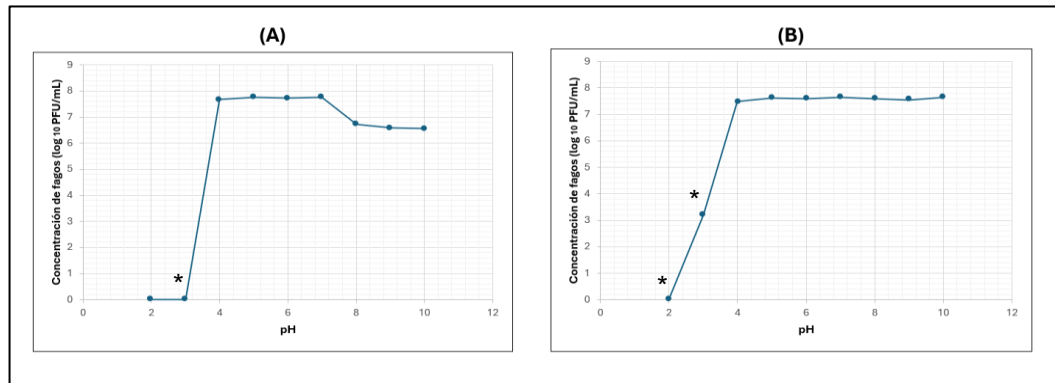
Serotipo de <i>Salmonella</i>	Fago FEX1	Fago FEX2
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++	+++
<i>Salmonella</i> Typhi	+++	+++
<i>Salmonella</i> Infantis	+	+++
<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++	+++

Nota: (+++): Altamente lítico, (+): Parcialmente lítico, (-): No hay actividad lítica presente.

### 3. Estabilidad según el pH y temperatura

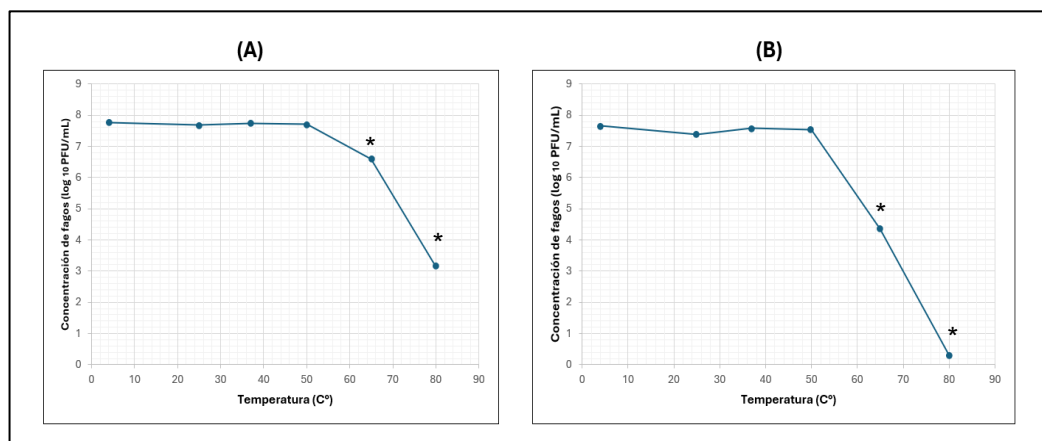
La evaluación de la estabilidad a diferentes valores de pH mostró que tanto el fago FEX1 y FEX2 se mantuvieron su actividad lítica en el rango de pH 4 - 7. La incubación en el rango de pH 2 - 3 inactivó completamente al fago FEX1, mientras que el fago FEX2 mostró actividad reducida al incubarse a pH 3 pero también se inactivó completamente a pH2. En el rango de alcalinidad, el fago FEX1 redujo su actividad de manera significativa a partir del pH 7. En contraste, el fago FEX2 mostró estabilidad hasta el pH 10. Estos resultados se pueden observar en la **Figura**

Nº 12.



**Figura Nº 12.** Estabilidad del fago FEX1 (A) y FEX2 (B) tras la incubación en diferentes pH. FEX2 es más estable que FEX1 en diferentes valores de pH.

En cuanto a la evaluación de la estabilidad térmica de los fagos evaluados, ambos fagos se comportaron de manera similar manteniendo su estabilidad hasta los 50°C, a partir de esta temperatura el fago FEX1 perdió significativamente su actividad, pero se mantuvo viable hasta los 80°C. Por otro lado, el fago FEX2 perdió toda actividad a 80°C, mostrando en general menor estabilidad térmica que el fago FEX1. Estos resultados se pueden observar en la **Figura Nº 13**.



**Figura Nº 13.** Estabilidad del fago FEX1 (A) y FEX2 (B) tras la incubación a diferentes temperaturas. FEX1 es más estable que FEX2 en temperaturas mayores a 50°C.

#### 4. MOI y curva de un solo paso

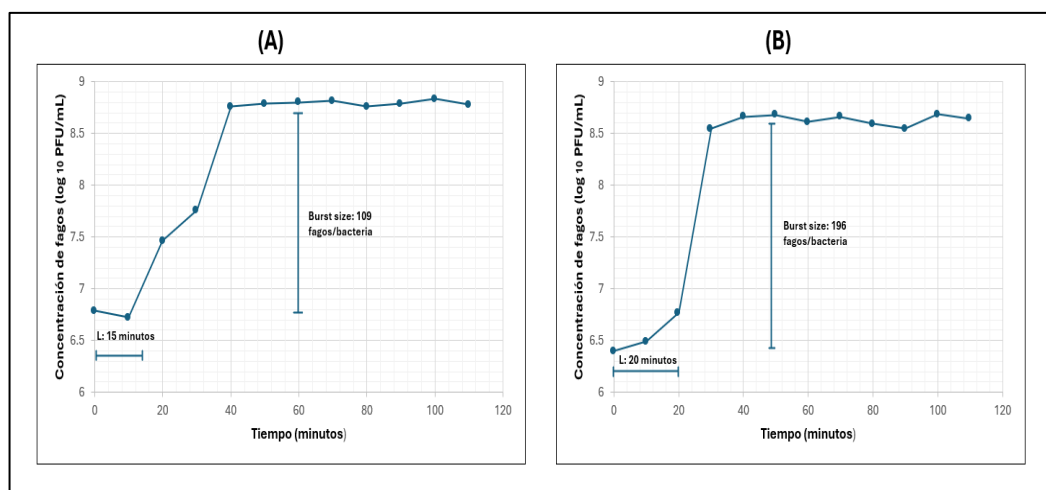
Al evaluar los diferentes MOIs (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100) se determinó que el MOI óptimo para el fago FEX1 fue de 0.01 y 0.001 para el fago FEX2. Esto debido a que en esa configuración se pudo obtener el mayor número de PFU/mL. Los valores obtenidos se pueden observar en la **Tabla N°2**.

**Tabla N°2.**

Determinación del MOI óptimo para los fagos FEX1 y FEX2. Se sombrea de gris los valores de (PFU/mL) más altos.

MOI	Concentración de suspensión de fagos (PFU/mL)	Concentración del inóculo de bacteria (CFU/mL)	Concentración final obtenida para el fago FEX1 (PFU/mL)	Concentración final obtenida para el fago FEX2 (PFU/mL)
0.001	$10^5$	$10^8$	$0.5 (\pm 1.82) \times 10^{10}$	$0.7 (\pm 2.63) \times 10^{10}$
0.01	$10^6$	$10^8$	$1.9 (\pm 1.27) \times 10^{10}$	$0.1 (\pm 1.77) \times 10^{10}$
0.1	$10^7$	$10^8$	$1.2 (\pm 1.64) \times 10^{10}$	$0.4 (\pm 2.09) \times 10^{10}$
1	$10^8$	$10^8$	$3.8 (\pm 1.25) \times 10^9$	$1.3 (\pm 2.33) \times 10^9$
10	$10^9$	$10^8$	$4.6 (\pm 1.31) \times 10^9$	$2.0 (\pm 1.48) \times 10^9$
100	$10^{10}$	$10^8$	$5.1 (\pm 1.49) \times 10^8$	$6.2 (\pm 1.66) \times 10^9$

Empleando el MOI óptimo para cada fago se realizó la curva de “un solo paso”, los resultados de este proceso se pueden observar en la **Figura N°14**. FEX1 presentó un tiempo de latencia de 15 minutos y un “burst size” de 109 fagos por bacteria, mientras que FEX2 presentó un tiempo de latencia de 20 min y un “burst size” de 196 fagos por bacteria.



**Figura N°14.** Curva de “un solo paso” de los fagos FEX1 (A) y FEX2 (B). FEX1 presentó un periodo de latencia de 15 min. y un burst size de 109 fagos por bacteria, mientras que FEX2 presentó 20 min. y 196 fagos por bacteria.

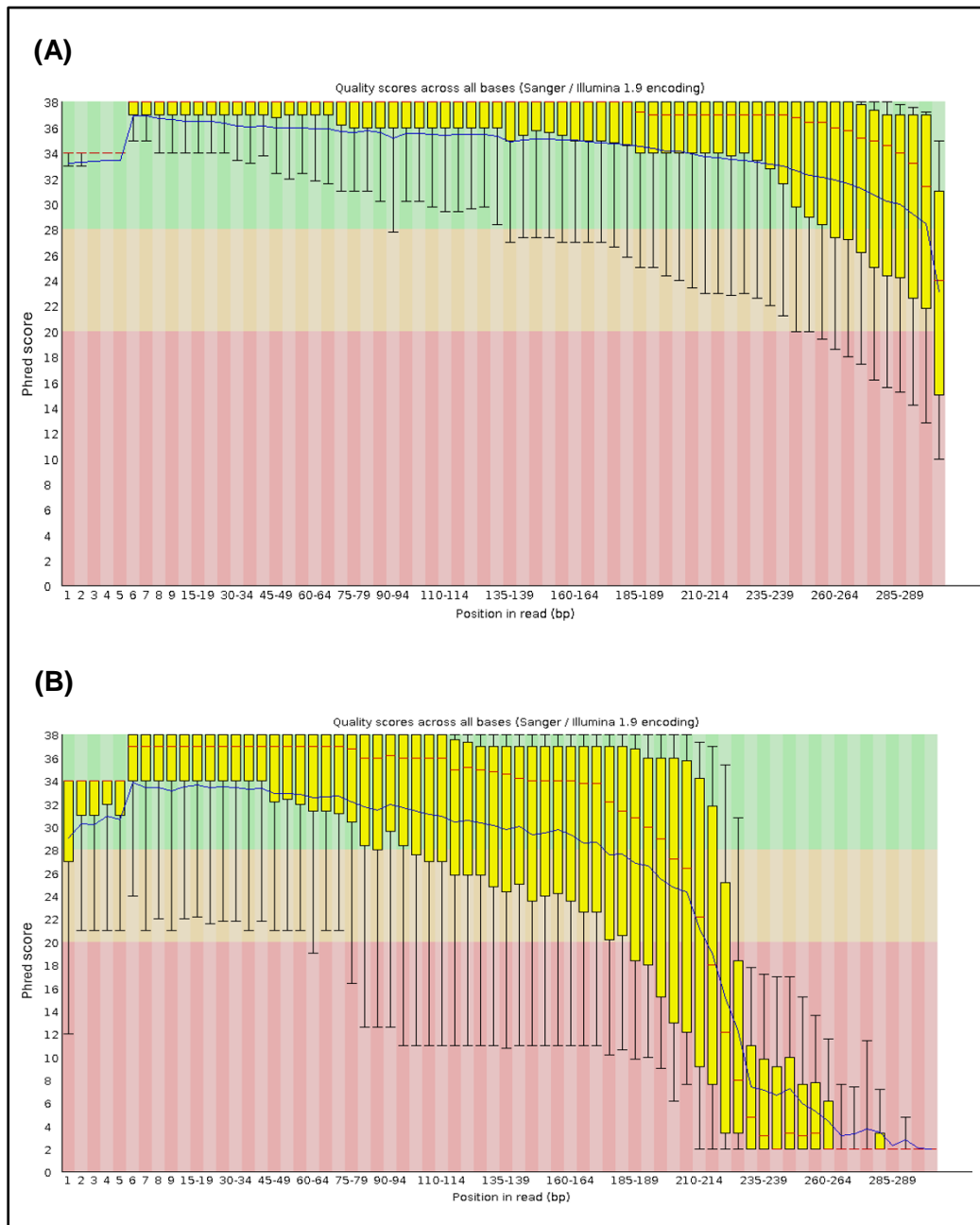
## ii. Caracterización genómica

### 1. Secuenciamiento y ensamblaje de genomas

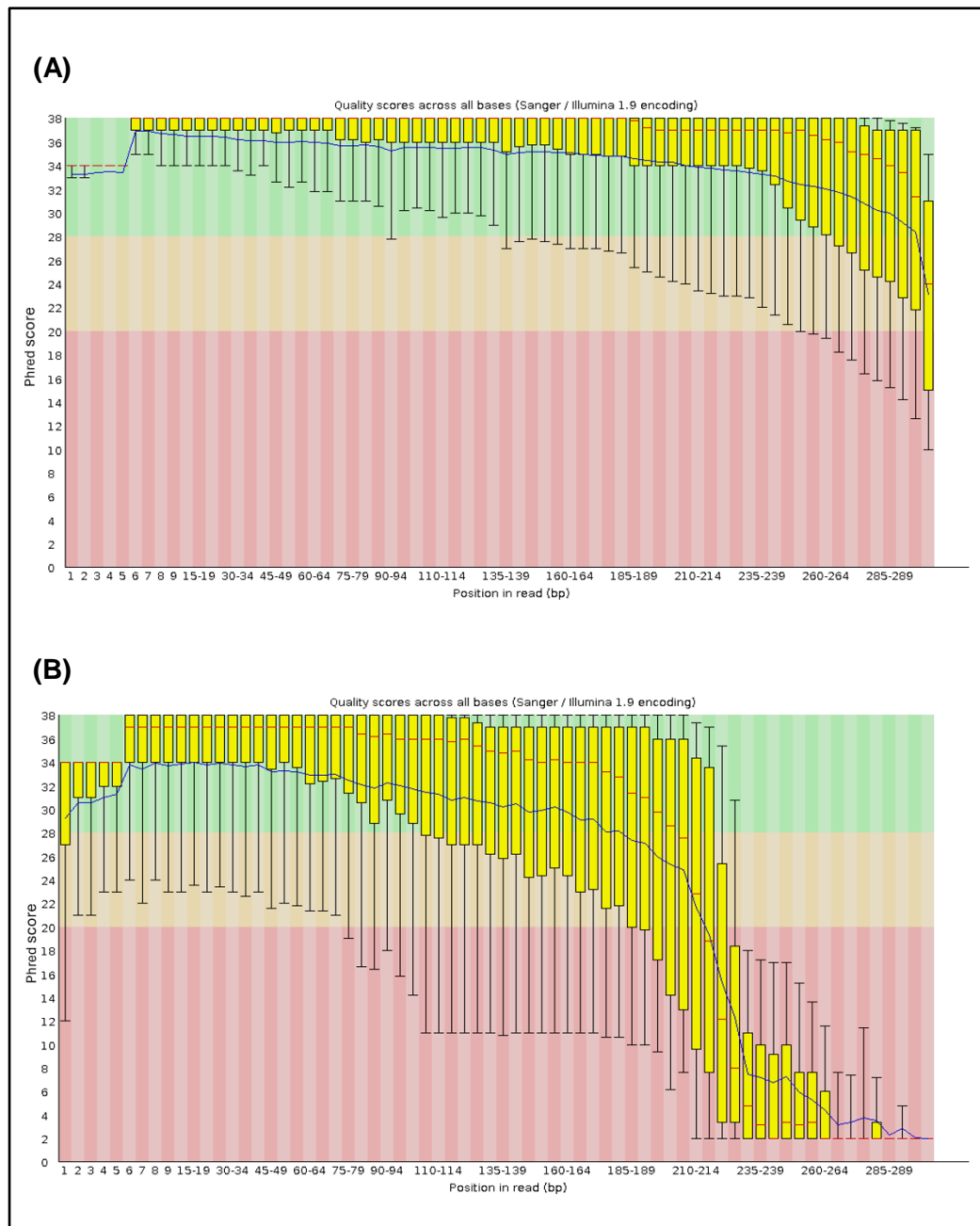
Se procedió con la extracción de ADN a partir de una suspensión concentrada de fagos ( $10^{11} PFU/mL$ ), obteniéndose 119 ng/ $\mu L$  de ADN del fago FEX1 y 83.9 ng/ $\mu L$ . Tras una corrida electroforética en un gel de agarosa no se evidenció fragmentación, lo que confirmó que el ADN cumplía con las concentraciones, volúmenes e integridad necesarios para proceder con la secuenciación.

