



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Carmen Pilar Garrido Pérez

**DETECCIÓN RÁPIDA DE BIOFILMS DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES EN SUPERFICIES MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ADN**

Traballo Fin de Grao

Xuño 2025

Índice

Índice de tablas.....	2
Índice de figuras.....	3
Resumen.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Abreviaturas.....	7
1. Introducción.....	8
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
1.2 Técnicas de diagnóstico.....	10
2. Objetivos.....	13
3. Materiales y métodos.....	14
3.1. Cepas bacterianas.....	14
3.2. Formación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	14
3.2.1. Preparación de medios de cultivo.....	14
3.2.2. Formación de biofilms monoespecie.....	14
3.2.3. Formación de biofilms multiespecie.....	16
3.3. Métodos para la recuperación óptima de células de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> ..	17
3.3.1. Preparación de disoluciones.....	17
3.3.2. Recuperación de células de biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	18
3.3.3. Determinación de las células adheridas en biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	19
3.4. Visualización de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> mediante microscopía confocal.....	19
3.5. Extracción de ADN.....	20
3.6. Pureza y concentración del ADN.....	21
3.6.1. Purificación de los extractos de ADN.....	21
3.7. Desarrollo de LAMP.....	21
3.7.1. Mezcla de reacción.....	21
3.7.2. LAMP en tiempo real.....	23
3.7.3. LAMP colorimétrico.....	23
3.8. Desarrollo de la qPCR.....	24
4. Resultados y discusión.....	25
4.1 Evaluación de la recuperación de células de biofilms de <i>L. monocytogenes</i>	25
4.1.1 Concentración del inóculo y de las células adheridas.....	25
4.1.2 Análisis de microscopía confocal.....	25
4.1.3 Pureza y concentración del ADN.....	26
4.1.4 Resultados de LAMP.....	28
4.2 Estudio del límite de detección del método LAMP desarrollado.....	31
4.2.1 Concentración del inóculo y de las células adheridas.....	31
4.2.2 Concentración y pureza de ADN.....	32
4.2.3 Resultados de LAMP.....	33
4.2.4 Resultados de qPCR.....	35
5. Conclusiones.....	37
6. Bibliografía.....	38

Índice de tablas

Tabla 1. Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de <i>L. monocytogenes</i>	8
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas.....	14
Tabla 3. Secuencia de los primers diseñados para el gen <i>hly</i>	22
Tabla 4. Componentes y volúmenes de mezcla de reacción para LAMP	22
Tabla 5. Secuencia de los primers diseñados para el gen <i>hly</i>	24
Tabla 6. Componentes y volúmenes de mezcla de reacción para PCR.....	24
Tabla 7. Concentración del inóculo inicial y de las células adheridas de los biofilms monoespecie y mixto a concentración 4 log UFC/mL	25
Tabla 8. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de <i>L. monocytogenes</i> mediante LAMP a tiempo real de las muestras de biofilms monoespecie y mixtos.....	28
Tabla 9. Concentración del inóculo inicial y de las células adheridas de los biofilms mixtos a concentraciones 1 log, 2 log y 4 log UFC/mL	32
Tabla 10. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de <i>L. monocytogenes</i> mediante LAMP a tiempo real de las muestras de biofilms mixtos formados a concentraciones iniciales de 1 log, 2 log y 4 log UFC/mL.	34
Tabla 11. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de <i>L. monocytogenes</i> mediante qPCR de biofilms mixtos formados a concentraciones iniciales de 1 log, 2 log y 4 log UFC/mL.	36

Índice de figuras

Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido de un biofilm de <i>L. monocytogenes</i> L1.D1 formado durante 72 horas a 25 °C.....	8
Figura 2. Esquema del proceso de amplificación de ADN de LAMP. Tomada de Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Thermo Fisher Scientific, US.....	11
Figura 3. Esquema de la formación del biofilm mono especie de <i>L. monocytogenes</i> . Imagen creada con BioRender.com.	15
Figura 4. Imagen tomada durante el proceso de recuperación de células de <i>L. monocytogenes</i> de biofilms formados en la superficie de cupones de acero inoxidable.....	18
Figura 5. Esquema del procedimiento de extracción de ADN. Imagen creada con BioRender.com.....	20
Figura 6. Imágenes de microscopía confocal de biofilms mono especie de <i>L. monocytogenes</i> IIM-L1D1 antes (a) y después de realizar la recuperación de células con PBS (b), LPT (c) y LPT-PRN (d). Células verdes: membrana intacta; células rojas, membrana dañada.	26
Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de biofilms multiespecie de <i>L. monocytogenes</i> IIM-L1D1 antes (a) y después de realizar la recuperación de células con PBS (b), LPT (c) y LPT-PRN (d). Células verdes, membrana intacta; células rojas: membrana dañada.	26
Figura 8. Concentración de ADN extraído (ng/μL) de los biofilms mono especie (a) y multiespecie (b) de acuerdo a la medición del fluorímetro Qubit™. Se observan los resultados de las muestras sin purificar a tiempo 0 (azul) y tras el enriquecimiento de 3h (rojo) y de las muestras purificadas a tiempo 0 (verde) y tras el enriquecimiento (morado).	27
Figura 9. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en biofilms por LAMP. Se muestran los resultados obtenidos en muestras de biofilms mono especie sin purificar (azul) y purificadas (rojo) y en muestras de biofilms mixtos sin purificar (verde) y purificadas (morado), con enriquecimiento (t3) y sin enriquecimiento previo (t0).	28
Figura 10. Imágenes de LAMP colorimétrico de las muestras del biofilm mono especie sin purificar (a) y purificadas (b) y del biofilm multiespecie sin purificar (c) y purificadas (d). Gráficos con los resultados de la medición del valor R obtenidos con la aplicación Color Picker 7.9.0 de biofilms mono especie (e) y mixtos (f).....	30
Figura 11. Resultados de la cuantificación del ADN extraído obtenidos con el fluorímetro Qubit™. Se observan los resultados de las muestras sin purificar a tiempo 0 (azul) y tras el enriquecimiento de 3h (rojo) y de las muestras purificadas a tiempo 0 (verde) y tras el enriquecimiento (morado).	33
Figura 12. Ciclos de amplificación de LAMP a tiempo real. Se observan los resultados de las muestras sin purificar (azul) y de las muestras purificadas (morado) antes (t0) y después (t3) del enriquecimiento de 3 horas.	34
Figura 13. Imágenes de LAMP colorimétrico de las muestras de biofilms mixtos a concentraciones iniciales de 1 log (a), 2 log (b) y 4 log UFC/mL (c), la primera fila corresponde a las muestras sin purificar y la segunda a las muestras purificadas. Gráfico con los resultados de la medición del valor R obtenidos con la aplicación Color Picker 7.9.0. (d).	35
Figura 14. Ciclos de amplificación de qPCR necesarios para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en biofilms mixtos. Se observan resultados obtenidos utilizando ADN sin purificar (azul) y purificado (morado) antes (t0) y después (t3) del enriquecimiento de 3 horas.	36

Resumen

Listeria monocytogenes es un patógeno de transmisión alimentaria de alta relevancia a nivel global por su elevada tasa de mortalidad. Su gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas y su capacidad para formar biofilms aumentan su resistencia y dificultan su eliminación. Las técnicas de diagnóstico tradicionales, basadas en el cultivo bacteriano, requieren de varios días para determinar la muestra como positiva. Para solventar estos problemas, en los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares más rápidas y sensibles como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y el LAMP (amplificación isotérmica de ADN mediada por bucle). En este trabajo se desarrolló un método rápido de detección de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable mediante LAMP. Para ello se evaluó la recuperación de células de los biofilms con distintos tratamientos (PBS, LPT y LPT-PRN), el impacto del enriquecimiento de las muestras en TSB durante 3 horas y la purificación del ADN previo a la amplificación. Los resultados demostraron que el método LAMP, tanto en su formato a tiempo real como colorimétrico, permite detectar *L. monocytogenes* en biofilms mono especie y mixtos a concentraciones superiores a $3,9 \log \text{ UFC/cm}^2$, con mejoras notables tras un enriquecimiento de 3 horas y la purificación del ADN de las muestras. Este formato colorimétrico puede llevarse a cabo utilizando únicamente un termobloque, sin necesidad de equipos especializados, lo que lo convierte en una herramienta accesible, rápida y robusta para su aplicación en entornos industriales.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, biofilm, LAMP, análisis de superficie, detección a simple vista.

Resumo

Listeria monocytogenes é un patóxeno de transmisión alimentaria de alta relevancia a nivel global pola súa elevada taxa de mortalidade. A súa gran capacidade de adaptación a condicións ambientais adversas e a súa capacidade para formar biofilms aumentan a súa resistencia e dificultan a súa eliminación. As técnicas de diagnóstico tradicionais, baseadas no cultivo bacteriano, requiren de varios días para determinar a mostra como positiva. Para solventar estes problemas, nos últimos anos desenvóléronse técnicas moleculares máis rápidas e sensibles como a PCR (reacción en cadea da polimerasa) e o LAMP (amplificación isotérmica de ADN mediada por bucle). Neste traballo desenvólvese un método rápido de detección de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable mediante LAMP. Para isto evaluouse a recuperación de células dos biofilms con distintos tratamentos (PBS, LPT e LPT-PRN), o impacto do enriquecemento das mostras en TSB durante 3 horas e a purificación do ADN. Os resultados demostraron que o método LAMP, tanto no formato a tempo real como colorimétrico, permite detectar *L. monocytogenes* en biofilms monoespecie e mixtos a concentracións superiores a $3,9 \log \text{ UFC/cm}^2$, con melloras notables tras un enriquecemento de 3 horas e a purificación do ADN das mostras. Este formato colorimétrico pode levarse a cabo empregando unicamente un termobloque, sen necesidade de equipos especializados, o que o converte nunha ferramenta accesible, rápida e robusta para a súa aplicación en entornos industriais.

Palabras chave: *Listeria monocytogenes*, biofilm, LAMP, análise de superficie, detección a simple vista.

Abstract

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen of high global relevance due to its high mortality rate. Its great ability to adapt to adverse environmental conditions and its ability to form biofilms increase its resistance and make its removal difficult. Traditional diagnostic techniques, based on bacterial culture, require several days to determine the sample as positive. To solve these problems, faster and more sensitive molecular techniques such as PCR (polymerase chain reaction) and LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) have been developed in recent years. In this study, a rapid method of detection of *L. monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces by LAMP was developed. To this end, the recovery of cells from the biofilms with different treatments (PBS, LPT and LPT-PRN), the impact of enriching the samples in TSB for 3 hours and DNA purification were evaluated. The results showed that the LAMP method, both in its real-time and colorimetric formats, allows the detection of *L. monocytogenes* in single-species and mixed biofilms at concentrations above $\log 3.9$ CFU/cm², with notable improvements after 3-hours enrichment and DNA purification of the samples. This colorimetric format can be carried out using only a thermoblock, without the need for specialized equipment, which makes it an accessible, fast and robust tool for application in industrial environments.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilm, LAMP, surface analysis, naked-eye detection.

Abreviaturas

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

ALOA: Agar para *Listeria* de acuerdo con Ottaviani y Agosti.

BIP: Backward Inner Primer.

B3: Backward Outer Primer.

Cq: Ciclo de amplificación.

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FIP: Forward Inner Primer.

F3: Forward Outer Primer.

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle.

LB: Loop Backward Primer.

LF: Loop Forward Primer.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PRN: Pronasa.

RTE: Ready-to-eat.

T_m: Temperatura de fusión.

TSA: Agar Soja y Triptona.

TSB: Caldo Soja y Triptona.

UFC: Unidad Formadora de Colonia.

UV: Ultravioleta.

WHO: World Health Organization.

1. Introducción

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno humano de transmisión alimentaria de gran relevancia por su alta mortalidad, de entre el 20% y el 30% de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. Se trata de una bacteria con forma de bacilo Gram positiva, anaerobia facultativa que se adapta fácilmente a ambientes fluctuantes y sobrevive a condiciones adversas que incluyen temperaturas frías, acidez y altas concentraciones de sal (Koopmans *et al.*, 2022). Estas características de resistencia justifican que esté ampliamente distribuida tanto en el medio ambiente como en los lugares de elaboración de alimentos (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, AESAN, 2024).

