



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Icíá Bermúdez Fornos

**Diseño de un método basado en la técnica molecular
LAMP para la detección de *Klebsiella pneumoniae*.**

Traballo Fin de Grao

Xuño 2024

Resumen

Diseño de un método basado en la técnica molecular LAMP para la detección de *Klebsiella pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae es una bacteria gram negativa incluida dentro del grupo ESKAPE y uno de los principales patógenos oportunistas causante de infecciones nosocomiales. La propagación de cepas que combinan hipervirulencia con multirresistencia a fármacos, hace necesario el desarrollo de métodos rápidos para la detección de este patógeno. Por ello, el objetivo de este trabajo fue el de desarrollar un método basado en la técnica molecular LAMP para la detección rápida de este patógeno en tres matrices biológicas: sangre, orina y leche. Para ello, se probaron y compararon cuatro métodos simples de extracción de ADN diferentes. Se optimizó el ensayo con chelex como método seleccionado para la extracción de ADN, y tras un enriquecimiento de las muestras de 6 horas, se obtuvo un límite de detección del 95% (LOD₉₅) cercano a 2 UFC/mL para leche y orina, y a 5 UFC/mL para sangre. Finalmente, este método fue aplicable a LAMP colorimétrico con SYBR Green I como método de detección, obteniéndose un LOD₉₅ cercano a 1 UFC/mL en sangre y orina, y a 3 UFC/mL en leche. Esto permitió llevar a cabo los ensayos LAMP en menos de una jornada laboral y con un equipamiento tan sencillo como un termobloque, lo que hace apta a la técnica para ser aplicada en puntos de interés.

Palabras clave: LAMP, *Klebsiella pneumoniae*, detección rápida de patógenos, ESKAPE, extracción ADN, chelex, sangre, orina, leche.

Resumo

Deseño dun método baseado na técnica molecular LAMP para a detección de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é unha bacteria gram negativa incluída dentro do grupo ESKAPE e un dos principais patóxenos oportunistas causante de infeccións nosocomiais. A propagación de cepas que combinan hipervirulencia con multirresistencia a fármacos, fai necesario o desenvolvemento de métodos rápidos para a detección deste patóxeno. Por iso, o obxectivo deste traballo foi o de desenvolver un método baseado na técnica molecular LAMP para a detección rápida deste patóxeno en tres matrices biolóxicas: sangue, ouriños e leite. Para iso, probáronse e comparáronse catro métodos simples de extracción de ADN diferentes. Optimizouse o ensaio con chelex como método seleccionado para a extracción de ADN, e tras un enriquecemento das mostras de 6 horas, obtívose un límite de detección do 95% (LOD₉₅) próximo a 2 UFC/mL para leite e ouriños, e a 5 UFC/mL para sangue. Finalmente, este método foi aplicable a LAMP colorimétrico con SYBR Green I como método de detección, obténdose un LOD₉₅ próximo a 1 UFC/mL en sangue e ouriños, e a 3 UFC/mL en leite. Isto permitiu levar a cabo os ensaios LAMP en menos dunha xornada laboral e cun equipamento tan sinxelo como un termobloque, o que fai apta á técnica para ser aplicada en puntos de interese.

Palabras chave: LAMP, *Klebsiella pneumoniae*, detección rápida de patóxenos, ESKAPE, extracción ADN, chelex, sangue, ouriños, leite.

Summary

Design of a method based on the LAMP molecular technique for the detection of *Klebsiella pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative bacterium that is included in the ESKAPE group and one of the main opportunistic pathogens causing nosocomial diseases. The spread of strains that combine hypervirulence with multidrug resistance, makes it necessary to develop rapid methods for the detection of this pathogen. Thus, the aim of this study was to develop a method based in the molecular technique LAMP for the rapid detection of this pathogen in three biological matrices: blood, urine and milk. To this end, four different simple methods for DNA extraction were tested and compared. The assay was optimised with chelex as the selected method for DNA extraction, and after a 6 hours enrichment of the samples, a limit of detection of 95% (LOD₉₅) close to 2 CFU/mL was obtained for milk and urine, and close to 5 CFU/mL for blood. Finally, this method was applicable to colorimetric LAMP with SYBR Green I as the detection method, achieving a LOD₉₅ close to 1 CFU/mL in blood and urine, and 3 CFU/mL in milk. This allowed the LAMP assays to be carried out in less than a working day and with equipment as simple as a thermal block, making the technique suitable for point-of-care applications.

Keywords: LAMP, *Klebsiella pneumoniae*, rapid pathogen detection, ESKAPE, DNA extraction, chelex, blood, urine, milk.

Índice

1. Introducción	6
1.1. Clasificación y características generales de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
1.2. Factores de virulencia	8
1.3. Resistencia a antibióticos.....	9
1.4. Técnicas moleculares para la detección de patógenos	10
2. Objetivos	16
3. Materiales y métodos	17
3.1. Cepas bacterianas y medio de cultivo	17
3.2. Extracción de ADN	17
3.2.1. Lisis térmica directa	18
3.2.2. Chelex	18
3.2.3. Lisis térmica con purificación por <i>beads</i> magnéticas.....	19
3.2.4. Lisis térmica con purificación por Glass milk	20
3.3. Ensayos LAMP	21
3.3.1. Diseño de los cebadores.....	21
3.3.2. Enriquecimiento de las muestras	22
3.3.3. Ensayos LAMP a tiempo a real (qLAMP).....	22
3.3.4. Determinación del rango dinámico.....	22
3.3.5. Determinación del límite de detección (LOD) y otras medidas analíticas.....	23
3.3.6. Ensayos LAMP colorimétricos	23
4. Resultados	25
4.1. Comparación de los protocolos de extracción de ADN.....	25
4.2. Límite de detección	32
5. Discusión	38
6. Conclusión	44
7. Bibliografía	45

Abreviaturas

ADNe: ADN extracelular

B3: *Backward outer primer*

BHI: *Brain Heart Infusion*

BIP: *Backward inner primer*

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

cKP: *Klebsiella pneumoniae clásica*

cLAMP: LAMP colorimétrico con SYBR Green I

EMA: Monoazida de etidio

F3: *Forward outer primer*

FIP: *Forward inner primer*

hvKP: *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

Kpl: *Klebsiella pneumoniae*

Kpll: *Klebsiella quasipneumoniae*

KpIII: *Klebsiella variicola*

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle

LB: *Backward loop primer*

LF: *Forward loop primer*

LOD: Límite de detección

NA: *Nutrient Agar*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMA: Monoazida de propidio

POD: Probabilidad de detección

qLAMP: LAMP a tiempo real

qPCR: PCR cuantitativa

SHV-1: Penicilinasa cromosómica

TSB: Soja triptona

WHO: World Health Organization

1. Introducción

1.1. Clasificación y características generales de *Klebsiella pneumoniae*

La era de los antibióticos comenzó en 1928 con la llegada de la penicilina, lo que constituyó un detonante para el desarrollo de la medicina moderna. Sin embargo, el abusivo uso de antibióticos, la automedicación y la exposición a infecciones en hospitales, han tenido como resultado la aparición de bacterias con multirresistencia a fármacos (Mulani et al., 2019). En 2008, Rice agrupó bajo el término ESKAPE a aquellas bacterias patógenas que evadían la acción de los antibióticos y que además eran paradigmas en cuanto a patogénesis, transmisión y resistencia. Dentro de este grupo incluyó a los siguientes organismos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Rice, 2008). Estos patógenos son altamente virulentos, responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales y capaces de evadir la acción biocida de los agentes antimicrobianos (Navidinia, 2016; Rice, 2008).

K. pneumoniae es una bacteria Gram negativa encapsulada, carente de motilidad y comúnmente está presente en el ambiente, incluyendo el suelo, la superficie del agua y dispositivos médicos (Paczosa & Meccas, 2016). Esta especie bacteriana presenta un genoma 5.7 Mb (GCF_000240185.1) con entre 5000 y 6000 genes, de los cuales, la mayoría constituyen el genoma accesorio conformado por diversos genes localizados en plásmidos y cromosomas, que genera diferencias entre cepas (Holt et al., 2015; Martin & Bachman, 2018). Esto da lugar a que unas cepas sean oportunistas, otras presenten un fenotipo de hipervirulencia y otras de multirresistencia a fármacos. La mayoría del genoma está conformado por genes accesorios como los relacionados con la fijación de N₂, factores de virulencia, y enzimas de resistencia a antibióticos (Martin & Bachman, 2018). Inicialmente, se consideraba a *K. pneumoniae* como una especie conformada por tres filogrupos diferentes, KpI, KpII y KpIII (Davis & Price, 2016). Sin embargo, se observó que el genoma accesorio separa cada uno de estos tres filogrupos en tres especies diferentes: *K. pneumoniae* (KpI), *K. quasipneumoniae* (KpII) y *K. variicola* (KpIII) (Davis & Price, 2016; Holt et al., 2015; Martin & Bachman, 2018). Además del genoma accesorio, presenta un genoma núcleo que se corresponde con un conjunto de genes que se encuentran conservados en las tres especies (KpI, KpII y KpIII), en más del 95 % de los genomas de las mismas (Holt et al., 2015).

En personas sanas, *K. pneumoniae* coloniza superficies mucosas como pueden ser la orofaringe, la nasofaringe y el tracto gastrointestinal (Paczosa & Mecsas, 2016; Piperaki et al., 2017). Sin embargo, *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista, por lo que puede colonizar otros tejidos y causar infecciones del tracto urinario, neumonía o bacteriemias (Stojowska-swędrzyńska et al., 2022; Paczosa & Mecsas, 2016). En 1986, se observó que *K. pneumoniae* podía provocar también infecciones graves, o incluso la muerte, en individuos sanos además de en inmunocomprometidos (Chen et al., 2023). Se vio también como ciertas cepas bacterianas de dicha especie tenían la capacidad de invadir otros tejidos, experimentando una propagación metastásica desde los lugares que colonizaban de forma natural. Consecuentemente, daban lugar a múltiples infecciones severas, como abscesos piogénicos, endoftalmitis o meningitis (Chen et al., 2023; Martin & Bachman, 2018; Paczosa & Mecsas, 2016). De este modo, aquellas cepas responsables de provocar infecciones en personas inmunocompetentes fueron consideradas hipervirulentas con relación a las cepas clásicas (Chen et al., 2023; Paczosa & Mecsas, 2016). En la actualidad, se considera que la especie *K. pneumoniae* está constituida por dos principales patotipos: *K. pneumoniae* clásica (cKP) y *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKP) (Chen et al., 2023).

Las cepas de cKP son de manera natural resistentes a la ampicilina, carbenicilina, y ticarcilina debido a la producción de penicilinasa cromosómica (SHV-1) (Piperaki et al., 2017; Stojowska - swędrzyńska et al., 2022). No obstante, están adquiriendo cada vez más multiresistencia a fármacos debido a la presencia de determinantes de resistencia en cromosomas o elementos móviles (plásmidos y transposones) (Marr & Russo, 2019). Las infecciones provocadas por este patotipo se caracterizan clínicamente por ser nosocomiales y por producirse mayoritariamente en pacientes de avanzada edad o inmunodeprimidos. Adicionalmente, son monomicrobianas y no suelen invadir otros tejidos (Chen et al., 2023).

Por otro lado, el patotipo hvKP está caracterizado por su habilidad para provocar infecciones que son adquiridas en la comunidad y que pueden poner en peligro la vida de pacientes sanos además de la de aquellos inmunodeprimidos. A diferencia de las cepas del patotipo anterior, estas sí que tienen capacidad para invadir otros tejidos y provocar infecciones polimicrobianas (Chen et al., 2023; Marr & Russo, 2019). Este patotipo difiere genéticamente del cKP debido a la adquisición de un clúster de factores de virulencia codificados en plásmidos y otros elementos genéticos móviles del

cromosoma (Marr & Russo, 2019). En el estudio realizado por Kang et al. (Kang et al., 2006) donde se comparaban las infecciones provocadas por *K. pneumoniae* nosocomiales en relación con las adquiridas en la comunidad; se demostró que las primeras, de manera general, son significativamente más resistentes a agentes antimicrobianos que en el caso de las segundas.

1.2. Factores de virulencia

Un factor de virulencia de gran relevancia en las infecciones nosocomiales provocadas por *K. pneumoniae* es la formación de biofilms. Estos protegen al patógeno de la respuesta inmune del hospedador, de los antibióticos y potencian su supervivencia en tejidos epiteliales y superficies de dispositivos médicos (Ashwath et al., 2022). El biofilm se genera por un proceso de polimerización en el que los microorganismos se adhieren a superficies inertes o vivas por medio de una matriz exopolimérica que producen ellos mismos y que puede estar compuesta entre otros componentes por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y ADN extracelular (ADNe) (Ashwath et al., 2022; Bertoglio et al., 2018).

Por otro lado, en las cepas del patotipo hvKP, los factores de virulencia más comunes serían (1) Sistemas de sideróforos para la captación de hierro, (2) Producción aumentada de la cápsula, (3) Producción de la toxina colibactina y (4) Hipermucoviscosidad (Chen et al., 2023). Los seres humanos almacenan hierro unido a diversas proteínas, lo que limita la disponibilidad de hierro libre para las bacterias patógenas; para quienes representa un nutriente esencial para su crecimiento, replicación y metabolismo (Page, 2019). A bajas concentraciones de dicho metal, se promueve la síntesis de los sideróforos para la obtención de hierro, lo que potenciaría la letalidad del patógeno (Chen et al., 2023). Por otra parte, la sobreexpresión de la cápsula está estrechamente relacionada con la virulencia (Dorman et al., 2018). Lee et al. (I. R. Lee et al., 2017) comprobaron en su estudio que las cepas de *K. pneumoniae* que presentaban hipermucoviscosidad mostraban mayor tolerancia inmunitaria a las trampas extracelulares de neutrófilos. Adicionalmente, la hipermucoviscosidad se emplea para diferenciar cepas del patotipo hvKP del resto de cepas. Finalmente, la producción de colibactina es también un factor de virulencia, pues esta toxina ejerce un efecto genotóxico al unirse al ADN y romper la doble cadena de dicho ácido nucleico de la célula hospedadora (Lam et al., 2018).

1.3. Resistencia a antibióticos

En las dos últimas décadas han emergido cKP resistentes a diversos fármacos, para lo que cuentan con diferentes mecanismos: (1) expresión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que les proporcionan resistencia a cefalosporinas y monobactámicos, (2) expresión de carbapenemasas que les otorga resistencia a la mayoría de los β -lactámicos disponibles y (3) posesión del gen de resistencia a colistina *mcr-1* (Marr & Russo, 2019; Paczosa & Meccas, 2016). No obstante, el hecho de que ciertas cepas puedan portar y expresar resistencia a fármacos no potencia su hipervirulencia; por ello, de manera general estas se comportan como oportunistas. Sin embargo, esta condición hace que sean especialmente difíciles de tratar (Martin & Bachman, 2018; Paczosa & Meccas, 2016). Como consecuencia de la ausencia de tratamientos efectivos disponibles para aquellas infecciones provocadas por cepas resistentes a carbapenémicos o productoras de BLEE, dan lugar a mayores tasas de mortalidad y morbilidad que aquellas infecciones causadas por bacterias no resistentes (Paczosa & Meccas, 2016).