De la secuenciación “pair-end” se obtuvieron lecturas de 35 – 301 pares de bases de longitud. Se empleó FastQC para evaluar la calidad de las lecturas teniendo un off-set de calidad de 28 (Phred score = 28). Este programa produce un gráfico que se divide en sectores de color verde, crema y rojo; denotando zonas de buena, intermedia y mala calidad respectivamente. Las lecturas se agrupan en base a su longitud y su Phred score, valor que indica la calidad de la lectura. Sin embargo, como se puede apreciar en la **Figura N°15** y **N°16**, los valores no cumplían con los

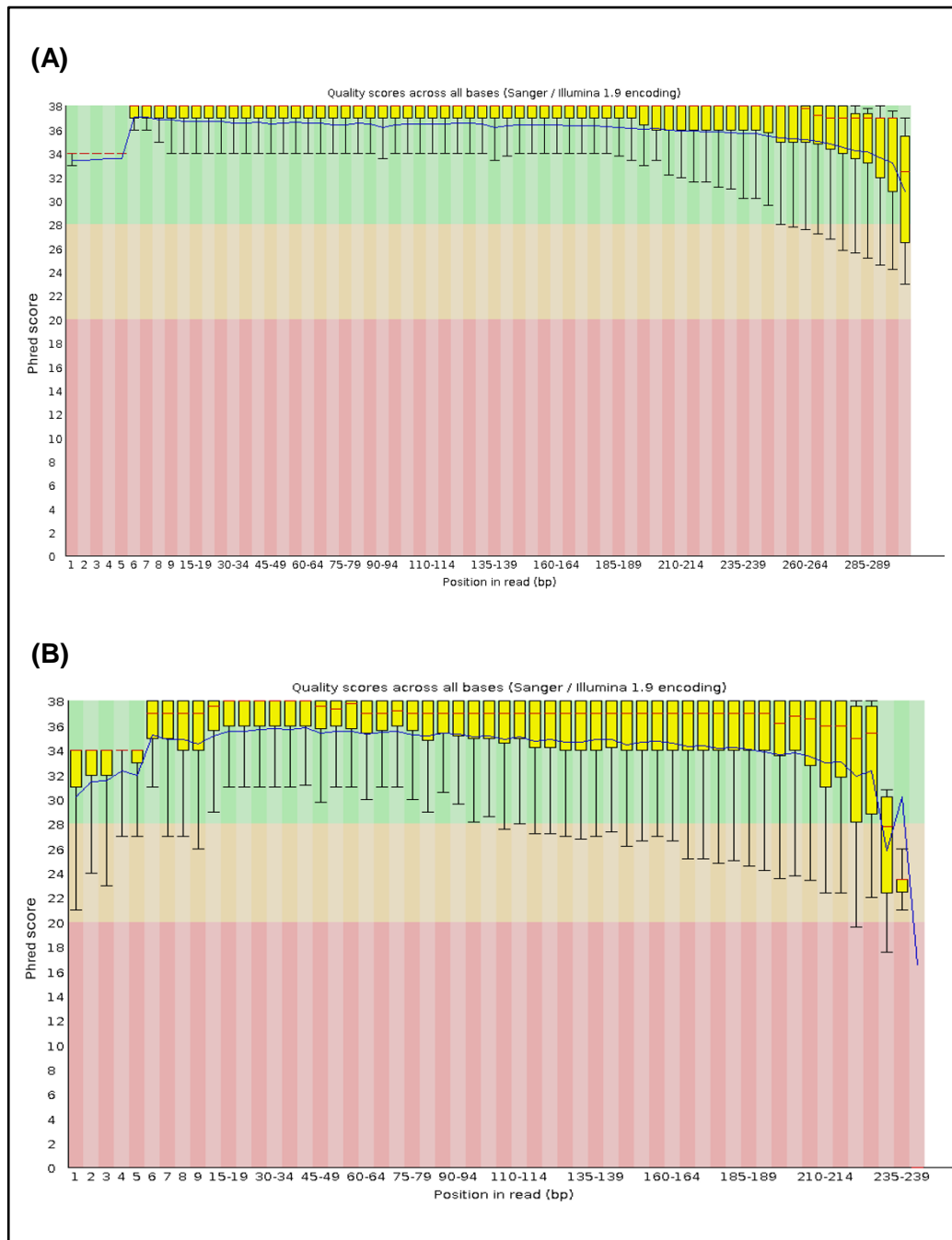
criterios de calidad mínimos, por lo que tras esto se optó por emplear la herramienta Trimmomatic con el fin de depurar las lecturas. Los resultados de este proceso se pueden observar en la **Figura N°17 y N°18**, donde se evidencia una significativa mejora de la calidad de las lecturas.



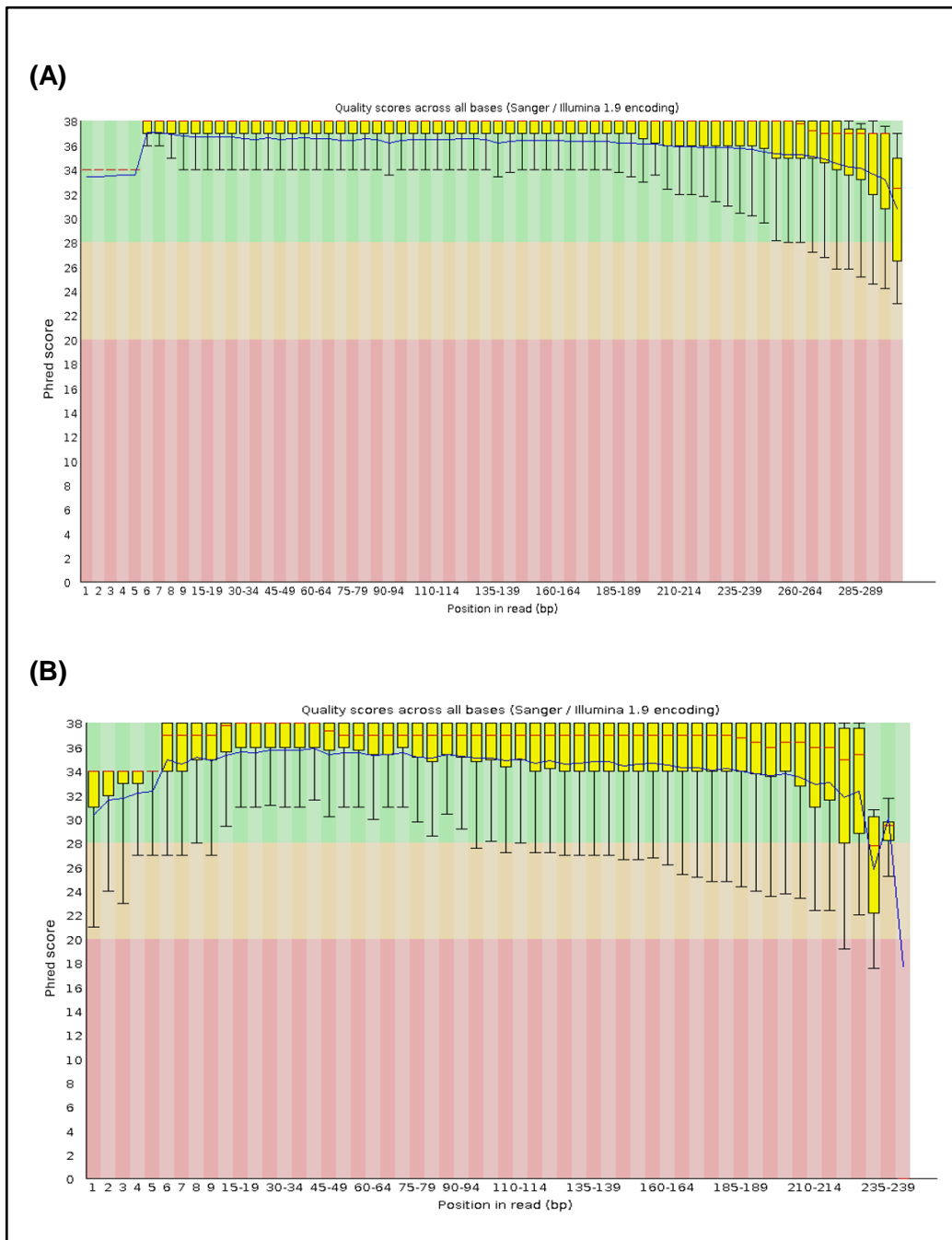
**Figura N°15.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX1 (A y B respectivamente). Se observa un gran número de lecturas que se encuentran en las zonas de calidad intermedia y mala.



**Figura N° 16.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX2 (A y B respectivamente). Se observa un gran número de lecturas que se encuentran en las zonas de calidad intermedia y mala.



**Figura N°17.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX1 (A y B respectivamente) tras la depuración con Trimmomatic. Se observa que la calidad de las lecturas ha mejorado.



**Figura N°18.** Gráficas de calidad de las lecturas forward y reverse del fago FEX2 (A y B respectivamente) tras la depuración con Trimmomatic. Se observa que la calidad de las lecturas ha mejorado.

Tras realizar el ensamblaje de novo de los genomas de los fagos FEX1 y FEX2 utilizando el programa SPAdes, se evaluó la calidad de los ensamblajes con la herramienta QUAST. En el caso del fago FEX1, el ensamblaje resultó en un total

de 345 contigs, de los cuales 121 tienen una longitud superior a 1000 pares de bases (bp). El contig más largo alcanzó los 41,924 bp, y la longitud total del ensamblaje fue de 556,859 bp. Dentro de este total, las secuencias mayores a 1000 bp representaron 468,151 bp, lo que sugiere que una proporción considerable del genoma está representada por fragmentos de tamaño relevante. El valor de N50 obtenido fue de 4,405 bp. Este valor indica que, ordenando los contigs de mayor a menor longitud, el 50 % del total del ensamblaje está contenido en contigs de al menos esa longitud. El valor de L50 fue de 28, lo que significa que los 28 contigs más largos son suficientes para cubrir la mitad del ensamblaje total. Por otro lado, el valor de L90 fue de 161, indicando que se requieren los 161 contigs más largos para cubrir el 90 % del ensamblaje. La métrica auN, que considera tanto la longitud como la continuidad de los contigs, alcanzó un valor de 10,417. El contenido de GC fue de 45.14 %, y no se detectaron ambigüedades en la secuencia, es decir, no se encontraron bases representadas por la letra "N", ni por cada 100 kbp ni en total.

Para el ensamblaje del fago FEX2 se observó una mejora notable en cuanto a continuidad y fragmentación. Se obtuvieron 203 contigs en total, con 68 de ellos superando los 1000 bp. El contig más largo alcanzó una longitud de 86,373 bp, lo que destaca una mayor continuidad en comparación con FEX1. La longitud total del ensamblaje fue de 527,437 bp, de los cuales 495,175 bp corresponden a contigs mayores a 1000 bp, evidenciando que la mayor parte del genoma está contenida en fragmentos largos y estructuralmente consistentes. En este caso, el valor de N50 fue de 19,490 bp, lo que refleja una mejora sustancial en la longitud de los contigs que componen el 50 % del ensamblaje. El valor de L50 fue de 7, lo que indica que tan

solo los 7 contigs más largos abarcan la mitad del ensamblaje, y el L90 fue de 52, lo que señala que se necesitan únicamente 52 contigs para cubrir el 90 % del genoma ensamblado. Además, el valor de auN fue de 28,078, confirmando la mayor continuidad de este ensamblaje frente al anterior. El contenido GC del ensamblaje de FEX2 fue ligeramente superior, alcanzando un 47.78 %, y al igual que en el caso anterior, no se detectaron secuencias ambiguas. El valor de L50, de solo 7, y L90, de 52, refuerzan esta idea al mostrar que un número reducido de contigs cubre gran parte del ensamblaje. Los resultados del QUASt se muestran en la **Figura N°19**.

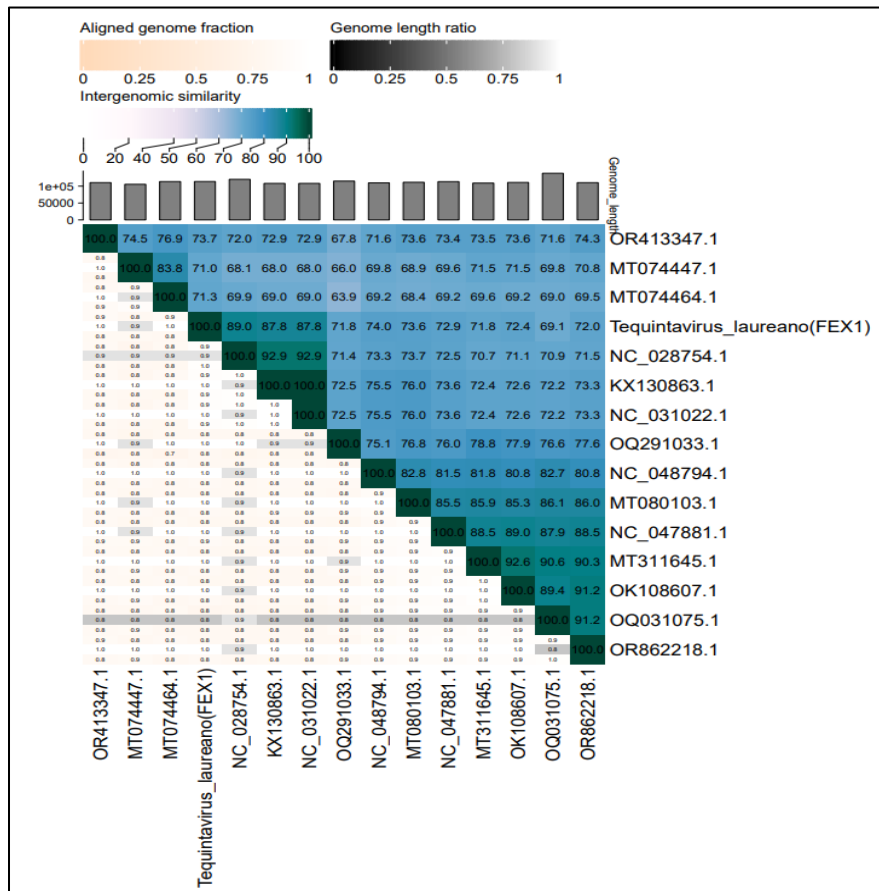
(A)		(B)	
Statistics without reference SPAdes_on_data_16_data_15_a...		Statistics without reference SPAdes_on_data_20_data_19_a...	
# contigs	257	# contigs	111
# contigs (>= 0 bp)	345	# contigs (>= 0 bp)	203
# contigs (>= 1000 bp)	121	# contigs (>= 1000 bp)	68
Largest contig	41 924	Largest contig	86 373
Total length	556 859	Total length	527 437
Total length (>= 0 bp)	588 359	Total length (>= 0 bp)	553 675
Total length (>= 1000 bp)	468 151	Total length (>= 1000 bp)	495 175
N50	4405	N50	19 490
N90	695	N90	1502
auN	10 417	auN	28 078
L50	28	L50	7
L90	161	L90	52
GC (%)	45.14	GC (%)	47.78
<b>Per base quality</b>		<b>Per base quality</b>	
# N's per 100 kbp	0	# N's per 100 kbp	0
# N's	0	# N's	0

**Figura N°19.** Resultados de la evaluación de la calidad de los ensamblajes de FEX1 y FEX2 (A y B, respectivamente) por medio de QUASt. El ensamblaje de FEX2 presenta una mayor calidad en términos de continuidad y menor fragmentación que el ensamblaje de FEX1.

## 2. Caracterización genómica del fago FEX1

El genoma del fago FEX1 tiene una longitud de 113,610 pares de bases y un contenido GC del 38.9. Utilizando las herramientas TaxMyPhage y PhaBOX, basadas en bases de datos curadas de genomas de fagos, se determinó que este virus pertenece a la clase *Caudoviricetes*, familia *Demereviridae*, subfamilia *Markadamsvirinae* y género *Tequintavirus*. El análisis intergenómico llevado a

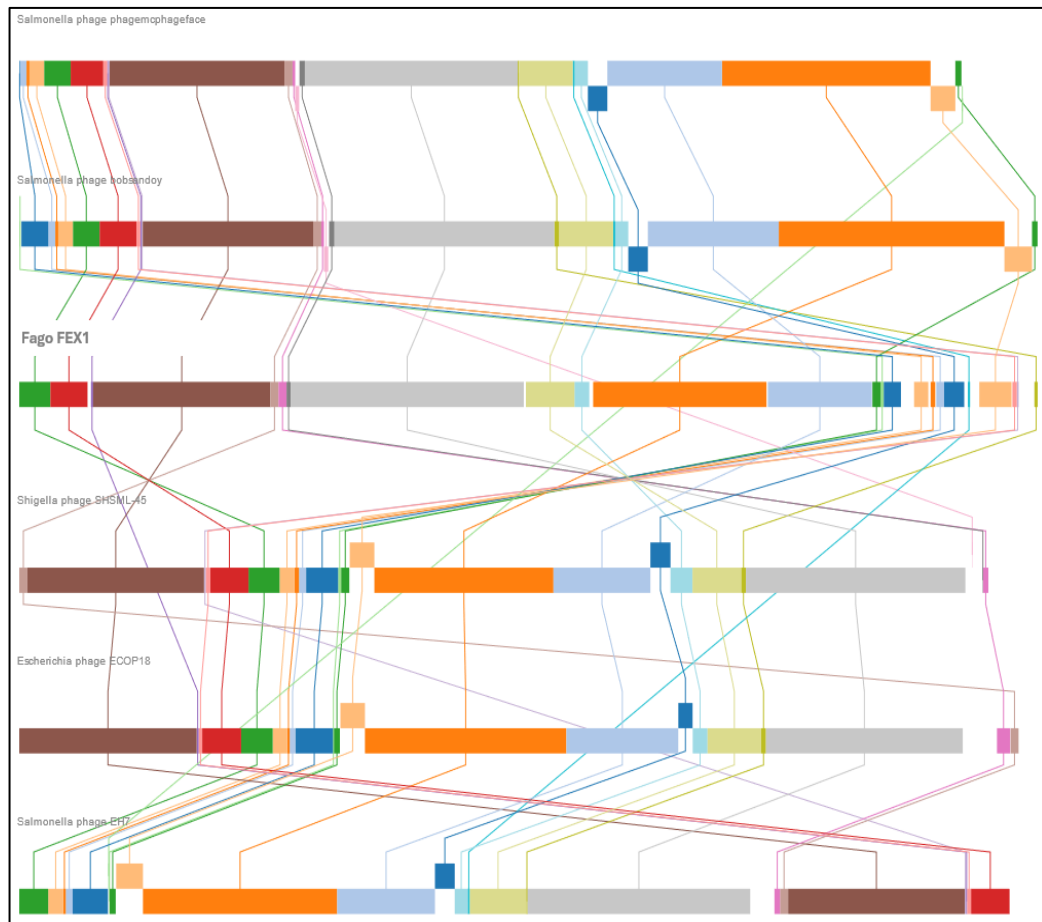
cabo mediante VIRIDIC evaluó la similitud entre el genoma del FEX1 y genomas de fagos relacionados. Los resultados, representados en la **Figura N°20**, muestran que la similitud genómica alcanza el umbral necesario para ser clasificado dentro de una nueva especie según los lineamientos establecidos por el ICTV. Esto apoya su identificación como un nuevo miembro del género que fue denominado *Tequintavirus laureano*.



**Figura N°20.** Análisis de similitud intergenómica del fago FEX1. Se observa que presenta una porcentaje de similitud menor a 95% con los demás fagos.

