



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA

**Detección de *Listeria Spp.* en queso fresco a través de un método isotérmico basado
en las regiones V1-V2 del 16S ARNr**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestra en Biociencias

Presenta:

I.A. Katia Ivonne Martínez González

Director de Tesis:

Dr. José Eleazar Barboza Corona

Codirectora de Tesis:

D. Ph. Gabriela Rodríguez Hernández

Irapuato, Guanajuato.

A 24 de Agosto del 2026



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA

Detección de *Listeria Spp.* en queso fresco a través de un método isotérmico basado en las regiones V1-V2 del 16S ARNr

TESIS

**Que como parte de los requisitos
para obtener el grado de:
Maestra en Biociencias**

Presenta:

I.A. Katia Ivonne Martínez González

Director de Tesis:

Dr. José Eleazar Barboza Corona

Codirectora

D. Ph. Gabriela Rodríguez Hernández

Sinodales:

Dr. Gustavo Hernández Guzmán

Presidente

Firma

Dra. Luz Edith Casados Vázquez

Secretario

Firma

Dr. José Eleazar Barboza Corona

Vocal

Firma

Irapuato, Guanajuato.

A 24 de Agosto Del 2026



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

«Universidad de Guanajuato: 80 años de
ser la Universidad Pública del Estado»

Oficio número: DICIVA/2026-306
Asunto: **AUTORIZACIÓN DE TITULACIÓN**

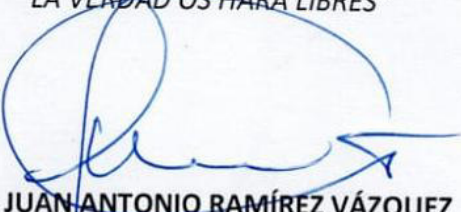
Irapuato, Guanajuato; 10 de julio 2026

C. KATIA IVONNE MARTÍNEZ GONZÁLEZ
MAESTRÍA EN BIOCENCIAS
Presente

Por medio de la presente y una vez revisado que ha cumplido íntegramente el plan de estudios del Programa Académico y, con base en el Artículo 79 del Reglamento Académico de la Normatividad de la Universidad de Guanajuato Vigente, me permito indicarle que doy mi autorización para que se titule por **Trabajo de Tesis**.

Sin otro asunto y enviándole un cordial saludo, se despide.

ATENTAMENTE
"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"


DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO – SALAMANCA
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Ccp: Archivo
JARV/mta


UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
División de Ciencias de la Vida
Ex-Hacienda el Copal Irapuato, Gto.
- DIRECCIÓN -

DIRECCIÓN DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA

Oficinas en el Complejo 2, km 9 carretera Irapuato-Silao ap 311 CP, Col. Centro, 36500
Irapuato, Gto.

Teléfono: 462 624 18 89
Ext. 1515



«Universidad de Guanajuato: 80 años de
ser la Universidad Pública del Estado»

Oficio número: DICIVA/2026-247
Asunto: **TEMA DE TRABAJO**

Irapuato, Guanajuato; 23 de junio 2026

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO – SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación, al trabajo de titulación del C. Katia Ivonne Martínez González, me permito comunicar a Usted que el tema señalado fue:

**“DETECCIÓN DE LISTERIA SPP. EN QUESO FRESCO A TRAVÉS DE UN MÉTODO ISOTÉRMICO
BASADO EN LAS REGIONES V1-V2 DEL 16S ARNR”**

Y que dicho trabajo ha sido totalmente elaborado y cuenta con mi aprobación.

Asimismo, me permito proponer a:

**DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN
DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ**

Para que junto conmigo integren el Jurado.

ATENTAMENTE
“LA VERDAD OS HARA LIBRES”
DIRECTOR DE TESIS


DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

DIRECCIÓN DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA

Oficinas en el Complejo 2, km 9 carretera Irapuato-Silao ap 311 CP, Col. Centro, 36500
Irapuato, Gto.

Teléfono: 462 624 18 89
Ext. 1515



Oficio número: DICIVA/2026-248
Asunto: **REVISIÓN DE TESIS**

Irapuato, Guanajuato; 29 de junio de 2026

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO – SALAMANCA,
P R E S E N T E.

Habiendo revisado la Tesis del Pasante C. **KATIA IVONNE MARTÍNEZ GONZÁLEZ**, Titulada:

**“DETECCIÓN DE LISTERIA SPP. EN QUESO FRESCO A TRAVÉS DE UN MÉTODO ISOTÉRMICO
BASADO EN LAS REGIONES V1-V2 DEL 16S ARNR”**

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

ATENTAMENTE
“LA VERDAD OS HARA LIBRES”
DIRECTOR


DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

SINODAL

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN

SINODAL

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

DIRECCIÓN DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA

Oficinas en el Complejo 2, km 9 carretera Irapuato-Silao ap 311 CP, Col. Centro, 36500
Irapuato, Gto.

Teléfono: 462 624 18 89
Ext. 1515



Irapuato, Guanajuato; 3 de junio de 2026

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO – SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación de la C. **Katia Ivonne Martínez González** nos permitimos comunicar a Usted que el trabajo de Tesis: **“DETECCIÓN DE LISTERIA SPP. EN QUESO FRESCO A TRAVÉS DE UN MÉTODO ISOTÉRMICO BASADO EN LAS REGIONES V1-V2 DEL 16S ARNR”** que fue desarrollado bajo la dirección del **Dr. José Eleazar Barboza Corona**, profesor de la División de Ciencias de la Vida, ha sido terminado. El escrito fue revisado por el Dr. Gustavo Hernández Guzmán y la Dra. Luz Edith Casados Vázquez, y se autorizó la impresión y empastado del mismo.

Así mismo, nos permitimos proponer para la integración del Jurado a los Señores;

DR.	GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN	PRESIDENTE
DRA.	LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ	SECRETARIO
DR.	JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA	VOCAL

ATENTAMENTE
“LA VERDAD OS HARA LIBRES”
DIRECTOR

DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

SINODAL

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ GUZMÁN

SINODAL

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

DIRECCIÓN DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA

Oficinas en el Complejo 2, km 9 carretera Irapuato-Silao ap 311 CP, Col. Centro, 36500
Irapuato, Gto.

Teléfono: 462 624 18 89
Ext. 1515

DEDICATORIA

A mi Familia, por su amor y apoyo incondicional; ustedes han sido un pilar en cada etapa de mi vida. Gracias por enseñarme la importancia del esfuerzo y la dedicación. Este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo financiero por parte de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) el cual, hizo posible realizar mis estudios de maestría; asimismo agradezco al Programa Educativo de Biociencias de la Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, por la formación académica recibida y por las oportunidades brindadas durante este periodo.

Agradezco a la Dra. Gabriela Rodríguez y al Dr. Eleazar Barboza por su dirección, orientación y acompañamiento a lo largo del desarrollo de este trabajo. Les agradezco sus enseñanzas, su paciencia y la confianza que depositaron en mí, así como su constante motivación y apoyo para ayudarme a alcanzar mis objetivos. A la Dra. Sheila Martínez, por compartir conmigo su amplio conocimiento, así como su paciencia y disposición durante el desarrollo experimental y a la M.P.P. Daniela Carrillo por su orientación y acompañamiento en el laboratorio durante el desarrollo de este trabajo. Gracias a ustedes, aprendí tanto en el ámbito personal como profesional, y su guía me permitió crecer más allá de lo académico; sin duda su experiencia, compromiso y dedicación fueron fundamentales para lograr esta investigación. También agradezco al Laboratorio de Microbiología y Tecnología de la Leche y al Laboratorio de Microbiotecnología y Biología Sintética Microbiana por el acompañamiento académico, así como por la infraestructura y los recursos proporcionados, los cuales, mediante el trabajo conjunto hicieron posible la generación de conocimiento.

Finalmente agradezco a mi familia, las personas más importantes en mi vida, por ser mi mayor apoyo y por acompañarme siempre con amor. A mis padres, Irma González y José Martínez, por todo su esfuerzo, por impulsarme a seguir aprendiendo cada día y por estar a mi lado en cada paso. A Dalia, Brenda y Cristina Martínez, por ser mis compañeras de vida, por sostenerme de una forma tan cálida y por estar siempre presentes. A Ignacio Alcocer por motivarme a seguir adelante, por alegrar mis días y por tu cariño incondicional. A Johan, Mati, Nono, Sebas y Sofi, por llenar mi vida de risas, por crecer conmigo y por recordarme lo importante que es seguir soñando.

ÍNDICE

RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. ANTECEDENTES.....	17
2.1. Seguridad alimentaria.....	17
2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	17
2.3. Listeriosis.....	18
2.3.1. Incidencia epidemiológica	19
2.3.2. Exposición alimentaria	19
2.3.3. Exposición en quesos	20
2.4. <i>Listeria spp.</i>	20
2.4.1. Diferencias filogenéticas entre <i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i>	23
2.4.2. Influencia de <i>L. innocua</i> en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	23
Evidencia	24
2.5. Métodos de detección de <i>Listeria spp.</i> en alimentos	25
2.5.1. Métodos microbiológicos	25
2.5.2. Métodos moleculares	26
2.5.2.1. PCR	26
2.5.2.2. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).....	28
2.5.2.2.1. Mecanismo de reacción colorimétrica.....	29
2.5.2.2.2. Kit WarmStart LAMP: acidificación del medio y viraje del rojo fenol	32
2.5.2.2.3. LAMP como herramienta de diagnóstico	34
2.5.2.3. Uso del gen 16S del ARNr como marcador molecular.....	38
III. JUSTIFICACIÓN.....	40
IV. HIPÓTESIS	41
V. OBJETIVOS	41
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	41
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	42

6.1.	Selección de la matriz alimentaria	42
6.2.	Inoculación	42
6.2.1.	Preparación del inóculo	42
6.2.2.	Inoculación de la muestra.....	44
6.3.	Estandarización del método de amplificación isotérmica.....	44
6.3.1.	Extracción de ADN genómico.....	44
6.3.2.	Extracción de ácidos nucleicos en muestras de queso fresco	45
6.3.2.1.	Solución salina tamponada con fosfato (PBS)+ Tween 20	45
6.3.2.2.	Ebullición	46
6.3.2.3.	Solución tampón de lisis fenol-cloroformo	46
6.3.2.4.	CTAB 2%	47
6.3.2.5.	Extracción modificada por Parayre	47
6.3.3.	Cuantificación y verificación de la integridad de ADN 48	
6.4.	Ensayo colorimétrico LAMP	48
6.4.1.	Síntesis de cebadores	48
6.4.2.	Reacción LAMP.....	50
6.4.2.1.	Kit comercial WarmStart Colorimetric LAMP 2X	50
6.4.2.2.	Cuantificación del color.....	50
6.5.	Sensibilidad de detección	51
6.5.1.	Concentración de ADN genómico	51
6.5.2.	Concentración de microorganismos viables (UFC/ml)	52
6.6.	Especificidad del ensayo	52
6.6.1.	Evaluación con PCR	52
6.6.2.	Evaluación con el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995.....	54
6.6.3.	Evaluación en productos comerciales	54
6.6.3.1.	Toma de muestra.....	54
6.6.3.2.	Caracterización organoléptica y determinación de acidez (pH)	55
6.6.3.3.	Evaluación microbiológica y detección molecular de <i>Listeria spp.</i> mediante NOM-143-SSA1-1995, LAMP y PCR.....	55
6.6.3.3.1.	Aislamiento y purificación de cepas bacterianas positivas	55

6.6.3.3.2. Diagnóstico y confirmación molecular	56
6.7. Evaluación estadística	58
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
7.1. Inoculación de la matriz alimentaria.....	60
7.2. Optimización de las reacciones LAMP	62
7.3. Evaluación de los métodos de extracción.....	62
7.3.1. Evaluación en monocultivos de <i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i>	63
7.3.2. Evaluación en muestras de queso fresco inoculadas con <i>L. innocua</i>	67
7.3.3. Evaluación con PCR	72
7.3.4. Evaluación estadística.....	76
7.4. Sensibilidad de detección	78
7.4.1. Concentración de ADN genómico	78
7.4.2. Concentración de microorganismos viables (UFC/ml)	80
7.5. Especificidad del ensayo	82
7.5.1. Evaluación con PCR y el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995..	82
7.6. Evaluación en productos comerciales	85
7.6.1. Caracterización organoléptica y determinación de acidez	85
7.6.2. Evaluación microbiológica de <i>Listeria spp</i> mediante NOM-143-SSA1-1995	90
7.6.3. Detección molecular de <i>Listeria spp.</i> mediante LAMP y PCR.....	93
7.6.3.1. Evaluación estadística	102
7.6.4. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas positivas	105
7.6.5. Diagnóstico y confirmación molecular mediante secuenciación del 16S ARNr	107
VIII. CONCLUSIONES	113
IX. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	116
X. BIBLIOGRAFÍA.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de <i>Listeria spp.</i> en alimentos.	20
Tabla 2. Evidencia reportada sobre la interacción competitiva entre <i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i>	24
Tabla 3. Genes de virulencia utilizados para la detección de <i>L. monocytogenes</i>	27
Tabla 4. Componentes necesarios para llevar a cabo en ensayo tipo LAMP.	30
Tabla 5. Comparación entre la amplificación isotérmica (LAMP) y la reacción en cadena la polimerasa (PCR).	34
Tabla 6. Factores que afectan la reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle. ..	35
Tabla 7. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos mediante LAMP.	36
Tabla 8. Oligonucleótidos y secuencia para <i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i>	49
Tabla 9. Mezcla de cebadores LAMP 10X y su concentración.	49
Tabla 10. Componentes para la mezcla de PCR.	53
Tabla 11. Condiciones de amplificación optimizadas para PCR.	53
Tabla 12. Componentes necesarios para ejecutar la reacción en cadena de la polimerasa. .	56
Tabla 13. Parámetros usados en cada ciclo de la PCR para amplificar el gen 16S ARNr.	57
Tabla 14. Datos obtenidos en la evaluación de los métodos de extracción de ácidos nucleicos partir de monocultivos.	66
Tabla 16. Evaluación de la compatibilidad entre métodos de extracción para LAMP y PCR. .	74
Tabla 17. Evaluación de las características organolépticas y valores de pH de las muestras de queso fresco comerciales.	87
Tabla 18. Resultados microbiológicos y moleculares muestras comerciales.	101
Tabla 19. Resultados del análisis de chi-cuadrada (χ^2)	105
Tabla 20. Cronograma de actividades.	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	22
Figura 2. Medios selectivos que favorecen el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	26
Figura 3. Detección visual de muestras por LAMP	29
Figura 4. Secuencia para la formación de bucles.	31
Figura 5. Representación gráfica del espectro de absorbancia de rojo fenol.....	33
Figura 6. Árbol filogenético a partir de la alineación de la región V1-V2 del gen del ARNr 16S de <i>Listeria monocytogenes</i> y bacterias de importancia alimentaria	39
Figura 7. Curva de calibración entre UFC/ml de <i>Listeria innocua</i> y OD600	61
Figura 8. Curva de calibración entre UFC/ml de <i>L. monocytogenes</i> y OD600.	61
Figura 9. Comparación cualitativa de los cinco métodos de extracción	65
Figura 10. Evaluación de la eficiencia los métodos de Ebullición y PBS + Tween 20.....	68
Figura 11. Evaluación de la eficiencia los métodos de Lisis fenol cloroformo, CTAB al 2% y Parayre	70
Figura 12. Evaluación de la compatibilidad de los cinco métodos de extracción de ácidos nucleicos mediante PCR.....	75
Figura 13. Comparación de medias de absorbancia obtenidas para los cinco métodos de extracción de ADN	77
Figura 14. Evaluación de la sensibilidad de detección de la técnica.....	79
Figura 15. Evaluación de la concentración límite de detección y reproducibilidad del método de extracción	81
Figura 16. Comparación de los métodos de detección: a) LAMP, b) PCR y c) método microbiológico establecido en la NOM-143-SSA1-1995	84
Figura 17. Caracterización organoléptica de las muestras comerciales	89
Figura 18. Comparativa de los controles experimentales en la evaluación microbiológica para la detección de <i>Listeria spp.</i>	90
Figura 19. Evaluación microbiológica para la detección de <i>Listeria spp.</i> en muestras de queso fresco comerciales conforme a la NOM-143-SSA1-1995.	93
Figura 20. Resultados de la detección en muestras del 1 al 5.....	95

Figura 21. Resultados de la detección en muestras del 6 al 10.....	96
Figura 22. Resultados de la detección en muestras del 11 al 15.....	97
Figura 23. Resultados de la detección en muestras del 16 al 20.....	98
Figura 24. Resultados de la detección en muestras del 21 al 25.....	99
Figura 25. Resultados de la detección en muestras del 26 al 30.....	100
Figura 26. Comparación múltiple de medias de pH en muestras comerciales.....	103
Figura 27. Aislamiento, purificación y caracterización morfológica de cepas positivas de <i>Listeria spp.</i>	106
Figura 28. Confirmación de las cepas aisladas 17 y 19 mediante LAMP y PCR.	108
Figura 29. Alineamiento de las secuencias consenso correspondientes a las regiones hipervariables V1–V2 del gen 16S ARNr.....	110
Figura 30. Árbol filogenético de las secuencias consenso.....	111

RESUMEN

La listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos causada por *Listeria monocytogenes*, cuya presencia representa un riesgo importante para la salud pública en México, especialmente por su elevada incidencia en productos lácteos frescos. Esto resalta la importancia de implementar métodos de detección rápidos, sensibles y confiables para prevenir brotes y garantizar la inocuidad alimentaria. El objetivo de este trabajo fue detectar *Listeria spp.* en queso fresco mediante amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), utilizando la región V1-V2 del gen 16S ARNr como marcador y comparar el método con técnicas convencionales. Se evaluaron cinco métodos de extracción de ácidos nucleicos y se optimizaron las condiciones de reacción para LAMP considerando variables como concentración bacteriana (1×10^1 a 1×10^9 UFC/ml), pureza del ADN, tiempos de incubación y costos. El protocolo establecido cuya detección se basó en el cambio colorimétrico y la cuantificación espectrofotométrica ($\Delta\text{Abs} = 434 - 560$ nm), se comparó con PCR convencional y el método microbiológico establecido en la NOM-143-SSA1-1995. Los resultados obtenidos durante la estandarización de la técnica de LAMP demostraron que el método de ebullición fue el más eficiente, compatible y reproducible, permitiendo la detección de *L. monocytogenes* hasta 1×10^1 UFC/ml y *L. innocua* hasta 1×10^3 UFC/ml; además, alcanzó una sensibilidad de hasta 100 fg de ADN, superando entre 10 y 1000 veces a la PCR convencional, con tiempos de detección menores a 60 minutos. La evaluación del protocolo en un contexto real se probó en 30 muestras comerciales donde se evaluaron valores de pH cercanos a la neutralidad y alteraciones organolépticas asociadas a contaminación por deficiencias en el procesamiento. Las muestras positivas fueron aisladas e identificadas taxonómicamente mediante la secuenciación del gen 16S ARNr y el análisis filogenético, lo que confirmó la identidad de *L. monocytogenes* con alta similitud (>98%). El protocolo propuesto puede considerarse una herramienta de diagnóstico integral, rápida, sensible y de bajo costo, como alternativa para la detección de *Listeria spp.* en la industria alimentaria.

Palabras clave: LAMP, 16S ARNr, *Listeria spp.*, queso fresco, inocuidad alimentaria.

ABSTRACT

Listeriosis is a foodborne illness caused by *Listeria monocytogenes*, which poses a significant public health risk in Mexico, particularly due to its high incidence in fresh dairy products. This underscores the importance of bringing about rapid, sensitive, and reliable detection methods to prevent outbreaks and ensure food safety. The objective of this study was to detect *Listeria spp.* in fresh cheese using loop-mediated isothermal amplification (LAMP), targeting the V1-V2 region of the 16S rRNA gene, and to compare the method with conventional techniques. Five nucleic acid extraction methods were evaluated, and the LAMP reaction conditions were optimized, considering variables such as bacterial concentration (1×10^1 to 1×10^9 CFU/ml), DNA purity, incubation times, and costs. The established protocol, whose detection was based on the colorimetric change and spectrophotometric quantification ($\Delta\text{Abs} = 434\text{--}560$ nm), was compared with conventional PCR and the microbiological method described in NOM-143-SSA1-1995. The results obtained during the standardization of the LAMP technique demonstrated that the boiling method was the most efficient, compatible, and reproducible, allowing the detection of *L. monocytogenes* up to 1×10^1 CFU/ml and *L. innocua* up to 1×10^3 CFU/ml. It also achieved a sensitivity of up to 100 fg of DNA, exceeding that of conventional PCR by 10 to 1000-fold, with detection times of less than 60 minutes. The protocol was evaluated under real-world conditions using 30 commercial samples, with pH values close to neutral and organoleptic defects associated with contamination from processing deficiencies. Positive samples were isolated and taxonomically identified by 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis, confirming their identity as *L. monocytogenes* with high similarity (>98%). The proposed protocol can be considered a comprehensive, rapid, sensitive, and low-cost diagnostic tool as an alternative for detecting *Listeria spp.* in the food industry.

Keywords: LAMP, 16S rRNA, *Listeria spp.*, fresh cheese, food safety.

I. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es uno de los principales retos a nivel global gracias a que el acceso de alimentos suficientes e inocuos se ha convertido en una prioridad en temas de salud pública. Lo anterior implica una especial atención en la reducción de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). Específicamente la listeriosis, enfermedad transmitida por el consumo de alimentos contaminados con *Listeria spp.*, destaca por sus altos porcentajes de incidencia en los países industrializados. En México aún no es claro dicho porcentaje debido a la escases de registros epidemiológicos, sin embargo, las autoridades sanitarias relacionan la presencia del género *Listeria* en la mayoría de ETA's en nuestro país.

Dentro de este género, la especie más conocida es *Listeria monocytogenes* debido a que a diferencia de otros patógenos puede sobrevivir y multiplicarse a valores de pH ácidos, a altas concentraciones de NaCl y a bajas temperaturas, lo que aumenta el riesgo de contaminación en alimentos bajo refrigeración y listos para el consumo. Por otro lado, destaca la presencia de *Listeria innocua* al ser considerada como una bacteria "inofensiva" ya que carece de factores de virulencia, sin embargo, gracias a su capacidad de competir y superar a *L. monocytogenes* en los medios de cultivo selectivos puede llevar a resultados falsos negativos cambiando por completo el paradigma para su detección.

En este sentido, se han implementado distintos métodos para la detección de *Listeria spp.*, como los cultivos microbiológicos tradicionales y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa; sin embargo, a pesar de su gran efectividad estos métodos suelen ser lentos, costosos o requieren equipamiento sofisticado, lo que limita la aplicación en determinados contextos. Como consecuencia, han surgido métodos de detección innovadores basados en sistemas moleculares y sintéticos, como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la cual, se ha posicionado como una alternativa prometedora debido a que la amplificación es rápida y eficiente bajo condiciones isotérmicas, lo que presenta beneficios en términos de simplicidad y costo. En el presente trabajo, el objetivo es detectar *Listeria spp.* en diferentes tipos de quesos mediante amplificación isotérmica tipo LAMP usando como gen "blanco" el 16S ARNr. Los resultados serán comparados con la reacción en cadena de la polimerasa y con el ensayo microbiológico.

II. ANTECEDENTES

2.1. Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria es un término dado cuando todas las personas tienen en todo momento acceso a alimentos nutritivos e inocuos (FAO, 1996). De acuerdo con el Fideicomiso de Riesgo Compartido, (2018) se basa en 4 pilares para lograr la salud y bienestar de quienes los consumen agrupando las necesidades de la sociedad actual a través de los siguientes enfoques:

- a) Disponibilidad de alimentos a nivel local o nacional.
- b) Estabilidad en los procesos de cultivo y almacenamiento.
- c) Acceso y control sobre los insumos, tecnología y conocimiento.
- d) Consumo a través de la existencia, inocuidad, dignidad y condiciones higiénicas.

En consideración a ello las organizaciones mundiales propusieron el desarrollo de protocolos para preservar la calidad de los alimentos y enfocar una vigilancia activa para buscar una garantía de inocuidad (Sanchez-Hernandez, 2016) para aumentar el acceso de alimentos inocuos y reducir las enfermedades transmitidas por alimentos (Bovay, 2016).

2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos

La calidad nutricional y la inocuidad de los alimentos son factores importantes que repercuten en la salud y la calidad de vida de las personas. Para velar por la inocuidad de los alimentos, es necesario asegurar el acceso a alimentos libres de patógenos a fin de prevenir la transmisión de enfermedades de origen alimentario (Kopper, 2009).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son un problema que debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político. Por ser un problema recurrente las autoridades e instancias gubernamentales y otras instituciones, tanto del sector público como privado, deberían dirigir campañas de vigilancia y asistencia

continúa a fin de prevenir o corregir situaciones que pueden ser muy peligrosas y que pueden afectar adversamente la salud de la población (Kopper, 2009; EFSA, 2022).

En la sociedad actual, los cambios en los hábitos alimentarios como el consumo de alimentos envasados, comidas fuera del hogar, consumo de comidas preparadas y comidas rápidas han sido factores que contribuyeron a la identificación de distintos agentes causantes de ETA's, entre los que destacan *Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella spp.* y *Listeria monocytogenes* (González & Rojas, 2005; Olea et al., 2012).

De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, México registró en 2023, 3 millones 457 mil 964 casos de infecciones intestinales, con más de 23 mil casos por intoxicación alimentaria bacteriana, destacando en 5to lugar la gastroenteritis por listeriosis.

2.3. Listeriosis

La listeriosis es una enfermedad infecciosa causada por *Listeria monocytogenes*. Se caracteriza por la presencia de síntomas que varían desde cuadros leves de gastroenteritis, hasta manifestaciones severas como meningitis, septicemia y abortos espontáneos en mujeres embarazadas (EFSA, 2022). Esta enfermedad es particularmente peligrosa para poblaciones vulnerables, incluidos los inmunocomprometidos y ancianos. Se estima que la tasa de mortalidad en los casos graves a pesar del tratamiento adecuado con antibióticos puede alcanzar hasta un 30% (Allerberger et al., 2023).

De acuerdo con Ramos et al., (2021) y Vallejo et al., (2022), la relación entre el alimento consumido y la infección se ha establecido a partir de los pocos datos epidemiológicos. No obstante, estas estimaciones presentan una alta incertidumbre considerando que la cantidad real del patógeno en la porción consumida puede diferir de manera considerable respecto a la detectada debido a distintos factores como la distribución heterogénea del microorganismo en el alimento, el tiempo transcurrido desde el consumo y la toma de muestra, los cambios en la carga microbiana durante el almacenamiento e incluso el estado fisiológico del consumidor. En

consideración a ello, Sánchez (2024) reportó que un alimento que contiene concentraciones superiores de 1×10^3 a 1×10^7 UFC/g o ml puede ocasionar daños a la salud para la población en general, y valores inferiores a 100 UFC/g o ml para la población vulnerable.

2.3.1. Incidencia epidemiológica

En México aún no existe una estadística real de casos por listeriosis; sin embargo, los últimos estudios realizados en nuestro país para la detección de *Listeria spp.* en alimentos mostraron una incidencia del 2% en productos congelados, derivados lácteos, cárnicos y vegetales listos para el consumo (Sánchez et al., 2006). El que no se realice la búsqueda y registro de este género bacteriano se debe a que el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica no considera a la listeriosis como enfermedad de notificación obligatoria. Ante tal situación aun no es claro si los cuadros de meningitis, intoxicaciones alimentarias asociadas con bacterias o gastroenteritis pudieran estar relacionados con *Listeria spp.* (Castañeda-Ruelas et al., 2018; Gaona-Pineda et al., 2018).

2.3.2. Exposición alimentaria

La mayoría de los casos de listeriosis humana son de transmisión alimentaria (99%), es decir, de animales a personas a través del consumo de alimentos contaminados debido a la falta de higiene, a la inadecuada manipulación y a la contaminación cruzada (EFSA, 2022).

De acuerdo con la cronología a partir de 1980, las hortalizas y productos cárnicos constituyeron los principales grupos de alimentos contaminados. Sin embargo, este patrón cambió con los nuevos hábitos alimenticios de la población destacando brotes derivados del consumo de productos lácteos, sobre todo de quesos (Orsi et al., 2016). Por otro lado, Burall et al., (2016) describieron una serie de brotes que involucraron alimentos atípicos como manzanas acarameladas, lo que aumento la interrogante de los patrones de crecimiento de *L. monocytogenes*.

2.3.3. Exposición en quesos

Los lácteos son los productos más consumidos en México, gracias a que su comercio está influenciado por la búsqueda de los requerimientos proteicos que estos otorgan; sin embargo, es precisamente por ello que son los más susceptibles a la contaminación debido a su naturaleza altamente nutritiva (Secretaría De Economía, 2012). El queso, uno de los productos lácteos más antiguos y populares, es consumido en diversas formas y variedades en todo el mundo. En términos de seguridad alimentaria representa un desafío debido a su susceptibilidad a la contaminación microbiana (Gutiérrez & Torres, 2021). En México la presencia de *Listeria spp.* destaca en quesos frescos (Secretaría De Economía, 2012) considerando su contenido de humedad ($\geq 50\%$), baja acidez, bajo contenido de sal y la necesidad de refrigeración como método de conservación (Engstrom et al., 2020), lo que permiten el crecimiento de bacterias como *L. monocytogenes* (Ribeiro, 2023).

2.4. *Listeria spp.*

Listeria es un género de bacterias que se caracteriza por sobrevivir y proliferar en una amplia gama de ambientes como en el suelo y el agua, así como en el tracto digestivo de los animales. Resiste temperaturas de 37°C a -20°C; condiciones ácidas con un pH entre 4.6 a 9.5 y a una actividad de agua (a_w) de 0.92; incluso, puede crecer en concentraciones de salinidad elevada y en ausencia de oxígeno (Norhana et al. 2010); siendo capaz de contaminar una gran gama de alimentos (Tabla 1).

Tabla 1. Presencia de *Listeria spp.* en alimentos.

Especie	Tipo de alimento	Referencias
<i>L. monocytogenes</i>	• Alimentos refrigerados (lácteos y cárnicos).	Carvalho (2010); Ministry for Primary Industries, (2018); Dincer (2023)
	• Alimentos listos para el consumo (RTE). preenvasados o mínimamente procesados.	
	• Frutas y verduras.	

<i>L. innocua</i>	• Mariscos • Carne de cerdo, salami de pavo y de aves de corral	Moura et al., (2019); Dincer, (2023)
<i>L. grayi</i>	• Haydari (platillo turco)	Dincer (2023)
<i>L. seeligeri</i>	• Tarator (Sopa fría)	Dincer (2023)
<i>L. ivanovii</i>	• Ensalada italiana	Dincer (2023)
<i>L. newyorkensis</i>	• Leche cruda • Mariscos	Chiara et al., (2015)
<i>L. fleischmannii</i>	• Quesos	Den Bakker et al., (2013)
<i>L. rocourtiae</i>	• Muestra de lechuga precortada	Orsi et al., (2024)

Específicamente, *Listeria monocytogenes* es un bacilo Grampositivo corto, anaerobio facultativo, no formador de esporas, móvil, que se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente (Castro et al., 2008). Debido a su capacidad de sobrevivencia destaca su presencia en una gran variedad de alimentos (Matle et al., 2020).

La habilidad de *Listeria* spp., para colonizar un amplio rango de ambientes se correlaciona con la presencia de 331 genes que codifican diferentes proteínas de transporte, esto ocasiona el éxito de su infección (Vázquez-Boland et al., 2001; Torres et al., 2005). A pesar de que el ciclo intracelular de *L. monocytogenes* es similar al de otras bacterias, como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., entre otras; el análisis de la secuencia de los genomas ha dado pauta a la descripción filogenética de las especies de *Listeria* para su diferenciación (Torres et al., 2005).

De acuerdo con Vera et al., (2013) el proceso de infección de *Listeria* spp., comprende varias etapas: adhesión, invasión de la célula hospedera, fagocitosis inducida por el propio patógeno, lisis de la vacuola fagocítica, multiplicación intracelular y proliferación extracelular. De forma general al cruzar la barrera intestinal, la bacteria se absorbe desde el lumen intestinal, atravesando las células epiteliales y si el sistema inmune no es capaz de controlar eficientemente la infección, la bacteria seguirá multiplicándose y la infección puede diseminarse al torrente sanguíneo y a los ganglios linfáticos (Figura 1). Tras el ingreso al torrente sanguíneo, alcanza el hígado y el bazo, donde puede replicarse en el interior de macrófagos o células epiteliales (Vázquez-Boland et al., 2001; Vera et al., 2013).

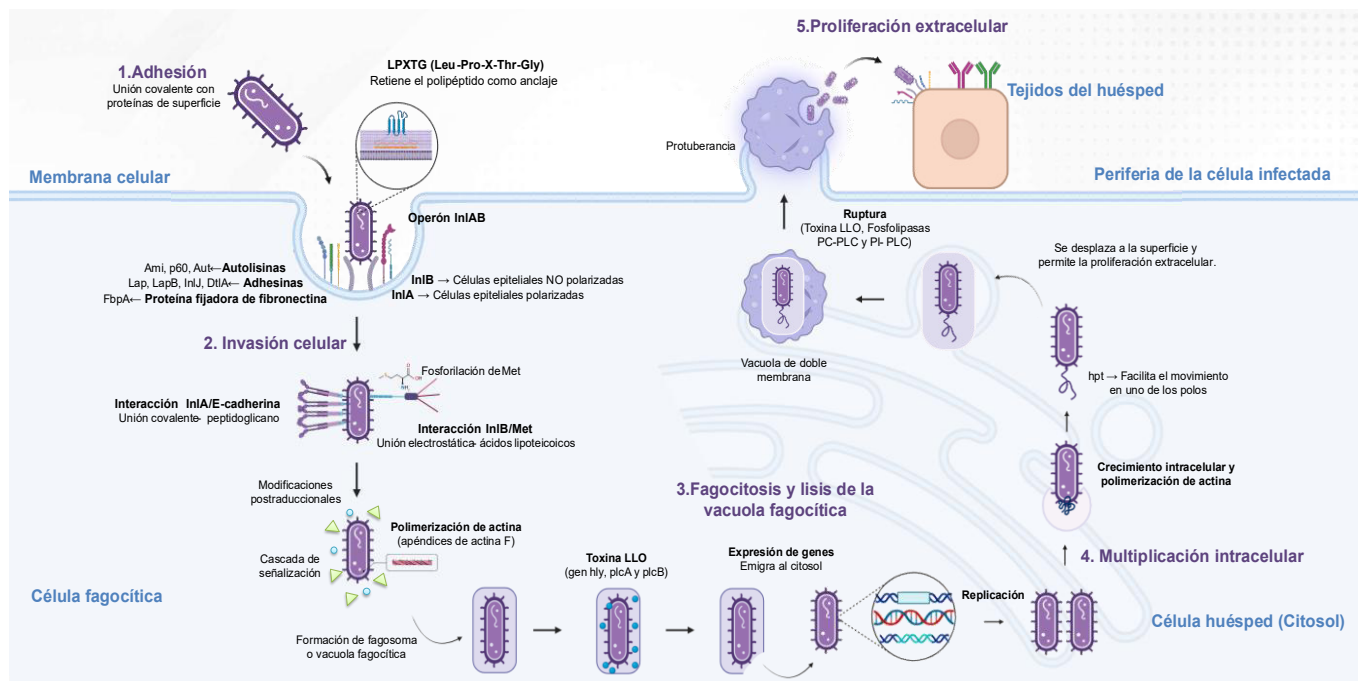


Figura 1. Ciclo de intracelular de *L. monocytogenes*. 1) Adhesión den la membrana celular, 2) Invasión de la célula huésped a través de la interacción de InlA y InlB con los receptores de superficie de la célula huésped. (B) Escape del fagosoma mediado por LLO, PlcA y PlcB. (D) Replicación en el citosol y desplazamiento a la superficie celular a través de la polimerización de actina, (E) promoviendo la propagación de célula a célula por (F) la ruptura de la vacuola mediada LLO. Elaboración propia basada en la ilustración de Lecturia, (2023).

Por otro lado, *L. innocua* es una bacteria Grampositiva de forma bacilar, móvil, facultativamente anaerobia y no formadora de esporas (Castro et al., 2008). A diferencia de *L. monocytogenes*, *L. innocua* es considerada no patógena, ya que carece de los factores de virulencia que le permiten a *L. monocytogenes* invadir y multiplicarse en las células del huésped (Orsi & Wiedmann, 2016). No obstante, se han reportado casos atípicos de infecciones por septicemia y meningitis en humanos y rumiantes (Moura et al., 2019). Estos han sido identificados a partir de aislados hemolíticos atípicos procedentes de mariscos en Asia (Johnson et al., 2004), de carne de cerdo en América del Norte (Moreno et al., 2012) y de aves de corral en Europa (Milillo et al., 2012).

A pesar de los casos reportados, se sabe poco sobre la diversidad filogenética y la patogenicidad de *L. innocua* por lo que su presencia en alimentos se sigue utilizando

exclusivamente como un indicador de condiciones higiénicas inadecuadas durante el procesamiento de alimentos, considerando que puede coexistir en ambientes contaminados con *L. monocytogenes* (Melian et al., 2019; Lecuit, 2020). En este sentido, la presencia de *L. innocua* en alimentos sigue siendo motivo de preocupación, ya que su resistencia a desinfectantes y su capacidad para formar biofilms pueden representar una amenaza para la inocuidad de los productos al ser un indicativo de posibles contaminaciones cruzadas con especies más peligrosas como *L. monocytogenes* (Bhosale et al., 2020; Lecuit, 2020).

2.4.1. Diferencias filogenéticas entre *L. innocua* y *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes se caracteriza por tener una alta virulencia, lo que la hace destacar dentro de su género (Vera et al., 2013). En 2001 se realizó la primera secuenciación del genoma completo de una cepa de *L. monocytogenes* y se comparó con el genoma de *L. innocua* siguiendo la premisa de que estas dos especies presentaban un alto grado de homología en la secuencia del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), siendo las de mayor cercanía taxonómicamente (Von Both et al., 1999; Glaser et al., 2001). Esto, permitió determinar que un 10% de los genes eran diferentes en la especie patógena respecto de la no patógena gracias a una evolución desencadenada por polimorfismos y mutaciones en las secuencias nucleotídicas (Glaser et al., 2001; Roche et al., 2005; Vera et al., 2013).

Específicamente esta comparación reportó que el genoma de *L. monocytogenes* poseía un cromosoma circular de 2,944,528 pb con un promedio de G + C de 39%; mientras que *L. innocua* poseía un cromosoma circular de 3.011.209pb con un contenido promedio de G + C de 37% (Glaser et al., 2001). A partir de ello se logró la identificación de los 484 genes reguladores del crecimiento intracelular de *Listeria* spp., de los cuales, 41 genes fueron de *L. monocytogenes* (Jacquet et al., 2004). De acuerdo con López et al., (2006) esta identificación podría explicar el potencial específico para la virulencia de *L. monocytogenes*.

2.4.2. Influencia de *L. innocua* en el crecimiento de *L. monocytogenes*

La detección de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos representa un reto debido a su baja concentración y a la presencia simultanea de otras bacterias, especialmente de

aquellas que conforman su microbiota (Norton et al., 2001); por lo que, para facilitar su aislamiento, normalmente se emplean medios de cultivo selectivos para propiciar su crecimiento e inhibir el de otras especies.

Pese a su uso, la eficacia del aislamiento se ve influenciada activamente por *L. innocua*, una especie estrechamente relacionada con *L. monocytogenes*. Esto es debido a la competencia por nutrientes, la sobrecarga bacteriana en placa y efectos de los componentes en el medio, ya que *L. innocua* muestra mayor adaptación a ciertos medios de enriquecimiento, acaparando los nutrientes y limitando el crecimiento de la especie patógena lo cual, favorece la alta concentración de otras colonias dificultando su identificación morfológica (Carvalho et al., 2010).

Esto genera un escenario donde *L. innocua* actúa enmascarando la presencia de *L. monocytogenes* y, por ende, compromete la sensibilidad y precisión de los métodos de detección. Sin embargo, este hecho no ha sido ampliamente estudiado debido a que muchos autores han sugerido que no existe tal influencia o encubrimiento por lo que se sigue considerando a *L. innocua* como una bacteria inofensiva (Petran & Swanson, 1993).

Tabla 2. Evidencia reportada sobre la interacción competitiva entre *L. innocua* y *L. monocytogenes*.

Ensayo	Evidencia	Referencias
Efecto de la acriflavina y el ácido nalidíxico en el crecimiento de <i>Listeria spp.</i> en medios de enriquecimiento	La ventaja del crecimiento de <i>L. innocua</i> frente a <i>L. monocytogenes</i> se relaciona con las interacciones inhibitorias entre especies que se han atribuido a la producción de agentes similares a las bacteriocinas que actúan frenando o impidiendo activamente el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	Beumer et al., (1996)
Detección de <i>L. monocytogenes</i> en muestras que contienen <i>L. innocua</i> .	La mayoría de los inhibidores pueden corresponder a partículas de bacteriófagos defectuosos, denominados monocinas.	Curiale & Lewus, (1994)

Crecimiento de cultivos mixtos de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria innocua</i> en carne de cangrejo azul.	Cuando se utilizaron niveles de inóculo inferiores a 50 UFC/g, no se observó diferencias significativas, pero al aumentar de 2 a 4 unidades log 10 <i>L. monocytogenes</i> presento una tasa de crecimiento más rápida que <i>L. innocua</i> .	Rawles & Croonenberghs, (1995)
Modelado del crecimiento competitivo de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i> en caldos de enriquecimiento	Los aislados de <i>L. innocua</i> tienen una ventaja durante el cultivo de enriquecimiento ya que las concentraciones de acriflavina afectan los tiempos de generación en <i>L. monocytogenes</i> .	Cornu & Flandrois, (2002)
Influencia de <i>L. innocua</i> en el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	La inhibición de <i>L. monocytogenes</i> por <i>L. innocua</i> se relaciona con la actividad inhibidora causada por bacteriocinas.	Carvalho et al., (2010)

2.5. Métodos de detección de *Listeria spp.* en alimentos

Las técnicas de detección de *Listeria spp.* en alimentos no constituyen solo herramientas para identificar brotes epidémicos, sino también para prevenirlos (Sánchez-Hernández, 2016). En los últimos años, su detección ha tenido grandes avances, por lo que se ha descrito una variedad de métodos que van desde el aislamiento mediante técnicas convencionales hasta los más sofisticados métodos moleculares (Jooste et al., 2016).