Este incremento en la resistencia a numerosos antibióticos por parte de cepas del patotipo cKP se ha vuelto preocupante ya que ciertas infecciones, como las del tracto urinario, se han vuelto reticentes al tratamiento. Incluso infecciones más serias como pueden ser las neumonías y bacteriemias causadas por este patógeno ponen en riesgo la vida de los que las padecen (Paczosa & Meccas, 2016). A pesar de que normalmente la resistencia a antibióticos es un fenotipo asociado a cKP, existen evidencias de cepas hipervirulentas portadoras de BLEEs o carbapenemasas (Zhang et al., 2015; Su et al., 2008). La evolución de la hipervirulencia y la multirresistencia a fármacos en hvKP supone una creciente amenaza para la salud pública (Chen et al., 2023).

Paralelamente, las enfermedades transmitidas por los alimentos y causadas por bacterias patógenas constituyen un serio reto a nivel global. La World Health Organization (WHO) reportó que en el año 2010, surgieron más de 600 millones de casos de enfermedades de origen alimentario, provocando 420.000 muertes y siendo los grupos poblacionales vulnerables, especialmente los niños menores de 5 años, los más afectados (World Health Organization, 2015).

La presencia de cepas de *K. pneumoniae* con resistencia a antimicrobianos en el suministro alimentario es alarmante (Guo et al., 2016). Los antibióticos son ampliamente

utilizados en la producción de alimentos de origen animal, lo que conlleva a la selección de las bacterias resistentes a los mismos (Davis & Price, 2016). En *K. pneumoniae* este problema se ve potenciado dada la presencia de muchos de los genes de resistencia en elementos genéticos transferibles, de modo que podrían ser movilizados a otras bacterias. Esto supondría la contribución de la especie en la resistencia a antibióticos de otras bacterias clínicamente relevantes (Guo et al., 2016).

Por otra parte, *K. pneumoniae* es una de las principales causas de mastitis bovina en rebaños de vacas lecheras (Davis & Price, 2016) y puede aislarse de la leche tanto en infecciones clínicas como subclínicas (Bhatt et al., 2012). Se demostró que la resistencia a antibióticos, incluida aquella mediada por BLEEs, es común entre *K. pneumoniae* asociada a mastitis (Locatelli et al., 2010; Timofte et al., 2014) y además, esta se consiguió aislar de las heces del ganado y del tanque de leche. Esto refleja la presencia de *K. pneumoniae* en las granjas lecheras y la posibilidad de entrar en la cadena alimentaria de dos principales modos: (1) vía leche contaminada cruda o pasteurizada de manera inadecuada y (2) como contaminante de productos cárnicos obtenidos de vacas lecheras (Davis & Price, 2016).

Guo et al. (Guo et al., 2016) concluyeron en su artículo que los alimentos pueden actuar como reservorios de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos. Sin embargo, a pesar de la amenaza que esta bacteria puede suponer para la salud pública, se carece de conocimiento suficiente en relación con la contribución por parte de los alimentos a la colonización y posterior infección en humanos (Rodrigues et al., 2022). Actualmente, la detección, aislamiento e identificación de *K. pneumoniae* no se encuentran bien integradas en los programas de vigilancia microbiológica. Adicionalmente, es importante resaltar la ausencia de herramientas estandarizadas para la detección de dicho microorganismo en alimentos (Rodrigues et al., 2022). Por ello, unas mejores estrategias de monitorización y prevención serían útiles para controlar la aparición y transmisión de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos (Guo et al., 2016).

1.4. Técnicas moleculares para la detección de patógenos

Las técnicas moleculares surgieron como una alternativa a los métodos de cultivo y han revolucionado la detección de patógenos (Elizaquível et al., 2014). Un ejemplo de

esto sería la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que amplifica el ADN diana y es ampliamente utilizada para la detección microbiana (Q. Zhang et al., 2023).

La utilidad de la PCR se expandió con el desarrollo de la PCR cuantitativa (qPCR), lo que permitió, no solo la detección, sino también la cuantificación de los ácidos nucleicos diana. En la qPCR, la inclusión de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN, o sondas marcadas con fluorescencia, permitieron la monitorización a tiempo real de la reacción de amplificación (Kuypers & Jerome, 2017). Sin embargo, este tipo de técnicas tienen ciertas desventajas como puede ser el consumo de tiempo, los costes y el requerimiento de equipos específicos (Rawnuck et al., 2022). Otro inconveniente viene dado al emplear alimentos como matriz, pues existen varias sustancias naturalmente presentes en los mismos, que inhiben la amplificación (Elizaquível et al., 2014).

Ante la necesidad de superar estas limitaciones, surgen las técnicas de amplificación isotérmicas, como puede ser la amplificación isotérmica mediada por bucle, LAMP por su nombre en inglés (Loop-mediated isothermal amplification). Este método fue desarrollado por Notomi et al. en el año 2000 (Notomi et al., 2000) y a lo largo de los años ha ido cobrando relevancia sobre todo por su sensibilidad, facilidad de uso y rapidez del método. Es de este modo como en tan solo una hora, se pueden llegar a obtener 10^9 copias empleando equipamiento básico como un baño de calor o un termobloque (Rawnuck et al., 2022). Adicionalmente, los productos obtenidos en los ensayos LAMP pueden ser detectados más rápidamente que en el caso de las técnicas estándar, pues en ocasiones, solo se requiere de análisis a simple vista (Soroka et al., 2021). Una limitación de LAMP que comparte con las técnicas moleculares convencionales, es la posibilidad de obtener falsos positivos, al no discernir bien entre células viables de aquellas que no lo son. Sin embargo, hoy en día existen diversas estrategias para solventar este problema, como puede ser la utilización de tintes específicos como la monoazida de propidio y de etidio (PMA/EMA) que son capaces de traspasar únicamente las membranas dañadas de las células muertas y unirse a su ADN de manera irreversible (Elizaquível et al., 2014). Las amplificaciones inespecíficas no son un problema exclusivo de LAMP, sino que también pueden darse en PCR/qPCR (Lamas et al., 2023).

A diferencia de las técnicas convencionales, no requiere de un termociclador y permite la detección rápida de patógenos (Moon et al., 2022). Esto se debe a la incorporación de una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de la cadena, de modo que se elimina la fase de desnaturalización del ADN (Soroka et al., 2021). Para llevar a cabo el método, también se necesitan desoxirribonucleótidos y un set de entre 4 y 6 cebadores para que de forma rápida y específica se amplifique el ADN (Moon et al., 2022; Zhang et al., 2023). En la **Figura 1** aparecen representados aquellos cebadores empleados en la reacción de LAMP: dos cebadores internos (FIP - *Forward Inner Primer*; BIP - *Backward Inner Primer*), dos cebadores externos (F3 - *Forward Outer Primer*; B3 - *Backward Outer Primer*), y dos cebadores Loop adicionales (LF- *Forward Loop Primer*; LB - *Backward Loop Primer*) (Moon et al., 2022).

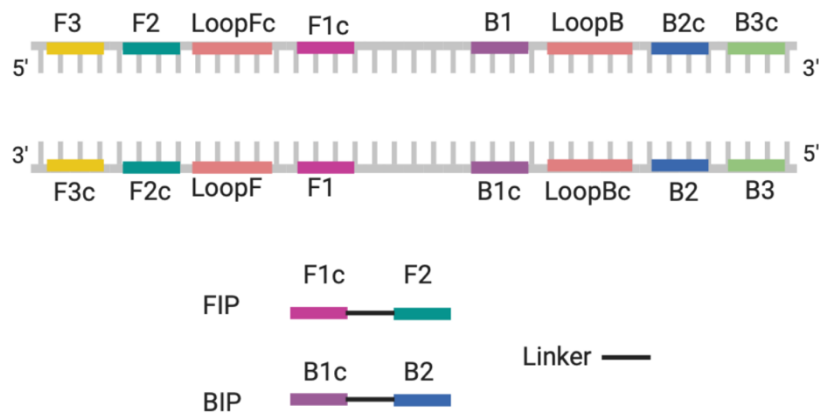


Figura 1. Representación gráfica de la posición de los cebadores para la realización de los ensayos LAMP. Creado con www.biorender.com

Los cebadores internos están compuestos por dos secuencias que se corresponden con la cadena codificante y no codificante del ADN diana de modo que facilitan la formación del bucle (Notomi et al., 2000; Parida et al., 2008). Estos suelen ser largos (45-49 pb) y complementarios a dos regiones distantes en la cadena molde (Soroka et al., 2021). Las dos secuencias se encuentran unidas por un *linker* cuya presencia tiene un impacto en los resultados de los ensayos al brindarles flexibilidad física a los cebadores para facilitar las interacciones intermoleculares (Lamas et al., 2023). Los cebadores externos son más cortos (21-24 pb), se adicionan en concentraciones menores en la mezcla de reacción para que se unan al molde más lentamente que los internos y juegan un papel relevante en el desplazamiento de la cadena durante la etapa no cíclica (Parida et al., 2008; Soroka et al., 2021). La adición de los dos cebadores

loop, tiene como finalidad acelerar la reacción de LAMP al unirse a sitios adicionales que no han sido ocupados por los cebadores internos (Nagamine et al., 2002; Parida et al., 2008).

La química que se encuentra detrás de la amplificación de LAMP se basa en el principio de la reacción de desplazamiento de la cadena llevado a cabo a una temperatura constante y empleando una ADN polimerasa. En este método se diferencian dos fases; una cíclica y otra no cíclica (Parida et al., 2008). La fase no cíclica comienza con la hibridación del cebador interno FIP en la región F2c del ADN molde de tal forma que se inicia la síntesis de la cadena complementaria. Posteriormente, F3 hibrida lentamente con la región F3c del molde, de modo que comienza el desplazamiento de la cadena de ADN a la vez que la síntesis. Es así como la cadena complementaria sintetizada que estaba unida a FIP se libera, y en consecuencia, se forma un bucle en uno de los extremos. Esta cadena sirve de molde para la hibridación de BIP que desplaza la cadena permitiendo la hibridación del cebador externo B3 y consecuentemente la síntesis de ADN. Como resultado se obtiene ADN en forma de mancuerna (**Figura 2A**), que rápidamente es convertido en una estructura tallo-bucle (**Figura 2B**) debido a la síntesis de ADN provocada por el autocebado. A partir de la estructura tallo-bucle, tiene lugar la etapa cíclica de LAMP, a partir de la cual se obtiene una mezcla de ADNs tallo-bucle con diferentes longitudes de tallo y estructuras tipo coliflor con muchos bucles formados por la hibridación de repeticiones invertidas de la secuencia diana en la misma cadena (Notomi et al., 2000).

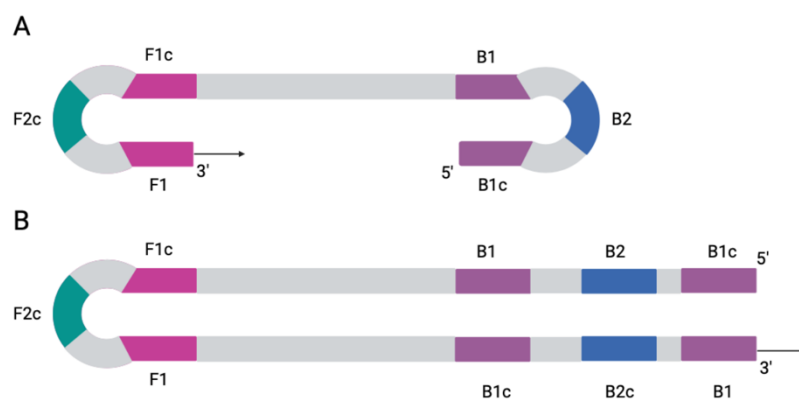


Figura 2. A- Representación gráfica del ADN en forma de mancuerna obtenido tras la etapa no cíclica de la reacción LAMP. **B-** Representación gráfica del ADN con estructura tallo-bucle obtenida a partir de la estructura representada en 2A por autocebado. Creada con www.biorender.com

Uno de los puntos críticos para que la técnica molecular LAMP progrese adecuadamente, es el diseño de los cebadores. Los pares de cebadores deben ser optimizados en diferentes aspectos como la concentración, la localización de los pares de nucleótidos, y la distancia entre las regiones identificadas del ADN diana. Adicionalmente, la temperatura de hibridación de los cebadores debe coincidir con la temperatura de funcionamiento de la ADN polimerasa empleada, que suele rondar los 60-65 °C (Soroka et al., 2021). Para poder obtener unos cebadores ideales deben tenerse en cuenta los siguientes criterios: (I) El contenido de GC debe estar sobre el 50-60 % y por tanto sobre el 40-50 % el de AT, (II) La energía libre de Gibbs de hibridación de los nucleótidos debe ser favorable para la unión de los cebadores al *target* y desfavorable para la formación de dímeros, (III) La distancia entre las regiones de unión a cebadores debe ser controlada (Meagher et al., 2018; Parida et al., 2008).

Sin embargo, pueden surgir potenciales problemas asociados con el elevado número y la concentración de los cebadores necesarios para que tenga lugar LAMP. Uno de estos problemas podría ser el aumento de las interacciones inespecíficas entre los mismos y por lo tanto el aumento del riesgo de que los cebadores sufran dimerización. Por otra parte, los cebadores internos particularmente tenderían a formar estructuras en horquilla debido a su elevada longitud (Meagher et al., 2018; Moon et al., 2022). La formación de dímeros de cebadores genera una fluorescencia de fondo y provoca una peor discriminación entre reacciones positivas y negativas. Adicionalmente, el secuestro de los cebadores en productos de doble cadena reduce la eficiencia del ensayo debido a que la bajada de la concentración de los cebadores tiene un impacto negativo en la velocidad y sensibilidad del ensayo (Meagher et al., 2018). De ahí la gran importancia de optimizar correctamente los ensayos.

La técnica LAMP tiene ciertas ventajas con respecto a las técnicas moleculares convencionales. Primeramente, LAMP permite la amplificación de ADN con alta eficiencia en condiciones isotérmicas y sin que los resultados se vean influenciados significativamente por la presencia de ADN no diana. Por otra parte, su límite de detección es similar al de una PCR convencional. Paralelamente, los productos obtenidos tras el ensayo son una mezcla de estructuras de ADN tallo-bucle con diferentes tamaños de tallo además de estructuras tipo coliflor con muchos bucles inducidos por la hibridación de repeticiones invertidas de la secuencia diana de la misma cadena. Estas características le confieren al método una detección simple, fácil y

específica (Notomi et al., 2000). Adicionalmente, esta metodología cuenta con una elevada especificidad por la secuencia diana atribuible a la gran cantidad de cebadores empleados que reconocen entre 6-8 regiones separadas (Moon et al., 2022; Notomi et al., 2000; Soroka et al., 2021). Finalmente, cabe destacar que la ADN polimerasa empleada en LAMP tiene actividad retrotranscriptasa por lo que se podrían amplificar secuencias de ARN con elevada eficiencia (Notomi et al., 2000).

