



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Caracterización de aislados de *L. monocytogenes* de  
diferentes industrias alimentarias por secuenciación de  
genoma completo (WGS)

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Barber Boronat, Jordi

Tutor/a: Leiva Brondo, Miguel

Cotutor/a externo: Sanz Puig, Maria

CURSO ACADÉMICO: 2025/2026

## RESUMEN

*Listeria monocytogenes* es un patógeno con gran importancia en la industria alimentaria debido a su capacidad para persistir en ambientes de procesado y contaminar alimentos listos para el consumo. Además, es capaz de causar listeriosis en humanos, una enfermedad poco frecuente, pero con una elevada mortalidad, especialmente en los grupos de población más vulnerables. Por ello, es muy importante caracterizar aislados de *L. monocytogenes* procedentes de distintos tipos de industrias alimentarias mediante la secuenciación de su genoma completo para estudiar su relación genética e identificar genes relacionados con resistencia antimicrobiana, tolerancia a biocidas, formación de biofilms y persistencia. En este proyecto se trabajó con 112 aislados de *L. monocytogenes* de distintos orígenes e industrias para identificar los tipos de secuencias (ST) predominantes, analizar la relación filogenética entre cepas y estudiar genes de interés presentes en sus genomas. Para lograrlo se realizó la extracción de ADN de las muestras, se secuenciaron mediante la tecnología de Oxford Nanopore Technologies y se usaron distintas herramientas bioinformáticas para analizar y comparar todos los genomas. Los análisis permitieron identificar los ST predominantes en los sectores estudiados y detectar genes de interés con una distribución variable entre los aislados. Gracias a los datos aportados en este trabajo, se concluyó que la relación genética entre los aislados estuvo más asociada con el ST que con su industria de procedencia. Sin embargo, sería conveniente ampliar el tamaño muestral y realizar análisis fenotípicos y/o transcriptómicos para determinar si la presencia de los genes identificados se corresponde con resistencia, tolerancia a biocidas, formación de biofilm o persistencia.

## PALABRAS CLAVE

Genómica, contaminación microbiológica, brote, patógenos, biobanco.

## RESUM

*Listeria monocytogenes* és un patògen amb gran importància en la indústria alimentària degut a la seua capacitat per a persistir en ambients de processat i contaminar aliments preparats per al consum. A més, és capaç de causar listeriosis en humans, una malaltia poc freqüent, però amb una elevada mortalitat, especialment en els grups de població més vulnerable. Per això, és molt important caracteritzar aïllaments de *L. monocytogenes* procedents de diversos tipus d'indústries alimentàries mitjançant la seqüenciació del seu genoma complet per a estudiar la seua relació genètica i identificar gens relacionats amb resistències antimicrobianes, tolerància a biocides, formació de biofilms i persistència. En aquest projecte es va treballar amb 112 aïllats de *L. monocytogenes* de diversos orígens i indústries per a identificar els tipus de seqüència (ST) predominants, analitzar la relació filogenètica entre les soques i estudiar gens d'interés presents als seus genomes. Per aconseguir-ho es va realitzar l'extracció de ADN de les mostres, es van seqüenciar mitjançant la tecnologia de Oxford Nanopore Technologies i s'utilitzaren diverses ferramentes bioinformàtiques per analitzar i comparar tots els genomes. Els anàlisis van permetre identificar els ST predominants als sectors estudiats i detectar gens d'interés amb una distribució variable entre els aïllats. Gràcies a les dades aportades en aquest treball, es va concloure que la relació genètica entre els aïllats va estar més associada amb el ST que amb la indústria de procedència. Però, seria convenient ampliar la mesura mostral i realitzar anàlisis fenotípics y/o transcriptòmics per a determinar si la presència dels gens identificats es correspon amb resistència, tolerància a biocides, formació de biofilms o persistència.

## PARAULES CLAU

Genòmica, contaminació microbiològica, brot, patògens, biobanc.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is a pathogen of great significance in the food industry due to its ability to persist in processing environments and contaminate ready-to-eat foods. Furthermore, it is capable of causing listeriosis in humans, a rare but highly fatal disease, particularly amongst the most vulnerable population groups. It is therefore very important to characterise *L. monocytogenes* isolates from different types of food industries by sequencing their whole genomes in order to study their genetic relationships and identify genes associated with antimicrobial resistance, biocide tolerance, biofilm formation and persistence. In this project, 112 isolates of *L. monocytogenes* from different sources and industries were analysed to identify the predominant sequence types (ST), analyse the phylogenetic relationships between strains and study genes of interest present in their genomes. To achieve this, DNA was extracted from the samples, sequenced using Oxford Nanopore Technologies, and various bioinformatics tools were employed to analyse and compare all the genomes. The analyses made it possible to identify the predominant STs in the sectors studied and to detect genes of interest with variable distribution amongst the isolates. Based on the data presented in this study, it was concluded that the genetic relationship between the isolates was more closely associated with the ST than with their industry of origin. However, it would be advisable to increase the sample size and carry out phenotypic analyses to determine whether the presence of the identified genes corresponds to resistance, tolerance to biocides, biofilm formation or persistence.

## KEYWORDS

Genomics, microbiological contamination, outbreak, pathogens, biobank.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero comenzar agradeciendo a mi tutora de la empresa, Maria Sanz Puig, su confiar en mí y el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo sobre un tema tan relevante. Su ayuda, experiencia y orientación han sido fundamentales para mi aprendizaje y para la realización del trabajo. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por la gran acogida, los momentos vividos y el apoyo recibido, que ha sido imprescindible para conseguir lograr los objetivos del trabajo y resolver las dificultades que se planteaban.

Quiero agradecerle a Miguel Leiva Brondo, mi tutor de la universidad, su gran disponibilidad, la rapidez y todo el tiempo dedicado a las correcciones que me han permitido mejorar este trabajo. Sus consejos han sido de gran utilidad durante todo el desarrollo del trabajo.

Quiero dar las gracias a mis amigos y compañeros de la universidad por haber hecho de estos cuatro años un periodo inolvidable para mí, tanto dentro como fuera de la universidad.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia por haber estado siempre ahí. Gracias por vuestra paciencia y apoyo.

## ÍNDICE

|      |                                                                                                                           |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.   | INTRODUCCIÓN .....                                                                                                        | 1  |
| 1.1. | Importancia de <i>Listeria monocytogenes</i> . Brotes y gravedad .....                                                    | 1  |
| 1.2. | Persistencia en la Industria Alimentaria.....                                                                             | 5  |
| 1.3. | Importancia de la Vigilancia.....                                                                                         | 7  |
| 1.4. | Nuevas Tecnologías de Vigilancia.....                                                                                     | 8  |
| 2.   | OBJETIVOS .....                                                                                                           | 12 |
| 3.   | MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                | 13 |
| 3.1. | Origen de los Aislados y Condiciones de Bioseguridad .....                                                                | 13 |
| 3.2. | Renovación de Cultivos .....                                                                                              | 13 |
| 3.3. | Extracción de ADN .....                                                                                                   | 13 |
| 3.4. | Cuantificación de ADN .....                                                                                               | 14 |
| 3.5. | Preparación de Librerías sin Amplificación por PCR .....                                                                  | 15 |
| 3.6. | Preparación de Librerías con Amplificación por PCR.....                                                                   | 15 |
| 3.7. | Secuenciación de las Librerías .....                                                                                      | 16 |
| 3.8. | Análisis Bioinformático .....                                                                                             | 17 |
| 4.   | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                                                                                               | 20 |
| 4.1. | Resultados de Secuenciación Genética.....                                                                                 | 20 |
| 4.2. | Distribución de ST por Industria .....                                                                                    | 20 |
| 4.3. | Análisis Filogenético Basado en el <i>Core Genome</i> .....                                                               | 22 |
| 4.4. | Distancias SNP entre Aislados.....                                                                                        | 23 |
| 4.5. | Genes Accesorios Asociados a la Industria .....                                                                           | 27 |
| 4.6. | Genes de Resistencia Antimicrobiana y Tolerancia a Biocidas.....                                                          | 28 |
| 4.7. | Genes Relacionados con la Formación de Biofilms y Persistencia.....                                                       | 30 |
| 4.8. | Biobanco Microbiano y Genómico.....                                                                                       | 32 |
| 5.   | CONCLUSIONES.....                                                                                                         | 34 |
| 6.   | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                                           | 36 |
|      | ANEJO I. Estadísticas de calidad individuales para todos los ensamblajes. ....                                            | 41 |
|      | ANEJO II. Árbol filogenético basado en el <i>core genome</i> según la industria de procedencia. ....                      | 44 |
|      | ANEJO III. Árbol filogenético basado en el <i>core genome</i> según el ST.....                                            | 45 |
|      | ANEJO IV. Mapa de calor de distancias SNP entre aislamientos ordenados según la industria de procedencia sin líneas. .... | 46 |
|      | ANEJO V. Mapa de calor de distancias SNP entre aislamientos ordenados según ST sin líneas. ....                           | 47 |
|      | ANEJO VI. Tabla completa de Scoary. ....                                                                                  | 48 |
|      | ANEJO VII. Catálogo resumido del biobanco microbiano y genómico. ....                                                     | 54 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Proceso de formación de un biofilm. ....                                                                                     | 6  |
| Figura 2. FLO-MIN114 de Oxford Nanopore Technologies. ....                                                                             | 16 |
| Figura 3. Árbol filogenético basado en el core genome de los aislados de <i>L. monocytogenes</i> con anotación de industria y ST. .... | 22 |
| Figura 4. Mapa de calor de distancias SNP entre aislados agrupados por clados genómicos y anotados según ST. ....                      | 24 |
| Figura 5. Mapa de calor de distancias SNP entre aislados ordenados según la industria de procedencia. ....                             | 25 |
| Figura 6. Mapa de calor de distancias SNP entre aislados ordenados según ST. ....                                                      | 25 |
| Figura 7. Matriz de distancias SNP entre tipos de secuencias (ST). ....                                                                | 26 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Estadísticas de calidad de los ensamblajes. ....                                           | 20 |
| Tabla 2. Distribución de tipos de secuencia (ST) por industria alimentaria. ....                    | 21 |
| Tabla 3. Resumen de distancias SNP entre aislados de <i>L. monocytogenes</i> . ....                 | 23 |
| Tabla 4. Genes accesorios asociados a industrias alimentarias según el análisis con Scoary. ....    | 27 |
| Tabla 5. Genes de resistencia antimicrobiana y tolerancia a biocidas detectados por industria. .... | 29 |
| Tabla 6. Genes relacionados con la formación de biofilms y persistencia detectados. ....            | 30 |

## Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

|                                                        | Alto | Medio | Bajo | No procede |
|--------------------------------------------------------|------|-------|------|------------|
| <b>ODS 1. Fin de la pobreza</b>                        |      |       |      | X          |
| <b>ODS 2. Hambre cero</b>                              |      | X     |      |            |
| <b>ODS 3. Salud y bienestar</b>                        | X    |       |      |            |
| <b>ODS 4. Educación de calidad</b>                     |      |       |      | X          |
| <b>ODS 5. Igualdad de género</b>                       |      |       |      | X          |
| <b>ODS 6. Agua limpia y saneamiento</b>                |      |       | X    |            |
| <b>ODS 7. Energía asequible y no contaminante</b>      |      |       |      | X          |
| <b>ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico</b>  |      | X     |      |            |
| <b>ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras</b> | X    |       |      |            |
| <b>ODS 10. Reducción de las desigualdades</b>          |      |       |      | X          |
| <b>ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles</b>      |      |       | X    |            |
| <b>ODS 12. Producción y consumo responsables</b>       | X    |       |      |            |
| <b>ODS 13. Acción por el clima</b>                     |      | X     |      |            |
| <b>ODS 14. Vida submarina</b>                          |      |       |      | X          |
| <b>ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres</b>          |      |       |      | X          |
| <b>ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas</b>   |      |       |      | X          |
| <b>ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.</b>         |      | X     |      |            |

El TFG se alinea con el ODS 3 (salud y bienestar) porque se basa en el estudio de un patógeno alimentario como es *Listeria monocytogenes* que produce la listeriosis. Esta enfermedad es poco común, pero tiene una elevada gravedad clínica. Para conocer mejor la diversidad genética de las cepas presentes en la industria alimentaria es necesario realizar la caracterización de aislados mediante secuenciación de genoma completo o whole genome sequencing (WGS). Esta tecnología también permite detectar características relacionadas con las resistencias, la virulencia y la adaptación a la industria. Toda esta información es de gran utilidad para mejorar la vigilancia epidemiológica y prevenir brotes alimentarios. De esta forma se contrinuye a garantizar la seguridad alimentaria de los productos, protegiendo sobre todo a los grupos de población más vulnerables.

El trabajo se relaciona con el ODS 9 (industria, innovación e infraestructuras) por el uso de la tecnología WGS sobre muestras procedentes de la industria alimentaria. Esta tecnología ofrece una mayor resolución en la identificación y comparación de cepas que los métodos clásicos para encontrar similitudes genéticas y genes relacionados con la virulencia, resistencia antimicrobiana, resistencia a biocidas o formación de biofilms. Esta aproximación incorpora innovación tecnológica al análisis microbiológico. Así se consigue mejorar la vigilancia, trazabilidad y control de contaminaciones persistentes o recurrentes.

El TFG también se asocia al ODS 12 (producción y consumo responsables), ya que se trata de un problema de seguridad alimentaria que favorece la contaminación cruzada, la retirada de productos, las pérdidas económicas y el riesgo sanitario para el consumidor. La caracterización genómica de aislados de diferentes sectores industriales permite conocer qué cepas están presentes, detectar posibles diferencias entre industrias y estudiar factores genéticos asociados a persistencia, resistencia o adaptación. Esta información puede servir de base para mejorar los programas de higiene, vigilancia ambiental y control preventivo, favoreciendo una producción alimentaria más segura y responsable.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Importancia de *Listeria monocytogenes*. Brotes y gravedad

*Listeria monocytogenes* (Murray, Webb & Swann) Pirie, es uno de los patógenos más relevantes en seguridad alimentaria por su transmisión a través de los alimentos y por la gravedad clínica de la listeriosis (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). Esta enfermedad es menos frecuente que otras infecciones alimentarias, como la salmonelosis y la campilobacteriosis (causadas principalmente por bacterias de los géneros *Salmonella* Lignières, y *Campylobacter* Sebal & Véron, respectivamente), pero presenta una elevada letalidad, situada habitualmente entre el 20% y el 30% (Finn et al., 2023). Su capacidad para mantenerse en el ambiente, contaminar alimentos durante o después del proceso de elaboración y multiplicarse en refrigeración explica su interés para las autoridades sanitarias y la industria alimentaria (Zhao et al., 2026).

Microbiológicamente, *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo y de pequeño tamaño (sus células tienen 0,4-0,5 µm de diámetro y 0,5-2,0 µm de longitud) (Unrath et al., 2021). Su material genético se caracteriza por un bajo contenido en GC (entre el 36% y el 42%) y forma parte del filo *Firmicutes* Gibbons & Murray (Unrath et al., 2021). Dentro de este filo, pertenece a la familia *Listeriaceae* y al género *Listeria* Pirie. En este género también se incluyen otras especies de interés, como *Listeria ivanovii* Seeliger et al., *Listeria innocua* Seeliger, *Listeria welshimeri* Rocourt & Grimont, *Listeria seeligeri* Rocourt & Grimont y *Listeria marthii* Graves et al. (Unrath et al., 2021). Crece en un amplio intervalo de temperatura (desde los 0 °C hasta los 45 °C) y pH (entre 4,3 y 9,6). También es capaz de soportar concentraciones de salinidad elevadas, como 10% de NaCl, o valores reducidos de actividad de agua cercanos a 0,9 (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). Su fisiología le permite adaptarse al estrés y sobrevivir en ambientes naturales, en alimentos y en superficies industriales. De esta forma, consigue mantenerse en la cadena alimentaria y en alimentos refrigerados, salados, ácidos o mínimamente procesados en condiciones que para otros microorganismos no son favorables (Unrath et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). Dado que se trata de un microorganismo psicrófilo, las temperaturas de refrigeración favorecen su multiplicación y sobrevive a temperaturas de congelación, pudiendo tener consecuencias graves para la seguridad alimentaria conociendo los métodos de conservación actuales (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023).

*Listeria monocytogenes* es una bacteria ubicua que se encuentra en suelo, agua, vegetación, animales, explotaciones ganaderas, materias primas, ambientes urbanos y plantas de procesamiento alimentario. Sin embargo, las prevalencias varían según la zona, la estación y el método de detección (Fagerlund, Idland, et al., 2022). La prevalencia en el suelo varía desde 0,7% hasta un 45% y en el agua de los ríos y lagos se sitúa entre el 10% y el 62% (Fagerlund, Idland, et al., 2022). Esta amplia distribución ambiental favorece su entrada en la cadena alimentaria y ayuda a explicar por qué resulta difícil garantizar su ausencia total en alimentos que no han sido sometidos a tratamientos letales para la bacteria (Fagerlund, Idland, et al., 2022; Unrath et al., 2021).

Desde el punto de vista genómico, *Listeria monocytogenes* presenta un genoma bacteriano pequeño y compacto de entre 2,8 y 3,2 Mbp. En un estudio basado en 322 aislados alimentarios, los genomas analizados presentaron entre 2748 y 3243 secuencias codificantes de proteínas, lo que refleja cierta variabilidad entre cepas (Ji et al., 2023). Su genoma se organiza en un cromosoma circular que contiene genes esenciales para el metabolismo, la multiplicación bacteriana y la

## 1. INTRODUCCIÓN

supervivencia, junto con regiones variables que pueden incluir islas genómicas, profagos, plásmidos y genes relacionados con virulencia, adaptación al estrés, tolerancia a biocidas o resistencia antimicrobiana (Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Mafuna et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). Tras la secuenciación, una cepa estudiada en Corea del Sur presentó un cromosoma circular de 2.933.635 pb, con 2913 genes, de los cuales 2824 correspondían a secuencias codificantes (Lee et al., 2023).

El desarrollo de las herramientas genómicas ha sido clave para lograr la taxonomía actual que organiza el género *Listeria* en 21 especies que se dividen en dos grandes grupos: *Listeria sensu stricto* y *Listeria sensu lato* (Unrath et al., 2021). La especie más relevante para la salud humana es *L. monocytogenes*, que pertenece al primer grupo. Esta clasificación es de gran utilidad porque permite situar a *L. monocytogenes* dentro de un contexto evolutivo más amplio y diferenciarla de especies con menor importancia clínica o alimentaria (Unrath et al., 2021). La propia especie de *L. monocytogenes* se divide a su vez en cuatro linajes evolutivos principales (I, II, III y IV), siendo los linajes I y II los más importantes en salud pública y seguridad alimentaria (Fagerlund, Idland, et al., 2022). El linaje I se relaciona con enfermedad humana y brotes e incluye los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e y 7, mientras que el linaje II está más presente en alimentos, materias primas y ambientes de procesado e incluye los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c (Ji et al., 2023; Mafuna et al., 2021). Pese a la gran cantidad de serotipos descritos, la mayoría de las infecciones humanas (más del 95%) se asocian a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b (Truchado et al., 2022).

Para estudiar con más precisión la población bacteriana se desarrolló una clasificación mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Esta técnica consiste en analizar siete genes constitutivos (*housekeeping*) para asignar un tipo de secuencia (*sequence type*) (ST) a cada aislado. Los ST relacionados se agrupan en complejos clonales (CC) (Stessl et al., 2021). Estos códigos representan distintos niveles de clasificación: el ST identifica un perfil genético concreto, mientras que el CC agrupa perfiles relacionados y, por tanto, indica un nivel más amplio de parentesco clonal. En estudios basados en secuenciación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) también pueden emplearse códigos de mayor resolución, como el *cluster type* (CT), obtenido mediante métodos como *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST). De esta forma se consigue diferenciar aislados muy próximos dentro de un mismo ST o CC. En estos sistemas de clasificación, los números que acompañan a cada código funcionan como identificadores de perfiles genéticos concretos, pero no tienen significado biológico por sí mismos sino que sirven para nombrar y comparar cepas de forma estandarizada (Fernández-Martínez et al., 2022; Wang et al., 2026).