2.5.1. Métodos microbiológicos

Los métodos microbiológicos han sido la base para la detección de patógenos en alimentos durante décadas. Se basan en el aislamiento e identificación de microorganismos patógenos mediante el cultivo en medios específicos.

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995 de carácter obligatorio, establece los lineamientos para el análisis microbiológico de *L. monocytogenes* en 25 gramos de muestra de alimento (Figura 2). Esta norma aplica tanto a productos nacionales como a importados y tiene como objetivo la identificación precisa de género y especie de cepas aisladas con el fin de garantizar la inocuidad alimentaria. A pesar de su efectividad, su uso ha sido limitado debido al tiempo y a la subjetividad de interpretación (Sánchez et al., 2014).

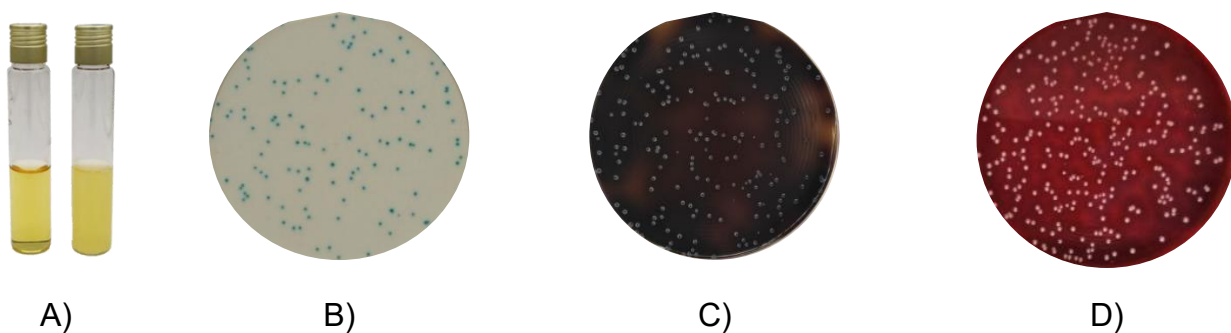


Figura 2. Medios selectivos que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* A) Caldo soya tripticaseína con 0,6 % de extracto de levadura (CSTEL), B) Medio de cloruro de litio feniletanol-moxolactam (LMP); C) Medio Oxford; D) Medio base Oxford (OXA) - Base de agar Columbia (NOM-143-SSA1-1995). Tomado de Shutterstock, (s.f); disponible en línea: <https://www.shutterstock.com/es/search/cultivo-microbiol%C3%B3gico>

2.5.2. Métodos moleculares

El avance de la biotecnología permitió el desarrollo de nuevos métodos para la detección de microorganismos en alimentos basados en la amplificación de ácidos nucleicos los cuales, proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia y tiempo.

2.5.2.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica molecular que permite la amplificación de secuencias específicas de ADN para obtener al mismo tiempo diferentes características genotípicas, como género y especie (Bartlett et al., 2003). La PCR se ha consolidado como una herramienta esencial para la detección rápida y específica en alimentos superando las limitaciones de los métodos microbiológicos en cuanto tiempo, sensibilidad y especificidad (Chen et al., 2017). Esto ha sido gracias a la identificación directa del patógeno sin necesidad de un cultivo prolongado, sobre todo cuando se encuentra en bajas concentraciones o en presencia de microbiota competitiva (Burbano et al., 2003).

De acuerdo con Aristizábal et al., (2020) para lograr una detección efectiva, se emplean cebadores específicos dirigidos a genes altamente conservados lo que permite no solo confirmar la presencia de una bacteria si no también diferenciarla de otras especies (Doménech-Sánchez & Vilab, 2004). Dependiendo de la especificidad que se desee en la

detección, diferentes regiones del ADN pueden ser usadas como "blanco" sin embargo, las más comunes son las que codifican factores de virulencia como genes de hibridación (Iñiguez Palomares., 2002).

Tabla 3. Genes de virulencia utilizados para la detección de *L. monocytogenes*.

Gen	Función	Especificidad	Referencias
<i>iap</i> (Proteína p60 de adherencia intracelular)	Proteína de superficie que actúa como factor de invasión Involucrado en la adherencia y colonización de las células del huésped.	Específicamente <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i> tienen en común una parte considerable de dicho gen, por lo que se complica la detección.	Iñiguez Palomares., (2002); Wang et al., (2010).
<i>hly A</i> B- hemolisina (Listeriolisina)	Citolisina que codifica la hemolisina, una proteína que permite a la bacteria causar hemólisis para contribuir a la producción de la listeriolisina O (LLO) y permitir a la bacteria escapar de las vacuolas fagocíticas.	Es el gen más utilizado para la detección de <i>L. monocytogenes</i> ya que tiene una región altamente conservada en su genoma y no se expresa en otras cepas hemolíticas como <i>L. ivanovii</i> y <i>L. seeligeri</i> . Cuenta con 1590 pb y los iniciadores diseñados a partir de él amplifican segmentos de tamaños variables.	Iñiguez Palomares., (2002); Tang et al., (2011); Vera et al., (2013); Fiore et al., (2023).
<i>ActA</i> (actina)	Polimeriza la actina que permite a <i>L. monocytogenes</i> moverse dentro de las células.	Este gen es característico de <i>L. monocytogenes</i> , pero algunas otras especies de <i>Listeria</i> pueden tener secuencias similares.	Pillich et al., (2017)
<i>feoB</i> (Proteína B de transporte de hierro ferroso)	Modulan la expresión de genes involucrados en la captación de hierro permitiendo.	Se encuentra en la mayoría de los organismos ya que su función es universal para el transporte de hierro ferroso.	Álvarez-Fraga, (2018); Srisawat et al., (2022).
<i>plcB</i> (Fosfolipasa C)	Es el primer gen que codifica PC-PLC para mediar la disolución de los fagosomas secundarios en el escape de la vacuola.	Característico de <i>L. monocytogenes</i> por ser considerado un factor de virulencia de esta especie.	Smith et al., (1995).
<i>plcA</i> (Fosfolipasa C)	Es el primer gen que codifica para PI-PLC para medir la desestabilización	Específico para el diagnóstico de <i>L. monocytogenes</i> por ser considerado uno de sus factores de	Smith et al., (1995); Vázquez-

	de los fagosomas primarios junto con la LLO (Listeriolosina O), es decir actúa como accesorio en el escape de la vacuola.	virulencia, sin embargo, puede estar presente en otras especies.	Boland et al., (2001).
Mpl (Metaloproteas)	Proteasa que favorece la diseminación de la bacteria mediante vacuolas, además codifica para la proteasa <i>mpl</i> , la cual procesa extracelularmente el propéptido PC-PLC.	Característico de <i>L. monocytogenes</i> .	Busch et al., (2022).
prfA (Factor A, regulador positivo)	Proteína citoplasmática que regula la expresión de varios factores de virulencia incluyendo la hemolisina, la fosfolipasa C y las proteínas que participan en el movimiento intracelular.	Aunque <i>L. monocytogenes</i> tiene un sistema regulador prfA conservado, otras bacterias del género también lo poseen, pero en formas diferentes. Esto lo convierte en un marcador clave para diferenciarla de otras especies de <i>Listeria</i> .	Vera et al., (2013); Cho et al., (2014)
PC-PLC (Fosfatidilcolina-fosfolipasa C)	Media la disolución de la doble membrana de los fagosomas secundarios, formados después de la diseminación célula a célula	Tipo de fosfolipasa C sintetizada específicamente por <i>L. monocytogenes</i> .	Smith et al., (1995); Torres et al., (2005).
PI-PLC (Fosfatidilinositol- fosfolipasa C)	Ayuda en el escape de la primera vacuola fagocítica y coopera con LLO en el desdoblamiento del fosfatidilinositol (PI), componente estructural de la bicapa lipídica de la célula hospedero.	Tipo de fosfolipasa C sintetizada específicamente por <i>L. monocytogenes</i> .	Smith et al., (1995); Torres et al., (2005).

2.5.2.2. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) es una alternativa al análisis basado en PCR, ideal para trabajar con gran rapidez bajo condiciones

isotérmicas y con un equipo de laboratorio mínimo (Frisch et al., 2021). Específicamente es una técnica emergente de amplificación de ADN o ARN (RT-LAMP); que ha ganado popularidad por su simplicidad (Notomi et al., 2000; Ma et al., 2019). Fue desarrollada en 2001 por Natomi y desde entonces se ha utilizado para detectar patógenos (Umar et al., 2015).

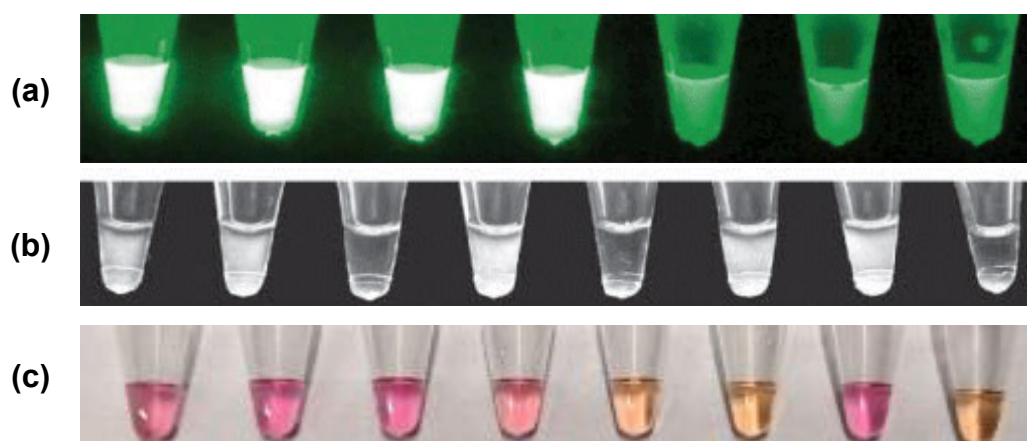


Figura 3. Detección visual de muestras mediante LAMP mediante (a) fluorescencia inducida por calceína, combinada inicialmente con iones de magnesio, (b) turbidez inducida por pirofosfato y (c) cambio de pH. Tomado de Adams et al. (2010), Sánchez et al. (2014).

2.5.2.2.1. Mecanismo de reacción colorimétrica

Para llevar a cabo la reacción se necesita una mezcla compuesta por un tinte o indicador que tiene la capacidad de intercalarse entre las pares de bases de las dobles hélices de ADN, agua destilada (dH₂O), el ADN objetivo, Bst polimerasa, transcriptasa inversa y una solución tampón LAMP optimizada (Tabla 4). Así mismo se necesitan de 4 a 6 cebadores: 2 cebadores externos F3 y B3, 2 cebadores internos FIP (F1C, F2) y BIP (B1C, B2) que ayudan en la formación de un bucle y 2 cebadores bucle F(FLP) y B(BLP) que aceleran la reacción mediante la unión adicional a sitios que no son accesibles por los cebadores internos (Figura 4) reconociendo un total de 8 secuencias distintas del ADN blanco, lo que le da la especificidad al método (Sánchez et al., 2014; Feng et al., 2018).

Tabla 4. Componentes necesarios para llevar a cabo en ensayo tipo LAMP.

Compuesto	Función	Referencias
Tinte o indicador intercalante fácilmente medible	Indica la presencia del gen blanco para ser percibida visualmente. - Calceína. Indicador fluorescente con iones de magnesio para conseguir el efecto de amortiguación e irradiar fluorescencia. - Pirofosfato. Indicador de turbidez ocasionada por el pirofosfato como producto secundario de la amplificación. - Rojo fenol (fenolsulfonftaleína). Colorante aniónico hidrosoluble sensible al pH donde un cambio de color de rosa a amarillo indica amplificación.	Sánchez et al., (2014).
dH ₂ O	Resuspende los reactivos y evita que los ácidos nucleicos se degraden.	Asuar, (2007).
ADN objetivo	Forma una estructura de mancuerna que se convierte rápidamente en un ADN de tallo y bucle mediante la síntesis de ADN autocebada. Esta estructura sirve como partida para la amplificación exponencial.	Parida et al., (2008).
Bst polimerasa	Actúa como helicasa para abrir la doble cadena de ADN de 5'-3', se activa entre 60-65°C y se inactiva a 80°C.	Sánchez et al., (2014).
Transcriptasa inversa	Sintetiza el ADN de doble cadena catalizando la retrotranscripción o transcripción inversa, además tiene actividad de desplazamiento.	Parida et al., (2008).
Solución tampón LAMP optimizada (mezcla maestra)	Mezcla maestra a partir de: - dUTP y UDG termolábil antártico. Evita la amplificación de productos de reacciones anteriores que contienen uracilo y reducen la posibilidad de contaminación por arrastre (donde el producto de una reacción anterior puede servir inesperadamente como sustrato de una reacción posterior). - Transcriptasa inversa y ADN polimerasa. Buscan una amplificación rápida y robusta de dianas de ADN y ARN.	New England Biolabs, (2024).
Cebadores	Actúan como punto de partida para la replicación del ADN. En presencia de la BST polimerasa, el cebador comienza la síntesis de una cadena única de ácido nucleico. pueden ser difíciles de diseñar, por lo que para lograr el éxito de la reacción es necesario una evaluación de 2 a 4 conjuntos completos de cebadores LAMP.	New England Biolabs, (2024).

La reacción de amplificación se lleva a cabo en dos pasos: no cíclico y cíclico. De acuerdo con Mori et al., (2009) el primer cebador en interactuar con el ADN blanco será el FIP el cual se une a su región complementaria F2c y comienza a sintetizar la hebra complementaria del ADN blanco, el siguiente cebador será el F3 uniéndose a la región F3c complementaria del ADN blanco (Kokkinos et al., 2014). En esta etapa la Bst polimerasa ocasiona que la doble

hebra se abra y la F3 pueda seguir con su camino. Al obtener la hebra complementaria los extremos formaran un bucle que servirá para la posterior síntesis de ADN. Finalmente, en la parte cíclica, FIP y BIP se unen a la hebra complementaria realizando la hibridación de las secuencias que se utilizaran para enviar las señales en la reacción (Notomi et al., 2002).

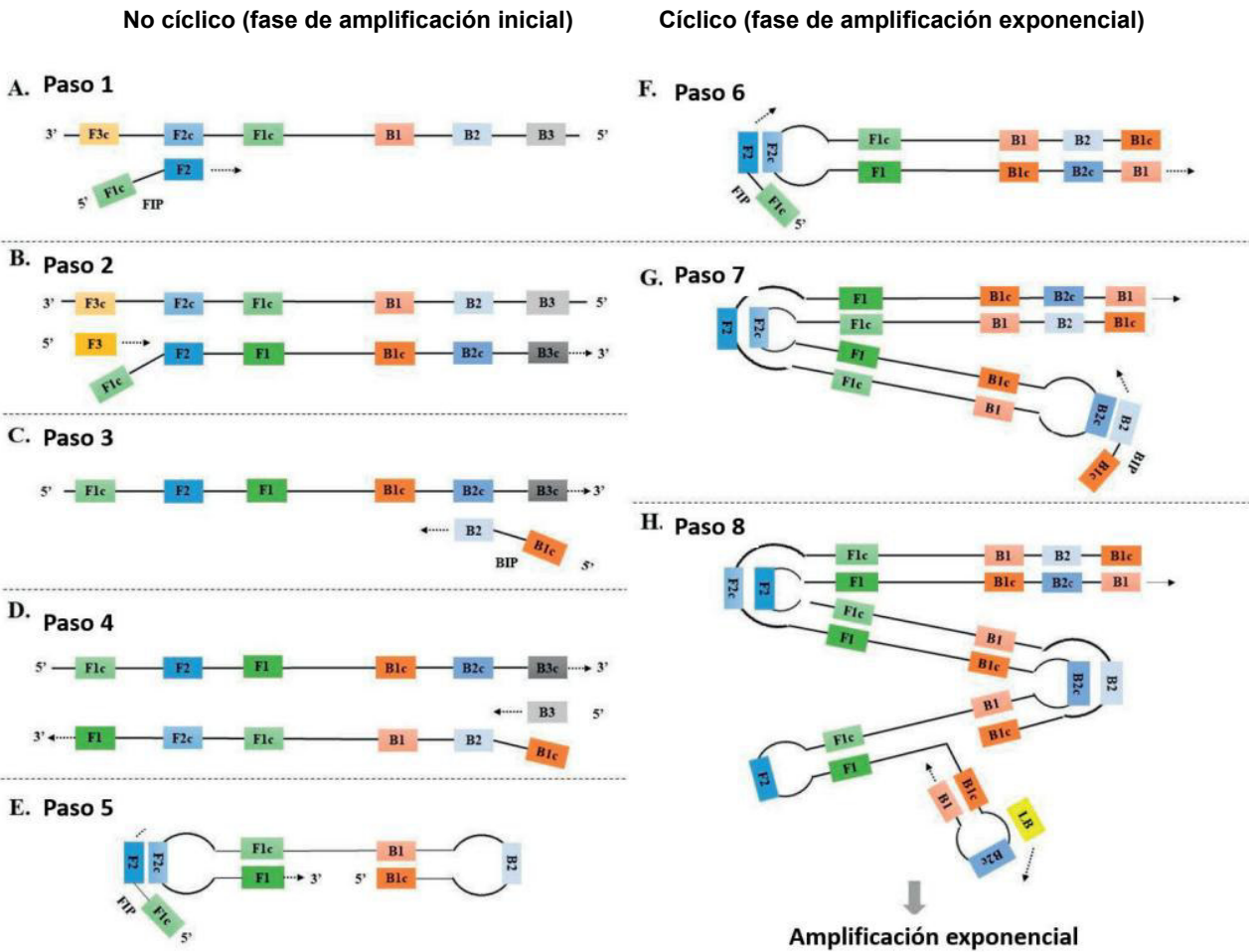


Figura 4. Secuencia para la formación de bucles. A) En la fase de amplificación inicial, los cebadores internos (FIP) se hibridan con el ADN diana e inician la síntesis de la cadena complementaria a la cadena 3'-5'. B) Al mismo tiempo, los cebadores externos (F3) también inician la síntesis de ADN para desplazar las cadenas de ADN recién sintetizadas desde los cebadores internos. C) El ADN monocatenario (ADNmc) liberado sirve como molde para la síntesis de ADN con los cebadores internos (BIP) y los externos (B3). E-G) El ADNmc liberado puede plegarse en una molécula con forma de mancuerna que sirve para iniciar la síntesis de ADN autocebado y como molde para nuevos ciclos de amplificación a través de los cebadores internos. Tomado de Zhang et al, (2023); CarriL et al, (2024).

2.5.2.2.2. Kit WarmStart LAMP: acidificación del medio y viraje del rojo fenol

El kit WarmStart LAMP incorpora un sistema de detección colorimétrica basado en el cambio de pH por acción del indicador rojo fenol el cual, permite el monitoreo de la reacción de amplificación de forma visual y sencilla. Este kit se suministra con la mezcla maestra WarmStart LAMP 2X, que contiene dos enzimas termoestables, una Bst ADN polimerasa y una transcriptasa inversa RTx las cuales, fueron diseñadas para actuar de forma sinérgica en presencia de inhibidores, aumentando la sensibilidad y reproducibilidad de la reacción (New England Biolabs, 2024). Específicamente la Bst polimerasa posee una actividad de síntesis de ADN en dirección 5'→3' con capacidad de desplazamiento de cadena, mientras que la transcriptasa inversa RTx permite la retrotranscripción de ARN en ADNc ampliando el rango de detección (New England Biolabs, s.f.; Poole et al., 2012).

La actividad catalítica de estas enzimas se encuentra regulada por aptámeros basados en oligonucleótidos específicos, los cuales, funcionan como inhibidores reversibles dependientes de la temperatura (Dao Thi et al., 2020). A temperatura ambiente, los aptámeros permanecen asociados a las enzimas, bloqueando transitoriamente sus sitios activos evitando reacciones de cebado inespecíficas. Sin embargo, al alcanzar la temperatura óptima de amplificación (60–65 °C), la estructura secundaria de los aptámeros se desestabiliza, lo que provoca su disociación y la consecuente liberación de la actividad enzimática. Este mecanismo asegura que la amplificación isotérmica inicie únicamente bajo condiciones controladas, reduciendo de manera significativa la aparición de productos inespecíficos y la generación de falsos positivos durante la preparación y manipulación de las mezclas de reacción (Nichols et al., s.f; Wang et al., 2023).

Durante el proceso de síntesis de ADN la Bst polimerasa cataliza la incorporación de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en el extremo 3' de la cadena molde, formando un enlace fosfodiéster liberando 2 grupos fosfato o pirofosfato inorgánico (PI) y protones o iones hidrógeno (H⁺) como subproductos (Mori et al., 2001; Kottur et al., 2018). Dicho efecto crea una acumulación de protones en el medio ocasionando una disminución progresiva del pH derivado de su acidificación lo que provoca un cambio en el viraje del rojo fenol (Saifuddin et al., 2024). Esto genera una coloración en tonos rosados correspondiente a un pH neutro o

alcalino y una coloración en tonos amarillo o ámbar a un pH ácido lo cual, constituye un indicador directo de la amplificación exitosa del ADN blanco (Dao Thi et al., 2020).

Particularmente, el mecanismo de acción del rojo fenol en la detección colorimétrica se fundamenta en su capacidad para actuar como un indicador de pH, presentando dos picos máximos de absorbancia definidos, uno a 434 nm correspondiente a su forma ácida o protonada (amarillo) y otro a 560 nm asociado a su forma desprotonada o básica (rosa) (Tanner et al., 2015; Dao Thi et al., 2020).

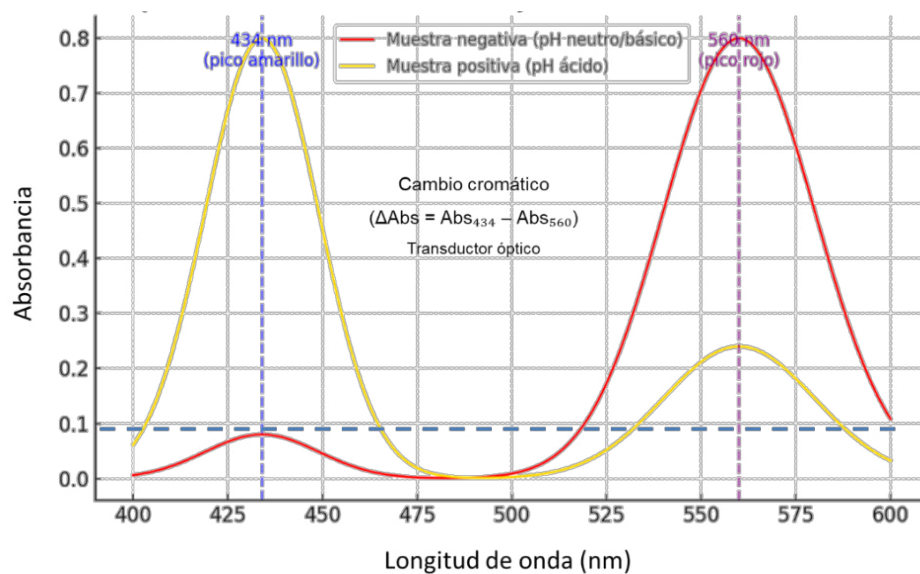


Figura 5. Representación gráfica del espectro de absorción de rojo fenol en LAMP. En muestras negativas sin amplificación, predomina el pico en 560 nm (rojo/rosa). En muestras positivas con amplificación, la acidificación desplaza el equilibrio de los protones, aumentando la absorbancia en 434 nm y disminuyéndola en 560 nm. Elaboración propia basada en la información descrita en Zhang et al. (2014); Tanner et al. (2015); Daddy Gaoh et al. (2021) y AAT Bioquest, Inc. (2025).

Para cuantificar este cambio cromático se calcula la diferencia de absorbancia entre ambas longitudes de onda ($\Delta OD = OD_{434} - OD_{560}$) considerando un parámetro robusto y reproducible para diferenciar entre reacciones positivas y negativas (Tanner et al., 2015; Zhang et al., 2020; Nguyen et al., 2019). En las muestras positivas, donde ocurre la amplificación, se observa un cambio neto en esta diferencia con valores de ΔOD cercanos a 0.1, reflejando el

aumento de la señal amarilla y la disminución de la tonalidad roja (Lou et al., 2023). En contraste, las muestras negativas mantienen valores de ΔOD entre 0 y 0.05, lo que indica la ausencia de un viraje significativo (Daddy Gaoh et al., 2021). De este modo, el rojo fenol funciona como un transductor óptico del cambio químico asociado a la amplificación, facilitando una lectura rápida, sensible y visualmente accesible sin necesidad de equipos de detección especializados, lo cual hace del kit WarmStart LAMP una herramienta útil.

2.5.2.2.3. LAMP como herramienta de diagnóstico

En comparación con la PCR (Tabla 5), este método no requiere un molde de ADN desnaturalizado (Nagamine et al. 2001), lo que permite una alta tolerancia en muestras a una temperatura constante, demostrando ser particularmente útil para el diagnóstico en áreas donde los recursos son limitados (Kaneko et al. 2007, Notomi 2015).

Tabla 5. Comparación entre la amplificación isotérmica (LAMP) y la reacción en cadena la polimerasa (PCR).

Propiedad	LAMP, RT-LAMP	PCR
Amplificación	ADN (LAMP) y ARN (RT-LAMP)	ADN (PCR) y ARN (RT-PCR)
Temperatura	60-65°C	Variación de ciclos
Tiempo	15 a 60 min	90 min o mas
Tipo de enzima	Bst polimerasa (Activa entre 60-65°C e inactiva a 80°C)	Taq polimerasa (Activa a temperaturas superiores a 70 °C)
Primers	Complejo (2-3 juegos)	Sencillo
Simplicidad de detección	Cambio de color (pH), presencia de turbidez blanca (pirofosfato de magnesio), fluorescencia (calceína)	Uso de geles de agarosa y luz UV
Equipos	Baño María o termobloque	Termociclador
Costos	\$ 25, 302.78 WarmStart® LAMP Kit - 500 reacciones por kit	\$204,837.75 Termociclador (inversión inicial) - 96 reacciones por corrida
Especificidad	Moderadamente (falsos positivos)	Altamente específico

*Tomado de Wang, (2008); Sánchez et al., (2014).

Estudios recientes han demostrado que LAMP es altamente sensible y específica para la detección de patógenos en alimentos, lo que la convierte en una herramienta prometedora (Mori, 2009). En consideración a esto se propone el uso de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP) a partir de la premisa de que son métodos rápidos, sensibles, y puede llevarse a cabo en dispositivos de calefacción simples tales como baño maría o termobloques y que los resultados pueden observarse a simple vista (Palomino-Camargo et al. 2014; Sánchez et al., 2014).

A pesar de ello, la reacción puede verse afectada por una serie de factores tanto intrínsecos como extrínsecos entre los cuales destacan la temperatura, el diseño y concentración de los cebadores, los iones divalentes y la presencia de inhibidores en las muestras biológicas (Tabla 6).

Tabla 6. Factores que afectan la reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle.

Factor	Efecto sobre la reacción	Referencias
Temperatura (60- 65°C)	Fuera del rango la Bst polimerasa pierde eficiencia, reduce la amplificación o genera productos inespecíficos como fragmentos no relacionados con el ADN diana o estructuras de bucle erróneas.	Parida et al., (2008); Nam et al., (2023); Ocorbin & Filipenko, (2023).
Diseño y concentración de cebadores	LAMP utiliza de 4 a 6 cebadores, lo que incrementa la especificidad, pero también eleva el riesgo de amplificación inespecífica y formación de dímeros.	Nagamine et al., (2002)
Mg ²⁺	Al ser un cofactor su concentración debe optimizarse, ya que una cantidad insuficiente reduce el rendimiento, mientras que un exceso provoca amplificaciones inespecíficas. Por otro lado, la formación de pirofosfato como subproducto provoca una turbidez irregular de acuerdo con dicha concentración.	Pavlov et al., (2004); En et al., (2008) ; Tomlinson et al., (2010).
CO ₂ atmosférico	El aire contiene CO ₂ (400 ppm). Cuando la mezcla de reacción está varios minutos expuesta al ambiente absorben suficiente CO ₂ del aire que se disuelve en el líquido donde se hidrata formando ácido carbónico (H ₂ CO ₃) lo que libera protones (H ⁺) y baja el pH del medio: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$.	Dao Thi et al., (2020), Shahid et al., (2022).
dNTPs	Una concentración desequilibrada provoca competencia por el Mg ²⁺ en el medio, lo cual, limita la cantidad disponible para la Bst y como consecuencia produce una	Zou et al., (2020) ; Yeni et al., (2024),

	inhibición enzimática. Además, el desequilibrio favorece las uniones parciales de cebadores y a su vez afecta la sensibilidad de detección al necesitar más ciclos de desplazamiento para alcanzar un nivel detectable.	
Inhibidores	Algunos compuestos derivados de las muestras pueden interferir al secuestrar el Mg^{2+} disponible, afectar la fuerza iónica del medio, formar micelas en la mezcla de reacción, desnaturalizar proteínas rompiendo interacciones hidrofóbicas e incluso afectar la solubilidad de dNTPs y cebadores.	Nwe et al., (2024); Sakatoku et al., (2024).
pH	La polimerización del ADN libera iones de hidrógeno, lo que disminuye el pH del medio y permite la detección colorimétrica, sin embargo, la concentración del buffer o el pH de la muestra puede afectar la actividad de la Bst o acidificar el medio y favorecer un falso positivo.	Tanner et al., (2015).
Calidad de la muestra	El ADN degradado o fragmentado (<200 pb) limita el reconocimiento por los cebadores, además la Bst, al no tener suficiente molde, reduce la amplificación. Por otro lado, los contaminantes como ARN, proteínas residuales o trazas de los reactivos de la extracción generan resultados poco reproducibles al inhibir la Bst, secuestrar cofactores esenciales, degradar el ADN molde o interferir con la hibridación de los cebadores.	Kaneko et al., (2007); Schrader et al., (2012).

Actualmente se han desarrollado diferentes ensayos de LAMP y RT-LAMP específicos para detectar *Listeria spp* (Tabla 7) en alimentos utilizando sus factores de virulencia, sin embargo, pese al éxito de los experimentales aun no es común su uso en la industria alimentaria o en los laboratorios de diagnóstico (Wang et al., 2012; Jordan & McAuliffe, 2018).

Tabla 7. Detección de *L.monocytogenes* en alimentos mediante LAMP.

Ensayo	Resultados	Referencias
Desarrollo y evaluación de un método de LAMP para detectar <i>L. monocytogenes</i> en leche cruda	Se diseñaron tres pares de cebadores para reconocer ocho secuencias distintas del gen <i>iap</i> (proteína extracelular P60, proteína asociada a la invasión IAP). Las condiciones se optimizaron para 40 min a 63 °C y se indicó que LAMP era 103 veces más sensible que la PCR convencional.	Wang et al., (2010).

Detección rápida y sensible de <i>L. monocytogenes</i> mediante LAMP en muestras de pollo	Se diseñaron seis cebadores para identificar ocho regiones del gen <i>hlyA</i> . El ensayo se realizó en 40 min a 65 °C en un baño de agua y se indicó que LAMP fue 100 veces más sensible que el ensayo de PCR.	Tang et al., (2011).
Detección rápida de <i>L. monocytogenes</i> en carne cruda, vegetales y mariscos mediante LAMP	Se desarrollo un método LAMP en tiempo real para la detección rápida del gen <i>hlyA</i> a 63 °C con un turbidímetro en tiempo real de de loopamp. Los límites de detección fueron 6 UFC/tubo y la sensibilidad en LAMP fue mayor que la de la PCR.	Shan et al., (2012).
Desarrollo de método LAMP rápido y sensible para detectar <i>L. monocytogenes</i> en la leche	Se identificó el gen <i>prfA</i> en muestras de leche contaminada artificialmente. El ensayo LAMP se vio menos influenciado por los compuestos de la leche que el ensayo de PCR en tiempo real.	Cho et al., (2014)
Desarrollo de una prueba de detección rápida de <i>L. monocytogenes</i> . en carne de pollo cruda mediante LAMP	Se diseñaron un juego de cebadores para identificar el gen de la fosfatidilcolina-fosfolipasa C. El método logró resultados en 90 min y no exhibió reactividad cruzada con otras especies de <i>Listeria</i> .	Wachiralurpan et al., (2017).
Desarrollo una tira reactiva con LAMP como prueba rápida para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en productos alimenticios congelados	Se evaluaron cinco conjuntos de cebadores LAMP para la detección de fragmentos del gen <i>feoB</i> (proteína B de transporte de hierro ferroso). La temperatura óptima para el conjunto de cebadores fue de 60 °C y 61 °C.	Srisawat et al., (2022).
LAMP basada en genes <i>Mpl</i> para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de productos cárnicos, quesos, productos de pescado y ensaladas RTE	Se dirigieron seis cebadores a la secuencia del gen <i>mpl</i> de <i>L. monocytogenes</i> . La amplificación se realizó a 64 °C durante 40 min con un límite de detección de 5 pg de ADN o 275 UFC por reacción. El ensayo tuvo un éxito del 100 % en detectar de 0.4 a 4 UFC g-1 de alimento después del enriquecimiento.	Busch et al., (2022).
Ensayo de LAMP para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón cocido	Se diseño un conjunto de seis cebadores dirigidos a ocho regiones del gen <i>hly A</i> ; el ensayo se realizó en 30 minutos a 65 °C y se reportó una especificidad y sensibilidad del 100% con respecto a un qPCR.	Fiore et al., (2023).
Desarrollo de un método LAMP para la detección rápida de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos	Se diseñaron seis cebadores para el gen <i>actA</i> . El ensayo se realizó a 65 °C por 30 minutos donde solo las muestras líquidas cambiaron por presencia de <i>L. monocytogenes</i> . Mostró ventajas frente a la PCR.	Chen et al., (2023).

Desarrollo de un ensayo visual para la detección ultrasensible de <i>L. monocytogenes</i> en leche y carne de pollo	Se modifico un bucle helicoidal que aísla el ADN y forma una estructura de hélice autocebada que amplifica a 65 °C por 75 min. Se diseño un juego de seis cebadores específicos para el gen <i>hlyA</i> . Los límites de detección fueron 120 UFC/mL. El ensayo mostró sensibilidad 100 veces mayor que la PCR.	Prasad et al., (2024).
Detección simplificada de LAMP basado en genes de la región V1-V3 ARNr 16S para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria spp.</i> en leche cruda.	Se desarrollo un protocolo que detectó 100 µg de ARNr 16S V1-V3 puro, así como 1 UFC/ml y 1 x 10 ³ UFC/ml de monocultivos de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i> con límites de detección en leche cruda de 10 UFC/ml y 1 x 10 ³ UFC/ml respectivamente. La presencia de <i>L. monocytogenes</i> se confirmó mediante PCR y ensayos microbiológicos (NOM-143-SSA1-1995) mostrando una concordancia entre ensayos con un valor Kappa de 0.74.	Barboza-Corona et al., (2026).

2.5.2.3. Uso del gen 16S del ARNr como marcador molecular

El gen 16S ARNr, también conocido como ADN ribosomal 16S, es un gen de mantenimiento que posee 1500 nucleótidos, una estructura altamente conservada y nueve regiones hipervariables(V1-V9) (Baker et al. 2003) las cuales, proporcionan información valiosa para la clasificación filogenética entre especies y permite el diseño de oligonucleótidos para el diagnóstico (Valenzuela-González et al., 2015). Particularmente, se ha denominado un marcador universal ya que se encuentra presente en todos los organismos conocidos; además, gracias a su gran variabilidad no solo permite distinguir los organismos más distantes, sino también los más cercanos (Valenzuela-González et al., 2015). Además, su estructura secundaria estable, permite una alineación precisa entre secuencias homologas lo cual es fundamental para realizar comparaciones filogenéticas confiables (Rodicio & Mendoza 2004).

Acinas et al., (2004) reportaron que las especies del género *Listeria* contienen 6 copias del gen 16S ARNr con ligeras variaciones entre ellas. Esta heterogeneidad intragenómica representa una ventaja para la subtipificación intraespecífica y la diferenciación entre especies (Hellberg et al., 2013). Gracias a este conjunto de características el gen 16S ARNr ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de métodos moleculares como PCR y LAMP, dirigidos a regiones específicas que permiten una detección rápida, sensible y específica de bacterias.

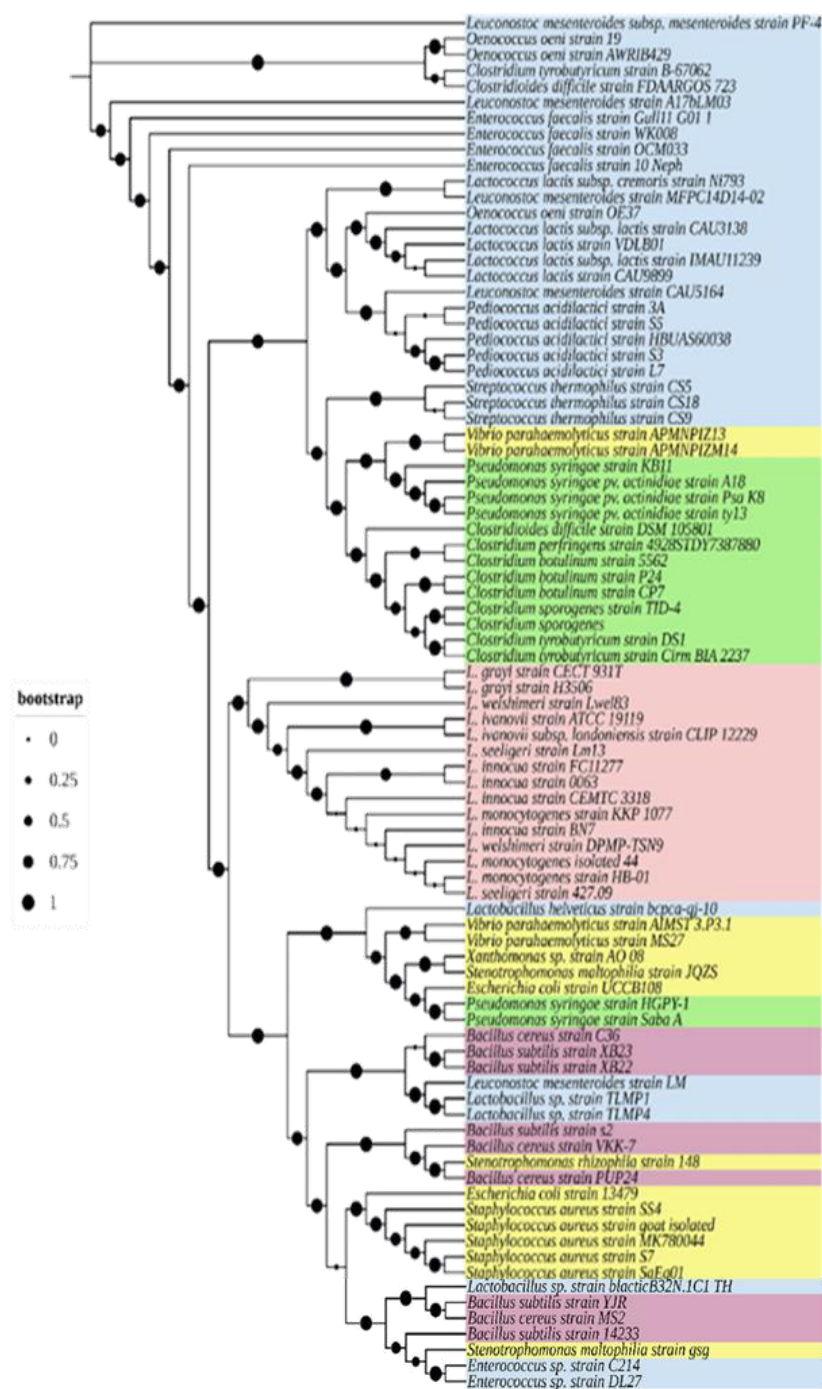


Figura 6. Árbol filogenético a partir de la alineación de la región V1-V2 del gen del ARNr 16S de *Listeria monocytogenes* y bacterias de importancia alimentaria. Azul: Bacterias del ácido láctico. Verde: contaminantes comunes en productos lácteos. Amarillo: patógenos transmitidos por alimentos, morado: cepas del género *Bacillus*, rosa: cepas de *Listeria*. De acuerdo con la simbología de Bootstrap el soporte de rama puede ser bajo (0-0.25), moderado (0.05) y alto (0.75-1) (Barboza-Corona et al., 2026).

III. JUSTIFICACIÓN

Dentro del panorama actual, resalta la detección de las bacterias del género *Listeria* debido a que las matrices alimentarias a las que afectan, como los productos lácteos, suelen ser de las principales fuentes de ingreso económico en nuestro país (Gallegos-Daniel et al., 2023). Tradicionalmente, la identificación de este patógeno se ha basado en el uso de cultivos microbiológicos combinados con pruebas bioquímicas, así como en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR. Actualmente se ha empleado la técnica LAMP, técnica de amplificación que, en comparación con los antes mencionados, destaca por su simplicidad operativa, menor tiempo de análisis y la posibilidad de visualizar los resultados a simple vista, lo que potencialmente reduce los costos de detección (Sánchez et al., 2014).