Otro punto destacable de esta técnica es que LAMP es menos sensible que la PCR a los inhibidores de muestras mínimamente procesadas o sin procesar como la sangre, el esputo o la orina, haciéndolo adecuado para su uso en el diagnóstico *point-of-care* (Notomi et al., 2000). Aun así, hay ciertas matrices complejas, como algunos alimentos, que pueden llegar a inhibir la detección de los patógenos. Un ejemplo sería el quitosano presente en el cangrejo y el langostino que provoca la agregación de las moléculas molde de ADN cargadas negativamente. Otro ejemplo serían los polisacáridos presentes en el arroz que también se ha visto que son capaces de inhibir la actividad de la ADN polimerasa (Moon et al., 2022).

La técnica LAMP reduce considerablemente el tiempo de análisis, lo que ha captado la atención de los laboratorios de diagnóstico. La aplicabilidad de esta técnica en el diagnóstico de enfermedades contagiosas tanto en humanos como en animales domésticos continúa expandiéndose (Soroka et al., 2021). Esta tecnología es empleada no solo en la detección de numerosas enfermedades de origen vírico, bacteriano o parasitario, sino también en inspección para la seguridad alimentaria y cosmética (Q. Zhang et al., 2023).

2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio es el desarrollo y optimización de un método basado en la técnica molecular isotérmica LAMP para la detección de *Klebsiella pneumoniae* en sangre, orina y leche. Para ello se establecieron los siguientes subobjetivos:

- a) Evaluar cuatro métodos simples de extracción de ADN (lisis térmica directa, lisis térmica con *beads* magnéticas, lisis térmica con glass milk y chelex), en las tres matrices incluidas en el estudio.
- b) Optimizar el flujo de trabajo con el método de extracción seleccionado para conseguir una detección rápida de *K. pneumoniae* reduciendo el tiempo del ensayo a una jornada laboral (8h).
- c) Determinar el límite de detección (LOD) del método en cada una de las matrices.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas y medio de cultivo

Como microorganismo de referencia se empleó la cepa WDCM 00192 de la especie *K. pneumoniae*, adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Esta bacteria fue seleccionada para llevar a cabo la optimización y evaluación del método. Se reconstituyeron las células bacterianas liofilizadas de la cepa de referencia en medio líquido Brain Heart Infusion (BHI; Merck KGaA Darmstadt, Alemania) y se incubaron a 37 °C durante la noche. Posteriormente, se pasaron a placas con medio de cultivo Nutrient Agar (NA, Nutrient Broth VWR chemicals, EC y Agar-agar polvo, VWR chemicals, España) para las que se emplearon 3,75 g de agar-agar por cada 250 mL de medio. Tras incubar las placas a 37 °C durante 24 horas, se tomaron colonias bacterianas de las mismas para la preparación del Estándar de turbidez de McFarland. Para ello se empleó el fotómetro (Photometer DEN-600, Grant-bio) donde una absorbancia de 0,2 equivaldría aproximadamente a 10⁸ UFC/mL. A partir de esta solución obtenida, se realizaron diluciones seriadas 1:100 y se sembraron en placas con medio de cultivo NA, que tras ser incubadas a 37 °C durante 24 horas, sirvieron para realizar un recuento de las colonias, y por lo tanto, para conocer la concentración bacteriana inicial de la solución. Esta fue empleada para inocular las diferentes matrices, sangre, orina y leche, utilizadas en los diversos ensayos llevados a cabo.

3.2. Extracción de ADN

El ADN fue extraído siguiendo los diferentes protocolos que se detallan a continuación; con el objetivo de seleccionar aquel que sea más adecuado para la detección del microorganismo de referencia seleccionado. Para todos los métodos se realizó una centrifugación inicial de 16000×g durante 2 minutos (Centrifuge 5415D, Eppendorf) con el posterior descarte del sobrenadante.

Adicionalmente, en el caso de la extracción de ADN con sangre como matriz, fue necesario incubar 900 µL de la misma en 100 µL de una solución de lisis constituida por NH₄Cl al 0,8 % (Merck, KGaA Darmstadt, Alemania) durante 10 minutos antes de la centrifugación inicial. Tras dicha centrifugación, se realizó un lavado del pellet con 1 mL

de PBS con pH 7,4 (Invitrogen, Thermofisher Scientific) con su respectiva centrifugación y descarte del sobrenadante.

Al realizar la extracción de los ácidos nucleicos en leche, tras la primera centrifugación se generó una capa de grasa, que se eliminó con una espátula. Posteriormente se realizó un lavado del pellet con 1 mL de PBS y a continuación se sometió a una segunda centrifugación. Para cultivos frescos puros u orina no fueron necesarios pasos extra de incubación con solución de lisis o de lavado con PBS. En cuanto a la preservación del ADN purificado obtenido, se almacenó refrigerado (4 °C) para su aplicación a corto plazo, o congelado (-20 °C) a largo plazo.

3.2.1. *Lisis térmica directa*

Se siguió el protocolo de Ribeiro-Costa et al. (Costa-Ribeiro et al., 2024) para la extracción del ADN (**Figura 3**). Así, tras la centrifugación inicial, el pellet se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas y posteriormente se calentó a 99 °C durante 5 minutos a 1400 rpm en un termobloque. Posteriormente se centrifugó a 16000×g durante 2 minutos y se preservó el sobrenadante

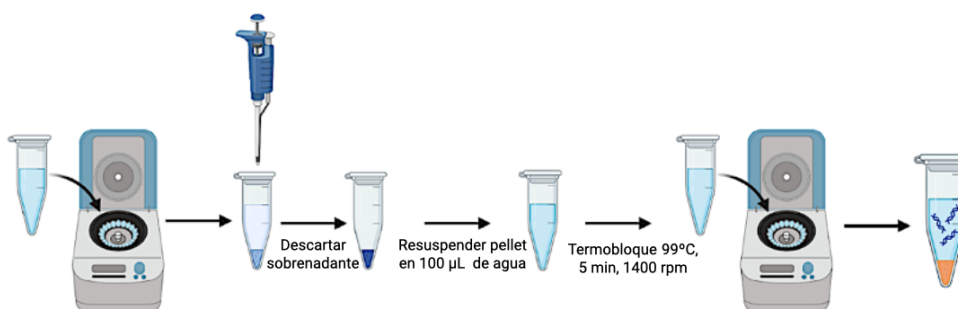


Figura 3. Resumen gráfico del protocolo para la extracción de ADN por lisis térmica directa. Creado con www.biorender.com

3.2.2. *Chelex*

El pellet se resuspendió directamente en 100 µL de Chelex[®] al 6 % (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) y se incubó durante 15 minutos a 56 °C y 1400 rpm e inmediatamente después, se calentó a 99 °C durante 8 minutos y 1400 rpm. Ambos pasos fueron ejecutados en un termobloque para microtubos de 1,5 mL (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Para finalizar, se centrifugó a 16000×g y se preservó el sobrenadante, donde se encontraba el material genético ya purificado, teniendo cuidado de no arrastrar resina (**Figura 4**).

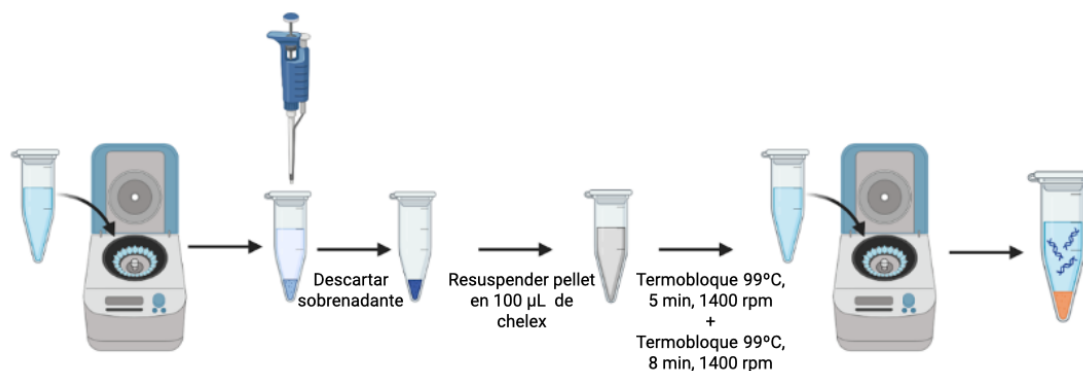


Figura 4. Resumen gráfico del protocolo para la extracción de ADN con Chelex®. Creado con www.biorender.com

3.2.3. Lisis térmica con purificación por beads magnéticas.

Este protocolo está basado en el descrito por Costa-Ribeiro et al. (Costa-Ribeiro et al., 2024) con leves modificaciones (**Figura 5**). El pellet se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas y se calentó a 99 °C por 5 minutos a 1400 rpm en un termobloqueo. A continuación, se centrifugó a 16000 × g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µL de *beads* magnéticas Mag-Bind® (Omega Bio-tek, Inc. Georgia, USA). Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador de balanceo (SBS). Posteriormente, empleando un concentrador de *beads* magnéticas (Dyna® MPC, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), se concentraron las *beads* de la solución durante 2 minutos, y con cuidado se eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados del pellet con etanol al 70 %, y finalmente, tras secarlo al aire, se añadieron 100 µL de agua libre de nucleasas que funcionó como eluyente. Finalmente se separaron las *beads* magnéticas, y se preservó el sobrenadante, pues este contenía el ADN purificado.

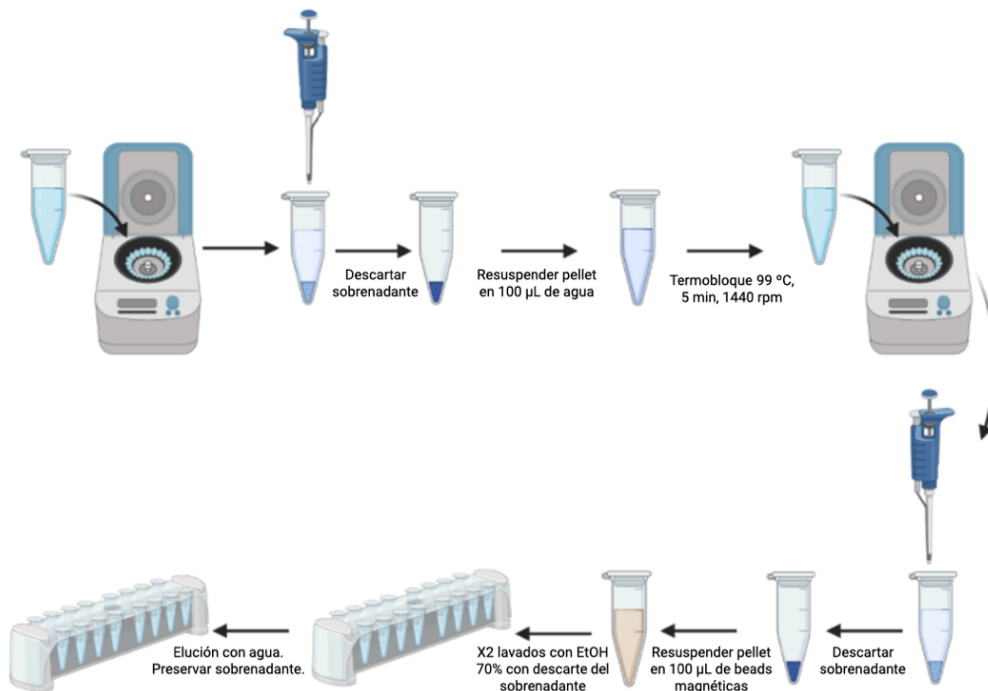


Figura 5. Resumen gráfico del protocolo para la extracción de ADN con partículas magnéticas. Creado con www.biorender.com

3.2.4. Lisis térmica con purificación por Glass milk

En este caso, para llevar a cabo la purificación del ADN, se siguió el protocolo de Page et al. (R. Page et al., 2022a, 2022b) pero realizando algunas modificaciones (**Figura 6**). Primeramente, se resuspendió el pellet en 100 µL de agua libre de nucleasas junto con 100 µL de una solución de SDS al 4 %. Tras esto, se incubó en un termobloque a 99 °C y 1400 rpm durante 5 minutos. A continuación, teniendo en cuenta que la lisis ya había tenido lugar, se añadieron 400 µL de isopropanol puro, 200 µL de una disolución de NaCl 1.25 M y 10 µL de glass milk. Posteriormente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó en una minicentrífuga (Thermo Scientific, mySPIN6) 15 segundos; preservando el pellet. Se realizaron dos lavados del pellet con etanol al 70 %, con su respectiva centrifugación en la minicentrífuga y el descarte del sobrenadante. Tras esto, se volvieron a introducir en la mini centrifuga durante 30 segundos para poder eliminar con una micropipeta el exceso de etanol que hubiera podido quedar tras los lavados, y se calentó en un termobloque durante 5 minutos a 65 °C con la tapa de los microtubos abierta. Finalmente, el pellet se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas, se centrifugó durante 15 segundos en la mini centrifuga, y se preservó el sobrenadante.

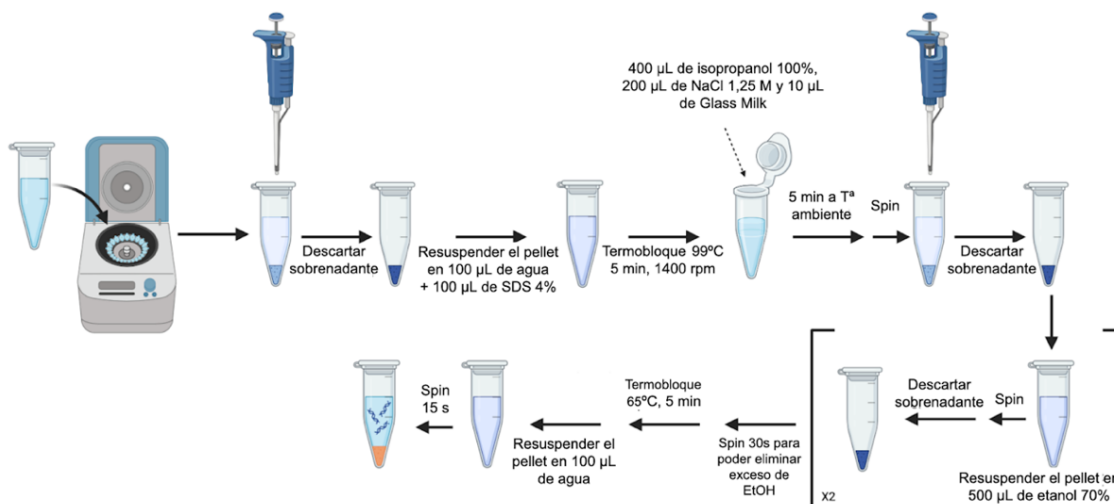


Figura 6. Resumen gráfico del protocolo para la extracción de ADN por 'Glass Milk'. Creado con www.biorender.com

3.3. Ensayos LAMP

3.3.1. Diseño de los cebadores

Para realizar el ensayo LAMP se diseñaron cebadores utilizando como herramienta Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Para ello se seleccionó la secuencia del gen que codifica para la hemolisina en la especie bacteriana *K. pneumoniae* con número de acceso NC_016845.1 en NCBI. Los cebadores diseñados se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Cebadores diseñados para los ensayos LAMP

Nombre del cebador	Secuencia (5' → 3')	Concentración STOCK (µM)
F3	TGG AAG CTG GAG CCC G	4
B3	GTG TGG ACC GAA GAA CTG C	4
FIP*	GAC GAA CTT CCT GCT CGG TGT T - ACA GCG TGG GTT TTC CCG	16
BIP*	GGC CAA CAA GAA GTA CAA CCG C - GTC AAC CCA ACG ATC CTG G	16
LF	TTG AGA AAG GTG TGG CAG ATG C	8
LB	TAC CCG CTC AAT CCC GG	8

* El "-" en FIP y BIP representa el *linker* conformado por TTTT.