Dentro del linaje I, los complejos clonales CC1, CC2, CC4 y CC6 se han asociado con hipervirulencia y mayor frecuencia a enfermedad humana. En el linaje II, destacan los complejos clonales CC9 y CC121 por aparecer de forma repetida en alimentos y plantas de procesado (Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Lucchini et al., 2023). Esto demuestra que no todas las cepas presentan el mismo comportamiento, ya que algunas se asocian más con el ambiente clínico y otras tienen mejor adaptación al industrial (Fagerlund, Idland, et al., 2022; Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Mafuna et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023).

En los productos listos para el consumo o *ready to eat* (RTE) es donde más preocupa la presencia de *Listeria monocytogenes* porque se consumen sin ninguna etapa posterior de tratamiento térmico que pueda eliminar el patógeno. Se incluyen carnes loncheadas, patés, productos cárnicos procesados, quesos blandos, pescados ahumados, ensaladas preparadas, vegetales congelados

consumidos sin cocción suficiente y hongos enoki (Lakicevic et al., 2023; Tessa et al., 2025; Zhao et al., 2026). En Estados Unidos, una evaluación de riesgo concluyó que el 90% de los casos de listeriosis se debían al consumo de carnes listas para el consumo y que el 60% de estos casos eran consecuencia de la contaminación durante la manipulación y el loncheado en establecimientos minoristas (Stasiewicz et al., 2015).

En Europa se ha descrito una tendencia ascendente de la listeriosis desde 2008, con la excepción de 2020, posiblemente influida por la infranotificación durante la pandemia del SARS-CoV-2. En España también se ha observado un aumento progresivo según los registros de hospitalización desde 1997, especialmente en personas mayores de 65 años, grupo en el que la tasa pasó de 0,5 casos por 100.000 habitantes en 1997 a casi 3 casos por 100.000 habitantes en 2015 (Fernández-Martínez et al., 2022). Los brotes de listeriosis muestran la dimensión real del problema. El brote de Sudáfrica de 2017 y 2018 es uno de los ejemplos más graves, demostrando que la contaminación persistente en una planta de producción tiene consecuencias muy graves cuando el alimento afectado se distribuye a gran escala (Lakicevic et al., 2023; Unrath et al., 2021). Este brote estuvo relacionado con productos cárnicos procesados listos para el consumo y causó 1060 casos confirmados y 216 muertes, con una letalidad aproximada del 27%. Después de realizar el análisis molecular se vio que el 91% de los casos estaban vinculados al ST6 (Lakicevic et al., 2023; Unrath et al., 2021). En España destaca el brote de listeriosis asociado a carne mechada en Andalucía en 2019, para el que se emitió la alerta sanitaria el 15 de agosto y se relacionó con el consumo de carne mechada de la marca “La Mechá” (Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2019). El brote ocurrió entre julio y octubre de 2019 y se identificaron 207 casos confirmados y 3059 casos probables de listeriosis. En Sevilla se dieron el 78,7% de los casos confirmados, hubo 3 muertes y un total de 141 pacientes (el 68,1%) hospitalizados. De las 34 mujeres embarazadas que estaban afectadas, 5 abortaron (Fernández-Martínez et al., 2022). El brote estuvo causado por una cepa que pertenece al serogrupo IVb y se clasifica como ST388, CC388 y CT8466 (estos códigos se corresponden con distintos niveles de tipado molecular dentro de la misma cepa). Otro aspecto relevante de este brote fue la gran utilidad que mostró el WGS, ya que permitió confirmar que la cepa responsable del brote estaba presente en 189 muestras humanas y en 87 relacionadas con la investigación (Fernández-Martínez et al., 2022).

Los brotes no ocurren únicamente en productos cárnicos. En los últimos años ha aumentado la preocupación por vegetales congelados y hongos enoki como vehículos de *Listeria monocytogenes* (Truchado et al., 2022; Zhao et al., 2026). En Inglaterra se ha observado que alrededor del 10% de los vegetales congelados analizados en restauración y establecimientos minoristas estaban contaminados con esta bacteria (Tessa et al., 2025). En relación con los hongos enoki, un estudio realizado en China analizó 144 cepas procedentes de productos comercializados en 24 provincias. Los aislados pertenecían a los linajes I y II, y los complejos clonales predominantes fueron CC8, CC87, CC14 y CC5. El 81,9% de los aislados se clasificaron como virulentos o hipervirulentos (Zhao et al., 2026). El mismo trabajo recoge datos de la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos con tasas de contaminación del 43% en hongos enoki importados de Corea del Sur y del 15% en productos procedentes de China entre 2021 y 2023 (Zhao et al., 2026). En Europa, un brote multinacional relacionado con maíz y otros vegetales congelados entre 2015 y 2018 causó 53 casos y 10 muertes, y se relacionó con una planta de procesamiento en Hungría (Truchado et al., 2022). Este caso muestra que la congelación no elimina el riesgo de contaminación.

## 1. INTRODUCCIÓN

La listeriosis se presenta como una infección gastrointestinal leve en personas sanas, con síntomas como fiebre, diarrea, náuseas, vómitos y malestar general. Sin embargo, en población vulnerable evoluciona hacia formas invasivas graves (Lecuit, 2020; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). En estos casos, *Listeria monocytogenes* puede atravesar la barrera intestinal, diseminarse por vía sanguínea y alcanzar órganos o tejidos como el sistema nervioso central o la placenta. Las manifestaciones clínicas más importantes incluyen septicemia, meningitis, encefalitis, meningoencefalitis e infecciones materno-fetales (Lecuit, 2020; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). En mujeres embarazadas, la infección puede cursar con síntomas leves en la madre, pero producir efectos graves en el feto, como aborto, muerte fetal, parto prematuro o infección neonatal (Finn et al., 2023). Los principales grupos de riesgo son mujeres embarazadas, recién nacidos, personas mayores y pacientes inmunodeprimidos. Un estudio realizado por Zhao en 2026 recoge una tasa de 0,66 casos por 100.000 habitantes en la UE y 0,28 por 100.000 en la población general estadounidense. Esta cifra asciende a 3,73 por 100.000 en embarazadas y a 1,33 por 100.000 en mayores de 70 años (Zhao et al., 2026). *L. monocytogenes* es un patógeno de alto impacto por sus cifras de hospitalización y mortalidad, que se sitúan en el 94,1% y el 22,1%, respectivamente (Zhao et al., 2026), significativamente superiores a las cifras de otras zoonosis comunes como las de *Salmonella* (26,9% de hospitalización y 0,7% de mortalidad) o *Campylobacter* (19,9% de hospitalización y 0,4% de mortalidad) (Zhao et al., 2026). Según informes oficiales europeos, en 2024 *L. monocytogenes* fue la zoonosis con mayor porcentaje de hospitalizaciones (97,3%) y muertes (15,6%) tanto en casos asociados a brotes como en infecciones no relacionadas con brotes (EFSA & ECDC, 2025). La listeriosis también genera un impacto económico importante. A los costes sanitarios derivados de la hospitalización y del tratamiento de los pacientes se suman las pérdidas asociadas a la contaminación persistente de productos y ambientes de procesado (Finn et al., 2023). En la industria alimentaria, la presencia de *L. monocytogenes* puede obligar a retirar productos del mercado, paralizar líneas de producción, cerrar instalaciones de forma temporal y asumir pérdidas comerciales y reputacionales. Se ha estimado que las retiradas de productos asociadas a *L. monocytogenes* suponen en Estados Unidos un coste anual de entre 1,2 y 2,4 mil millones de dólares, mientras que el coste anual de la enfermedad se ha estimado en 2,6 mil millones de dólares (Finn et al., 2023; Stasiewicz et al., 2015).

La capacidad patógena de *Listeria monocytogenes* se basa, en gran parte, en su habilidad para entrar en las células del hospedador, sobrevivir en su interior y propagarse directamente hacia células vecinas (Lecuit, 2020; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). En las primeras fases de la infección, las internalinas InlA e InlB favorecen la adhesión y la invasión de células no fagocíticas. Tras la entrada celular, la bacteria consigue escapar del fagosoma mediante la acción de la listeriolisina O, codificada por el gen *hly*, y de fosfolipasas como PlcA y PlcB. Una vez libre en el citoplasma, puede multiplicarse y emplear la proteína ActA para inducir la polimerización de actina, lo que le permite desplazarse dentro de la célula y extenderse a células adyacentes (Schiavano et al., 2022; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). Esta estrategia limita la exposición extracelular del patógeno y dificulta su eliminación por mecanismos humorales. Muchos de estos genes se organizan en islas de patogenicidad: LIPI-1 contiene genes esenciales para el ciclo intracelular, como *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*, LIPI-3 codifica la listeriolisina S y LIPI-4 se ha asociado con clones hipervirulentos y con infecciones del sistema nervioso central y de la placenta (Mafuna et al., 2021; Schiavano et al., 2022; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023).

Este comportamiento intracelular condiciona la respuesta del huésped, ya que tras atravesar la barrera intestinal la bacteria alcanza órganos como el hígado, donde intervienen macrófagos y se reclutan monocitos como parte de la respuesta inflamatoria (Lecuit, 2020).

El tratamiento de la listeriosis invasiva se basa habitualmente en antibióticos  $\beta$ -lactámicos, especialmente ampicilina, penicilina o amoxicilina, a menudo combinados con gentamicina en casos graves (Manqele et al., 2024; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). En pacientes alérgicos a  $\beta$ -lactámicos, el trimetoprim se considera una alternativa terapéutica (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). En un estudio con 24 aislados de carne y productos cárnicos, todos los STs portaban genes intrínsecos como *fosX*, *lin*, *norB* y *mprF*, relacionados con resistencia a fosfomicina, lincosamidas, quinolonas y péptidos catiónicos. Sin embargo, no se detectaron genes de resistencia frente a los antibióticos de primera línea empleados para tratar la listeriosis (Manqele et al., 2024).