El mapa genómico de FEX1 se muestra en el **Anexo N°2**. Contiene genes asociados con diversas funciones esenciales para el ciclo viral, como aquellos relacionados con la replicación, ensamblaje y liberación de nuevos viriones. También se detectaron regiones de transferencia horizontal (HGT) en el genoma del fago. El

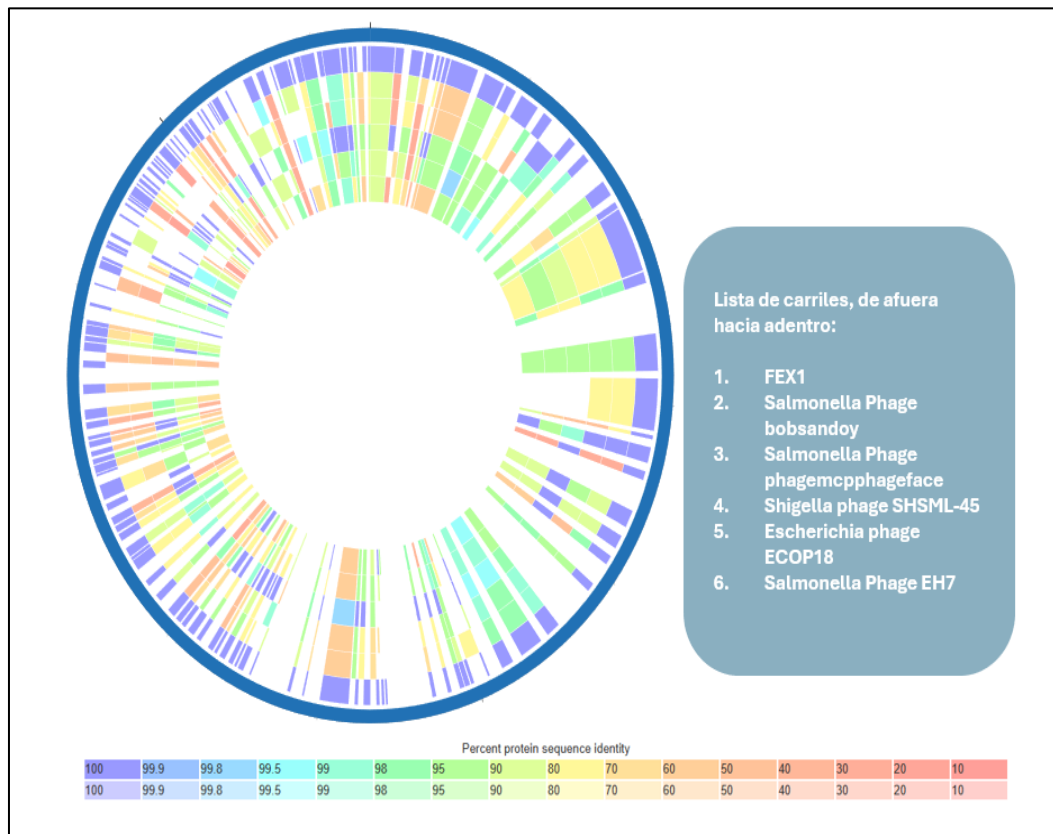
uso de AMRFinderPlus y la base de datos VFDB indicó que no se encontraron genes de resistencia antimicrobiana (ARG) ni factores de virulencia, lo que predice la seguridad del fago en aplicaciones terapéuticas. También se detectaron cuatro genes de ARN de transferencia: ile, arg, met y un pseudotRNA.



**Figura N°21.** Alineamiento genómico del fago FEX1 respecto a los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa una divergencia en el ordenamiento de los genes de FEX1 en comparación a los demás fagos.

El alineamiento genómico del fago FEX1 respecto a cinco fagos representativos, mostrado en la **Figura N°21**, refleja la conservación de ciertos bloques genómicos. Sin embargo, se evidencian regiones divergentes que destacan la particularidad de este fago en comparación con otros miembros del género *Tequintavirus*. Estas

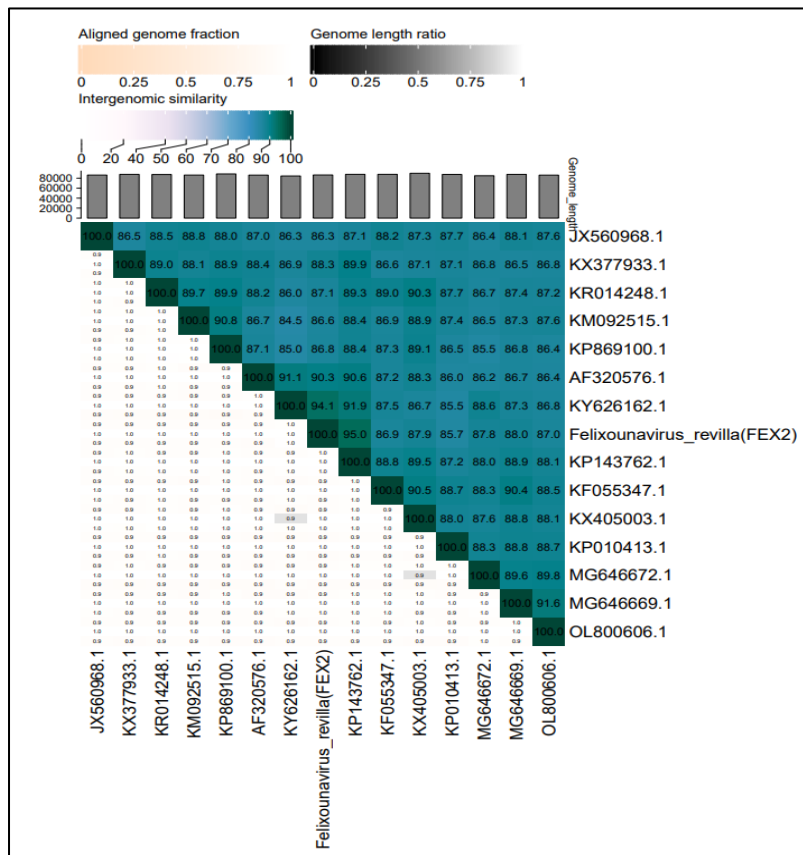
diferencias en la organización del genoma refuerzan la conclusión de que el fago FEX1 constituye un nuevo miembro dentro de su género. La comparación proteómica con los mismos fagos relacionados, representada en la **Figura N°22**, permitió identificar proteínas conservadas que reflejan similitudes funcionales. Sin embargo, también se observaron diferencias importantes en proteínas de función desconocida, lo que podría representar adaptaciones únicas del FEX1. Como también en proteínas de función conocida como la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa y un par de proteínas de tipo endonucleasas.



**Figura N°22.** Comparación proteómica del fago FEX1 respecto a los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa una distribución heterogénea de los porcentajes de identidad del proteoma de FEX1 con respecto a los demás fagos.

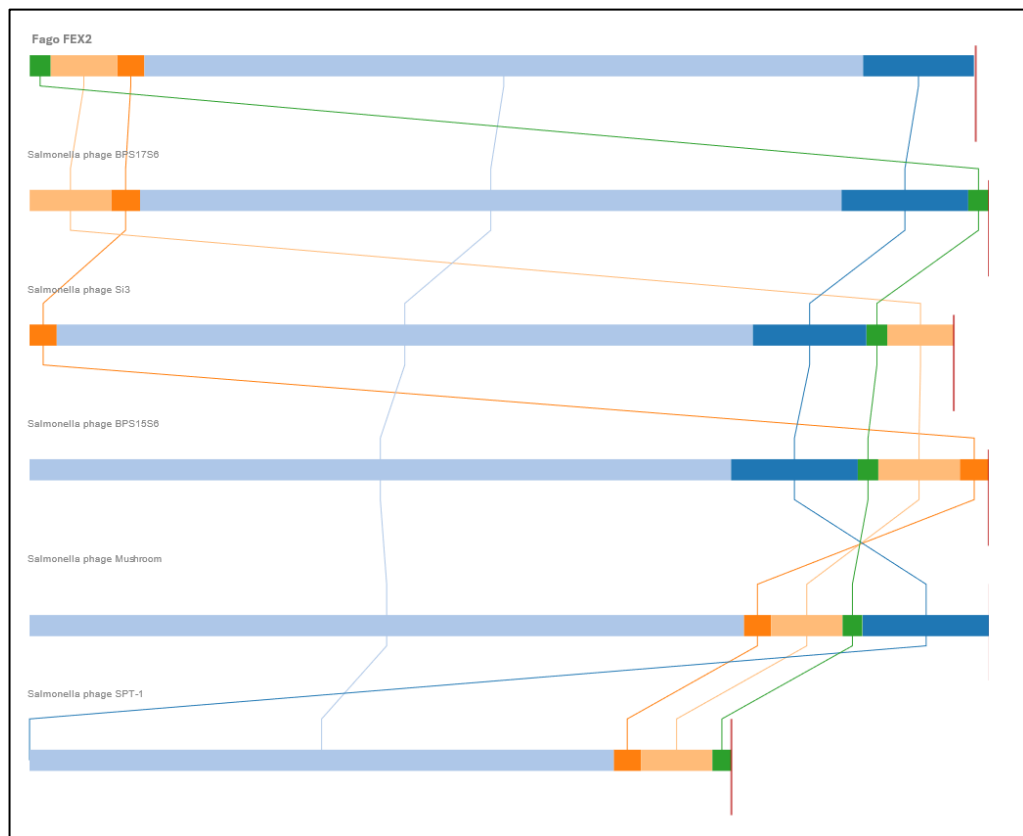
### 3. Caracterización genómica del fago FEX2

El genoma del fago FEX2 tiene una longitud de 86,429 pares de bases y un contenido de GC del 39.08%. De manera similar al fago FEX1, tiene un contenido GC mucho menor que el de su hospedero. Empleando las mismas herramientas taxonómicas se pudo determinar que este fago pertenece a la clase *Caudoviricetes*, subfamilia *Ounaviridae* y del género *Felixounavirus*. Al realizar el análisis de similaridad intergenómica presentados en la **Figura N°23** se pudo determinar que el fago FEX2 se encuentra justo en el umbral de diferenciación de una nueva especie, siendo muy cercano al fago *Felixounavirus mushroom*. En ese sentido se nombra al fago FEX2 como *Felixounavirus revilla*.



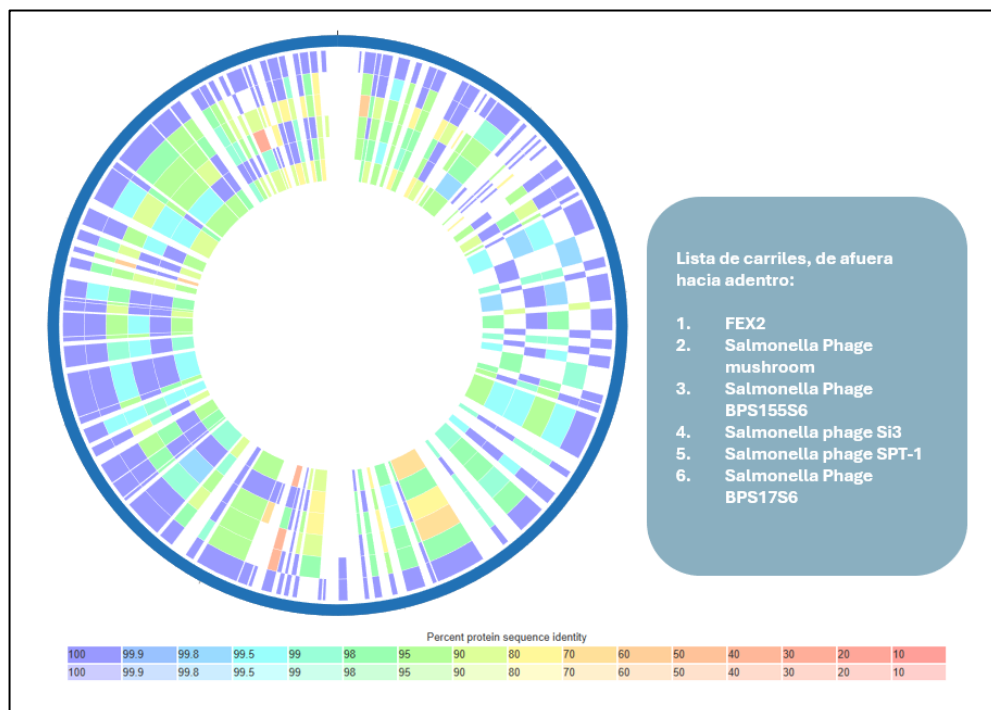
**Figura N°23.** Análisis de similaridad intergenómica del fago FEX2. Se observa que presenta una porcentaje de similaridad menor a 95% con los demás fagos, a excepción de uno (KP143762.1).

El mapa genómico del fago FEX2 se muestra en el **Anexo N°3**. De misma manera se pudo identificar los genes asociados a la replicación y empaquetamiento del ADN, como también a los genes estructurales y que median la invasión a la bacteria blanco. Un aspecto importante que notar es que, a diferencia de FEX1, FEX2 no cuenta con regiones repetitivas y posee genes que codifican a 17 tRNAs. A su vez, también se pudo detectar cuatro regiones HGT. Empleando AMRFinderPlus se pudo determinar la ausencia de genes ARG; se hizo lo propio con la base de datos VFDB para los factores de virulencia evidenciando la ausencia de estos en el genoma. Esta información en conjunto sugiere un uso seguro de FEX2 para aplicaciones terapéuticas y biotecnológicas.



**Figura N°24.** Alineamiento genómico del fago FEX2 respecto a los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa ordenamiento de genes más conservado con respecto a los demás fagos.

El alineamiento genómico de FEX2 contra cinco fagos representativos, mostrado en la **Figura N°24**, evidencia una región altamente conservada de gran extensión en los genomas. A diferencia que, en el primer alineamiento, los genomas cuentan con un menor número de regiones representativas. FEX2 se distingue teniendo un ordenamiento único, hecho que apoya la idea de su establecimiento como una nueva especie. Al evaluar la comparación proteómica queda en evidencia el parentesco con el fago *mushroom*. Sin embargo, estos difieren en gran medida en lo que respecta a una proteína putativa de fagos con motivos de endonucleasa. Esto sugiere que se diferencian en gran medida en sus estrategias de empaquetamiento o de manejo de su material genético. Otra proteína que resalta por su ligera variación es la fibra de la cola, sugiriendo diferencias estructurales potenciales que conlleven a diferentes perfiles de estabilidad. Los resultados se muestran en la **Figura N°25**.



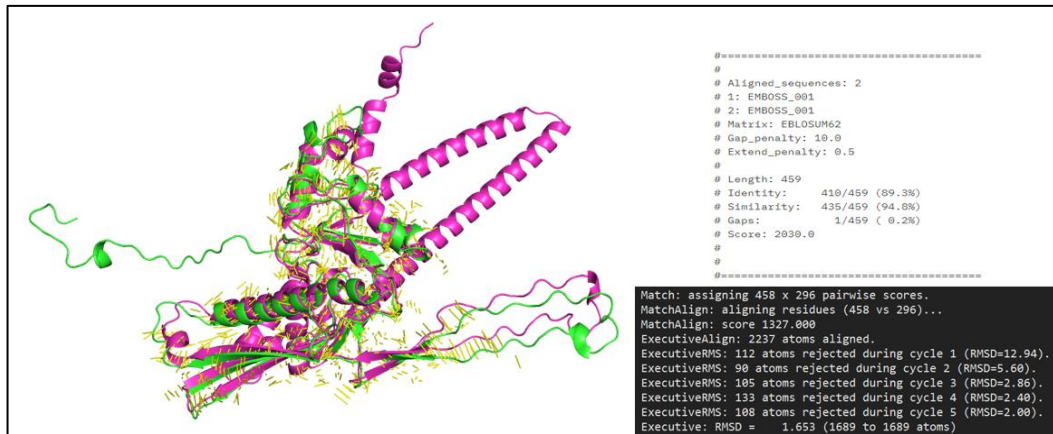
**Figura N°25.** Comparación proteómica del fago FEX2 contra los 5 fagos más cercanos genéticamente. Se observa una un alto porcentaje de identidad a lo largo de gran parte del proteoma.

### iii. Asignación de proteínas estructurales

La creación de un mapa estructural inicial se puede realizar a través de estructuras tridimensionales publicadas de fagos que se encuentren estrechamente emparentados con el fago a analizar. Con este fin, se realizó una búsqueda extensiva en la base de datos EMDB que recopila toda estructura tridimensional proteica publicada. En este caso en particular se buscaron estructuras que fueran obtenidas por medio de Cryo-EM dado que esta técnica aporta la mayor resolución.

#### 1. Asignación de proteínas estructurales de FEX1

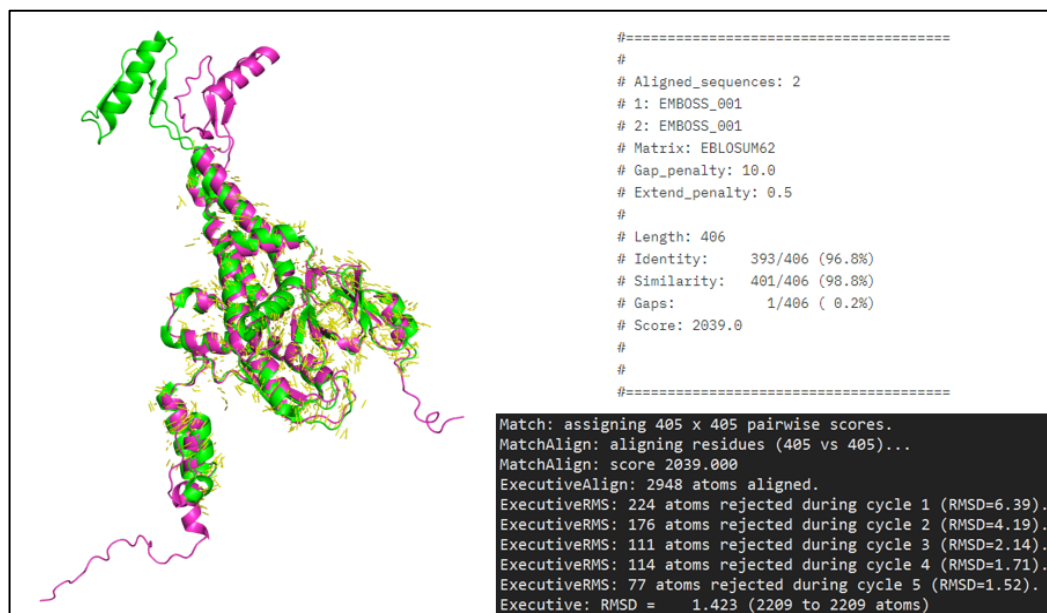
La búsqueda arrojó que el fago más emparentado cuya estructura tridimensional se encontraba elucidada fue el fago denominado DT57C, un fago del género Tequintavirus que se encuentra identificado bajo el código taxonómico del NCBI N° 1567008 (67). Empleando la herramienta EMBOSS Needle se realizaron los alineamientos globales entre las secuencias de proteínas estructurales del fago DT57C y el fago FEX1. La proteína mayor de la cápside de FEX1 presentó un 89.3% de identidad y un 94.8% de similitud con respecto a su homóloga en DT57C, con una cobertura de alineamiento del 99.8%. En el alineamiento estructural se detectó una zona de potencial superposición desde el residuo LEU188 al residuo GLU211, y del residuo GLU232 en adelante hasta ALA455. Este alineamiento estructural comprendió un total de 1689 átomos estrictamente alineados, con un RMSD final de 1.653Å, lo que sugiere una fuerte conservación estructural. El alineamiento se puede visualizar en la **Figura N°26**.



**Figura N°26.** Alineamiento estructural entre la proteína mayor de la cápside de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.653 Å tras alinear 1689 átomos.