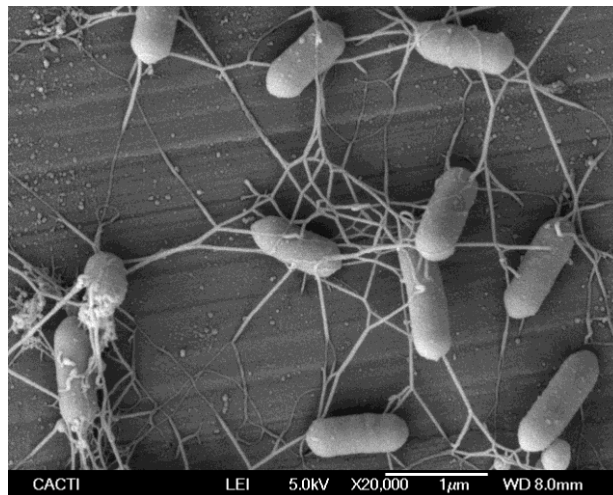


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido de un biofilm de *L. monocytogenes* L1.D1 formado durante 72 horas a 25 °C.

Tabla 1. Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes*.

Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir, pero no crecer
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1,5	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2	7,0	9,5	3,3 a 4,2
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	16	≥20

Adaptada de López *et al.*, (2011).

L. monocytogenes es el agente etiológico de la listeriosis, infección asociada en los casos más graves con enfermedades como la septicemia, infecciones del sistema nervioso central (SNC), infecciones focales graves y resultados materno-neonatales adversos como pueden ser el aborto y la muerte fetal (Huang *et al.*, 2023), especialmente en el grupo de riesgo compuesto por embarazadas, ancianos y pacientes inmunodeprimidos (World Health Organization: WHO, 2018).

La listeriosis es la quinta zoonosis de transmisión alimentaria más común, durante el año 2022 se confirmaron 2 770 casos en la Unión Europea, de los cuales 437 fueron en España, una de las tasas más altas de acuerdo con el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC). La principal vía de transmisión está asociada con los alimentos Ready-To-Eat (RTE), categoría que incluye cualquier alimento que normalmente se consume en su estado crudo o que está preparado en una forma en la que se consume sin más procesamiento, principalmente productos de origen cárnico, productos lácteos elaborados con leche cruda y productos pesqueros (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2022). En este sentido, la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria identifica los fenómenos de contaminación cruzada desde superficies que tienen lugar antes y después del procesado en el caso de alimentos no empaquetados, como la vía principal de contaminación de estos alimentos (EFSA, 2019).

L. monocytogenes persiste en superficies de la industria alimentaria asociada a otras especies bacterianas formando biofilms, comunidades complejas y diversas de bacterias embebidas en una matriz extracelular (ME) y adheridas a una superficie sólida (Chen *et al.*, 2023). Estos biofilms son realmente estructuras de resistencia, ya que protegen a los microorganismos de agentes adversos, incrementan la disponibilidad y la eficiencia en la transmisión de nutrientes y facilitan la transferencia de material genético, lo que incrementa sus capacidades de supervivencia (Rodríguez *et al.*, 2010).

L. monocytogenes se considera un problema de salud pública y su control debe de hacerse efectivo en todas las fases de la cadena alimentaria, para cumplir de este modo los límites microbiológicos establecidos en alimentos, actualmente más restrictivos de acuerdo con el nuevo reglamento (UE 2024/2895) publicado recientemente y que establece un límite máximo de 100 UFC/g a lo largo del período de comercialización. Es, pues, necesario el desarrollo de métodos rápidos y fáciles de utilizar por los

operadores, que permitan monitorizar la presencia de *L. monocytogenes* a lo largo de la cadena de valor, complementado los métodos oficiales y contribuyendo al cumplimiento de los objetivos exigidos por la legislación en cada tipo de productos.

1.2 Técnicas de diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico de referencia para detección de *L. monocytogenes* se basan principalmente en métodos de microbiología clásica, basados en cultivo, combinados con pruebas bioquímicas para su confirmación.

El método de referencia se basa en la norma EN/ISO 11290-1:2017, denominado “Microbiología de la cadena alimentaria, método de detección horizontal y enumeración para *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp.”. De acuerdo con este método, la detección de *L. monocytogenes* requiere cuatro etapas: preenriquecimiento, enriquecimiento, siembra en medios selectivos e identificación y confirmación mediante pruebas morfológicas y bioquímicas apropiadas. Este proceso consume de 5 a 7 días.

Las técnicas de cultivo convencionales utilizadas en la detección de patógenos de transmisión alimentaria son tediosas y pueden generar falsos positivos en los resultados. Como alternativa, se han desarrollado técnicas rápidas de detección basadas en métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), ambas más fiables y sensibles que los métodos en placa basados en técnicas de cultivo diferenciales o selectivas (Jadhav *et al.*, 2012).

Sin embargo, dentro de las técnicas moleculares, las basadas en PCR presentan algunos inconvenientes, como la necesidad de uso de equipos sofisticados o la ocurrencia del apareamiento no específico de los cebadores y la consecuente aparición de falsos positivos que retrasan y dificultan la obtención de un resultado fiable. Como consecuencia, se han desarrollado diferentes métodos de amplificación isotérmica que permiten la amplificación de ácidos nucleicos sin cambios de temperatura con dispositivos simples como el LAMP (Park, 2022). Este método, que ofrece claras ventajas como la simplicidad y facilidad de manejo, elimina la necesidad de equipos sofisticados para el termociclado, gracias al uso de la polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*), que tiene propiedades de desplazamiento de hebra, por lo que no es necesaria la desnaturalización por calor del ADN molde previa a la reacción (Abdul-Ghani *et al.*, 2012).

El funcionamiento del LAMP se ilustra en la Figura 2. LAMP utiliza un conjunto de cuatro cebadores, compuesto por dos cebadores externos (F3 y B3) y dos cebadores internos (cebador interno directo (FIP) y cebador directo inverso (BIP)); adicionalmente se puede utilizar un par más de cebadores, cebadores de bucle (bucle hacia delante (LF) y bucle hacia atrás (LB)), para aumentar la velocidad de reacción (Wong *et al.*, 2017). En los pasos iniciales de la reacción de LAMP, se utilizan los cuatro cebadores, pero durante la reacción cíclica solo se emplean los cebadores internos para la síntesis de ADN (Notomi *et al.*, 2000).

El cebador FIP consta de una región F2 en el extremo 3' y una región F1c en el extremo 5', mientras que el cebador BIP contiene una región B2 en el extremo 3' y una región B1c en el extremo 5'. El cebador F3 consta de una región F3 complementaria a la región F3c de la secuencia plantilla, mientras que el cebador B3 tiene una región B3 complementaria a la región B3c.

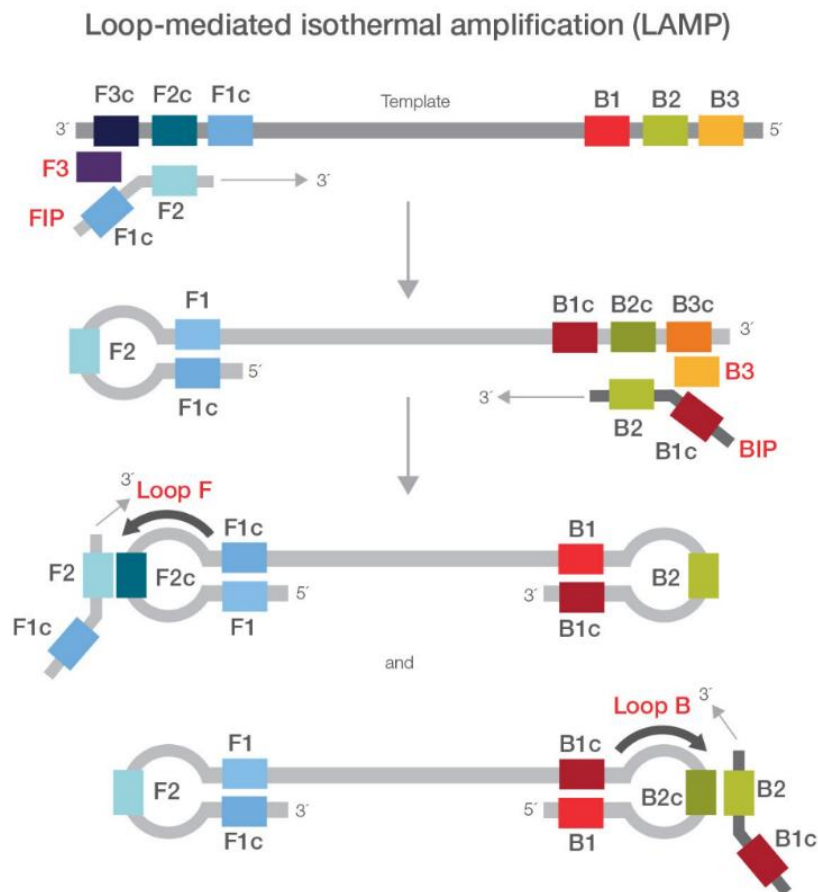


Figura 2. Esquema del proceso de amplificación de ADN de LAMP. Tomada de Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Thermo Fisher Scientific, US.

La reacción de amplificación comienza cuando el cebador interno FIP hibrida con F2c en el ADN diana iniciando la síntesis de la hebra complementaria. El cebador F3 hibrida lentamente con F3c e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de hebra, liberando una hebra complementaria vinculada a FIP, que forma una estructura de bucle en el extremo. Este ADN monocatenario sirve como molde para la síntesis iniciada por BIP y la posterior síntesis de ADN por desplazamiento de hebra por el cebador B3, esto conduce a la producción de un ADN en forma de mancuerna, que se convierte en tallo mediante la síntesis de ADN autocebado. Para iniciar el siguiente ciclo de LAMP, FIP hibrida con esta estructura tallo-bucle y la amplificación continúa siguiendo el mismo proceso (Notomi *et al.*, 2000).

Los métodos de detección del fragmento amplificado más utilizados en LAMP son la turbidez, la electroforesis en gel de agarosa, la detección colorimétrica a simple vista y la detección con luz ultravioleta (Wong *et al.*, 2017). En el estudio que nos ocupa, se utilizaron la medición de fluorescencia a tiempo real y la detección colorimétrica a punto final.

Adicionalmente, si la detección se realiza mediante fluorescencia a tiempo real, con compuestos intercalantes, se puede realizar el análisis de la curva de fusión (MCA) para realizar un ensayo sobre la contaminación de los productos, de esta forma si la temperatura de fusión (T_m) es la misma que la del control positivo, se puede asegurar que todas las amplificaciones corresponden con el gen de interés y no hay presencia de amplificaciones inespecíficas.

En este trabajo se desarrolló un método rápido de detección de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable por LAMP colorimétrico y a tiempo real. Para ello se evaluó la recuperación de células con diferentes tratamientos, el impacto de un enriquecimiento de tres horas y la purificación del ADN de las muestras.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo y validación de un método para la detección rápida de biofilms de *L. monocytogenes* basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos.

- Estudiar el efecto de diferentes medios de extracción (PBS, LPT y LPT-PRN) sobre la recuperación de células de *L. monocytogenes* desde biofilms formados en superficies de acero inoxidable.
- Evaluar el impacto de incluir una fase de enriquecimiento sobre la detección de células de *L. monocytogenes* presentes en biofilms formados en superficies de acero inoxidable.
- Determinar la influencia de la purificación del ADN extraído de células de *L. monocytogenes* presentes en biofilms formados en superficies de acero inoxidable.
- Evaluar el límite de detección de la técnica desarrollada.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *L. monocytogenes*, *Staphylococcus* y *Rothia* utilizadas pertenecen a una colección del Grupo de Microbiología y Tecnología de Productos Marinos del Instituto de Investigaciones Marinas (MicroTec-IIM), aisladas de una industria pesquera (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepas bacterianas	Referencia IIM
<i>Listeria monocytogenes</i>	L1.D1
<i>Staphylococcus</i> sp.	A3.c2
<i>Rothia terrae</i>	R2.D2.c1

3.2. Formación de biofilms de *L. monocytogenes*

3.2.1. Preparación de medios de cultivo

Se utilizaron medios de cultivo líquidos y sólidos. En el caso de los líquidos se utilizó caldo de soja y triptona (TSB, Condalab, España) y agua de peptona (Scharlab S.L., España), y en el caso de los cultivos sólidos se utilizó agar de soja y triptona (TSA, Scharlab S.L., España) y agar cromogénico para *Listeria* de acuerdo con Ottaviani y Agosti (ALOA, Scharlab S.L., España) Todos los medios fueron preparados según las especificaciones comerciales y esterilizados mediante autoclavado a 121 °C durante 20 minutos.