En los últimos años se han realizado ensayos para evaluar la detección específica de *L. monocytogenes* en alimentos, utilizando como genes diana sus factores de patogenicidad (*prfA*, *hlyA*, *feoB*, *lmo0753*, *plcB* y *actA*). Por lo que proponer un ensayo basado en el uso del gen 16S ARNr, basado en su eficiencia en productos lácteos, podría representar una ventaja significativa debido a que contiene nueve regiones hipervariables (V1–V9), útiles para la identificación y diferenciación entre especies. Además, dado que la diferencia genética entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* es mínima, esta detección permitiría identificar simultáneamente ambas especies.

Dicho enfoque no solo garantizaría la seguridad alimentaria y disminuiría el número de brotes (Melian et al., 2019), sino que también contribuiría al cumplimiento de la política de tolerancia cero a *Listeria* establecida en los programas de vigilancia y monitoreo de inocuidad alimentaria, fortaleciendo las estrategias de control microbiológico implementadas por las autoridades sanitarias y agroalimentarias (SENASICA, 2023).

IV. HIPÓTESIS

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) permite detectar *Listeria spp.* en quesos frescos de manera más rápida, específica y sensible que la PCR y la NOM-143-SSA1-1995.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Detectar *Listeria spp.* en queso fresco mediante LAMP, utilizando como marcador el gen 16S ARNr, y comparar el método con técnicas convencionales.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estandarizar un método de extracción de ácidos nucleicos de *Listeria spp.* en monocultivos y en muestras de queso fresco inoculadas artificialmente, compatible con LAMP y PCR.
- 2) Implementar la detección con LAMP en muestras de queso fresco, utilizando como blanco el gen 16S ARNr de *L. monocytogenes* y *L. innocua*.
- 3) Comparar LAMP, PCR y la NOM-143-SSA1-1995 para detectar *Listeria spp.* en quesos frescos inoculados artificialmente.
- 4) Probar la especificidad de la detección por LAMP en muestras de queso fresco comerciales.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiotecnología y Biología Sintética Microbiana y en el Laboratorio de Microbiología y Tecnología de la Leche de la Universidad de Guanajuato, División Ciencias de la Vida en el Campus Irapuato-Salamanca.

6.1. Selección de la matriz alimentaria

Considerando la alta incidencia de *Listeria spp.* en productos lácteos, la técnica se evaluó en muestras de queso fresco. Para el desarrollo de este proyecto se trabajó con un queso comercial proveniente de una tienda de autoservicio bajo la marca Aguascalientes, queso fresco ranchero de leche entera pasteurizada, con un contenido neto de 220 g. La elección de este producto se basó en respetar la denominación bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, la cual define la elaboración de quesos frescos tomando como materia prima leche cruda de vaca. En este contexto, se trabajó con un queso con alto contenido de humedad, sabor suave y sin corteza que se almaceno en condiciones de refrigeración (4°C).

Para fines experimentales, la matriz alimentaria fue manipulada en el Laboratorio de Microbiología y Tecnología de la Leche en un área aséptica siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 la cual, establece los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que deben observarse en el procesamiento y manipulación de alimentos para reducir la probabilidad de una posible contaminación cruzada o un falso positivo.

6.2. Inoculación

6.2.1. Preparación del inóculo

A partir de las cepas de *L. innocua* ATCC 3309 y *L. monocytogenes* ATCC 19115 se realizó una siembra en placa para obtener un cultivo puro. Esta siembra fue por estría cruzada en agar base Oxford, los cuales, se incubaron a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se observó el crecimiento y se seleccionó una colonia aislada de cada especie para ser

suspendida en glicerol estéril al 50% y almacenada a -80 °C. Asimismo, se preparó el inóculo inicial; se tomó una colonia aislada con un palillo estéril y se transfirió a 5 ml de caldo Soya Trypticaseína (TSB) para ser incubados a 37 °C durante 24 h en agitación constante. Una vez obtenido el inóculo, se cuantificaron las bacterias presentes en el medio de cultivo a través del método directo (recuento en placa de diluciones seriadas) e indirecto (espectrofotometría), para obtener tanto las unidades formadoras de colonias (UFC) como las absorbancias de densidad óptica a 600 nm (OD600).

El análisis por método directo se basó en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Se realizaron nueve diluciones seriadas 1:10 en buffer fosfato (pH 7.2). Se colocó 1 ml del inóculo inicial con 9 ml de buffer y se llevó al vortex, enseguida se tomó 1 ml de dicha dilución y se adicionó 9 ml de buffer fosfato y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 1×10^{-9} UFC/ml. Se prepararon placas del medio Agar base Oxford de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se etiquetaron y se vertieron 100 μ l (0.1 ml) de cada dilución. Para homogeneizar la muestra, se realizaron 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Como control negativo, se incluyeron una caja sin inóculo y otra con diluyente como testigos de esterilidad. Finalmente se incubaron las cajas en posición invertida a 37°C durante 48 ± 2 horas. Transcurrido el tiempo, se observó el crecimiento y se seleccionaron las cajas para lectura. Se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas, incluyendo las colonias puntiformes, registrando únicamente aquellas donde aparecieron entre 25 y 250 UFC para disminuir el error en la cuenta por aglomeración (>250) o por escasez (<25) y evitar resultados estadísticamente no representativos.

Por otro lado, el análisis por el método indirecto se basó en medir la Densidad Óptica de las diluciones a una absorbancia de 600nm (OD600). Se utilizó el espectrofotómetro GloMax Multi Jr. marca Promega, modelo E6081 y se configuró la longitud de onda a 600nm, se llenó una cubeta limpia y sin rayones con 1 ml de agua como blanco y se realizó la primera lectura. En seguida se llenó una segunda cubeta con 1 ml del inóculo original y así

sucesivamente hasta obtener la lectura de todas las diluciones. Dichas lecturas se consideraron en un rango límite entre 0.1 y 0.8, si la lectura resultaba mayor a 0.8 se realizaba una dilución adicional con agua y se multiplicaba por el factor de dilución.

6.2.2. Inoculación de la muestra

Con base a la NOM-110-SSA1-1994 se ajustó el inóculo a 1.423×10^9 UFC/ml y se adicionó a la matriz alimentaria. Se tomaron 10 ml del cultivo ajustado y se adicionaron 90 ml de buffer fosfato pH 7.2 como diluyente. Respetando dicha relación, se pesaron 10 g de queso fresco, se colocaron en un recipiente estéril de tamaño adecuado, se adicionaron 90 ml de la solución obtenida y se incubó a 4°C durante 24h. Esto se repitió con cada una de las diluciones seriadas. Para homogeneizar y asegurar una distribución uniforme del inóculo, las muestras se molieron en una licuadora durante 1 a 2 min para imitar los movimientos peristálticos de un stomacher. Se transfirió la suspensión a un tubo con taparrosca y se permitió que las partículas grandes se sedimentaran. Finalmente, se tomó 1 ml del sobrenadante y se mezcló con 9 ml de buffer fosfato pH 7.2 en otro tubo estéril, obteniendo así una muestra representativa.

6.3. Estandarización del método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

6.3.1. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN total bacteriano, se tomó 1 ml de monocultivo de *L. monocytogenes* y *L. innocua*. Respecto a la especie a evaluar, se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. De acuerdo con las instrucciones del kit de extracción de ADN genómico Monarch, para provocar la lisis celular y liberar los ácidos nucleicos, el sedimento se centrifugó a $1,000 \times g$ durante 1 minuto y se resuspendió en 100 µl de PBS frío. De inmediato, se añadió 1 µl de proteinasa K y 3 µl de ARNasa al pellet resuspendido y se mezcló agitando brevemente en vórtex para asegurar que las enzimas se dispersaran eficientemente. Asimismo, se añadieron 100 µl de tampón de lisis celular y se agitó en vórtex. Una vez que se obtuvo una solución viscosa, se incubó durante 5 minutos a 56 °C

en un termobloque con agitación a 1400 rpm. Para la unión y elución del ADN genómico se añadió 400 µl de tampón de unión de ADN genómico a la muestra y se mezcló mediante agitación vertical durante 5-10 segundos. Enseguida, se transfirieron 600 µl de la mezcla obtenida a una columna de purificación preinsertada en un tubo de recolección, donde se centrifugó primero durante 3 minutos a 1000 g para unir el ADN genómico, y después durante 1 minuto a 12,000 g. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección, donde se agregaron 500 µl del tampón de lavado y se agitó ligeramente de forma manual. Inmediatamente, se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 g y se desechó el flujo continuo. Dentro de la misma columna, se añadieron 500 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 1 min a 12,000 g. Una vez obtenido el flujo, se desecharon el tubo de recolección y se colocó la columna en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml al que se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasas precalentada (60 °C); se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g durante 1 min. Finalmente, el ADN genómico obtenido se usó como control positivo en las reacciones de amplificación.

6.3.2. Extracción de ácidos nucleicos en muestras de queso fresco

Previo a la extracción, se transfirieron 1.5 ml de las suspensiones de queso inoculadas en diferentes diluciones a un tubo estéril de 2 ml, el cual se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 rpm con el fin de separar la fase lipídica de la suspensión. Una vez centrifugado se obtuvo una muestra relativamente limpia y se transfirió 1 ml a otro tubo estéril de 2 ml. Para la extracción se implementaron cinco métodos con el objetivo de evaluar su compatibilidad con la técnica de amplificación por lo que en cada ensayo se utilizaron dos controles positivos (monocultivos de *L. innocua* y *L. monocytogenes*), cuatro controles negativos (agua, *Escherichia coli*, queso fresco sin inocular y caldo TSB) y nueve diluciones representativas (de 1×10^9 a 1×10^1 UFC/ml).

6.3.2.1. Solución salina tamponada con fosfato (PBS)+ Tween 20

La muestra se centrifugó durante 10 min por 6500 g a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y

se centrifugó a 1600 g durante 5 min a 4 °C; dicho lavado se realizó 2 veces. Tras el segundo lavado se adiciono 100 µl de la solución PBS al 0.05% + Tween 20 y se llevó a ebullición (100°C) durante 12 min. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar la muestra y se llevó a centrifugar a 1600 g durante 5 min; el sobrenadante obtenido fue utilizado para la reacción (Longhi et al., 2003).

6.3.2.2. Ebullición

Se centrifugaron las muestras de queso inoculadas artificialmente durante 5 min a 11000 rpm. El sobrenadante se decantó y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril (ddH₂O) durante 5 min a 6500 rpm. El pellet se resuspendió en 1ml de agua destilada estéril (ddH₂O) y se llevó a ebullición (100°C) durante 10 min. Una vez provocada la lisis, se centrifugó a 8000 rpm durante 30 s. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y fue utilizado para la reacción de amplificación (Shao et al., 2011).

6.3.2.3. Solución tampón de lisis fenol-cloroformo

Se mezclaron 500 µl de muestra con 500 µl de NaCl al 0,9% y se centrifugó durante 3 min a 10000 rpm; se eliminó la fase lipídica con un hisopo estéril y el sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril al cual se añadieron 400 µl de solución de lisis (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8) y 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen). La mezcla se incubó durante 2 horas a 50°C. Transcurrido el tiempo, se añadió 1 ml de NaCl 1.5 M y se homogenizó en vórtex. Se realizó un lavado, dos veces, con 500 µl de una solución de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico 25:24:1; se centrifugó a 12.000 rpm durante 4 min y se transfirieron 500 µl del sobrenadante a otro tubo estéril. Se agregó 1 ml de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min; se decantó el sobrenadante, se dejaron secar los tubos y el botón se resuspendió en 25 µl de agua destilada estéril (ddH₂O) (Marianelli et al., 2008).

6.3.2.4. CTAB 2%

De acuerdo con el protocolo propuesto por SENASICA, (2020), para provocar la lisis celular y liberar los ácidos nucleicos se tomaron 500 µl de la dilución de queso fresco inoculado en un tubo estéril de 2 ml y se agregaron 1.5 ml de buffer CTAB 2% (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) previamente calentado a 80 °C y 100 µl de SDS (dodecilsulfato sódico) al 10 % (p/v). La mezcla se incubó en baño María a 80 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo se atemperaron los tubos y posteriormente se colocaron en la centrifuga durante 5 min a 16 000 x g. Un mililitro del sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se agregaron 1 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y 30 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5.2). La muestra se mezcló por inversión y se colocó en la centrifuga a 16 000 × g durante 10 min. Posteriormente se transfirieron 850 µl del sobrenadante a un tubo estéril de 2 ml, se adicionaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 16 000 × g durante 10 min. Una vez obtenido el sobrenadante, se transfirieron 850 µl a un tubo estéril de 1.5 ml con 500 µl de etanol absoluto o 2-propanol y se mezcló por inversión y se centrifugó a 16 000 x g por 10 min. Se decantó el sobrenadante, procurando no tirar la pastilla, y se lavó con 1 ml de etanol al 70 %. Se centrifugó a 16 000 x g por 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas.

6.3.2.5. Extracción modificada por Parayre

La muestra se homogeneizó en 10 ml de citrato trisódico estéril al 2 % (p/v) en vortex durante 1 min y enseguida se transfirió 1 ml de la suspensión a un tubo estéril para ser centrifugado a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se eliminó la capa lipídica formada con ayuda de una pipeta; el pellet obtenido se resuspendió en 400 µl del buffer de lisis enzimática (20 mM Tris HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1,2 % Triton X100, 20 mg/ml de lisozima) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación se dejó enfriar y se añadió 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Qiagen), 200 µl del buffer AL (10 ml de Tris-HCl 1.0 M pH 7.5, 200 ml de Tris-HCl 1 M pH 7.5, 10 ml de EDTA 0.5 M, pH 8, 12.5 ml de SDS al 10%, 5 ml de NaCl 5 M y 67.5 ml de ddH₂O) y se incubó a 70 °C durante 30 min.

Se centrifugó a 10,000 g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron 200 µl de etanol absoluto a 4°C, se centrifugó a 10000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µL de ddH₂O (Parayre et al., 2007).

6.3.3. Cuantificación por espectrofotometría y verificación de la integridad del ADN total

Se cuantificó 1 µl de ADN genómico, así como de los ácidos nucleicos, mediante espectrofotometría para determinar su concentración en ng/µl. Se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ y se siguieron las instrucciones del fabricante para su uso. Para calibrar el espectrofotómetro, se colocó 1 µl de agua y posteriormente las muestras. La pureza del ADN genómico y de los ácidos nucleicos se evaluó mediante valores de absorbancia entre 1.7 y 2.0 para determinar la relación A260/A280. Para verificar su integridad, las muestras de ADN se separaron en geles de agarosa al 1% (1 g de agarosa en 100 ml de TAE). Además, se depositaron 2 µl de marcador molecular 1 kb Plus ADN Ladder-Invitrogen™ de Thermo Scientific y 5 µl del material genético junto con 1 µl de buffer de carga (6X) en cada muestra. Se encendió la cámara de electroforesis con una potencia de 120 V durante 20 minutos y se dejó correr. Transcurrido ese tiempo, se colocó el gel en el transiluminador a 302 nm y se observaron los fragmentos amplificados de ADN.

6.4. Ensayo colorimétrico LAMP

6.4.1. Síntesis de cebadores

Se sintetizaron cinco cebadores para la reacción de LAMP diseñados a partir de la secuencia obtenida de *L. monocytogenes* en NEB LAMP, la cual consta de dos cebadores externos, Forward Outer Primer (F3) y Backward Outer Primer (B3), y dos cebadores internos, denominados Forward Inner Primer (FIP) (F1C, F2) y Backward Inner Primer (BIP) (B1C, B2). Cada par se compuso de dos secuencias distintas correspondientes a las secuencias sentido

y antisentido del ADN diana de tal manera que ayudaron en la formación del bucle. Además, un cebador de bucle Forward Loop Primer (LF) para acelerar la reacción de amplificación mediante la unión adicional a sitios inaccesibles para los cebadores internos. Dada esta estructura, las secuencias utilizadas fueron aquellas reportadas por Mendoza-Valerio et al. (2024), cuyos oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias del gen 16S ARNr en la región hipervariable V1-V3 de *L. monocytogenes* (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos y secuencia para *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Tomado de Barboza-Corona et al., (2026).

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→ 3')	Posición en el gen 16S (<i>L. innocua</i>)	Posición en el gen 16S (<i>L. monocytogenes</i>)
LF	TGCCTGTAAGTTGGGGATAACT	69-90	130-151
B3	AGTTGGTAGGGTAATGGCCT	195-214	255-274
F3	CAAAGTTAGTGGCGGACGG	29-47	90-108
BIP	GCTATCGCTTACAGATGGGC	159-178	219-238
FIP	ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC	88-112	149-173

Con base en la tabla 9, se preparó un stock de los cebadores LAMP 10X del cual se tomaron alícuotas para simplificar la elaboración de las reacciones individuales. Fueron conservadas en agua libre de nucleasas y almacenadas a –20 °C.

Tabla 9. Mezcla de cebadores LAMP 10X y su concentración.

Cebador	Concentración 10X (stock)	Concentración 1X (final)
PIF	16 µM	1.6 µM
BIP	16 µM	1.6 µM
F3	2 µM	0.2 µM
B3	2 µM	0.2 µM
LF (Bucle)	4 µM	0.4 µM

6.4.2. Reacción LAMP

6.4.2.1. Kit comercial WarmStart Colorimetric LAMP 2X

Considerando las instrucciones del fabricante, la mezcla se estandarizó con un volumen final de 12 µl a partir de las siguientes concentraciones: 6 µl de la mezcla maestra WarmStart Colorimetric LAMP 2X (ADN y ARN) (NEB M1800S), 1 µl de la mezcla de cebadores LAMP 10X, 1 µl (~10 ng) de ADN correspondiente a la muestra y 4 µl de agua libre de nucleasas. Dependiendo del número de muestras, se realizó una mezcla maestra para agilizar y simplificar la preparación de las reacciones, reduciendo errores, contaminación y gasto innecesario de reactivo. Este “mix” contuvo todos los componentes necesarios para la reacción excepto la muestra de ADN, la cual, fue incorporada de forma individual en cada tubo de reacción. Una vez obtenidas las reacciones, se homogeneizó en vórtex y se incubó en un ThermoShaker modelo MS-100 a diferentes tiempos (30 min - 120 min) y temperaturas (60 °C – 65 °C) según el método de extracción de ADN. Para determinar el tiempo exacto de reacción, el cambio de color se evaluó a los 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 min. Al observar un tono amarillo en el control negativo, se detuvo el tiempo de incubación y se consideró terminada la amplificación.

Adicionalmente, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en solución tampón TAE 1X, teñidas con 2 µL de bromuro de etidio. Se dejaron correr a 120V durante 20 min y se observaron en un transiluminador UV a 302 nm para comprobar la amplificación bacteriana mediante el bandeo.

6.4.2.2. Cuantificación del color

Una vez estandarizados los tiempos de reacción (Tabla 10) por método de extracción, se cuantificó el color obtenido por absorbancia 434 (amarillo) menos 560 (rojo) en un lector Multi-Modal de Microplacas Synergy™ HTX modelo HTXS1LFA con el software de análisis de datos de microplacas BioTek Gen5 2.06 (Dao Thi et al., 2020). Se preparó una microplaca con 8 µl correspondientes a cada muestra, controles positivos y controles negativos, se colocó en el equipo y se dió lectura. Dentro de los comandos se seleccionó la microplaca negra con 384 pozos de fondo transparente y, para la descripción de las lecturas, se modificó a un espectro

con 454 y 560. Los pozos fueron leídos por defecto, arrojando un conjunto de datos correspondientes a su intensidad de color, restando la absorbancia de 434 a la de 560 para determinar la densidad del color presente y dar una idea aproximada del color que está siendo percibido visualmente.

6.5. Sensibilidad de detección

Para determinar la sensibilidad práctica del método de extracción se evaluaron distintas concentraciones de ADN genómico para estimar el rendimiento y la compatibilidad de cada método con la técnica de amplificación, así como el límite mínimo de detección (UFC/ml).

6.5.1. Concentración de ADN genómico

De acuerdo con la metodología descrita en el punto 6.3.1, se extrajo ADN genómico a partir de 1 ml de inóculo de *L. monocytogenes* y *L. innocua*, siguiendo las instrucciones del kit de extracción Monarch. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ADN de cada muestra en ng/μL mediante espectrofotometría utilizando 1 μL del producto obtenido. Para tomar un punto de partida, durante la estandarización se ajustó la concentración de todas las muestras a 100 ng/μL ± 2; por lo tanto, las concentraciones superiores a 100 ng/μL se diluyeron con agua libre de nucleasas hasta alcanzar la concentración deseada.

Para evaluar el límite de detección, se realizaron once diluciones seriadas a partir de la concentración estandarizada, hasta alcanzar una concentración final de 1 ag/μL, que se considera el límite mínimo de cuantificación del ADN. Estas diluciones se utilizaron como templado para la reacción de LAMP, preparada según lo descrito en el punto 6.4.2.1, empleando la mezcla maestra WarmStart Colorimetric LAMP 2X (NEB M1800S). Una vez obtenidas las reacciones, se homogeneizaron y se incubaron a 65 °C en un termobloque durante 60 minutos. Finalmente, se realizó la cuantificación colorimétrica del producto amplificado, tal como se detalla en el punto 6.4.2.2 y una electroforesis en geles de agarosa al 2% para determinar la capacidad mínima de detección del ensayo.

6.5.2. Concentración de microorganismos viables (UFC/ml)

Para determinar la concentración límite de microorganismos viables y a su vez evaluar la reproducibilidad de los métodos de extracción aplicados en las matrices alimentarias, se realizaron diluciones seriadas de 1×10^9 a 1×10^1 UFC/ml a partir de las muestras inoculadas de queso fresco (descrito en el punto 6.2) con *L. innocua* y *L. monocytogenes*, se realizaron las extracciones de material genético conforme al método seleccionado. La sensibilidad del método se evaluó mediante reacciones de LAMP, utilizando 1 μ L de cada extracción como molde, de acuerdo con las especificaciones del fabricante del kit WarmStart Colorimetric LAMP 2X (NEB M1800S) establecidas en el punto 6.4.2.1. Las reacciones se homogeneizaron e incubaron en un termobloque a 65 °C en distintos intervalos de tiempo. Posteriormente, se realizó la cuantificación colorimétrica del producto amplificado (apartado 6.4.2.2) y una electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar el límite de detección del ensayo.

6.6. Especificidad del ensayo

Para confirmar la especificidad de la técnica, el material genético de ensayos positivos se corrobora por PCR punto final y por cultivos microbiológicos siguiendo la metodología de la NOM-143-SSA1-1995 para la detección de *L. monocytogenes*.

6.6.1. Evaluación con PCR

Para la amplificación se utilizó el protocolo establecido por Burbano et al., (2006) el cual, se basa en detectar los oligonucleótidos LM1 (sentido: 5'- GCTTAATAACCCCTGACCG-3') que amplifican un regulador transcripcional perteneciente a la familia MerR para *Listeria monocytogenes* con 260 pb y SPP1 (sentido: 5'-GAGTAGACACAAAGGAAT-3'; antisentido: 5'-GCTTTGAACATCCAGATA-3') que amplifica para la proteína codificada ferritina que contiene hierro para *Listeria spp.* con 427 pb. Como molde para la reacción se utilizaron el ADN genómico obtenido en el punto 6.3.1 y el material genético de las muestras de queso fresco obtenido en el punto 6.3.2.2, que describe el protocolo de Ebullición. Las condiciones de la

PCR se optimizaron para llevarse a cabo en una mezcla de reacción de 10 µL con 2 µL del ADN de muestra (Tabla 10).

Tabla 10. Componentes para la mezcla de PCR.

Componente	Cantidad 10X	Cantidad 1X
dH ₂ O	71.5 µl	7.15 µl
Buffer	10 µl	1 µl
MgSO ₄	10 µl	1 µl
dNTPs	2 µl	0.20 µl
FW	2 µl	0.20 µl
RV	2 µl	0.20 µl
Taq	0.5 µl	0.05 µl
ADN	2 µl	0.20 µl
Volumen final	100 µl	10 µl

Para llevar a cabo la amplificación se utilizaron los siguientes parámetros de ciclado: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min; seguida de 30 ciclos de a 94 °C durante 30 s, una hibridación a 56 °C durante 30s, una extensión inicial a 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C durante 5 min (Tabla 11). Los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) en solución tampón TAE 1X, teñidos con 2 µL de bromuro de etidio, a 120 V durante 15 min, y fueron observados bajo luz ultravioleta para compararlos con el marcador molecular 1Kb plus.

Tabla 11. Condiciones de amplificación optimizadas para PCR.

Parte del ciclo	N° de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	1	94	02:00
Templado de oligos	30	94	00:30
Hibridación		56	00:30
Extensión inicial		72	01:00
Extensión final	1	72	05:00

6.6.2. Evaluación con el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995

La presencia o ausencia de *Listeria* también fue corroborada a través del método microbiológico de acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995. Se tomó 1 ml de la suspensión de queso fresco inoculado de manera representativa. Se colocó en caldo de enriquecimiento TSB con piruvato de sodio al 0.1 % (p/v) y se incubó a 30 °C por 48 h. Transcurrido el tiempo se sembró en un medio selectivo de agar base Oxford específico para *Listeria spp.* Como control positivo se utilizó un cultivo en placa de *L. innocua* ATCC 3309, y como controles negativos se utilizaron caldo de enriquecimiento sin inocular y caldo de enriquecimiento inoculado con *Escherichia coli*. Transcurrido el período de incubación, se observó el crecimiento característico de *Listeria* en placa con colonias y halos negros. Según el número de UFC, se reportó la ausencia o presencia de *Listeria* en 25 ml de muestra.

6.6.3. Evaluación en productos comerciales

Se realizó un mapeo en zonas aledañas a la ciudad de Irapuato, Guanajuato para adquirir muestras en comercios locales, incluyendo establecimientos formales e informales, y evaluar la ausencia o presencia de *Listeria spp.* a partir del protocolo estandarizado. Con base en una estadística paramétrica, se seleccionaron 30 muestras para respetar los criterios de normalidad y tener un panorama más robusto para el posterior análisis.

6.6.3.1. Toma de muestra

Las muestras fueron designadas con un código numérico del 1 al 30 y su correspondiente repetición (R) según la fecha de compra y de procesamiento, para facilitar su trazabilidad durante el análisis experimental. Una vez rotuladas, cada muestra fue manipulada en condiciones asépticas y pesada en una balanza analítica con el objetivo de estandarizar la cantidad empleada conforme lo indica la NOM-143-SSA1-1995; es decir, una porción representativa de 25 g del alimento, incluyendo tanto la superficie externa como la parte interna según lo descrito en el punto 6.6.2.

6.6.3.2. Caracterización organoléptica y determinación de acidez (pH)

Previo al diagnóstico molecular y microbiológico, se realizó una caracterización organoléptica de los quesos frescos comerciales considerando atributos como color, textura superficial y aroma, mediante la observación directa, utilizando criterios previamente definidos que describen las características típicas de un queso fresco. Asimismo, se midió el nivel de acidez (pH), dado que el reactivo utilizado en la técnica estandarizada de LAMP se basa en el cambio de pH. Para ello se utilizó un probador de pH para leche (Milk pH Tester) HI981034 marca Hanna para tener una lectura precisa.

6.6.3.3. Evaluación microbiológica y detección molecular de *Listeria spp.* mediante NOM-143-SSA1-1995, LAMP y PCR

Para probar la efectividad de la técnica estandarizada en condiciones reales y establecer un protocolo de monitoreo en productos de consumo común se evaluaron las muestras comerciales por el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995 descrito en el punto 6.6.2., así como por PCR y LAMP según los puntos 6.6.1. y 6.4.2. respectivamente. Como controles positivos se utilizó un monocultivo de *L. innocua* ATCC3309 y queso fresco inoculado con *L. innocua*; como controles negativos se utilizó caldo de enriquecimiento inoculado con *Escherichia coli*, caldo de enriquecimiento TSB sin inocular, queso sin inocular y agua destilada.

6.6.3.3.1. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas positivas

En el caso de muestras en sospecha o que resultaron positivas a la presencia de *Listeria spp.* se realizó un preenriquecimiento en caldo TSB con piruvato de sodio al 0,1 % (p/v) incubado a 30°C por 48 h sin suplementos y un enriquecimiento adicional en caldo *Listeria* fraser broth base ISO incubado a 30°C por 24 h adicionado con suplementos como acriflavina, ácido nalidíxico y citrato férrico amónico para inhibir la flora competitiva y detectar la hidrólisis de la esculina selectiva para *Listeria spp.*. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó una siembra en Agar Soya Trypticaseína como medio general y en Agar base Oxford como medio

selectivo incubado a $30^{\circ}\text{C} \pm 5$ por 24 a 48h. De acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995 se observó el crecimiento en placa de colonias de color blanco o azul iridiscentes, así como de colonias negras con halo negro respectivamente. Se seleccionaron 5 ± 2 colonias con morfología aparentemente similar para ser resembradas en placas de Agar base Oxford e incubadas a 37°C por 24h. Posterior a ello, se evaluó el crecimiento de las cepas aisladas tomando como referencia las cepas de *Listeria innocua* ATCC3309 y *Listeria monocytogenes* ATCC19115. Con base en esta comparación morfológica, se seleccionaron 5 ± 2 colonias características, a partir de las cuales se obtuvieron monocultivos destinados a las pruebas de identificación. De manera complementaria, a las cepas aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas de caracterización básica, incluyendo la tinción de Gram, la prueba de KOH al 3% y las pruebas de catalasa y oxidasa.

6.6.3.3.2. Diagnóstico y confirmación molecular

El diagnóstico molecular de las cepas aisladas se llevó a cabo empleando las técnicas de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descritas previamente. Para reforzar los resultados obtenidos en el laboratorio se realizó la amplificación del gen 16S ARNr mediante PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos FW 16S (sentido: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTGAG -3') y RV 16S (sentido: 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3') que amplifican un fragmento conservado del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S de aproximadamente 1400-1500 pb. Como templado para la reacción se utilizó material genético extraído mediante el método de ebullición descrito en el punto 6.3.2.2. Las condiciones de la PCR se optimizaron para llevarse a cabo en una mezcla de reacción de 25 μL totales con 2 μL de ADN (Tabla 12).

Tabla 12. Componentes necesarios para ejecutar la reacción en cadena de la polimerasa.

Componente	Cantidad 1X	Cantidad 1X
dH ₂ O	6.5 μl	16.25 μl
Buffer	1 μl	2.5 μl
MgSO ₄	1 μl	2.5 μl
dNTPs	0.20 μl	0.50 μl

FW	0.20 µl	0.50 µl
RV	0.20 µl	0.50 µl
Taq	0.1 µl	0.25 µl
ADN	0.8 µl	2 µl
Volumen final	10 µl	25 µl

Para la amplificación se empleó un ciclo con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min; seguido de 30 ciclos de a 94 °C durante 30s, una hibridación a 56 °C durante 30s, una extensión inicial a 72 °C durante 1:30 min y una extensión final a 72 °C durante 5 min (Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros usados en cada ciclo de la PCR para amplificar el gen 16S ARNr.

Parte del ciclo	N° de Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	1	94	02:00
Templado de oligos		94	00:30
Hibridación	30	56	00:30
Extensión inicial		72	01:30
Extensión final	1	72	05:00

Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) en solución tampón TAE 1X, teñidos con 0.8 µL de bromuro de etidio corridos a 120V por 15 min. Una vez obtenidos los amplicones, las barras correspondientes fueron cortadas con un bisturí estéril bajo luz UV para ser purificadas siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial FavorPrep de FavorGen con el fin de eliminar los residuos de la reacción y obtener ADN de alta calidad ($A_{260}/A_{280} \sim 1.8 - 2$); asimismo, el producto purificado se sometió a un proceso de concentración por evaporación en un equipo SpeedVac para alcanzar altas concentraciones (≥ 100 ng/µL).

Finalmente, las muestras fueron enviadas al laboratorio LabSerGen del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV),

Unidad Irapuato, para su secuenciación mediante el método de capilaridad por Sanger. A partir de los resultados obtenidos, se utilizaron los softwares MEGA versión 12.1 y Clustal Omega para generar un alineamiento y una secuencia consenso, la cual, fue posteriormente comparada con el banco de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para confirmar la identidad de las cepas a nivel de género y especie.

6.7. Evaluación estadística

Como parte de lo descrito en el punto 6.3.2., se realizó un análisis estadístico utilizando el software SAS (Statistical Analysis System) para evaluar los efectos principales de los métodos de extracción, las concentraciones bacterianas y la posible interacción entre ambos factores, determinando además la significancia del factor de repetición.

Para determinar el método de extracción de ácidos nucleicos más robusto se realizó una evaluación sistemática comparativa considerando diferentes condiciones experimentales y tipos de muestras. Se analizaron los cinco métodos de extracción de ácidos nucleicos previamente descritos (Ebullición, PBS + Tween 20, Fenol Cloroformo, CTAB 2% y Parayre), utilizando doce tratamientos que incluyeron controles positivos, controles negativos y diluciones seriadas de *Listeria spp.* a diferentes concentraciones (1×10^9 a 1×10^3 UFC/ml). Cada tratamiento se realizó por duplicado para evaluar la reproducibilidad del método.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los métodos de extracción, se aplicó un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), tomando como variable dependiente la absorbancia diferencial obtenida ($\Delta\text{Abs} = 434 - 560 \text{ nm}$). Esta variable represento el cambio de color asociado a la acidificación del medio, indicador directo de la amplificación. Asimismo, se realizó una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey (HSD), con el fin de identificar específicamente qué métodos de extracción y tratamientos presentaban diferencias estadísticamente significativas en los valores de absorbancia diferencial (ΔAbs).

De manera complementaria, se estructuró un diseño de experimentos completamente al azar para el punto 6.6.3, considerando un total de 30 muestras como unidades experimentales, cada una analizada por duplicado. Esto permitió tomar las réplicas como una fuente de error para mejorar la precisión y confianza de los resultados, así como fortalecer la validez estadística del estudio. Debido a la naturaleza de los datos, con variables cuantitativas y cualitativas, se definieron cuatro variables de respuesta: el valor de pH y la detección mediante las técnicas de LAMP, PCR y la NOM-143-SSA1-1995.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS (Statistical Analysis System) donde la variable pH se trató como variable cuantitativa continua y se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, utilizando el procedimiento de Modelo Lineal General (GLM) considerando como factores tanto a la muestra como a la réplica. Asimismo, se realizó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (HSD) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Por otro lado, los resultados cualitativos de LAMP, PCR y la NOM-143-SSA1-1995 se trataron como variables categóricas con valores mutuamente excluyentes para resultados positivos (+) y resultados negativos (-). Estas variables fueron analizadas mediante tablas de contingencia y pruebas de chi-cuadrada (χ^2), con el fin de evaluar la relación entre los métodos de diagnóstico considerando un nivel de significancia del 5% usando el comando "CHISQ EXPECTED". De manera complementaria, se realizó un segundo análisis utilizando como única variable el resultado del diagnóstico para estimar la probabilidad de detectar muestras positivas o negativas.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1. Estandarizar un método de extracción de ácidos nucleicos de *Listeria* spp. en monocultivos y en muestras de queso fresco inoculadas artificialmente, compatible con LAMP y PCR.

7.1. Inoculación de la matriz alimentaria

Para evaluar la sensibilidad del método, se inocularon artificialmente distintas muestras de queso fresco con diferentes concentraciones de *L. monocytogenes* y *L. innocua*. De acuerdo con Badui, (2016) los sólidos totales de la leche y su alto contenido de humedad juegan un papel crucial en la susceptibilidad a la contaminación bacteriana dado que un mayor contenido de agua, que depende en gran medida de la concentración de caseína y otros sólidos, influye directamente en el éxito de la inoculación sin necesidad de un preenriquecimiento o un mayor tiempo de incubación.

En consideración a lo anterior, se logró un crecimiento oportuno, el cual se cuantificó y analizó mediante un modelo ajustado a una curva de calibración correspondiente a las UFC/ml y la densidad óptica (OD600) del inoculado con diferentes concentraciones de las especies de *Listeria*. El análisis de regresión lineal reveló una alta correlación positiva entre la turbidez del cultivo y la concentración bacteriana, con coeficientes de determinación de 0.9941 para *L. innocua* y 0.9266 para *L. monocytogenes*. De acuerdo con Duh y Schaffner (1993), los aislados de *L. innocua* presentan una ventaja selectiva sobre *L. monocytogenes* durante el cultivo de enriquecimiento, lo cual generalmente se atribuye a los nutrientes presentes en el caldo TSB y al uso de temperaturas de incubación inferiores a 40 °C. De igual manera, Curiale y Lewus (1994) reportaron que *L. innocua* crece mucho más rápido que *L. monocytogenes* en caldo de soya tripticasa debido a su menor exigencia. Por otro lado, en términos del modelo ajustado, se observó una correlación similar a la reportada por Mendoza-Valerio et al. (2024), quienes obtuvieron una ecuación ajustada de $y = 3 \times 10^{-10} x + 0.0184$ y $y = 5 \times 10^{-10} x + 0.0834$ para *L. innocua* y *L. monocytogenes*, respectivamente. En comparación, se observó un comportamiento similar para *L. innocua* pero, una gran variación en el comportamiento de *L.*

monocytogenes a pesar de haber utilizado las mismas cepas, ATCC3309 y ATCC19115. Esto puede atribuirse en parte a la preparación inicial de los inóculos y los factores de dilución empleados.

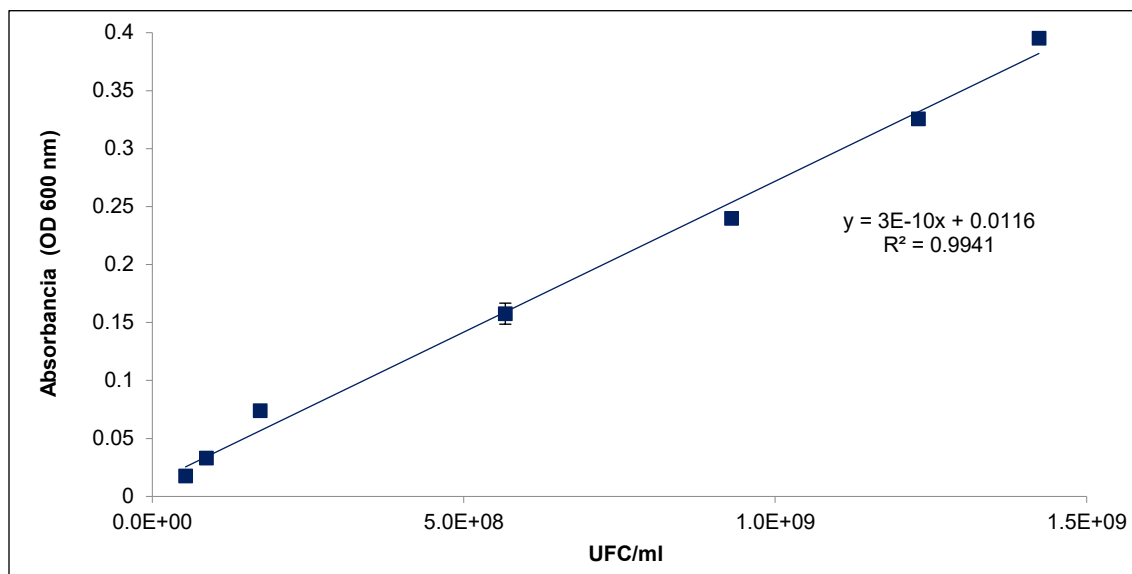


Figura 7. Curva de calibración entre la relación de UFC/ml de *Listeria innocua* y la densidad óptica (OD600) en medio TSB.

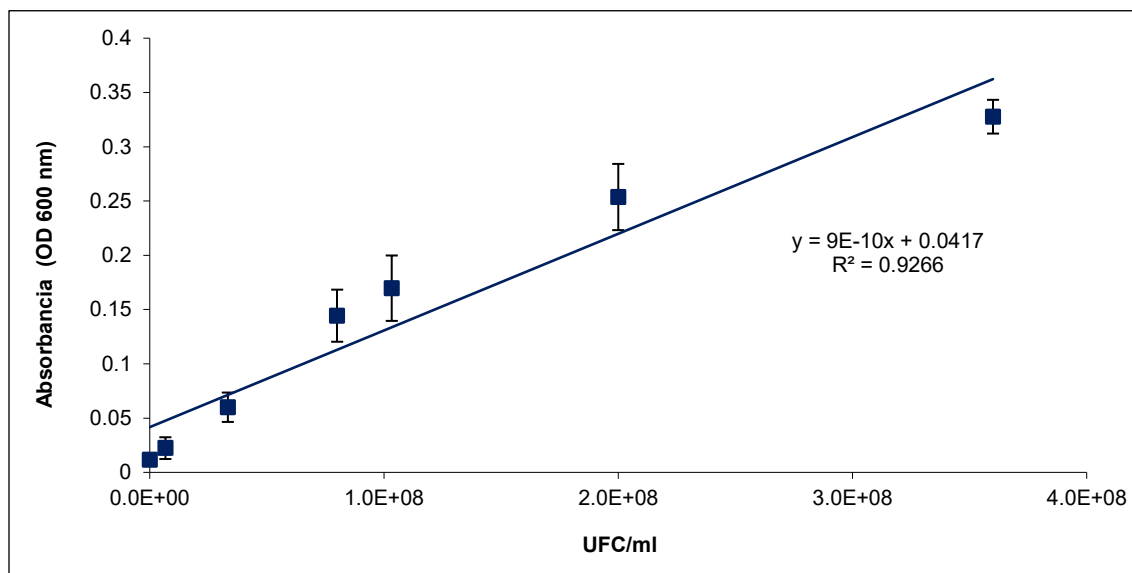


Figura 8. Curva de calibración entre la relación de UFC/ml de *L. monocytogenes* y densidad óptica (OD600) en medio TSB.