3.3.2. Enriquecimiento de las muestras

Para mejorar la detección de *K. pneumoniae* en las diferentes matrices inoculadas, antes de realizar la purificación del ADN se realizó un enriquecimiento incubando 1 mL de las mismas, con 9 mL de Soja Triptona (TSB, PanReac Applichem, Castellar del Vallès, Barcelona, España) durante 6 horas en una estufa a 37 °C. Posteriormente, se procedió a la purificación del ADN y a la realización de los ensayos LAMP.

3.3.3. Ensayos LAMP a tiempo a real (qLAMP)

Las reacciones LAMP que se llevaron a cabo en los diferentes ensayos, se realizaron bajo las siguientes condiciones: un volumen final de reacción de 20 µL, de los cuales 12 µL se corresponden con la Master Mix isotérmica ISO-004 (OptiGene Ltd., Horsham, UK) que contiene la ADN polimerasa *GspSSD2.0*, 4.7 µL de agua libre de nucleasas, 0.3 µL de ROX (colorante de referencia), 2 µL de la muestra (ADN purificado) y 1 µL de la mezcla de cebadores de un stock 20X, obteniendo así, las siguientes concentraciones finales de los mismos en la mezcla de reacción: FIP/BIP 800 nM, LB/LF 400 nM y F3/B3 200 nM.

Las reacciones se llevaron a cabo a 65 °C por 30 minutos, durante los que se realizaron un total de 60 ciclos de 30 segundos, tras cada uno de los cuales, se midió la fluorescencia. Esto se llevó a cabo en el equipo QuantStudio™ 12K Flex System y se analizó con QuantStudio™ 12K Flex Software v1.2.2. (Applied Biosystems™, Foster city, CA, USA). Tras la amplificación, se realizó un análisis de las curvas de fusión, donde las muestras fueron sometidas a 95 °C durante 15 segundos, a 80 °C durante 20 segundos y finalmente se fue aumentando la temperatura 0.05 °C/s hasta alcanzar los 95 °C, midiendo la fluorescencia tras cada incremento. Un único pico de fusión entorno a los 90 °C indicaría que el ensayo es positivo para la secuencia buscada.

3.3.4. Determinación del rango dinámico

Para poder determinar el rango dinámico, fue necesario obtener el ADN empleando los diferentes métodos de extracción explicados, de cultivos frescos de la cepa de referencia de la especie *K. pneumoniae* empleada. Posteriormente, con el ADN extraído, se realizaron 6 diluciones seriadas 1/10 en agua libre de nucleasas, y se analizó siguiendo como estrategia de detección LAMP a tiempo real.

3.3.5. *Determinación del límite de detección (LOD) y otras medidas analíticas*

Se llevó a cabo por medio del método establecido por Wilrich & Wilrich (Wilrich & Wilrich, 2009). El LOD determina la concentración en UFC/g o UFC/mL con la que una muestra contaminada da positivo con una probabilidad determinada (por ejemplo, del 50 o 95 %). Para poder calcular el LOD y otras medidas analíticas como la sensibilidad, el valor negativo predictivo y la tasa de falsos negativos, se inocularon diferentes muestras de cada matriz de estudio, orina, leche y sangre, con concentraciones decrecientes de la cepa de referencia. Se enriquecieron las muestras como se especifica en Materiales y Métodos 1.3.2. y se incubaron durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente se analizó por tres metodologías diferentes: LAMP colorimétrico (cLAMP), qLAMP y siembra en placa con medio de cultivo MacConkey Agar (VWR International bvba, Leuven, Bélgica) con incubación durante 24 horas a 37 °C.

3.3.6. *Ensayos LAMP colorimétricos*

Se llevaron a cabo en microtubos de 1,5 mL con el mismo volumen de reacción que se ha mencionado en Materiales y Métodos 2.3.3. Para llevar a cabo el ensayo se tomó un fragmento de Parafilm® y se tapó la parte superior del microtubo, dejando un pequeño hueco sin cubrir. Posteriormente, se depositó 1 µL de una dilución 1:10 de SYBR Green I que se encontraba en un stock de 10000X (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), en el Parafilm® y se cerró cuidadosamente, procurando que la gota quedara en el centro de la tapa del microtubo. Una vez preparados los microtubos, se sometió la mezcla de reacción a un calentamiento durante 30 minutos a 65 °C en un termobloque (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Una vez transcurrido el tiempo, se introdujeron los microtubos en una minicentrífuga (Thermo Scientific, mySPIN6) para que la gota de SYBR Green I cayera en la mezcla de reacción. Así, se unió a los amplicones y a simple vista, pudimos diferenciar aquellas mezclas de reacción en las que había habido una amplificación y que, por tanto, eran positivas, de aquellas en las que esta no había sucedido. De este modo, las muestras positivas en *K. pneumoniae* se tornaron a un color verdoso, mientras que las negativas permanecieron de un color anaranjado. Además, el SYBR Green I unido a los amplicones, tiene la capacidad de emitir fluorescencia, por lo que, sometiéndolo a luz

UV se pudieron diferenciar las muestras positivas (emiten fluorescencia) de las negativas.

La **Figura 7** resume gráficamente el flujo de trabajo seguido que ha sido explicado a lo largo de esta sección. De este modo aparecen reflejados los diferentes pasos que han tenido lugar desde que se ha tomado la muestra, pasando por la purificación del material genético, el empleo de qLAMP, cLAMP y siembra en MacConkey Agar como métodos alternativos de detección y finalmente la visualización de los resultados.

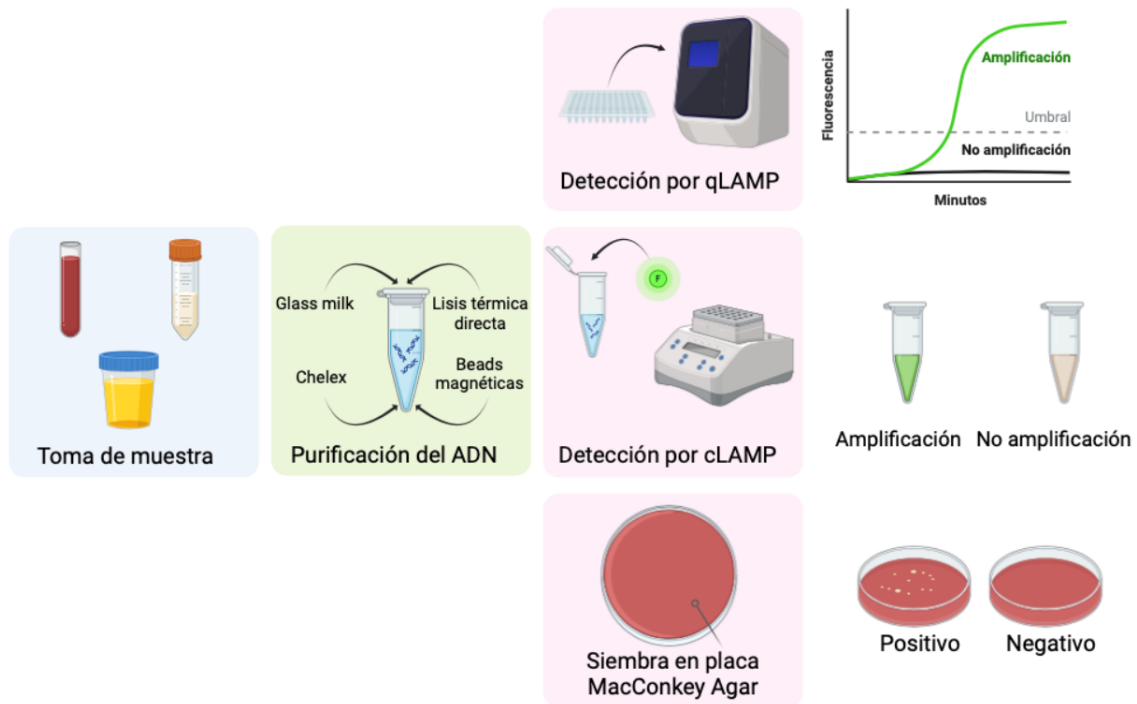


Figura 7. Representación gráfica del flujo de trabajo desde la toma de la muestra, pasando por la purificación del ADN y las tres estrategias de detección comparadas en el estudio junto con la visualización de los resultados para cada una de ellas. Creada con www.biorender.com

4. Resultados

4.1. Comparación de los protocolos de extracción de ADN

Se testaron cuatro métodos diferentes para la extracción de ADN en las tres matrices: 1) Lisis térmica directa, 2) Lisis térmica con purificación por *beads* magnéticas, 3) Chelex y 4) Lisis térmica con purificación por glass milk. En la **Tabla 2** se muestran los resultados para la matriz láctea.

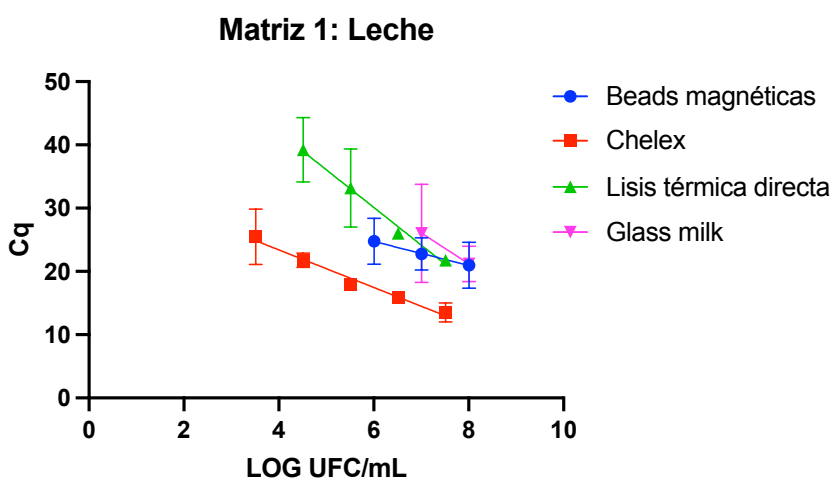
Tabla 2: Resultados obtenidos en el ensayo qLAMP en leche

Lisis térmica directa				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	Log UFC/mL
22,3	21,6	21,4	21,8±0,5	7,5
26,3	24,9	26,8	26,0±0,9	6,5
38,4	34,7	26,3	33,2±6,2	5,5
35,1	44,9	37,7	39,2±5,1	4,5
No determinado	20,9	No determinado	-	3,5
47,8	12,3	55,2	-	2,5
Chelex				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	Log UFC/mL
14,3	11,8	14,4	13,5±1,5	7,5
15,8	16,1	15,9	15,9±0,1	6,5
17,6	17,9	18,2	17,9±0,3	5,5
22,3	22,5	20,4	21,8±1,2	4,5
21,9	24,1	30,4	25,5±4,4	3,5
45,3	No determinado	40,8	-	2,5
Lisis térmica con purificación por glass milk				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	Log UFC/mL
17,9	22,8	22,8	21,2±2,8	8,0
20,5	22,7	34,9	26,1±7,8	7,0
No determinado	No determinado	27,5	-	6,0
No determinado	No determinado	No determinado	-	5,0
32,9	No determinado	22,2	-	4,0
Lisis térmica con purificación por beads magnéticas				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	Log UFC/mL
16,8	22,4	23,7	20,9±3,6	8,0
19,9	23,4	24,9	22,8±2,6	7,0
20,7	25,8	27,8	24,8±3,7	6,0
28,2	No determinado	No determinado	-	5,0
29,1	No determinado	No determinado	-	4,0

Cq: Ciclo de cuantificación

El rango dinámico se define como el intervalo existente entre el mínimo y el máximo número de copias detectables donde la reacción es lineal. Según Bustin et al. (Bustin et al., 2009) para que el experimento sea adecuado, su rango dinámico debe cubrir por lo menos tres órdenes de magnitud, e idealmente extenderse a cinco o seis. A la hora de representar gráficamente los datos, solo se tomaron en cuenta aquellas concentraciones en las que la detección de *K. pneumoniae* fue exitosa en las tres réplicas del ensayo.

Como se puede observar en los datos recogidos en la **Tabla 2**, la purificación de ADN con leche como matriz, da lugar a un rango dinámico más amplio en el caso de emplear chelex, con hasta cinco órdenes de magnitud (7,5-3,5 log UFC/mL) o lisis térmica directa con hasta cuatro que en el caso de emplear *beads* magnéticas con tres órdenes de magnitud o glass milk..Las *beads* magnéticas no solo presentan un rango dinámico más estrecho (8,0-6,0 log UFC/mL) sino que además la dispersión de los datos, como se puede comprobar en la **Figura 8** es elevada. Cuando se emplea glass milk como método de extracción, la detección de *K. pneumoniae* solo se asegura a concentraciones del orden de 8,0 a 7,0 UFC/mL (solo dos órdenes de magnitud), por lo que no es una metodología adecuada para esta matriz.



Beads magnéticas	Chelex	Lisis térmica directa	Glass milk
$Y = -1.896 \cdot X + 36.12$	$Y = -2.970 \cdot X + 35.29$	$Y = -5.953 \cdot X + 65.84$	$Y = -4.867 \cdot X + 60.15$
$R^2 = 0.2454$	$R^2 = 0.8376$	$R^2 = 0.7958$	$R^2 = 0.2067$

Figura 8. En la gráfica se muestra el número de ciclos que tarda el equipo en detectar la presencia de *K. pneumoniae* (umbral de ciclos o Cq) frente al logaritmo de la concentración inicial de dicha bacteria en leche para tres métodos de extracción diferentes; *beads* magnéticas, chelex y lisis térmica. También aparecen descritas las ecuaciones de la recta para cada método de extracción junto con su respectivo valor de R^2 .