La eficacia del tratamiento depende, en gran parte, de que la enfermedad se identifique pronto y de que el antibiótico elegido sea el correcto desde el primer momento. En un estudio con 229 pacientes con bacteriemia o meningitis por *Listeria monocytogenes*, la mortalidad a los 30 días fue del 39,7% en los pacientes que recibieron un tratamiento inadecuado y del 13,3% en los tratados de forma adecuada desde el principio (Thønnings et al., 2016). En otro estudio más reciente, la terapia combinada con gentamicina se asoció a una menor mortalidad a 90 días, con un 10% en el grupo tratado con gentamicina frente al 60% en el grupo tratado con monoterapia (Sutter et al., 2024). El retraso en el diagnóstico o una elección inicial incorrecta del antibiótico empeoran el pronóstico, mientras que el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado aumentan las posibilidades de una evolución favorable.

### 1.2. Persistencia en la Industria Alimentaria

La persistencia de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria es uno de los principales desafíos para su control. Se considera persistencia la detección repetida de una misma cepa, o de cepas genéticamente muy relacionadas, en una instalación durante meses o años (Fagerlund, Wagner, et al., 2022). Esta situación puede deberse a la supervivencia real del microorganismo en un nicho ambiental, pero también a reintroducciones repetidas desde materias primas, proveedores, personal, utensilios o zonas externas. Conviene distinguir entre ambas posibilidades, ya que si se trata de una cepa residente la estrategia óptima a seguir pasa por localizarla y eliminar el reservorio dentro de la planta, mientras que en una reintroducción recurrente la clave recae en revisar flujos, proveedores, barreras higiénicas y puntos de entrada (Bardsley et al., 2024; Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Stasiewicz et al., 2015).

La capacidad de supervivencia de *Listeria monocytogenes* se debe a su tolerancia al estrés ambiental, pudiendo resistir frío, salinidad, pH ácido o alcalino, desecación y exposición a determinados biocidas. También posee una serie de genes de respuesta al estrés que favorecen su adaptación a condiciones subóptimas (Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). Estas características son especialmente importantes en plantas alimentarias, donde hay zonas frías, superficies húmedas, restos orgánicos, equipos difíciles de desmontar y gradientes de concentración de desinfectantes. Por ello, si la limpieza y desinfección no elimina completamente la materia orgánica y la contaminación microbiana o no alcanza determinados nichos, la bacteria puede sobrevivir y volver a contaminar el ambiente (Finn et al., 2023; Unrath et al., 2021).

## 1. INTRODUCCIÓN

Resulta de gran utilidad diferenciar entre cepas transitorias, residentes y pervasivas. Las cepas transitorias aparecen de forma puntual y suelen desaparecer tras la limpieza y desinfección, las residentes se detectan repetidamente en la misma instalación durante meses o años y las pervasivas aparecen en distintas plantas o sectores, lo que puede reflejar clones especialmente adaptados o diseminación a través de materias primas y cadenas de suministro. Esta diferenciación es importante porque una contaminación puntual no se controla igual que una cepa establecida en una instalación (Bardsley et al., 2024; Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Stasiewicz et al., 2015; Tessa et al., 2025).

La persistencia en entornos de producción alimentaria se ve favorecida, entre otros aspectos, por la capacidad que tiene *Listeria monocytogenes* de formar biofilms (Finn et al., 2023; Unrath et al., 2021). Estos no son siempre visibles y pueden formarse sobre materiales como acero inoxidable, plástico, vidrio, caucho o superficies de equipos. Un biofilm es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y rodeados por una matriz extracelular que los protege frente a condiciones adversas, desinfectantes y tratamientos antimicrobianos (Finn et al., 2023). La matriz extracelular puede contener ADN extracelular, proteínas, exopolisacáridos y ácidos teicoicos (Finn et al., 2023). En condiciones reales, los biofilms suelen ser comunidades mixtas donde *L. monocytogenes* convive con otros microorganismos. Esta convivencia modifica la estructura de la matriz y aumenta la tolerancia frente a desinfectantes o desecación. El proceso de formación de un biofilm consta de distintas etapas (Figura 1). Se inicia con una adhesión, que puede ser reversible en la fase más inicial, y progresa hacia una unión más estable, volviéndose irreversible. A continuación, se forman microcolonias, las bacterias se organizan para formar la matriz extracelular y el biofilm crece de forma vertical hasta convertirse en un biofilm maduro. Finalmente, a partir de un biofilm maduro, pueden liberarse pequeños fragmentos que pueden contaminar el propio alimento o colonizar otras superficies empezando de nuevo el proceso (Finn et al., 2023).

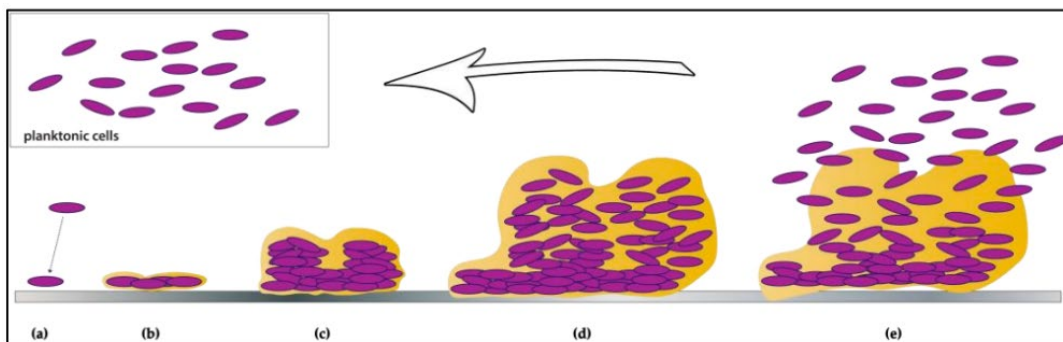


Figura 1. Proceso de formación de un biofilm.

Nota: (a) Adhesión inicial. (b) La adhesión se vuelve más fuerte e irreversible. (c) Formación de microcolonias. (d) Biofilm maduro. (e) Algunas células se dispersan, vuelven al estado planctónico y pueden colonizar nuevas superficies. (Finn et al., 2023).

Sin embargo, la formación de un biofilm no implica necesariamente que una cepa sea persistente, ya que, aunque algunos estudios han observado una mayor formación de biofilm en cepas persistentes, hay otros que no encuentran diferencias claras frente a cepas transitorias (Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Unrath et al., 2021). La persistencia debe entenderse como un fenómeno multifactorial en el que intervienen la cepa, la presencia de genes de respuesta al estrés, la tolerancia a biocidas, los plásmidos, la humedad, la materia orgánica, el diseño de la planta y la eficacia de la limpieza y desinfección (Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Mafuna et al., 2021).

## 1. INTRODUCCIÓN

En cuanto a la tolerancia a desinfectantes, se han descrito genes, como *bcrABC*, *qacH*, *emrE*, *mdrL* o *lde*, asociados a resistencia frente a compuestos de amonio cuaternario (Mafuna et al., 2021; Manqele et al., 2024). En un estudio con 143 aislados, *bcrABC* apareció en 55 de ellos, un 38%, y *ermC*, en 58 de ellos, un 40% (Mafuna et al., 2021). Esto no significa que los desinfectantes sean ineficaces, pero sí que su aplicación incorrecta, las concentraciones subletales o la presencia de biofilms favorecen la supervivencia de clones adaptados.

Los reservorios industriales más frecuentes suelen localizarse en zonas húmedas, frías o difíciles de higienizar, como drenajes, suelos, cintas transportadoras, cortadoras, cámaras frigoríficas, túneles de congelación, ruedas de carros, carretillas elevadoras, calzado del personal y utensilios de limpieza (Bardsley et al., 2024; Tessa et al., 2025). Por ello, la contaminación afecta a superficies de contacto directo y también a puntos periféricos de la planta que actúan como fuentes recurrentes de contaminación. Según el estudio realizado por Tessa en 2025, en una planta de patata congelada, la mayoría de los aislados de *L. monocytogenes* formaban un mismo clúster por cgMLST. Este resultado apoyaba una persistencia de al menos tres años en torno al túnel de congelación. El estudio señaló como posibles vehículos de transmisión el calzado de los empleados y las ruedas de un carro de herramientas (Tessa et al., 2025).

Esta persistencia también se relaciona con determinados clones adaptados al ambiente industrial. Por ejemplo, en el sistema alimentario noruego, un estudio de tres décadas en industrias cárnicas y de salmón mostró una amplia presencia de clones persistentes y pervasivos, especialmente CC121, CC7, CC8 y CC9. Estos clones se asociaron con plásmidos y determinantes relacionados con la resistencia a metales pesados, biocidas y otros mecanismos de supervivencia al estrés (Fagerlund, Wagner, et al., 2022).

La persistencia de *Listeria monocytogenes* tiene consecuencias directas para la industria alimentaria, ya que favorece la contaminación cruzada entre lotes y provoca retiradas de producto, aumento de costes analíticos, limpiezas extraordinarias, paradas de producción, modificaciones en equipos y pérdida de confianza del consumidor (Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Stasiewicz et al., 2015). La detección repetida de *Listeria* spp. en una instalación también afecta a la reputación de la empresa, especialmente si se asocia a fallos de control o a un brote alimentario (Finn et al., 2023).

### 1.3. Importancia de la Vigilancia

La vigilancia microbiológica es esencial para controlar *Listeria monocytogenes* en la cadena alimentaria (Bardsley et al., 2024; Lakicevic et al., 2023; Stasiewicz et al., 2015). Su función es detectar la presencia del patógeno y comprender dónde aparece, con qué frecuencia, qué cepas están implicadas y qué relación existe entre aislados de distintos puntos. En este caso, analizar solo el producto final resulta insuficiente, ya que un resultado negativo en un lote no descarta la presencia de un reservorio ambiental en la planta capaz de contaminar productos posteriores. Por este motivo, los programas de vigilancia deben incluir tanto muestreos de producto como muestreos ambientales (Bardsley et al., 2024; Lakicevic et al., 2023; Lucchini et al., 2023; Manqele et al., 2024; Stasiewicz et al., 2015).