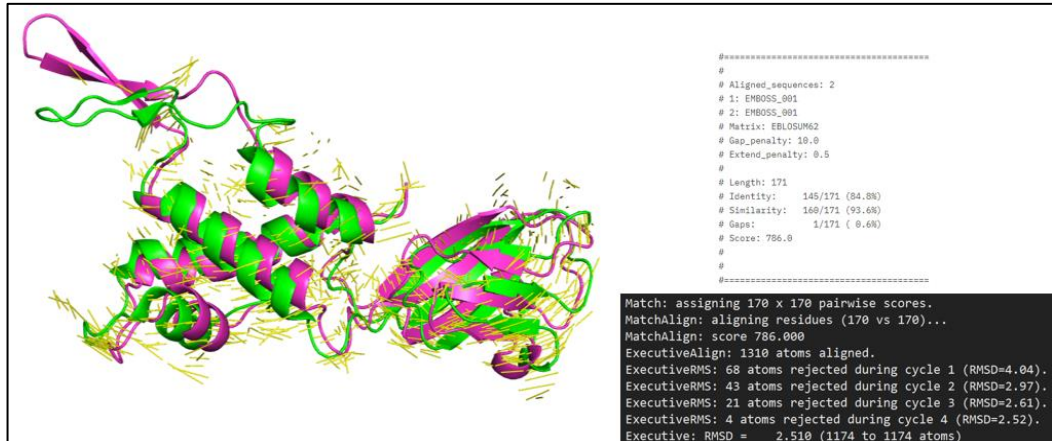
En el caso de evaluar la sección del cuello del fago, se compararon cuatro proteínas: la proteína portal, la proteína de completamiento de la cápside, la proteína terminadora de la cola y la proteína de medida de la cola. Todas las proteínas mostraron una alta identidad y similitud con sus contrapartes del fago DT57C, lo que sugiere una posible relación de homología. En particular, la proteína portal presentó un 96.8% de identidad y un 98.8% de similitud (cobertura: 96.0%), la proteína de completamiento de cápside un 84.8% de identidad y 93.6% de similitud (cobertura: 99.4%), la proteína terminadora de cola un 96.9% de identidad y 99.4% de similitud (cobertura: 99.3%) y la proteína de medida de cola un 89.3% de identidad y 93.5% de similitud (cobertura: 99.5%). Estas cifras reflejan una fuerte conservación a nivel de secuencia, lo cual respalda su asociación funcional y estructural dentro de esta región del virión. Sobre la proteína portal, se pudo observar un superposición casi total. Este patrón empezó desde el residuo LEU10 de la proteína de FEX1 y se mantuvo hasta LEU196. Luego, tras una zona de no alineamiento, se volvieron a superponer desde el residuo SER253 hasta LEU362, seguido de una zona final de no alineamiento. El cálculo del RMSD para las zonas

estrictamente alineadas fue de 1.423Å y fue compuesta por 2209 átomos. Esto se puede apreciar en la **Figura N°27**.



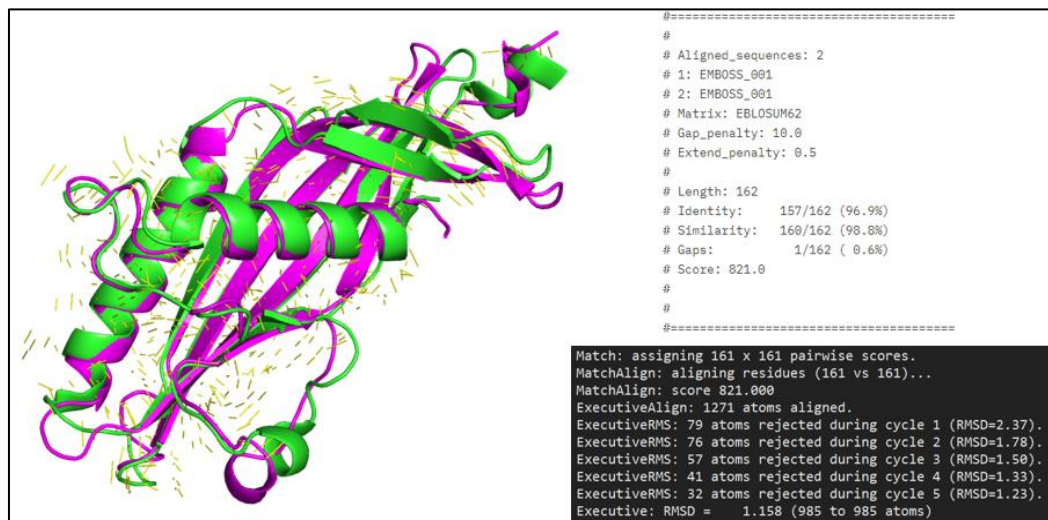
**Figura N°27.** Alineamiento estructural entre la proteína portal de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.423 Å tras alinear 2209 átomos.

Todos los residuos de la proteína de cierre de la cápside se encontraron dentro de la zona de potencial superposición a excepción de una región comprendida entre los residuos ILE140 y LYS151. En la **Figura N°28** se ve que el RMSD fue de 2.510Å y los átomos que fueron considerados para estrictamente alineados estructuralmente fueron 1174 de 1310 átomos totales asignados en la prueba.



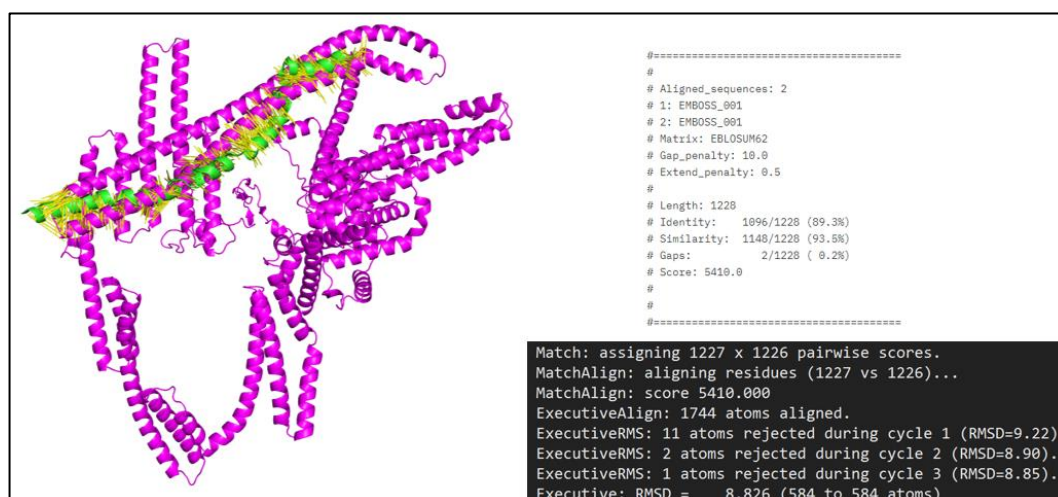
**Figura N°28.** Alineamiento estructural entre la proteína de cierre de la cápside de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 2.510 Å tras alinear 1174 átomos.

De misma manera, se observó en la proteína de completamiento de la cola gran parte de la secuencia tenía potencial de superponerse estructuralmente, tal y como se puede observar en la **Figura N°29**. Únicamente en dos zonas no hubo aparente superposición, siendo estas de THR38 a GLU42 y de LEU62 a GLN66, de la proteína de FEX1. El RMSD calculado para la alineación estructural estricta fue de 1.158Å, incluyendo 985 átomos de 1271.



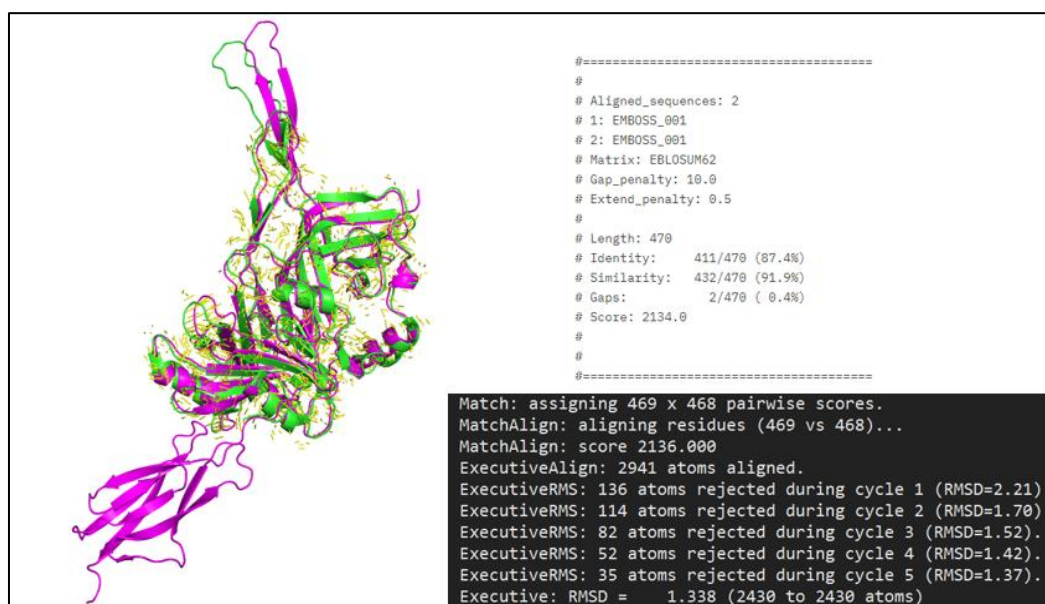
**Figura N°29.** Alineamiento estructural entre la proteína completamiento de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.158 Å tras alinear 985 átomos.

Al analizar la proteína de medida de la cola solo se puede apreciar la región N-terminal de DT57C, pero se pudo superponer esta pequeña región en el modelo predicho de la proteína de FEX1; esto se aprecia en la **Figura N°30**. Se puede apreciar una zona de potencial interacción iban desde el residuo MET1 hasta THR79 de la proteína de FEX1. El RMSD obtenido fue de 8.826 Å, siendo el más alto hasta este punto del análisis contemplando 584 átomos de los 1744 alineados.



**Figura N°30.** Alineamiento estructural entre la proteína de medida de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 8.826 Å tras alinear 584 átomos.

La estructura de la cola del fago DT57C está compuesta por la proteína de medida de la cola y la proteína tubular de la cola. Sobre esta última, que la zona de superposición comenzó desde LEU3 hasta THR42. Desde aquí hubo una interrupción hasta ARG59 y la zona continuó hasta PRO374 de la proteína de FEX1. En la **Figura N°31** se muestra que el RMSD de la zona estrictamente alineada se obtuvo un valor de 1.338Å, indicando que esta región, comprendida por 2430 átomos, se encuentra muy conservada estructuralmente entre ambas proteínas.



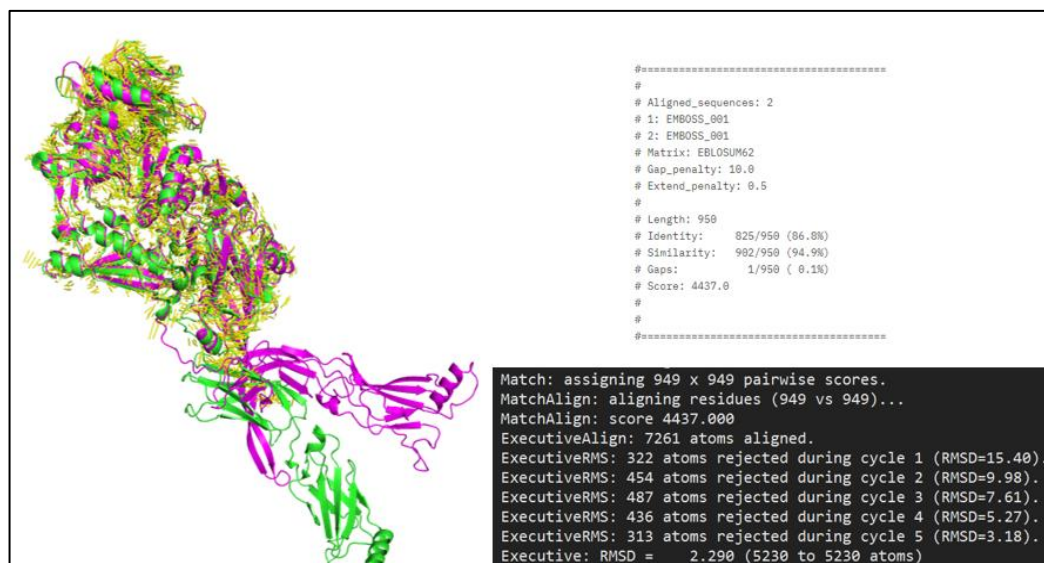
**Figura N°31.** Alineamiento estructural entre la proteína tubular de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.338 Å tras alinear 2430 átomos.

Pasando a analizar la composición de proteínas en la estructura de la placa base del fago DT57C, se encontraron 5 proteínas en FEX1 que podrían cumplir esos roles. Primero, la proteína lateral de la cola A es la única que no se encuentra bajo relación de homología con su contraparte en DT57C obteniendo un porcentaje de conservación de identidad de 28.6%. Se muestra en la **Figura N°32** los resultados del alineamiento de las secuencias de proteínas. No se pudo realizar un alineamiento estructural porque la sección de la proteína de DT57C elucidada por Cryo-EM es extremadamente pequeña.

```
#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 1194
# Identity:   341/1194 (28.6%)
# Similarity: 472/1194 (39.5%)
# Gaps:      350/1194 (29.3%)
# Score: 824.5
#
#
#=====
```

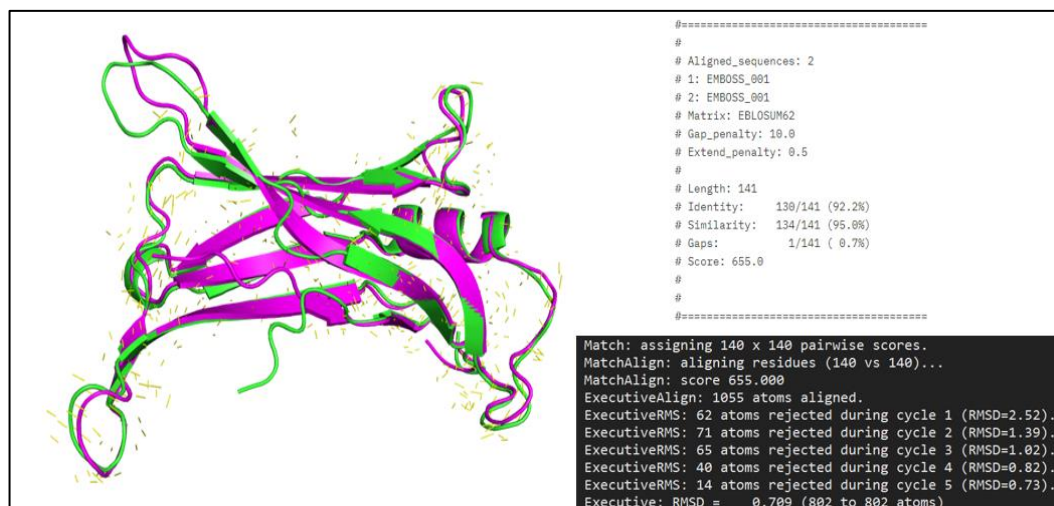
**Figura N°32.** Alineamiento global entre la proteína lateral de la cola A de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa que no hay relación de homología entre las proteínas.

La proteína central de la base de DT57C mantuvo una relación de homología con la de FEX1, de 86.8%. La zona de potencial superposición estructural se mantuvo desde MET1 hasta el residuo ILE212 de la proteína de FEX1. Tras una sección no alineada de 46 residuos, las estructuras se volvieron a superponer desde el residuo ALA259 hasta ILE726. En la **Figura N°33** se muestra que el RMSD calculado una sección de estricta superposición fue de 2.290Å compuesta por 5230 átomos de los 7261 presentes en la región de potencial alineamiento.



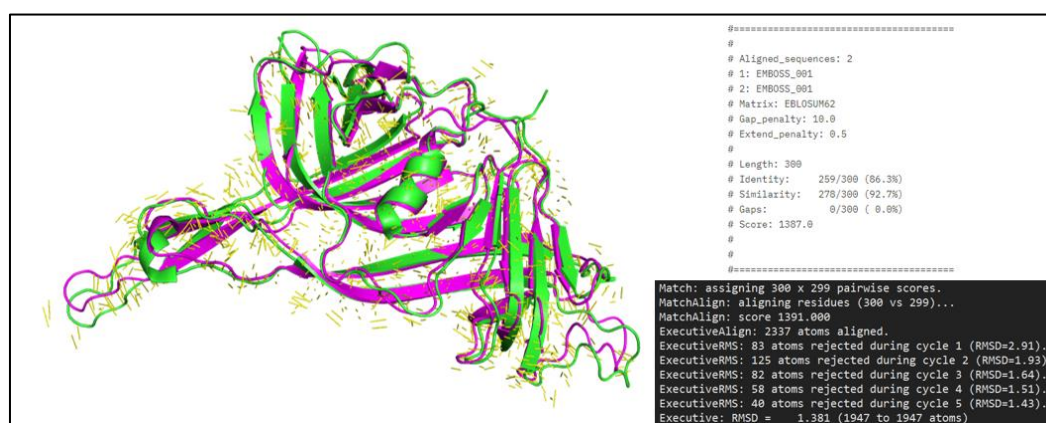
**Figura N°33.** Alineamiento estructural entre la proteína central de la base de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 2.290 Å tras alinear 5230 átomos.

Al analizar la proteína lateral de la cola C de FEX1 se vio que mantenía una estrecha relación de homología con la de DT57C, siendo esta de 92.2%. Las regiones de potencial superposición estuvieron presentes casi a lo largo de toda la estructura, teniendo pocas zonas de no alineamiento de corta longitud tales como: de MET1 a ASN5, de VAL115 a GLU119 y por último el residuo GLN138 de la proteína del fago FEX1. En cuanto al RMSD, en la **Figura N°34** se puede apreciar que fue de 0.709Å para los 802 átomos involucrados en la superposición estricta.



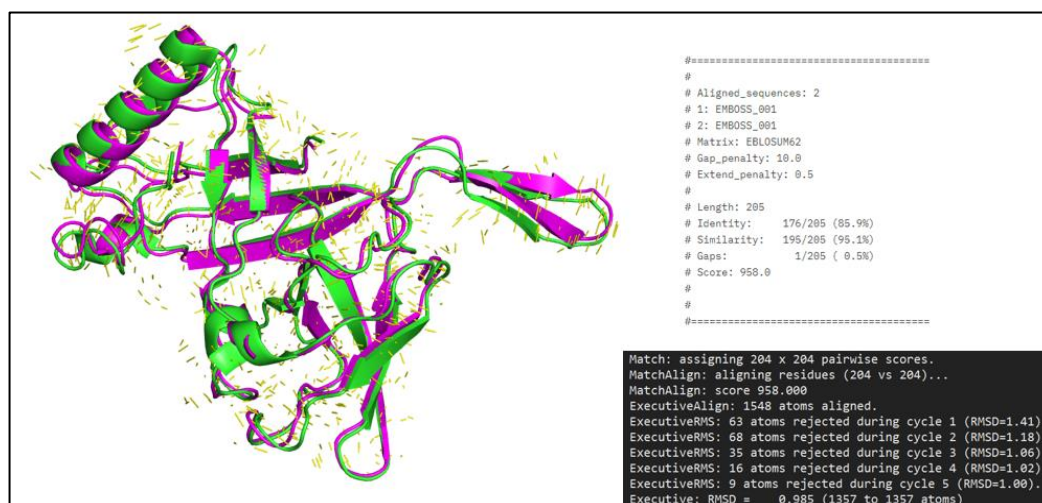
**Figura N°34.** Alineamiento estructural entre la proteína lateral de la cola C de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 0.709 Å tras alinear 802 átomos.