Adicionalmente, empleando el equipo Nanodrop™ Lite Plus Spectrophotometer (Thermo Scientific™) se obtuvieron los ratios de absorbancias para cada una de las muestras cuyo ADN había sido extraído por los diferentes métodos que se comparan en este estudio. Como se refleja en la **Tabla 3**, los ratios para absorbancia 260/280 para todos los métodos de extracción en leche, están por debajo de lo que deberían (1,7-2,0), indicando una contaminación posiblemente por proteínas. Los ratios para las absorbancias 260/230 también presentan valores muy bajos (<1,5), indicando la presencia de contaminantes en la muestra (Bruijns et al., 2022). Los mejores ratios y por lo tanto el ADN más puro, lo presentan aquellas muestras cuyo material genético ha sido extraído por medio de lisis térmica con glass milk. Paralelamente, se obtuvieron datos de la concentración de ADN extraído en cada una de las muestras demostrando que la mayor cantidad de ADN se obtiene al emplear chelex.

Tabla 3: Datos de calidad y concentración del ADN extraído en leche

Método de extracción ADN	Concentración bacteriana*	A 260/280	A 260/230	Concentración ADN †
LT	$3,3 \cdot 10^7$	0,6	0,2	63,0
LT	$3,3 \cdot 10^6$	0,9	0,2	100
LT	$3,3 \cdot 10^5$	0,8	0,2	320,9
LT	$3,3 \cdot 10^4$	0,8	0,2	159,7
LT	$3,3 \cdot 10^3$	0,6	0,1	20,2
LT	$3,3 \cdot 10^2$	0,9	0,2	95,6
Che	$3,3 \cdot 10^7$	0,9	0,2	894,4
Che	$3,3 \cdot 10^6$	0,9	0,2	764,9
Che	$3,3 \cdot 10^5$	0,8	0,2	955,4
Che	$3,3 \cdot 10^4$	0,8	0,2	659,1
Che	$3,3 \cdot 10^3$	0,8	0,2	1113,2
Che	$3,3 \cdot 10^2$	0,9	0,2	1125,6
GM	$1,0 \cdot 10^8$	0,9	0,2	15,3
GM	$1,0 \cdot 10^7$	1,2	0,3	36,7
GM	$1,0 \cdot 10^6$	1,2	0,3	39,2
GM	$1,0 \cdot 10^5$	1,1	0,3	26,9
GM	$1,0 \cdot 10^4$	1,3	0,4	83,3
BM	$1,0 \cdot 10^8$	0,9	0,2	100,1
BM	$1,0 \cdot 10^7$	0,9	0,2	172,1
BM	$1,0 \cdot 10^6$	0,9	0,3	353,0
BM	$1,0 \cdot 10^5$	0,8	0,6	481,4
BM	$1,0 \cdot 10^4$	0,9	0,2	131,0

LT: Lisis térmica directa; Che: Chelex; BM: Beads magnéticas; GM: Glass milk. *UFC/mL. †ng/μL

Al extraer el ADN teniendo como matriz la sangre, se comprueba como los diferentes métodos de extracción, que habían funcionado en leche, en este caso no permiten una detección adecuada (**Tabla 4**).

Tabla 4: Resultados obtenidos en el ensayo qLAMP en sangre				
Lisis térmica directa				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio\pmSD	LOG UFC/mL
50,7	32,7	31,3	38,2 \pm 10,8	7,9
No determinado	53,6	No determinado	-	6,9
No determinado	32,6	No determinado	-	5,9
55,7	57,6	No determinado	-	4,9
Chelex				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio\pmSD	LOG UFC/mL
15,8	15,7	14,4	15,3 \pm 0,8	7,9
17,4	18,0	14,4	16,6 \pm 1,9	6,9
22,5	24,0	16,9	21,1 \pm 3,8	5,9
22,1	22,9	20,4	21,8 \pm 1,3	4,9
Lisis térmica con purificación por glass milk				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio\pmSD	LOG UFC/mL
21,3	20,9	20,8	21,0 \pm 0,3	7,9
18,2	31,3	No determinado	-	6,9
No determinado	30,7	No determinado	-	5,9
No determinado	No determinado	No determinado	-	4,9
Lisis térmica con purificación por beads magnéticas				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio\pmSD	LOG UFC/mL
No determinado	No determinado	26,3	-	7,9
No determinado	No determinado	No determinado	-	6,9
No determinado	No determinado	No determinado	-	5,9
No determinado	14,6	No determinado	-	4,9

Cq: Ciclo de cuantificación

La extracción por *beads* magnéticas, lisis térmica directa o glass milk, no son metodologías apropiadas para esta matriz. En el caso de la extracción por chelex se consigue un rango dinámico de cuatro órdenes de magnitud (7,9-4,9 log UFC/mL) con un R² de 0,6451 como se muestra en la **Figura 9**. La asociación lineal no es muy elevada, debido entre otras cosas, a la dispersión de los datos obtenidos.

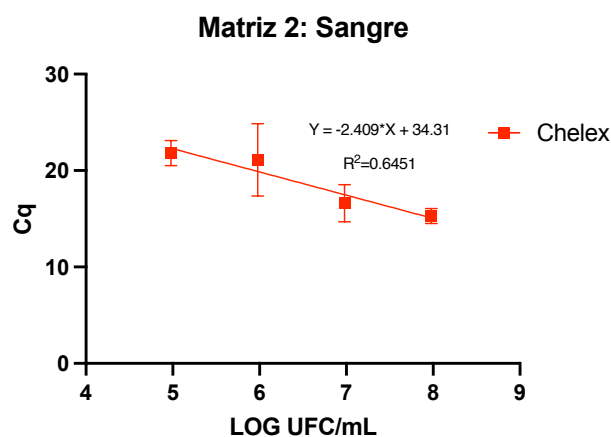


Figura 9. En la gráfica se muestra el número de ciclos que tarda el equipo en detectar la presencia de *K. pneumoniae* frente al logaritmo de la concentración inicial de dicha bacteria en sangre con chelex como método de purificación del ADN. También aparece descrita la ecuación de la recta junto con su respectivo valor de R^2 .

En la **Tabla 5** se puede comprobar como los valores para el ratio de absorbancias 260/280 se encuentran por debajo del intervalo de referencia. Sin embargo, aquellas muestras extraídas por *beads* magnéticas tienen los mejores valores de calidad. Paralelamente, el método por el que se obtienen unas concentraciones mayores de ácido nucleico es por lisis térmica directa. Los ratios para las absorbancias a 260/230 se encuentran también muy por debajo de los valores de referencia.

Tabla 5: Datos de calidad y concentración del ADN extraído en sangre

Muestra	Concentración bacteriana*	A 260/280	A 260/230	Concentración ADN†
LT	$9,5 \cdot 10^7$	1,3	0,3	11,1
LT	$9,5 \cdot 10^6$	1,2	0,2	18,5
LT	$9,5 \cdot 10^5$	1,3	0,2	11,7
LT	$9,5 \cdot 10^4$	1,3	0,3	12,4
Che	$9,5 \cdot 10^7$	0,8	-0,1	34,5
Che	$9,5 \cdot 10^6$	-0,3	0,0	10,5
Che	$9,5 \cdot 10^5$	0,3	-0,1	-9,5
Che	$9,5 \cdot 10^4$	0,7	-0,2	-81,5
GM	$9,5 \cdot 10^7$	1,4	0,3	7,0
GM	$9,5 \cdot 10^6$	1,0	0,3	3,5
GM	$9,5 \cdot 10^5$	1,7	0,3	7,5
GM	$9,5 \cdot 10^4$	1,6	0,4	13,3
BM	$9,5 \cdot 10^7$	1,7	0,4	7,1
BM	$9,5 \cdot 10^6$	1,5	0,4	27,9
BM	$9,5 \cdot 10^5$	1,6	0,3	3,8
BM	$9,5 \cdot 10^4$	1,7	0,4	6,0

LT: Lisis térmica directa; Che: Chelex; BM: Beads magnéticas; GM: Glass milk. *UFC/mL. †ng/μL

Los valores negativos que aparecen en los ratios obtenidos tras las mediciones con el Nanodrop se deben a la elevada contaminación de las muestras extraídas con los diferentes métodos.

En el caso de las extracciones de ADN en orina, como aparece recogido en la **Tabla 6**, se obtienen rangos dinámicos de cuatro órdenes de magnitud (8,5-5,5 log UFC/mL) para dos de los cuatro métodos de extracción; *beads* magnéticas y chelex. Por otra parte, al extraer el ADN por lisis térmica directa y glass milk se obtiene un rango dinámico de tres órdenes de magnitud (8,5-6,5 log UFC/mL).

Tabla 6: Resultados obtenidos en el ensayo qLAMP en orina

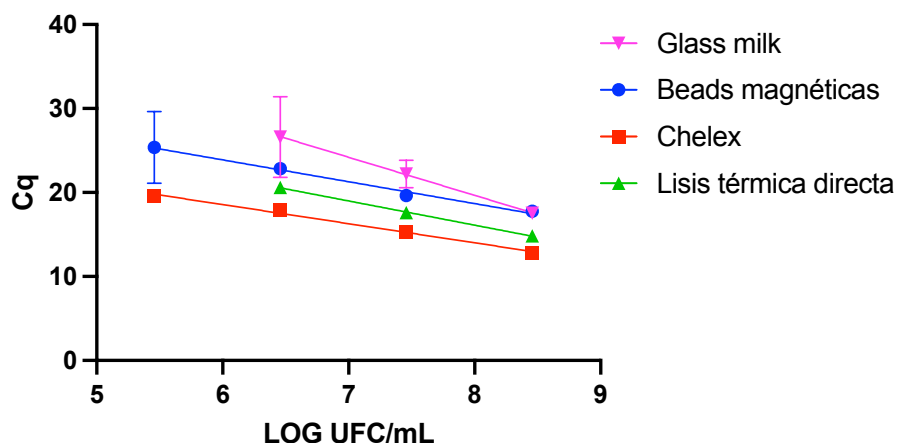
Lisis térmica directa				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	LOG UFC/mL
14,9	14,2	15,4	15,2±0,2	8,5
17,6	17,7	17,5	17,6±0,1	7,5
21,4	20,6	19,9	20,6±0,8	6,5
45,9	No determinado	34,7	-	5,5
Chelex				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	LOG UFC/mL
12,7	12,9	12,9	12,8±0,1	8,5
15,2	15,3	15,5	15,3±0,2	7,5
17,6	17,7	18,4	17,9±0,4	6,5
19,2	19,6	19,8	19,6±0,3	5,5
Lisis térmica con purificación por glass Milk				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	LOG UFC/mL
17,9	17,2	17,5	17,6±0,4	8,5
23,4	22,9	20,4	22,2±1,6	7,5
31,1	27,2	21,5	26,6±4,8	6,5
39,3	No determinado	21,1	-	5,5
Lisis térmica con purificación por beads magnéticas				
Cq1	Cq2	Cq3	Cq medio±SD	LOG UFC/mL
17,6	17,4	18,3	17,8±0,4	8,5
19,9	19,7	19,2	19,6±0,4	7,5
22,7	23,6	22,2	22,8±0,7	6,5
23,7	22,2	30,2	25,4±4,3	5,5

Cq: Ciclo de cuantificación

Como se muestra en la **Figura 10**, chelex es el protocolo que mejor asociación lineal tiene ($R^2=0,984$), seguido de la lisis térmica directa ($R^2=0,9636$), *beads* magnéticas ($R^2=0,7221$) y finalmente glass milk ($R^2=0,7028$). De este modo se demostró

como chelex no solo es el método con el rango dinámico más amplio, sino que además la asociación lineal del mismo es mayor que la del resto de protocolos de extracción.

Matriz 3: Orina



Glass milk	Beads magnéticas	Chelex	Lisis térmica directa
$Y = -4.533 \cdot X + 55.93$	$Y = -2.603 \cdot X + 39.51$	$Y = -2.276 \cdot X + 32.23$	$Y = -2.882 \cdot X + 39.18$
$R^2 = 0.7028$	$R^2 = 0.7221$	$R^2 = 0.984$	$R^2 = 0.9636$

Figura 10. En la gráfica se muestra el número de ciclos que tarda el equipo en detectar la presencia de *K. pneumoniae* frente al logaritmo de la concentración inicial de dicha bacteria en orina por cuatro métodos de purificación de ADN diferentes; Glass milk, beads magnéticas, chelex y lisis térmica directa. También aparecen descritas las ecuaciones de la recta para cada método de extracción junto con su respectivo valor de R^2 .

En cuanto a la calidad del ADN obtenido tras la extracción del material genético en orina, se puede observar en la **Tabla 7**, como la purificación del material genético por los protocolos de lisis térmica directa o chelex, da lugar a un ratio de absorbancias 260/280 más cercano al intervalo de referencia (1,7-2,0) que el resto de los métodos de extracción. Por otra parte, los ratios de absorbancia 260/230 obtenidos se encuentran por debajo del valor de referencia, indicando la presencia de contaminantes en el extracto. Paralelamente, con relación a la concentración de ADN presente en los purificados obtenidos por cada uno de los métodos de extracción, se puede comprobar como aquellas muestras que habían sido tratadas con lisis térmica directa o chelex tienen mayor cantidad del ácido nucleico que el resto. Es mencionable que los valores elevados de concentración de ADN obtenidos tras las mediciones con el Nanodrop, son debidos a una sobreestimación derivada de los niveles de contaminación de la muestra, que interfirieron en la cuantificación del material genético.

Tabla 7: Datos de calidad y concentración del ADN extraído en orina

Muestra	Concentración bacteriana*	A 260/280	A 260/230	Concentración ADN†
LT	$2,9 \cdot 10^8$	1,6	0,4	516,6
LT	$2,9 \cdot 10^7$	1,6	0,2	664,1
LT	$2,9 \cdot 10^6$	1,6	0,2	817,8
LT	$2,9 \cdot 10^5$	1,6	0,2	1368,1
Che	$2,9 \cdot 10^8$	1,6	0,5	563,1
Che	$2,9 \cdot 10^7$	1,6	0,5	585,5
Che	$2,9 \cdot 10^6$	1,6	0,2	784,4
Che	$2,9 \cdot 10^5$	1,6	0,2	770,0
GM	$2,9 \cdot 10^8$	1,5	0,7	15,1
GM	$2,9 \cdot 10^7$	1,5	0,6	20,7
GM	$2,9 \cdot 10^6$	1,6	0,5	10,5
GM	$2,9 \cdot 10^5$	1,5	0,4	14,3
BM	$2,9 \cdot 10^8$	1,5	0,4	7,6
BM	$2,9 \cdot 10^7$	1,6	0,2	4,6
BM	$2,9 \cdot 10^6$	0,6	0,0	0,2
BM	$2,9 \cdot 10^5$	2,6	0,1	0,5

LT: Lisis térmica directa; Che: Chelex; BM: Beads magnéticas; GM: Glass milk. *UFC/mL. †ng/μL

Al comparar las temperaturas de *melting* para cada una de las matrices con chelex, se observaron diferencias mínimas siendo de $89,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ para sangre, de $89,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ para leche y de $89,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$ para orina. Adicionalmente, al comparar las temperaturas de *melting* de cada uno de los métodos de extracción, se observaron diferencias más notables que en el caso anterior, siendo de $88,6 \pm 2,6^\circ\text{C}$ para lisis térmica, de $88,5 \pm 2,3^\circ\text{C}$ para glass milk, de $89,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ para chelex y de $89,2 \pm 1,6^\circ\text{C}$ para las *beads* magnéticas. Tras recopilar y comparar todos los resultados obtenidos, se comprueba como el método chelex es la mejor opción en las tres matrices para la purificación y posterior detección del ADN.