7.2. Optimización de las reacciones LAMP

La optimización de parámetros como la temperatura y el tiempo de incubación, la concentración y pureza del ADN, la mezcla de cebadores, el volumen final de reacción y las condiciones de procesamiento de la muestra fue fundamental para obtener una amplificación reproducible con el kit WarmStart Colorimetric LAMP 2X, así como para reducir la ocurrencia de amplificaciones inespecíficas (Notomi et al., 2000).

Por otro lado, los resultados previos a la estandarización evidenciaron que el tiempo de reacción es determinante a la compatibilidad con el método de extracción, dado que incubaciones prolongadas pueden inducir amplificaciones no específicas, mientras que tiempos muy cortos generan resultados poco confiables (Kaur et al., 2023). En este sentido, la estandarización de las condiciones experimentales permitió garantizar la reproducibilidad del cambio de color asociado a la amplificación (Tanner et al., 2015). Asimismo, el análisis espectrofotométrico demostró que la amplificación con LAMP condujo a una acidificación del medio, alterando los picos de absorbancia de acuerdo con el viraje del indicador (Goto et al., 2009; Oliveira et al., 2022; Papadakis et al., 2020). Por lo que, los resultados obtenidos confirman que la cuantificación espectrofotométrica complementa eficazmente la observación visual, permitiendo discriminar de forma más precisa entre reacciones positivas y negativas, garantizando una detección confiable y reproducible.

7.3. Evaluación de los métodos de extracción de ácidos nucleicos y cuantificación colorimétrica

Para elegir un método de extracción de ácidos nucleicos se realizó una validación interna que implicó la evaluación de la pureza, la concentración obtenida, tiempo de extracción, tiempo de amplificación y costos de los 5 métodos probados: Ebullición, PBS + Tween 20, Fenol cloroformo, CTAB 2 % y un método adaptado para muestras de queso descrito por Parayre et al, (2007). Dicha validación se realizó tanto en monocultivos de *L. innocua* y *L. monocytogenes* como en muestras de queso fresco inoculadas con *L. innocua*.

En comparación con otros ensayos (Tabla 7), la pureza y la estabilidad del ADN demostraron ser factores críticos para la reproducibilidad de las pruebas moleculares. Por lo tanto, la estandarización del proceso de extracción en monocultivos permitió establecer un control de calidad en la metodología, asegurando que las posibles variaciones observadas en las muestras de queso fresco se deban principalmente a la complejidad del alimento y no a fallas en la extracción inicial.

7.3.1. Evaluación en monocultivos de *L. innocua* y *L. monocytogenes*

Específicamente, la extracción de ADN genómico a partir de los monocultivos de *L. innocua* y *L. monocytogenes* permitió obtener un material puro, de buena calidad y suficiente concentración para emplearse como control positivo en las reacciones de amplificación isotérmica. El procedimiento realizado con el kit Monarch garantizó la remoción de proteínas y ARN, lo que se reflejó en la pureza del ADN extraído. Estos resultados confirman que este protocolo fue eficiente para recuperar ADN bacteriano íntegro, minimizando la degradación y asegurando un rendimiento adecuado para la amplificación posterior.

Por otro lado, la extracción de los ácidos nucleicos mediante los cinco métodos probados mostró diferencias notables en pureza, concentración y compatibilidad con la técnica LAMP. Algunos métodos permitieron obtener ácidos nucleicos suficientes para la detección visual del cambio de color, mientras que otros presentaron inhibición parcial o total de la reacción, probablemente asociada a la presencia de impurezas o a una menor eficiencia en la lisis celular. En la Figura 9 se observa la comparación cualitativa de los cinco métodos a partir de monocultivos de *L. innocua* y *L. monocytogenes*, en función de su compatibilidad con la técnica de amplificación, lo que evidencia variaciones en la intensidad y la homogeneidad del cambio de color asociadas al desempeño de cada protocolo.

Los métodos de Ebullición, PBS + Tween 20 y Parayre mostraron un cambio de color más intenso, de rosa a amarillo, indicando una amplificación positiva y compatible con LAMP, mientras que la extracción mediante el método CTAB 2% mostró una coloración parcial, lo que sugiere una menor pureza o presencia de inhibidores. Esta diferencia coincide con

observaciones previas donde la pureza del ADN y la presencia de contaminantes como detergentes o sales residuales se identifican como factores determinantes para la ineficiencia de LAMP (Haugland et al., 2002; Kaneko et al., 2007; Sun et al., 2014).

Por el contrario, el método de Fenol cloroformo mostró una coloración inexistente, a pesar de que la amplificación de ADN probablemente ocurrió. Esto se debe a que los residuos de fenol y otros compuestos orgánicos presentes tras la extracción pueden mantener la mezcla de reacción en un entorno relativamente alcalino, neutralizando la acidificación que normalmente ocurre durante la síntesis de ADN y que es responsable del cambio de color en los sistemas de detección pH-dependientes (Goto et al., 2009). Además, estos compuestos pueden interactuar con la ADN polimerasa, inhibiendo parcialmente su actividad o alterando la concentración de iones de hidrógeno, sin detener por completo la reacción de amplificación (Wilson et al., 1997; Schrader et al., 2012). Como consecuencia, el cambio de pH necesario para que se produzca un cambio de color visible no ocurrió de manera suficiente para ser detectado visualmente, lo que explica la falta de señal colorimétrica observada (Goto et al., 2009; Kaneko et al., 2007).

En la intensidad del cambio colorimétrico mediante la diferencia de absorbancias, se observa que las extracciones con CTAB 2 % y Fenol cloroformo se mantuvieron por debajo del umbral de detección para muestras negativas (≤ 0.05), mientras que las extracciones con Parayre, Ebullición y PBS + Tween 20 alcanzaron los valores más altos de absorbancia correspondiente a muestras positivas (≥ 1). Estos resultados confirman que la pureza y composición del ADN influyen directamente en la cinética de amplificación y en el cambio de pH detectado por el indicador colorimétrico (Tanner et al., 2015; Notomi et al., 2000).

Los resultados mostrados en la Figura 9 junto con los registrados en la Tabla 12, evidencian diferencias notables entre los métodos de extracción en cuanto a pureza, concentración, tiempo y costo (en moneada nacional), factores determinantes para la selección.

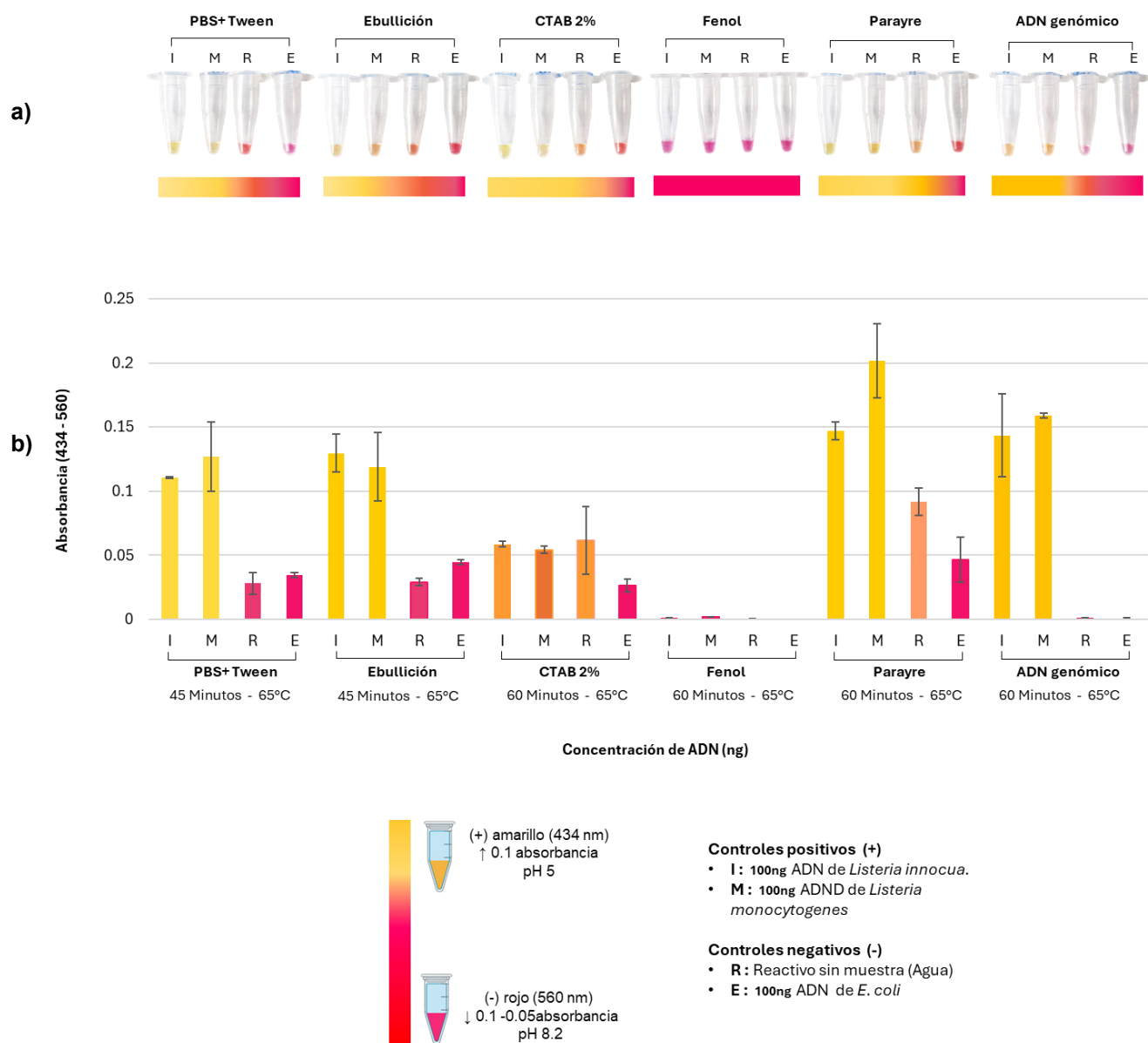


Figura 9. Comparación cualitativa de los cinco métodos de extracción con base en la diferencia de absorbancia derivada del cambio de color. Se emplearon muestras de ácidos nucleicos (100 ng) extraídas de monocultivos de *L. innocua* (I) y *L. monocytogenes* (M) como controles positivos; asimismo, agua (R) y ADN genómico (100 ng) extraído de un monocultivo de *E. coli* (E) como controles negativos. a) Tubos de reacción que muestran un cambio de color que va desde amarillo intenso (reacciones positivas) hasta un degradado de tonos naranjas y rosados (reacciones negativas), de acuerdo con el gradiente ilustrado en la barra inferior basado en el indicador de pH rojo fenol. b) Cuantificación de la diferencia de absorbancias. El eje Y representa un valor cuantitativo que refleja la eficiencia de amplificación: valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas.

Tabla 14. Datos obtenidos en la evaluación de los métodos de extracción de ácidos nucleicos partir de monocultivos de *L. innocua* (I) y *L. monocytogenes* (M), agua (R) y ADN de *E. coli* (E).

Método de extracción	Muestra	Inicial		Tiempo de extracción	Tiempo de amplificación	Costo (10x)
		Pureza (A260/A280)	Concentración (ng/μl)			
Ebullición	I	1.47	6.4	30 min	45 min	\$45.84
	M	1.59	9.6			
	R	N/A	-14.6			
	E	1.53	10.5			
PBS + Tween 20	I	1.63	7.5	30 min	45 min	\$46.0
	M	1.76	13.8			
	R	N/A	-9.9			
	E	1.44	5			
Lisis fenol-cloroformo	I	1.66	19.2	3 h	2 h	\$ 275.06
	M	1.88	22.7			
	R	N/A	-12.9			
	E	1.9	61.7			
CTAB 2%	I	1.86	24.8	2:30 h	60 min	\$ 320.91
	M	2.10	33.1			
	R	N/A	-10			
	E	1.7	28.1			
Modificado por Parayre	I	1.8	42.1	2:15 h	60 min	\$204.0
	M	1.89	54.2			
	R	N/A	-15.3			
	E	1.67	35			
ADN genómico kit Monarch	I	1.91	120.2	60 min	75 min	\$1541.64
	M	2.22	142.6			
	R	N/A	0			
	E	1.87	126.8			

Según la Tabla 12, los métodos de Ebullición y PBS + Tween 20 demostraron ser altamente eficientes y prácticos para la detección cualitativa mediante LAMP, ya que, aunque las concentraciones de ADN y la pureza fueron bajas (5-13 ng/μL y A260/A280 entre 1.4–1.7), las reacciones de amplificación fueron exitosas, evidenciando la tolerancia de LAMP a impurezas y bajas concentraciones de ADN (Kaneko et al., 2007; Tomita et al., 2008; Goto et al., 2009). Además, su tiempo de extracción (30 min) y su bajo costo (≈ \$45) los posicionan como alternativas ideales.

Por su parte, el método modificado por Parayre ofreció una mejor relación entre la pureza y la concentración. Pese a requerir un mayor tiempo de extracción (2 h 15 min) y presentar un costo superior (\$204) este método puede ser una alternativa reproducible considerando que Parayre et al., (2007) optimizaron el protocolo para la obtención de ADN microbiano a partir de productos lácteos; lo que refuerza su aplicación en matrices alimentarias con alto contenido graso o proteico como el queso fresco.

En contraste, los métodos CTAB 2% y fenol cloroformo presentaron una alta pureza (A260/A280 de 1.6 – 2); sin embargo, implicaron procesos aún más largos (2 a 3 h) y un costo elevado (\$275 – \$320). De acuerdo con Junior et al. (2017), la presencia de contaminantes como proteínas o fenol puede influir en los valores de pureza e incluso inhibir el cambio colorimétrico durante la detección, lo que limita su compatibilidad con la técnica LAMP. Finalmente, el kit comercial Monarch ofreció una mayor concentración y pureza (>100 ng/μL y A260/A280 de 1.8 – 2.0), no obstante, su alto costo limita su uso para análisis rutinarios.

7.3.2. Evaluación en muestras de queso fresco inoculadas con *L. innocua*.

La evaluación de los cinco métodos de extracción de ácidos nucleicos en muestras de queso fresco inoculadas fue necesaria debido a la compleja composición de la matriz alimentaria, la cual, se caracteriza por su elevado contenido de grasas, proteínas y sales que pueden interferir en las reacciones al inhibir la actividad enzimática, modificar el pH de la mezcla de reacción o afectar la lectura colorimétrica del indicador, generando falsos negativos o señales inconsistentes. En este sentido, se realizó una comparación en la eficiencia, compatibilidad y sensibilidad de detección de cada método a fin de seleccionar un protocolo adecuado que asegure la reproducibilidad y confiabilidad de la técnica. Específicamente la Figura 10 muestra dicha comparación con base a las muestras evaluadas considerando controles positivos, negativos y una serie de diluciones a diferentes concentraciones (UFC/ml). En cada método se presenta la evidencia visual del cambio de color en los tubos de reacción y la cuantificación espectrofotométrica de absorbancia, lo que permite una evaluación integral de la eficiencia de cada protocolo.

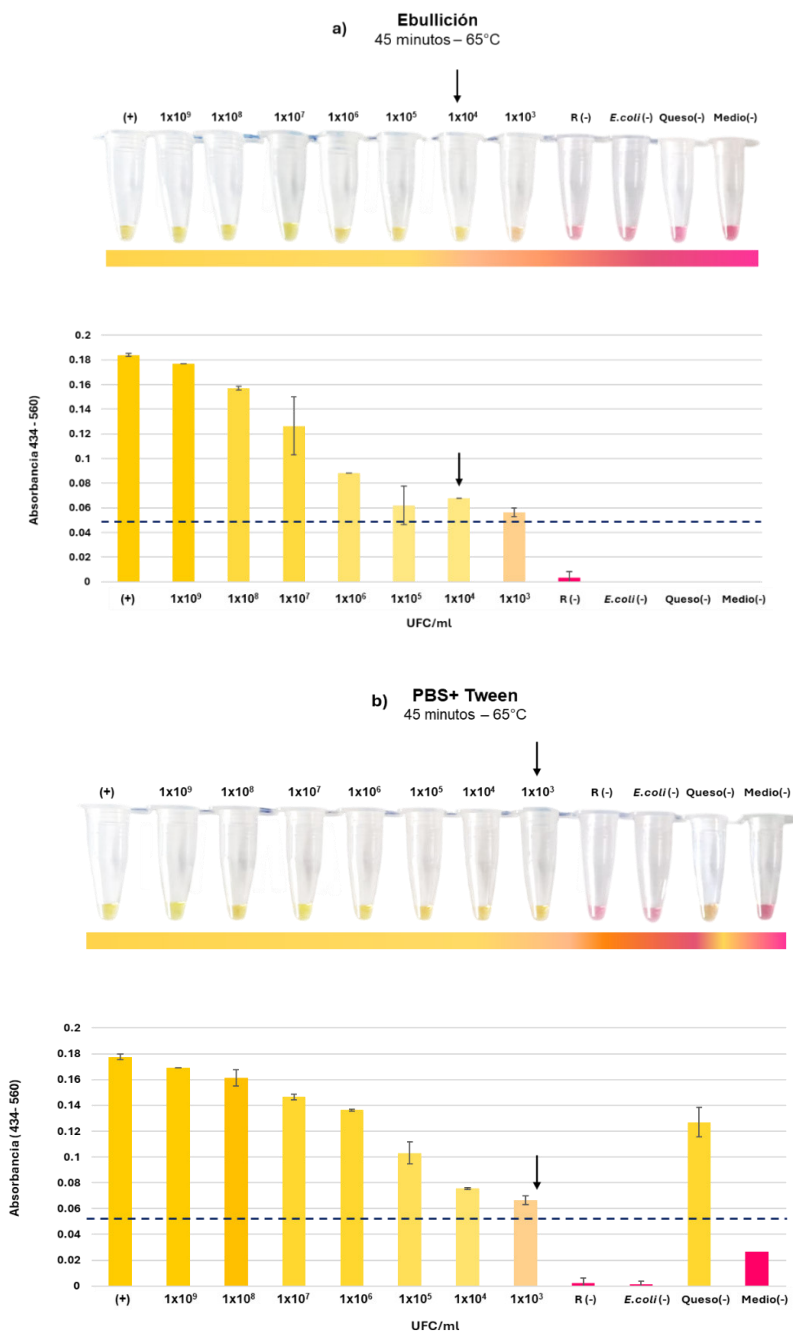
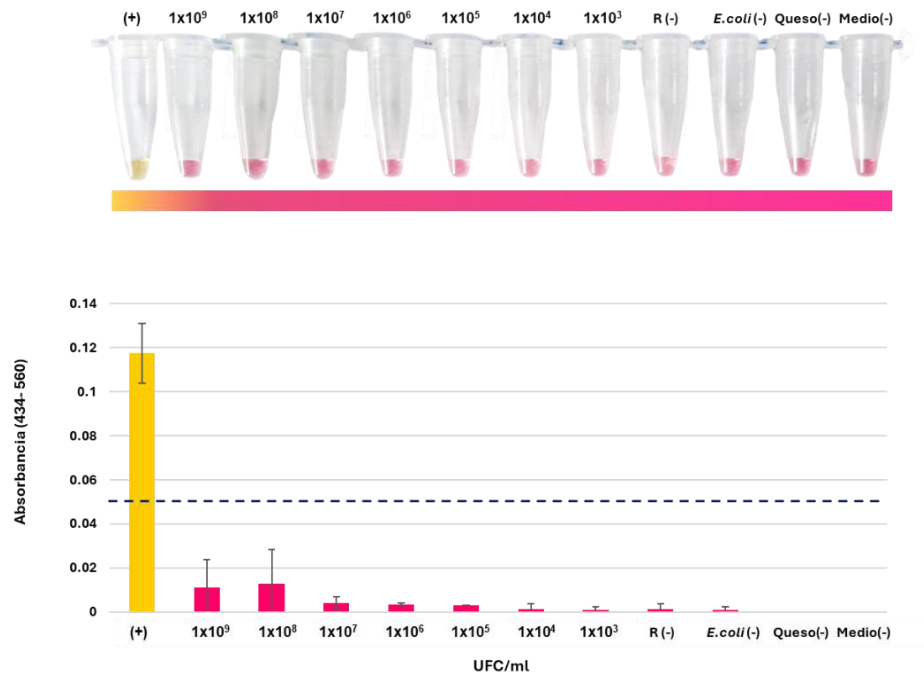
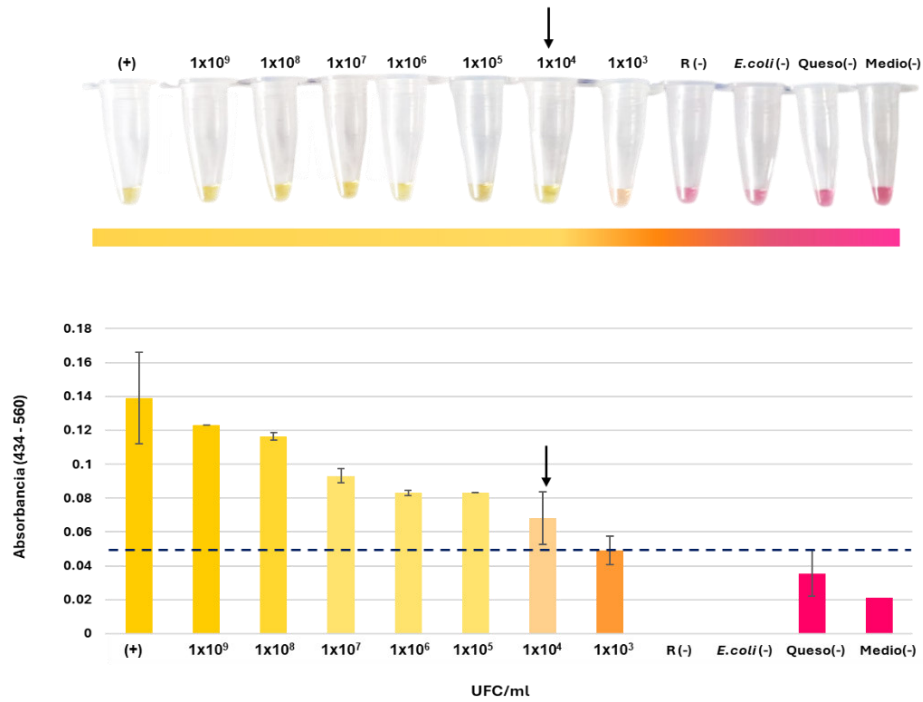


Figura 10. Evaluación de la eficiencia los métodos de extracción de ácidos nucleicos a) Ebullición y b) PBS + Tween 20 en muestras de queso fresco inoculadas con *L. innocua* a distintas concentraciones bacterianas, mediante un ensayo LAMP colorimétrico. En la sección superior se muestra la detección visual, mientras que en la sección inferior se muestra la detección cuantitativa basada en la diferencia de absorbancias para cada rango de concentración bacteriana (UFC/ml).

a) Lisis fenol-cloroformo
120 minutos – 65°C



b) CTAB 2%
60 minutos – 65°C



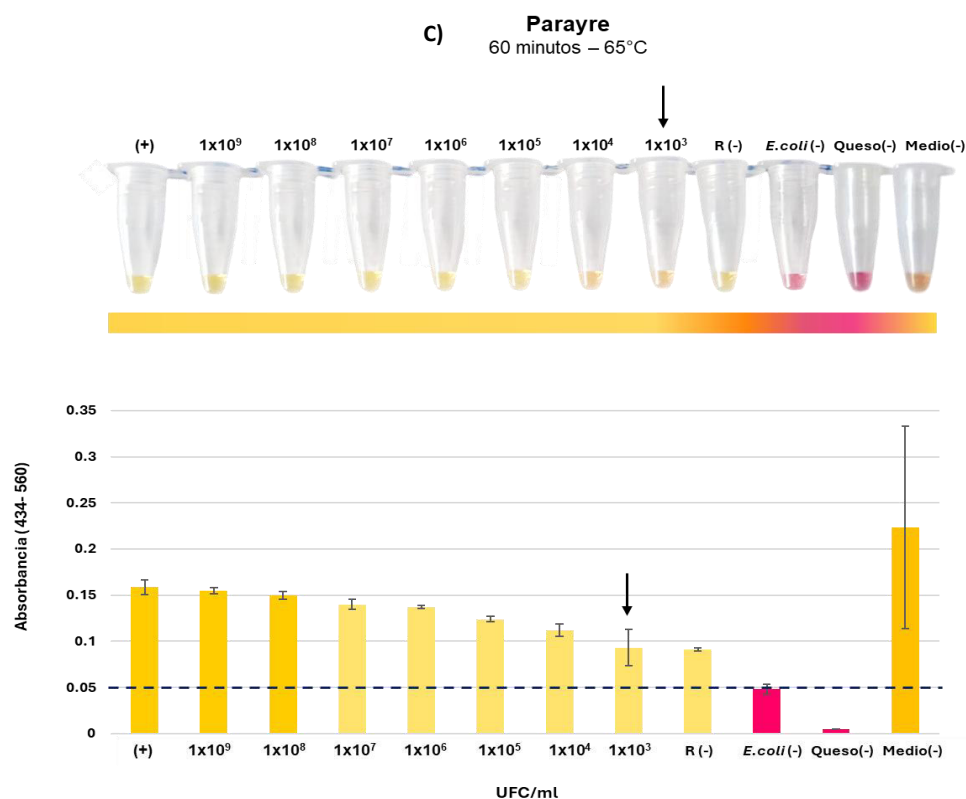


Figura 11. Evaluación de la eficiencia los métodos de extracción de ácidos nucleicos a) Lisis fenol cloroformo, b) CTAB al 2% y c) Parayre en muestras de queso fresco inoculadas con *L. innocua* a distintas concentraciones bacterianas, mediante un ensayo LAMP colorimétrico. En la sección superior se muestra la detección visual, mientras que en la sección inferior se muestra la detección cuantitativa basada en la diferencia de absorbancias para cada rango de concentración bacteriana (UFC/ml).

De acuerdo con las Figura 10 y 11 los métodos de Ebullición, PBS + Tween 20 y Parayre demuestran de manera consistente una amplificación exitosa en un rango amplio de concentraciones bacterianas. Visualmente, estos métodos presentan un cambio de color evidente de rosa a amarillo que se correlaciona con valores de absorbancia superiores al umbral de negatividad (línea azul ≤ 0.05). Este patrón refleja una alta eficiencia en la extracción y una baja presencia de inhibidores en la reacción, incluso a concentraciones reducidas de *L. innocua* (1x10³UFC/ml).

Los métodos CTAB 2% y Fenol cloroformo muestran una disminución significativa en la eficiencia de amplificación. El protocolo con CTAB 2% produce únicamente cambios parciales en la coloración, mientras que el método de Fenol cloroformo falla por completo, incluso en las concentraciones más elevadas. Esto sugiere que ambos protocolos presentan limitaciones en la liberación de ácidos nucleicos puros o introducen compuestos inhibidores que interfieren con la Bst polimerasa (Tomita et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, la presencia de residuos de fenol o cloroformo, así como la acumulación de sales o detergentes asociados a los reactivos empleados, se sugieren como la causa principal de la inhibición observada en las reacciones de amplificación (Schrader et al., 2012; Opel et al., 2010).

Aunque los métodos de ebullición, PBS + Tween 20 y Parayre mostraron resultados favorables, se observó cierta ventaja en el método de Ebullición en términos de especificidad y compatibilidad. Este método no amplifica ninguno de los cuatro controles negativos (queso fresco sin inocular y medio TSB) lo que demuestra exclusivamente la detección en presencia de *Listeria* y no de contaminantes o interferentes de la matriz alimentaria. En contraste, el método PBS + Tween 20 provocó cambios de color en las muestras de queso sin inocular, aunque no se detectó amplificación. Este comportamiento probablemente se debe a la elevada acidez intrínseca del queso fresco, ya que contiene cantidades significativas de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos durante la fermentación; además, esta matriz alimentaria puede contener sales ionizables residuales que, en combinación con los ácidos orgánicos, generan un efecto tampón insuficiente o una acidificación prematura del medio, alterando el pH de la mezcla de reacción (Fox et al., 2017a). Por lo tanto, la acidez preexistente de la muestra provoca un falso positivo al descender por debajo del punto de viraje del indicador sin que se haya producido una verdadera amplificación (Rossen et al., 1992).

Por su parte, el método Parayre mostró amplificación incluso en el control negativo de caldo TSB, lo que evidencia una falta de especificidad, probablemente asociada a la presencia de contaminantes o a la liberación no selectiva de ácidos nucleicos, generando falsos positivos. Este comportamiento indica que, aunque el protocolo puede ser efectivo para aislar ADN bacteriano en matrices complejas, como aquellas con alto contenido graso, también podrían

permanecer compuestos que inhiben parcial o selectivamente la reacción isotérmica, afectando la fidelidad de la amplificación (Parayre et al., 2007; Li et al., 2025).

En consideración a lo anterior, el método de Ebullición resulta la mejor opción, ya que no solo evita el uso de reactivos que puedan inhibir la reacción de amplificación, sino que además es un procedimiento simple, económico y rápido. Estas características lo hacen particularmente adecuado para la detección cualitativa en matrices complejas, como el queso fresco, donde la presencia de grasas, sales y ácidos orgánicos puede afectar la eficiencia de la amplificación (Wong et al., 2018; Barboza-Corona et al., 2026).

7.3.3. Evaluación con PCR

Para establecer una base de referencia sobre la compatibilidad de los métodos de extracción, se realizó una evaluación mediante PCR punto final. Este ensayo permitió identificar los protocolos capaces de extraer ácidos nucleicos de calidad para lograr una amplificación eficiente, estableciendo así un punto de comparación con los resultados obtenidos por LAMP. De este modo, fue posible validar la efectividad y compatibilidad de cada método de extracción en ambos enfoques de detección molecular.

Los resultados obtenidos mediante PCR y LAMP, utilizando diferentes métodos de extracción, evidencian variaciones notables en la sensibilidad y la especificidad de cada protocolo (Tabla 13). En los ensayos con ácidos nucleicos extraídos de monocultivos, ambas técnicas presentaron gran robustez frente a impurezas; sin embargo, LAMP mostró una mayor sensibilidad en comparación con la PCR, ya que permitió detectar *L. innocua* a concentraciones de 1×10^1 UFC/mL.

Entre los métodos de extracción evaluados Ebullición destacó por su eficiencia y especificidad al permitir la detección de *L. innocua* en concentraciones de 1×10^3 UFC/ml tanto en monocultivo como en muestras de queso fresco inoculado, sin amplificación en los controles negativos. Este desempeño se atribuye a que la ebullición libera eficientemente el ADN bacteriano mediante la desnaturalización térmica de las células, evitando el uso de reactivos

químicos que pueden inhibir la actividad de la Bst polimerasa durante la amplificación isotérmica (Tomita et al., 2008). A pesar de su buen desempeño con LAMP, la sensibilidad del método fue considerablemente menor en PCR, donde solo permitió la detección hasta 1×10^7 UFC/ml. Este bajo rendimiento puede deberse a diversos factores, como una lisis incompleta en bacterias Gram positivas, como *Listeria spp.*, cuya pared celular gruesa y rica en peptidoglucano dificulta la liberación total del ADN bacteriano (Agersborg et al., 1997); así como a la baja calidad o fragmentación del ADN obtenido (Haugland et al., 2001); además, la presencia de inhibidores celulares propios de la matriz alimentaria, proteínas, lípidos, polisacáridos, ácidos orgánicos o sales, puede interferir con la actividad de la Taq polimerasa, reduciendo la eficiencia de amplificación (Schrader et al., 2012; Jana et al., 2020). En este contexto, la técnica LAMP demuestra una clara ventaja al presentar mayor tolerancia a impurezas y alta eficiencia de amplificación, incluso a partir de extractos no purificados (Tomita et al., 2008; Mori & Notomi, 2009; Anupama et al., 2021).

En contraste, los métodos PBS + Tween 20 y Parayre mostraron amplificación en los controles negativos de LAMP, lo que sugiere la aparición de falsos positivos, probablemente asociados a alteraciones en el pH de la mezcla de reacción o a la presencia de contaminantes residuales (Fox et al., 2017a). A pesar de su compatibilidad con PCR, estos métodos no son recomendables para la detección mediante LAMP, ya que la presencia de compuestos como sales ionizables, ácidos orgánicos o detergentes puede inducir cambios que afectan la especificidad y confiabilidad del ensayo (Rossen et al., 1992; Li et al., 2016). Por otro lado, el método Fenol cloroformo mostró una gran eficiencia en PCR detectando hasta 1×10^4 UFC/ml; sin embargo, mostró resultados nulos en LAMP probablemente debido a la presencia de residuos orgánicos del proceso de extracción, como fenoles y solventes o pérdida de ADN durante las fases de separación y purificación (Schrader et al., 2012).

Por su parte, el método CTAB 2% mostró compatibilidad tanto con LAMP como con PCR, logrando detectar concentraciones de 1×10^4 y 1×10^3 UFC/ml respectivamente. Este desempeño puede atribuirse a la capacidad del CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) para eliminar polisacáridos, lípidos y proteínas que interfieren con la purificación del ADN, permitiendo obtener extractos de mayor pureza en comparación con otros métodos (Wilson,

1997). Sin embargo, la presencia residual de detergentes o sales puede afectar la actividad enzimática, especialmente en reacciones isotérmicas, reduciendo la eficiencia de amplificación (Schrader et al., 2012). Aun así, su capacidad para extraer ADN de buena calidad y su compatibilidad con ambas técnicas lo posicionan como una alternativa útil cuando se requiere mayor pureza en la extracción, aunque con mayor tiempo de reacción y costo operativo en comparación con el método de Ebullición.

En conjunto, estos resultados confirman que el método Ebullición es el más simple, para la extracción de ácidos nucleicos en queso fresco, optimizando la sensibilidad del ensayo LAMP y facilitando su aplicación en entornos de diagnóstico rápido o con recursos limitados (Foo et al., 2020).

Tabla 15. Evaluación de la compatibilidad entre métodos de extracción para LAMP y PCR.

Método de extracción	Monocultivo <i>L. innocua</i>		Queso fresco inoculado	Queso fresco sin inocular	Caldo TSB
	PCR	LAMP	LAMP	LAMP	LAMP
Ebullición	1x10 ⁷	1x10 ³	1x10 ³	No amplifica	No amplifica
PBS+ Tween 20	1x10 ⁶	1x10 ²	1x10 ³	Cambio de viraje sin amplificación	No amplifica
Fenol cloroformo	1x10 ⁴	No detecta	No detecta	No amplifica	No amplifica
CTAB 2%	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁴	No amplifica	No amplifica
Parayre	1x10 ³	1x10 ¹	1x10 ²	No amplifica	Amplifica

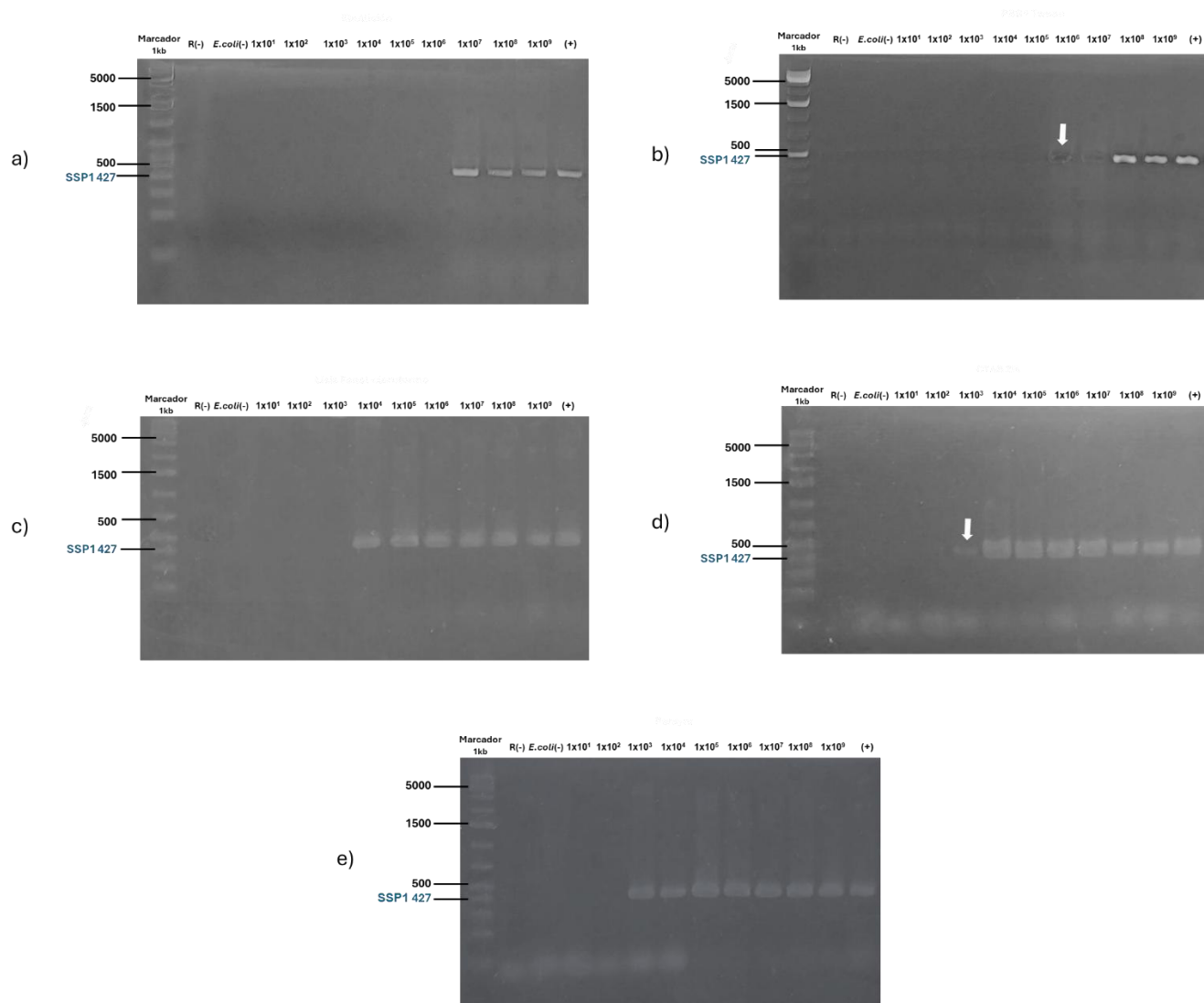


Figura 12. Evaluación de la compatibilidad de los cinco métodos de extracción de ácidos nucleicos mediante PCR. Se muestra la eficiencia de los métodos a) Ebullición, b) PBS + Tween 20, c) Lisis con fenol-cloroformo, d) CTAB al 2% y e) Parayre aplicados a un control positivo (ADN extraído de un monocultivo de *L. innocua*), muestras de queso fresco inoculadas con *L. innocua* a distintas concentraciones (1×10^1 – 1×10^9 UFC/ml) y dos controles negativos (agua y ADN extraído de un monocultivo de *E. coli*). La amplificación se observa para la proteína ferritina de *Listeria* spp. con 427 pb. La flecha blanca indica la presencia de amplificación poco visible.

7.3.4. Evaluación estadística

Como se demostró en las pruebas de estandarización, cada método de extracción influyó directamente en la eficiencia de la amplificación y su efecto varío según la concentración (UFC/ml). Esto respalda la necesidad de evaluar cada método bajo distintas condiciones, ya que algunos protocolos mostraron un rendimiento óptimo a bajas concentraciones mientras que otros se vieron afectados por inhibidores presentes en la matriz o en los reactivos. Además, la interacción entre el método de extracción y la concentración (UFC/ml) pudo determinar la reproducibilidad y la especificidad de la reacción, aspectos críticos para garantizar resultados confiables en ensayos como LAMP o PCR. Por ello, se realizó una evaluación sistemática para identificar el método más robusto y adecuado para su aplicación en matrices complejas, como el queso fresco, donde factores como grasas, sales y ácidos orgánicos pueden interferir con la amplificación.

Se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y una comparación múltiple de medias considerando la absorbancia como variable dependiente para evaluar los efectos principales de los métodos de extracción frente a las doce muestras (control positivo, controles negativos y diluciones a distintas concentraciones UFC/ml), así como su interacción, con dos repeticiones. Este análisis demostró que el modelo es altamente significativo ($P < 0.0001$), con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.919, lo que indica que aproximadamente el 92% de la variabilidad observada en la absorbancia se explica por los factores del estudio. Además, el factor de repetición no fue estadísticamente significativo ($P = 0.3977$), lo que demostró que el procedimiento experimental fue consistente.

Por lo tanto, se confirmó que el método y las muestras evaluadas (tratamientos), así como su interacción son estadísticamente significativas ($P < 0.0001$), lo que, valida la necesidad de evaluar el rendimiento de cada método bajo las condiciones específicas de cada tratamiento, es decir el mejor método para una alta concentración (UFC/ml) no es necesariamente el mejor para una baja concentración, esto exige que la selección del protocolo se base en el tratamiento específico basándonos en su compatibilidad con la técnica de amplificación.

La prueba de Tukey (HSD) para la comparación múltiple de medias permitió identificar con precisión qué métodos de extracción y tratamientos presentaban diferencias significativas en cuanto a los valores de diferencia de absorbancia (434 – 560 nm).