El alineamiento estructural de la proteína central de la punta de la cola muestra una superposición casi completa, esta se muestra en la **Figura N°35**. Las únicas secciones que no se encuentran superpuestas esta comprendida por los residuos de MET1 a SER4 y de GLU294 a LYS 294. El RMSD del alineamiento fue de 1.381Å, en donde fueron seleccionados 1947 átomos de los 2337 presentes en la zona de potencial superposición.



**Figura N°35.** Alineamiento estructural entre la proteína central de la punta de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 1.381 Å tras alinear 1947 átomos.

Tal como se muestra en la **Figura N°36**, en el caso de la proteína distal de la cola de FEX1 se vio que se encuentra extremadamente alineada con la de DT57C. Solo 5 residuos en total no se encuentran alineados, estos son: SER181, PHE181, GLY182, SER187 y ASN188. El RMSD para este alineamiento es de 0.985Å, donde se contempla 1357 átomos.



**Figura N°36.** Alineamiento estructural entre la proteína distal de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 0.985 Å tras alinear 1357 átomos.

La última proteína en ser evaluada fue la fibra recta de la cola. Al igual que en el caso de la proteína lateral de la cola, no se pudo realizar un alineamiento estructural dado el tamaño reducido de la estructura publicada, por lo que solo se muestra el alineamiento global de las secuencias de aminoácidos. En la **Figura N°37** se puede apreciar que existe una relación de homología entre las proteínas de DT57C y FEX1.

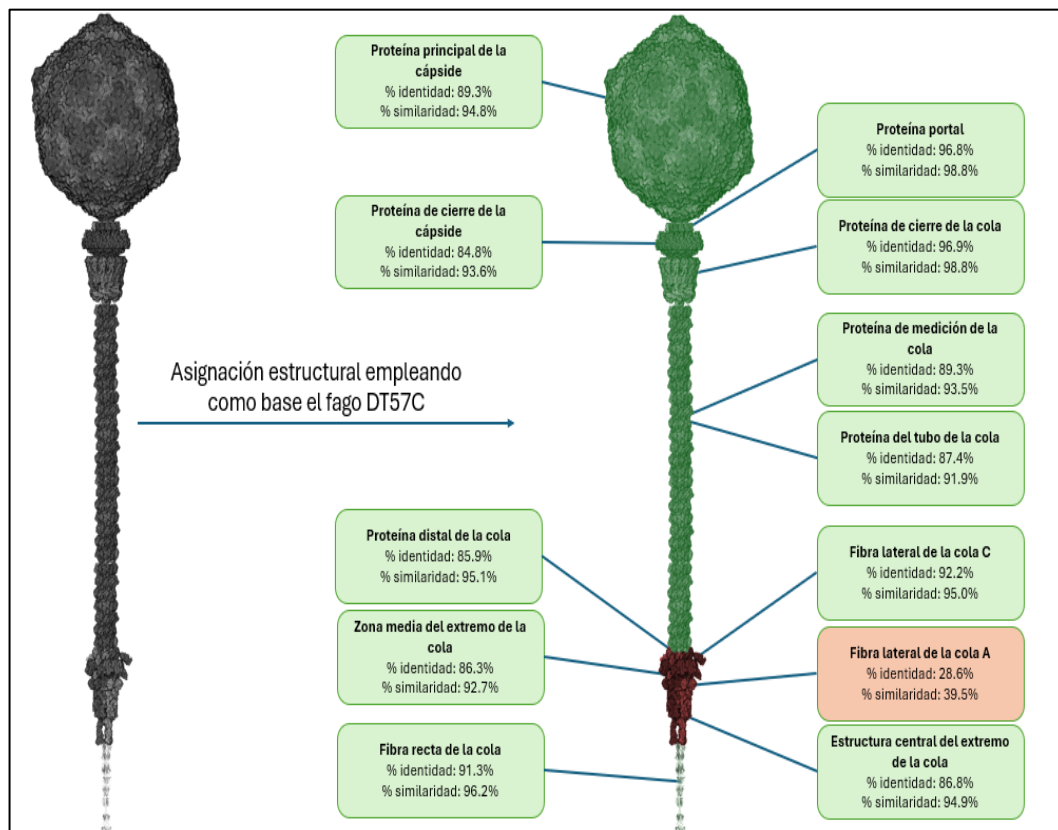
```

#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EBL0SUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 686
# Identity:      626/686 (91.3%)
# Similarity:   660/686 (96.2%)
# Gaps:         1/686 ( 0.1%)
# Score: 3372.0
#
#
#=====

```

**Figura N°37.** Alineamiento estructural entre la proteína de la fibra recta de la cola de FEX1 (magenta) y DT57C (verde). Se observa que hay relación de homología entre las proteínas.

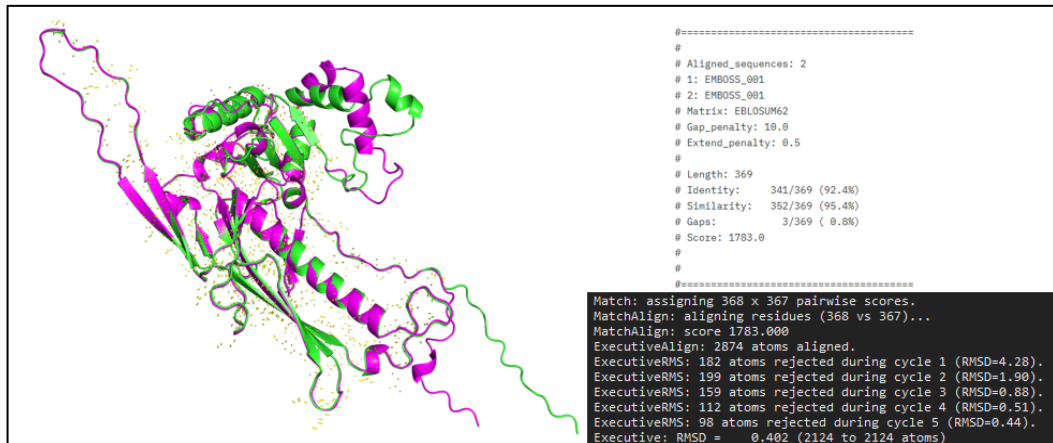
La representación gráfica mostrada en la **Figura N°38** ilustra la asignación estructural realizada para el fago FEX1, utilizando como referencia la estructura tridimensional del fago DT57C, un miembro del género Tequintavirus. Como se observa en la figura, las proteínas estructurales de FEX1 muestran una alta homología con las de DT57C, evidenciada por los valores de RMSD bajos obtenidos en los alineamientos estructurales. En particular, las proteínas como la mayor de la cápside, la proteína portal y la proteína de cierre de la cápside presentan una notable conservación, lo que sugiere una estructura compartida entre ambos fagos. Sin embargo, la proteína lateral de la cola A de FEX1 no mostró relación de homología con la proteína equivalente en DT57C, con un porcentaje de identidad de 28.6% y similitud de 39.5%. Este resultado indica una diferencia estructural en esta proteína específica entre ambos fagos. En general, las demás proteínas estructurales de FEX1, que presentaron una alta identidad y similitud, refuerzan la validez de la asignación estructural realizada utilizando como modelo el fago DT57C.



**Figura N°38.** Asignación estructural de las proteínas del fago FEX1 utilizando como referencia el fago DT57C. Los valores de identidad y similitud entre las proteínas estructurales de FEX1 y DT57C se muestran en los recuadros correspondientes. La proteína lateral de la cola A (cuadro en rojo) no muestra relación de homología con su contraparte en DT57C, con un porcentaje de identidad del 28.6% y similitud del 39.5%.

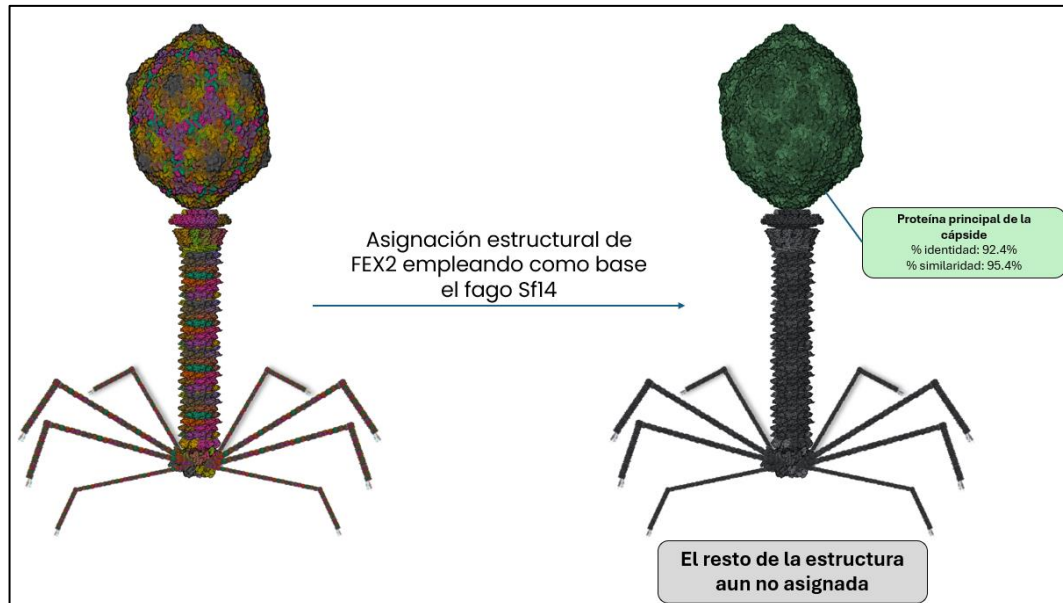
## 2. Asignación de proteínas estructurales de FEX2

En el caso del fago FEX2, no se encontró referencia de alguna estructura completa elucidada por medio de Cryo-EM de algún fago cercano donde las proteínas estructurales mantengan una relación de homología (>30%). La única estructura cercana corresponde a la proteína mayor de la cápside del fago Sf14 (68). El alineamiento estructural se puede observar en la **Figura N°39**.



**Figura N°39.** Alineamiento estructural entre la proteína mayor de la cápside de FEX2 (magenta) y Sf14 (verde). Se observa una alta superposición entre ambas estructuras, con un RMSD de 0.402 Å tras alinear 2124 átomos.

La superposición de las estructuras comienza desde el residuo LEU14 y sigue hasta THR190, tras una primera intermisión se vuelven a alinear desde el residuo GLU198 hasta ARG218. Luego se observó una última intermisión hasta HIS248, tras lo cual el alineamiento se mantuvo a largo de la proteína. El RMSD calculado para el alineamiento estricto fue de 0.402Å, donde se tomó en cuenta 2124 átomos de los 2874 que se encontraban en la zona de potencial alineamiento. Sin embargo, debido a la limitada disponibilidad de información estructural para FEX2, no ha sido posible realizar una representación gráfica completa de la asignación estructural para las demás proteínas del fago, lo que restringe el análisis detallado de su arquitectura y su comparación con otros fagos cercanos. En la **Figura N°40** se muestra la asignación estructural de FEX2 empleando la información disponible del fago Sf14.



**Figura N°40.** Asignación estructural de las proteínas del fago FEX2 utilizando como referencia el fago Sf14. Los valores de identidad y similitud entre la proteína estructural de FEX2 y Sf14 se muestra en el recuadro correspondiente. Solo se considera a la proteína principal de la cápside dado que única sección del fago que ha sido elucidado tridimensionalmente.

## VIII. Discusión

El presente trabajo de investigación se enfocó en determinar las características microbiológicas, genómicas y estructurales de los fagos FEX1 y FEX2 que fueron aislados a partir de residuos fecales de una granja de cuyes en Lima, Perú. Los resultados obtenidos revelan diferencias significativas entre los fagos FEX1 y FEX2 en términos de morfología, actividad lítica y espectro de hospederos. La morfología observada mediante TEM indica que FEX1 cuenta con una morfología compatible con Siphoviridae, mientras que FEX2 cuenta con una morfología compatible con Myoviridae (**Figura N°11**). Estas diferencias en la estructura, de la cola principalmente, son consistentes con los patrones establecidos para estas familias. La cola flexible de los Siphoviridae, como se puede observar en el fago  $\lambda$ , facilita la unión a receptores conservados, tales como LPS o flagelos dispuestos en la superficie bacteriana; mientras que la cola contráctil de los Myoviridae, característica de fagos como T4, permite penetrar membranas bacterianas (69-72). Estas características puntuales en la cola de los fagos Siphoviridae y Myoviridae también representan adaptaciones estructurales que influyen en la interacción con sus hospederos específicos (73).

La actividad lítica de los fagos, evaluada mediante la técnica de Spot-test, reveló diferencias significativas. Las placas formadas por el fago FEX1 mostraron mayor translucidez en comparación con las de FEX2 (**Figura N°10**), lo que sugiere una lisis bacteriana más completa. Este fenómeno podría asociarse a una mayor eficiencia de las endolisinas codificadas por FEX1, enzimas que degradan la pared celular bacteriana de manera coordinada (74,75).

Adicionalmente, la menor translucidez en FEX2 podría deberse a un fenómeno llamado “lysis from without”, en donde la lisis bacteriana ocurre de manera prematura sin haberse saturado de partículas virales (76). Este comportamiento ya fue visto previamente en fagos de *Salmonella* (77). Sin embargo, esto es poco probable dados los resultados obtenidos del tiempo que le tomó a FEX2 en alcanzar el “burst”. Alternativamente, la diferencia en translucidez podría indicar una liberación celular menos sincronizada, como se ha observado en fagos Myoviridae con maquinaria de lisis dependiente de holinas (78).

La actividad lítica reducida de FEX1 frente a *S. Infantis* (**Tabla N°1, Anexo N°1**) contrasta con su alta eficiencia en otras cepas de *Salmonella*, lo que sugiere mecanismos específicos de resistencia en esta cepa. Estudios recientes han identificado que ciertas mutaciones en los genes de la vía de síntesis de lipopolisacáridos (LPS) en *S. Infantis*, confieren a esta bacteria resistencia a la infección por bacteriófagos (79). Esto sugiere que FEX1 podría estar empleando los LPS como punto de reconocimiento primero para iniciar el proceso de infección. Cabe mencionar que este tipo de inmunidad también fue reportado en *S. Enteritidis*, sin embargo, en este estudio no se evidenció resistencia a la infección (80).

Adicionalmente, es posible que el fago FEX1 sea susceptible al sistema CRISPR/Cas presente en *S. Infantis* (81,82). Un gran número de bacterias del género *Salmonella* cuentan con un sistema funcional CRISPR/Cas, que les provee de un sistema de protección contra infecciones por fagos (83). Este sistema es altamente específico ya que depende de la especificidad del ARN guía por el ADN

blanco (84). Los bacteriófagos por su lado también poseen mecanismos denominados anti-CRISPR que les permite burlar los sistemas de defensa bacterianos. Estos consisten en la producción de proteínas denominadas “Acr” que pueden ejercer la función de bloquear la integración del complejo CRISPR/Cas al ADN del fago, como también pueden generar la disrupción del complejo CRISPR/Cas y la degradación del crRNA (85,86). Contemplando esta posibilidad, se empleó la herramienta bioinformática AcrDB para detectar la presencia de genes Acr en FEX1 y FEX2 (87). Sin embargo, no se pudo detectar estos genes en ninguno de los dos fagos.

En nuestros aislamientos, el espectro activo incluye *S. Typhimurium*, *S. Typhi* y *S. Enteritidis*, con menor actividad de FEX1 frente a *S. Infantis*. La literatura destaca que el rango de hospedadores es un criterio central para seleccionar fagos y que su amplitud condiciona la utilidad práctica. Aunque con frecuencia se considera que los siphovirus presentan un alcance restringido, también se han descrito casos con actividad sobre varios serovares de *Salmonella*, lo que ayuda a explicar patrones de sensibilidad diferentes entre serovares cercanos (88). En ese marco, se reconoce que el rango limitado representa un desafío para la aplicación terapéutica, por lo que es necesario verificar la susceptibilidad a nivel de serovar cuando se definen fagos candidatos.

Los análisis de estabilidad del pH muestran que los fagos FEX1 y FEX2 mantienen una viabilidad estable entre pH 4 y 7 (**Figura N° 12**). Este comportamiento es típico de muchos fagos, cuya actividad suele disminuir drásticamente en condiciones

extremas de pH debido a la desnaturalización de proteínas estructurales (89,90). En condiciones de pH altamente ácido (pH 2–3), FEX1 se inactivó completamente, mientras que FEX2 mostró una tolerancia ligeramente superior al permanecer parcialmente activo en pH 3, aunque también perdió toda actividad a pH 2. En el rango alcalino (pH 8–10), FEX2 mostró mayor estabilidad en comparación con FEX1, cuya actividad decreció significativamente a pH 10. Los resultados de FEX2 son consistentes con los previamente reportados sobre estabilidad a diferentes pH para fagos del género *Felixounavirus* (91-93). En el caso de los resultados de FEX1, son consistentes con lo previamente reportado en fagos del género *Tequintavirus* (87,94) pero también se han realizado estudios donde fagos de este género probaron mantener su viabilidad al ser sometidos a pH 3 (96,97). Lo encontrado sugiere que FEX2 podría ser más versátil en términos de aplicaciones industriales, médicas o ambientales donde los fagos sean expuestos a condiciones de pH variadas (98,99). La estabilidad diferencial observada en pH extremos podría explorarse más a fondo mediante estudios estructurales de alta resolución para identificar los componentes moleculares responsables.

La estabilidad térmica de los fagos FEX1 y FEX2 fue evaluada en función de su capacidad para mantener la infectividad tras la exposición a diferentes temperaturas (**Figura N°13**). Los resultados mostraron que ambos fagos mantienen su viabilidad en temperaturas moderadas, pero difieren en su capacidad de resistencia térmica a temperaturas extremas. Mientras que FEX2 mostró una rápida inactivación a temperaturas superiores a 50°C, FEX1 demostró una mayor resistencia, lo que sugiere una organización de proteínas estructurales más estable a altas

temperaturas.

Estudios previos han demostrado que la termoestabilidad de los fagos está influenciada principalmente por la compactación del ADN y la composición de la cápside viral. Se ha observado que fagos con una mayor densidad en el empaquetamiento de su genoma tienden a ser más resistentes a la desnaturalización térmica, lo que podría explicar la mayor estabilidad de FEX1 en comparación con FEX2 (100). En las imágenes TEM se puede apreciar que el tamaño aproximado de las cápsides de FEX1 y FEX2 es de 65nm y 100nm respectivamente (**Figura N°11, Anexo N°4**). Teniendo en cuenta el tamaño de los genomas se puede estimar que el grado de compactación de FEX1 es mayor ya que cuenta con un genoma de 113kb ocupando un espacio menor del disponible en FEX2, que cuenta con un genoma de 86kb. Investigaciones sobre fagos con morfología de tipo Siphovirus han identificado características estructurales que favorecen la estabilidad térmica, lo cual es consistente con la alta resistencia de FEX1 (101,102).