En la industria alimentaria, es importante muestrear superficies de contacto directo con alimentos, como cintas, mesas, cuchillas o cortadoras, pero también superficies sin contacto directo con alimentos, como suelos, drenajes, ruedas, cámaras y zonas húmedas. Los resultados de los análisis deben interpretarse junto con información sobre limpieza y desinfección, mantenimiento, diseño

de equipos, flujos de personal, historial de positivos y proveedores. Un positivo aislado no tiene el mismo significado ni gravedad que un patrón repetido en el mismo punto o con la misma cepa (Bardsley et al., 2024; Lucchini et al., 2023; Stasiewicz et al., 2015; Tessa et al., 2025; Truchado et al., 2022).

La vigilancia epidemiológica complementa la vigilancia industrial. En el momento que aparece un brote es necesario relacionar casos humanos con alimentos, lotes, plantas de procesamiento y aislados ambientales (Lakicevic et al., 2023; Stasiewicz et al., 2015). Para ello se combinan información epidemiológica, trazabilidad, análisis microbiológicos y comparación molecular de cepas. En listeriosis, esta investigación suele ser especialmente compleja, porque el periodo de incubación es largo y los casos aparecen separados en el tiempo y en el espacio. Por este motivo, las herramientas genómicas han adquirido un papel central, ya que este tipo de herramientas son clave para obtener datos epidemiológicos (Lakicevic et al., 2023; Lüth et al., 2021; Stasiewicz et al., 2015).

El control de *Listeria monocytogenes* se apoya en un marco normativo europeo basado en la responsabilidad del operador, la trazabilidad, la higiene alimentaria y los procedimientos de autocontrol. El Reglamento (CE) nº 178/2002 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2002) establece los principios generales de la legislación alimentaria y la trazabilidad, mientras que el Reglamento (CE) nº 853/2004 (Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea, 2004) exige la aplicación de procedimientos basados en el APPCC. Por su parte, el Reglamento (CE) nº 2073/2005 (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005) fija los criterios microbiológicos aplicables a los alimentos, incluyendo criterios específicos para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Este último ha sido reforzado por el Reglamento (UE) 2024/2895 (Comisión Europea, 2024), que modifica el criterio aplicable a productos RTE capaces de favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* y desplaza la atención hacia el cumplimiento del límite de 100 ufc/g durante toda la vida útil del alimento.

El cambio más relevante para este trabajo es el Reglamento de Ejecución (UE) 2025/179 (Comisión Europea, 2025), aplicable a partir del 23 de agosto de 2026, ya que introduce la recogida, secuenciación y transmisión de datos moleculares en investigaciones de brotes de transmisión alimentaria. Este reglamento contempla la secuenciación del genoma completo de aislados de patógenos alimentarios asociados o sospechosos de estar asociados a brotes, entre ellos *Listeria monocytogenes*. Cuando estén disponibles y la autoridad competente lo solicite, los operadores alimentarios deberán aportar los aislados o los resultados de WGS generados en sus propias investigaciones. Por ello, existe un interés creciente por parte de las industrias alimentarias en caracterizar las cepas de *L. monocytogenes* presentes en sus propias plantas. Conocer esta diversidad genética permite identificar fuentes habituales de contaminación, diferenciar cepas residentes de contaminaciones puntuales y mejorar los protocolos de higiene, vigilancia ambiental y control preventivo.

### 1.4. Nuevas Tecnologías de Vigilancia

La vigilancia de *Listeria monocytogenes* ha evolucionado desde métodos fenotípicos y técnicas moleculares de menor resolución hacia enfoques genómicos. Inicialmente, el serotipado permitió clasificar aislados mediante antígenos somáticos y flagelares. Aunque sigue siendo útil para una primera aproximación, su capacidad discriminatoria es limitada, ya que dos cepas del mismo serotipo pueden ser genéticamente muy diferentes (Lakicevic et al., 2023; Stessl et al., 2021).

## 1. INTRODUCCIÓN

La electroforesis en gel de campo pulsado o *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) fue durante años una técnica de referencia en vigilancia molecular. Esta consiste en digerir el ADN bacteriano con enzimas de restricción y separar fragmentos grandes mediante un campo eléctrico que cambia de dirección. El resultado es un patrón de bandas que funciona como una huella molecular. La PFGE fue útil para comparar aislados y detectar agrupaciones. Sin embargo, esta técnica presenta una serie de limitaciones, ya que requiere una ejecución técnica cuidadosa, tiene problemas de reproducibilidad entre laboratorios y no siempre distingue cepas estrechamente relacionadas (Lakicevic et al., 2023; Stessl et al., 2021).

El tipado de secuencias multilocus o *multilocus sequence typing* (MLST) supuso un avance importante porque se basa en secuencias de genes *housekeeping*. En *Listeria monocytogenes*, el esquema clásico analiza siete genes de entre 399 y 537 pares de bases (Stessl et al., 2021). A cada combinación de alelos se le asigna un *sequence type* y los que están relacionados se agrupan en complejos clonales. Este método mejoró la comparabilidad entre laboratorios y permitió estudiar la estructura poblacional de la especie. Sin embargo, al analizar solo siete genes, no siempre tiene suficiente resolución para investigar brotes complejos o diferenciar persistencia de reintroducción en una planta industrial (Stasiewicz et al., 2015; Stessl et al., 2021).

La aparición de la secuenciación de nueva generación cambió este escenario. Este avance dio lugar a distintas plataformas de secuenciación, entre las que destacan Illumina, Oxford Nanopore Technologies (ONT) y Pacific Biosciences (PacBio). Todas ellas permiten obtener información genómica a gran escala, pero su fundamento técnico es diferente. Illumina se basa en la secuenciación por síntesis de fragmentos cortos de ADN, generando lecturas cortas y muy precisas. PacBio secuencia moléculas individuales de ADN en tiempo real y produce lecturas largas. ONT detecta los cambios de corriente eléctrica que se producen cuando una molécula de ADN atraviesa un nanoporo, lo que permite obtener lecturas largas en tiempo real mediante dispositivos portátiles como MinION, empleado en este trabajo (Biggel et al., 2024; Luan et al., 2024). Estas diferencias influyen en la precisión, el coste, el tiempo de análisis, la portabilidad y la capacidad para cerrar genomas o resolver plásmidos y regiones repetitivas (Biggel et al., 2024; Luan et al., 2024).

Las tecnologías de secuenciación de genoma completo o *whole genome sequencing* (WGS) permiten secuenciar grandes cantidades de ADN de forma rápida y a un coste cada vez menor. Aplicadas a patógenos alimentarios, permiten estudiar el genoma completo de los aislados y compararlos con una resolución mucho mayor que los métodos tradicionales. Actualmente es posible analizar simultáneamente el parentesco genómico, los genes de virulencia, los genes de resistencia, la tolerancia al estrés, los plásmidos, los profagos y las islas genómicas (Lakicevic et al., 2023; Stessl et al., 2021; Unrath et al., 2021). Esta tecnología se ha consolidado como una herramienta central para la vigilancia de *Listeria monocytogenes* y sus ventajas son claras: mayor resolución que PFGE y MLST, posibilidad de comparar aislados a escala internacional, identificación de genes relevantes y apoyo a la investigación de brotes (Lakicevic et al., 2023; Lüth et al., 2021; Stessl et al., 2021). El WGS permite saber si dos aislados son próximos o si solo comparten un serotipo o ST frecuente. También permite reconstruir rutas de transmisión dentro de una planta, identificar reservorios y diferenciar cepas residentes de contaminaciones transitorias (Bardsley et al., 2024; Lakicevic et al., 2023; Stasiewicz et al., 2015; Unrath et al., 2021).

El flujo de trabajo del WGS comienza con la obtención de ADN bacteriano de calidad a partir de un cultivo puro. Después se preparan las librerías y se secuencia el material genético en plataformas

como Illumina, Oxford Nanopore o PacBio (Biggel et al., 2024; Luan et al., 2024; Stessl et al., 2021). Illumina genera lecturas cortas con alta precisión y se emplea de forma habitual en vigilancia rutinaria. Oxford Nanopore y PacBio producen lecturas largas, útiles para cerrar genomas, resolver plásmidos y estudiar regiones repetitivas. La elección de la plataforma de secuenciación depende del objetivo del estudio, del coste, del tiempo disponible y de la infraestructura bioinformática, teniendo cada una ventajas y limitaciones (Biggel et al., 2024; Luan et al., 2024). Tras la secuenciación, los datos deben someterse a un control de calidad, ensamblaje o mapeo, anotación y análisis comparativo. Este análisis bioinformático es crítico, ya que un genoma de mala calidad, una referencia inadecuada o criterios de filtrado distintos afectan a la interpretación (Biggel et al., 2024; Luan et al., 2024; Stessl et al., 2021). Por tanto, la estandarización es uno de los grandes retos pendientes de la vigilancia genómica, sobre todo en brotes multinacionales donde los datos proceden de distintos laboratorios y deben compararse de forma fiable (Lakicevic et al., 2023; Lüth et al., 2021).