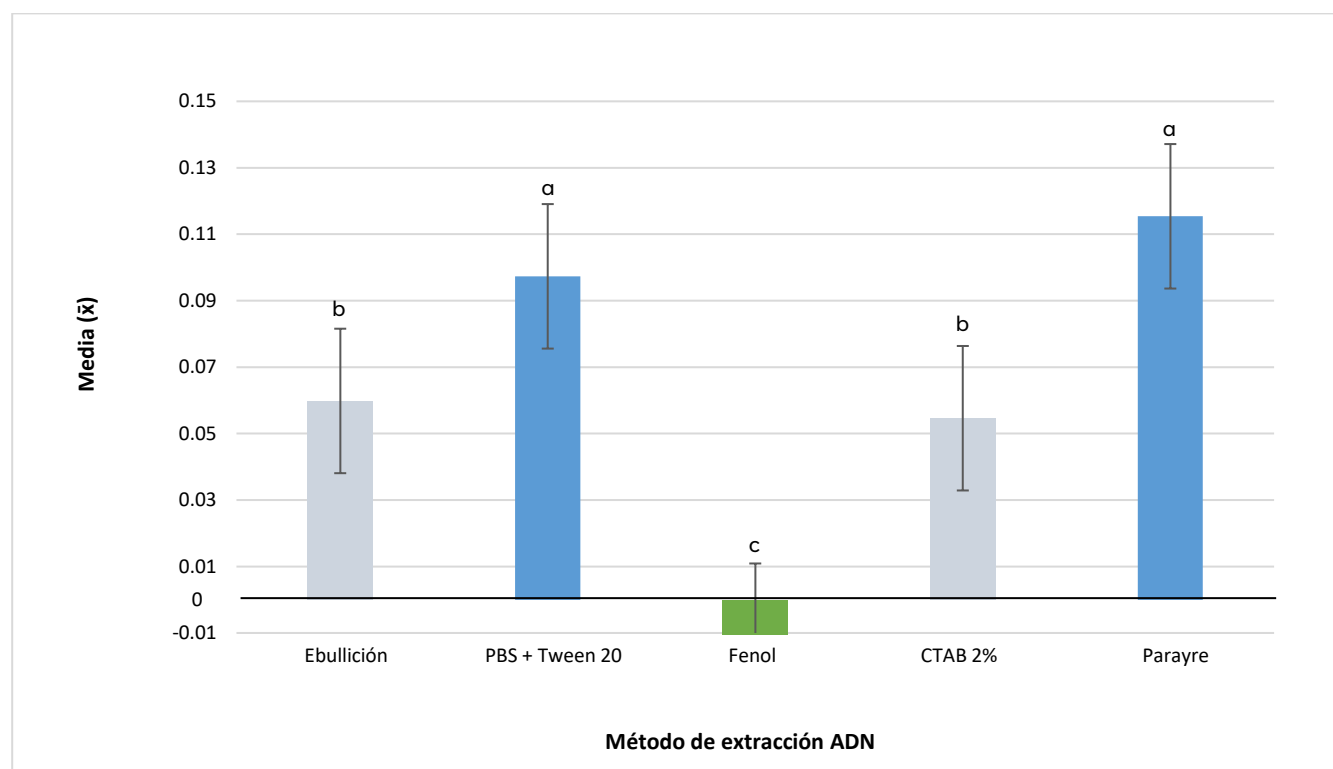


Figura 13. Comparación múltiple de medias. Comparación de medias de absorbancia obtenidas para los cinco métodos de extracción de ADN, analizadas mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Las barras con literales diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Elaboración propia a partir de datos obtenidos de Statistical Analysis System (2023).

De acuerdo con la Figura 13 los métodos de PBS + Tween 20 (0.09733) y Parayre(0.1154) se encuentran en el grupo con la absorbancia más alta (Figura 13, inciso a). Lo anterior sugiere que, en promedio, son los métodos más eficaces para la extracción de ácidos nucleicos, lo que se traduce en una señal de amplificación más robusta. Sin embargo, las pruebas de especificidad demuestran lo contrario al presentar inconsistencias en sus controles negativos lo que se atribuye a una detección inespecífica asociada a interferencias iónicas o a la presencia de contaminantes residuales en la reacción.

Los métodos Ebullición (0.05983) y CTAB 2% (0.05463) se encuentran en el grupo con la absorbancia media intermedia (b); si bien logran la amplificación, la diferencia de absorbancia es notablemente menor que la de los métodos anteriores lo que implica que en promedio, experimentan un grado significativo de inhibición o presentan un menor rendimiento de ADN amplificable (Jana et al., 2020) a pesar de ello, no afecta la sensibilidad cerca del límite de detección ni presenta inconsistencias en los controles negativos. Por otro lado, el método de fenol-cloroformo mostró un resultado negativo (-0.01083), lo que confirma una diferencia significativa y un fallo sistemático del protocolo. Este resultado coincide con lo reportado anteriormente, lo que demuestra que es estadísticamente ineficaz para la detección con LAMP, independientemente de la concentración (UFC/ml).

La robustez estadística observada en el análisis de varianza y la consistencia de los resultados en los controles negativos respaldan la superioridad del método de Ebullición, no solo por su eficiencia técnica, sino también por su simplicidad. Estos atributos lo convierten en una alternativa ideal para el diagnóstico.

7.4. Sensibilidad de detección

7.4.1. Concentración de ADN genómico

La evaluación de la sensibilidad de detección constituyó un paso fundamental en la estandarización de la técnica, ya que permitió determinar el límite mínimo de ADN genómico detectable. Este resultado es esencial para evaluar la eficiencia y la estabilidad del sistema de reacción a diferentes concentraciones, partiendo de 100 ng/ml de ADN genómico de *L. innocua*. Al evaluar un rango de diluciones seriadas, fue posible identificar el umbral de detección a partir del cual la señal colorimétrica y la absorbancia dejan de ser detectables, asegurando la precisión diagnóstica.

En la Figura 14 se observa una correlación directa entre la concentración de ADN genómico y la intensidad del cambio de color, lo cual confirma la efectividad del sistema basado en rojo fenol. Asimismo, el análisis espectrofotométrico respaldó los resultados visuales, mostrando una disminución gradual en los valores de absorbancia conforme se redujo la cantidad de ADN

inicial. Esta correlación entre la respuesta colorimétrica y la absorbancia confirma la confiabilidad de la técnica LAMP como ensayo tanto cualitativo como cuantitativo, donde la intensidad de color refleja la cantidad de ADN amplificado (Notomi et al., 2000; Tanner et al., 2015).

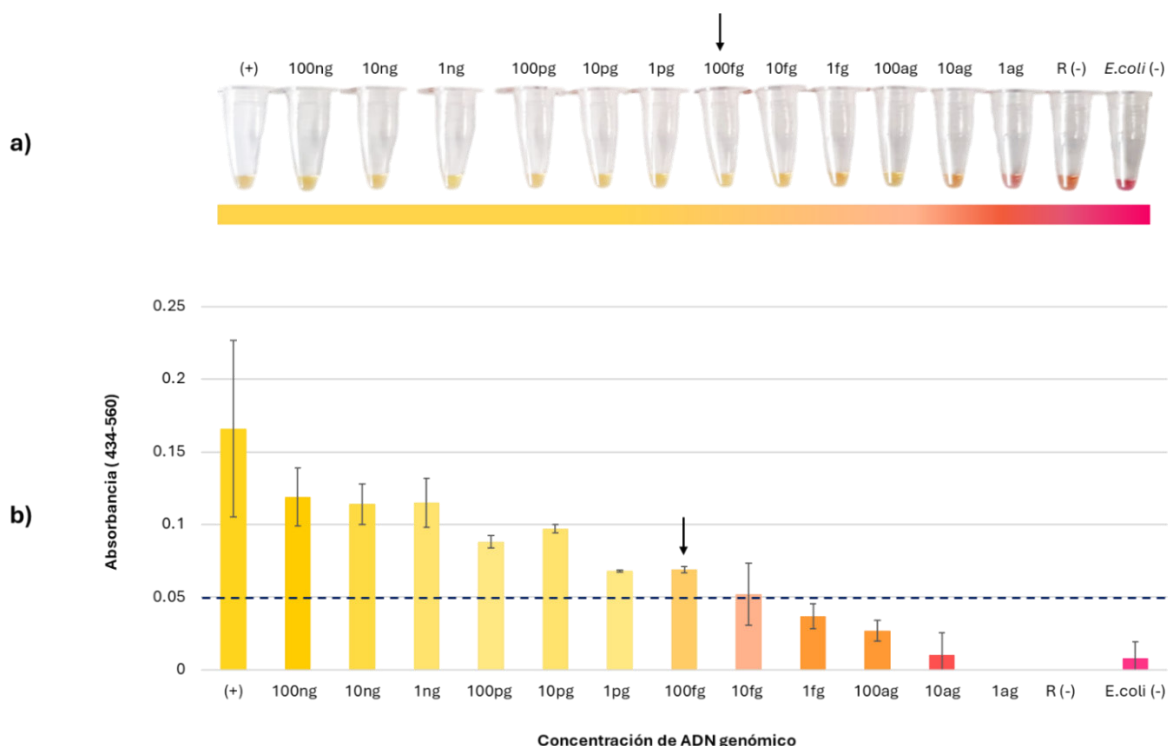


Figura 14. Evaluación de la sensibilidad de detección de la técnica utilizando ADN genómico extraído de un monocultivo de *L. innocua*. Se analizaron doce diluciones seriadas a partir de una concentración inicial de 100 ng. Como controles, se incluyeron ADN de *L. innocua* (positivo), ADN de *E. coli* y agua (negativos). a) Resultados visuales de la detección colorimétrica, donde se observan los tubos de reacción que muestran un cambio de color que va desde amarillo intenso (reacciones positivas) hasta un degradado de tonos naranjas y rosados (reacciones negativas), de acuerdo con el gradiente ilustrado en la barra inferior basado en el indicador de pH rojo fenol. b) Cuantificación de la diferencia de absorbancias. El eje Y representa un valor cuantitativo que refleja la eficiencia de amplificación: valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas. El eje X muestra la concentración de ADN de cada dilución evaluada. En conjunto, se observa una clara concordancia entre los valores de absorbancia y los resultados visuales, lo que confirma la correlación entre la detección colorimétrica y la cuantificación espectrofotométrica.

La sensibilidad observada en este ensayo permitió la detección de ADN genómico hasta concentraciones de 100 fg (1×10^{-4} ng/ml) lo que concuerda con estudios previos en los que la técnica LAMP mostró una sensibilidad entre 10 y 1000 veces mayor que la PCR convencional (Tabla 7) para la detección de *Listeria spp.* y otros patógenos (Zhao et al., 2014). Esto se atribuye a la naturaleza isotérmica del proceso y al uso conjunto de seis cebadores que reconocen múltiples regiones del gen objetivo, lo que mejora la especificidad y la eficiencia de amplificación (Mori & Notomi, 2009).

Por lo tanto, la clara correspondencia entre los resultados visuales y los valores de absorbancia demuestra que la técnica optimizada es altamente reproducible, sensible y adecuada para la detección directa de bacterias del género *Listeria* usando como blanco el gen 16S ARNr sin necesidad de equipos sofisticados. Además, el cambio de color facilita la aplicación del método en entornos con recursos limitados o en análisis de campo, donde la confirmación visual representa una ventaja operativa significativa frente a la PCR.

Objetivo 2. *Implementar la detección con LAMP en muestras de queso fresco, utilizando como blanco el gen 16S ADN de *L. monocytogenes* y *L. innocua*.*

7.4.2. Concentración de microorganismos viables (UFC/ml)

Para lograr la detección con LAMP en muestras de queso fresco, se probó la sensibilidad del método de extracción por ebullición utilizando como blanco el gen 16S ARNr, una región altamente conservada dentro del género *Listeria*. Este enfoque permitió determinar la capacidad del protocolo para liberar ADN en condiciones óptimas para la amplificación isotérmica y, al mismo tiempo, reducir la interferencia de inhibidores presentes en la matriz alimentaria.

La sensibilidad diagnóstica se evaluó mediante diluciones seriadas de muestras de queso fresco inoculadas con monocultivos de *L. monocytogenes* y *L. innocua* cuantificando los tiempos de amplificación y estableciendo así un límite de detección. Los resultados

demostraron que la combinación del método de Ebullición con LAMP puede ofrecer una herramienta rápida, reproducible y altamente sensible, capaz de detectar bajas concentraciones de bacterias en un alimento complejo como el queso fresco. Esta integración valida el potencial de LAMP como método de diagnóstico fiable y aplicable en el monitoreo de la seguridad alimentaria.

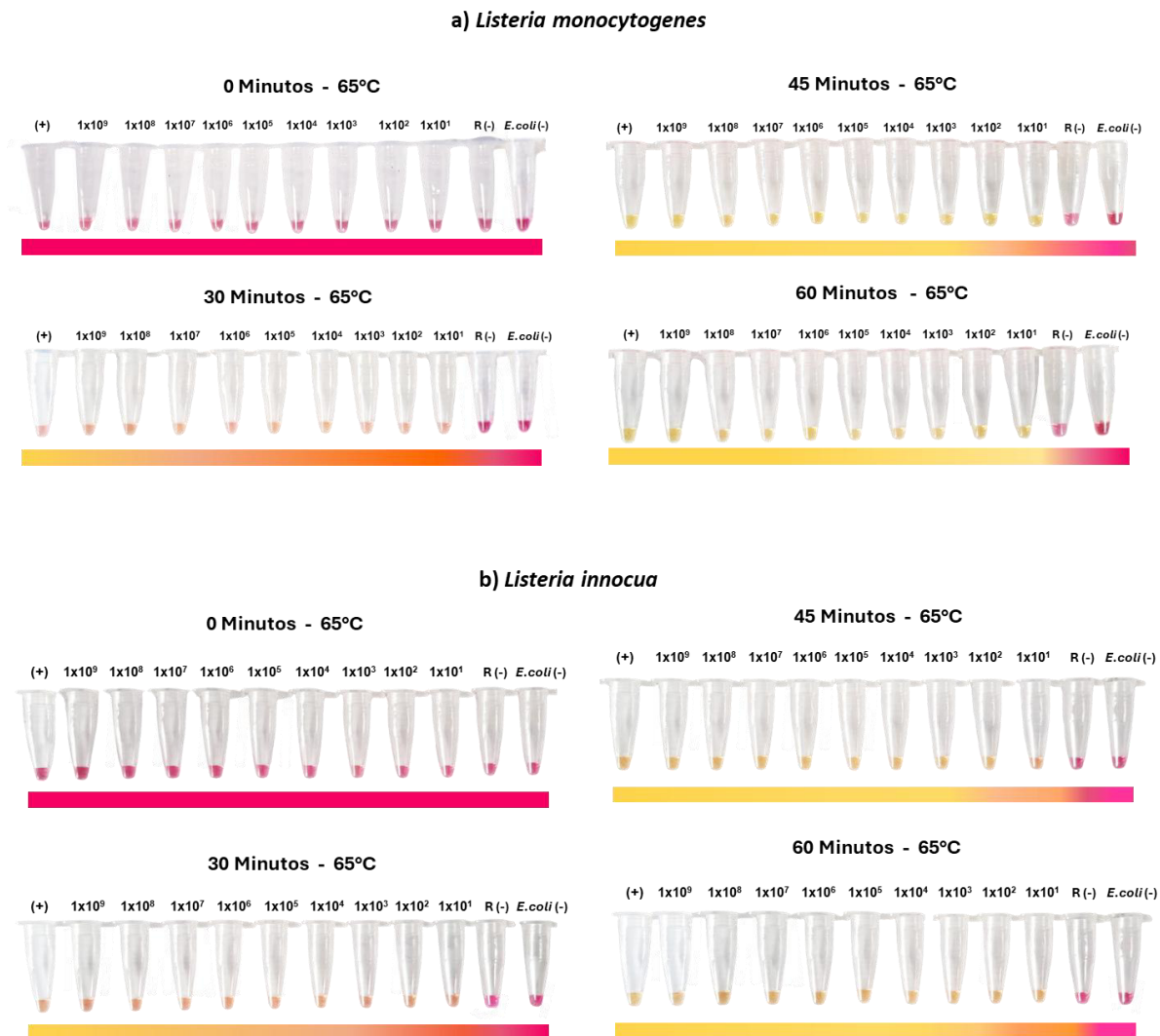


Figura 15. Evaluación de la concentración límite de detección y reproducibilidad del método de extracción por ebullición a partir de diluciones seriadas de muestras de queso fresco inoculadas con monocultivos de a) *L. monocytogenes* y b) *L. innocua* en distintas concentraciones (UFC/ml).

La Figura 15 presenta la evaluación de la concentración límite de detección y la reproducibilidad del método de extracción de ebullición aplicado a diluciones seriadas de muestras de queso fresco inoculadas con *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*. Los resultados muestran que el ADN obtenido mediante este método fue apto para la amplificación isotérmica, evidenciada por el cambio de color característico de la reacción. Se observó una amplificación colorimétrica hasta la dilución 1×10^1 UFC/ml para *L. monocytogenes* y 1×10^3 UFC/ml para *L. innocua* a 45 minutos de incubación, manteniendo una señal detectable y reproducible entre réplicas

Estos resultados confirman que el método de ebullición posee una alta capacidad de lisis celular y una eficiencia adecuada para eliminar posibles inhibidores presentes en la matriz alimentaria, lo que permite detectar en menos de 60 minutos de incubación. En conjunto, la sensibilidad alcanzada y la reproducibilidad del ensayo respaldan este método para la detección confiable de *Listeria spp.* en matrices complejas, utilizando como blanco el gen 16S ARNr en diversas condiciones experimentales.

Objetivo 3. Comparar LAMP, PCR y la NOM-143-SSA1-1995 para detectar *Listeria spp* en quesos frescos inoculados artificialmente.

7.5. Especificidad del ensayo

7.5.1. Evaluación con PCR y el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995

Para evaluar la especificidad de la técnica estandarizada, los ensayos positivos para muestras de queso fresco inoculadas con *L. innocua* se corroboraron por PCR de punto final y cultivos microbiológicos conforme a lo establecido en la NOM-143-SSA1-1995. De esta manera no solo se comprobó su especificidad si no la sensibilidad de detección. Como se mencionó en el punto 6.4.2.1. la validación por PCR se realizó utilizando el oligonucleótido SPP1, el cual amplifica un fragmento de 427 pb correspondiente a la proteína ferritina específica del género *Listeria*.

De acuerdo con Rawool et al. (2007), la PCR constituye una herramienta de diagnóstico diferencial altamente confiable para la identificación de especies del género *Listeria*, al permitir la detección sensible y específica de secuencias génicas específicas. Sin embargo, Kaur et al. (2023) destacan la importancia de complementar la técnica LAMP con una PCR confirmativa, ya que la amplificación isotérmica puede ser propensa a falsos positivos, debido a la utilización simultánea de seis cebadores que, bajo ciertas condiciones, pueden formar estructuras secundarias y generar resultados erróneos. Adicionalmente, la evaluación microbiológica sirvió como método de confirmación fenotípico fortaleciendo la validación del diagnóstico al permitir corroborar la presencia de *Listeria*.

En la Figura 16 se observa una comparación global de los tres métodos, LAMP, PCR y microbiología tradicional. El ensayo LAMP mostró la mayor sensibilidad, detectando a *Listeria* hasta una dilución de 1×10^3 UFC/ml. Por su parte, la PCR mostró amplificación hasta la dilución 1×10^7 UFC/ml indicando una menor sensibilidad en comparación lo cual, es consistente con ensayos previos que señalan que la PCR requiere ADN de gran pureza y mayor concentración (Rossen et al., 1992). En contraste, el método microbiológico presentó un crecimiento visible hasta 1×10^3 UFC/ml lo que demuestra una sensibilidad similar a la obtenida con LAMP, sin embargo, requiere tiempos de incubación prolongados (24–48 h), lo que limita su aplicación (Hitchins et al., 2017).

Si bien los tres métodos demostraron ser aptos para la detección de *L. innocua*, el ensayo LAMP evidenció una sensibilidad significativamente superior, lo que coincide con lo reportado por Notomi et al. (2000), quienes resaltan la capacidad de esta técnica para amplificar ADN de manera rápida y eficiente incluso a bajas concentraciones. Esto no solo valida la precisión de los resultados, sino que refuerza la utilidad de LAMP como una alternativa robusta para el diagnóstico. Sin embargo, pese a su ventaja competitiva, la elección del método de detección seguirá dependiendo de los objetivos del estudio, la disponibilidad de tiempo y la limitación de recursos.

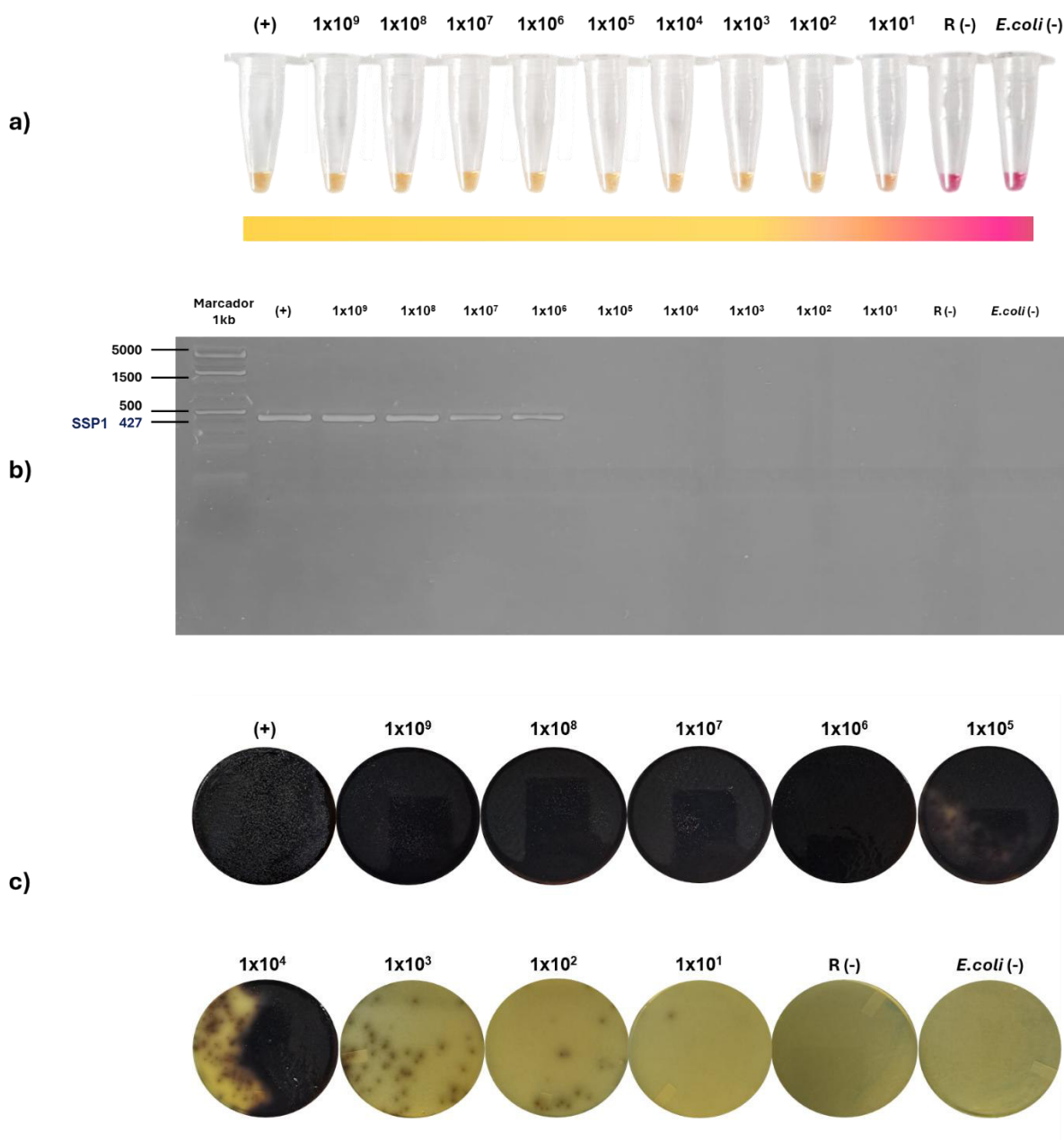


Figura 16. Comparación de los métodos de detección: a) LAMP, b) PCR y c) método microbiológico establecido en la NOM-143-SSA1-1995. Se muestra la sensibilidad de detección frente a muestras de queso fresco inoculadas a diferentes concentraciones de *L. innocua* (UFC/mL). La técnica LAMP evidencia un cambio de color asociado a la amplificación positiva, la PCR presenta bandas correspondientes al fragmento esperado (427 pb), y el método microbiológico revela crecimiento bacteriano visible en las diluciones detectables. Los controles negativos (agua y *E. coli*) no mostraron amplificación ni crecimiento, lo que confirma la especificidad y la confiabilidad de los tres métodos evaluados.

Objetivo 4. Probar la especificidad de la detección por LAMP en muestras de queso fresco comerciales.

7.6. Evaluación en productos comerciales

El mapeo realizado en la ciudad de Irapuato permitió obtener un panorama representativo de la posible distribución de *Listeria spp.* en distintos comercios locales, tanto formales como informales. Esto resulto relevante para la posterior evaluación, ya que ambos puntos de venta presentaron diferencias en las condiciones de control sanitario, lo que influyo directamente en el riesgo de contaminación microbiana no solo con la bacteria de estudio, sino también con otros microorganismos comúnmente asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).

7.6.1. Caracterización organoléptica y determinación de acidez

La caracterización organoléptica permitió complementar los resultados microbiológicos mediante el análisis visual de los atributos sensoriales facilitando la identificación de posibles indicios de deterioro o contaminación (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012; Reyes-Díaz et al., 2025). Para integrar este enfoque, se realizó una evaluación mediante observación directa considerando atributos como color, textura superficial y aroma, con base en criterios establecidos para productos lácteos frescos, tales como color blanco homogéneo, superficie uniforme y consistencia compacta (Juárez-Barrientos et al., 2021).

En términos generales, la mayoría de los quesos evaluados presentaron atributos dentro de los parámetros esperados para un queso fresco comercial (4°C), particularmente en color (blanco a blanco crema) y textura (lisa a ligeramente irregular); sin embargo, las muestras 17 y 19, las cuales resultaron positivas en los análisis microbiológicos y moleculares, mostraron alteraciones superficiales como grietas, exceso de humedad, textura irregular y porosidad en comparación con las muestras control (Figura 17). De acuerdo con Guerrero et al. (2026) y Torres-Llenez et al. (2006), estas alteraciones pueden atribuirse a procesos de contaminación

microbiana, donde el crecimiento de microorganismos genera la degradación de proteínas (proteólisis), producción de gases y acumulación de metabolitos, afectando directamente la estructura y apariencia del queso. Así mismo, Juárez-Barrientos et al., (2021) y Magenis et al., (2014) señalan que dichas alteraciones también pueden estar asociadas a factores tecnológicos como el tiempo de prensado, el contenido de humedad y la adición de ingredientes como aditivos, sales o grasas (Villegas-Gante & de la Huerta-Benítez, 2015; Juárez-Barrientos et al., 2021).

En este sentido, las muestras con apariencia húmeda, presencia de grietas, textura porosa o con suero superficial, observadas en la Figura 17, podrían estar asociadas tanto a variaciones tecnológicas del proceso de elaboración como a la formación de microambientes derivados de una contaminación (Jaimez-Ordaz et al., 2026; Fox et al., 2017b; Castellanos et al., 2019).

En cuanto al pH, los valores registrados en la Tabla 18 oscilaron entre 5.81 y 7.98, observándose una tendencia hacia valores cercanos a la neutralidad en la mayoría de las muestras. Este comportamiento resulto ser relevante, ya que los quesos frescos típicamente presentan valores de pH ligeramente ácidos (aproximadamente entre 5.1 a 6.1) derivados de la fermentación láctica (Hwang & Gunasekaran, 2001; Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012); por lo que, la incidencia de valores superiores a 7 podrían indicar deficiencias en la acidificación, posible contaminación microbiana post-proceso o alteraciones durante el almacenamiento en la cadena de frío (Torres-Llanez et al., 2006 ; Magenis et al., 2014 ; Fox et al., 2017a).

En relación con la caracterización organoléptica, este parámetro es fundamental, ya que influye tanto en las propiedades sensoriales como en la estabilidad microbiológica del producto considerando que un pH adecuado favorece la formación de una estructura proteica compacta, así como el desarrollo de sabores ligeramente ácidos característicos; mientras que, valores elevados pueden asociarse con defectos sensoriales como sabores menos ácidos o incluso aromas anómalos; defectos en la textura y una mayor susceptibilidad a la contaminación (Torres-Llanez et al., 2006; Cunha & Viotto, 2010).

Desde el punto de vista microbiológico, diversos autores han señalado que las condiciones de elaboración de quesos artesanales, especialmente con el uso de leche cruda sin pasteurizar y la ausencia de buenas prácticas de manufactura (BPM), incrementan el riesgo de contaminación al favorecer la supervivencia y proliferación de microorganismos patógenos, comprometiendo la inocuidad del producto (Cuevas-González et al., 2017; Reyes-Díaz et al., 2025; Torres-Llanez et al., 2006). Adicionalmente, estudios realizados en quesos frescos artesanales en Latinoamérica han documentado que valores elevados de pH, así como defectos en la textura, se asocian con una mayor carga microbiana por presencia de patógenos (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012; Magenis et al., 2014). En este contexto, esto refuerzan la idea de que las características organolépticas no solo constituyen indicadores de calidad sensorial, sino también pueden ser útiles para inferir la inocuidad del producto, ya que reflejan, en cierta medida, las condiciones microbiológicas y de procesamiento a las que ha sido sometido el alimento.

Tabla 16. Evaluación de las características organolépticas y valores de pH de las muestras de queso fresco comerciales.

No.	Color	Textura superficial	Aroma	pH
1	Blanco crema	Ligeramente irregular con pequeñas grietas superficiales	Agrio suave	7.62
2	Blanco crema	Irregular con pequeñas grietas superficiales y Marcas de molde	<i>Sui generis</i>	7.41
3	Blanco amarillento	Rugosa con pequeñas grietas superficiales	Fresco, <i>Sui generis</i>	7.70
4	Blanco	Lisa, apariencia compacta y restos adicionales	Fresco, <i>Sui generis</i>	7.35
5	Blanco crema	Lisa, Apariencia compacta y Marcas de corte	<i>Sui generis</i>	7.39
6	Blanco	Muy lisa, Apariencia compacta	<i>Sui generis</i>	6.82
7	Blanco crema	Porosa con pequeñas grietas superficiales y Marcas de molde	Agrio	7.59

8	Blanco crema	Irregular con Ligeras grietas	<i>Sui generis</i>	7.68
9	Blanco amarillento	Ligeramente irregular con pequeñas grietas superficiales	<i>Sui generis</i>	7.12
10	Amarillo pálido	Superficie irregular y ligeramente húmeda	Agrio suave	7.98
11	Blanco	Lisa, Apariencia compacta	<i>Sui generis</i>	6.33
12	Blanco brillante	Lisa, Apariencia compacta	<i>Sui generis</i>	7.57
13	Blanco	Irregular, pequeña porosidad y marcas de molde	Ligeramente agrio	6.48
14	Blanco crema	Superficie irregular y ligeramente húmeda	Agrio	6.20
15	Blanco	Lisa, Apariencia compacta y pequeña porosidad	<i>Sui generis</i>	7.67
16	Blanco crema	Textura uniforme, Lisa y apariencia compacta	<i>Sui generis</i>	7.61
17	Blanco crema	Superficie irregular con pequeñas grietas	Agrio suave	7.15
18	Blanco	Apariencia porosa uniforme y compacta	Suero	7.03
19	Blanco crema	Superficie irregular con apariencia rugosa, grietas y porosidad	Agrio suave	7.24
20	Blanco crema	Lisa, apariencia compacta y restos adicionales	Fresco	7.58
21	Blanco amarillento	Irregular con marcas de molde	<i>Sui generis</i>	6.36
22	Blanco	Lisa y uniforme	<i>Sui generis</i>	6.49
23	Blanco	Lisa y porosa	Suero	7.34
24	Blanco crema	Apariencia lisa, uniforme y compacta con marcas de corte	<i>Sui generis</i>	5.81
25	Blanco	Lisa, uniforme y compacta	<i>Sui generis</i>	6.33
26	Blanco crema	Lisa, uniforme y compacta	<i>Sui generis</i>	7.42
27	Blanco	Irregular con marcas de molde	<i>Sui generis</i>	6.56
28	Blanco crema	Apariencia porosa uniforme y compacta	Ligeramente Agrio	6.30
29	Blanco	Lisa, uniforme y compacta	<i>Sui generis</i>	5.90
30	Blanco	Lisa y compacta con marcas de molde	<i>Sui generis</i>	7.74

**Sui generis. Específico, característico o peculiar del producto.*

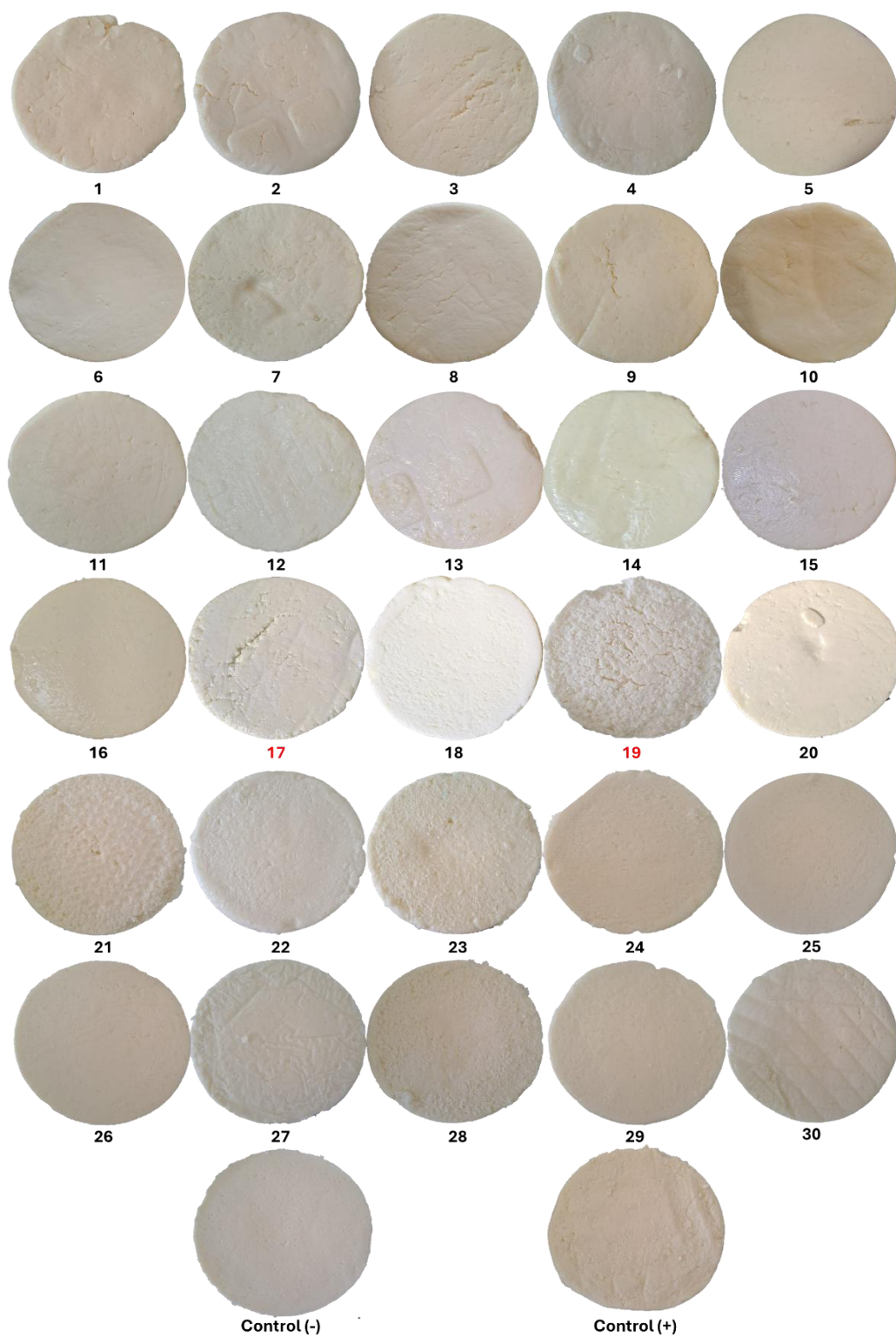


Figura 17. Caracterización organoléptica de las muestras de queso fresco comerciales. La figura presenta la evaluación macroscópica de la textura superficial y el color de las muestras en comparación con los criterios

establecidos para un queso fresco con características típicas (muestras control). De forma visual, las muestras 17 y 19 presentan una superficie irregular con grietas que forman una textura heterogénea. En contraste, el resto de las muestras presentan variaciones únicamente en color y ligera textura dentro de los criterios esperados derivado a la variabilidad de los productos comerciales.

7.6.2. Evaluación microbiológica de *Listeria spp* mediante NOM-143-SSA1-1995

La evaluación microbiológica de las muestras de queso fresco comercial mediante el método de la NOM-143-SSA1-1995, así como por técnicas moleculares (7.6.3), permitió determinar la presencia de *Listeria spp.* bajo condiciones reales de muestreo; lo cual, fue validado por los controles experimentales (Figura 18), que evidenciaron la precisión del protocolo estandarizado, ya que los controles positivos confirmaron la capacidad de detección del método tanto en condiciones ideales (*Listeria innocua* ATCC3309) como en una matriz alimentaria compleja (queso fresco inoculado con *Listeria innocua* ATCC3309), mientras que los controles negativos evidenciaron la especificidad del ensayo al no presentar reacciones cruzadas con *Escherichia coli* ni contaminación en los medios.

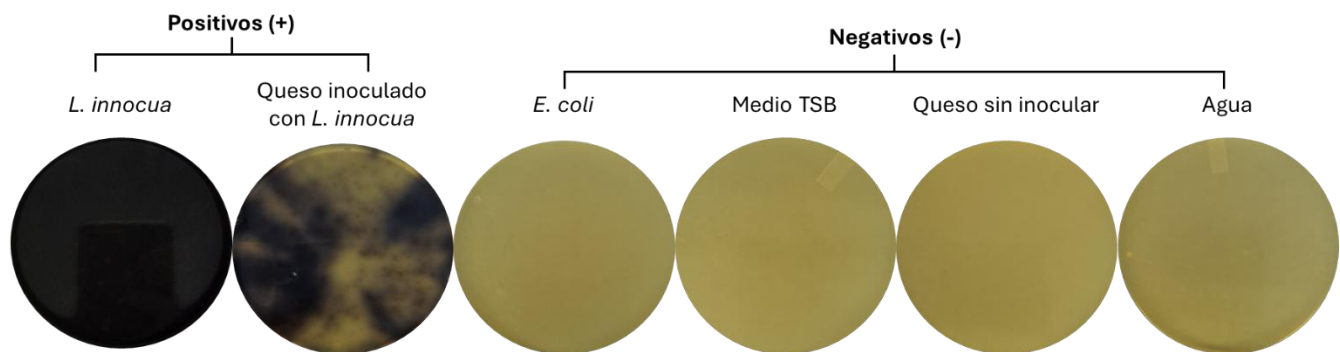
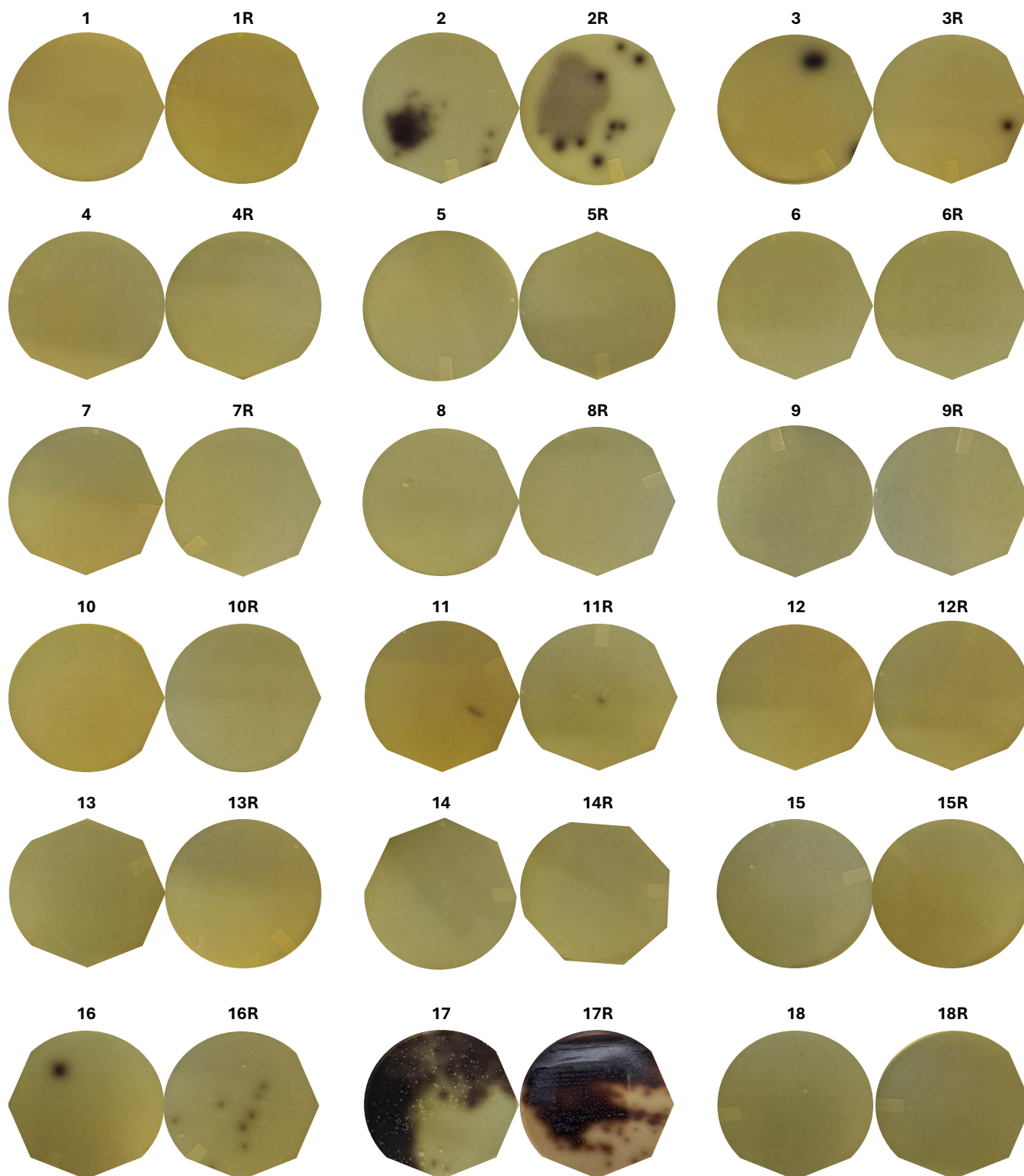


Figura 18. Comparativa de los controles experimentales en la evaluación microbiológica para la detección de *Listeria spp.* en muestras de queso fresco comercial. A la izquierda, los controles positivos (+) corroboran la efectividad del método tanto en condiciones ideales (*L. innocua*) como en una matriz alimentaria de consumo común (queso fresco inoculado con *L. innocua*). A la derecha, los controles negativos (-) demuestran la selectividad del protocolo frente a microorganismos no objetivos (*E. coli*) y garantizan la ausencia de contaminantes en los medios de cultivo (TSB) y en el diluyente (agua) empleados.