3.2.2. Formación de biofilms monoespecie

Activación del cultivo de L. monocytogenes y preparación del cultivo de trabajo: inicialmente se procede a la activación de la cepa, para asegurar que sus condiciones fisiológicas son adecuadas para la realización de los experimentos. Para ello, se inoculan, tomando 100 µL de un criovial de la cepa *L. monocytogenes* IIM-L1.D1 conservada bajo condiciones de congelación a -20 °C, 5 mL de TSB, que posteriormente se incuban a 37 °C durante 24 horas. Para la obtención del cultivo de trabajo se repite este mismo procedimiento.

Preparación del inóculo: el cultivo obtenido se ajusta a una $DO_{700}=0,1$ (que equivale a $8 \log \text{ UFC/mL}$, de acuerdo con calibrados previos) haciendo uso de un espectrofotómetro Jenway modelo 7205 (Cole-Parmer Ltd., Reino Unido) y se realizan dos diluciones seriadas 1/100 (v/v) en TSB hasta obtener una concentración final de $4 \log \text{ UFC/mL}$.

A continuación, se añaden 25 mL del cultivo así preparado en placas Petri ($\Phi 90 \times 14 \text{ mm}$ con tres vientos estéril, Deltalab, España) con cupones $5 \times 5 \text{ cm}$ de acero inoxidable (SS AISI 316) previamente irradiados durante 15 minutos con luz UV para esterilizarlos. Posteriormente se incuban a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 horas para la formación de biofilms tal y como se indica en la Figura 3.

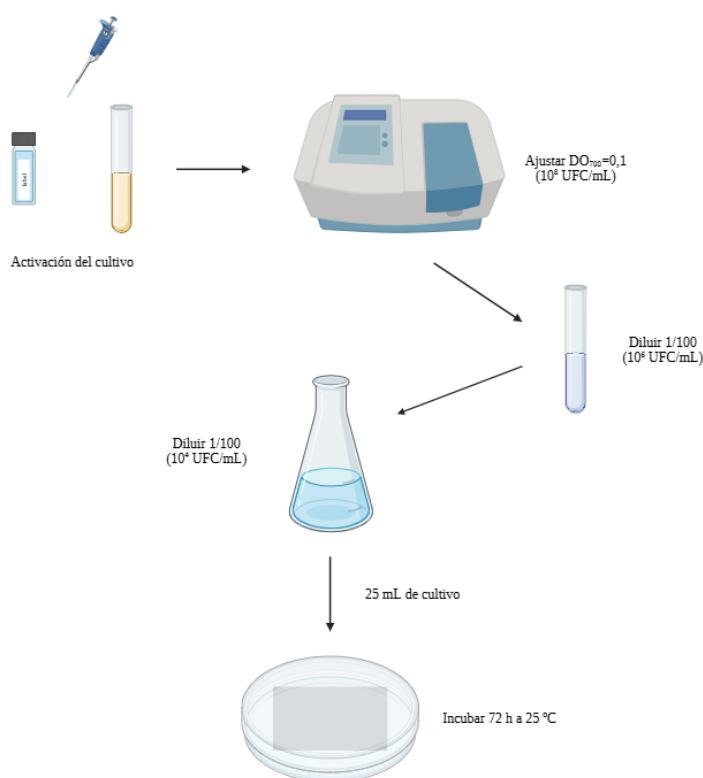


Figura 3. Esquema de la formación del biofilm monoespecie de *L. monocytogenes*. Imagen creada con BioRender.com.

Cálculo de la concentración bacteriana: Se procede al cálculo de la concentración de la especie bacteriana objetivo presente en el inóculo y en los biofilms una vez transcurridas las 72 horas de incubación. Para el cálculo de la concentración del inóculo se toman $100 \mu\text{L}$ del matraz de cultivo, se prepara una dilución 1/10 (v/v) en agua peptonada, se siembra en placa Petri y se incuba a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Para el cálculo de la concentración de los biofilms, tras la incubación y utilizando el equipo automático Scan 500 (Interscience, Francia), se procede al recuento de colonias y al cálculo del número de UFC/mL.

3.2.3. Formación de biofilms multiespecie

Activación de las cepas Staphylococcus sp. A3.c2 y Rothia terrae R2.D2.c1: mediante el mismo procedimiento detallado en el punto 3.2.2 para *L. monocytogenes*.

Preparación de los inóculos: para este estudio se prepararon tres tipos de biofilms multiespecie con diferentes concentraciones de *L. monocytogenes*, 4 log, 2 log y 1 log UFC/mL.

Para obtener una concentración final de 4 log UFC/mL se procede como se ha descrito en el punto 3.2.2. Sin embargo, se observó experimentalmente que siguiendo este procedimiento las concentraciones finales eran demasiado altas, por lo que se repitió utilizando TSB diluido 1/500 (v/v) en PBS.

Para obtener la concentración final de 2 log UFC/mL se realizan tres diluciones seriadas 1/100 (v/v) en TSB 1/500 (v/v).

Para obtener la concentración final de 1 log UFC/mL se realiza una primera dilución 1/10 (v/v) y posteriormente se realizan tres diluciones seriadas 1/100 (v/v) en TSB 1/500 (v/v).

En el caso de las cepas utilizadas como acompañantes, en todos los casos el cultivo se ajusta a $DO_{700}=0,1$ y se diluye primero 1/10 (v/v) y posteriormente se realiza otra dilución 1/100 (v/v) en TSB para obtener una concentración final de 5 log UFC/mL. También se observó que estas concentraciones eran demasiado altas, por lo que se repitió el procedimiento empleando TSB/PBS 1/500 (v/v).

El montaje del sistema experimental para la formación de biofilms es el descrito en 3.2.2.

Control la concentración bacteriana: Primero se procede al cálculo de la concentración bacteriana del inóculo. Para el control de la concentración 4 log UFC/mL de *L. monocytogenes* se toman 100 μ L del matraz de cultivo, se realiza una dilución 1/10 (v/v) en agua peptonada y se siembra en placas Petri ALOA. Para las concentraciones

de 2 log y 1 log UFC/mL de *L. monocytogenes* se toman 100 µL del matraz de cultivo y se siembran directamente en placas Petri ALOA. Estas placas se incuban a 37 °C durante 24 horas.

Para el control de la concentración de las cepas acompañantes a partir de la dilución 1/10 (v/v) de la preparación del inóculo se realizan diluciones decimales seriadas (v/v) en agua de peptona tamponada y se siembran las diluciones -6 y -7 en placas Petri con TSA. Posteriormente se incuban a 37 °C durante 24 horas.

El cálculo de la concentración bacteriana de los biofilms se realiza siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.2.2.

3.3. Métodos para la recuperación óptima de células de biofilms de *L. monocytogenes*

3.3.1. Preparación de disoluciones

Se preparan disoluciones de PBS, LPT y LPT-PRN (pronasa).

PBS: para 1 L de PBS se mezclan los siguientes solutos.

- 8 g NaCl,
- 200 mg KCl,
- 1,44g Na₂HPO₄,
- 240mg KH₂PO₄,

Se comprueba que el pH esté en 7,4.

LPT: para 250 mL de LPT se mezclan los siguientes solutos:

- 0,175 g de lecitina,
- 2,5 g de triptona,
- 1,25 g de extracto de levadura,
- 1,25 g de NaCl,
- 0,25 g de tioglicolato sódico,
- 0,25 g de tiosulfato sódico
- 0,6 g de bi-sulfito sódico,
- 0,25 g de histidina,
- 1,25 mL polisorbato 80.

Se disuelve en agua milliQ utilizando un agitador magnético con calor hasta ebullición. El pH debe estar en $7,6 \pm 0,2$.

LPT-PRN: al LPT de composición indicada, se le añade pronasa comercial comercial (Sigma-Aldrich, EE.UU.) procedente de *Streptomyces griseus* a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en Tris-HCl 0,1M a pH 7,5.

3.3.2. Recuperación de células de biofilms de *L. monocytogenes*

Una vez formados los biofilms, las células se recuperan mediante frotado de las superficies con esponjas tomamuestras 5x5 cm (Laboratorios Microkit S.L., España) previamente humedecidas en los diferentes tratamientos (PBS, LPT y LPT-PRN (0,4 mg/mL)), durante un minuto. Este proceso se realizó para los biofilms mono especie y mixto de *L. monocytogenes* a concentración 4 log UFC/mL.

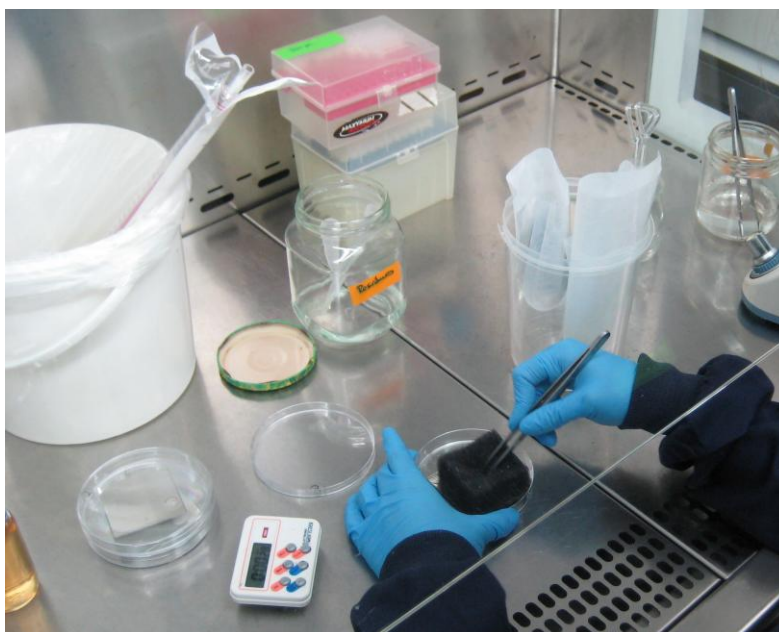


Figura 4. Imagen tomada durante el proceso de recuperación de células de *L. monocytogenes* de biofilms formados en la superficie de cupones de acero inoxidable.

Posteriormente, se realizó este mismo procedimiento utilizando únicamente esponjas tomamuestras humedecidas en LPT-PRN (0,4 mg/mL) para los biofilms mixtos de *L. monocytogenes* a concentraciones de 4 log, 2 log y 1 log UFC/mL.

3.3.3. Determinación de las células adheridas en biofilms de *L. monocytogenes*

Se lavan los cupones (x2) con 25 mL de PBS y se trasvasa el cupón a una placa Petri limpia con 10 mL de peptona. Se sonica durante 1 minuto en Sonicador Bransor Ultrasonido bath modelo CPX5800H-E (Emerson Electric, EE.UU.) con potencia no regulable a 40 kHz y se raspa con un asa tipo Digralsky de plástico. A continuación, se realizan diluciones decimales seriadas en peptona (v/v).

En el caso de biofilms monoespecie, la determinación de células de *L. monocytogenes* se realiza mediante siembra y recuento en placas de agar TSA. En biofilms multiespecie, la determinación de *L. monocytogenes* se realiza mediante siembra en medio selectivo ALOA. Se incuban a 37 °C durante 24 horas y se procede al recuento de colonias y el cálculo de UFC/mL de acuerdo con el procedimiento descrito en 3.2.2.

3.4. Visualización de biofilms de *L. monocytogenes* mediante microscopía confocal

Se realiza inicialmente una tinción haciendo uso de un kit comercial Film Tracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), que permite observar la viabilidad de poblaciones bacterianas en función de la integridad de la membrana. De este modo las bacterias con la membrana comprometida se tiñen de rojo con yoduro de propidio, que puede penetrar en las células, y las células con la membrana intacta se tiñen de verde con SYTO™ 9 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, 2009).

Las imágenes de los biofilms fueron tomadas por el equipo del Servicio de Microscopía Óptica y Análisis de Imagen del IIM-CSIC y se empleó un microscopio confocal Leica® (Wetzlar, Alemania) modelo TSC-SPE equipado con un objetivo ACS APO 63x/1,30 *oil*.

3.5. Extracción de ADN

Inmediatamente después del frotis, se le añaden 5 mL de TSB a las esponjas tomamuestras y se mezclan 1 minuto en Stomacher IUL Masticator (IUL, SA, España). De esta solución se toma 1 mL para la extracción. Las soluciones con las esponjas se dejan incubando a 37 °C durante 3 horas, una vez transcurrido ese tiempo se toma de nuevo 1 mL para la extracción de ADN.