4.2. Límite de detección

Para poder calcular el LOD del ensayo para cada una de las matrices, se prepararon diferentes muestras que fueron inoculadas con diferentes concentraciones conocidas de *K. pneumoniae*. Inicialmente, se realizaron ensayos sin el enriquecimiento de las muestras, dando lugar a límites de detección demasiado altos. Finalmente, tras la inoculación de las muestras, estas se enriquecieron con TSB, y gracias a este paso previo a la extracción del ADN con chelex, se consiguió reducir el límite de detección del ensayo. Estas muestras se sometieron a tres métodos de detección diferentes: 1)

qLAMP, 2) cLAMP , 3) Siembra en MacConkey Agar. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Recopilación de los resultados obtenidos en los diferentes métodos de detección empleados para cada muestra inoculada en cada una de las matrices de estudio.

UFC/mL inoculados	Inoculaciones en sangre			Inoculaciones en leche			Inoculaciones en orina		
	qLAMP	cLAMP	MacConkey Agar	qLAMP	cLAMP	MacConkey Agar	qLAMP	cLAMP	MacConkey Agar
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	-	+	+	+	+	+	+	+	+
35	-	+	-	+	-	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	-	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	-	+	+	+
12	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	+	+	-	-	-	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8	+	+	+	-	-	-	+	+	+
7	-	+	+	+	+	-	-	+	-
5	-	-	-	+	+	+	-	-	-
5	+	+	-	+	+	-	+	+	+
2	-	+	+	+	+	-	-	-	+
2	+	+	+	-	-	-	+	+	-
1	-	-	-	-	+	-	-	-	+
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Con los resultados obtenidos tras someter a las muestras inoculadas con *K. pneumoniae* a qLAMP para cada una de las matrices, se procedió al cálculo del LOD₅₀ y LOD₉₅ siguiendo el modelo matemático de Wilrich & Wilrich (Wilrich & Wilrich, 2009). Los límites de detección obtenidos para cada matriz junto con el intervalo de confianza se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Recopilación de los límites de detección y límites de confianza del método qLAMP optimizado para tres matrices: sangre, leche y orina.

Matriz	LOD ₅₀ % = 50 % LOD en UFC/mL			LOD ₉₅ % = 95 % LOD en UFC/mL		
	Límite de detección	Límite inferior confianza	Límite superior confianza	Límite de detección	Límite inferior confianza	Límite superior confianza
Sangre	1,09	0,56	2,16	4,73	2,39	9,33
Leche	0,41	0,19	0,84	1,75	0,84	3,65
Orina	0,36	0,17	0,76	1,55	0,74	3,28

LOD₅₀: Límite de detección del 50%, LOD₉₅: Límite de detección del 95%

De este modo, el menor, y por lo tanto el mejor límite de detección, se consigue en las muestras inoculadas de orina, seguido por aquellas que tienen leche como matriz y finalmente en sangre. Sin embargo, los límites de detección para las tres matrices son relativamente bajos y por lo tanto buenos valores. Al comparar las funciones POD (Probabilidad de detección) en la **Figura 11**; se comprueba como las funciones representadas para la leche y la orina, se acercan bastante a la función POD ideal, mientras que la función de la sangre se aleja más.

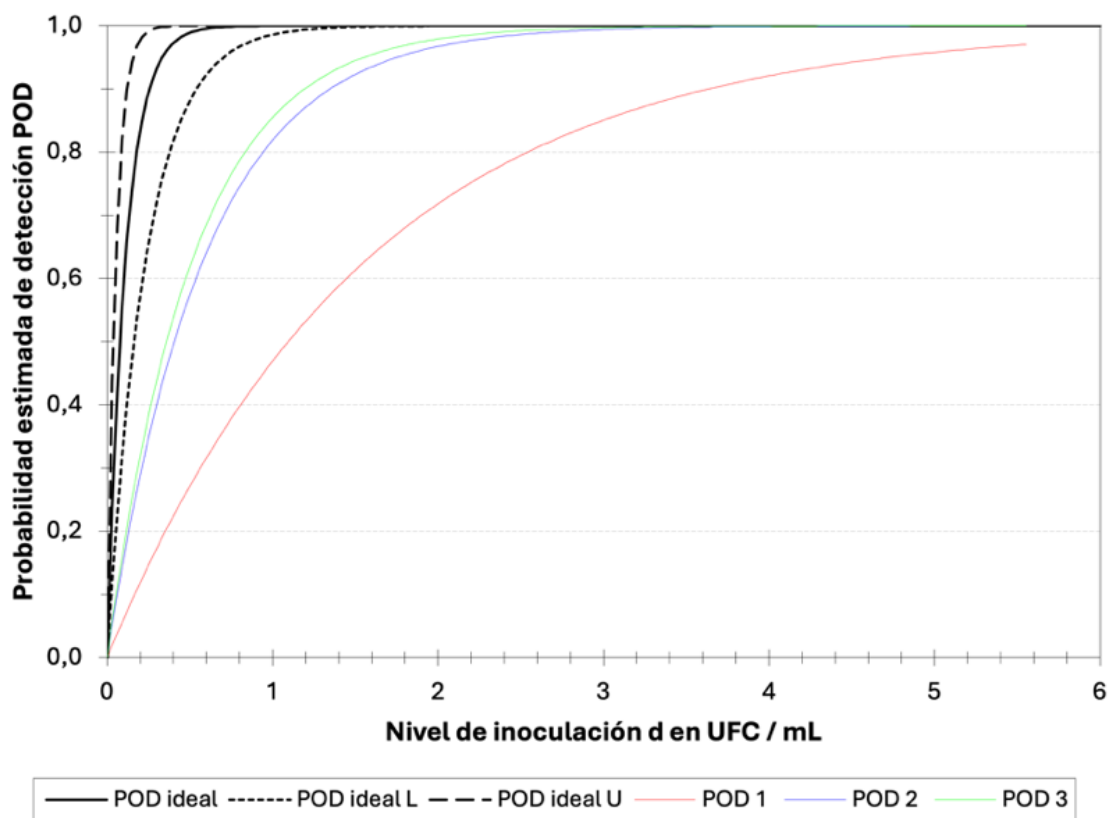


Figura 11. Representación gráfica de los datos para la determinación de LOD₉₅ en las tres matrices para LAMP a tiempo real. Se muestran 6 curvas diferentes; POD1 que se corresponde con sangre, POD 2 con leche y POD 3 con orina. POD ideal se corresponde con la curva que presentaría un método de detección ideal, POD ideal L y POD ideal U se corresponden con el límite inferior y superior de confianza ideales respectivamente.

También se calcularon los LOD₅₀ y LOD₉₅ del cLAMP para cada una de las matrices. Los límites de detección obtenidos para cada matriz junto con el intervalo de confianza se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10: Recopilación de los límites de detección y límites de confianza del método cLAMP optimizado para tres matrices: sangre, leche y orina.

Matriz	LOD ₅₀ %= 50 % LOD en UFC/mL			LOD ₉₅ %= 95 % LOD en UFC/mL		
	Límite de detección	Límite inferior confianza	Límite superior confianza	Límite de detección	Límite inferior confianza	Límite superior confianza
Sangre	0,19	0,08	0,44	0,86	0,35	2,09
Leche	0,63	0,32	1,27	2,74	1,37	5,47
Orina	0,26	0,11	0,58	1,11	0,49	2,49

LOD₅₀: Límite de detección del 50%, LOD₉₅: Límite de detección del 95%

En el caso del cLAMP, los mejores límites de detección se obtienen para las muestras de sangre inoculadas, siendo las de leche las que peor límite tienen. Adicionalmente, al observar la **Figura 12**, se comprueba como las funciones de sangre y orina se acercan más al POD ideal en relación con la leche.

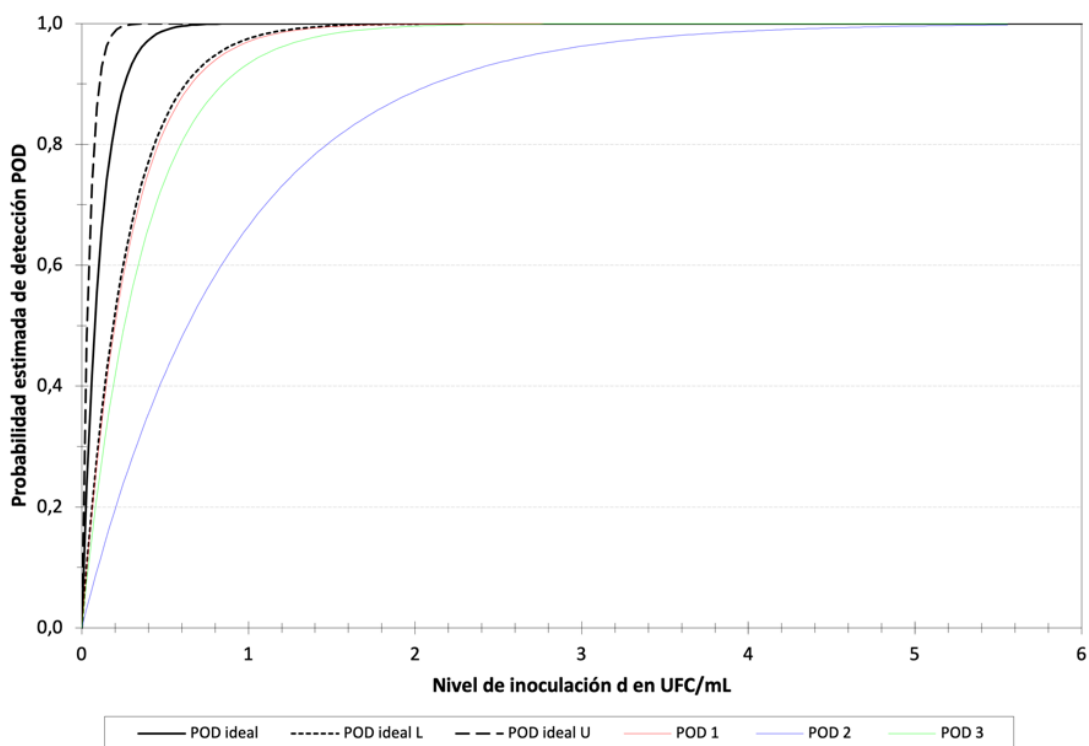


Figura 12. Representación gráfica de los datos para la determinación de LOD₉₅ en las tres matrices para cLAMP. Se muestran 6 curvas diferentes; POD1 que se corresponde con sangre, POD 2 con leche y POD 3 con orina. POD ideal se corresponde con la curva que presentaría un método de detección ideal, POD ideal L y POD ideal U se corresponden con el límite inferior y superior de confianza ideales respectivamente.

Al comparar los datos que aparecen recopilados en la **Tabla 9** y **Tabla 10**, se pueden observar diferencias entre las dos estrategias de detección empleadas, pues al detectar colorimétricamente los productos de LAMP empleando SYBR Green I, se obtienen unos límites de detección peores para las muestras de leche y mejores para las de sangre y orina, en relación con los obtenidos por qLAMP.

La sensibilidad con la que se detecta *K. pneumoniae* varía no solo entre las diferentes matrices de partida, sino también entre los propios protocolos de detección estudiados. De este modo, se puede observar en la **Tabla 11** como la detección por cLAMP presenta una mejor sensibilidad en sangre que en orina o leche, mientras que en el caso de qLAMP la peor sensibilidad se da para esa misma matriz. En leche y orina se detecta *K. pneumoniae* con una sensibilidad similar independientemente de la estrategia de detección empleada. Adicionalmente, es mencionable la menor tasa de falsos negativos que presenta cLAMP para sangre y orina en relación con qLAMP, mientras que dicha tasa es igual para ambas estrategias en muestras de leche.

Tabla 11: Otras métricas de los ensayos LAMP

Métrica	Fórmula	Resultados qLAMP*			Resultados cLAMP†		
		Leche	Sangre	Orina	Leche	Sangre	Orina
Sensibilidad	$\frac{TP}{TP + FN}$	0,80	0,65	0,80	0,80	0,90	0,85
Valor negativo predictivo	$\frac{TN}{TN + FN}$	0,20	0,14	0,20	0,20	0,33	0,25
Tasa de falsos negativos	$\frac{FN}{FN + TP}$	0,20	0,35	0,20	0,20	0,16	0,15

TP: True positive, FN: False negative, TN: True negative. *Para las tres matrices, n=21 siendo n el número de muestras inoculadas e los cuales en leche TN=1, TP=16, FN=4, en sangre TN=1, TP=13, FN=7 y en orina TN=1, TP=16, FN=4 † Para las tres matrices n=21 siendo n el número de muestras inoculadas, de los cuales en leche TN=1, TP=16, FN=4, en sangre TN=1, TP=18, FN=2 y en orina TN=1, TP=17, FN=3

En la **Figura 13** se ilustran los resultados visualizados por cada uno de los tres métodos de detección empleados en este estudio, para un mismo nivel de inoculación (50 UFC) en cada una de las tres matrices utilizadas. En los tres métodos de detección se necesitaron 6 horas de incubación de las muestras. Para la obtención de resultados tras siembra en MacConkey agar, ilustrado en **13-A**, **13-B** y **13-C**, se necesitaron además, 24 horas de incubación de las placas sembradas; de modo que tuvieron que pasar 30 horas hasta poder determinar si una muestra era positiva o negativa en *K.*

pneumoniae. Paralelamente, en las **Figura 13-E** y **13-F** se muestra la visualización de las mismas muestras pero por cLAMP y qLAMP respectivamente. Para ambos métodos de detección se invirtieron menos de 30 minutos en la extracción del ADN por chelex, y otros 30 minutos de amplificación, que junto con la incubación previa de las muestras, suman un total de 7 horas. De este modo se comprueba, como qLAMP y cLAMP proporcionan resultados en un tiempo menor que la siembra placa, y además cLAMP lo hace con un equipamiento sencillo.