Entre los métodos de comparación genómica destacan el tipado de secuencias multilocus del genoma núcleo o *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST), el tipado de secuencias multilocus del genoma completo o *whole genome multilocus sequence typing* (wgMLST) y el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido o *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) (Lakicevic et al., 2023; Lüth et al., 2021). El cgMLST compara alelos de genes conservados del genoma núcleo, mientras que el wgMLST amplía el análisis al conjunto del genoma (incluyendo también genes accesorios). El wgMLST puede aportar mayor resolución en determinados estudios epidemiológicos, aunque también puede ser más sensible a diferencias en la calidad del ensamblaje, la anotación y el esquema usado (Angelo et al., 2017; Lakicevic et al., 2023). En *Listeria monocytogenes*, se han propuesto distintos esquemas de cgMLST, entre ellos el de Ruppitsch, basado en 1.701 loci, y el del Institut Pasteur/Moura, basado en 1.748 loci. Para estos esquemas se han propuesto umbrales de  $\leq 10$  alelos y  $\leq 7$  alelos, respectivamente, en el contexto de agrupaciones relacionadas con brotes (Lakicevic et al., 2023). La correlación entre esquemas cgMLST es muy elevada, con valores entre 0,97 y 1,0 (Lüth et al., 2021), lo que facilita la comparación de resultados entre laboratorios cuando los análisis están armonizados. El análisis de SNPs ofrece una resolución mayor, pero depende mucho del genoma de referencia y del flujo bioinformático utilizado. En un estudio con 494 aislados de *Listeria monocytogenes*, el uso de un genoma de referencia específico permitió detectar hasta 3,9 veces más diferencias genéticas que el uso de una referencia general (Lüth et al., 2021). Esto demuestra que la elección del método modifica la interpretación de la distancia genética. Es por esto que los umbrales deben manejarse con cautela y siempre interpretarse junto con el contexto epidemiológico, temporal y ambiental (Stasiewicz et al., 2015; Wang et al., 2026).

El WGS identifica determinantes genéticos relacionados con virulencia, resistencia y adaptación ambiental. En el estudio mencionado anteriormente de hongos enoki, la clasificación basada en LIPI-1 a LIPI-4 e inIA permitió clasificar el 81,9% de los aislados como virulentos o hipervirulentos (Zhao et al., 2026). En el estudio de Corea del Sur, la cepa del brote portaba 64 genes de virulencia (Lee et al., 2023). Otros estudios de caracterización genómica han identificado determinantes asociados a la tolerancia a biocidas, la adaptación al estrés osmótico y ácido, la resistencia a metales pesados y la resistencia antimicrobiana (Ji et al., 2023; Mafuna et al., 2021; Mangele et al., 2024). Por tanto, el WGS sirve, entre otros, para comparar cepas y para valorar su potencial de supervivencia en la cadena alimentaria.

## 1. INTRODUCCIÓN

El WGS no sustituye a la epidemiología clásica porque dos aislados muy próximos genómicamente pueden proceder de una fuente común, pero también de un clon ampliamente distribuido. Una cepa persistente también es capaz de acumular pequeñas diferencias con el tiempo. Por eso, los datos genómicos deben interpretarse junto con fechas, lugares, lotes, rutas de producción, proveedores, historial de limpieza y desinfección y resultados ambientales. La secuenciación aporta resolución, pero la interpretación siempre necesita contexto en forma de metadatos (Lakicevic et al., 2023; Lüth et al., 2021; Stasiewicz et al., 2015).

La estandarización de los análisis también condiciona la comparación entre laboratorios. Diferentes laboratorios suelen emplear esquemas cgMLST distintos, genomas de referencia diferentes, programas de ensamblaje diversos o criterios de filtrado no equivalentes, lo que afecta a los resultados. La posibilidad de comparar datos entre métodos facilita el intercambio de información y reduce la necesidad de repetir análisis completos, algo especialmente importante en brotes suprarregionales o internacionales. Por esta razón, la estandarización de los análisis resulta necesaria (Lüth et al., 2021).

Esta nueva aproximación en la vigilancia alimentaria tiene una importancia directa en la industria. Con la entrada en vigor del Reglamento de Ejecución (UE) 2025/179, será cada vez más útil disponer de información propia sobre los aislados de *Listeria monocytogenes* presentes en las plantas de producción. Caracterizar las cepas de *L. monocytogenes* propias de cada instalación será clave para identificar las posibles fuentes de contaminación habituales, detectar posibles contaminaciones puntuales y optimizar los protocolos de higiene. También puede servir como apoyo en estudios posteriores de trazabilidad. Este trabajo se centra en la obtención y caracterización genómica de aislados industriales de *L. monocytogenes*, con el fin de aportar información sobre su diversidad y sobre genes de interés relacionados con virulencia, resistencia y adaptación al ambiente de procesado.

## 2. OBJETIVOS

- Identificar cepas de *Listeria monocytogenes* vía secuenciación de genoma completo (WGS) predominantes en cada sector de la industria alimentaria, a partir de aislados.
- Comparar distintas cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en cuanto a diferencias genómicas y distancia filogenética.
- Caracterizar genes de interés en los genomas de cada una de las cepas de *Listeria monocytogenes*.
- Generar un biobanco de genomas de *Listeria monocytogenes* según el tipo de industria alimentaria.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Origen de los Aislados y Condiciones de Bioseguridad

Las muestras procedían de industrias alimentarias externas de diferentes sectores: láctea, cárnica, pesquera, avícola, hortofrutícola, heladera y panadera/repostera. Estas muestras fueron remitidas para el análisis de una posible presencia de *Listeria monocytogenes*. Las que dieron positivo en PCR se confirmaron después en placa, para lo cual se usó el COMPASS® *Listeria* Agar (Biokar Diagnostics, n.d.) como medio cromogénico selectivo y diferencial para la detección de *L. monocytogenes*. Su formulación combina nutrientes, factores de crecimiento, sustratos cromogénicos y componentes selectivos que favorecen el crecimiento de *Listeria* spp. Para confirmar que se trataba de *L. monocytogenes*, las colonias tenían que verse de color azul verdoso y rodeadas por un halo opaco.

El estudio se centró únicamente en aislados positivos confirmados de *Listeria monocytogenes* y no se incluyó ninguna muestra negativa, ya que el objetivo no fue evaluar la presencia o ausencia del microorganismo en las industrias, sino caracterizar genómicamente las cepas disponibles. Se analizaron 112 aislados de *L. monocytogenes*, distribuidos entre industria láctea (37), cárnica (28), pesquera (20), avícola (15), hortofrutícola (9), heladera (2) y panadera/repostera (1), para poder comparar aislados procedentes de distintos sectores alimentarios y estudiar si la variabilidad genómica observada estaba relacionada con la industria de origen, el ST, los clados filogenéticos o la presencia de genes de interés.

Todos los trabajos de manipulación de los aislados de *Listeria monocytogenes* se realizaron en cabina de bioseguridad tipo II, empleando material estéril y siguiendo las normas habituales de bioseguridad para microorganismos de grupo de riesgo 2, de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 664/1997 (Ministerio de la Presidencia, 1997).

#### 3.2. Renovación de Cultivos

Una vez seleccionados los aislados, las colonias confirmadas se incubaron en tubos Eppendorf con 1 mL de caldo LEB, empleado como medio de enriquecimiento selectivo para *Listeria* spp. Este medio está compuesto por peptona, extracto de levadura, cloruro de litio, citrato férrico amónico, cloruro sódico, polimixina y antimicrobianos quinolónicos (Oxoid, n.d.).

Para renovar los cultivos, se centrifugaron a 8.000 g en una centrífuga Digicen 21R (Orto Alresa, n.d.) durante 3 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en un tubo Falcon con 5 ml de LEB. Después se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Esto se hizo para aumentar la biomasa bacteriana disponible y conseguir una cantidad suficiente para la posterior extracción de ADN.

#### 3.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó con el zymoBIOMICS™ DNA miniprep kit (Zymo Research, 2023). Así se pudo obtener el ADN microbiano purificado y libre de inhibidores para aplicaciones posteriores (PCR o secuenciación).

Se centrifugaron los tubos Falcon a 5.000 g durante 5 minutos, después se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 750 µl de tampón de lisis (ZymoBIOMICS™ Lysis Solution) para transferir el contenido a un tubo (ZR BashingBead™ Lysis Tubes) con microperlas de ultra alta densidad de 0,1 y 0,5 mm. Este se mezcló bien en el multi-vórtex Biosan V-32 (Biosan, n.d.) por 10 minutos, que permitió la agitación simultánea de varios tubos para su homogeneización.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, estos tubos se centrifugaron a 10.000 g durante 1 minuto para separar las microperlas de la muestra. Se transfirieron 400 µl del sobrenadante a un tubo con filtro (Zymo-Spin™ III-F Filter) colocado dentro de un tubo de recolección de 2 ml y se centrifugaron a 8000 g durante 1 minuto. En esta centrifugación el lisado filtrado quedó recogido en el tubo de recolección, por lo que se descartó el tubo con filtro.

Al líquido filtrado se le añadieron 1.200 µl de tampón de unión (ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer) al ADN y se mezcló bien. Se transfirieron 800 µl de esta mezcla a una columna (Zymo-Spin™ IICR Column) situada en un tubo de recolección nuevo y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto. Se descartó el filtrado y se repitió el proceso con lo que quedaba de la mezcla anterior. De esta forma el ADN quedó retenido en la columna.

En esta columna se añadieron 400 µl de un tampón de lavado (ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1), se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto y se descartó el filtrado del tubo de recolección. Se repitió el proceso dos veces más, pero con otro tampón de lavado (ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2), primero con 700 µl y luego con 200 µl. Después, la columna se colocó en un tubo Eppendorf, se añadieron 100 µl de agua libre de nucleasas (ZymoBIOMICS™ DNase/RNase Free Water), en el centro de la columna y lentamente, y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto para eluir el ADN.

Paralelamente, se colocó un tubo con filtro (Zymo-Spin™ III-HRC Filter) en un tubo de recolección nuevo al que se le añadieron 600 µl de una solución (ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution) para acondicionar el filtro. Para que esto fuera posible se centrifugó sin la muestra a 8000 g durante 3 minutos.

Finalmente, el ADN eluido se transfirió a la columna hidratada situada en un nuevo tubo Eppendorf, se centrifugó a 16.000 g durante 3 minutos, se descartó la columna y se guardó la muestra en el congelador a -20 °C para realizar la posterior secuenciación.

#### 3.4. Cuantificación de ADN

Después de la extracción, fue necesario determinar la concentración de ADN de las muestras para seleccionar el protocolo de preparación de librerías más adecuado, según si era necesaria una amplificación por PCR o no. Para ello, se usó el fluorímetro de sobremesa Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, 2021) y el Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 2022). Durante la medición se trabajó con la menor exposición posible a la luz porque los reactivos empleados eran fotosensibles.