Tras la evaluación de las 30 muestras de queso fresco comerciales, se observó que las muestras 17 y 19 presentaron un crecimiento incontable (UFC/ml) de colonias negras con halo oscuro, lo que evidencia una elevada carga microbiana asociada a la aparente presencia de *Listeria spp.* (NOM-143-SSA1-1995). En contraste, el resto de las muestras presentaron resultados aparentemente negativos al no observarse crecimiento de colonias; asimismo, en los casos donde se observó bajo crecimiento, se asoció solamente a la presencia de microbiota competitiva o acompañante debido a que las células observadas al microscopio no coincidían con la morfología típica de *Listeria* (Figura 19).

En relación con lo anterior, la presencia de *Listeria spp.* en las muestras 17 y 19 puede estar asociada a deficiencias en las condiciones sanitarias o prácticas de higiene durante la elaboración, manipulación o almacenamiento del producto (NOM-251-SSA1-2009), lo que subraya la necesidad de implementar protocolos de monitoreo más estrictos, especialmente en productos lácteos con valores de pH superiores a 6.1, donde el riesgo de desarrollo de este patógeno es significativamente mayor (Hwang & Gunasekaran, 2001; Cuevas-González et al., 2017; Fox et al., 2017b).

En consideración a los valores de pH (Tabla 18), se observa que las muestras positivas presentaron valores relativamente altos y cercanos a la neutralidad (7.15 y 7.24) en comparación con el estándar. De acuerdo con Fox et al., (2017a) este comportamiento se debe a que un pH elevado favorece la supervivencia y proliferación de microorganismos patógenos al disminuir el efecto inhibitorio de la acidez; asimismo, Bover & Garriga, (2014) mencionan que las bacterias del género *Listeria* pueden desarrollarse en un amplio rango de pH (aproximadamente entre 4.2 y 9.5), con un crecimiento óptimo en condiciones cercanas a la neutralidad. No obstante, aunque un pH neutro constituye un entorno favorable para su desarrollo, la presencia inicial del patógeno está más asociada a eventos de contaminación cruzada o a deficiencias en los procesos de pasteurización (Fox et al., 2017a; Fox et al., 2017b; Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2012).



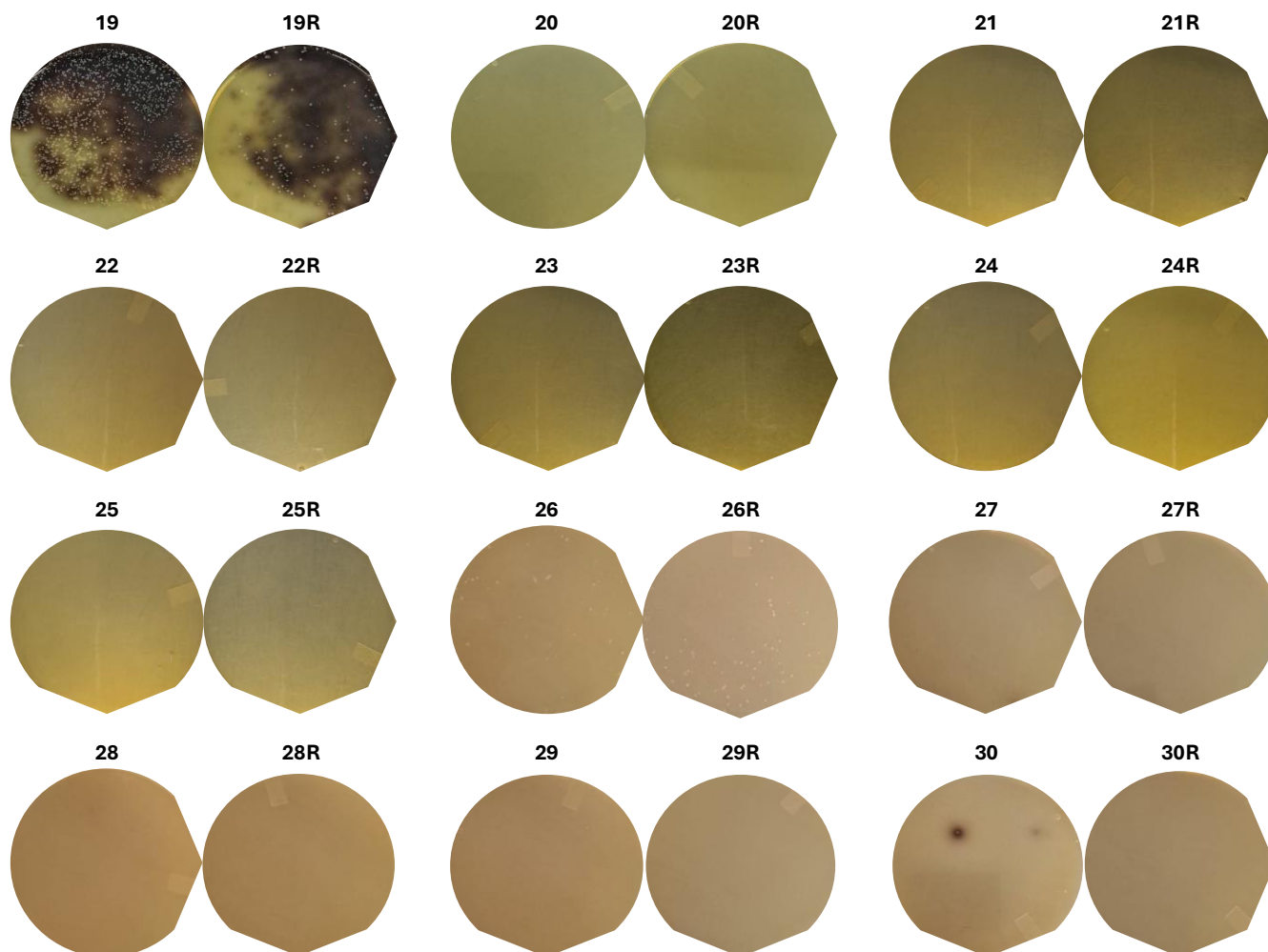


Figura 19. Evaluación microbiológica para la detección de *Listeria spp.* en muestras de queso fresco comerciales conforme a la NOM-143-SSA1-1995 tras 48 h de incubación a 30°C. Se presentan los medios de cultivo correspondientes a cada muestra y sus respectivas réplicas (R). Las muestras que presentan crecimiento de colonias características (colonias negras con halo oscuro) se consideran positivas evidenciando la presencia del microorganismo de interés; en contraste, aquellas sin desarrollo visible se interpretan como negativas.

7.6.3. Detección molecular de *Listeria spp.* mediante LAMP y PCR

Para probar la efectividad de la técnica estandarizada de LAMP en condiciones reales y establecer un protocolo confiable de monitoreo, las muestras de queso fresco comerciales evaluadas mediante el método microbiológico de la NOM-143-SSA1-1995 fueron corroboradas mediante técnicas moleculares (LAMP y PCR). De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla

19), las muestras 17 y 19 resultaron positivas tanto para LAMP como para PCR en concordancia con lo observado previamente en el análisis microbiológico del punto 7.6.2; lo cual, confirma la presencia de *Listeria spp.* en dichas muestras y evidencia la fiabilidad del protocolo estandarizado.

La validez de estos resultados (Figuras 20 - 25) se respaldó mediante el uso de controles experimentales incluyendo un monocultivo de *L. innocua* y queso fresco inoculado con *L. innocua* como controles positivos, así como un monocultivo de *E. coli*, caldo de enriquecimiento TSB sin inocular y queso sin inocular como controles negativos. Esto permitió evaluar la especificidad de las técnicas y descartar la presencia de contaminación durante el análisis.

En este sentido, la técnica estandarizada de LAMP permitió una detección rápida y visual mediante el cambio de color donde las muestras positivas presentaron una transición de color rojo a color amarillo acompañada de valores cercanos o superiores a 0.1 en la diferencia de absorbancia (434–560 nm); lo que se asoció con una amplificación eficiente y altamente detectable (Notomi et al., 2000; Tanner et al., 2015; Daddy Gaoh et al., 2021 Lou et al., 2023). De manera complementaria, la técnica de PCR permitió corroborar estos resultados mediante la presencia de bandas definidas correspondientes al tamaño esperado del fragmento asociado al género *Listeria* (427 pb).

En cuanto a las 28 muestras restantes, la baja señal colorimétrica y la falta de bandas de amplificación se atribuyó a la ausencia de material genético de *Listeria spp.* o concentraciones por debajo del límite de detección (100 fg). No obstante, aunque algunas muestras presentaron crecimiento bacteriano en la evaluación microbiológica (Figura 19), la falta de amplificación en LAMP y PCR indicó que dicho crecimiento corresponde a microbiota y no al patógeno objetivo. Esto ha sido ampliamente reportado en matrices alimentarias complejas donde la microbiota competitiva o acompañante puede desarrollarse sin implicar necesariamente la presencia de microorganismos patógenos (Torres-Llanez et al., 2006); lo que a su vez resalta la especificidad de las técnicas moleculares empleadas, particularmente de LAMP ya que permitió discriminar de manera eficiente el ADN objetivo incluso en presencia de microbiota competitiva (Notomi et al., 2000; Law et al., 2015).

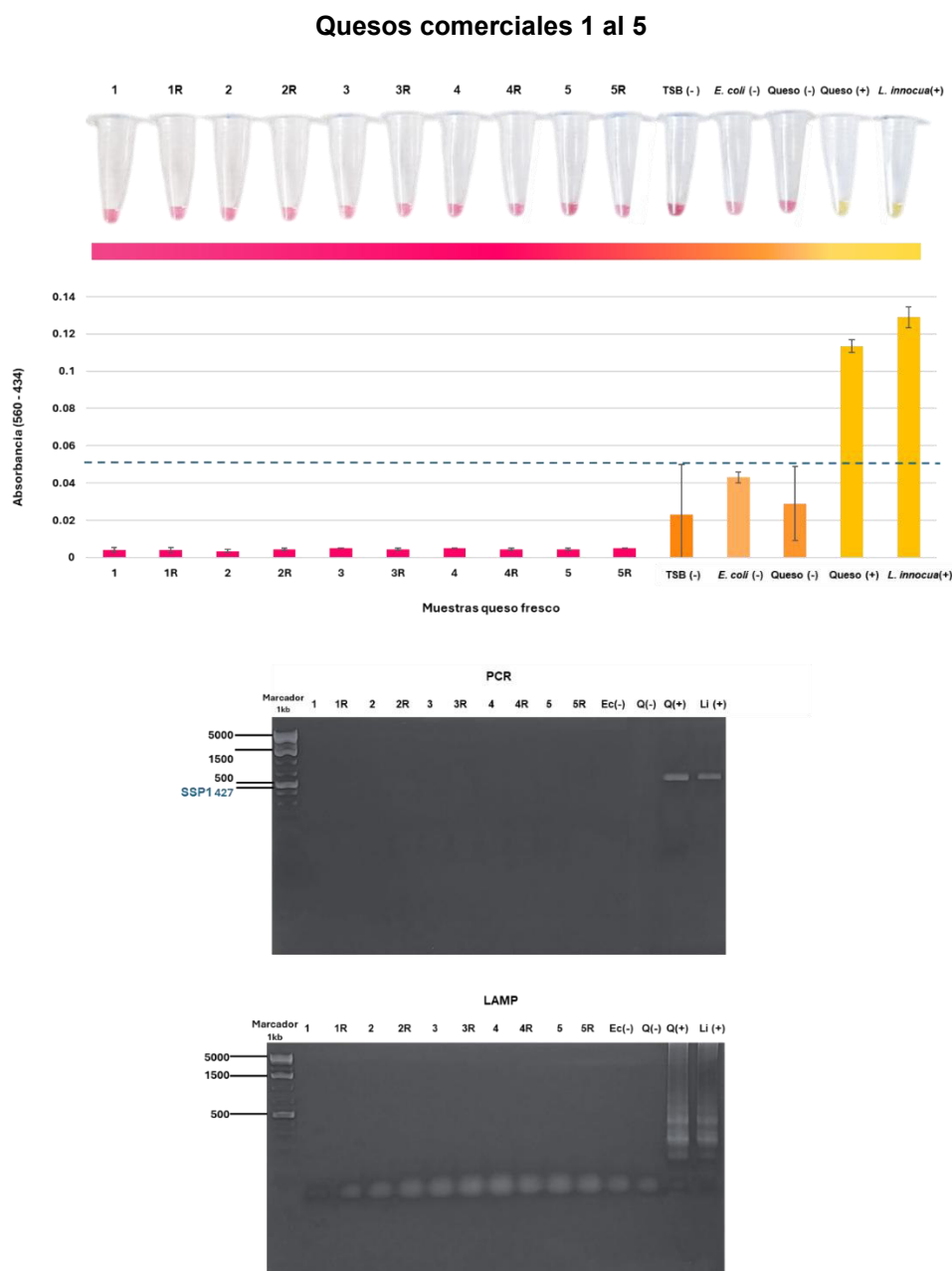


Figura 20. Resultados de la detección molecular de *Listeria spp.* mediante LAMP y PCR en muestras de queso fresco comerciales (1 al 5). En la parte superior se muestra la amplificación por LAMP de forma visual a través de un cambio de color, donde el amarillo indica muestras positivas y el rojo muestras negativas. La grafica central presenta la intensidad de la señal colorimétrica, la cual, refleja la eficiencia de amplificación donde valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación de PCR y LAMP en geles de agarosa al 2%, en los que la PCR confirma los resultados mediante la presencia de bandas de 427 pb, mientras que LAMP presenta su patrón de bandeo característico.

Quesos comerciales 6 al 10

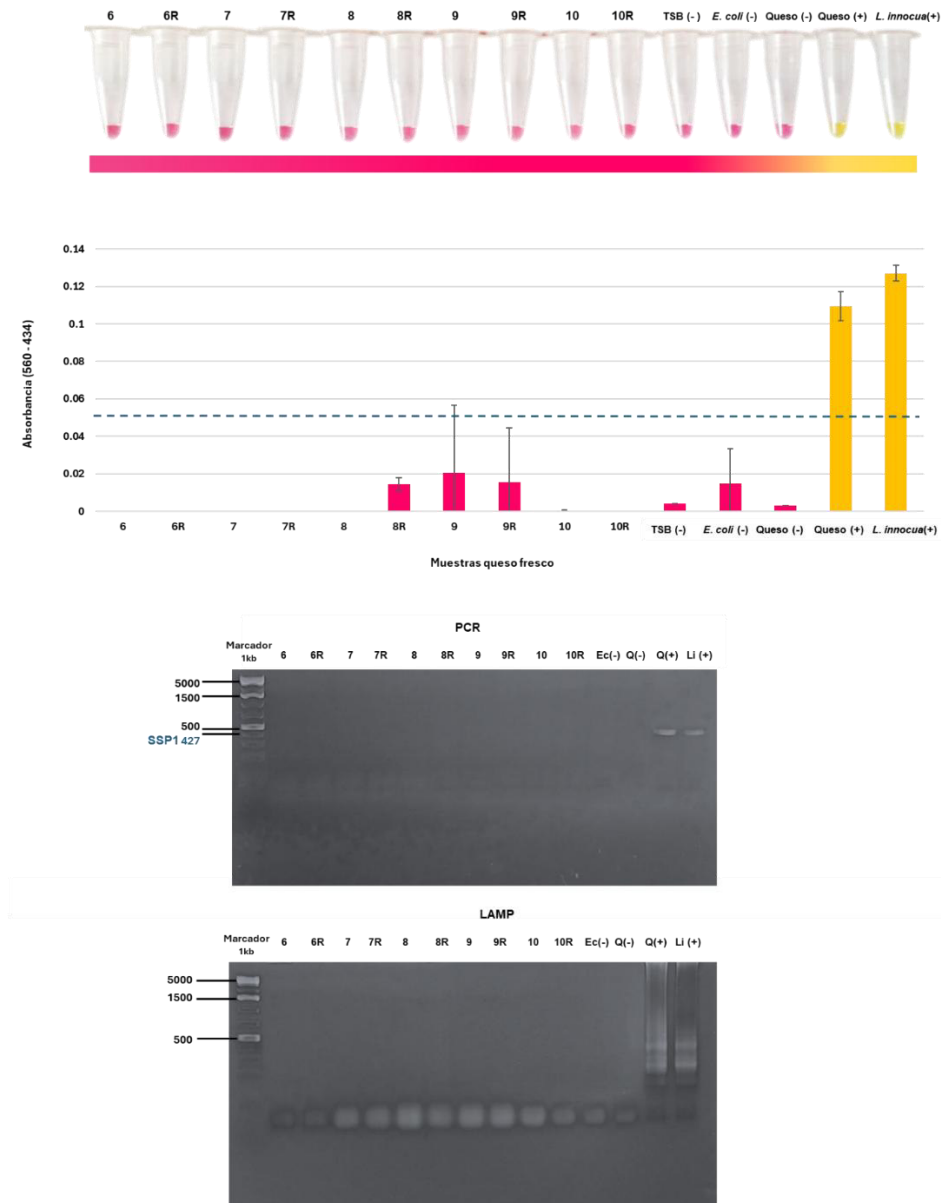


Figura 21. Resultados de la detección molecular de *Listeria spp.* mediante LAMP y PCR en muestras de queso fresco comerciales (6 al 10). En la parte superior se muestra la amplificación por LAMP de forma visual a través de un cambio de color, donde el amarillo indica muestras positivas y el rojo muestras negativas. La grafica central presenta la intensidad de la señal colorimétrica, la cual, refleja la eficiencia de amplificación donde valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación de PCR y LAMP en geles de agarosa al 2%, en los que la PCR confirma los resultados mediante la presencia de bandas de 427 pb, mientras que LAMP presenta su patrón de bandeo característico.

Quesos comerciales 11 al 15

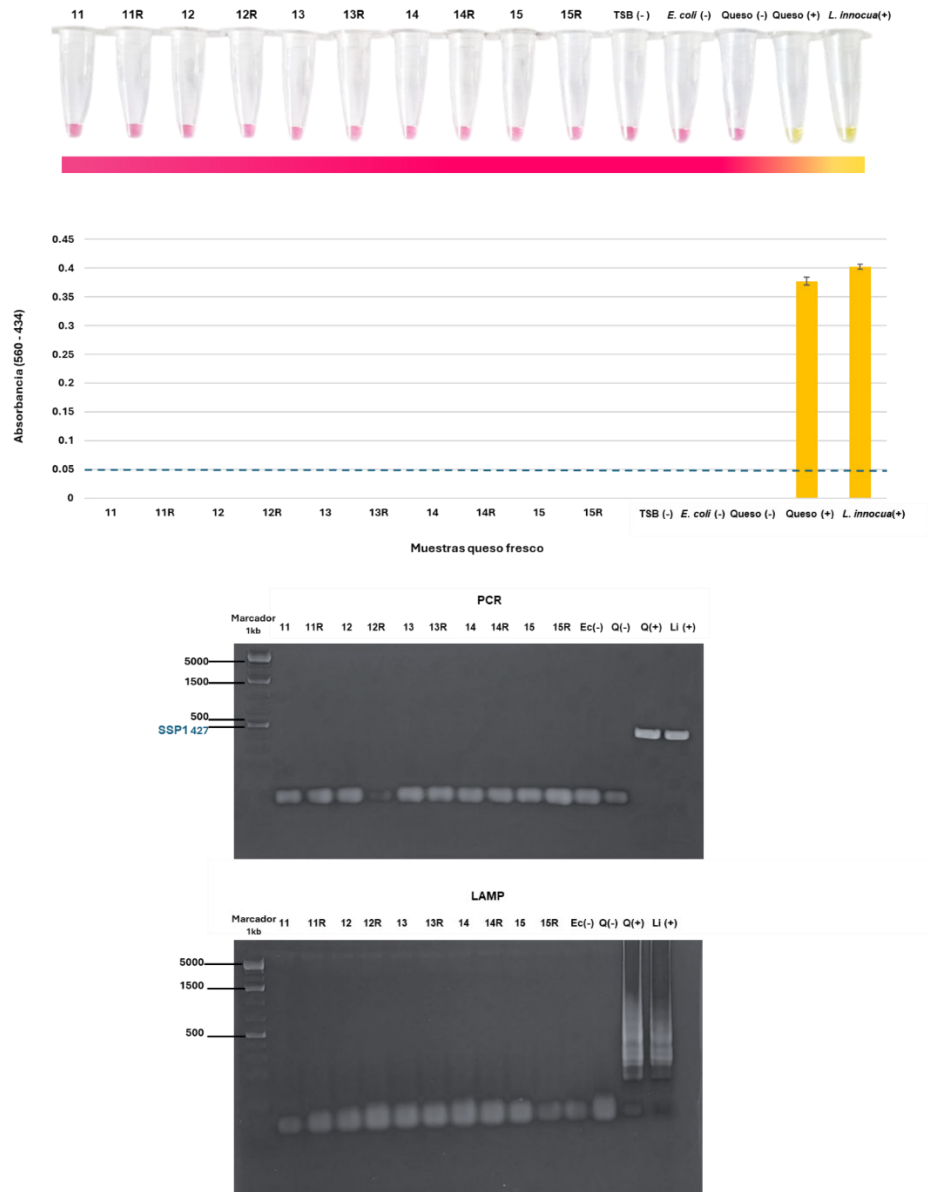


Figura 22. Resultados de la detección molecular de *Listeria spp.* mediante LAMP y PCR en muestras de queso fresco comerciales (11 al 15). En la parte superior se muestra la amplificación por LAMP de forma visual a través de un cambio de color, donde el amarillo indica muestras positivas y el rojo muestras negativas. La grafica central presenta la intensidad de la señal colorimétrica, la cual, refleja la eficiencia de amplificación donde valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación de PCR y LAMP en geles de agarosa al 2%, en los que la PCR confirma los resultados mediante la presencia de bandas de 427 pb, mientras que LAMP presenta su patrón de bandeo característico.

Quesos comerciales 16 al 20

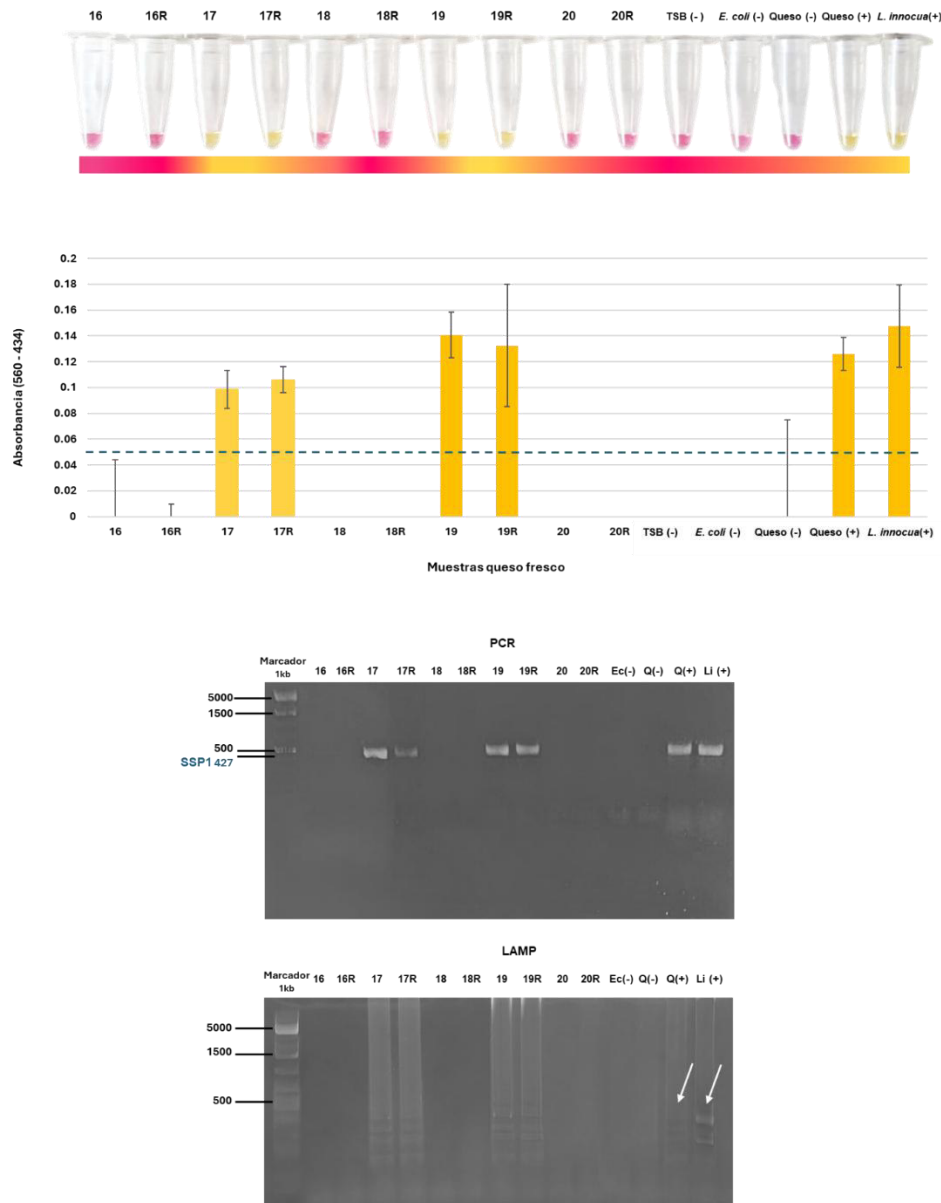


Figura 23. Resultados de la detección molecular de *Listeria spp.* mediante LAMP y PCR en muestras de queso fresco comerciales (16 al 20). En la parte superior se muestra la amplificación por LAMP de forma visual a través de un cambio de color, donde el amarillo indica muestras positivas y el rojo muestras negativas. La grafica central presenta la intensidad de la señal colorimétrica, la cual, refleja la eficiencia de amplificación donde valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación de PCR y LAMP en geles de agarosa al 2%, en los que la PCR confirma los resultados mediante la presencia de bandas de 427 pb, mientras que LAMP presenta su patrón de bandeo característico.

Quesos comerciales 21 al 25

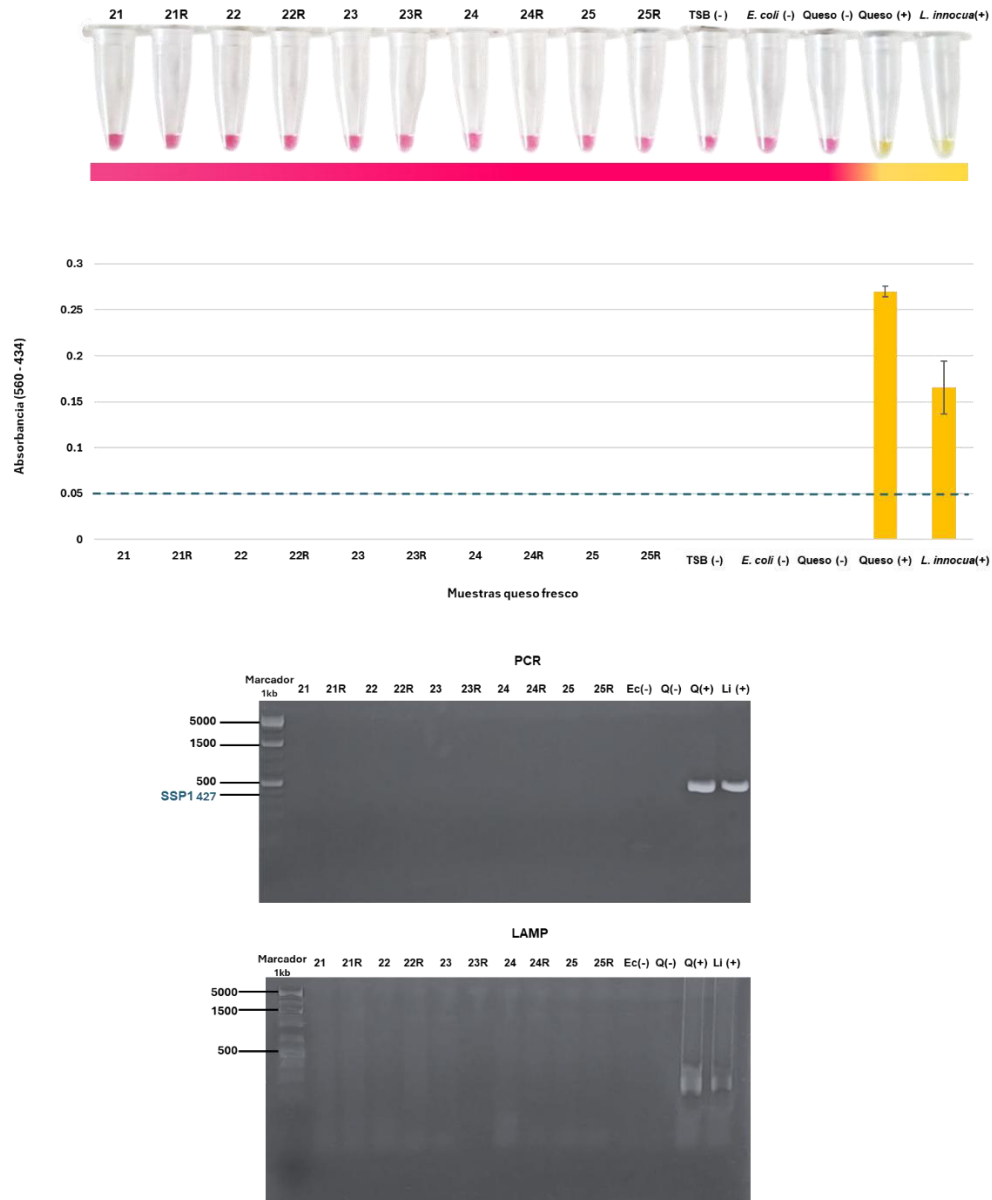


Figura 24. Resultados de la detección molecular de *Listeria spp.* mediante LAMP y PCR en muestras de queso fresco comerciales (20 al 25). En la parte superior se muestra la amplificación por LAMP de forma visual a través de un cambio de color, donde el amarillo indica muestras positivas y el rojo muestras negativas. La grafica central presenta la intensidad de la señal colorimétrica, la cual, refleja la eficiencia de amplificación donde valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación de PCR y LAMP en geles de agarosa al 2%, en los que la PCR confirma los resultados mediante la presencia de bandas de 427 pb, mientras que LAMP presenta su patrón de bandeo característico.

Quesos comerciales 26 al 30

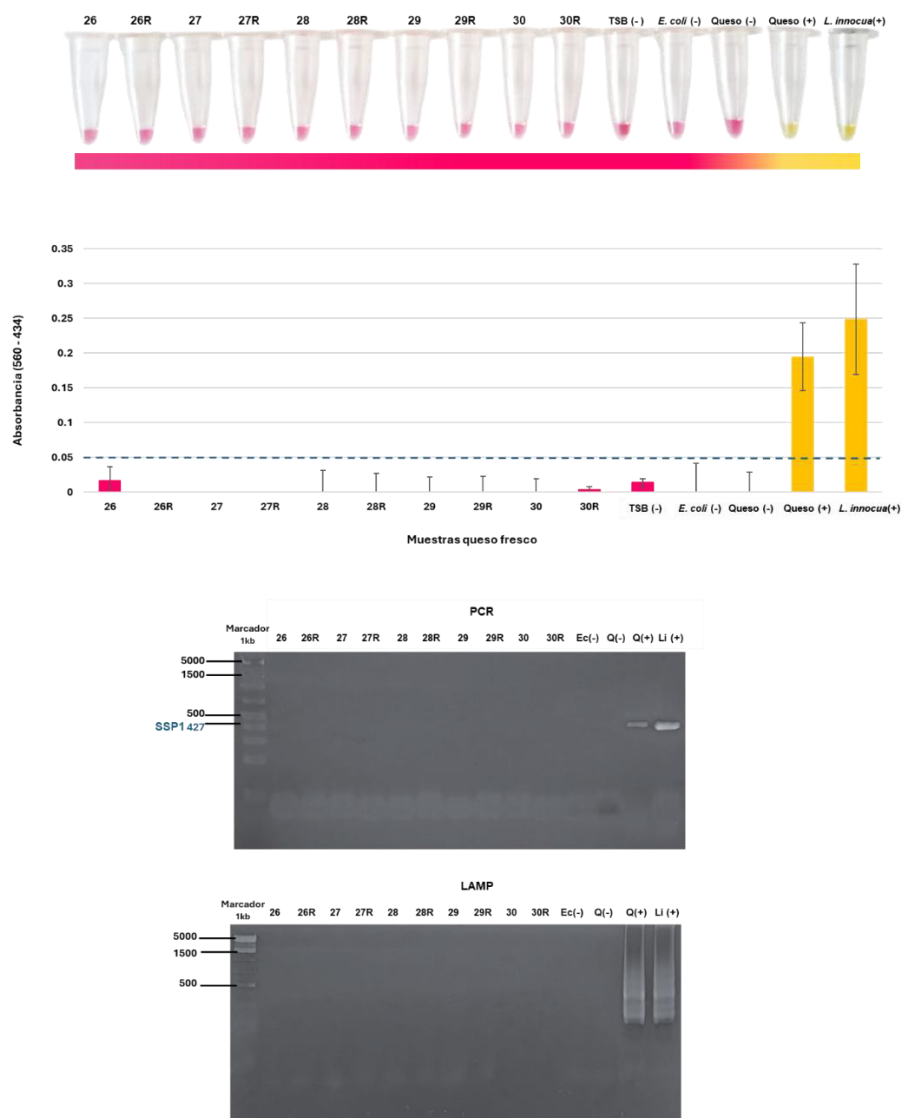


Figura 25. Resultados de la detección molecular de *Listeria* spp. mediante LAMP y PCR en muestras de queso fresco comerciales (26 al 30). En la parte superior se muestra la amplificación por LAMP de forma visual a través de un cambio de color, donde el amarillo indica muestras positivas y el rojo muestras negativas. La grafica central presenta la intensidad de la señal colorimétrica, la cual, refleja la eficiencia de amplificación donde valores inferiores a 0.05 corresponden a reacciones negativas, mientras que valores cercanos o superiores a 1 indican amplificaciones positivas. En la parte inferior se muestran los productos de amplificación de PCR y LAMP en geles de agarosa al 2%, en los que la PCR confirma los resultados mediante la presencia de bandas de 427 pb, mientras que LAMP presenta su patrón de bandeo característico.

Tabla 17. Resultados microbiológicos y moleculares obtenidos en las muestras comerciales.

No.	Fecha			Resultados				
	Compra	Toma de muestra	Procesamiento	Muestra	pH	NOM 143	LAMP	PCR
1	18/01/26	19/01/26	21/01/26	1	7.62	-	-	-
				1R		-	-	-
				2		-	-	-
2	18/01/26	19/01/26	21/01/26	2R	7.41	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
3	18/01/26	19/01/26	21/01/26	3	7.70	-	-	-
				3R		-	-	-
				4		-	-	-
4	18/01/26	19/01/26	21/01/26	4R	7.35	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
5	18/01/26	19/01/26	21/01/26	5	7.39	-	-	-
				5R		-	-	-
				6		-	-	-
6	25/01/26	26/01/26	28/01/26	6R	6.82	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
7	25/01/26	26/01/26	28/01/26	7	7.59	-	-	-
				7R		-	-	-
				8		-	-	-
8	25/01/26	26/01/26	28/01/26	8R	7.68	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
9	25/01/26	26/01/26	28/01/26	9	7.12	-	-	-
				9R		-	-	-
				10		-	-	-
10	25/01/26	26/01/26	28/01/26	10R	7.98	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
11	02/01/26	03/01/26	05/01/26	11	6.33	-	-	-
				11R		-	-	-
				12		-	-	-
12	02/02/26	03/02/26	05/02/26	12R	7.57	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
13	02/02/26	03/02/26	05/02/26	13	6.48	-	-	-
				13R		-	-	-
				14		-	-	-
14	02/02/26	03/02/26	05/02/26	14R	6.20	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
15	02/02/26	03/02/26	05/02/26	15	7.67	-	-	-
				15R		-	-	-
				16		-	-	-
16	08/02/26	09/02/26	11/02/26	16R	7.61	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-
17	08/02/26	09/02/26	11/02/26	17	7.15	+	+	+
				17R		+	+	+
				18		-	-	-
18	08/02/26	09/02/26	11/02/26	18R	7.03	-	-	-
						-	-	-
						-	-	-

19	08/02/26	09/02/26	11/02/26	19	7.24	+	+	+
				19R		+	+	+
20	08/02/26	09/02/26	11/02/26	20	7.58	-	-	-
				20R		-	-	-
21	15/02/26	16/02/26	18/02/26	21	6.36	-	-	-
				21R		-	-	-
22	15/02/26	16/02/26	18/02/26	22	6.49	-	-	-
				22R		-	-	-
23	15/02/26	16/02/26	18/02/26	23	7.34	-	-	-
				23R		-	-	-
24	15/02/26	16/02/26	18/02/26	24	5.81	-	-	-
				24R		-	-	-
25	15/02/26	16/02/26	18/02/26	25	6.33	-	-	-
				25R		-	-	-
26	22/02/26	23/02/26	25/02/26	26	7.42	-	-	-
				26R		-	-	-
27	22/02/26	23/02/26	25/02/26	27	6.56	-	-	-
				27R		-	-	-
28	22/02/26	23/02/26	25/02/26	28	6.30	-	-	-
				28R		-	-	-
29	22/02/26	23/02/26	25/02/26	29	5.90	-	-	-
				29R		-	-	-
30	22/02/26	23/02/26	25/02/26	30	7.74	-	-	-
				30R		-	-	-

(+): Prueba positiva, (-): Prueba negativa

7.6.3.1. Evaluación estadística

Para fortalecer la interpretación de los resultados obtenidos, se realizó un análisis estadístico debido a que las muestras no fueron sometidas a tratamientos controlados previamente definidos, sino que representaron condiciones naturales de variabilidad derivadas de su proceso de elaboración; lo que implicó que cualquier diferencia observada pudiera atribuirse al efecto propio de cada muestra y al error experimental. Esto permitió evaluar la variabilidad entre las muestras, así como la reproducibilidad y concordancia entre los métodos de detección empleados.