La extracción de ADN (Figura 5) se realiza mediante Chelex 6% (m/v), una resina que previene la degradación del ADN mediante quelación de los cationes necesarios para la actividad de las ADNAsas. Las muestras se centrifugan a $17000 \times g$ durante 2 minutos y se descarta el sobrenadante. Posteriormente el pellet se resuspende en 200 μ L de una suspensión de ChelexTM 100 6% (m/v) (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU) en vórtex. A continuación, las muestras se incuban en un termobloque a 56 °C durante 15 minutos con agitación constante a 1400 rpm para mantener la resina en suspensión. A esto le sigue una lisis térmica a 99 °C durante 8 minutos con agitación constante a 1400 rpm. Finalmente, las muestras se centrifugan durante 2 minutos a $17000 \times g$ a 4 °C (Abalo *et al.*, 2024).

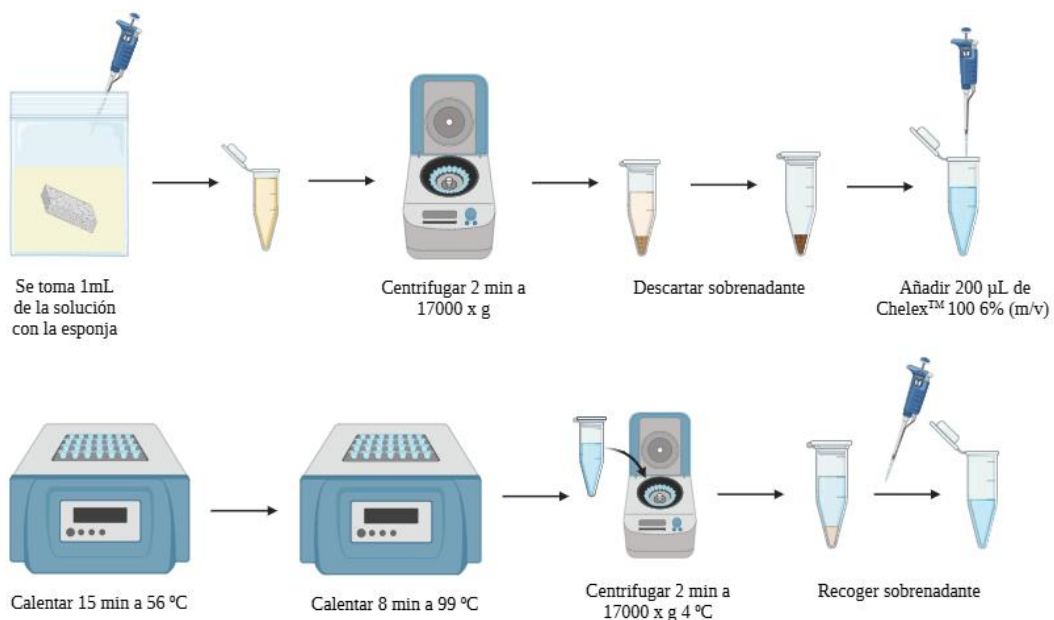


Figura 5. Esquema del procedimiento de extracción de ADN. Imagen creada con BioRender.com

El ADN extraído fue almacenado a 4 °C a corto plazo y a -20 °C a largo plazo.

3.6. Pureza y concentración del ADN

Con el fin de evaluar la calidad del ADN extraído se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis de microvolúmenes NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) que permite estimar la pureza del ADN de acuerdo a las relaciones entre las absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm, de acuerdo a dos relaciones: A260/280 y A260/230 (Thermo Fisher Scientific, 2009). La pureza es adecuada cuando el ratio A260/280 oscila entre 1,7 y 2,0, resultados más bajos indicarían la presencia de péptidos residuales. En cuanto al ratio A260/230, este debe estar entre 2,0 y 2,2, proporciones inferiores pueden indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm como compuestos fenólicos (Versmessen *et al.*, 2024).

Para determinar la concentración de los extractos de ADN se utilizó el fluorímetro Qubit™ 4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Para esta medición de la concentración se empleó el kit comercial Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits, específico para ADN bicatenario, que proporciona un rango de ensayo de 0,2 a 100 ng según las especificaciones del producto (Thermo Fischer Scientific, 2020).

3.6.1. Purificación de los extractos de ADN

Las muestras fueron purificadas con el kit comercial OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research Corporation, CA, EE. UU.), que elimina de forma eficaz los contaminantes de las preparaciones de ADN que pueden inhibir reacciones enzimáticas como la PCR, específicamente elimina de forma eficiente compuestos polifenólicos, ácidos húmicos/fúlvicos, taninos y melanina de acuerdo con las especificaciones del producto (Zymo Research).

3.7. Desarrollo de LAMP

Durante el desarrollo del LAMP se llevaron a cabo dos ensayos diferentes mediante fluorescencia a tiempo real, desde ahora LAMP a tiempo real, y mediante determinaciones colorimétricas a punto final, desde ahora LAMP colorimétrico.

3.7.1. Mezcla de reacción

Para este estudio fueron empleados seis primers diseñados para el gen *hly* de *L. monocytogenes*, siendo estos dos internos (FIP y BIP), dos externos (F3 y B3) y dos

cebadores de bucle (LF y LB); cuyas secuencias se muestran en la Tabla 3. Estos primers fueron diseñados en estudios previos (Abalo *et al.*, 2024).

Tabla 3. Secuencia de los primers diseñados para el gen *hly*.

	Secuencia (5'→3')
FIP	TGA ACA ATT TCG TTA CCT TCA GGA T <i>tttt</i> TTG ATC ACT CTG GAG GAT AC
BIP	GGA GCG AAA ACA ATA AAA GCA AGC T <i>tttt</i> GCG TAA ACA TTA ATA TTT CTC GC
F3	TTC AAA AGC TTA TAC AGA TGG AA
B3	AAG CTA AAC CAG TGC ATT C
LF	CAT CCC AAG AAA TGT TGA ATT GAG C
LB	TCG TCC ATC TAT TTG CCA GGT A

Los primers se reconstituyen de su forma liofilizada mediante disolución en agua libre de nucleasas (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc. EE.UU.) hasta una concentración final de 100 μ M.

El volumen final de la mezcla de reacción fue en ambos casos de 25 μ L, compuesto por 15 μ L de GspSSD2.0 Isothermal Mastermix (ISO-004) o Visual Detection RT Isothermal Mastermix (ISO-010RT-VIS), ambos adquiridos de OptiGene (OptiGene Ltd., Horsham, Reino Unido), para el LAMP a tiempo real o el LAMP colorimétrico respectivamente, 1000 nM de primers FIP y BIP con linker de cuatro timinas (polyT), 200 nM de primers F3 y B3, 800 nM de primers LF y LB, 1% de pullulan (TCI Chemicals Co., Ltd.), 6 μ L de ADN como molde. Se preparó un stock intermedio de todos los primers a una concentración 25x y se completó el volumen con agua libre de nucleasas tal y como se indica en la Tabla 4 (Abalo *et al.*, 2024).

Tabla 4. Componentes y volúmenes de mezcla de reacción para LAMP

Componentes de mezcla de reacción	Volumen de reacción (μ L)
GspSSD2.0 Isothermal Mastermix*	15
Visual Detection RT Isothermal Mastermix**	15
Stock primers 25x	1
Pullulan	2,5
Agua libre de nucleasas	0,5
ADN	6

* GspSSD2.0 Isothermal Mastermix fue empleado únicamente para en ensayo de LAMP a tiempo real.

** Visual Detection RT Isothermal Mastermix fue empleado únicamente para el ensayo de LAMP colorimétrico.

3.7.2. LAMP en tiempo real

El ensayo de LAMP a tiempo real se llevó a cabo en el equipo CFX Opus 96 Real-Time PCR System y los resultados se analizaron con el software desktop CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EE.UU.) que calcula automáticamente el ciclo de amplificación (Cq).

Para este ensayo se añade la mezcla de reacción en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se cubren con film de calidad óptica. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

La reacción tuvo lugar a 66 °C durante 30 minutos con adquisición de fluorescencia cada 30 segundos (60 ciclos). Una vez finalizada la amplificación se realizó un análisis de la curva de fusión con los siguientes pasos: calentamiento a 95 °C durante 1 segundo, mantenimiento a 80 °C durante 20 segundos y recalentamiento hasta 95 °C con incrementos de 0,03 °C y adquisición continua de la fluorescencia.

3.7.3. LAMP colorimétrico

En el caso del LAMP colorimétrico el procedimiento se llevó a cabo en microtubos de 0,2 mL en el equipo MyCycler™ Thermal Cycler System With Gradient Option (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EE.UU.) a 66 °C durante 60 minutos y posteriormente a 4 °C para evitar que siga teniendo lugar la amplificación. El tiempo prolongado permitió una mejor discriminación del color.

Además de la evaluación a simple vista, se tomaron imágenes de las muestras con un teléfono móvil OPPO A94 5G modelo CPH2211, estos resultados se analizaron mediante el valor R con la aplicación gratuita Color Picker 7.9.0. El valor R se refiere al componente rojo del código de colores primarios RGB (*red, green, blue*) y sus valores varían de 0 a 255, siendo el 255 el rojo puro. Se realizaron 5 mediciones por tubo y aquellos con una media del valor R por debajo de 200 fueron considerados positivos de acuerdo con Abalo *et al.*, (2024).

3.8. Desarrollo de la qPCR

Para el desarrollo del ensayo de qPCR se seleccionaron cebadores dirigidos al gen *hly* junto con un control de amplificación interna (IAC) competitivo empleados en estudios previos (Azinheiro *et al.*, 2023). Los primers y las sondas se proporcionaron como una mezcla a concentración 10x, sus secuencias y concentraciones finales en la mezcla de reacción se muestran en la Tabla 5. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 μ L, compuesto por 10 μ L de NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal), 2 μ L de la mezcla de primers a concentración 10x, 3 μ L de ADN molde y 5 μ L de agua libre de ADN/ARNasas. Estos volúmenes aparecen detallados en la Tabla 6.

Tabla 5. Secuencia de los primers diseñados para el gen *hly*.

	Secuencia (5' → 3')	Concentración (nM)
<i>hly</i> -P3F	CGC AAC AAA CTG AAG CAA AGG A	200
<i>hly</i> -P3R	CGA TTG GCG TCT TAG GAC TTG C	200
<i>hly</i> -P3P	CAT GGC ACC// ACC AGC ATC TCC G	150
IAC-F	AGT GGC GGT// GAC ACT GTT GAC CT	100
IAC-R	CGC AAC AAA CTG AAG CAA AGG A	100
IAC-P	CGA TTG GCG TCT TAG GAC TTG C	100
IAC-ADN	GGA TTA CCC TAG AGT GGC GGT GAC ACT GTT GAC CTT CTA TTA CCT C	10 ³ *

*Copias de IAC-ADN añadidas por reacción.

Tabla 6. Componentes y volúmenes de mezcla de reacción para PCR

Componentes de mezcla de reacción	Volumen de reacción (μ L)
NZYSupreme qPCR Probe Master Mix	10
Stock primers 10X	2
Agua libre de nucleasas	3
ADN	5

El ensayo se llevó a cabo en el mismo equipo que el LAMP a tiempo real, el CFX Opus 96 Real-Time PCR System, y de igual manera los resultados fueron analizados con el software desktop CFX Maestro. En el caso de la PCR, el perfil térmico consistió en un primer paso de calentamiento de 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización durante 15 segundos a 95 °C y un ciclo de hibridación-extensión a 63 °C durante 60 segundos.

4. Resultados y discusión

4.1 Evaluación de la recuperación de células de biofilms de *L. monocytogenes*.

El primer objetivo se centró en optimizar el procedimiento de recuperación de células de biofilms mono especie y mixtos de *L. monocytogenes* formados tras 72 horas de incubación a 25 °C. Para ello se evaluaron tres tratamientos de recolección con esponjas humedecidas en: i) PBS, una solución salina tamponada ampliamente utilizada en laboratorios de microbiología como medio de suspensión de bacterias, ii) LPT, un medio de cultivo neutralizante que inactiva la acción de agentes químicos que puedan inhibir el crecimiento de microorganismos y iii) LPT-PRN, LPT suplementado con pronasa, una enzima proteolítica con capacidad para digerir una gran variedad de proteínas, entre ellas las proteínas de adhesión que producen las bacterias en los biofilms.