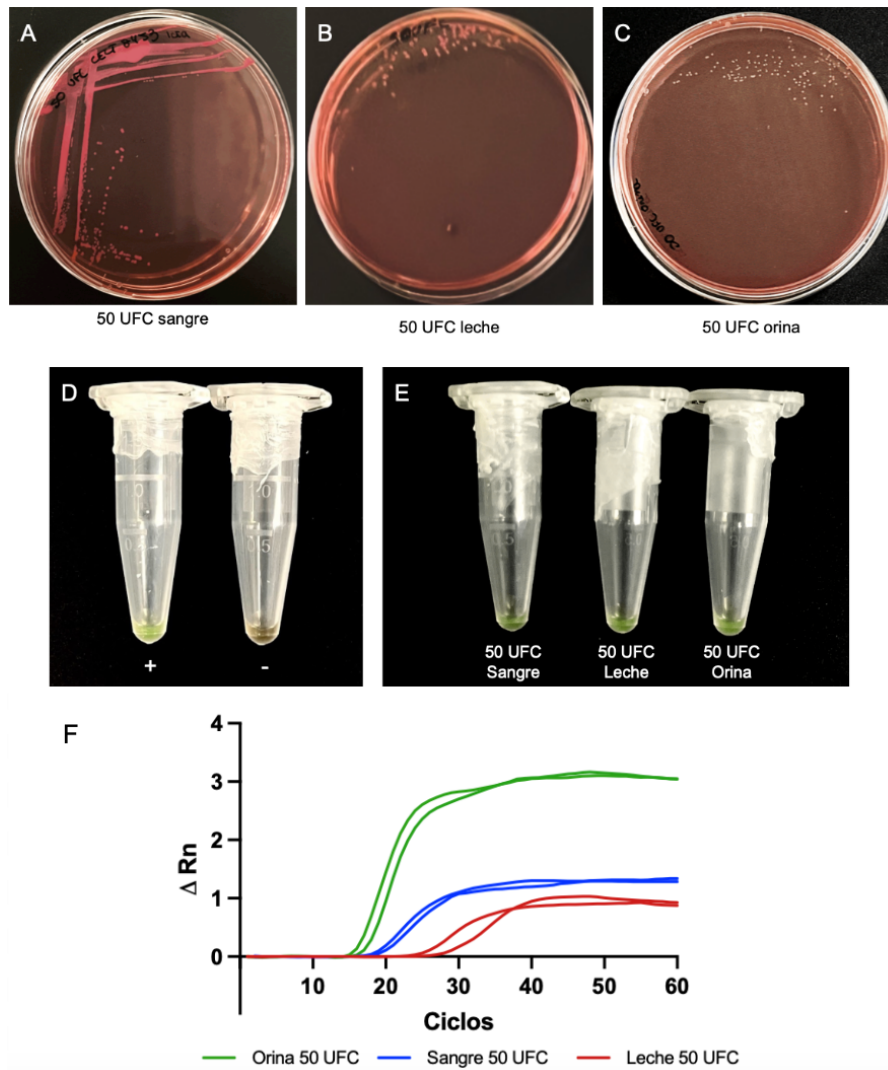


Figura 13. **A, B y C** colonias de *K. pneumoniae* en MacConkey Agar, de muestras de sangre, leche y orina inoculadas con 50 UFC de la bacteria. **D** diferencias de coloración entre una muestra positiva para *K. pneumoniae* y una negativa, empleando cLAMP como método de detección. **E y F** muestran el resultado de las mismas muestras sembradas en placa para cLAMP y qLAMP, respectivamente.

5. Discusión

El objetivo de este estudio fue de desarrollar un método de detección rápida de *K. pneumoniae*, uno de los patógenos causantes de un mayor número de muertes debido a su resistencia a los antimicrobianos. Para ello, se empleó la técnica molecular LAMP, evaluándose su rendimiento para cuatro métodos de extracción de ADN diferentes y se optimizó para tres matrices: sangre, orina y leche. Se emplearon dos estrategias diferentes para la detección de dicha especie bacteriana: 1) qLAMP con monitorización de fluorescencia y 2) cLAMP.

Al comparar los cuatro métodos de extracción de ADN se observó que, para las tres matrices, el mejor protocolo era el que empleaba chelex, pues no solo presentó la mayor asociación lineal, sino que además dio lugar a valores de Cq más bajos, lo que indica una mayor concentración de ADN a igualdad de pureza, al conseguirse detectar la presencia de *K. pneumoniae* en menos tiempo. Por otra parte, tanto en leche como en sangre a pesar de que la calidad del ADN extraído no fue óptima para este protocolo, se obtuvo el rango dinámico más amplio, probablemente por la ya mencionada resistencia del LAMP a los inhibidores típicos. Adicionalmente, la linealidad de los resultados obtenidos no se vio influenciada por la baja calidad del material genético. En el caso de la orina, las *beads* magnéticas y el chelex tienen el mismo rango dinámico, sin embargo, la extracción de ADN con las primeras tiene un coste más elevado (**Tabla 12**), además de una eficiencia menor y una peor asociación lineal.

Tabla 12: Comparación de costes de los cuatro protocolos de extracción

Protocolo de extracción de ADN	Cantidad	Precio	Nº muestras	Precio/muestra
Beads magnéticas	5 mL	125 €	50	2,50 €
Chelex	100 g	375 €	16666	0,02 €
Sílica*	500 g	132,20 €	71428	<0,01€
Lisis térmica directa*	-	-	-	0 €

*El glass milk empleado para el protocolo de extracción es una suspensión de sílica. + La lisis térmica directa no precisa de reactivos específicos.

Si se comparan los costes para cada uno de los métodos, se comprueba como hay una gran diferencia entre los mismos, siendo las *beads* magnéticas las más caras. Por lo tanto, aunque para todas las matrices la calidad del ADN extraído se acerca a los

valores de los ratios de absorbancia establecidos, su rango dinámico es más estrecho en relación con el método seleccionado. En el hipotético caso de que se quisiera aumentar el rango dinámico para dicho protocolo, sería necesario aumentar la cantidad de *beads* empleadas, pues uno de los motivos por los que se detectan menos órdenes de magnitud, podría ser la saturación de las *beads* magnéticas. Es decir, que a pesar de que puedan quedar moléculas de ADN por purificar, finalmente son descartadas ante la ausencia de *beads* magnéticas libres a las que se puedan unir. No obstante, un aumento de la cantidad adicionada de *beads* en el protocolo de extracción, derivaría en un aumento del precio/muestra.

A pesar de que empleando el equipo Nanodrop™ Lite Plus Spectrophotometer (Thermo Scientific™) se consiguió cuantificar el ADN de doble cadena presente en cada una de las muestras, al tratar de hacerlo empleando el Invitrogen™ Qubit™ 4 Fluorometer no fue posible debido a que la señal de fluorescencia se encontraba por debajo del rango detectable. La sobreestimación de la cantidad de ADNbc por parte del Nanodrop con relación a lo obtenido por el Qubit, se debe probablemente a que el equipo mide la absorbancia a 260 nm, longitud de onda a la cual, no solo absorbe el ADNbc, sino también el ADNmc y el ARN. Paralelamente, las mediciones del Qubit se obtienen empleando fluorescencia y son específicas para el ADNbc (Bruijns et al., 2022). Es por ello por lo que se recomienda combinar un método espectrofotométrico como el Nanodrop con uno fluorimétrico como el Qubit, para obtener y contrastar datos de pureza y cuantificación del ADNbc (Bruijns et al., 2022; Simbolo et al., 2013).

Para determinar la pureza del ADN, se optó por la obtención de los ratios de absorbancias: 260/280 y 260/230 empleando el Nanodrop. Una vez obtenidos los ratios, estos otorgan información sobre los contaminantes presentes en las muestras. De este modo, para el ratio 260/280 nm se recomiendan valores entre 1,7-2,0; siendo el valor 1,8 el óptimo de calidad del ADN. Un valor por debajo de 1,7 indicaría contaminación por compuestos fenólicos o proteínas. Por otra parte, para el ratio 260/230 nm, valores por encima de 1,5 indican una buena calidad del material genético extraído (Bruijns et al., 2022). Como se mencionó en el apartado de resultados, los ratios de pureza obtenidos se encuentran en todos los casos por debajo de lo deseado, lo que puede ser debido a contaminantes remanentes tras la purificación pertenecientes a la matriz de partida. Además, en el caso del chelex, cabe la posibilidad de que, tras la extracción del ADN, hayan podido quedar restos de la resina que interfieran en la pureza del mismo.

Existen ciertos componentes en las matrices que a elevadas concentraciones podrían llegar a inhibir la reacción de LAMP. Nwe et al. (Nwe et al., 2024) estudiaron el efecto inhibitorio de la urea sobre las reacciones de LAMP, y comprobaron que este metabolito debía estar en concentraciones de alrededor de 1200 mM para llegar a inhibir la reacción. Realmente, esta concentración es superior a la que se esperaría encontrar en muestras reales de orina y además, es mucho más elevada de la que se observó que inhibía las PCR (~50 mM) (Khan et al., 1991). Por otro lado, se vio que la hematina que se encuentra en la sangre a concentraciones superiores de 25 μ M podía provocar una reducción en la intensidad de fluorescencia en qLAMP al actuar como *quencher* (Nwe et al., 2024). Otro inhibidor que puede afectar al rendimiento de la reacción, es el Ca^{2+} que no solo está presente en la leche, sino que también se encuentra en fluidos biológicos como la sangre (Vavrusova & Skibsted, 2014) y la orina (Foley et al., 2010). Este catión, al ser divalente, compite con el cloruro de magnesio por unirse a la ADN polimerasa y además podría estabilizar estructuras secundarias y terciarias del ADN. Se genera un aumento de la temperatura de *melting* así como de los C_q , dependiente de la concentración de CaCl_2 (Nwe et al., 2024). Todos los componentes potencialmente inhibitorios mencionados, se encuentran en las matrices que fueron objeto de estudio; por lo que una purificación del ADN tras la que permanezcan ciertos contaminantes, podría haber afectado al rendimiento del ensayo. Adicionalmente la diferencia en cuanto a rango dinámico, linealidad y límite de detección entre los métodos de extracción, puede venir dada también por la capacidad de los mismos para separar estos contaminantes presentes en las matrices, del material genético de interés.

Para conseguir un límite de detección, y en consecuencia, una sensibilidad adecuada, se realizó un pre-enriquecimiento de *K. pneumoniae* en las tres matrices previo a la purificación del ADN. La incubación de las muestras de sangre con TSB ya había mostrado en otros estudios no solo mejorar la sensibilidad del método de detección (Andini et al., 2018) sino también hacerla más eficiente, al conseguirse la detección del patógeno en menos ciclos en PCR (Jordan & Durso, 2000) y en qPCR (Andini et al., 2018).

El límite de detección del 95 % obtenido en LAMP en orina por Jevtuševskaja et al. (Jevtuševskaja et al., 2016) para *Chlamydia trachomatis* fue de 70 copias por cada reacción de LAMP, lo que aproximadamente equivaldría a $5,8 \cdot 10^4$ UFC/mL, asumiendo que una UFC se corresponde con una bacteria. En ese trabajo no se realizó un

enriquecimiento de las muestras de orina con TSB ni tampoco se llevó a cabo un paso de purificación o concentración del ADN. Su principal objetivo era el de acortar al máximo el tiempo de detección (30 minutos), además de conseguir un método que no precisara de personal especializado o equipo adicional. En el presente estudio se invirtieron 6 horas de pre-incubación de las muestras y menos de media hora de purificación del ADN, pasos previos a la detección por LAMP. Sin embargo, aunque se invierte más tiempo en el transcurso del protocolo establecido en este trabajo, se consigue un límite de detección menor, se asegura una menor presencia de sustancias inhibidoras que puedan interferir con el rendimiento del ensayo y en menos de una jornada laboral de 8 horas se consigue determinar la presencia o ausencia del patógeno en la muestra.

Kaneko et al. (Kaneko et al., 2007), compararon las diferencias entre LAMP y PCR en cuanto a detección de patógenos, en función del porcentaje de sustancias contaminantes presentes en la muestra. Comprobaron como el LAMP se ve menos afectado por los diversos componentes presentes en las muestras clínicas en comparación a la PCR. Es por esto, que en ocasiones es posible llevar a cabo LAMP sin necesidad de un paso para la purificación del material genético como en el caso del estudio de Jevtuševskaja et al. (Jevtuševskaja et al., 2016). En ocasiones, saltarse este paso tiene un impacto negativo en la sensibilidad del método, pero tiene otras ventajas como el ahorro de tiempo y dinero, además de hacer menos laboriosa la metodología.

Por otra parte, Poirier et al. (Poirier et al., 2022) obtuvieron un límite de detección en torno a 7,6 UFC/reacción en muestras de sangre, que se corresponderían aproximadamente con $1,5 \cdot 10^3$ UFC/mL. Este LOD lo obtuvieron tras inocular muestras de sangre a diferentes concentraciones de *K. pneumoniae*. En este caso no se realizó un enriquecimiento de las muestras por lo que no hubo una expansión bacteriana y, por lo tanto, es coherente que el límite de detección sea 1000 veces mayor que en el presente estudio. Adicionalmente, la purificación del ADN fue realizada por medio de un kit comercial lo que, explicaría que su LOD sin enriquecimiento sea mejor que el que se observó en este estudio al obtener el rango dinámico. Sin embargo, extraer el ADN con un kit comercial aumentaría notablemente el coste de cada muestra analizada.

Para asegurar la calidad y la seguridad de los productos lácteos son necesarios métodos de detección efectivos (Qi et al., 2024). En la industria láctea se emplea

comúnmente la detección por cultivo, siendo este tipo de técnicas considerado el *gold standard* (Sudhakaran & Anand, 2020). A pesar de lo sencillos que son este tipo de protocolos, consumen tiempo y son laboriosos, de modo que no se adaptan a las necesidades de ciertos productos lácteos que deben salir a la venta cuanto antes debido a su corta vida útil (Zeng et al., 2016). Por otra parte, ciertos métodos basados en cultivo cuentan con la problemática de que algunos patógenos humanos, entre otros *K. pneumoniae*, pueden entrar en un estado fisiológico “viable pero no cultivable” en el que viven, pero no pueden crecer fuera de su hábitat natural (Oliver James, 2005). Es por ello que surge la necesidad de optimizar métodos de detección rápida que permitan diferenciar entre las células viables de las que no lo son en este tipo de matrices lácteas.

Por otro lado, la detección de bacterias por técnicas moleculares convencionales presenta problemas para discernir entre células viables de aquellas que no lo son (Elizaquível et al., 2014). Sin embargo, en seguridad alimentaria esta diferenciación es crítica, pues solo los patógenos viables constituyen un riesgo para la salud (Zeng et al., 2016). En este estudio, no se asegura que las células bacterianas detectadas sean viables, pero esto se podría solventar fácilmente con la adición de tintes biológicos como el EMA o el PMA (Elizaquível et al., 2014; Zeng et al., 2016).