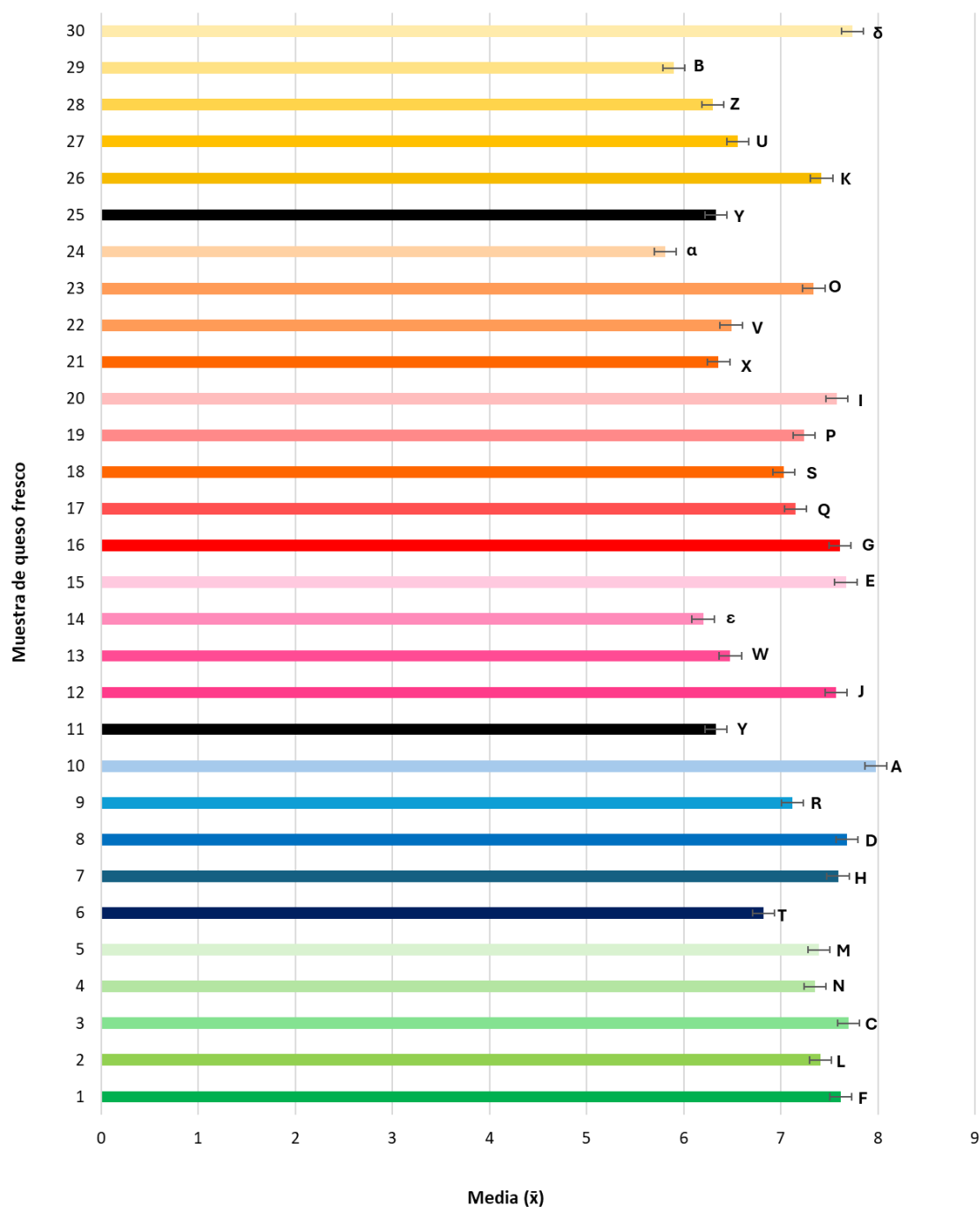


Figura 26. Comparación múltiple de medias de pH en muestras de queso fresco comerciales mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los datos se presentan como medias $\pm$ desviación estándar, obtenidos a partir del análisis mediante el procedimiento de Modelo Lineal General (GLM) por efecto de la muestra y la réplica como factores del modelo. Las barras con literales diferentes indican diferencias significativas. Statistical Analysis System (2023).

El análisis de las variables cuantitativas continuas correspondientes a los valores de pH (Figura 26) mostró diferencias estadísticamente significativas entre muestras ($p < 0.05$) lo cual indica que al menos una de las medias de pH difiere significativamente del resto. Asimismo, la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (HSD) permitió identificar grupos homogéneos entre muestras; se observó que únicamente las muestras 11 y 25 compartieron la misma literal (y), siendo las únicas que no presentaron diferencias significativas entre sí ($\alpha = 0.05$); por otro lado, el resto de las muestras se agrupó con literales distintas, lo que confirma diferencias significativas entre grupos.

De acuerdo con Fox et al., (2017a) las diferencias observadas en los valores de pH son atribuibles a la naturaleza propia de cada muestra y reflejan las condiciones fisicoquímicas del producto, lo que puede referirse no solo a las diferencias en los procesos de elaboración, sino también a las condiciones de almacenamiento y grado de acidificación, factores que influyeron directamente en la estabilidad microbiológica del queso fresco. Por lo tanto, la dispersión observada en los valores de pH sugiere variaciones en el nivel de riesgo microbiológico entre las muestras (Ryser & Marth, 2007; Bover-Cid & Garriga, 2014; Fox et al., 2017b).

Por otro lado, el análisis de las variables categóricas mediante la prueba de chi-cuadrada (X^2) mostró una alta consistencia entre los métodos de diagnóstico empleados LAMP, PCR y la NOM-143-SSA1-1995 (Tabla 20). Las frecuencias observadas, 28 respuestas negativas y 2 respuestas positivas, fueron consistentes entre las tres técnicas, lo que indica una asociación estadísticamente significativa entre los métodos ($X^2 = 30$; $p < 0.0001$).

Este tipo de relación coincide con lo reportado en ensayos previos, donde se menciona que las técnicas convencionales y moleculares, como LAMP y PCR, presentan niveles de sensibilidad y especificidad comparables en la detección de patógenos (Notomi et al., 2000; Law et al., 2015). Además, la baja proporción de muestras positivas frente a la alta proporción de muestras negativas indica una baja prevalencia de bacterias del género *Listeria* en las muestras evaluadas; sin embargo, en términos de inocuidad alimentaria, incluso niveles bajos de contaminación representan un riesgo significativo, especialmente en productos listos para el consumo como los quesos frescos (Farber & Peterkin, 1991).

Tabla 18. Resultados del análisis de chi-cuadrada (X^2) entre variables categóricas a partir de la comparación entre frecuencias observadas y esperadas. Statistical Analysis System (2023).

Diagnóstico	Resultado	Frecuencia observada	Frecuencia esperada
LAMP	Negativo	28	0.5
	Positivo	2	0.5
PCR	Negativo	28	0.5
	Positivo	2	0.5
NOM-143-SSA1-1995	Negativo	28	0.5
	Positivo	2	0.5

7.6.4. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas positivas

El proceso de aislamiento y purificación de cepas bacterianas a partir de las muestras positivas (17 y 19) permitió confirmar fenotípicamente la presencia de bacterias del género *Listeria* (Figura 27). En la etapa inicial de siembra y resiembra en Agar base Oxford, se observó un marcado oscurecimiento del medio asociado a la hidrólisis de esculina entre las 48 y 72 horas de incubación; una reacción característica del género *Listeria* que ocurre cuando la esculina es hidrolizada en esculetina y glucosa gracias a la acción de la enzima β -glucosidasa (esculinasa), donde la esculetina resultante reacciona con los iones férricos presentes en el medio formando un complejo de color negro que da lugar al oscurecimiento del agar y a la formación de halos oscuros alrededor de las colonias (Hussain et al., 1981; Fraser & Sperber, 1988; Deroncelé, 2023; BenchChem, 2026).

Tras la confirmación a nivel de género, la purificación de las cepas permitió la obtención de aislados con morfología colonial distintiva, lo que facilitó su diferenciación preliminar a nivel de especie. En esta etapa se observó la presencia de colonias grises con halo oscuro, así como de colonias con color blanco o azul iridiscentes tras 24 horas de incubación, tanto en medios generales como en medios selectivos, tal como lo establece la NOM-143-SSA1-1995. Dicha variación fenotípica entre colonias y medios se asoció a las diferencias en la actividad metabólica bacteriana según la especie, la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de incubación (Roszak & Colwell, 1987; Hitchins et al., 2003; Ryser & Marth, 2007; Bonnet et al., 2020; Datta & Burall, 2024).

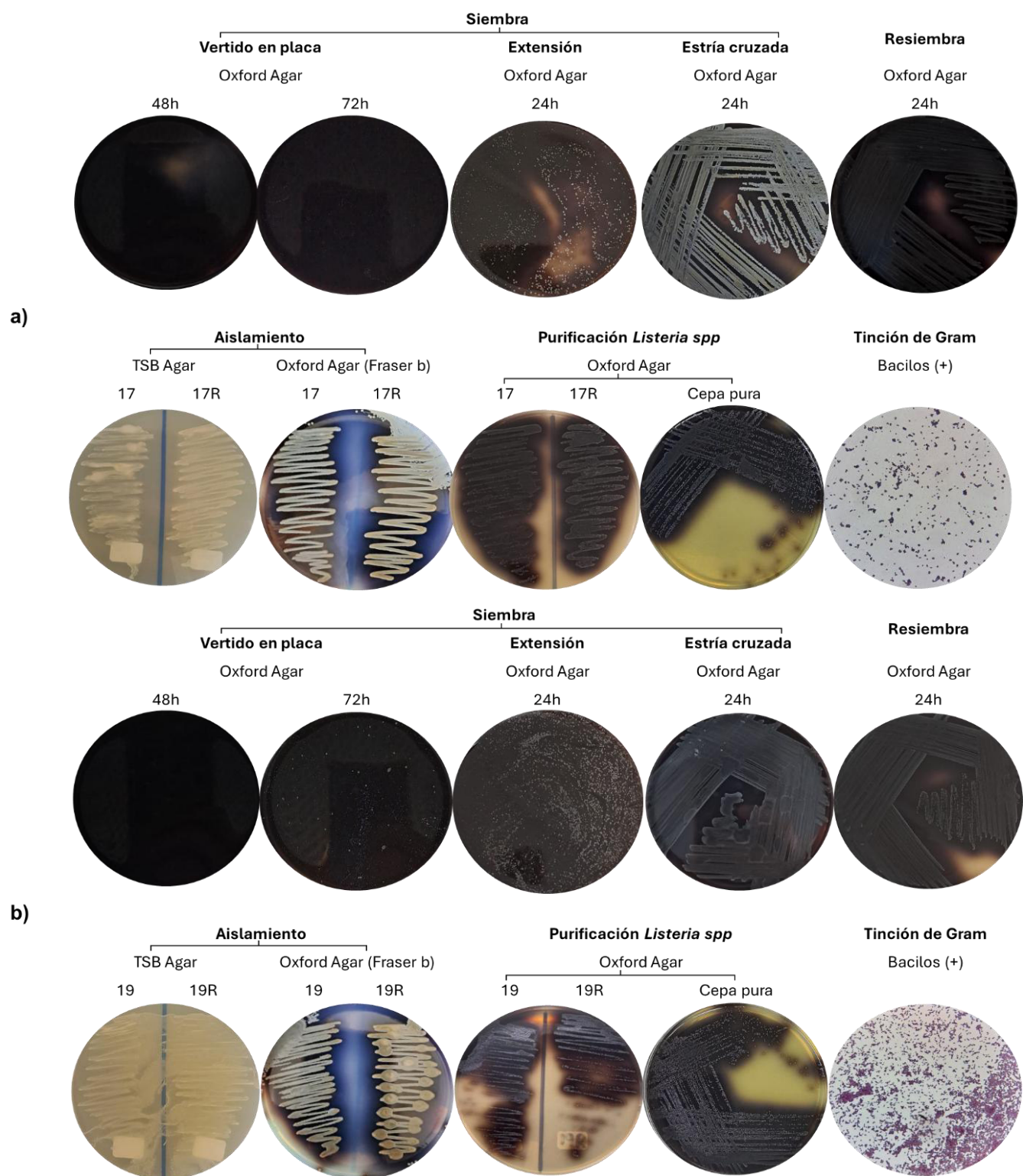


Figura 27. Aislamiento, purificación y caracterización morfológica de cepas positivas de *Listeria spp.* a partir de las muestras de queso fresco comerciales. Se presenta el proceso sistemático realizado para las muestras a) 17

y b) 19 de acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995. En la parte superior se muestra la etapa inicial de siembra y resiembra en Agar base Oxford, donde se observa el oscurecimiento del medio por la hidrólisis de esculina característica del género *Listeria*; mientras que en la parte inferior se presenta el aislamiento y la purificación en placa evidenciando el crecimiento de colonias típicas de color blanco y/o azul iridiscentes, así como de color negro con un halo negro respectivamente. De igual manera, se observa la tinción de Gram en la que se identifican bacilos Gram positivos (+) representativos del género *Listeria*.

De manera complementaria, para reforzar la identificación de los aislados, se realizaron pruebas bioquímicas básicas donde los resultados caracterizados por la presencia de bacilos Gram positivos (+) en la tinción de Gram, la ausencia de formación de hilo en la prueba de KOH al 3 %, la actividad positiva de la enzima catalasa y la ausencia de actividad del citocromo C-oxidasa, permitieron establecer una identidad aparentemente compatible con la bacteria *Listeria monocytogenes* (NOM-143-SSA1-1995; Bover & Garriga, 2014).

7.6.5. Diagnóstico y confirmación molecular mediante secuenciación del 16S ARNr

Finalmente, el diagnóstico molecular permitió la confirmación de la identidad de los aislados obtenidos de las muestras 17 y 19 mediante la combinación de técnicas adicionales. En primera instancia, la técnica optimizada de LAMP mostró un viraje colorimétrico significativo de rojo a amarillo en ambas muestras asociado a valores de diferencia de absorbancia superiores a 0.1; en contraste, los controles negativos se mantuvieron en un rango entre 0 y 0.05 lo que evidenció la ausencia de amplificación inespecífica y confirmó la especificidad de la reacción (Tanner et al., 2015). De igual manera, la PCR punto final corroboró estos resultados mediante la amplificación de un fragmento de 427 pb correspondiente al género *Listeria* (gen de proteína tipo ferritina), así como de un amplicón de 260 pb asociado a la especie *Listeria monocytogenes* por el regulador transcripcional de la familia MerR involucrado en la regulación de sus genes de virulencia (Li et al., 2021) (Figura 28).

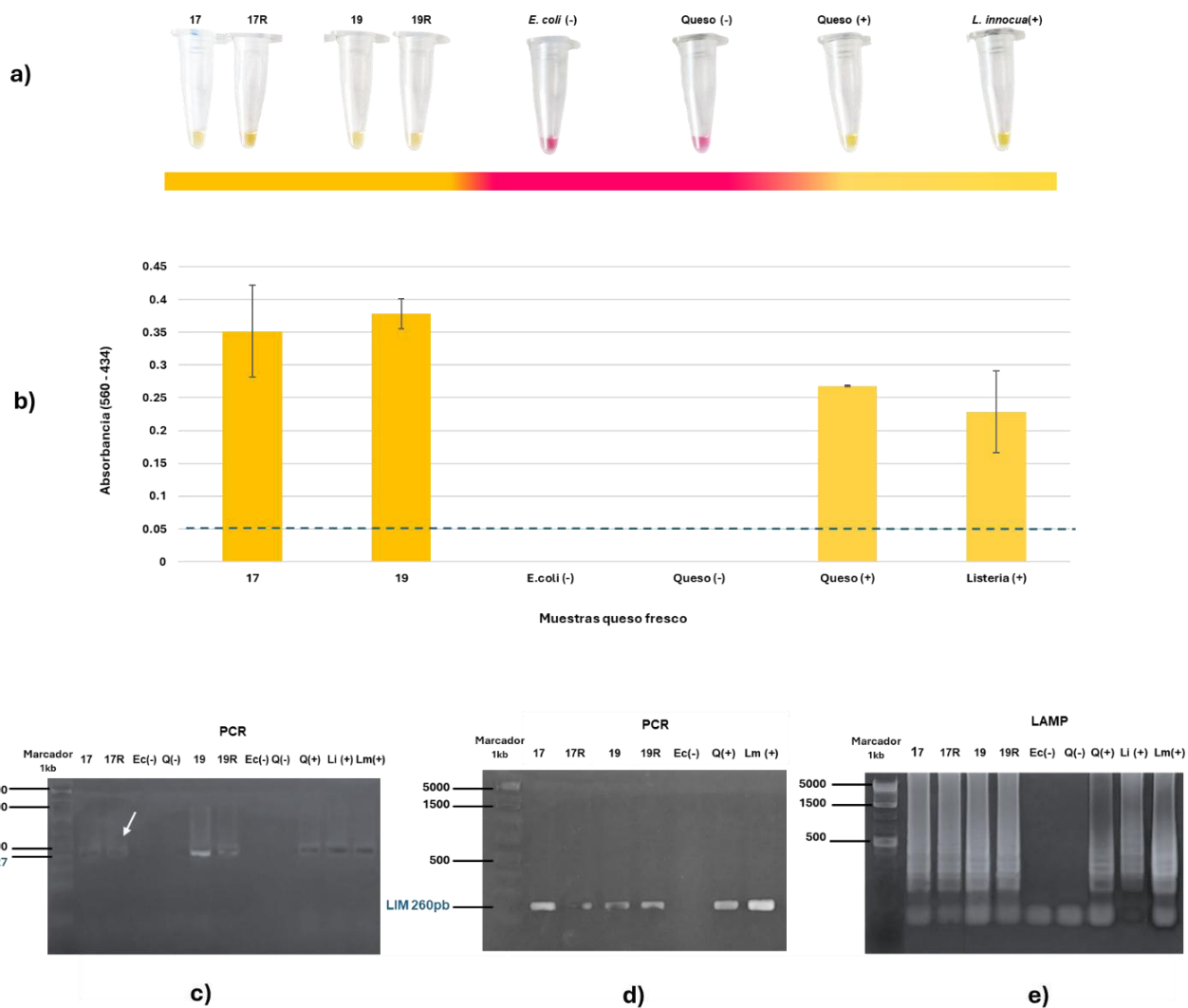


Figura 28. Confirmación molecular de las cepas aisladas 17 y 19 mediante LAMP y PCR. a) Evaluación colorimétrica mediante la técnica de LAMP donde el viraje de rojo a amarillo confirma la amplificación en las cepas puras en comparación con la estabilidad del color rojo en los controles negativos. b) Intensidad de la señal colorimétrica ($\Delta\text{Abs } 560\text{--}434 \text{ nm}$) utilizada como indicador de la eficiencia de amplificación con valores inferiores a 0.05 correspondientes a reacciones negativas y valores cercanos o superiores a 1 correspondientes a amplificaciones positivas. En la parte inferior se valida la identidad de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con la c) detección del género *Listeria* por amplificación de un fragmento de 427 pb (gen que codifica una proteína tipo ferritina) y la d) confirmación de la especie *Listeria monocytogenes* mediante la amplificación de un fragmento de 260 pb (regulador transcripcional de la familia MerR); así como la corroboración a dicho genero bacteriano mediante un e) patrón de bandeo característico de la amplificación isotérmica por LAMP.

Para respaldar dicho diagnóstico y alcanzar un alto nivel de resolución taxonómica, se llevó a cabo la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 1400–1500 pb donde el análisis de las secuencias consenso y la posterior comparación bioinformática en el banco de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) revelaron que las secuencias de los aislados 17 y 19 presentaron porcentajes de similitud superiores al 90% con cepas de referencia de *L. monocytogenes*, superior al observado con otras especies cercanas como *L. innocua* (Altschul et al., 1990).

De manera complementaria, el análisis filogenético permitió reforzar la asignación taxonómica mediante la construcción de un filograma (Figura 30); en el cual, la filogenia fue inferida utilizando el método de Máxima Verosimilitud bajo el modelo de sustitución de nucleótidos de Jukes & Cantor, (1969) seleccionándose el árbol con el mayor valor de verosimilitud (log likelihood = -55.50).

A partir de ello, se obtuvo un árbol filogenético en el que se observó que las muestras 17, 17R y 19 se agruparon dentro de un mismo clado asociado con secuencias de referencia correspondientes a *Listeria monocytogenes*, indicando una alta cercanía genética y afinidad filogenética entre los aislados y dicha especie (Hackmann, 2025). Por otro lado, las secuencias de referencia de *Listeria innocua* formaron clados independientes, pero estrechamente relacionados con *Listeria monocytogenes*, reflejando la proximidad evolutiva entre ambas especies (Clarridge III, 2004). Asimismo, la muestra 19R se agrupó en un clado separado y más cercano a las secuencias de referencia correspondientes a *Staphylococcus aureus*, lo que sugirió una menor similitud genética con los aislados de *Listeria* y evidenció una divergencia filogenética respecto al resto de las secuencias (Stecher et al., 2025; Clustal Omega, 2026).

Esta diferenciación filogenética entre los aislados y las secuencias de referencia se sustentó en la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en regiones hipervariables del gen 16S ARNr, particularmente en las regiones V1–V2, donde se identificaron diferencias puntuales entre *L. monocytogenes* y *L. innocua*, observándose una mayor similitud de los aislados analizados con *L. monocytogenes* en comparación con *L. innocua* (Figura 29, incisos c y d). En este sentido, la distancia observada en las ramas del

árbol, la agrupación y la distribución de los clados obtenidos fueron suficientes para discriminar especies estrechamente relacionadas y respaldar la identidad de las secuencias analizadas a nivel de género y especie (Clarridge III, 2004; Janda & Abbott, 2007; Woo et al., 2009; Orsi & Wiedmann, 2016).

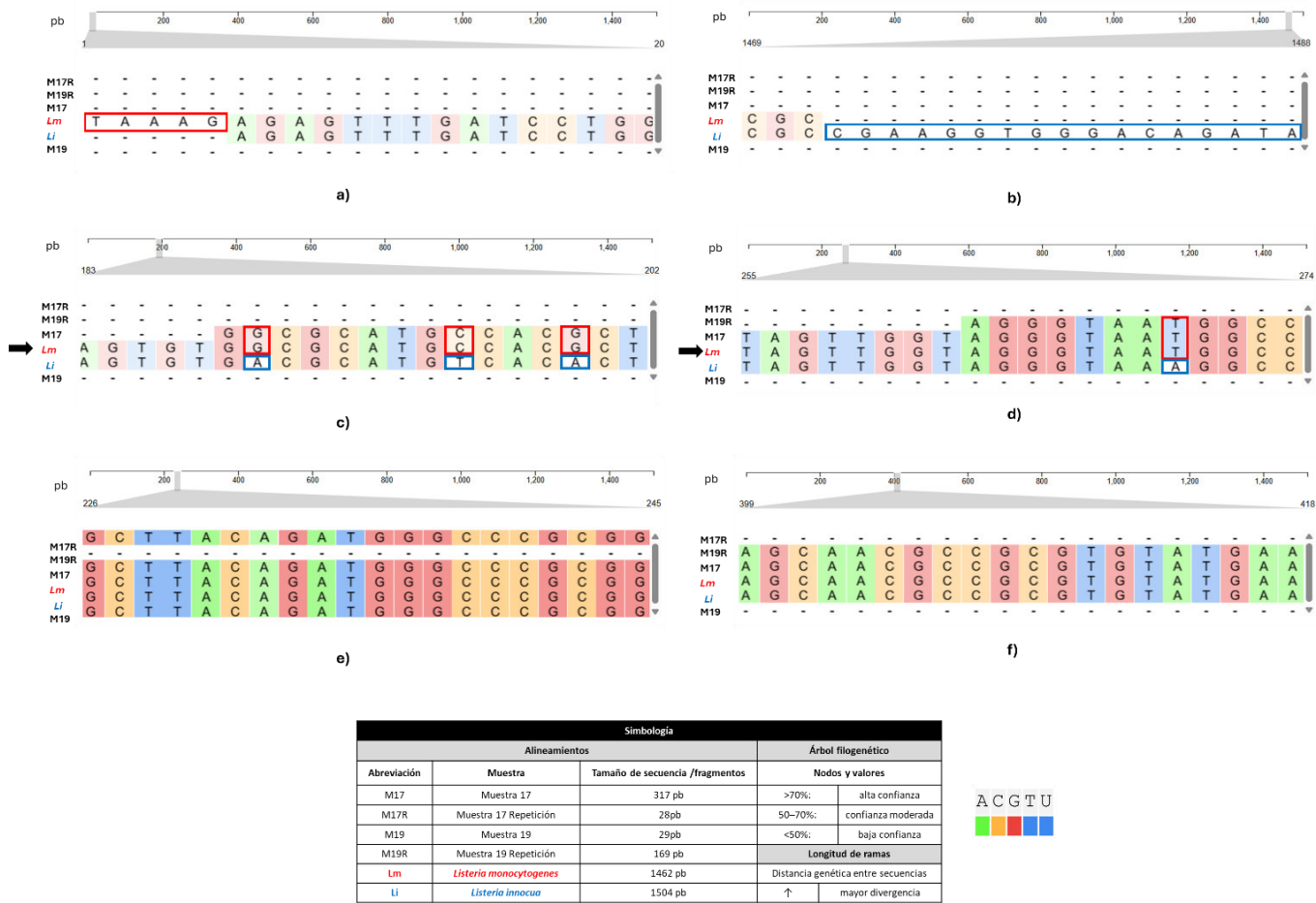


Figura 29. Alineamiento de las secuencias consenso correspondientes a las regiones hipervariables V1–V2 del gen 16S ARNr obtenidas a partir de los aislamientos de muestras de queso fresco comerciales positivas para *Listeria spp.* En la figura se presentan alineamientos parciales de las secuencias consenso (a–f) donde los nucleótidos se representan mediante código de color de acuerdo con la simbología descrita en la parte inferior. En a) y b) se observan diferencias puntuales en las bases al inicio y al final de las secuencias entre *Listeria innocua* (azul) y *Listeria monocytogenes* (rojo). En c) y d) se evidencia una mayor similitud entre las secuencias alineadas con *L. monocytogenes*. Por su parte, en e) y f) se muestran regiones altamente conservadas, con una elevada similitud entre las secuencias comparadas. Elaboración propia a partir de datos obtenidos de Clustal Omega, (2026) y MEGA 12.1, (Stecher et al., 2025).

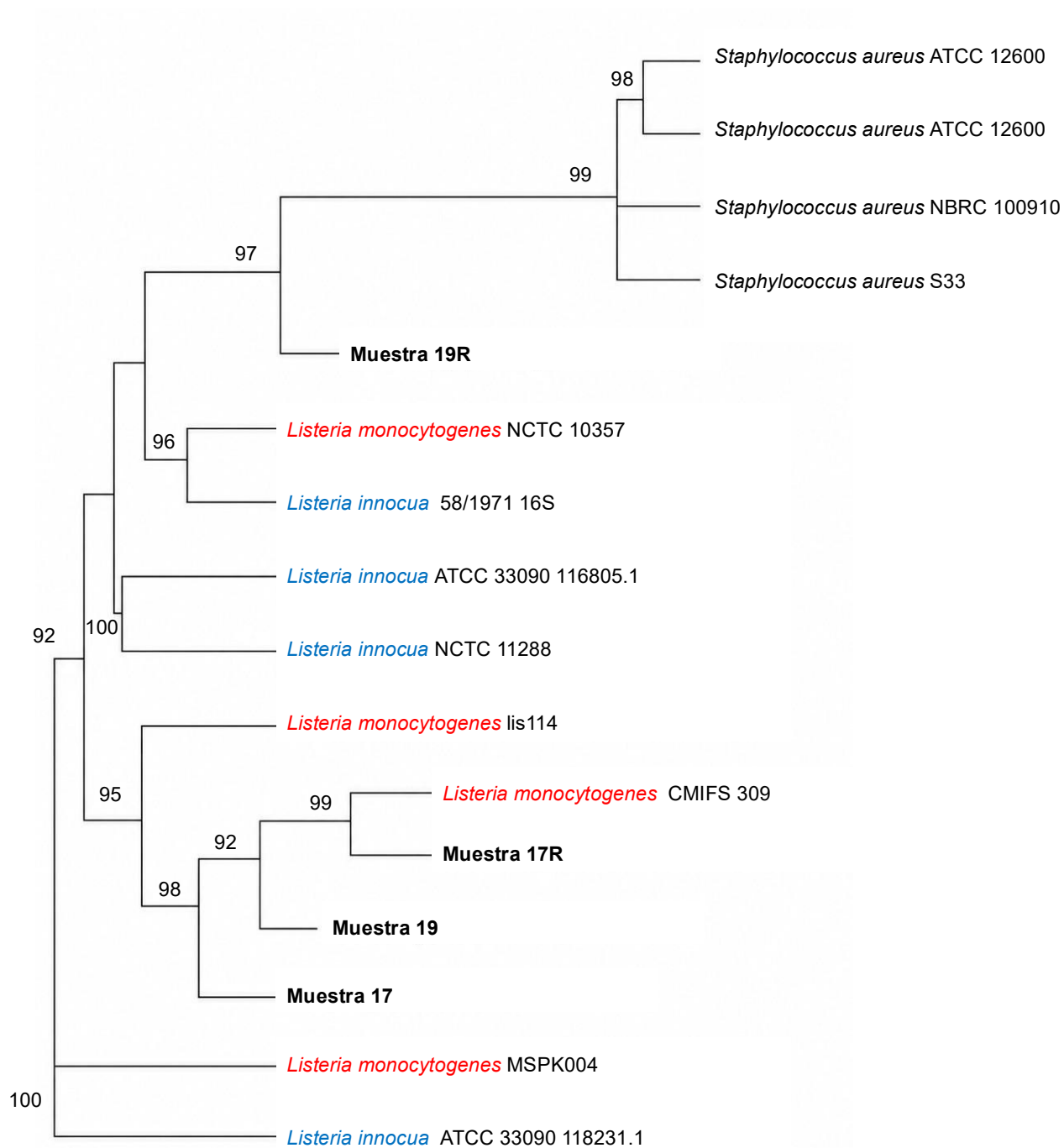


Figura 30. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias consenso alineadas, mostrando la relación filogenética entre las muestras 17 y 19 y las secuencias de referencia (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) con valores de soporte que evidencian la afinidad de los aislamientos. Elaboración propia a partir de datos obtenidos de Clustal Omega, (2026) y MEGA 12.1, (Stecher et al., 2025).

En términos generales, la concordancia entre la detección colorimétrica, el análisis filogenético, los resultados del alineamiento múltiple y la alta similitud en BLAST confirman de manera robusta que los aislados 17 y 19 corresponden específicamente a *Listeria monocytogenes*.; destacando que, la integración de LAMP usando como gen “blanco” el 16S ARNr si constituye una estrategia integral y altamente confiable para el diagnóstico de especies del género *Listeria* en matrices alimentarias complejas como el queso fresco.

VIII. CONCLUSIONES

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) permite detectar *Listeria spp.* en quesos frescos de manera más rápida, específica y sensible que la PCR y la NOM-143-SSA1-1995.

La evaluación integral de cinco métodos de extracción de ácidos nucleicos, la optimización de la técnica de amplificación isotérmica LAMP y su comparación con métodos convencionales de detección permitieron establecer un protocolo altamente eficiente, sensible y reproducible para la detección de *Listeria spp.* en queso fresco, utilizando como blanco el gen 16S ARNr.

El análisis experimental evidenció una alta correlación entre la respuesta colorimétrica y los valores de absorbancia, lo que respaldó la validez de la estandarización. Desde el punto de vista estadístico, este comportamiento fue respaldado por un modelo altamente significativo ($P < 0.0001$; $R^2 = 0.919$), que demuestra la variabilidad observada dependió directamente del método de extracción. Por su parte, la naturaleza fisicoquímica de la matriz alimentaria caracterizada por su acidez, contenido graso y elevada salinidad; influyó de manera determinante en la pureza del ADN extraído y, en consecuencia, en la eficiencia de la amplificación. En este sentido, el método de ebullición destacó como la alternativa más robusta por su bajo costo, simplicidad, reproducibilidad y alta compatibilidad con LAMP, lo que permite la detección confiable del patógeno sin generar falsos positivos y la detección de concentraciones mínimas de ADN (100 fg) y cargas bacterianas cercanas al límite de detección (1×10^1 y $1 \times 10^3 \text{ UFC/ml}$).

En comparación con la PCR convencional y el método microbiológico establecido en la NOM-143-SSA1-1995, LAMP mostró superioridad en rapidez, sensibilidad y practicidad, al eliminar la necesidad de equipos especializados y permitir una interpretación directa mediante el cambio de color, lo que disminuye significativamente los tiempos de diagnóstico sin comprometer la especificidad ni la concordancia entre métodos ($X^2 = 30$; $p < 0.0001$).

Tras la estandarización del protocolo, se evaluó su desempeño en condiciones reales mediante el análisis de muestras comerciales; lo que permitió confirmar la detección efectiva de *Listeria spp.* fuera del entorno controlado de laboratorio. Si bien, los resultados mostraron una baja prevalencia de este patógeno (2 de 30 muestras), se observó un riesgo potencial para la inocuidad alimentaria, subrayando que la presencia del microorganismo, aun en bajas concentraciones, es suficiente para comprometer la salud del consumidor. Este hecho se ve respaldado por el análisis de la matriz alimentaria, ya que las muestras positivas presentaron características fisicoquímicas y organolépticas que favorecieron el desarrollo microbiano, específicamente al registrar valores de pH cercanos a la neutralidad y alteraciones estructurales que, en conjunto, mostraron deficiencias graves en las prácticas de procesamiento, almacenamiento o higiene. En consecuencia, la detección de *Listeria spp.* en este estudio no solo validó la sensibilidad del protocolo optimizado, sino que también actuó como un indicador para fortalecer los controles sanitarios en la cadena de producción de alimentos listos para el consumo.

La confirmación de las muestras mediante la convergencia de pruebas microbiológicas, PCR y análisis de secuenciación del gen 16S ARNr permitió una identificación robusta y precisa de los patógenos detectados. En este sentido, el análisis filogenético respaldó la identidad del microorganismo a nivel de especie, confirmando que los aislados correspondieron a *Listeria monocytogenes* con valores de similitud superiores al 90%. Esta integración metodológica no solo consolidó el diagnóstico inicial por la técnica de LAMP, sino que validó con un alto grado de certeza la identidad del microorganismo, superando con éxito las limitaciones inherentes de los métodos convencionales.

Finalmente, los resultados obtenidos permitieron aceptar la hipótesis planteada, ya que la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) permitió detectar *Listeria spp.* en quesos frescos de manera más rápida, específica y sensible que la PCR y la NOM-143-SSA1-1995; consolidando a la técnica estandarizada, en combinación con el método de ebullición, como una alternativa eficiente, económica y altamente sensible. Además, su implementación representa una herramienta prometedora para el monitoreo y diagnóstico oportuno de patógenos en alimentos listos para el consumo, particularmente en contextos de

vigilancia sanitaria con recursos y tiempo limitados. Asimismo, se resalta la importancia de fortalecer las buenas prácticas de manufactura (BPM), los sistemas de control sanitario y los programas de vigilancia microbiológica con el fin de contribuir a la reducción de riesgos asociados a la presencia de *Listeria spp.* y al fortalecimiento de la inocuidad alimentaria en la región.

IX. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 19. Cronograma de actividades.

Actividad	Periodo																							
	Agosto a Diciembre 2024					Enero a Julio 2025							Agosto a Diciembre 2025					Enero a Julio 2026						
	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J
Revisión de literatura																								
Desarrollo del protocolo inicial																								
Objetivo 1: Estandarizar un método de extracción de ácidos nucleicos de <i>Listeria spp.</i> en monocultivos y en muestras de queso fresco inoculadas artificialmente, compatible con LAMP y PCR.																								
Objetivo 2: Implementar la detección con LAMP en muestras de queso fresco usando como blanco el gen 16S ARNr de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. innocua</i> .																								
Objetivo 3: Comparar LAMP, PCR y la NOM-143-SSA1-1995 para detectar <i>Listeria spp</i> en quesos frescos inoculados artificialmente.																								
Objetivo 4: Probar la especificidad de la detección con LAMP en muestras de queso fresco comerciales.																								
Escritura de artículo de divulgación																								
Escritura de revisión bibliográfica																								
Escritura de un artículo científico																								
Término del proyecto																								

Fecha estimada para realizar la actividad

Actividad realizada

*A: Agosto; S: Septiembre; O: Octubre; N: Noviembre; D: Diciembre; E: Enero; F: Febrero; M: Marzo; A: Abril; M: Mayo; J: Junio; J: Julio.

X. BIBLIOGRAFÍA

- AAT Bioquest, Inc. (2025). Quest Graph™ Absorption [Phenol Red]. AAT Bioquest. Disponible en línea: https://www.aatbio.com/absorbance-uv-visible-spectrum-graph-viewer/phenol_red. (Consultado en Octubre 2025).
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M.F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *The Journal of Bacteriology*, 186 (9), 2629- 2635.
- Adams, E. R., Schoone, G. J., Ageed, A. F., Safi, S. E., and Schallig H. D. F. H. (2010). Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of *Leishmania* Parasites in Clinical Samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82 (4), 591-596.
- Agersborg, A., Dahl, R., & Martinez, I. (1997). Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 35(3), 275-280.
- Allerberger, F., Bagó, Z., Huhulescu, S., Pietzka, A., & Pleininger, S. (2023). Listeriosis: the dark side of refrigeration and ensiling. In *Zoonoses: Infections Affecting Humans and Animals*. Cham: Springer International Publishing, 373-410.
- Alonso, M. A. (2018). Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. Universidad De Oviedo, 22-32.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Álvarez-Fraga, L. (2018). Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*. Universidad de Coruña. Disponible en línea: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/20573> (Consultado en Enero de 2025).
- Anupama, K. P., Nayak, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I., & Maiti, B. (2021). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay along with conventional and real-time PCR assay for sensitive detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood sample without enrichment. *Molecular Biology Reports*, 48(1), 1009-1016.

- Aristizábal, A. G., Becerra, A. M. A., Cáceres, E. X. U., Bernal, A. M. P., & Bernal, C. P. J. (2020). Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(2), 7-19.
- Arrazola, E. R., & Romero, M. C. (2023). Reducción de Reclamaciones por Deformación y Desuerado de Queso Ranchero de Alta Demanda en una Empresa Distribuidora de Quesos a Través de Enfoques de Toma de Decisiones Multicriterio. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(6), 1344-1358.
- Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*. LE Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds). INECC. México, 517-552.
- Ávila-Camacho, F. J., Moreno-Villalba, L. M., Cerón-Montes, G. I., Garrido-Hernández, A., Cardoso-Chávez, C. A., & Pacheco-Piña, C. J. (2021). Diseño de un espectrofotómetro UV-VIS de bajo costo para la industria bioquímica: Una Revisión. *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas e Ingenierías Del ICBI*, 9, 19-28.
- Badui, S. (2016). *Química de los Alimentos* (5a ed.). México, D.F. (México): Pearson Educación, 494.
- Barboza-Corona JE, Martínez-Zavala SA, Mendoza-Valerio AP, Rangel-Chávez CP, Casados-Vázquez LE, Endy D (2026). Isothermal assay targeting the V1-V2 region of the 16S rRNA gene for rapid screening of *Listeria spp.* in raw milk. *International Dairy Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106477>
- Barrera. H.A., Ortiz, R., Rojas. A. (1993). Una nueva época dorada en la biología molecular, *Ciencia y Desarrollo*; 50,180.
- Bartlett, J., Stirling, D. (2003). *Methods in Molecular Biology. PCR Protocols*. Vol 226. 2nd Ed. Humana Press. New Jersey. 545.
- BenchChem Technical Support Team. (2026). Application of Esculin in Selective Media for *Listeria monocytogenes*: A Detailed Guide for Researchers. Methodological & Application. Disponible en línea en: https://pdf.benchchem.com/1671/Application_of_Esculin_in_Selective_Media_for_Listeria_monocytogenes_A_Detailed_Guide_for_Researchers.pdf (Consultado en Abril 2026)

- Beumer, R. R., Giffel, M. C., Anthonie, S. V. R., & Cox, L. J. (1996). The effect of acriflavine and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. In enrichment media. Food Microbiology, 13, 137–148.
- Bhosale, S., Desale, R.J., Fulpagare, YG. (2020). Biofilm: una descripción general con respecto a la industria láctea. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 9, 150–160.
- Bi, Y., Shu, M., Zhong, C., Li, S. Y., Li, Y. K., Yang, H. H., & Wu, G. P. (2020). A novel SDS rinse and immunomagnetic beads separation combined with real-time loop-mediated isothermal amplification for rapid and sensitive detection of *Salmonella* in ready-to-eat duck meat. Food Analytical Methods, 13, 1166-1175.
- Bonazzi, M., Lecuit, M., Cossart, P. (2009). *Listeria monocytogenes* internalin and E- cadherin from structure to pathogenesis. Cellular Microbiology, 11, 693-702.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. New microbes and new infections, 34, 100622.
- Bovay, J. (2016). FDA refusals of imported food products by country and category, 2005–2013. United States Department of Agriculture. Economic Information Bulletin Number 151. Disponible en línea: https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/44066/57014_eib151.pdf (Consultado en Octubre de 2024).
- Bover, S., & Garriga, M. (2014). Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Informe final de la actividad (Ref. 0404-I3020). Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). 8-21.
- Braun, L., Dramsi, P., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., Cossart, P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. Molecular Microbiology, 25, 85-94.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food control, 75, 1-13.