Desde una perspectiva biotecnológica, la termoestabilidad de los fagos tiene implicaciones clave en su aplicación en biocontrol y terapia. Fagos con alta resistencia térmica pueden ser empleados en entornos donde la temperatura varía significativamente, como en la industria alimentaria o en la desinfección de aguas (103). Además, se ha propuesto que la encapsulación en polímeros y nanopartículas mejora la estabilidad de los fagos y extiende su vida útil, lo que podría ser una estrategia viable para mejorar la termoestabilidad de FEX1 y FEX2 (104). Asimismo, estudios han señalado que la liofilización permite preservar la

infectividad de fagos a largo plazo sin comprometer su actividad biológica (104).

La interpretación de los perfiles de estabilidad frente a pH y temperatura debe situarse en los escenarios concretos de uso de la fagoterapia, tales como infecciones humanas, producción animal, alimentos y ambiente. Su implementación requiere que las condiciones fisicoquímicas y de proceso preserven la infectividad del preparado fágico durante su preparación, almacenamiento y administración. Además de las aplicaciones en dichos ámbitos, persisten limitaciones y desafíos vinculados a la implementación, incluida la seguridad del hospedero y las respuestas inmunes; por ello, la selección de matrices y vías de administración debe ir de la mano con la conservación de la actividad bajo los regímenes operativos previstos, evitando escenarios que ignoren estas restricciones (105).

La determinación del índice de multiplicidad de infección (MOI) óptimo indicó que FEX1 y FEX2 tienen máximos de producción a valores de 0.01 y 0.001, respectivamente (**Tabla N°2**). Este resultado destaca diferencias en la eficiencia de infección entre los dos fagos, donde FEX2 requiere una menor proporción de partículas virales para alcanzar niveles máximos de producción. Esto puede reflejar una interacción más eficiente entre FEX2 y su hospedero bacteriano, posiblemente relacionada con la afinidad de sus proteínas de unión a receptores (106). Es justamente esta diferencia en el nivel de eficiencia de interacción con su hospedero que hace al MOI un valor variable inclusive entre fagos del mismo género. Se ha visto que fagos del género *Tequintavirus*, tales como vB\_SabS\_Sds2 y vB\_EcoS\_GN06, tienen un MOI óptimo similar al fago FEX1 (97,107). Sin

embargo, hay casos como el de vB\_EcoS-P24 que tuvo como MOI óptimo el valor de 0.1 (108). De misma manera, los fagos phA11, phC11, phB7, y phC17 se propagaron de una manera óptima con un MOI de 1 (109). Este patrón variable también se ve en los fagos del género *Felixounavirus*. Investigaciones realizadas con los fagos SPJ41 y B\_kpnM\_17-11 evidenciaron un MOI óptimo de 0.001, igual al de FEX2 (91,110). Pero también se dan casos donde la variabilidad aumenta demasiado, como con SP3 y Pr103Blw cuyo MOI óptimo es de 0.0001 y 1000 respectivamente (111,112)

La curva de un solo paso reveló diferencias significativas en los parámetros de replicación de ambos fagos (**Figura N°14**). FEX1 presentó un tiempo de latencia de 15 minutos y un tamaño de explosión de 109 fagos por bacteria, mientras que FEX2 mostró un tiempo de latencia ligeramente mayor (20 minutos) y un tamaño de explosión considerablemente mayor (196 fagos por bacteria). Estas diferencias sugieren que FEX2 tiene una estrategia replicativa más eficiente, maximizando la producción de partículas virales a expensas de un tiempo de latencia más largo. Esto podría deberse a diferencias en la maquinaria de replicación viral o en la capacidad de FEX2 para secuestrar recursos celulares. Los bacteriófagos pueden codificar genes metabólicos auxiliares (AMG, por sus siglas en inglés), estos producen versiones modificadas de enzimas metabólicas que tienen la función de aumentar la producción de recursos necesarios para la producción de partículas virales (113,114). En el genoma de FEX1 se encontró genes que codifican a una dUTP nucleotidohidrolasa y timidilato sintasa, favoreciendo así la producción de nucleótidos de timidina en su hospedero. Esto podría ser una modulación del

metabolismo favorable para el proceso de infección fágica, ya que algunos fagos incorporan en su genoma genes que codifican a estos nucleótidos como parte de un mecanismo de protección frente a las endonucleasas bacterianas (115).

En el caso del genoma de FEX2, no solo se encontró un gen que codifica a una timidilato sintasa, sino también otros genes AMG. FEX2 cuenta con una pirofosfatasa MazG-like, enzima que se ha reportado juega un papel en la inhibición de la infección abortiva (Abi) en bacterias (116). Se le denomina Abi al evento de muerte programada en respuesta a una infección viral en bacterias, funcionando así como un mecanismo de defensa bacteriano que previene la propagación de las partículas virales. De la misma manera, se identificó un gen de glutaredoxina. Esta proteína sirve como agente reductor para las ribonucleótido-reductasas inducidas por fagos (117,118). Además de esta función como modulador metabólico, también se ha reportado que la glutaredoxina juega un papel fundamental en el inicio de la infección de fagos que tienen como material genético ARNbc (ARN bicatenario) (119). Igualmente, se detectó un gen que codifica a una nicotinamida fosforibosiltransferasa. Esta es metabólicamente relevante ya que favorece una vía de salvataje de dinucleótidos de nicotinamida ( $NAD^+$ ), lo que conlleva a condicionamiento por medio de ribosilación a proteínas involucradas en la expresión del genoma del fago (120). Generalmente en los fagos con morfología Myoviridae este gen se encuentra junto a otro que codifica a una nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (121). Sin embargo, en FEX2 solo se pudo encontrar la fosforibosiltransferasa.

La relación entre el MOI óptimo y los parámetros replicativos también merece atención. El MOI bajo de FEX2, combinado con su mayor tamaño de explosión, lo hace un candidato ideal para aplicaciones donde se requiere maximizar la producción de fagos con una mínima inversión inicial en partículas virales. Por otro lado, el MOI relativamente más alto de FEX1, junto con su menor tamaño de explosión, podría limitar su uso en ciertas aplicaciones industriales, aunque podría ser ventajoso en contextos donde se prefiera una infección más controlada (122). Sin embargo, si se desea contemplar un uso biotecnológico o biomédico es importante tomar en cuenta otros parámetros tales como tiempo de exposición, tasas de adsorción, qué tan rápido la bacteria objetivo se puede adaptar al fago e incluso la inmunogenicidad del fago (123-125).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que a MOI más bajos, la adsorción inicial es menos saturante y la población bacteriana persiste durante más tiempo como “sustrato” de replicación, lo que puede retrasar el inicio de la inhibición del crecimiento, pero favorecer la producción global de partículas virales. Inversamente, MOI más altos aceleran la supresión temprana del crecimiento, pero “consumen” más partículas en coinfecciones redundantes por célula (126). Adicionalmente, el acoplamiento clásico entre periodo de latencia y tamaño de explosión explica que un retraso moderado en la eclosión de FEX2 se traduzca en un mayor número de progenie por célula infectada, mientras que el perfil de FEX1 prioriza ciclos más rápidos con rendimientos menores. En este mismo marco, existe un umbral inferior de MOI dependiente de la densidad bacteriana por debajo del cual la amplificación deja de ser eficiente; por tanto, la elección de MOI en ensayos

y formulaciones debe mantenerse por encima de ese límite y alinearse con las densidades celulares empleadas, de modo que el patrón cinético propio de cada fago se exprese de forma reproducible.

Nuestros resultados aportan elementos directamente útiles para la selección de candidatos prometedores para realizar estudios enfocados a verificar su potencial terapéutico. La anotación genómica sin factores de virulencia ni genes de resistencia antimicrobiana se alinea con el principal criterio de exclusión señalado por consensos regulatorios para descartar fagos “no aptos” (127). El patrón de actividad por serovar que observamos es consistente porque el rango de hospedadores suele ser estrecho con frecuencia a nivel de cepa, por tanto, la elección terapéutica exige perfilar la susceptibilidad con ese nivel de resolución. Además, el uso de ensayos *in vitro* para cuantificar eficacia y cinética, como los que reportamos, constituye el paso operativo razonable para informar decisiones iniciales en un contexto donde escalar sistemáticamente a pruebas *in vivo* para cada fago es poco viable (127).

La caracterización genómica del fago FEX1 revela su pertenencia al género *Tequintavirus*, destacándose por su contenido GC del 38.9%, el cual es menor en comparación con el de su huésped bacteriano *Salmonella Typhimurium* (52.22%) (68). Este dato se alinea con lo reportado para el fago más cercano evolutivamente, denominado fago Shivani. Este fago es un miembro del cóctel terapéutico IntestiPhage, que ha demostrado eficacia en el tratamiento de infecciones gastroenterales (128). La inclusión de Shivani en IntestiPhage sirve como ejemplo del potencial de los fagos para aplicaciones terapéuticas y destaca la importancia de

continuar explorando fagos como FEX1. El análisis intergenómico realizado con VIRIDIC y las herramientas proteómicas posicionan a FEX1 como un nuevo miembro dentro del género *Tequintavirus*, con moderada conservación que oscila entre el 70% y 90% de identidad con el genoma de los fagos comparados (**Figura N°20 - N°22**). Los genes que presentan un 50% de identidad o menor codifican a proteínas hipotéticas y proteínas endonucleasas con motivos HNH. Esto último sugiere que FEX1 pueda estar empleando una estrategia de empaquetamiento del ADN en etapas tempranas de la maduración de la cápside (129).

En el genoma de FEX1 se pudieron detectar cuatro genes que codifican a ARN de transferencia (ARNt), esto está usualmente vinculado a un mecanismo de compensación de codones donde el fago incorpora en su genoma genes que codifican a los codones más usados en la expresión de sus genes (130). De misma manera, se pudieron detectar 4 regiones que provinieron de eventos de HGT. En el caso de FEX1, estos espacios se encuentran ocupados por genes del fago, genes AMG y por genes que codifican a proteínas hipotéticas. Además, se confirmó la ausencia de genes de resistencia antimicrobiana y virulencia en el genoma de FEX1.

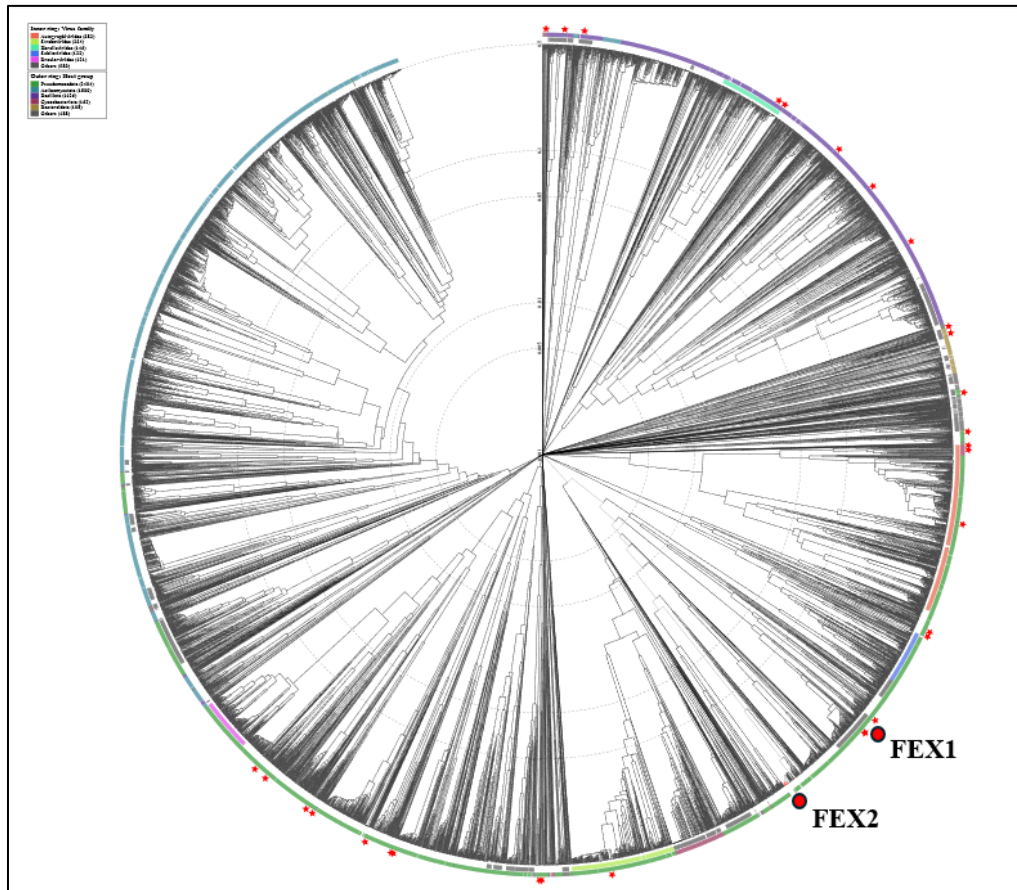
El análisis genómico de FEX2 indica su pertenencia al género *Felixounavirus* y su cercanía con el fago Mushroom (132). Los análisis de similaridad intergenómica, alineamiento genómico y comparación proteómica (**Figura N°23 – N°25**) mostraron que existe exactamente un 95% similaridad entre FEX2 y Mushroom, siendo este el valor de similaridad más alto aceptado para definir a una nueva especie establecido por el ICTV (32). Mientras que FEX2 tiene un tamaño de

genoma de 86,429 pb y codifica 17 ARNts, Mushroom cuenta con un genoma de 87,709 pb que incluye 23 ARNts, dos de ellos pseudo-ARNts (132). En comparación con FEX1, FEX2 cuenta con una cantidad mayor de ARNt que además se estar jugando un rol compensativo como fue descrito anteriormente es probable que estén ofreciendo otra ventaja a FEX2.

Al igual que FEX1, en FEX2 se pudieron detectar 4 regiones que provinieron de eventos de HGT. Curiosamente, todos los ARNt se encuentran dentro de una de estas regiones, lo que sugiere que fueron adquiridas en algún punto de su evolución por un evento de transducción. Los análisis bioinformáticos comprobaron la ausencia de genes de resistencia antimicrobiana y virulencia. La clasificación de FEX2 como una nueva especie también se ve apoyada por los datos de comparación proteómica. Aunque Mushroom y FEX2 comparten una alta identidad en varias proteínas estructurales clave, difieren significativamente en una endonucleasa con motivos HNH. Esta diferencia podría tener implicaciones en la eficacia del empaquetamiento genómico (127).

Actualmente la caracterización estructural de fagos se basa en el uso conjunto de bioinformática y la microscopía electrónica de transmisión. En particular, mediante Cryo-EM se pueden elucidar las estructuras con alta resolución (133,134). Como un primer avance en la elucidación de la estructura 3D, en el presente trabajo se optó por una asignación estructural de proteínas de los fagos y realizar un mapeo tomando como referencia estructuras previamente publicadas y elucidadas por Cryo-EM. En la **Figura N°40** se muestra un mapa filogenético de los fagos

conocidos que poseen material genético de tipo ADN bicatenario. En él se ha marcado con una estrella roja todos los fagos cuya estructura se halla completamente elucidada por medio de Cryo-EM según una revisión de la base de datos EMDB (135). En la misma figura se indica la ubicación de FEX1 y FEX2 en el mapa. De inmediato se puede notar que FEX1 cuenta con parientes filogenéticamente cercanos con estructura conocida, de los cuales se eligió al fago DT57C para la asignación estructural. Esta elección se respaldó en los resultados de alineamiento globales de las secuencias de proteínas estructurales de ambos fagos. Como se puede apreciar en la sección de resultados, a excepción de una proteína, todas las proteínas estructurales de FEX1 mantienen alta semejanza (>85% idénticas) con las de DT57C (**Figura N°38**). A su vez, los alineamientos estructurales obtuvieron valores de RMSD bajos cuando se compararon las estructuras predichas por Alphafold3 de FEX1 y las reales determinadas por Cryo-EM de DT57C. Estos resultados respaldan el uso de la estructura de DT57C como modelo para describir la estructura del fago FEX1. La ausencia de homología en la proteína lateral de la cola A (**Figura N°32**), podría sugerir que existen diferencias en el proceso mecánico de inyección del ADN entre los fagos (136-138).



**Figura N°41.** Mapa filogenético de los fagos con genoma ADNbc. Con estrella roja se marcaron los fagos con estructura conocida por medio de Cryo-EM. Con un círculo rojo se marcó la ubicación de FEX1 y FEX2.

Como se puede apreciar en la **Figura N°41**, el fago FEX2 no cuenta con fagos de estructura completa conocida cercanos filogenéticamente para emplearlos como referencia estructural. Sin embargo, se pudo encontrar una alternativa en el fago Sf14. Este fago presenta su estructura parcialmente elucidada, teniendo la estructura de su cápside elucidada por Cryo-EM. De misma manera que con FEX1, se eligió a Sf14 en base a la relación de homología que comparte la proteína mayor de la cápside con la de FEX2 (**Figura N°39**). El alineamiento estructural obtuvo un valor muy bajo de RMSD, sugiriendo que la estructura de la cápside de Sf14 puede representar a la cápside de FEX2 como se muestra en la **Figura N° 40**. Esto resalta la necesidad de realizar estudios futuros enfocados en elucidar por medio de Cryo-

EM, u otra técnica que provea de una alta resolución atómica la estructura de FEX2 ya que contribuiría a la obtención de un modelo estructural para fagos del género *Felixounavirus*.

## **IX. Limitaciones del estudio**

A pesar de los hallazgos relevantes obtenidos, el presente estudio presenta ciertas limitaciones que deben ser consideradas al interpretar los resultados. En primer lugar, si bien se logró una caracterización genómica y funcional de los fagos FEX1 y FEX2, la ausencia de estudios estructurales experimentales mediante Cryo-EM o técnicas de cristalografía limita la confirmación directa de las asignaciones estructurales propuestas. Las inferencias estructurales se basaron en análisis de homología y superposición con estructuras previamente elucidada, lo que, si bien aporta valor, no reemplaza la evidencia directa derivada de métodos de alta resolución.

Asimismo, la evaluación de la actividad lítica se realizó frente a un número limitado de cepas bacterianas, lo que restringe el entendimiento completo del espectro de hospederos y podría subestimar la amplitud o especificidad de estos fagos frente a otros serovares clínicamente relevantes. En el mismo sentido, no se realizaron pruebas de co-evolución ni de resistencia bacteriana emergente, lo cual hubiera permitido explorar el potencial de adaptación de los hospederos frente a la presión ejercida por los fagos.