4.1.1 Concentración del inóculo y de las células adheridas

La concentración del inóculo que preparamos a 4 log UFC/mL para el biofilm mono especie fue de 4,3 log UFC/mL y tras los tres días de incubación el biofilm presentaba una concentración de 9,2 log UFC/cm². En cuanto al biofilm mixto, la concentración del inóculo de *L. monocytogenes* fue de 5,1 log UFC/mL y finalmente el biofilm tenía una concentración de 10,8 log UFC/cm², tal y como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentración del inóculo inicial y de las células adheridas de los biofilms mono especie y mixto a concentración 4 log UFC/mL

	Cepa bacteriana	Concentración inóculo [UFC/mL]	Concentración células adheridas [UFC/cm ²]
Biofilm mono especie 4 log	L1.D1	4,3	9,2
	L1.D1	5,1	10,8
Biofilm mixto 4 log	St.A1.c1	8,1	
	R2.D2.c1	8,2	

4.1.2 Análisis de microscopía confocal

La visualización por microscopía confocal permitió confirmar visualmente la eficacia de los distintos tratamientos de recuperación de células. Todos los tratamientos consiguieron recuperar una gran cantidad de células, esto se puede ver al comparar las imágenes de los controles de los biofilms (Figuras 6a y 7a) con las imágenes de los

biofilms una vez realizado el frotis. Tanto en las imágenes del biofilm monoespecie como del mixto (Figuras 6 y 7) se observa una notable reducción de células presentes en el cupón tras el procedimiento de extracción con LPT (Figuras 6c y 7c) y LPT-PRN (Figuras 6d y 7d), en comparación con el tratamiento con PBS (Figuras 6b y 7b). No obstante, tal y como se aprecia si comparamos las Figuras 6 y 7 estas diferencias son ligeramente más evidentes en las imágenes del biofilm monoespecie.

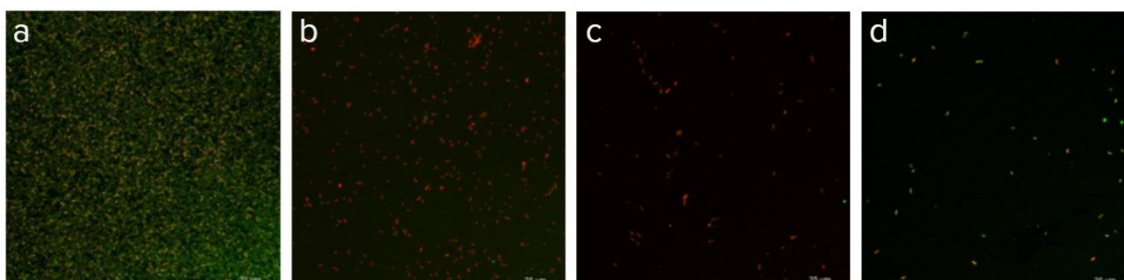


Figura 6. Imágenes de microscopía confocal de biofilms monoespecie de *L. monocytogenes* IIM-L1D1 antes (a) y después de realizar la recuperación de células con PBS (b), LPT (c) y LPT-PRN (d). Células verdes: membrana intacta; células rojas, membrana dañada.

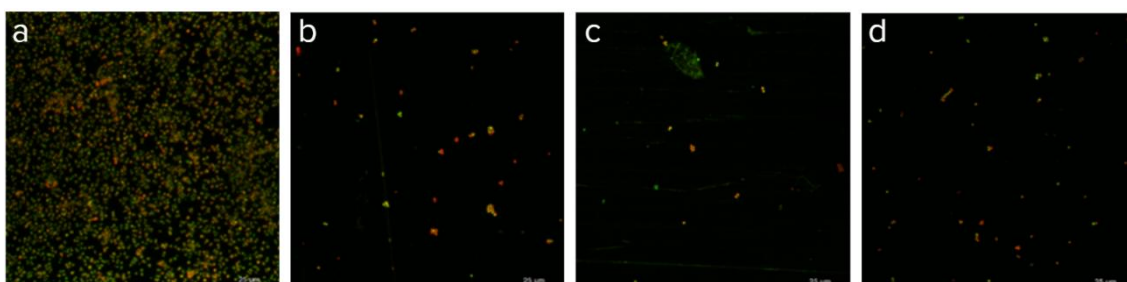


Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de biofilms multiespecie de *L. monocytogenes* IIM-L1D1 antes (a) y después de realizar la recuperación de células con PBS (b), LPT (c) y LPT-PRN (d). Células verdes, membrana intacta; células rojas: membrana dañada.

4.1.3 Pureza y concentración del ADN

Se cuantificó y determinó la calidad del ADN extraído. La pureza se midió mediante un NanoDrop™ 2000 en base a los ratios A260/280 y A260/230 de acuerdo a estudios previos. Los resultados mostraron que un 48,6% de las muestras se encuentran dentro del rango de pureza para A260/280, y un 72% se encuentra entre 1,6 y 2,1, por lo que hay cierta contaminación proteica en las muestras. Por otro lado, todas las muestras se encuentran por debajo de 1,23 para el rango A260/230, lo que indica contaminación por compuestos fenólicos.

Se comparó la concentración del ADN extraído de las células recuperadas con los tres medios utilizados, con y sin enriquecimiento de 3 horas de duración e incluyendo o no un paso intermedio de purificación en el procedimiento.

La concentración de ADN se midió con el fluorímetro Qubit™ empleando un kit comercial. Aunque el Nanodrop™ 2000 también cuantifica el ADN, de acuerdo con varios estudios tiende a sobrestimar su concentración, mientras que el Qubit™ proporciona una información mucho más fiable (Masago *et al.*, 2021). La cuantificación del ADN extraído (Figura 8) de los diferentes tratamientos muestra una menor concentración de ADN en las muestras de PBS, lo que concuerda con las imágenes de microscopía mostradas previamente (Figuras 6 y 7).

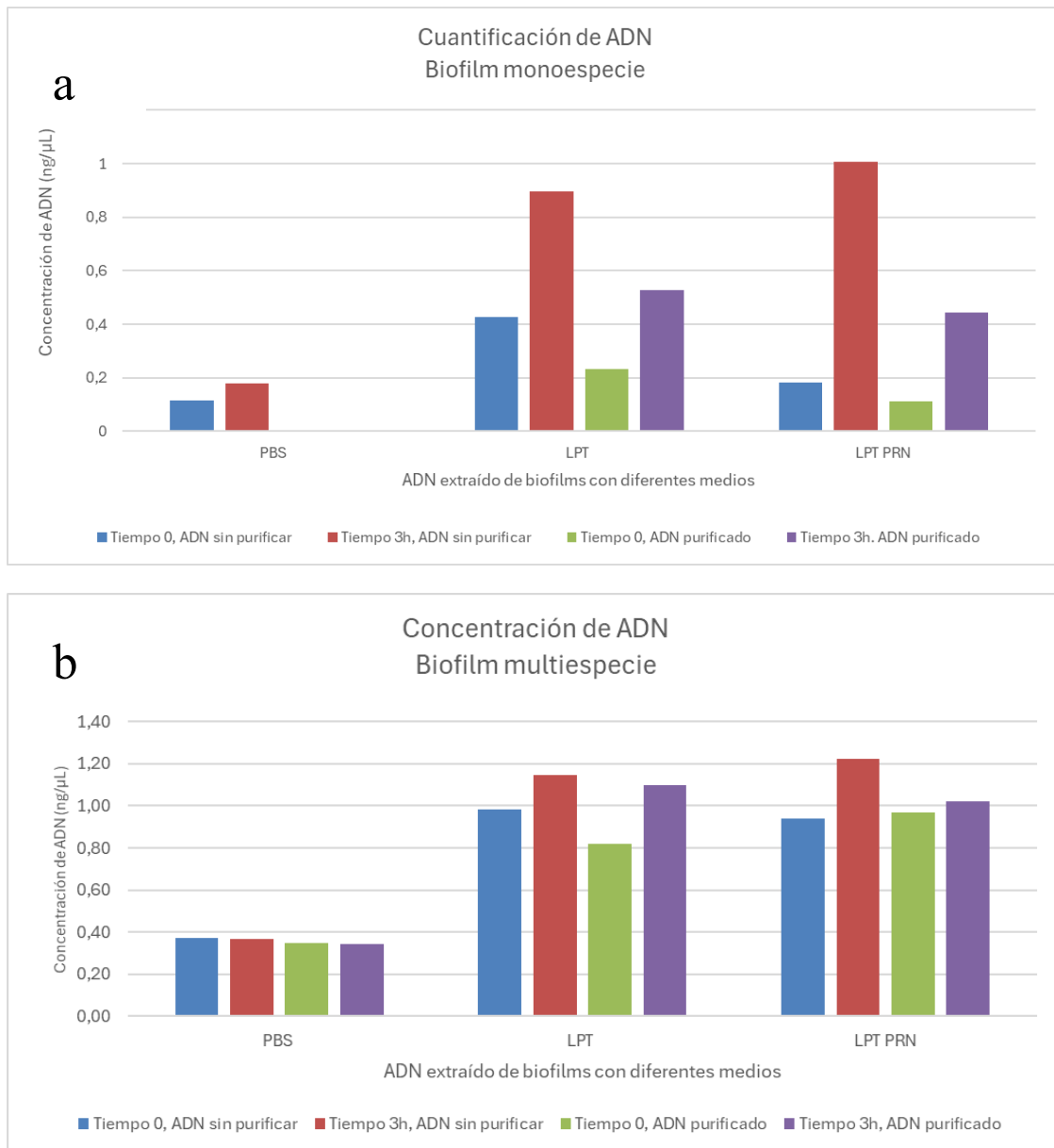


Figura 8. Concentración de ADN extraído (ng/μL) de los biofilms monoespecie (a) y multiespecie (b) de acuerdo a la medición del fluorímetro Qubit™. Se observan los resultados de las muestras sin purificar a tiempo 0 (azul) y tras el enriquecimiento de 3h (rojo) y de las muestras purificadas a tiempo 0 (verde) y tras el enriquecimiento (morado).

4.1.4 Resultados de LAMP

En la Tabla 8 y en la Figura 9 se muestran los resultados de los ciclos de amplificación (Cq) de LAMP a tiempo real de las muestras de los tres tratamientos de los biofilms monoespecie y mixto purificados y sin purificar, antes (t0) y después del enriquecimiento (t3).

Tabla 8. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de *L. monocytogenes* mediante LAMP a tiempo real de las muestras de biofilms monoespecie y mixtos.

Muestra	Biofilm monoespecie		Biofilm mixto	
	Cq±DS muestras sin purificar	Cq±DS muestras purificadas	Cq±DS muestras sin purificar	Cq±DS muestras purificadas
PBS t0	22,68±2,46	17,63±0,90	27,55±8,38	17,89±0,83
LPT t0	22,39±1,27	18,11±0,38	31,65±2,62	17,68±1,21
LPTPRN t0	22,03±1,83	18,61±0,85	33,78±1,84	17,94±0,65
PBS t3	19,81±1,08	18,00±0,99	32,89±1,76	19,01±0,35
LPT t3	20,15±0,88	17,94±0,61	34,21±1,70	19,11±0,90
LPTPRN t3	19,95±0,98	19,63±2,12	29,71±6,32	19,07±0,54

DS: desviación estándar

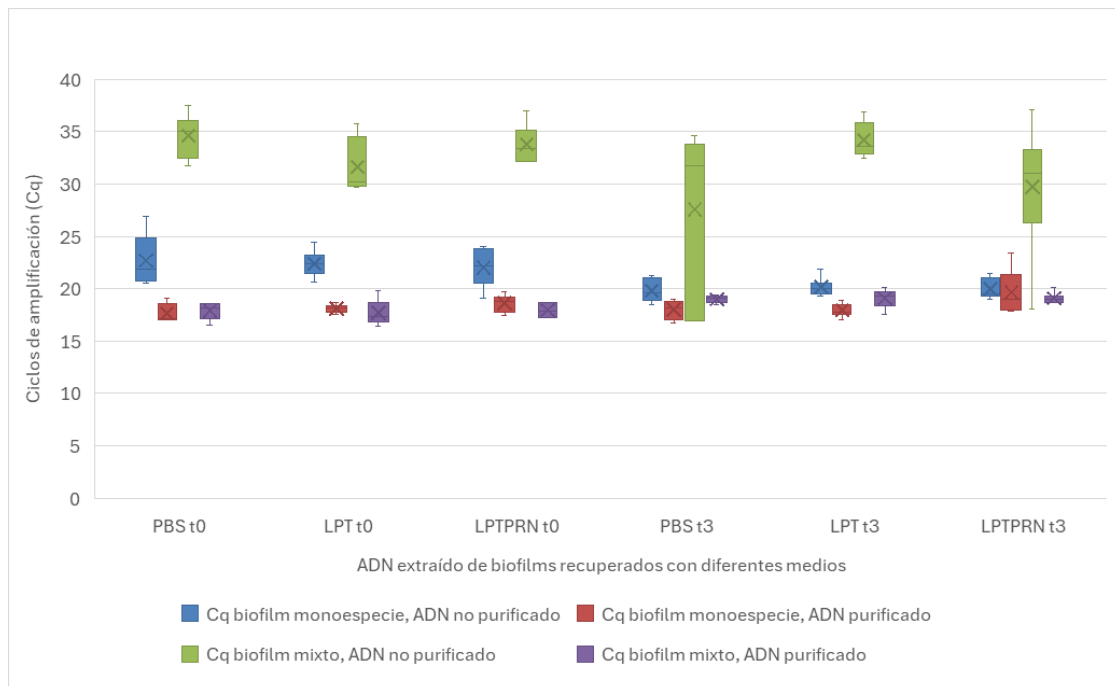


Figura 9. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de *L. monocytogenes* en biofilms por LAMP. Se muestran los resultados obtenidos en muestras de biofilms monoespecie sin purificar (azul) y purificadas (rojo) y en muestras de biofilms mixtos sin purificar (verde) y purificadas (morado), con enriquecimiento (t3) y sin enriquecimiento previo (t0).