- Burall, L.S., Macarisin, D., et al. (2016). Prevalencia y nivel de *Listeria monocytogenes* en helados vinculados a un brote de listeriosis en los Estados Unidos. *Journal of Food Protection*; 79: 1828–1832. 10.4315/0362-028X.JFP-16-208
- Burbano, E. M., Carrascal, A. K., Mercado, M., & Poutou, R. (2003). Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. *Normas y Calidad*, 57, 39-48.
- Burbano, E., Sierra, S., Torres, K., Mercado, M., Carrascal, A., & Poutou, R. (2006). Rapid ADN extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Revista MVZ Córdoba*, 11(1), 715-724.
- Busch, A., Becker, A., Schotte, U., Plötz, M., Abdulmawjood, A. (2022). Mpl-gene-based loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in various food samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 19(7):463-472. doi: 10.1089/fpd.2021.0080
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-Time PCR Experiments. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, Volume 55, Issue 4, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2, 379-94.
- Carril, D. M., Crego-Vicente, B., del Olmo, M. D., & Fernández-Soto, P. (2024). Aplicación de la tecnología lamp (Loop-mediated isothermal amplification) para el diagnóstico molecular de infecciones por *Schistosoma haematobium*. *FarmaJournal*, 9(2), 51-61.
- Carvalho, A., Eusébio, C., Silva, J., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2010). Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 21(11), 1492-1496.
- Castañeda-Ruelas, G. M., Chaidez-Quiroz, C., Salazar-Jiménez, E. P., Hernández-Chiñas, U., & Eslava-Campos, C. A. (2018). *Listeria monocytogenes* y la listeriosis, problema de salud pública en México. *Salud Pública de México*, 60, 376-377. <https://doi.org/10.21149/9466>

- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix J., Chaidez-Quiroz C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*. 56(6), 654–659. <https://doi.org/10.21149/spm.v56i6.7393>
- Castellanos, N. A., Gómez, L. M., Parra, A. K., Neiza, N. C., Rodríguez, M. C., & Neira, Y. S. (2019). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 56(1), 23.
- Castro, A.E., Hofer. E., Matias da Silva M., Marín V. (2008). Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8), 836–838. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000800016>.
- Chen, B., Pyla, R., Kim, T., Silva, J., Jung, Y. (2010). Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. *Letters in Applied Microbiology*. 50, 626-632.
- Chen, J. Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(2), 39-59.
- Chen, J., Luo, X., Jiang, L., Jin, P., Wei, W., Liu, D. (2009). Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiology*, 26, 103-11.
- Chen, P. Y., He, C. H., & Zhang, L. L. (2023). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 51(10), 74-78.
- Chen, Y., Li, H., Yang, L., Wang, L., Sun, R., Shearer, J. E., & Sun, F. (2021). Rapid detection of *Clostridium botulinum* in food using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(9), 4401.
- Chiara, M., Caruso, M., D'Erchia, AM., Manzari, C., Fraccalvieri, R., Goffredo, E., Latorre L., Miccolupo, A., Padalino, I., Santagada, G., Chiocco, D., Pesole, G., Horner, DS., Parisi, A. (2015). Comparative genomics of *Listeria sensu lato*: genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity-related traits

- through lateral gene transfer. *Genome Biology and Evolution* 7, 2154-2172.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evv131>
- Cho, A. R., Dong, H. J., Seo, K. H., & Cho, S. (2014). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Listeria monocytogenes prfA* in milk. *Food Science and Biotechnology*, 23(2), 467-474.
- Clarridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862.
- Clustal Omega. Multiple Sequence Alignment (MSA). (2026). clustalo-I20260415-231501-0808-47147770-p2m Disponible en línea:
<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo?stype=dna> (Consultado en Abril 2026).
- Cornu, M., Kalmokoff, M., & Flandrois, J. P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 261-274.
- Cossart, P., Mengaud, J. (1989). *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Molecular Biology in Medicine*, 6, 463-74.
- Cossart, P., Pizarro-Cerdá, J., Lecuit M. (2003). Invasion of Mammalian Cells by *Listeria monocytogenes*: Functional Mimicry to Subvert Cellular Functions. *Trends in Cell Biology*, 13(1), 23-31.
- Cuevas-González, P., Heredia-Castro, P., Méndez-Romero, J., Hernández-Mendoza, A., Reyes Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B. (2017). Artisanal Sonoran cheese (Cocido cheese): An exploration of its production process, chemical composition and microbiological quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(13), 4459–4466.
- Cunha, C. R., Dias, A. I., & Viotto, W. H. (2010). Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Research International*, 43(3), 723-729.
- Curiale, M. S., & Lewus, C. (1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 57, 1048–1051.
- Czajka, J., Bsat, N. A. D. A., Piani, M., Russ, W., Sultana, K. H. A. L. I. D. A., Wiedmann, M., & Batt, C. A. (1993). Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S

- rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 304-308.
- Daddy Gaoh, S., Kweon, O., Lee, Y. J., LiPuma, J. J., Hussong, D., Marasa, B., & Ahn, Y. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detecting *Burkholderia cepacia* complex in non-sterile pharmaceutical products. *Pathogens*, 10(9), 1071.
- Dao Thi, V. L., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L. P., Kirrmaier, D. & Anders, S. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science Translational Medicine*, 12(556), eabc7075.
- Datta, A. R., & Burall, L. S. (2024). Detection of *Listeria monocytogenes* in Food and Environment. *Diagnosis of Pathogenic Microorganisms Causing Infectious Diseases*, 67-95.
- Datta, A., & Burall, L. (2018). Current trends in foodborne human listeriosis. *Food Safety*, 6(1), 1-6.
- Den Bakker, H.C., Manuel, C.S., Fortes, E.D., Wiedmann, M., Nightingale, K.K., (2013). Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3257–3268. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048587-0>
- Deroncelé, V. (2023). *Listeria monocytogenes*. μ -NOTAS. MITLAB. Disponible en línea en: <https://www.mit-lab.com/listeria-monocytogenes/> (Consultado Abril 2026)
- Dincer, E. (2023). Detection of *Listeria* Species by Conventional Culture-Dependent and Alternative Rapid Detection Methods in Retail Ready-to-Eat Foods in Turkey. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(2), 349.
- Doménech-Sánchez, A., & Vilab, J. (2004). Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(1), 46-54.
- Duh, Y.S., Schaffner, D.W., 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 56, 205–210.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology*, 58, 587-610.

- EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), 2022. Mapa de historias sobre *Listeria monocytogenes*, Disponible en línea: <https://storymaps.arcgis.com/stories/629e6627e6c64111bfd5b9257473c74a> (Consultado en Octubre 2024)
- En, F. X., Wei, X., Jian, L., & Qin, C. (2008). Loop-mediated isothermal amplification establishment for detection of pseudorabies virus. *Journal of Virological Methods*, 151(1), 35-39.
- Engstrom, SK., Cheng, C., Seman, D., Glass, KA. (2020). Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un modelo de queso con alto contenido de humedad en función del pH, la humedad y el tipo de acidez. *Journal of Food Protection*, 83, 1335–1344.
- FAO. (1996). Cumbre Mundial sobre la Alimentación 1996. Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial. Roma. Disponible en línea: <https://www.fao.org/4/w3548s/w3548s00.htm#:~:text=La%20Declaraci%C3%B3n%20reafirma%20%22el%20derecho,satisfacer%20sus%20necesidades%20nutricionales%20b%C3%A1sicas%22> (Consultado en Octubre 2024).
- Farber, J. M., & Peterkin, P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, 55(3), 476-511.
- Feng, J., Dai, Z., Tian, X., & Jiang, X. (2018). Detection of *Listeria monocytogenes* based on combined aptamers magnetic capture and loop-mediated isothermal amplification. *Food Control*, 85, 443-452. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.027>
- Fideicomiso de Riesgo Compartido. (2018) Seguridad Alimentaria y Nutricional. Declaración Universal de Derechos Humanos de 1948. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/firco/es/articulos/seguridad-alimentaria-y-nutricional> (Consultado en Octubre 2024).
- Fiore, A., Treglia, I., Ciccaglioni, G., Ortoffi, M. F., & Gattuso, A. (2023). Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cooked Ham. *Foods*, 12(1), 193. <https://doi.org/10.3390/foods12010193>
- Foo, P. C., Nurul Najian, A. B., Muhamad, N. A., Ahamad, M., Mohamed, M., Yean Yean, C., & Lim, B. H. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: a comparative analysis study of LAMP, conventional

- PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample. *BMC Biotechnology*, 20(1), 34.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of cheese science* (Vol. 1, p. 271). Boston, MA, USA: Springer. 60, 111,340.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017a). Bacteriology of cheese milk. En *Fundamentals of cheese science* (2da ed.). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_5
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2017b). Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. En: *Fundamentals of Cheese Science*. (2da ed.). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_19
- Fraser, J. A., & Sperber, W. H. (1988). Rapid detection of *Listeria spp.* in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 51(10), 762-766.
- Frisch, L. M., Mann, M. A., Marek, D. N., & Niessen, L. (2021). Development and optimization of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the species-specific detection of *Penicillium expansum*. *Food Microbiology*, 95, 103681.
- Gallegos-Daniel, C., Taddei-Bringas, C., & González-Córdova, A. F. (2023). Panorama de la industria láctea en México. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional*, 33(61).
- Gaona-Pineda, E. B., Martínez-Tapia, B., Arango-Angarita, A., Valenzuela-Bravo, D., Gómez-Acosta, L. M., Shamah-Levy, T., & Rodríguez-Ramírez, S. (2018). Consumo de grupos de alimentos y factores sociodemográficos en población mexicana. *Salud Pública de México*, 60, 272-282.
- García, G. (2022). Crece la detección de patógenos en alimentos mediante biosensores. THE FOOD TECH - Medio de noticias líder en la Industria de Alimentos y Bebidas. Disponible en línea: <https://thefoodtech.com/seguridad-alimentaria/crece-la-deteccion-de-patogenos-en-alimentos-mediante-biosensores/> (Consultado en Octubre 2024).
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294, 849-52.
- González, F.T. & Rojas, H.R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y por prevención y diagnóstico, *Salud Pública de México*, 47 (5): 388- 391.

- González, R., & Pérez, S. (2021). Control de calidad microbiológico en productos lácteos: Un enfoque en la detección de patógenos. *International Dairy Journal*, 14(1), 45-60.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46(3), 167-172.
- Guan, Y., Wu, Y., Huang. (2024). The Development and Application of Lyophilized LAMP Detection Reagent for *Listeria monocytogenes*. *Current Microbiology*, 81, 398. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03925-0>.
- Guerrero, J. T. G., Guevara, L. I. P., & León, S. C. (2026). Microbial ecology of artisanal fresh cheese from Sinaloa: Influence of geographic terroir on diversity, functionality, and safety. *Food Microbiology*, 105073.
- Gutiérrez, F., & Torres, A. (2021). Contaminación microbiológica en productos lácteos: Casos y estudios recientes. *Journal of Food Safety*, 18(2), 45-56.
- Hackmann, T. J. (2025). Setting new boundaries of 16S rRNA gene identity for prokaryotic taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 75(4), 00674
- Haugland, R. A., Brinkman, N., & Vesper, S. J. (2002). Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Journal of microbiological methods*, 50(3), 319-323.
- Hellberg, R. S., Martin, K. G., Keys, A. L., Haney, C. J., Shen, Y., & Smiley, R. D. (2013). 16S rRNA partial gene sequencing for the differentiation and molecular subtyping of *Listeria* species. *Food microbiology*, 36(2), 231-240.
- Hitchins, A. D. (2003). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *Bacteriological Analytical Manual*, 10.
- Hussain Qadri, S. M., Smith, J. C., Zubairi, S., & DeSilva, M. I. (1981). Esculin hydrolysis by gram positive bacteria: A rapid test and it's comparison with other methods. *Medical Microbiology and Immunology*, 169(2), 67-74.
- Hwang, C. H., & Gunasekaran, S. (2001). Measuring crumbliness of some commercial Queso Fresco-type Latin American cheeses. *Milchwissenschaft*. 56: 446-450.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2009). Procedimiento para identificación bioquímica de cepas de *L.monocytogenes* aisladas en alimentos y ambiente, 15.

- Iñiguez Palomares., C. M. (2002). Detección y prevalencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por reacción en cadena de la polimerasa y método oficial. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (1), 43-45.
- Jacquet, C., Doumith, M., Gordon, J.I., Martin, P.M., Cossart, P., Lecuit, M. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. The Journal of Infectious Diseases, 189, 2094-100.
- Jaimez-Ordaz, J., Hernández-Serna, Y., González-Olivares, L. G., Pérez-Flores, J. G., Curiel, L. G., Monroy-Rodríguez, I., & Contreras-López, E. (2026). Technological Refinement of Mexican Aro Cheese Production: Effects on Yield, Microbiological Quality, and Storage Stability. International Dairy Journal, 106606.
- Jaimez-Ordaz, J., Hernández-Serna, Y., González-Olivares, L. G., Pérez-Flores, J. G., Curiel, L. G., Monroy-Rodríguez, I., & Contreras-López, E. (2026). Technological Refinement of Mexican Aro Cheese Production: Effects on Yield, Microbiological Quality, and Storage Stability. International Dairy Journal, 106606.
- Jana, M., Adriana, V., & Eva, K. (2020). Evaluation of DNA extraction methods for culture-independent real-time PCR-based detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. Food Analytical Methods, 13(3), 667-677.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of Clinical Microbiology, 45(9), 2761-2764.
- Jemmi, T., & Stephan, R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), 25(2), 571–580.
- Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B.G., Lye, D., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S., Bennett, R.W., Pruckler, J., Steigerwalt, A., Kathariou, S., Volokhov, D., Rasooly, A., Chizhikov, V., Fortes, E., Duvall, R.E., Hitchins, A.D., Messer, J., Swaminathan, B., Yildirim, S., Wiedmann, M. (2004). Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4256–4266. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4256-4266.2004>.

- Jonquières, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Grampositive bacteria. *Molecular Microbiology*, 34, 902-14.
- Jooste, P., Jordan, K., Leong, D. y Alvarez-Ordóñez, A., (2016), *Listeria monocytogenes* en alimentos: control mediante el monitoreo del entorno de procesamiento de alimentos. *Revista Africana de Investigación en Microbiología* 10(1), 1–14.
- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in foods. *Advances in food and Nutrition Research*, 86, 181-213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00028-1>.
- Juárez-Barrientos, J. M., Díaz-Rivera, P., de Jesús Ramírez-Rivera, E., Rodríguez-Miranda, J., Martínez-Sánchez, C. E., Carmona-García, R., & Herman-Lara, E. (2021). El queso tradicional ranchero Jarocho: un estudio multidisciplinario aplicando un enfoque de la tipicidad. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 12(2), 353-369.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian protein metabolism*, Academic Press, New York.3(21), 132.
- Junior, E. M., Carvalho, R. D., Lorenzoni, R. M., & Soares, T. C. B. (2017). Universidade Federal do Espírito Santo. Avaliação de métodos de preservação de tecido foliar de fumo para obtenção de dna para estudos moleculares, 3.
- 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), 499-501. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008>
- Kaur, M., Ayarnah, K., Duanis-Assaf, D., Alkan, N., & Eltzov, E. (2023). Rapid and simple colorimetric detection of quiescent *Colletotrichum* in harvested fruit using reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technology. *Talanta*, 255, 124251.
- Kokkinos, P. A., Ziros, P. G., Bellou, M., & Vantarakis, A. (2014). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *Salmonella* in food. *Food Analytical Methods*, 7, 512-526.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G., Rosell, C., & Mejía, D. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe de

- la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia: FAO, 6, 1-194.
- Kottur, J., & Nair, D. T. (2018). Pyrophosphate hydrolysis is an intrinsic and critical step of the DNA synthesis reaction. *Nucleic Acids Research*, 46(12), 5875-5885.
- Kuhn, M., Goebel, W. (2007). Molecular virulence determinants of *Listeria monocytogenes*. Rysr E, Marth E, editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. 3rd ed. CRS Press, Taylor & Francis Group, 111-55.
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, 770.
- Lectura. (2023). Listeriosis. Disponible en línea: <https://app.lecturio.com/#!/article/3603>. (Consultado en Octubre 2024).
- Lecuit, M. (2020). *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. *Cellular microbiology*, 22(4), e13186. <https://doi.org/10.1111/cmi.13186>.
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*, 292, 1722-5.
- Lee, S.H.I., Cappato, L.P., Guimarães, J.T., Balthazar, C.F., Rocha, R.S., Franco, L.T., da Cruz, A.G., Corassin, C.H. (2019). CAF *Listeria monocytogenes* en la leche: presencia y avances recientes en métodos de inactivación. *Beverages*, 5-14.
- Li, F., Ye, Q., Chen, M., Zhang, J., Xue, L., Wang, J. & Wu, Q. (2021). Multiplex PCR for the identification of pathogenic *listeria* in Flammulina velutipes plant based on novel specific targets revealed by pan-genome analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 634255.
- Li, J. J., Xiong, C., Liu, Y., Liang, J. S., & Zhou, X. W. (2016). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): emergence as an alternative technology for herbal medicine identification. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1956.
- Li, X., Zhu, M., Wang, S., Li, W., Ren, B., Qu, L., & Zhang, X. (2025). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detecting Four Major Foodborne Pathogens in Meat and Meat Products. *Foods*, 14(13), 2321.

- Liu, D., Lawrence, M., Ainsworth, A., Austin, F. (2007). Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Food Microbiology*, 118, 101-15.
- Longhi, C., Maffeo, A., Penta, M., Petrone, G., Seganti, L., Conte, M. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal Of Applied Microbiology*, 94(5), 879-885. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01921>.
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(4), 224-234.
- Lou, D., Meurer, M., Ovchinnikova, S., Burk, R., Denzler, A., Herbst, K., Knop, M. (2023). Scalable RT-LAMP-based SARS-CoV-2 testing for infection surveillance with applications in pandemic preparedness. *EMBO reports*, 24(5), e57162.
- Maertens de Noordhout, C. M., Devleesschauwer, B., Angulo, F. J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., & Speybroeck, N. (2014). The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(11), 1073-1082.
- Magenis, R. B., Prudêncio, E. S., Fritzen-Freire, C. B., Stephan, M. P., do Egito, A. S., & Daguer, H. (2014). Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 45, 22-28.
- Marianelli, C., Martucciello, A., Tarantino, M., Vecchio, R., Iovane, G., & Galiero, G. (2008). Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. *Journal Of Dairy Science*, 91(10), 3779-3786. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1233>
- Martínez, R., Gómez, P., & Silva, F. (2022). La evolución del consumo de queso en mercados emergentes: Oportunidades y desafíos. *Global Dairy Journal*, 34(4), 102-114.
- Matle, I., Mbatha, K. R., & Madoroba, E. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1), 1-20.
- Melian, C.; Segli, F.; Gonzalez, R.; Vignolo, G.; Castellano, P. (2019). Lactocina AL705 como inhibidor de quórum sensing para controlar la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 127, 911–920.

- Mendoza-Valerio, A. P., Martínez- Zavala, S. A. M., & Barboza- Corona, J. E. (2024). Detección de *Listeria spp.* en leche mediante un método de amplificación isotérmica. Jóvenes en la ciencia, 28, 1-13.
- Milillo, S.R., Stout, J.C., Hanning, I.B., Clement, A., Fortes, E.D., den Bakker, H.C., Wiedmann M., Ricke, S.C. (2012). *Listeria monocytogenes* and hemolytic *Listeria innocua* in poultry. Poult Sci 91:2158–2163. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02292>.
- Ministry for Primary Industries. (2018). Govt.nz. *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat foods. Disponible en línea: <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/46446-Listeria-monocytogenes-and-ready-to-eat-foods> (Consultado en Noviembre 2024).
- Moreno, L.Z., Paixão, R., Gobbi, D.D., Raimundo, D.C., Ferreira, T.P., Hofer, E., Matte, M.H., Moreno, A.M. (2012). Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. Research in Microbiology. 163, 268–271. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.02.004>.
- Mori Y., & Notomi T., (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. Journal of Infection and Chemotherapy, 15, 62-69 DOI 10.1007/s10156-009-0669-9
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 289(1), 150–154.
- Moura, A., Disson, O., Lavina, M., Thouvenot, P., Huang, L., Leclercq, A & Lecuit, M. (2019). Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. Infection and immunity, 87(4), 10-1128.
- Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. (2001). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes 16. 223-229.
- Nam, D., Kim, S., Kim, J. H., Lee, S., Kim, D., Son, J., & Park, K. S. (2023). Low-temperature loop-mediated isothermal amplification operating at physiological temperature. Biosensors, 13(3), 367.
- New England Biolabs (s.f.). Bst 2.0® DNA Polymerase. Disponible en línea: <https://www.neb.com/en/products/m0537-bst-20-dna-polymerase?utm> (Consultado en Octubre 2024).

- New England Biolabs (s.f.). WarmStart® RTx Reverse Transcriptase. Disponible en línea: [https://www.neb.com/en/products/m0380-warmstart-rtx-reverse transcriptase?srsId=AfmBOorbkzf7Shr2kr-wZVihJlytrLeZ6dl8BeyMqm8IBBhYk8JMX6XY&utm_](https://www.neb.com/en/products/m0380-warmstart-rtx-reverse-transcriptase?srsId=AfmBOorbkzf7Shr2kr-wZVihJlytrLeZ6dl8BeyMqm8IBBhYk8JMX6XY&utm_) (Consultado en Octubre 2024).
- New England Biolabs. (2024). WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA). FAQs & Troubleshooting. Disponible en línea: <https://www.neb.com/en/products/e1700-warmstart-lamp-kit-dna-rna?srsId=AfmBOopmulbLgJaPQrvkNvS-m87-rOBiLG5LSLzbQd6iKipOPxr6y1yR#FAQs--Troubleshooting> (Consultado en Diciembre 2024).
- Nguyen, D. V., Nguyen, V. H., & Seo, T. S. (2019). Quantification of colorimetric loop-mediated isothermal amplification process. *BioChip Journal*, 13(2), 158-164.
- Nichols, N. M., Tanner, N. A., New England Biolabs, Inc. (s.f.). Using aptamers to control enzyme activities: Hot Start *Taq* and beyond. Disponible en línea https://www.neb.com/en/tools-and-resources/feature-articles/using-aptamers-to-control-enzyme-activities-hot-start-taq-and-beyond?srsId=AfmBOoqnZb_KfoYAM8kYooGNJV8xBqaRY82r2VQFoX98dWJt4JZoqryN&utm_ (Consultado en Octubre 2024).
- NOM-092-SSA1-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación (DOF) 23 de marzo de 1994. Disponible en línea: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0 (Consultado en Enero 2025).
- NOM-110-SSA1-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación (DOF) 28 de abril de 1994. Disponible en línea: <https://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69533.pdf> (Consultado en Enero 2025).
- NOM-143-SSA1-1995. (1997). Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Diario Oficial de la Federación (DOF) 3 de junio de 1996. Disponible en línea: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4901269&fecha=19/11/1997#gsc.tab=0, (Consultado en Octubre 2024).

- NOM-251-SSA1-2009. NORMA Oficial Mexicana, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Diario Oficial de la Federación (DOF) 10 de octubre de 2008. Disponible en línea: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm> (Consultado en Octubre 2024).
- Norhana, M. W., Poole, S. E., Deeth, H. C., & Dykes, G. A. (2010). Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. *Food control*, 21(4), 343-361.
- Notomi, T, Nagamine, K., Hase, T.(2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [version electronica]. *Molecular and Cellular Probes* 16. 223-229.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., & Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of microbiology*, 53(1), 1-5.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *NucleicAcids Research* 28 (12).
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., Lecuit, M. (2018). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 68, 844–850. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>
- Nwe, M. K., Jangpromma, N., & Taemaitree, L. (2024). Evaluation of molecular inhibitors of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Scientific Reports*, 14, 5916.
- Oconnor, L., Joy, J., Kane, M., Smith, T., Maher, M. (2000). Rapid polymerase chain reaction/DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. *Journal of Food Protection*. 63(3), 337-342.
- Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A. y García M. (2012), Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29 (5), 504-510.
- Oliveira Coelho, B., Sanchuki, H. B. S., Zanette, D. L., Nardin, J. M., Morales, H. M. P., Fornazari, B. & Blanes, L. (2021). Essential properties and pitfalls of colorimetric Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification as a point-of-care test for SARS-CoV-2 diagnosis. *Molecular Medicine*, 27, 1-11.

- Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 55(1), 25-33.
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287.
- Orsi, R. H., Liao, J., Carlin, C. R., & Wiedmann, M. (2024). Taxonomy, ecology, and relevance to food safety of the genus *Listeria* with a particular consideration of new *Listeria* species described between 2010 and 2022. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273–5287.
- Orsi, R.H. & Wiedmann, M. (2016). Características y distribución de *Listeria spp.* , incluidas las especies de *Listeria* descritas recientemente desde 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 100, 5273–5287. 10.1007/s00253-016-7552-2
- Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*. 301,79-96.
- Orton, D.M.; Batt, C.A. (1999). Detection of Viable *Listeria monocytogenes* with a 5 nuclease PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 65(5): 2122-2127.
- Oscorbin, I., & Filipenko, M. (2023). Bst polymerase a humble relative of Taq polymerase. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 4519-4535.
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food: advantages and limitations. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535–546.
- Papadakis, G., Pantazis, A. K., Fikas, N., Chatziioannidou, S., Michaelidou, K., Pogka, V & Gizeli, E. (2020). Real-time colorimetric LAMP methodology for quantitative nucleic acids detection at the point-of-care. *BioRxiv*, 22.
- Parayre, S., Falentin, H., Madec, M. N., Sivieri, K., Le Dizes, A. S., Sohier, D., & Lortal, S. (2007). Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-temporal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods*, 69(3), 431–441.

- Parida, 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), 407-421.
- Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Kozyavkin, S. A., & Slesarev, A. I. (2004). Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends in Biotechnology*, 22(5), 253-260.
- Petran, R. L., & Swanson, K. M. (1993). Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 56(7), 616-618.
- Pillich, H., Puri, M., & Chakraborty, T. (2017). ActA of *Listeria monocytogenes* and its manifold activities as an important listerial virulence factor. *The Actin Cytoskeleton and Bacterial infection*, 113-132.
- Policani, M., Ayala, C., Álvarez, S., Parra, Y., Ulke, G., Fernández, D., & López, T. (2024). Ensayo de inhibición en medio líquido con placa multipocillo de bacterias ácido-lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguay contra *Listeria monocytogenes*. *Reportes Científicos de la FACEN*, 15(1), 50-56.
- Poole, C. B., Tanner, N. A., Zhang, Y., Evans Jr, T. C., & Carlow, C. K. (2012). Diagnosis of brugian filariasis by loop-mediated isothermal amplification. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1948.
- Poussard, M., Pant, S. D., Huang, J., Scott, P., & Ghorashi, S. A. (2025). Comparative evaluation of PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detecting *Pasteurella multocida* in poultry. *New Zealand Veterinary Journal*, 73(2), 134-142.
- Prasad, M. C. B., Milton, A. A. P., Menon, V. K., Srinivas, K., Bhargavi, D., Das, S & Thomas, N. (2024). Development of a novel visual assay for ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk and chicken meat harnessing helix loop-mediated isothermal amplification (HAMP). *Food Control*, 155, 110081.
- Quereda, J.J., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Gómez, A., García, Á., Thouvenot, P., Tessaud, N., Bracq, H., Lecuit M. (2020). *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70:5868–5879. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004494>

- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 131-148.
- Ramos, G. L. P. A., Nascimento, J. S., Margalho, L. P., Duarte, M. C. K. H., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Cruz, A. G., & Sant'Ana, A. S. (2021). Quantitative microbiological risk assessment in dairy products: Concepts and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 610-616.
- Raufu, I.A., Moura, A., Vales, G., Ahmed, O.A., Aremu, A., Thouvenot, P., Tessaud, R.N., Bracq, H., Krishnamurthy, R., Leclercq, A., Lecuit, M. (2022). *Listeria Ilorinensis sp. nov.*, isolated from cow milk cheese in Nigeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(5). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005437>.
- Rawles, D. D. & Croonenberghs, R. (1995). Growth of mixed cultures of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. *Journal of food Protection*, 58(11), 1268-1270.
- Rawool, D. B., Malik, S. V. S., Shakuntala, I., Sahare, A. M., & Barbuddhe, S. B. (2007). Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 201-207.
- Reyes-Díaz, R., Méndez-Romero, J. I., Reyes-Díaz, A., Cuevas-Gonzalez, P. F., Beltran-Barrientos, L. M., Santiago-López, L & González-Córdova, A. F. (2025). From Mexico to the world: at least sixty different types of artisanal Mexican cheeses. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 40, 101189.
- Ribeiro, A. C., Almeida, F. A. D., Medeiros, M. M., Miranda, B. R., Pinto, U. M., & Alves, V. F. (2023). *Listeria monocytogenes*: An inconvenient hurdle for the dairy industry. *Dairy*, 4(2), 316-344.
- Rivas-Macho, A., Elettigerra, U., Díez-Ahedo, R., Merino, S., Goñi-de-Cerio, F., & Olabarria, G. (2024). LAMP based electrochemical sensor for extraction-free detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Control*, 163, 110546.
- Roche, S., Gracieux, P., Molihanic, E., Albert, I., Virlogeux, I., Témoin, S. (2005). Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low- virulence

- field strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6039-48.
- Rodicio, M. & Mendoza, M.D. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22: 238-245.
- Rosimin, A. A., Kim, Min-Ju., Joo, In-Sun., Suh, Soo-Hwan., Kim, Keun-Sung. (2016). Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method. *LWT - Food Science and Technology*, S002364381630086X-. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.007
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 37-45.
- Rozsak, D. B., & Colwell, R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*, 51(3), 365-379.
- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. CRC press. Disponible en línea en: [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=X7WNEQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT16&dq=Ryser,+E.+T.,+%26+Marth,+E.+H.+\(Eds.\).+\(2007\).+Listeria,+listeriosis,+and+food+safety.+CRC+press.&ots=GJnmM87-tL&sig=MuBuQL_YBaUBvvpmm6uUA5DCfa8&redir_esc=y#v=onepage&q=Ryser%2C%20E.%20T.%2C%20%26%20Marth%2C%20E.%20H.%20\(Eds.\).%20\(2007\).%20Listeria%2C%20listeriosis%2C%20and%20food%20safety.%20CRC%20press.&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=X7WNEQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT16&dq=Ryser,+E.+T.,+%26+Marth,+E.+H.+(Eds.).+(2007).+Listeria,+listeriosis,+and+food+safety.+CRC+press.&ots=GJnmM87-tL&sig=MuBuQL_YBaUBvvpmm6uUA5DCfa8&redir_esc=y#v=onepage&q=Ryser%2C%20E.%20T.%2C%20%26%20Marth%2C%20E.%20H.%20(Eds.).%20(2007).%20Listeria%2C%20listeriosis%2C%20and%20food%20safety.%20CRC%20press.&f=false) (Consultado Abril 2026)
- Sadeghi, Y., Kananizadeh, P., Moghadam, S. O., Alizadeh, A., Pourmand, M. R., Mohammadi, N., & Ranjbar, R. (2021). The sensitivity and specificity of loop-mediated isothermal amplification and PCR methods in detection of foodborne microorganisms: A systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Public Health*, 50(11), 2172.
- SADER. (2022). Convoca Agricultura a impulsar el consumo de leche en México Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/convoca-agricultura-a-impulsar-el-consumo-de->

leche-en-

mexico#:~:text=En%20el%20marco%20del%20D%C3%ADa,millones%20239%20mil%20779%20toneladas.&text=Ciudad%20de%20M%C3%A9xico-

,En%20el%20marco%20del%20D%C3%ADa%20Mundial%20de%20la%20Leche%2C%20que,ciento%20respecto%20al%20a%C3%B1o%20previo (Consultado en Octubre 2024)

Saifuddin, S. A., Rashid, R., Azmi, N. J. N., & Mohamad, S. (2024). Colorimetric strategies applicable for loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 223, 106981.

Sakatoku, A., Suzuki, T., Hatano, K., Seki, M., Tanaka, D., Nakamura, S., & Isshiki, T. (2024). Inhibitors of LAMP used to detect *Tenacibaculum* sp. strain Pbs-1 associated with black-spot shell disease in Akoya pearl oysters, and additives to reduce the effect of the inhibitors. *Journal of Microbiological Methods*, 223, 106986.

Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., & Mabilat, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria species*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3), 669-674.

Sánchez Triana, L. (2024). Planteamiento de un perfil de riesgo en inocuidad de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos colombianos. *Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería*, 49-53.

Sánchez, E., Nina, M., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Revista Con-ciencia*, 2(1), 127-140.

Sánchez, F.J., Mata, V., Espinoza, A. y Villareal, L. (2006). Incidencia de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL*; 9:51-56.

Sanchez-Hernandez, F. J. (2016). *Listeria monocytogenes*: un reto para la seguridad alimentaria. *Revista de Salud Pública*, 2445-1355.

ScEYEnce Studios. (s.f). Sociedad española de microbiología. Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad CEU Cardenal Herrera. Valencia. Garland Science. KVR-2020-0377. Figure: Graphical Abstract. Disponible en línea: <https://www.semicrobiologia.org/subgrupos->

- especializados/listeria-monocytogenes-biologia-e-infeccion (Consultado en Diciembre 2024).
- Schlech, R.J. (2020). Biofilm: una descripción general con respecto a la industria láctea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9 , 150–160.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026.
- Secretaría De Economía. (2012). Dirección general de industrias básicas análisis del sector lácteo en México (versión preliminar). *Análisis del Sector Lácteo en México*, 4-1.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2021). Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Disponible en línea: https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/noviembre/MonitorInocuidad24112021_103a7517-c5fa-4db5-95e8-879f0b09d7fe.pdf (Consultado en Noviembre 2024).
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2020). Ficha Técnica: Metodologías para la extracción de DNA total. [Versión 1.0]. Disponible en línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728770/2._FT._Metodolog_as_para_la_Extracci_n_de_DNA_total_1.0_2020.pdf (Consultado en Octubre 2024).
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2023). Sistemas de reducción de riesgos de contaminación. Medidas y procedimientos para reducir los peligros de contaminación y garantizar las condiciones óptimas de producción y procesamiento. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/sistemas-de-reduccion-de-riesgos-de-contaminacion> (Consultado en Septiembre 2024).
- Shahid, S., Geetha, M., Sadasivuni, K. K., Remani, D., Muthusamy, S., Muthalif, A. G., & Al-Maadeed, S. (2022). Highly sensitive and selective colorimetric sensing of CO₂ for biomedical applications. *3 Biotech*, 12(12), 334.
- Shan, X., Zhang, Y., Zhang, Z., Chen, M., Su, Y., Yuan, Y., Alam, M. J., Yan, H., & Shi, L. (2012). Rapid detection of food-borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Food Science And Biotechnology/Food Science And Biotechnology*, 21(1), 101-106. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0012-6>

- Shao, Y., Zhu, S., Jin, C., & Chen, F. (2011). Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2), 75-79.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, 103, 501-10.
- Shutterstock, (s.f); Imágenes libres de regalías de Cultivo microbiológico. Disponible en línea: <https://www.shutterstock.com/es/search/cultivo-microbiol%C3%B3gico> (Consultado en Octubre 2024).
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2023). Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) tienen mayor riesgo de contraerlas las personas adultas mayores. Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores. Disponible en línea <https://www.gob.mx/inapam/articulos/las-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta-tienen-mayor-riesgo-de-contraerlas-las-personas-adultas-mayores> (Consultado en Octubre 2024).
- Smith, G. A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N. C., Portnoy, D. A., Goldfine, H. (1995). The Two Distinct Phospholipases C of *Listeria monocytogenes* Have Overlapping Roles in Escape from a Vacuole and Cell-to-Cell Spread. *Infection and Immunity*, 63, 4231–4237.
- Srisawat, M. & Panbangred, W. (2015). Efficient and Specific Detection of *Salmonella* in Food Samples Using a stn-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *BioMed research international*, 2015(1), 356401.
- Srisawat, W., Saengthongpinit, C., & Nuchchanart, W. (2022). Development of loop-mediated isothermal amplification-lateral flow dipstick as a rapid screening test for detecting *Listeria monocytogenes* in frozen food products using a specific region on the ferrous iron transport protein B gene. *Veterinary World*, 15(3), 590.
- Statista. (2023). Dairy Market Value Worldwide, 2020–2026. Disponible en línea: <https://www.statista.com/statistics/502280/global-dairy-market-value/> (Consultado en Octubre 2024).
- Statistical Analysis System (SAS). (2023). Version 9.04.01 SASR. OnDemand for Academics. SAS. Institute Inc. Cary, Carolina del Norte, EE.UU. Disponible en línea en: https://www.sas.com/es_mx/home.html?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_cam

paign=non-cbo-

cala&gclsrc=aw.ds&gad_source=1&gad_campaignid=22098935225&gbraid=0AAAAAD_W
ZgBpUQWYg7K8H-

6HKmRwl5PLK&gclid=CjwKCAjwqubPBhBOEiwAzgZX2uYERoVPmyUX3funpDyfDfhsDf3
gjKfXaMYZp9-7nPavvTeGY3thahoCmSUQAvD_BwE (Consultado Octubre 2026)

Stecher, G., Suleski, M., Tao, Q., Tamura, K., & Kumar, S. (2025). MEGA 12.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Cross-platform Release for macOS and Linux Operating Systems. *Journal of Molecular Evolution*, 102(1), 123-130 <https://doi.org/10.1007/s00239-025-10287-z>. Disponible en línea: <https://www.megasoftware.net/> (Consultado en Abril 2026).

Stecher, G., Suleski, M., Tao, Q., Tamura, K., & Kumar, S. (2025). MEGA 12.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Cross-platform Release for macOS and Linux Operating Systems. *Journal of Molecular Evolution*, 102(1), 123-130 <https://doi.org/10.1007/s00239-025-10287-z>. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/>

Stecher, G., Suleski, M., Tao, Q., Tamura, K., & Kumar, S. (2025). MEGA 12.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Cross-platform Release for macOS and Linux Operating Systems. *Journal of Molecular Evolution*, 102(1), 123-130 <https://doi.org/10.1007/s00239-025-10287-z>. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/>

Sun, Y., Quyen, T. L., Hung, T. Q., Chin, W. H., Wolff, A., & Bang, D. D. (2015). A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of *Salmonella spp.* in food samples. *Lab on a Chip*, 15(8), 1898-1904.

Sun, Y., Zhao, L., Zhao, M., Zhu, R., Deng, J., Wang, F., & Qian, Y. (2014). Four DNA extraction methods used in loop-mediated isothermal amplification for rapid adenovirus detection. *Journal of Virological Methods*, 204, 49-52.

Szulejko, J. E., Kim, K. H., Brown, R. J., & Bae, M. S. (2014). Review of progress in solvent-extraction techniques for the determination of polyaromatic hydrocarbons as airborne pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61, 40-48.

- Tang, M. J., Zhou, S., Zhang, X. Y., Pu, J. H., Ge, Q. L., Tang, X. J., & Gao, Y. S. (2011). Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated isothermal amplification. *Current Microbiology*, 63, 511-516.
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans Jr, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*, 58(2), 59-68.
- Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans Jr, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*, 58(2), 59-68.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882. doi:10.1038/nprot.2008.57
- Tomlinson, J. A., Boonham, N., & Dickinson, M. (2010). Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathology*, 59(3), 465-471.
- Torres, K., Piñales, R. P., Carrascal, A., Sierra, S., & Mercado, M. (2004). Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes de res y pollo. *Revista MVZ Córdoba*, 9(2), 414-427.
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., & Mercado, M. (2005). Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1), 511-543.
- Torres-Llanaez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, M. A., & González-Córdova, A. F. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food control*, 17(9), 683-690.
- Tumino, S., Tolone, M., Parco, A., Puleio, R., Arcoleo, G., Manno, C., & Loria, G. R. (2020). Validation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) field tool for rapid and sensitive diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. *Animals*, 10(3), 509.
- Umar, A., Rochman, N., Wan, T., Ahmadu, S., Anas, M., Sani, A., Y Atif, B. (2015). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), An Innovation in Gene Amplification: Bridging the Gap in Molecular Diagnostics; A Review. En: *Indian Journal of Science and Technology*. (8), 3-5.

- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297-313.
- Vallejo, P., Cilla, G., López-Olaizola, M., Vicente, D., & Marimón, J. M. (2022). Epidemiology and clinical features of listeriosis in Gipuzkoa, Spain, 2010–2020. *Frontiers in Microbiology*, 13, 894334.
- Vázquez-Boland, J., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft JGoebel, W. (2001). Pathogenicity Islands and Virulence Evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection*, 3, 571-584.
- Vázquez-Boland, J., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews Journal*; 14: 584-640.
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista chilena de infectología*, 30(4), 407-416.
- Villegas-Gante, A., & de la Huerta-Benítez, R. (2015). Naturaleza, evolución, contrastes e implicaciones de las imitaciones de quesos mexicanos genuinos. *Estudios Sociales*, 23(45), 213–236.
- Von Both, U., Otten, S., Darbouche, A., Domann, E., Chakraborty, T. (1999). Physical and Genetic Map of the *Listeria monocytogenes* EGD Serotype 1/2a Chromosome. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 281-289.
- Wachiralurpan, S., Sriyapai, T., Areekit, S., Kaewphinit, T., Sriyapai, P., Santiwatanakul, S., & Chansiri, K. (2017). Development of a rapid screening test for *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and lateral flow dipstick (LFD). *Food Analytical Methods*, 10, 3763-3772.
- Wang, D., Huo, G., Ren, D., & Li, Y. (2010). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detecting *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Journal of Food Safety*, 30(2), 251-262.
- Wang, D., Huo, G., Wang, F., Li, Y. and Ren, D. (2008). Drawback of loop-mediated isothermal amplification. *African Journal of Food Science* 2 083-086. Disponible en línea <http://www.academi-cjournals.org/ajfs>. (Consultado en Octubre 2024).

- Wang, L., Li, Y., Chu, J., Xu, Z., & Zhong, Q. (2012). Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains. *Molecular Biology Reports*, 39(1), 445-449. <http://doi.org/10.1007/s11033-011-0757-7>
- Wang, Y., Shi, Y., Hellinga, H. W., & Beese, L. S. (2023). Thermally controlled intein splicing of engineered DNA polymerases provides a robust and generalizable solution for accurate and sensitive molecular diagnostics. *Nucleic Acids Research*, 51(11), 5883-5894.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751.
- Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 56(1), 2-4.
- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., & Chee, H. Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626-643.
- Woo, P. C., Teng, J. L., Wu, J. K., Leung, F. P., Tse, H., Fung, A. M. & Yuen, K. Y. (2009). Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 58(8), 1030-1036.
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K., & Misawa, N. (2009). Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(6), 1597-1603.
- Yeni, O., Şen, M., Hasançebi, S., & Turgut Kara, N. (2024). Optimization of loop-mediated isothermal amplification assay for sunflower mildew disease detection. *Scientific Reports*, 14(1), 23224.
- Zhang, G., Brown, E. W., & González-Escalona, N. (2011). Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6495-6501.

- Zhang, Y., Odiwuor, N., Xiong, J., Sun, L., Nyaruaba, R. O., Wei, H., & Tanner, N. A. (2020). Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP. *MedRxiv*, 2020-02.
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 297-312.
- Zou, Y., Mason, M. G., & Botella, J. R. (2020). Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics. *PloS One*, 15(6), e0235216.