Otra limitación relevante radica en que, aunque se emplearon herramientas bioinformáticas de amplio uso para la detección de genes de resistencia, virulencia y anti-CRISPR, es posible que algunos genes funcionales hayan pasado inadvertidos debido a la novedad o baja representación en las bases de datos de referencia. Esto puede afectar la interpretación completa del potencial

biotecnológico y de seguridad de los fagos analizados.

Finalmente, las condiciones experimentales de estabilidad frente a pH y temperatura se realizaron en sistemas controlados de laboratorio, los cuales no simulan completamente los escenarios complejos y variables a los que podrían enfrentarse los fagos en aplicaciones reales, como entornos gastrointestinales, matrices alimentarias o sistemas ambientales. Esta limitación subraya la necesidad de validar estos hallazgos en condiciones más representativas y funcionales, que incluyan ensayos in vivo o modelos más complejos de interacción fago-hospedero.

## X. Conclusiones

- FEX1 presentó un índice de multiplicidad de infección (MOI) óptimo de 0.01, mientras que FEX2 mostró un MOI más bajo (0.001), indicando que FEX2 requiere una menor cantidad de partículas virales para alcanzar niveles óptimos de propagación.
- La curva de un solo paso mostró que FEX2 tiene un mayor tamaño de explosión (196 fagos por bacteria) en comparación con FEX1 (109 fagos por bacteria), lo que sugiere una estrategia replicativa más eficiente.
- Ambos fagos son estables en rangos de pH entre 4 y 7, pero FEX2 mostró una tolerancia ligeramente mayor a pH extremos.
- La estabilidad térmica de los fagos evidenció que FEX1 mantiene su viabilidad a temperaturas elevadas con mayor eficiencia que FEX2, lo que podría estar relacionado con la compactación de su ADN y la composición de su cápside viral.
- FEX1 y FEX2 son bacteriófagos pertenecientes a los géneros *Tequintavirus* y *Felixounavirus*, respectivamente. Ambos fagos muestran diferencias genómicas y estructurales significativas que justifican su clasificación como nuevas especies: *Tequintavirus laureano* para FEX1 y *Felixounavirus revilla* para FEX2.
- Ambos fagos carecen de genes asociados con resistencia a antibióticos y factores de virulencia, posicionándolos como candidatos seguros para aplicaciones terapéuticas, especialmente en el contexto de infecciones bacterianas multirresistentes.
- FEX1 codifica genes metabólicos auxiliares como dUTP

nucleotidohidrolasa y timidilato sintasa, lo que sugiere una posible estrategia para aumentar la producción de nucleótidos de timidina en su hospedero.

- FEX2 presenta genes adicionales como la pirofosfatasa MazG-like, asociada con la inhibición de la infección abortiva (Abi), y una glutaredoxina que podría jugar un rol clave en la modulación metabólica del hospedero, y una gran cantidad de ARNt, que pueden estar ejerciendo un rol defensivo en el proceso de infección.
- FEX1 presentó una morfología de tipo Siphoviridae, mientras que FEX2 presentó una morfología de tipo Myoviridae en las imágenes obtenidas por TEM.
- La caracterización estructural basada en modelos de homología con fagos previamente estudiados por Cryo-EM permitió realizar inferencias sobre la arquitectura de FEX1 y FEX2.

## XI. Referencias

1. Calero-Cáceres W, Ye M, Balcázar JL. Bacteriophages as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 2019 Jul 1;27(7):570–7. DOI:10.1016/j.tim.2019.02.008
2. Van Cauwenberghe J, Simms EL. How might bacteriophages shape biological invasions? *MBio.* 2023 Sep 1;14(5). DOI:10.1128/MBIO.01886-23
3. Zuppi M, Hendrickson HL, O’Sullivan JM, Vatanen T. Phages in the gut ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jan 4;11. DOI:10.3389/fcimb.2021.822562
4. Gupta M, Anzelc M, Stetkevich S, Burkhart C. Bacteriophages: an alternative to combat antibiotic resistance? *J Drugs Dermatology.* 2022 Dec 1;21(12):1311–5. DOI:10.36849/JDD.6638
5. Wang CH, Hsieh YH, Powers ZM, Kao CY. Defeating antibiotic-resistant bacteria: exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 5;21(3):1061. DOI:10.3390/ijms21031061
6. João J, Lampreia J, Prazeres DMF, Azevedo AM. Manufacturing of bacteriophages for therapeutic applications. *Biotechnol Adv.* 2021 Jul;49:107758. DOI:10.1016/j.biotechadv.2021.107758
7. Harada LK, Silva EC, Campos WF, Del Fiol FS, Vila M, Dąbrowska K, et al. Biotechnological applications of bacteriophages: state of the art. *Microbiol Res.* 2018 Jul;212–213:38–58. DOI:10.1016/j.micres.2018.04.007

8. Sahu R, Singh AK, Kumar A, Singh K, Kumar P. Bacteriophages concept and applications: a review on phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2023 Aug;24(10):1245–64. DOI:10.2174/1389201024666221104142457
9. Zhang S, Li S, Gu W, Den Bakker H, Boxrud D, Taylor A, et al. Zoonotic source attribution of salmonella enterica serotype typhimurium using genomic surveillance data, united states. *Emerg Infect Dis*. 2019 Jan;25(1):82–91. DOI:10.3201/eid2501.180835
10. Lin JS, Tsen HY. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of salmonella typhimurium in stool and food samples. *J Food Prot*. 1999 Oct;62(10):1103–10. DOI:10.4315/0362-028X-62.10.1103
11. Muckey M, Huss AR, Jones C. Evaluation of liquid and dry chemical treatments to reduce salmonella typhimurium contamination on animal food manufacturing surfaces. *J Food Prot*. 2022 May;85(5):792–7. DOI:10.4315/JFP-21-240
12. Westrell T. Salmonella typhimurium: experiences from recent european outbreaks. *Eurosurveillance*. 2008 Oct 30;13(44). DOI:10.2807/ese.13.44.19019-en
13. Yildirim Z, Sakin T, Çoban F. Isolation of lytic bacteriophages infecting salmonella typhimurium and salmonella enteritidis. *Acta Biol Hung*. 2018 Sep;69(3):350–69. DOI:10.1556/018.68.2018.3.10
14. Jung L seung, Ding T, Ahn J. Evaluation of lytic bacteriophages for control of multidrug-resistant salmonella typhimurium. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017 Dec 22;16(1):66. DOI:10.1186/s12941-017-0237-6

15. Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect.* 1998 Jan;36(1):5–15. DOI:10.1016/S0163-4453(98)92874-2
16. Aranaga C, Pantoja LD, Martínez EA, Falco A. Phage therapy in the era of multidrug resistance in bacteria: a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 21;23(9):4577. DOI:10.3390/ijms23094577
17. Anyaegbunam NJ, Anekpo CC, Anyaegbunam ZKG, Doowuese Y, Chinaka CB, Odo OJ, et al. The resurgence of phage-based therapy in the era of increasing antibiotic resistance: from research progress to challenges and prospects. *Microbiol Res.* 2022 Nov;264:127155. DOI:10.1016/j.micres.2022.127155
18. Hatfull GF, Dedrick RM, Schooley RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections. *Annu Rev Med.* 2022 Jan 27;73(1):197–211. DOI:10.1146/annurev-med-080219-122208
19. Rupa R. Bacteriófagos nativos anti-salmonella persistentes en circulación en *cavia porcellus* (cuy). su potencial terapéutico contra la salmonelosis sistémica prevalente en criaderos comerciales. Tesis para optar el grado Maestro en ciencias con mención en Microbiol. 2016.
20. Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. a comprehensive review. *Int J Antimicrob Agents.* 2019 Jan;53(1):16–21. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004
21. Liu N, Lewis C, Zheng W, Fu ZQ. Phage cocktail therapy: multiple ways to suppress pathogenicity. *Trends Plant Sci.* 2020 Apr;25(4):315–7. DOI:10.1016/j.tplants.2020.01.013

22. Abdelghafar A, El-Ganiny A, Shaker G, Askoura M. A novel lytic phage exhibiting a remarkable in vivo therapeutic potential and higher antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2023 Oct 23;42(10):1207–34. DOI:10.1007/s10096-023-04649-y
23. Dallal MMS, Nikkhahi F, Alimohammadi M, Douraghi M, Rajabi Z, Foroushani AR, et al. Phage therapy as an approach to control salmonella enterica serotype enteritidis infection in mice. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52. DOI:10.1590/0037-8682-0290-2019
24. Islam MS, Zhou Y, Liang L, Nime I, Liu K, Yan T, et al. Application of a phage cocktail for control of salmonella in foods and reducing biofilms. *Viruses*. 2019 Sep 10;11(9):841. DOI:10.3390/v11090841
25. Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. Worldwide Epidemiology of Salmonella Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Appl Environ Microbiol* 85:e00591-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>
26. Teng L, Liao S, Zhou X, Jia C, Feng M, Pan H, Ma Z, Yue M. Prevalence and Genomic Investigation of Multidrug-Resistant Salmonella Isolates from Companion Animals in Hangzhou, China. *Antibiotics (Basel)*. 2022 May 5;11(5):625. doi: 10.3390/antibiotics11050625. PMID: 35625269; PMCID: PMC9137667.
27. Carhuaricra Huaman DE, Luna Espinoza LR, Rodríguez Cueva CL, Duran Gonzales CG, Rosadio Alcántara RH, Setubal JC, Maturrano Hernández L. Genomic Characterization of Salmonella Typhimurium Isolated from Guinea Pigs with Salmonellosis in Lima, Peru. *Microorganisms*. 2022;

- 10(9):1726. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091726>
28. Dedeo CL, Cingolani G, Teschke CM. Portal protein: the orchestrator of capsid assembly for the dsDNA tailed bacteriophages and herpesviruses. *Annu Rev Virol.* 2019 Sep 29;6(1):141–60. DOI:10.1146/annurev-virology-092818-015819
  29. González B, Li D, Li K, Wright ET, Hardies SC, Thomas JA, et al. Structural studies of the phage g tail demonstrate an atypical tail contraction. *Viruses.* 2021 Oct 18;13(10):2094. DOI:10.3390/v13102094
  30. Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC. The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature.* 2020 Jan 16;577(7790):327–36. DOI:10.1038/s41586-019-1894-8
  31. Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat Rev Microbiol.* 2020 Mar 3;18(3):125–38. DOI:10.1038/s41579-019-0311-5
  32. Turner D, Shkoporov AN, Lood C, Millard AD, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Arch Virol.* 2023 Feb 23;168(2):74. DOI:10.1007/s00705-022-05694-2
  33. Champagne-Jorgensen K, Luong T, Darby T, Roach DR. Immunogenicity of bacteriophages. *Trends Microbiol.* 2023 Oct;31(10):1058–71. DOI:10.1016/j.tim.2023.04.008
  34. Love MJ, Dobson RCJ, Billington C. Stemming the tide of antibiotic resistance by exploiting bacteriophages. *Biochem (Lond).* 2020 Dec

- 11;42(6):6–11. DOI:10.1042/BIO20200074
35. Gao Z, Feng Y. Bacteriophage strategies for overcoming host antiviral immunity. *Front Microbiol.* 2023 Jun 8;14. DOI:10.3389/fmicb.2023.1211793
36. Leprince A, Mahillon J. Phage adsorption to gram-positive bacteria. *Viruses.* 2023 Jan 10;15(1):196. DOI:10.3390/v15010196
37. Cahill J, Young R. Phage lysis: multiple genes for multiple barriers. In 2019. p. 33–70. DOI:10.1016/bs.aivir.2018.09.003
38. Elois MA, Silva R da, Pilati GVT, Rodríguez-Lázaro D, Fongaro G. Bacteriophages as biotechnological tools. *Viruses.* 2023 Jan 26;15(2):349. DOI:10.3390/v15020349
39. Silpe JE, Duddy OP, Johnson GE, Beggs GA, Hussain FA, Forsberg KJ, et al. Small protein modules dictate prophage fates during polylysogeny. *Nature.* 2023 Aug 17;620(7974):625–33. DOI:10.1038/s41586-023-06376-y
40. Campbell A. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet.* 2003 Jun 1;4(6):471–7. DOI:10.1038/nrg1089
41. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses.* 2021 Mar 18;13(3):506. DOI:10.3390/v13030506
42. Usman SS, Uba AI, Christina E. Bacteriophage genome engineering for phage therapy to combat bacterial antimicrobial resistance as an alternative to antibiotics. *Mol Biol Rep.* 2023 Aug 1;50(8):7055–67. DOI:10.1007/s11033-023-08557-4

43. Yuan X, Fan L, Jin H, Wu Q, Ding Y. Phage engineering using synthetic biology and artificial intelligence to enhance phage applications in food industry. *Curr Opin Food Sci.* 2025 Apr;62:101274. DOI:10.1016/j.cofs.2025.101274
44. van Charante F, Holtappels D, Blasdel B, Burrowes B. Isolation of bacteriophages. In: *Bacteriophages*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 1–32. DOI:10.1007/978-3-319-40598-8\_14-1
45. Jończyk-Matysiak E, Łodej N, Kula D, Owczarek B, Orwat F, Międzybrodzki R, et al. Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019 Aug 3;17(8):583–606. DOI:10.1080/14787210.2019.1646126
46. Kosznik-Kwaśnicka K, Topka G, Mantej J, Grabowski Ł, Necel A, Węgrzyn G, et al. Propagation, purification, and characterization of bacteriophages for phage therapy. In 2024. p. 357–400. DOI:10.1007/978-1-0716-3549-0\_22
47. Afgan E, Nekrutenko A, Grüning BA, Blankenberg D, Goecks J, Schatz MC, et al. The galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jul 5;50(W1):W345–51. DOI:10.1093/nar/gkac247
48. Trivedi UH, Căzard T, Bridgett S, Montazam A, Nichols J, Blaxter M, et al. Quality control of next-generation sequencing data without a reference. *Front Genet.* 2014 May 6;5. DOI:10.3389/fgene.2014.00111
49. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014 Aug 1;30(15):2114–20.

DOI:10.1093/bioinformatics/btu170

50. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012 May;19(5):455–77. DOI:10.1089/cmb.2012.0021
51. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013 Apr 15;29(8):1072–5. DOI:10.1093/bioinformatics/btt086
52. Ramsey J, Rasche H, Maughmer C, Criscione A, Mijalis E, Liu M, et al. Galaxy and apollo as a biologist-friendly interface for high-quality cooperative phage genome annotation. Pertea M, editor. *PLOS Comput Biol.* 2020 Nov 2;16(11):e1008214. DOI:10.1371/journal.pcbi.1008214
53. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, et al. AMRFinderPlus and the reference gene catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep.* 2021 Jun 16;11(1):12728. DOI:10.1038/s41598-021-91456-0
54. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D912–7. DOI:10.1093/nar/gkab1107
55. Millard A, Denise R, Lestido M, Thomas M, Turner D, Turner D, et al. TaxmyPHAGE: automated taxonomy of dsdna phage genomes at the genus and species level. 2024. DOI:10.1101/2024.08.09.606593
56. Shang J, Peng C, Liao H, Tang X, Sun Y. PhaBOX: a web server for

- identifying and characterizing phage contigs in metagenomic data. Forslund S, editor. *Bioinforma Adv.* 2023 Jan 5;3(1). DOI:10.1093/bioadv/vbad101
57. Moraru C, Varsani A, Kropinski AM. VIRIDIC—a novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses. *Viruses.* 2020 Nov 6;12(11):1268. DOI:10.3390/v12111268
58. Olson RD, Assaf R, Brettin T, Conrad N, Cucinell C, Davis JJ, et al. Introducing the bacterial and viral bioinformatics resource center (bv-brc): a resource combining patric, ird and vipr. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D678–89. DOI:10.1093/nar/gkac1003
59. Nishimura Y, Yoshida T, Kuronishi M, Uehara H, Ogata H, Goto S. ViPTree: the viral proteomic tree server. Valencia A, editor. *Bioinformatics.* 2017 Aug 1;33(15):2379–80. DOI:10.1093/bioinformatics/btx157
60. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D20–6. DOI:10.1093/nar/gkab1112
61. Madeira F, Madhusoodanan N, Lee J, Eusebi A, Niewielska A, Tivey ARN, et al. The EMBL-EBI job dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Res.* 2024 Jul 5;52(W1):W521–5. DOI:10.1093/nar/gkae241
62. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with alphafold 3. *Nature.* 2024 Jun 13;630(8016):493–500. DOI:10.1038/s41586-024-07487-w
63. The pymol molecular graphics systems. Version 3.1.3. Schrodinger, LCC.
64. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. fourth edition.

- Fourth Edit. World Health Organization, editor. 2020. 124 p.
65. Mazzali de Ija R. Nivel 2 de bioseguridad. biosecurity level-2. *Rev la Soc Venez Microbiol.* 2003;23(2).
66. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 6th Editio. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. 1–250 p.
67. Ayala R, Moiseenko A V., Chen TH, Kulikov EE, Golomidova AK, Orekhov PS, et al. Nearly complete structure of bacteriophage dt57c reveals architecture of head-to-tail interface and lateral tail fibers. *Nat Commun.* 2023 Dec 11;14(1):8205. DOI:10.1038/s41467-023-43824-9
68. Subramanian S, Parent KN, Doore SM. Ecology, structure, and evolution of shigella phages. *Annu Rev Virol.* 2020 Sep 29;7(1):121–41. DOI:10.1146/annurev-virology-010320-052547
69. Ackermann HW. 5500 phages examined in the electron microscope. *Arch Virol.* 2007 Feb 6;152(2):227–43. DOI:10.1007/s00705-006-0849-1
70. Karam JD, Miller ES. Bacteriophage t4 and its relatives. *Virol J.* 2010 Dec 28;7(1):293. DOI:10.1186/1743-422X-7-293
71. Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov V V., Arisaka F, Rossmann MG. Structure and morphogenesis of bacteriophage t4. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Nov 1;60(11):2356–70. DOI:10.1007/s00018-003-3072-1
72. Mesyanzhinov V V., Leiman PG, Kostyuchenko VA, Kurochkina LP, Miroshnikov KA, Sykilinda NN, et al. Molecular architecture of bacteriophage t4. *Biochem.* 2004 Nov;69(11):1190–202.