Tal y como se observa en la Figura 9, lo más destacado de los resultados obtenidos es una disminución significativa del tiempo de detección de *L. monocytogenes* cuando se añade en el procedimiento un paso de purificación, tanto si está presente en biofilms monoespecie como mixtos. Este efecto es cuantitativamente más patente en el caso de biofilms mixtos, donde el paso de purificación supone una bajada de Cq desde valores entre 27,55 y 34,21 hasta valores de entre 17,68 y 19,11. En el caso de biofilms monoespecie, se observa igualmente una disminución, pero con diferencias cuantitativas significativamente menores. Estos resultados indican la conveniencia de purificar el ADN previamente a la amplificación para mejorar la detección de *L. monocytogenes*, especialmente en biofilms mixtos.

Adicionalmente se realizó un análisis de la curva de fusión. La temperatura de fusión (Tm) depende de la longitud y secuencia de los nucleótidos, secuencias más largas y con mayor proporción C-G presentan Tm más altas. De esta forma, el análisis de la curva de fusión a tiempo real permite diferenciar entre los amplicones de LAMP positivos y los productos de amplificación de cebadores no específicos que pueden producir falsos positivos. (Lee *et al.*, 2018).

La Tm del fragmento del gen *hly* amplificado es de 83,27 °C (Abalo *et al.*, 2024). Todas las muestras se encontraban entre 82,5 y 83,1 °C. De acuerdo con Lee *et al.* (2018), son normales variaciones de 2 °C, por lo que podemos afirmar que todos los resultados se corresponden con el gen de interés. Se añadió también un control negativo con agua libre de ADN/ARNasas en lugar de ADN, de forma que si este amplificara sería a causa de amplificaciones inespecíficas. Del mismo modo, no debería mostrar picos en la curva de fusión, si esto ocurriera los resultados serían invalidados.

En cuanto al LAMP colorimétrico, los resultados positivos se manifiestan de un color turquesa, mientras que las muestras negativas son incoloras. Como se puede observar en la Figura 10, todos los resultados son positivos, aunque diferentes tonos de turquesa indican diferentes grados de amplificación. En general, no se observan grandes diferencias entre las muestras antes y después del enriquecimiento, pero sí se percibe un color más intenso en las muestras purificadas.

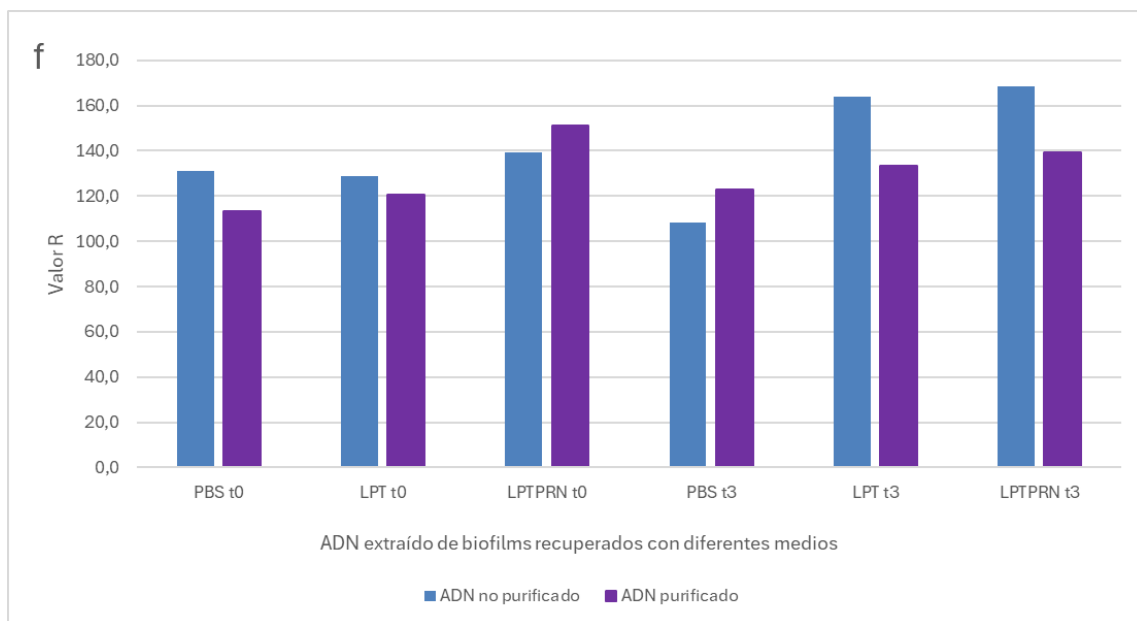
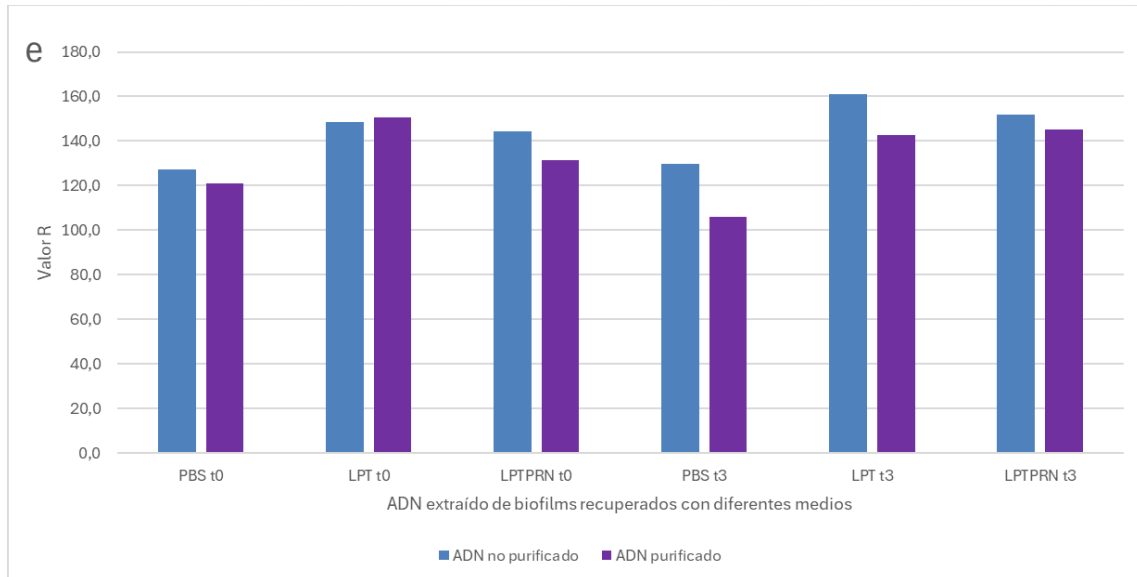
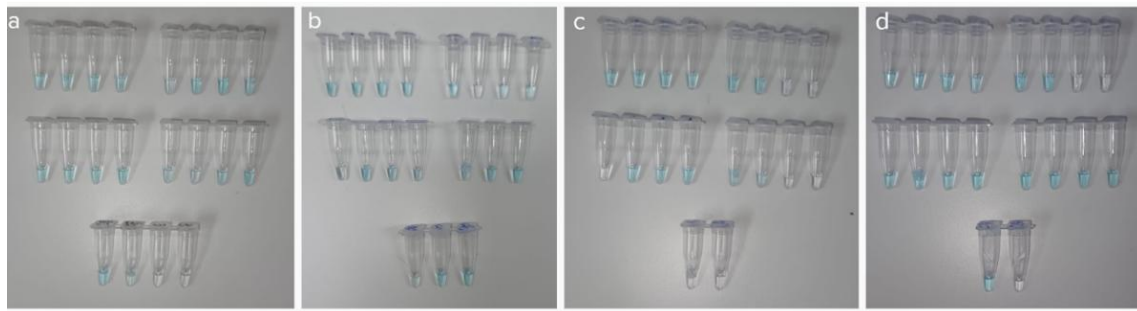


Figura 10. Imágenes de LAMP colorimétrico de las muestras del biofilm monoespecie sin purificar (a) y purificadas (b) y del biofilm multiespecie sin purificar (c) y purificadas (d). Debajo, gráficos con los resultados de la medición del valor R obtenidos con la aplicación Color Picker 7.9.0 de biofilms monoespecie (e) y mixtos (f).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se puede concluir que las esponjas humedecidas con PBS recogen un menor número de células de los biofilms, y por lo tanto estas muestras presentan una menor cantidad de ADN y Cq más altos, es decir, tardan más tiempo en amplificar el ADN, y con mayores desviaciones. Los resultados de las muestras recogidas con los tratamientos de LPT y LPT-PRN son similares, aunque con una ligera tendencia a una mayor recuperación de células de la superficie con el uso de esponjas humedecidas en LPT-PRN, seleccionando esta opción para los experimentos siguientes.

4.2 Estudio del límite de detección del método LAMP desarrollado

Con el objetivo de estudiar el límite de detección de *L. monocytogenes* del método desarrollado, se estudiará la capacidad de detectar células de *L. monocytogenes* presentes en biofilms mixtos formados durante 72 horas a 25 °C tras la inoculación de 4 log, 2 log y 1 log UFC/mL de *L. monocytogenes*, utilizando en todos los casos LPT-PRN como medio de recuperación.

4.2.1 Concentración del inóculo y de las células adheridas.

En la Tabla 9 se muestran los datos de la concentración de *L. monocytogenes* en el inóculo inicial antes de la formación del biofilm y en los biofilms obtenidos tras 3 días de incubación a 25 °C. Tal y como se observa, la concentración del inóculo preparado a 1 log UFC/mL fue de 1,8 log UFC/mL y tras los tres días de incubación el biofilm presentaba una concentración de 3,9 log UFC/cm². En cuanto al biofilm a 2 log UFC/mL, la concentración del inóculo de *L. monocytogenes* fue de 3,2 log UFC/mL y finalmente tenía una concentración de 4,8 log UFC/cm². Por último, la concentración de inóculo preparado a 4 log UFC/mL fue de 4,3 log UFC/mL y la concentración del biofilm, de 6,5 log UFC/cm².

Tabla 9. Concentración del inóculo inicial y de las células adheridas de los biofilms mixtos a concentraciones 1 log, 2 log y 4 log UFC/mL

	Cepa bacteriana	Concentración inóculo [UFC/mL]	Concentración células adheridas [UFC/cm²]
Biofilm 1 log	L1.D1	1,8	3,9
	St.A1.c1	3,4	
	R2.D2.c1	3,4	
Biofilm 2 log	L1.D1	3,2	4,8
	St.A1.c1	3,3	
	R2.D2.c1	3,0	
Biofilm 4 log	L1.D1	4,3	6,5
	St.A1.c1	3,3	
	R2.D2.c1	3,0	

4.2.2 Concentración y pureza de ADN

Se determinó la pureza del ADN en función de las relaciones entre los valores de absorbancia A260/280 y A260/230 al igual que en el apartado 4.1.3. En este caso solo un 16% de las muestras se encuentran entre los valores 1,7 y 2 para el ratio A260/280, y para el ratio A260/230 ninguna muestra supera el valor de 0,4. Esto indica que las muestras presentan contaminación por proteínas y otros compuestos.