El primer paso fue preparar la solución de trabajo (Qubit™ working solution) que era una dilución 1:200 del reactivo (Qubit™ dsDNA BR Reagent) en el tampón (Qubit™ dsDNA BR Buffer). El reactivo es una solución concentrada 200X en DMSO.

Antes de la primera medición era necesario preparar dos estándares de concentración conocida para la correcta calibración del equipo. El Qubit™ dsDNA BR Standard #1 tenía una concentración de 0 ng/ µL y el Qubit™ dsDNA BR Standard #2 de 100 ng/ µL. Ambos estaban disueltos en tampón TE (una mezcla de Tris y EDTA). Estos se prepararon añadiendo 10 µl de cada estándar en un tubo de Qubit y 190 µl de la solución de trabajo preparada previamente.

Luego se depositaron 199 µl de la solución de trabajo en tantos tubos de Qubit como muestras había y a cada uno se le añadió 1 µl de la muestra correspondiente. Después se homogeneizaron y

se dejaron incubar 2 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrió el tiempo de incubación, se procedió a medir los dos estándares y, a continuación, las muestras una por una. El límite se estableció en 20 ng/μl. Las muestras cuya concentración fue superior a este valor no requirieron pasar por la PCR, pero el resto sí.

#### **3.5. Preparación de Librerías sin Amplificación por PCR**

La preparación de librerías sin amplificación por PCR se realizó mediante el kit SQK-RBK114.24 de Oxford Nanopore Technologies (Oxford Nanopore Technologies, 2025). Este protocolo se empleó en las muestras que presentaban una concentración de ADN igual o superior a 20 ng/μl, ya que permite preparar la librería de forma rápida mediante la fragmentación del ADN y la incorporación de códigos de barras, sin necesidad de una etapa previa de amplificación.

Al conocer la concentración de ADN de la muestra (previamente medida en el Qubit), se prepararon 200 ng de ADN genómico de cada muestra en tubos de PCR y se ajustó el volumen en cada uno hasta 10 μl con agua libre de nucleasas. Después se añadió 1,5 μl de cada código de barras (Rapid Barcode Primers) a las muestras para poder identificarlas en la librería. Los tubos se incubaron en el termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, n.d.) con un ciclo de 2 minutos a 30 °C y 2 minutos a 80 °C para que el ADN se fragmentase y los códigos de barras se incorporasen. Luego se enfriaron con hielo y se centrifugaron con la minicentrífuga MC7000 (LBX Instruments, n.d.).

A continuación, se mezclaron todas las muestras ya codificadas en un tubo Eppendorf (se puso la misma cantidad de cada muestra) y se añadió el mismo volumen total de perlas magnéticas (AMPure XP Beads) para retener el ADN y eliminar impurezas. El tubo se incubó durante 10 minutos y a temperatura ambiente en un agitador orbital, mientras se preparaban 2 ml de etanol al 80% en agua libre de nucleasas. Tras los 10 minutos, se centrifugó el tubo con la librería y se colocó en una gradilla magnética para que las perlas unidas al ADN quedasen retenidas en la pared del tubo y así poder retirar el sobrenadante. Después se lavaron las perlas con 1 ml del etanol preparado previamente sin deshacer el pellet y se retiró todo el etanol restante (esto se realizó dos veces). El tubo se centrifugó y se colocó en la gradilla magnética para eliminar cualquier resto de etanol. Se dejó secar el pellet (sin que llegase a agrietarse), se quitó el tubo de la gradilla magnética y se resuspendió el pellet con 15 μl de Elution Buffer para separar el ADN de las perlas magnéticas. El tubo se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se colocó en la gradilla magnética y se pipeteó el ADN eluido a otro tubo Eppendorf nuevo para cuantificarlo por Qubit (tal y como se ha explicado anteriormente). Paralelamente, se diluyó en otro tubo Eppendorf el Rapid Adapter con Adapter Buffer (1,5 μl del primero y 3,5 μl del segundo).

Finalmente, se transfirieron 11 μl de la librería a un tubo Eppendorf y se añadió 1 μl del Rapid Adapter diluido anteriormente. Esto se mezcló y centrifugó para terminar incubándolo 5 minutos a temperatura ambiente. La librería se guardó en hielo hasta el momento de carga.

#### **3.6. Preparación de Librerías con Amplificación por PCR**

La preparación de librerías con amplificación por PCR se realizó mediante el kit SQK-RPB114.24 de Oxford Nanopore Technologies (Oxford Nanopore Technologies, 2026). Este protocolo se aplicó en aquellas muestras con una concentración de ADN inferior a 20 ng/μl, ya que incluye una etapa de amplificación que permite obtener suficiente material para la posterior secuenciación. Las amplificaciones por PCR se realizaron con el termociclador previamente mencionado.

Al conocer la concentración de ADN de la muestra (previamente medida en el Qubit), se prepararon 5 ng de ADN genómico de cada muestra en tubos de PCR y se ajustó el volumen en cada uno hasta 3 µl con agua libre de nucleasas. A cada uno de estos tubos se le añadió 1 µl de Fragmentation Mix para fragmentar el ADN genómico y generar moléculas adecuadas para la amplificación por PCR y la unión de los códigos de barras. Todos los tubos se incubaron en el termociclador 2 minutos a 30 °C y 2 minutos a 80 °C. Después se enfriaron con hielo.

Posteriormente, se añadieron 11 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de código de barras y 25 µl de LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (contiene Taq DNA polimerasa, tampón de reacción,  $Mg^{2+}$ , dNTPs y otros componentes esenciales para la PCR) a cada tubo. Los tubos se centrifugaron y, después, se amplificaron en el termociclador. Se usó un ciclo habitual de PCR que constaba de una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, seguida de dieciséis ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 56 °C y 6 minutos a 65 °C, y que terminaba con una extensión final de 6 minutos a 65 °C. La reacción se incubó a 4 °C hasta que se añadió el EDTA (4 µl) para detener la reacción de amplificación. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se cuantificó al Qubit 1 µl de cada muestra.

Conociendo la concentración de cada muestra tras la amplificación, se juntó la misma cantidad de ADN genómico de todas las muestras en un tubo Eppendorf. A este tubo se le añadieron las perlas magnéticas resuspendidas en una proporción del 0,6X respecto al volumen total de la librería y se mezclaron con la pipeta. Esto tuvo como objetivo retener el ADN y eliminar las impurezas presentes. El tubo se incubó durante 5 minutos en un agitador orbital. A partir de aquí, el procedimiento empleado fue exactamente el mismo que en la preparación de librerías sin amplificación por PCR que se describe con detalle en el apartado anterior.

#### 3.7. Secuenciación de las Librerías

Una vez preparadas, las librerías obtenidas mediante ambos protocolos se secuenciaron siguiendo el mismo procedimiento general (Oxford Nanopore Technologies, 2025, 2026). Cada librería, formada por un número variable de muestras, se cargó de forma independiente en la celda de flujo (Figura 2) correspondiente y se secuenció en el dispositivo MinION mediante el software MinKNOW. Este programa permitió controlar el estado de los poros de la celda de flujo, configurar la secuenciación, monitorizar el proceso en tiempo real y generar los datos brutos necesarios para el análisis posterior. Durante la carga de la librería se evitó la formación de burbujas porque estas pueden dificultar la distribución homogénea de la muestra en la celda de flujo y reducir el número de poros disponibles para la secuenciación.



Figura 2. FLO-MIN114 de Oxford Nanopore Technologies.

Para poder cargar la librería en la celda de flujo, primero se preparó en un tubo Eppendorf la mezcla de cebado o *priming mix* que consistía en 1170 µl de Flow Cell Flush, 5 µl de albúmina sérica bovina (BSA) a 50 mg/ml y 30 µl de Flow Cell Tether. Una vez preparada la mezcla, se situó la celda de flujo en el dispositivo MinION correctamente y se realizó un recuento de poros con el software MinKNOW

para comprobar el estado de la celda de flujo. A continuación, se abrió la cubierta del *priming port* y con una pipeta automática ajustada a 200 µl se aspiró desde el *priming port* un pequeño volumen de tampón para eliminar cualquier burbuja de aire presente (con la pipeta insertada en el *priming port* se giró la rueda de la pipeta hasta aspirar un pequeño volumen de tampón). Después se cargaron 800 µl de la mezcla de cebado, previamente preparada, evitando la formación de burbujas en la celda de flujo y se esperó 5 minutos. Al mismo tiempo se preparó en un tubo Eppendorf la mezcla de secuenciación o *sequencing mix* que constaba de 37,5 µl de Sequencing Buffer, 25,5 µl de Library Beads y los 12 µl de la librería de ADN genómico.

Una vez transcurridos los 5 minutos, se abrió la cubierta del *SpotON sample port* y se añadieron 200 µl de la mezcla de cebado en el *priming port* (de la misma forma que antes, evitando las burbujas). Luego se mezcló la librería de ADN con la pipeta y se añadieron los 75 µl de la mezcla de secuenciación en el *SpotON sample port* gota a gota (observando que entraban por completo en la celda de flujo). Finalmente, se cerraron las cubiertas del *priming port* y del *SpotON sample port* y se cubrió la celda de flujo con el protector de luz.

En el software MinkNOW se seleccionó el kit usado para la preparación de las librerías (SQK-RBK114.24 o SQK-RPB114.24, según el caso) y se inició la secuenciación.

#### 3.8. Análisis Bioinformático

Los archivos resultantes de la secuenciación fueron archivos POD5, que contenían la señal eléctrica registrada cuando las moléculas de ADN atravesaban los poros de la celda de flujo. El análisis bioinformático se inició con el proceso de *basecalling*, mediante el cual esta señal se convirtió en secuencias de bases nucleotídicas y se obtuvieron archivos FASTQ con las lecturas y sus valores de calidad. Este paso se realizó con Dorado Basecaller v2.0.0-win64 (Oxford Nanopore Technologies, n.d.-b), empleando el modelo de alta precisión (sup) para obtener lecturas más fiables a partir de la señal registrada. Se aplicó un umbral mínimo de calidad de Q-score 12 para descartar lecturas de baja calidad que pudieran interferir en el ensamblaje posterior. Además, no se realizó el recorte de adaptadores, cebadores ni códigos de barras en Dorado, con el objetivo de mantener el mismo procesamiento inicial para todas las muestras antes de continuar con los análisis posteriores.