DOI:10.1007/s10541-005-0064-9

73. Scholl D. Phage tail-like bacteriocins. *Annu Rev Virol.* 2017 Sep 29;4(1):453–67. DOI:10.1146/annurev-virology-101416-041632
74. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012 Oct 3;7(10):1147–71. DOI:10.2217/fmb.12.97
75. Liu B, Guo Q, Li Z, Guo X, Liu X. Bacteriophage endolysin: a powerful weapon to control bacterial biofilms. *Protein J.* 2023 Oct 25;42(5):463–76. DOI:10.1007/s10930-023-10139-z
76. Abedon ST. Lysis from without. *Bacteriophage.* 2011 Jan 22;1(1):46–9. DOI:10.4161/bact.1.1.13980
77. He J, Wong CWY, Schultze DM, Wang S. Inactivation of salmonella enteritidis in liquid egg yolk and egg white using bacteriophage cocktails. *Curr Res Food Sci.* 2024;8:100703. DOI:10.1016/j.crfs.2024.100703
78. Wang IN, Smith DL, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol.* 2000 Oct;54(1):799–825. DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.799
79. Yu J, Zhang H, Ju Z, Huang J, Lin C, Wu J, et al. Increased mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes cause time-dependent development of phage resistance in salmonella. Shields RK, editor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2024 Feb 7;68(2). DOI:10.1128/aac.00594-23
80. Zeng Y, Li P, Liu S, Shen M, Liu Y, Zhou X. Salmonella enteritidis acquires phage resistance through a point mutation in rfbD but loses some of its environmental adaptability. *Vet Res.* 2024 Jul 5;55(1):85.

DOI:10.1186/s13567-024-01341-7

81. Richards AK, Hopkins BA, Shariat NW. Conserved crispr arrays in salmonella enterica serovar infantis can serve as qpcr targets to detect infantis in mixed serovar populations. *Lett Appl Microbiol.* 2020 Aug 13;71(2):138–45. DOI:10.1111/lam.13296
82. Gao R, Rae Frost J. Involvement of crispr-cas systems in salmonella immune response, genome editing, and pathogen typing in diagnosis and surveillance. In: *Salmonella - Perspectives for Low-Cost Prevention, Control and Treatment.* IntechOpen; 2024. DOI:10.5772/intechopen.109712
83. Shariat N, Timme RE, Pettengill JB, Barrangou R, Dudley EG. Characterization and evolution of salmonella crispr-cas systems. *Microbiology.* 2015 Feb 1;161(2):374–86. DOI:10.1099/mic.0.000005
84. Rabinowitz R, Offen D. Single-base resolution: increasing the specificity of the crispr-cas system in gene editing. *Mol Ther.* 2021 Mar;29(3):937–48. DOI:10.1016/j.ymthe.2020.11.009
85. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the crispr/cas bacterial immune system. *Nature.* 2013 Jan 17;493(7432):429–32. DOI:10.1038/nature11723
86. Davidson AR, Lu WT, Stanley SY, Wang J, Mejdani M, Trost CN, et al. Anti-crisprs: protein inhibitors of crispr-cas systems. *Annu Rev Biochem.* 2020 Jun 20;89(1):309–32. DOI:10.1146/annurev-biochem-011420-111224
87. Huang L, Yang B, Yi H, Asif A, Wang J, Lithgow T, et al. AcrDB: a

- database of anti-crispr operons in prokaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D622–9. DOI:10.1093/nar/gkaa857
88. Tao C, Yi Z, Zhang Y, Wang Y, Zhu H, Afayibo DJA, Li T, Tian M, Qi J, Ding C, Gao S, Wang S, Yu S. Characterization of a Broad-Host-Range Lytic Phage SHWT1 Against Multidrug-Resistant *Salmonella* and Evaluation of Its Therapeutic Efficacy *in vitro* and *in vivo*. *Front Vet Sci.* 2021 Jun 10;8:683853. DOI: 10.3389/fvets.2021.683853. PMID: 34179174; PMCID: PMC8222671.
89. Dąbrowska K. Phage therapy: what factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? systematic and critical review. *Med Res Rev.* 2019 Sep 19;39(5):2000–25. DOI:10.1002/med.21572
90. Bagińska N, Grygiel I, Orwat F, Harhala MA, Jędrusiak A, Gębarowska E, et al. Stability study in selected conditions and biofilm-reducing activity of phages active against drug-resistant *acinetobacter baumannii*. *Sci Rep.* 2024 Feb 21;14(1):4285. DOI:10.1038/s41598-024-54469-z
91. Lin Y, Liu Y, Zhang Y, Yuan W, Wang D, Zhu W. Biological and genomic characterization of a polyvalent bacteriophage (s19cd) strongly inhibiting *salmonella enterica* serovar *choleraesuis*. *Vet Microbiol.* 2023 Sep;284:109822. DOI:10.1016/j.vetmic.2023.109822
92. Pan H, Shu M, Li TJ, Shen KS, Zhao YY, Liao NB, et al. Isolation and characterization of two lytic phages against multidrug-resistant *salmonella* and their application as a cocktail for biocontrol in foods. *LWT.* 2023 Aug;185:115184. DOI:10.1016/j.lwt.2023.115184
93. Smith KR, Bumunang EW, Schlechte J, Waldner M, Anany H, Walker M,

- et al. The isolation and characterization of bacteriophages infecting avian pathogenic escherichia coli o1, o2 and o78 strains. *Viruses*. 2023 Oct 16;15(10):2095. DOI:10.3390/v15102095
94. Wang L, Tan Y, Liao Y, Li L, Han K, Bai H, et al. Isolation, characterization and whole genome analysis of an avian pathogenic escherichia coli phage vb\_ecos\_gn06. *Vet Sci*. 2022 Dec 5;9(12):675. DOI:10.3390/vetsci9120675
95. Sváb D, Falgenhauer L, Rohde M, Szabó J, Chakraborty T, Tóth I. Identification and characterization of t5-like bacteriophages representing two novel subgroups from food products. *Front Microbiol*. 2018 Feb 13;9. DOI:10.3389/fmicb.2018.00202
96. Wan X, Mahillon J, Yuan Z, Zhang G, Geng P, Hu X. Characterization of vb\_sals\_psa2, a t5-like demerecviridae bacteriophage, and its potential use in food matrices. *Virology*. 2024 Aug;596:110101. DOI:10.1016/j.virol.2024.110101
97. Li F, Li L, Na S, Zhao J, Liu F, Liu P, et al. Isolation, characterization and genomic analysis of a novel phage ime178 with lytic activity against escherichia coli. *Microb Pathog*. 2023 Jun;179:106099. DOI:10.1016/j.micpath.2023.106099
98. Kamiński B, Paczesny J. Bacteriophage challenges in industrial processes: a historical unveiling and future outlook. *Pathogens*. 2024 Feb 7;13(2):152. DOI:10.3390/pathogens13020152
99. Suh GA, Lodise TP, Tamma PD, Knisely JM, Alexander J, Aslam S, et al. Considerations for the use of phage therapy in clinical practice. *Antimicrob*

- Agents Chemother. 2022 Mar 15;66(3). DOI:10.1128/aac.02071-21
100. Sae-Ueng U, Bunsuwansakul C, Showpanish K, Phironrit N, Thadajarassiri J, Nehls C. Nanomechanical resilience and thermal stability of rsj2 phage. *Sci Rep.* 2024 Aug 20;14(1):19389. DOI:10.1038/s41598-024-70056-8
101. Fayed MS, Hakim TA, Zaki BM, Makky S, Abdelmoteleb M, Essam K, et al. Morphological, biological, and genomic characterization of klebsiella pneumoniae phage vb\_kpn\_zc2. *Virol J.* 2023 May 3;20(1):86. DOI:10.1186/s12985-023-02034-x
102. Xuan G, Kong J, Wang Y, Lin H, Wang J. Characterization of the newly isolated pseudomonas phage vb\_pae\_lc3i3. *Virus Res.* 2023 Jan;323:198978. DOI:10.1016/j.virusres.2022.198978
103. Briers Y, Miroshnikov K, Chertkov O, Nekrasov A, Mesyanzhinov V, Volckaert G, et al. The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage  $\phi$ kz. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Oct;374(4):747–51. DOI:10.1016/j.bbrc.2008.07.102
104. Stone NP, Demo G, Agnello E, Kelch BA. Principles for enhancing virus capsid capacity and stability from a thermophilic virus capsid structure. *Nat Commun.* 2019 Oct 2;10(1). DOI:10.1038/s41467-019-12341-z
105. Fathima B, Archer AC. Bacteriophage therapy: recent developments and applications of a renaissance weapon. *Res Microbiol.* 2021 Sep-Oct;172(6):103863. DOI: 10.1016/j.resmic.2021.103863. Epub 2021 Jul 19. PMID: 34293451.

106. Jia HJ, Jia PP, Yin S, Bu LK, Yang G, Pei DS. Engineering bacteriophages for enhanced host range and efficacy: insights from bacteriophage-bacteria interactions. *Front Microbiol.* 2023 May 31;14. DOI:10.3389/fmicb.2023.1172635
107. Liu W, Han L, Song P, Sun H, Zhang C, Zou L, et al. Complete genome sequencing of a tequintavirus bacteriophage with a broad host range against salmonella abortus equi isolates from donkeys. *Front Microbiol.* 2022 Aug 16;13. DOI:10.3389/fmicb.2022.938616
108. Yildirim Z, Sakin T, Akçelik M, Akçelik N. Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic escherichia coli o157:h7. *Food Sci Technol Int.* 2021 Jan 14;27(1):56–72. DOI:10.1177/1082013220929836
109. Ribeiro JM, Pereira GN, Durli Junior I, Teixeira GM, Bertozzi MM, Verri WA, et al. Comparative analysis of effectiveness for phage cocktail development against multiple salmonella serovars and its biofilm control activity. *Sci Rep.* 2023 Aug 11;13(1):13054. DOI:10.1038/s41598-023-40228-z
110. Bai J, Zhang F, Liang S, Chen Q, Wang W, Wang Y, et al. Isolation and characterization of vb\_kpnm\_17-11, a novel phage efficient against carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jul 5;12. DOI:10.3389/fcimb.2022.897531
111. Sritha KS, Augustine J, Bhat SG. Draft genome sequence data of t-5 like salmonella bacteriophage  $\phi$ sp3 with demonstrated therapeutic potential. *Data Br.* 2019 Dec;27:104606. DOI:10.1016/j.dib.2019.104606

112. Zhang Y, Liao YT, Salvador A, Lavenburg VM, Wu VCH. Characterization of two new shiga toxin-producing escherichia coli o103-infecting phages isolated from an organic farm. *Microorganisms*. 2021 Jul 17;9(7):1527. DOI:10.3390/microorganisms9071527
113. Warwick-Dugdale J, Buchholz HH, Allen MJ, Temperton B. Host-hijacking and planktonic piracy: how phages command the microbial high seas. *Virology*. 2019 Dec 1;16(1):15. DOI:10.1186/s12985-019-1120-1
114. Luo XQ, Wang P, Li JL, Ahmad M, Duan L, Yin LZ, et al. Viral community-wide auxiliary metabolic genes differ by lifestyles, habitats, and hosts. *Microbiome*. 2022 Nov 5;10(1):190. DOI:10.1186/s40168-022-01384-y
115. Lee YJ, Dai N, Walsh SE, Müller S, Fraser ME, Kauffman KM, et al. Identification and biosynthesis of thymidine hypermodifications in the genomic dna of widespread bacterial viruses. *Proc Natl Acad Sci*. 2018 Apr 3;115(14). DOI:10.1073/pnas.1714812115
116. Ho P, Chen Y, Biswas S, Canfield E, Abdolvahabi A, Feldman DE. Bacteriophage antidefense genes that neutralize tir and sting immune responses. *Cell Rep*. 2023 Apr;42(4):112305. DOI:10.1016/j.celrep.2023.112305
117. Eklund H, Ingelman M, Söderberg BO, Uhlin T, Nordlund P, Nikkola M, et al. Structure of oxidized bacteriophage t4 glutaredoxin (thioredoxin). *J Mol Biol*. 1992 Nov;228(2):596–618. DOI:10.1016/0022-2836(92)90844-A
118. Nikkola M, Gleason FK, Eklund H. Reduction of mutant phage t4

- glutaredoxins by escherichia coli thioredoxin reductase. *J Biol Chem.* 1993 Feb 25;268(6):3845–9.
119. Qiao J, Qiao X, Sun Y, Mindich L. Role of host protein glutaredoxin 3 in the control of transcription during bacteriophage  $\phi$ 2954 infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 Mar 30;107(13):6000–4. DOI:10.1073/pnas.1000383107
120. Lee JY, Li Z, Miller ES. Vibrio phage kvp40 encodes a functional nad + salvage pathway. Henkin TM, editor. *J Bacteriol.* 2017 May;199(9). DOI:10.1128/JB.00855-16
121. Miller ES, Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Durkin AS, Ciecko A, et al. Complete genome sequence of the broad-host-range vibriophage kvp40: comparative genomics of a t4-related bacteriophage. *J Bacteriol.* 2003 Sep;185(17):5220–33. DOI:10.1128/JB.185.17.5220-5233.2003
122. Rogovski P, Cadamuro RD, da Silva R, de Souza EB, Bonatto C, Viancelli A, et al. Uses of bacteriophages as bacterial control tools and environmental safety indicators. *Front Microbiol.* 2021 Nov 30;12. DOI:10.3389/fmicb.2021.793135
123. Międzybrodzki R, Kasprzak H, Letkiewicz S, Rogóż P, Żaczek M, Thomas J, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic obstacles for phage therapy from the perspective of clinical practice. *Clin Infect Dis.* 2023 Nov 2;77(Supplement\_5):S395–400. DOI:10.1093/cid/ciad516
124. Abedon ST. Phage therapy dosing: the problem(s) with multiplicity of infection (moi). *Bacteriophage.* 2016 Jul 2;6(3):e1220348. DOI:10.1080/21597081.2016.1220348

125. Berkson JD, Wate CE, Allen GB, Schubert AM, Dunbar KE, Coryell MP, et al. Phage-specific immunity impairs efficacy of bacteriophage targeting vancomycin resistant enterococcus in a murine model. *Nat Commun.* 2024 Apr 6;15(1):2993. DOI:10.1038/s41467-024-47192-w
126. Kim SG, Kwon J, Giri SS, Yun S, Kim HJ, Kim SW, Kang JW, Lee SB, Jung WJ, Park SC. Strategy for mass production of lytic *Staphylococcus aureus* bacteriophage pSa-3: contribution of multiplicity of infection and response surface methodology. *Microb Cell Fact.* 2021 Mar 2;20(1):56. DOI: 10.1186/s12934-021-01549-8. PMID: 33653327; PMCID: PMC7923500.
127. Cook, B.W.M., Hynes, A.P. Re-evaluating what makes a phage unsuitable for therapy. *npj Antimicrob Resist* 3, 45 (2025). DOI: <https://doi.org/10.1038/s44259-025-00117-z>
128. Piya D, Xie Y, Hernandez Morales AC, Kutty Everett GF. Complete genome sequence of salmonella enterica serovar typhimurium siphophage shivani. *Genome Announc.* 2015 Feb 26;3(1). DOI:10.1128/genomeA.01443-14
129. Kala S, Cumby N, Sadowski PD, Hyder BZ, Kanelis V, Davidson AR, et al. HNH proteins are a widespread component of phage dna packaging machines. *Proc Natl Acad Sci.* 2014 Apr 22;111(16):6022–7. DOI:10.1073/pnas.1320952111
130. Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E. Causes for the intriguing presence of trnas in phages. *Genome Res.* 2007 Oct;17(10):1486–95. DOI:10.1101/gr.6649807

131. Dutilh BE, Varsani A, Tong Y, Simmonds P, Sabanadzovic S, Rubino L, et al. Perspective on taxonomic classification of uncultivated viruses. *Curr Opin Virol.* 2021 Dec;51:207–15. DOI:10.1016/j.coviro.2021.10.011
132. Tolen TN, Xie Y, Hernandez AC, Kutty Everett GF. Complete genome sequence of salmonella enterica serovar typhimurium myophage mushroom. *Genome Announc.* 2015 Apr 30;3(2). DOI:10.1128/genomeA.00154-15
133. Iglesias SM, Hou CFD, Reid J, Schauer E, Geier R, Soriaga A, et al. Cryo-em analysis of pseudomonas phage pa193 structural components. *Commun Biol.* 2024 Oct 6;7(1):1275. DOI:10.1038/s42003-024-06985-x
134. Sonani RR, Esteves NC, Scharf BE, Egelman EH. Cryo-em structure of flagellotropic bacteriophage chi. *Structure.* 2024 Jul;32(7):856-865.e3. DOI:10.1016/j.str.2024.03.011
135. Turner J, Abbott S, Fonseca N, Pye R, Carrijo L, Duraisamy AK, et al. EMDB—the electron microscopy data bank. *Nucleic Acids Res.* 2024 Jan 5;52(D1):D456–65. DOI:10.1093/nar/gkad1019
136. Rossmann MG, Mesyanzhinov V V, Arisaka F, Leiman PG. The bacteriophage t4 dna injection machine. *Curr Opin Struct Biol.* 2004 Apr;14(2):171–80. DOI:10.1016/j.sbi.2004.02.001
137. Johnson JE, Chiu W. DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr Opin Struct Biol.* 2007 Apr;17(2):237–43. DOI:10.1016/j.sbi.2007.03.011
138. Zhao H, Speir JA, Matsui T, Lin Z, Liang L, Lynn AY, et al.

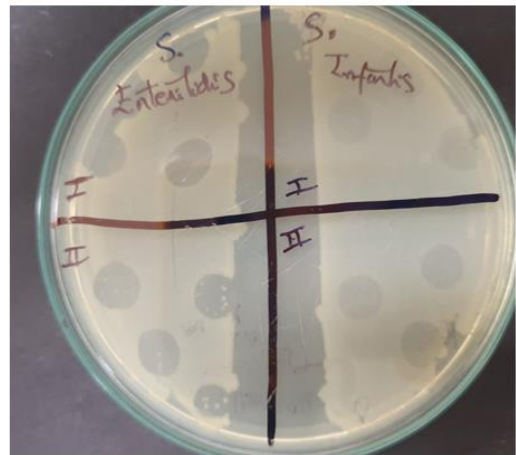
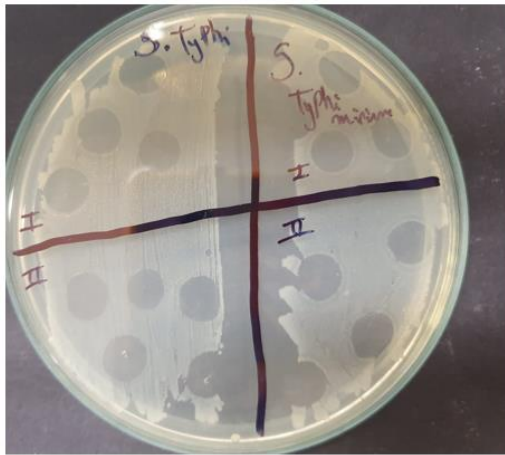
Structure of a bacterial virus dna-injection protein complex reveals a decameric assembly with a constricted molecular channel. Schuch R, editor.

PLoS One. 2016 Feb 16;11(2):e0149337.

DOI:10.1371/journal.pone.0149337

## XII. Anexos

**Anexo N°1.** Spot-test de los fagos FEX1 y FEX2 contra las cepas: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella infantis*.







**Anexo N°4.** Imagen de TEM del fago FEX1 a una extremadamente alta concentración ( $2.86 \times 10^{19}$  PFU/mL).