Respecto a la concentración de ADN extraído, los resultados muestran una mayor concentración para los biofilms formados a concentración inicial 2 log y 4 log UFC/mL en comparación con el biofilm formado a 1 log UFC/mL. Estos resultados concuerdan con lo esperado, ya que a menor concentración de bacterias se espera una menor concentración de ADN. Se observa también que las muestras purificadas presentan una menor concentración de ADN, esto puede deberse a una saturación de la microcolumna del kit comercial empleado para la purificación, ya que si esta columna se satura parte del ADN podría quedar retenido, disminuyendo así la concentración de la muestra.

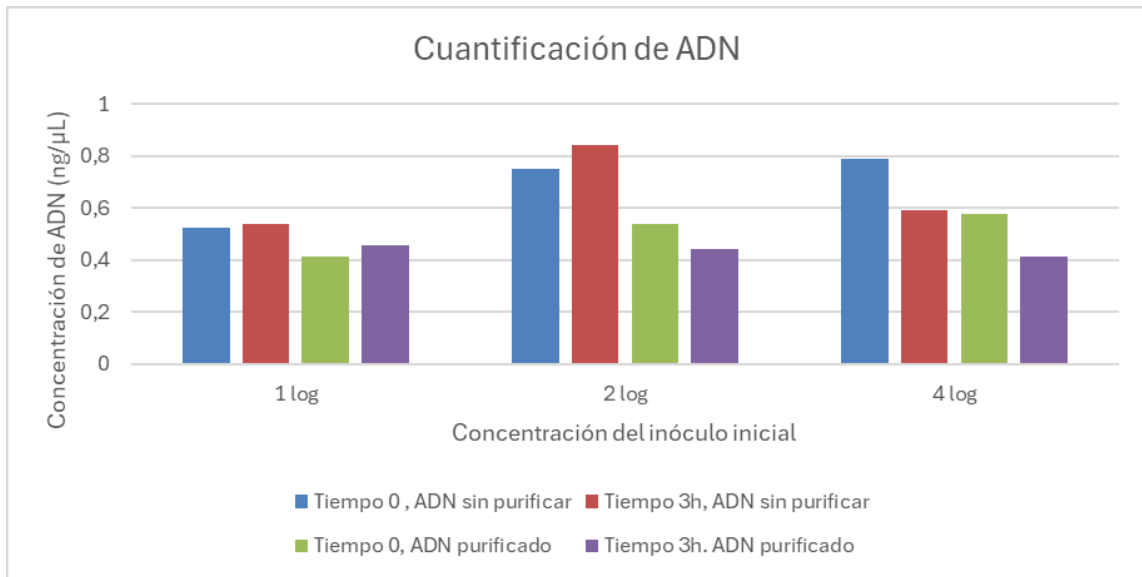


Figura 11. Resultados de la cuantificación del ADN extraído obtenidos con el fluorímetro Qubit™. Se observan los resultados de las muestras sin purificar a tiempo 0 (azul) y tras el enriquecimiento de 3h (rojo) y de las muestras purificadas a tiempo 0 (verde) y tras el enriquecimiento (morado).

4.2.3 Resultados de LAMP

En la Tabla 10 y en la Figura 12 se muestran los resultados de los Cq de LAMP a tiempo real de las muestras purificadas y sin purificar, antes (t0) y después del enriquecimiento (t3) de los biofilms mixtos formados a concentraciones iniciales 1 log, 2 log y 4 log UFC/mL. En este caso también se llevó a cabo la curva de fusión, la Tm para estos fragmentos fue de entre 82,5 y 81,3 °C, por lo que también podemos afirmar que estas amplificaciones corresponden con el gen de interés.

Estos resultados muestran Cq y desviaciones estándar mayores cuanto más baja es la concentración del biofilm. En los tres casos los Cq disminuyen notablemente tras las tres horas de enriquecimiento, esto se hace más evidente para las muestras del biofilm a concentración inicial 1 log UFC/mL. En cuanto a las muestras purificadas, no se aprecian grandes diferencias para los biofilms 2 log y 4 log UFC/mL, pero a concentraciones más bajas se observa como el ADN tarda menos ciclos en poder detectarse y se observa menor desviación entre las muestras.

Tabla 10. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de *L. monocytogenes* mediante LAMP a tiempo real de las muestras de biofilms mixtos formados a concentraciones iniciales de 1 log, 2 log y 4 log UFC/mL.

	Muestras sin purificar	Muestras purificadas
Muestra	Cq±DS	Cq±DS
1 log t0	47,45±3,40	33,43±2,72
2 log t0	27,95±0,81	30,86±3,93
4 log t0	23,01±0,72	23,04±0,61
1 log t3	30,56±4,66	31,15±1,53
2 log t3	21,32±0,87	23,98±0,80
4 log t3	19,25±0,64	22,89±1,80

DS: desviación estándar

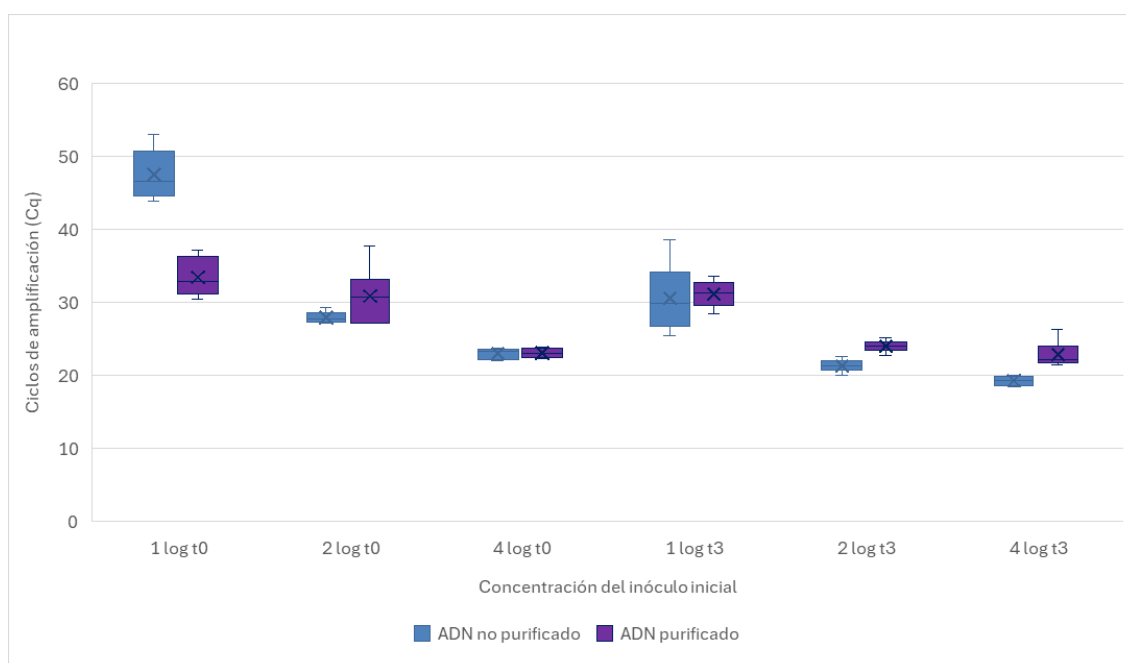


Figura 12. Ciclos de amplificación de LAMP a tiempo real. Se observan los resultados de las muestras sin purificar (azul) y de las muestras purificadas (morado) antes (t0) y después (t3) del enriquecimiento de 3 horas.

Al igual que en el LAMP a tiempo real, el LAMP colorimétrico también muestra todos los resultados positivos. Como se observa en la Figura 13, todas las muestras presentan un intenso color azul turquesa. Aunque a simple vista no se aprecia, tras el análisis del valor R con la aplicación Color Picker 7.9.0, se puede ver que las muestras purificadas presentan mejores resultados, pero no se observan grandes diferencias entre las muestras de los diferentes biofilms ni entre las muestras tomadas después de las tres horas de enriquecimiento.

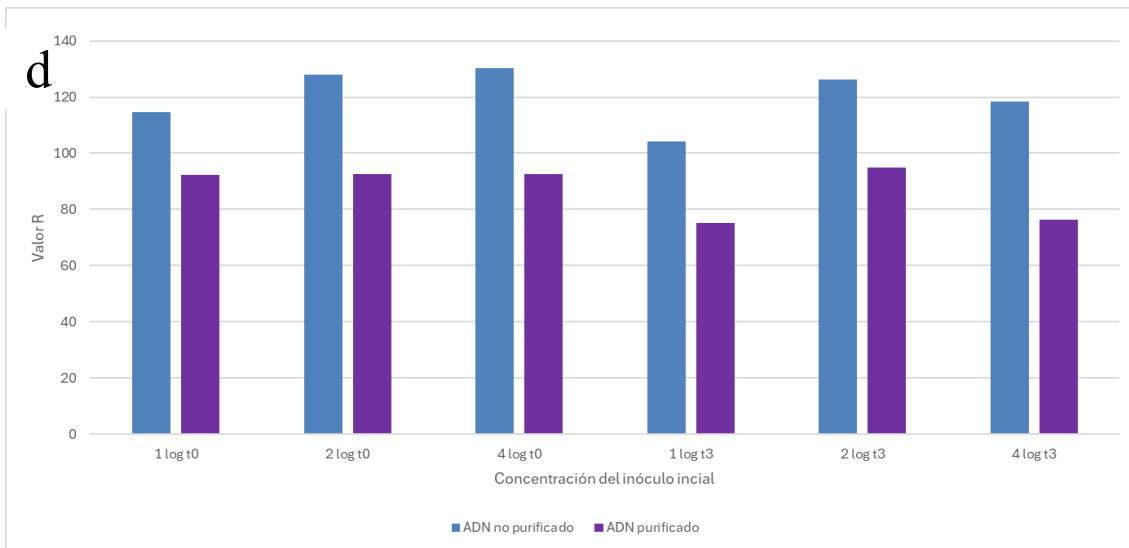
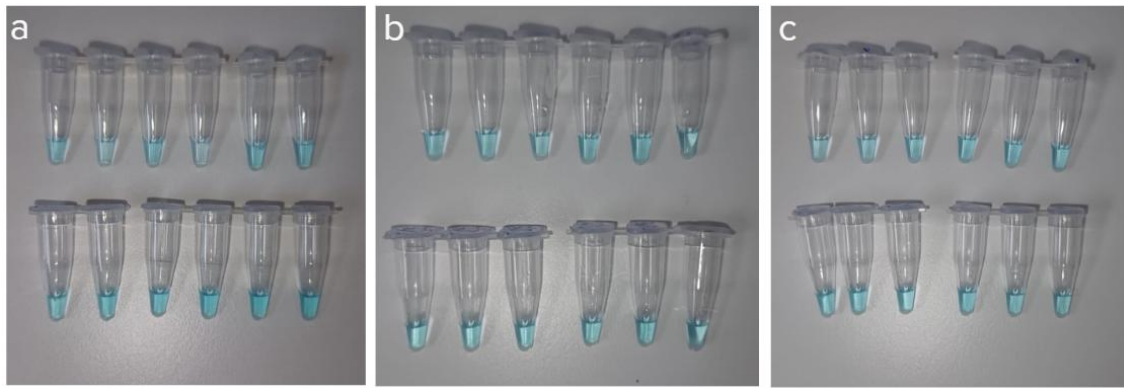


Figura 13. Imágenes de LAMP colorimétrico de las muestras de biofilms mixtos a concentraciones iniciales de 1 log (a), 2 log (b) y 4 log UFC/mL (c), la primera fila corresponde a las muestras sin purificar y la segunda a las muestras purificadas. Debajo, gráfico con los resultados de la medición del valor R obtenidos con la aplicación Color Picker 7.9.0. (d).

4.2.4 Resultados de qPCR

Con el objetivo de comparar los resultados de LAMP a tiempo real con otra técnica de amplificación de ADN, se analizaron todas las muestras mediante qPCR. Los resultados (Tabla 11 y Figura 14) no muestran grandes diferencias entre los Cq de los biofilms a diferentes concentraciones, en cuanto a las muestras obtenidas después del enriquecimiento presentan mejores resultados, pero no se aprecian grandes diferencias entre las muestras sin purificar y las purificadas, esto puede deberse a la contaminación que tenemos en las muestras aun después de purificarlas.

Tabla 11. Ciclos de amplificación necesarios para la detección de *L. monocytogenes* mediante qPCR de biofilms mixtos formados a concentraciones iniciales de 1 log, 2 log y 4 log UFC/mL.