Teniendo en cuenta los potenciales problemas derivados de la técnica molecular LAMP ya comentados como puede ser la aparición de falsos positivos, se tomaron precauciones a la hora de realizar los ensayos. Es por ello que en qLAMP se sellaron las placas de 96 pocillos antes de someter a las muestras al proceso de amplificación y el cLAMP se llevó a cabo en microtubos que permanecieron cerrados desde que tuvo lugar el inicio de la reacción. Estas medidas fueron adoptadas puesto que, si los ensayos se realizaran de tal forma que los amplicones estuvieran en contacto con el ambiente, estos podrían generar aerosoles que tendrían la capacidad de provocar un arrastre de contaminaciones en futuros ensayos (Bao et al., 2020; Quyen et al., 2022)

El hecho de que los ensayos de cLAMP compitan en cuanto a sensibilidad y tasa de falsos negativos, así como en límite de detección, con respecto a qLAMP, como se muestra en el apartado de resultados, solo es un motivo más para resaltar las posibilidades que presenta esta técnica isotérmica para trasladar los ensayos de los equipos sofisticados de monitoreo de la fluorescencia, a equipamiento más básico como un termobloque o un baño de calor. Es así como la técnica molecular LAMP puede ser

empleada en cualquier lugar, sin necesidad de técnicos entrenados ni laboratorios sofisticados (Srivastava & Prasad, 2023). De hecho, existen diversos casos en los que incluso se han conseguido diseñar equipos portátiles para realizar *screenings* rápidos basados en esta técnica; como el dispositivo desarrollado por Lee et al. (Lee et al., 2019) para una detección rápida e *in-situ* de aguas contaminadas con materia fecal.

6. Conclusión

En este trabajo se consiguió desarrollar un protocolo de detección rápida para *K. pneumoniae* basado en la técnica molecular LAMP en tres matrices diferentes: sangre, orina y leche.

- a) Entre los cuatro métodos de extracción de ADN evaluados, se determinó que el más adecuado para las tres matrices de estudio era el chelex; no solo por su amplio rango dinámico, sino también por la elevada asociación lineal y baja dispersión de los datos, así como por el bajo coste y rapidez del protocolo.
- b) Se optimizó el flujo de trabajo con chelex como método de extracción del ADN consiguiéndose reducir el tiempo del ensayo a menos de 7 horas: 6 horas de incubación, menos de 30 minutos de extracción de ADN y 30 minutos de LAMP.
- c) Se obtuvo el límite de detección para cada una de las matrices y se comparó el obtenido por qLAMP y cLAMP. Para ambas metodologías se consiguieron LOD₉₅ cercanos a 1 UFC/mL para las tres matrices, a excepción de la matriz láctea en cLAMP que dio lugar a un LOD₉₅ de 2,74 UFC/mL y la sangre en qLAMP con 4,73 UFC/mL.
- d) La detección de *K. pneumoniae* empleando cLAMP, posibilita la aplicación del método desarrollado en puntos de interés.

7. Bibliografía

- Andini, N., Hu, A., Zhou, L., Cogill, S., Wang, T.-H., Wittwer, C. T., & Yang, S. (2018). A “Culture” Shift: Broad Bacterial Detection, Identification, and Antimicrobial Susceptibility Testing Directly from Whole Blood. *Clinical chemistry*, 64(10), p. 1453-1462. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.290189>
- Ashwath, P., Deekshit, V. K., Rohit, A., Dhinakaran, I., Karunasagar, I., Karunasagar, Indrani, Akhila, D. S. (2022). Biofilm Formation and Associated Gene Expression in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Specimens. *Current Microbiology*, 79(3), p. 73. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02766-z>
- Bao, Y., Jiang, Y., Xiong, E., Tian, T., Zhang, Z., Lv, J., Li, Y., & Zhou, X. (2020). CUT-LAMP: Contamination-Free Loop-Mediated Isothermal Amplification Based on the CRISPR/Cas9 Cleavage. *ACS Sensors*, 5(4), p. 1082–1091. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00034>
- Bertoglio, F., Bloise, N., Oriano, M., Petrini, P., Sprio, S., Imbriani, M., Tampieri, A., & Visai, L. (2018). Treatment of biofilm communities: An update on new tools from the nanosized world. In *Applied Sciences (Switzerland)* 8(6), 845. <https://doi.org/10.3390/app8060845>
- Bhatt, V. D., Ahir, V. B., Koringa, P. G., Jakhesara, S. J., Rank, D. N., Nauriyal, D. S., Kunjadia, A. P., & Joshi, C. G. (2012). Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), p. 639-650. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05244.x>
- Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods. *Analytica*, 3(3), p. 371-384. <https://doi.org/10.3390/analytica3030025>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), p. 611–622. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.112797>
- Chen, J., Zhang, H., & Liao, X. (2023). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance* 16, p. 5243-5249. <https://doi.org/10.2147/IDR.S418523>

- Costa-Ribeiro, A., Lamas, A., Mora, A., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2024). Moving towards on-site detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat leafy greens. *Current Research in Food Science*, 8, 100716. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2024.100716>
- Davis, G. S., & Price, L. B. (2016). Recent Research Examining Links Among *Klebsiella pneumoniae* from Food, Food Animals, and Human Extraintestinal Infections. *Current Environmental Health Reports*, 3, p. 128-135. <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0089-9>
- Dorman, M. J., Feltwell, T., Goulding, D. A., Parkhill, J., & Short, F. L. (2018). The capsule regulatory network of *Klebsiella pneumoniae* defined by density-traDISort. *MBio*, 9(6), e01863-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01863-18>
- Elizaquível, P., Aznar, R., & Sánchez, G. (2014). Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), p. 1-13. <https://doi.org/10.1111/jam.12365>
- Foley, K. F., Boccuzzi, L., & Foley, K. (2010). Urine Calcium: Laboratory Measurement and Clinical Utility. *Laboratory medicine*, 41(11), p. 683-686. <https://doi.org/10.1309/LM9SO94ZNBHEDNTM>
- Guo, Y., Zhou, H., Qin, L., Pang, Z., Qin, T., Ren, H., Pan, Z., & Zhou, J. (2016). Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Food Samples. *PLoS ONE*, 11(4), e0153561. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153561>
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Van Nguyen, K., Nguyen, T. V., Dao, T. T., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), E3574-E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- James D. Oliver. (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *Journal of Microbiology*, 43(spc1), p. 93–100.
- Jevtuševskaja, J., Uusna, J., Andresen, L., Krölov, K., Grellier, T., Tulp, I., & Langel, Ü. (2016). Combination with antimicrobial peptide lyses improves loop-mediated isothermal amplification based method for *Chlamydia trachomatis* detection directly in urine sample. *BMC infectious Diseases*. 16, 329. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1674-0>

- Jordan, J. A., & Durso, M. B. (2000). Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), p. 2574–2578. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2574-2578.2000>
- Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., & Suzutani, T. (2007). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(3), p. 499–501. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008>
- Kang, C. I., Kim, S. H., Bang, J. W., Kim, H. Bin, Kim, N. J., Kim, E. C., Oh, M. D., & Choe, K. W. (2006). Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: Clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *Journal of Korean Medical Science*, 21(5), p. 816-822. <https://doi.org/10.3346/jkms.2006.21.5.816>
- Khan, G., Kangro, H. O., Coates, P. J., & Heath, R. B. (1991). Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology*, 44(5), p. 360-365. <https://doi.org/10.1136/jcp.44.5.360>
- Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2017). Applications of digital PCR for clinical microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), p. 1621–1628. <https://doi.org/10.1128/jcm.00211-17>
- Lam, M. M. C., Wyres, K. L., Duchêne, S., Wick, R. R., Judd, L. M., Gan, Y. H., Hoh, C. H., Archuleta, S., Molton, J. S., Kalimuddin, S., Koh, T. H., Passet, V., Brisse, S., & Holt, K. E. (2018). Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nature Communications*, 9, 2703. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05114-7>
- Lamas, A., Azinheiro, S., Roumani, F., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2023). Evaluation of the effect of outer primer structure, and inner primer linker sequences, in the performance of Loop-mediated isothermal amplification. *Talanta*, 260, 124642 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124642>
- Lee, I. R., Sng, E., Lee, K. O., Molton, J. S., Chan, M., Kalimuddin, S., Izharuddin, E., Lye, D. C., Archuleta, S., & Gan, Y. H. (2017). Comparison of diabetic and non-diabetic human leukocytic responses to different capsule types of *Klebsiella pneumoniae* responsible for causing pyogenic liver abscess. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 401. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00401>

- Lee, S., Khoo, V. S. L., Medriano, C. A. D., Lee, T., Park, S. Y., & Bae, S. (2019). Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods. *Water Research*, 160, p. 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.049>
- Locatelli, C., Scaccabarozzi, L., Pisoni, G., & Moroni, P. (2010). CTX-M1 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. In *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), p. 3822-3823. <https://doi.org/10.1128/jcm.00941-10>
- Marr, C. M., & Russo, T. A. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new public health threat. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(2), p. 71-73. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1555470>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Meagher, R. J., Priye, A., Light, Y. K., Huang, C., & Wang, E. (2018). Impact of Primer Dimers and Self-Amplifying Hairpins on Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection of Viral RNA. *The Analyst*, 143(8), 1924-1933. <https://doi.org/10.1039/C7AN01897E>
- Moon, Y. J., Lee, S. Y., & Oh, S. W. (2022). A Review of Isothermal Amplification Methods and Food-Origin Inhibitors against Detecting Food-Borne Pathogens. *Foods* 11(3), 322. <https://doi.org/10.3390/foods11030322>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), p. 223-229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Navidinia, M. (2016). The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Archives of Advances in Biosciences*, 7(3), p. 43-57 <https://doi.org/10.22037/jps.v7i3.12584>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

- Nwe, M. K., Jangpromma, N., & Taemaitree, L. (2024). Evaluation of molecular inhibitors of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Scientific Reports*, 14, 5916. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55241-z>
- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), p. 629-661. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00078-15>
- Page, M. G. P. (2019). The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 69(S7), p. S529-S537. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz825>
- Page, R., Scourfield, E., Ficarelli, M., McKellar, S. W., Lee, K. L., Maguire, T. J. A., Bouton, C., Lista, M. J., Neil, S. J. D., Malim, M. H., Zuckerman, M., Mischo, H. E., & Martinez-Nunez, R. T. (2022a). Homebrew: An economical and sensitive glassmilk-based nucleic-acid extraction method for SARS-CoV-2 diagnostics. *Cell Reports Methods*, 2(3), 100186. <https://doi.org/10.1016/J.CRMETH.2022.100186>
- Page, R., Scourfield, E., Ficarelli, M., McKellar, S. W., Lee, K. L., Maguire, T. J. A., Bouton, C., Lista, M. J., Neil, S. J. D., Malim, M. H., Zuckerman, M., Mischo, H. E., & Martinez-Nunez, R. T. (2022b). Homebrew: Protocol for glassmilk-based nucleic-acid extraction for SARS-CoV-2 diagnostics. *STAR Protocols*, 3(2), 101300. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2022.101300>
- Parida, M. M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18(6), p. 407–421. <https://doi.org/10.1002/RMV.593>
- Piperaki, E. T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouvelekis, L. S., & Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(10), p. 1002-1005. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001675>
- Poirier, A. C., Kuang, D., Siedler, B. S., Borah, K., Mehat, J. W., Liu, J., Tai, C., Wang, X., van Vliet, A. H. M., Ma, W., Jenkins, D. R., Clark, J., La Ragione, R. M., Qu, J., & McFadden, J. (2022). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Rapid Diagnostic Assays for the Detection of *Klebsiella pneumoniae* and Carbapenemase Genes in Clinical Samples. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 794961. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.794961>
- Qi, Y., Li, S., Zhang, Y., & You, C. (2024). Recent advances in viability detection of foodborne pathogens in milk and dairy products. *Food Control*, 160, 110314. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2024.110314>

- Quyen, T. L., Vinayaka, A. C., Golabi, M., Ngoc, H. Van, Bang, D. D., & Wolff, A. (2022). Elimination of Carryover Contamination in Real-Time Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of the SARS-CoV-2 Virus in Point-of-Care Testing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 856553. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.856553>
- Rawnuck, T., Reza, M. S., Rahman Khan, M. J., Khanam, R. A., & Munshi, S. U. (2022). A Comparative Study of LAMP and PCR in Relation to Time and Cost. *Journal of Shaheed Suhrawardy Medical College*, 12(2), p. 72-75. <https://doi.org/10.3329/jssmc.v12i2.56885>
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, 197(8), p. 1079-1081 <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rodrigues, C., Hauser, K., Cahill, N., Ligowska-Marzeta, M., Centorotola, G., Cornacchia, A., Garcia Fierro, R., Haenni, M., Nielsen, E. M., Piveteau, P., Barbier, E., Morris, D., Pomilio, F., & Brisse, S. (2022). High Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* in European Food Products: a Multicentric Study Comparing Culture and Molecular Detection Methods. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e02376-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02376-21>
- Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., Mafficini, A., Malpeli, G., Lawlor, R. T., & Scarpa, A. (2013). DNA Qualification Workflow for Next Generation Sequencing of Histopathological Samples. *PLOS ONE*, 8(6), e62692. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0062692>
- 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>
- Srivastava, P., & Prasad, D. (2023). Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic technologies. *3 Biotech*, 13, 200. <https://doi.org/10.1007/S13205-023-03628-6>
- Stojowska-swędrzyńska, K., Łupkowska, A., Kuczyńska-wiśnik, D., & Laskowska, E. (2022). Antibiotic heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. In *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 449. <https://doi.org/10.3390/ijms23010449>
- Sudhakaran V, A., & Anand, S. (2020). Approaches for Detection of Dairy Microorganisms: An Update. In: Minj, J., Sudhakaran V, A., Kumaari, A. *Dairy Processing: Advanced Research to Applications*. p. 217–241. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4_11

- Timofte, D., Maciuc, I. E., Evans, N. J., Williams, H., Wattret, A., Fick, J. C., & Williams, N. J. (2014). Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), p. 789-794. <https://doi.org/10.1128/AAC.00752-13>
- Vavrusova, M., & Skibsted, L. H. (2014). Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), p. 1198–1204. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.04.034>
- World Health Organization (2015). WHO estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015.
- Wilrich, C., & Wilrich, P. T. (2009). Estimation of the pod function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. *Journal of AOAC International*, 92(6), p. 1763-1772. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.6.1763>
- Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F., & Li, B. (2016). Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01833>
- Zhang, Q. bin, Zhu, P., Zhang, S., Rong, Y. jing, Huang, Z. an, Sun, L. wan, & Cai, T. (2023). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* detection methods: a minireview. In *Archives of Microbiology* 205(10), 326. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03665-y>
- Zhang, Y., Zeng, J., Liu, W., Zhao, F., Hu, Z., Zhao, C., Wang, Q., Wang, X., Chen, H., Li, H., Zhang, F., Li, S., Cao, B., & Wang, H. (2015). Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China. *Journal of Infection*, 71(5), p. 553–560. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2015.07.010>