Muestra	Cq±DS de las muestras sin purificar	Cq±DS de las muestras purificadas
1 log t0	29,48±0,54	24,50±0,40
2 log t0	31,85±0,25	32,08±0,28
4 log t0	26,84±0,51	27,11±0,43
1 log t3	26,80±0,62	27,08±0,66
2 log t3	26,15±1,17	26,71±1,15
4 log t3	24,20±0,33	24,41±0,51

DS: desviación estándar

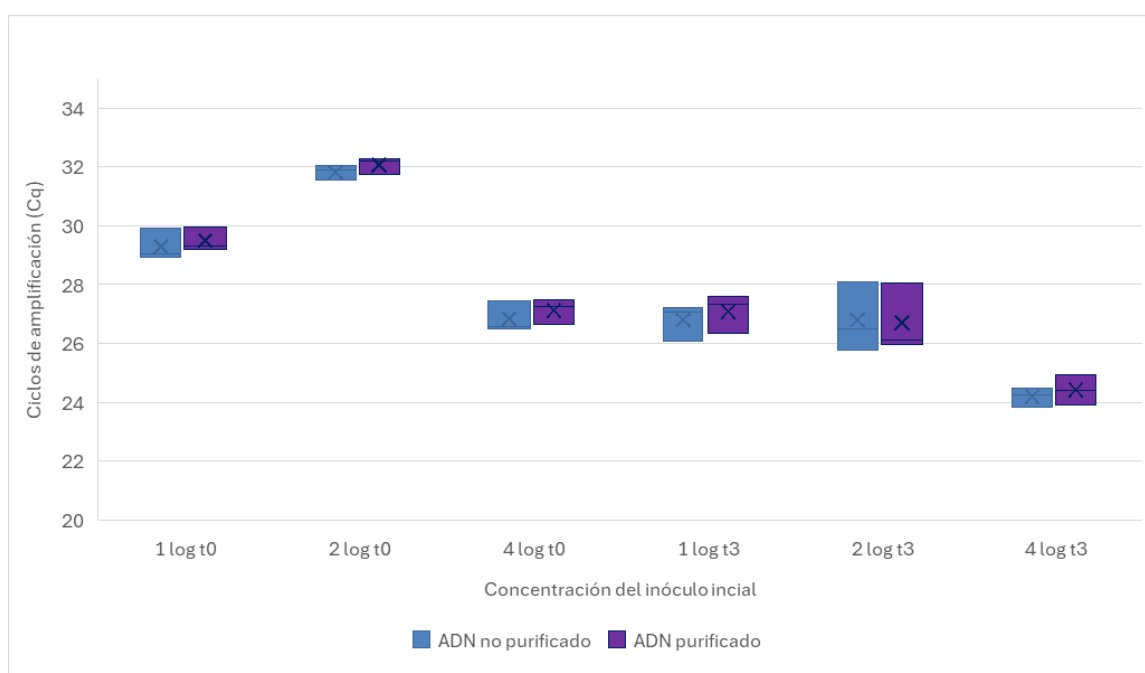


Figura 14. Ciclos de amplificación de qPCR necesarios para la detección de *L. monocytogenes* en biofilms mixtos. Se observan resultados obtenidos utilizando ADN sin purificar (azul) y purificado (morado) antes (t0) y después (t3) del enriquecimiento de 3 horas.

Al igual que en el LAMP, todas las muestras de qPCR son positivas, y además estas presentan Cq más bajos. Estos resultados nos indican que ambas técnicas permiten detectar *L. monocytogenes* en biofilms multiespecie a concentraciones mayores a 3,9 log UFC/cm² y, dado que no se llegó al límite de detección, potencialmente se podrían detectar concentraciones más bajas.

5. Conclusiones

Listeria monocytogenes es un problema de salud pública a nivel global y su control es necesario en todas las fases de la cadena alimentaria. Su capacidad para adaptarse a condiciones adversas y formar biofilms la convierte en un patógeno difícil de eliminar, por ello es necesario el desarrollo de métodos moleculares que permitan una rápida detección y así poder mantener la seguridad alimentaria. Las conclusiones obtenidas del presente estudio son las siguientes.

- La recuperación de células de los biofilms de *L. monocytogenes* es más efectiva con el tratamiento de LPT-PRN, que con las esponjas humedecidas en PBS y LPT.
- El enriquecimiento breve de 3 horas a 37 °C de las muestras en TSB mejora los resultados de LAMP, reduciendo los valores de Cq en el LAMP a tiempo real y aumentando la intensidad de color en el LAMP colorimétrico.
- La purificación del ADN de las muestras mediante columnas comerciales mejora los resultados de LAMP.
- Se demostró que la técnica LAMP es capaz de detectar *L. monocytogenes* en biofilms de concentración superior a 3,9 Log UFC/cm², pero no fue posible evaluar el límite de detección.

6. Bibliografía

- Abdul-Ghani, R., Al-Mekhlafi, A. M., & Karanis, P. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: Would it come to clinical reality as a point-of-care test? *Acta Tropica*, 122(3), 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.02.004>
- Abalo, M., Lamas, A., Teixeira, C., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2024). Surface monitoring of *L. monocytogenes* by real-time fluorescence and colorimetric LAMP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13318-9>
- AESAN - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. *Listeriosis* https://4/www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm
- Azinheiro, S., Rodríguez-López, P., Lozano-León, A., Guedes, H., Regal, P., Franco, C. M., Cepeda, A., Teixeira, P., Melo, L. D., Silva, D., Fernández, A., Faria, M., Roumani, F., Herrera, J., Prado, M., López-Cabo, M., & Garrido-Maestu, A. (2023). Interlaboratory validation of a multiplex qPCR method for the detection of *Listeria monocytogenes* in a ready-to-eat seafood product. *Food Control*, 150, 109769. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.10976>
- Birmpa, A., Kalogeropoulos, K., Kokkinos, P., & Vantarakis, A. (2015). Evaluation of two loop-mediated isothermal amplification methods for the detection of *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated ready-to eat fresh products. *Italian Journal Of Food Safety*, 4(3). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5383>
- Chen, Q., Zhang, X., Wang, Q., Yang, J., & Zhong, Q. (2023). The mixed biofilm formed by *Listeria monocytogenes* and other bacteria: Formation, interaction and control strategies. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 64(24), 8570-8586. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2200861>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Listeriosis. Annual Epidemiological Report for 2022*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2022>

Feng, Y., Wang, M., Jiang, H., Shi, Y., Zhang, W., & Wang, H. (2023). Comparative Evaluation of LAMP and Nested PCR for the Rapid Diagnosis of *Mycobacterium marinum* Infection. *Infection And Drug Resistance, Volume 16*, 1601-1609. <https://doi.org/10.2147/idr.s404929>

Fiore, A., Treglia, I., Ciccaglioni, G., Ortoffi, M. F., & Gattuso, A. (2023). Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cooked Ham. *Foods, 12*(1), 193. <https://doi.org/10.3390/foods12010193>

Gunasegar, S., & Neela, V. K. (2021). Evaluation of diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) compared with polymerase chain reaction (PCR) for *Leptospira* spp. in clinical samples: a systematic review and meta-analysis. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease, 100*(3), 115369. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115369>

Huang, C., Lu, T., & Yang, Y. (2023). Mortality risk factors related to listeriosis — A meta-analysis. *Journal Of Infection And Public Health, 16*(5), 771-783. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.03.013>

ISO 11290-1:2017. ISO. <https://www.iso.org/standard/60313.html>

Jadhav, S., Bhavne, M., & Palombo, E. A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal Of Microbiological Methods, 88*(3), 327-341. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.002>

Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023, 6 marzo). *Polymerase chain Reaction (PCR)*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>

- Koopmans, M. M., Brouwer, M. C., Vázquez-Boland, J. A., & Van de Beek, D. (2022). Human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 36(1). <https://doi.org/10.1128/cmr.00060-19>
- Lee, S. H., Ahn, G., Kim, M., Jeong, O. C., Lee, J. H., Kwon, H. G., Kim, Y., & Ahn, J. (2018). Poly-adenine-Coupled LAMP Barcoding to Detect Apple Scar Skin Viroid. *ACS Combinatorial Science*, 20(8), 472-481. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.8b00022>
- Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring. (2022). En *FAO; WHO*. <https://doi.org/10.4060/cc2400en>
- Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) | Thermo Fisher Scientific - US*. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/isothermal-nucleic-acid-amplification/loop-mediated-isothermal-amplification.html>
- López, A. M., Sáez, A. C., Marteache, A. H., & Andicoberry, C. A. (2011). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para Listeria Monocytogenes en determinados productos alimenticios*. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3772265>
- Lopez-Valladares, G., Danielsson-Tham, M., & Tham, W. (2018). Implicated Food Products for Listeriosis and Changes in Serovars of *Listeria monocytogenes* Affecting Humans in Recent Decades. *Foodborne Pathogens And Disease*, 15(7), 387-397. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2419>
- Masago, K., Fujita, S., Oya, Y., Takahashi, Y., Matsushita, H., Sasaki, E., & Kuroda, H. (2021). Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests. *Medicina*, 57(12), 1375. <https://doi.org/10.3390/medicina57121375>
- Notomi, T. (2000b). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), 63e-663. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

- Oloketuyi, S. F., & Khan, F. (2017). Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms—current knowledge and future outlooks. *Journal Of Basic Microbiology*, 57(9), 728-743. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700071>
- Park, J. (2022). Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests. *Biosensors*, 12(10), 857. <https://doi.org/10.3390/bios12100857>
- Reglamento (UE) 2024/2895 de la Comisión, de 20 de noviembre de 2024, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 en lo que respecta a *Listeria monocytogenes*. *Boletín Oficial del Estado*, 2895, 21 de noviembre de 2024. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2024-81723>
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., & Cabo, M. L. (2018). Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. *Foods*, 7(6), 85. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>
- Rodríguez-López, P., Carballo-Justo, A., Draper, L. A., & Cabo, M. L. (2016). Removal of *Listeria monocytogenes* dual-species biofilms using combined enzyme-benzalkonium chloride treatments. *Biofouling*, 33(1), 45-58. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1261847>
- Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells*, 10(8), 1931. <https://doi.org/10.3390/cells10081931>
- Tang, M., Zhou, S., Zhang, X., Pu, J., Ge, Q., Tang, X., & Gao, Y. (2011). Rapid and Sensitive Detection of *Listeria monocytogenes* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Current Microbiology*, 63(6), 511-516. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0013-3>
- The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. (2022). *EFSA Journal*, 20(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

- Thermo Fisher Scientific. (2009) FilmTrace™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit manual. Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10316.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2009). NanoDrop 2000-2000c Spectrophotometers – User Manual. Thermo Fisher scientific inc. Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2020). Qubit 1X dsDNA HS assay kits user guide (rev. C). Retrieved from https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0017455_Qubit_1X_dsDNA_HS_Assay_Kit_UG.pdf
- Tone, K., Fujisaki, R., Yamazaki, T., & Makimura, K. (2016). Enhancing melting curve analysis for the discrimination of loop-mediated isothermal amplification products from four pathogenic molds: Use of inorganic pyrophosphatase and its effect in reducing the variance in melting temperature values. *Journal Of Microbiological Methods*, *132*, 41-45. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.020>
- Versmessen, N., Van Simaey, L., Negash, A. A., Vandekerckhove, M., Hulpiau, P., Vanechoutte, M., & Cools, P. (2024). Comparison of DeNovix, NanoDrop and Qubit for DNA quantification and impurity detection of bacterial DNA extracts. *PLoS ONE*, *19*(6), e0305650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305650>
- Wang, Y., Wang, Y., Ma, A., Li, D., Luo, L., Liu, D., Hu, S., Jin, D., Liu, K., & Ye, C. (2015). The Novel Multiple Inner Primers-Loop-Mediated Isothermal Amplification (MIP-LAMP) for Rapid Detection and Differentiation of *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, *20*(12), 21515-21531. <https://doi.org/10.3390/molecules201219787>
- Wong, Y., Othman, S., Lau, Y., Radu, S., & Chee, H. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms. *Journal Of Applied Microbiology*, *124*(3), 626-643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>

- World Health Organization: WHO. (2018, 20 febrero). *Listeriosis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- Ye, L., Li, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Meng, H., Yan, H., Miyoshi, S., & Shi, L. (2015). Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Letters In Applied Microbiology*, *61*(1), 85-90. <https://doi.org/10.1111/lam.12429>
- Zhang, X., Lowe, S. B., & Gooding, J. J. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors And Bioelectronics*, *61*, 491-499. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.039>
- Zymo Research. OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit protocol (ver. 2.0.2). Retrieved from https://files.zymoresearch.com/protocols/d6030_onestep_pcr_inhibitor_removal_kit.pdf