Los FASTQ se procesaron con el programa EPI2ME v5.4.0, más concretamente con el flujo de trabajo Bacterial & Fungal Genomes v2.0.2 (Oxford Nanopore Technologies, n.d.-a). Así se pudieron procesar las lecturas de cada muestra y se obtuvieron distintos archivos con información relacionada con el ensamblaje, la anotación o la caracterización de los aislados. Los archivos de salida más destacados fueron los FASTA comprimidos (medaka.fasta.gz), los archivos de anotación generados por Bakta (Schwengers et al., 2021) (bakta.gff3 y bakta.gbff), los archivos de alineamiento (bam y bam.bai) y los resultados de tipado molecular (mlst.json). Todos estos archivos se organizaron en carpetas individuales para cada muestra.

Desde los archivos mlst.json se extrajeron los ST (tipo de secuencia) de cada muestra y se integraron en una tabla de metadatos que incluía el identificador de las muestras y el tipo de industria de las que procedía cada una de ellas. En algunos aislados no fue posible asignar ningún ST, por lo que se registraron como “sin ST asignado” y se codificaron como STNA en los archivos de trabajo. Se calculó la frecuencia de cada ST para las diferentes industrias y se consideró predominante el ST con mayor número de aislados en cada sector. De esta forma se consiguió identificar los perfiles predominantes en cada sector industrial. Se optó por analizar la distribución según los ST porque constituyen una

clasificación estandarizada y ampliamente empleada, que facilita la comparación de los resultados con otros estudios y permite diferenciar perfiles alélicos concretos. Los complejos clonales agrupan varios ST relacionados, por lo que proporcionan un menor nivel de detalle para describir la diversidad de los aislados (Stessl et al., 2021; Tessa et al., 2025).

Los archivos bakta.gff3 se emplearon como entrada en el programa informático Panaroo (Tonkin-Hill et al., 2020), que permitió construir el genoma central (*core genome*) del conjunto de cepas, generar la matriz de presencia/ausencia génica y obtener el alineamiento del *core genome*. El alineamiento del *core genome* se usó para construir árboles filogenéticos con el programa IQ-TREE (Minh et al., 2020), los cuales se visualizaron mediante Itol (Letunic & Bork, 2024). En esta plataforma se añadieron etiquetas sobre la industria de procedencia y los ST de cada aislado, para estudiar si la agrupación de las cepas estaba relacionada con el sector industrial de origen o con la estructura clonal de los aislados.

La proximidad genética entre cepas también se estudió mediante matrices de distancias SNP generadas con la herramienta snp-dists (Seemann, 2026) a partir del alineamiento del *core genome*. Para poder visualizar las distancias genéticas entre aislados con una mayor facilidad se generaron distintos mapas de calor, entre los que destacan los mapas ordenados por clados genómicos, industria y ST, así como la matriz de distancias SNP entre ST. A partir de la matriz completa de distancias SNP se calcularon la distancia mínima, mediana y máxima entre aislados para el conjunto total de comparaciones, dentro de un mismo ST, entre ST diferentes, dentro de una misma industria y entre industrias.

La matriz de presencia/ausencia génica generada por Panaroo se empleó para realizar un análisis exploratorio de asociación entre genes accesorios e industria de procedencia mediante la herramienta Scoary (Brynildsrud et al., 2016). Para ello, se generó una tabla de rasgos binarios a partir de los metadatos de cada aislado, en la que cada industria se evaluó como una variable independiente. De esta forma, cada sector se comparó frente al resto de aislados. Este análisis permitió identificar genes accesorios asociados o enriquecidos en determinados grupos industriales. Los resultados se filtraron considerando genes con p-valor ajustado por Benjamini-Hochberg  $< 0,05$ , diferencia de frecuencia  $\geq 0,20$ , presencia en al menos tres aislados de la industria y anotación funcional interpretable.

Los perfiles de resistencia antimicrobiana y tolerancia a biocidas se analizaron con AMRFinderPlus (Feldgarden et al., 2021) a partir de los ensamblajes en formato FASTA (medaka.fasta.gz). Para cada aislado se registraron los genes detectados y se generó una tabla resumen que incluyó el identificador de muestra, la industria de procedencia, el ST y los genes asociados a resistencia antimicrobiana o tolerancia a biocidas. Posteriormente, estos resultados se resumieron por industria para comparar la distribución de los genes detectados entre sectores industriales.

Los genes relacionados con la formación de biofilms, persistencia, estrés, tolerancia a biocidas y virulencia se estudiaron mediante una búsqueda dirigida de genes candidatos en los archivos de anotación generados por Bakta. Se preparó una lista de genes de interés que a partir de genes descritos previamente en estudios sobre biofilms, persistencia, respuesta a estrés, adaptación a ambientes de procesado y virulencia en *Listeria monocytogenes*. La lista incluyó los genes *Imo0444*, *Imo0445*, *Imo0446*, *Imo0447*, *Imo0448*, *lin0464*, *lin0465*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, *luxS*, *sigB*, *bapL*, *inlL*, *inlA*, *actA*, *flaA*, *degU*, *dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*, *comK*, *recO*, *Imo2504*, *gadT*, *Imo1798* y *Imo1799*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

(Bombelli et al., 2026; Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Mafuna et al., 2021; Tessa et al., 2025; Unrath et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). La presencia o ausencia de estos genes se registró para cada aislado y se integró con la información de industria y ST.

Finalmente, se generó una tabla de biobanco genómico que integró la información principal de cada aislado. Esta tabla incluyó el identificador de muestra, la industria de procedencia, el ST, el clado filogenético, los genes relacionados con resistencia antimicrobiana o tolerancia a biocidas, los genes relacionados con la formación biofilms/persistencia y las observaciones principales. De esta forma, se organizó una colección de genomas de *L. monocytogenes* clasificada según el tipo de industria alimentaria de origen.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Resultados de Secuenciación Genética

Los 112 aislados de *Listeria monocytogenes* incluidos en el estudio pudieron secuenciarse correctamente mediante tecnología Nanopore. Las principales estadísticas de calidad de los ensamblajes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Estadísticas de calidad de los ensamblajes.

| Parámetro               | Nº muestras | Mínimo | Mediana  | Media    | Máximo   |
|-------------------------|-------------|--------|----------|----------|----------|
| Tamaño ensamblaje (kb)  | 112         | 602,30 | 2.990,12 | 3.086,45 | 6.458,03 |
| Número contigs          | 112         | 1,00   | 3,00     | 11,50    | 211,00   |
| N50 del ensamblaje (kb) | 112         | 24,76  | 2.154,51 | 2.080,96 | 3.122,81 |
| Contig más largo (kb)   | 112         | 75,94  | 2.177,42 | 2.157,02 | 3.122,81 |
| Porcentaje GC (%)       | 112         | 36,90  | 37,96    | 37,88    | 38,24    |
| Cobertura media (x)     | 112         | 9,15   | 53,51    | 68,44    | 200,23   |

*Nota:* N50 indica la longitud para la cual el 50 % del genoma ensamblado está contenido en contigs de ese tamaño o mayores. Un contig es una secuencia continua de DNA formada al ensamblar lecturas solapadas. La cobertura se refiere al número medio de veces que se ha leído cada posición del genoma.

Los ensamblajes presentaron una mediana de 3 contigs, un N50 mediano de 2.154,51 kb y una cobertura media mediana de 53,51x. El contenido GC mostró poca variación entre las muestras, con una mediana del 37,96 %. Estos resultados mostraron unos valores acordes a los trabajos mencionados anteriormente (Ji et al., 2023; Unrath et al., 2021; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023). También indicaron una buena continuidad y una cobertura adecuada en la mayoría de los ensamblajes, aunque un número reducido de ensamblajes presentó valores extremos de cobertura, tamaño o fragmentación. Dado que estos pudieron anotarse y procesarse correctamente, no se consideró necesario excluirlos únicamente por estas diferencias. Además, tras el *basecalling* y el procesamiento bioinformático, todas las muestras generaron archivos válidos para los análisis posteriores. Por ello, los 112 aislados se incluyeron en los análisis posteriores. Los valores individuales de cada aislado se recogen en el Anejo I.

### 4.2. Distribución de ST por Industria

Se identificaron los perfiles genómicos predominantes en las diferentes industrias alimentarias analizadas mediante la distribución de los tipos de secuencia (ST) de los aislados de *Listeria monocytogenes*. Los datos que se obtuvieron en este análisis se muestran en la Tabla 2.

En el total de los 112 aislados predominó el ST9 con un total de 15 muestras (13%), seguido del ST sin asignar (12%). El ST predominante en la industria láctea fue el ST570, presente en 7 de los 37 aislados (19%). En la industria cárnica destacó el ST9, también con 7 aislados, pero esta vez sobre 28, por lo que representa un porcentaje mayor (25%). En la industria pesquera, el ST más frecuente fue el ST121, presente en 4 aislados de un total de 20, lo que supone un 20%. En el caso de la industria avícola se identificaron dos ST más comunes, el ST9 y el ST121, ambos detectados en 3 de los 15 aislados (20% cada uno). En la industria hortofrutícola destacó de forma clara el ST392 con un 44%, siendo identificado en 4 de las 9 muestras. En las industrias heladera y panadera y repostería destacaron como predominantes los ST1047 y ST391, respectivamente. Estos dos últimos resultados se interpretaron como casos aislados sin robustez estadística, dado que el reducido tamaño muestral no permite establecer patrones generales.

Tabla 2. Distribución de tipos de secuencia (ST) por industria alimentaria.

| Industria             | ST predominante | Nº de aislados total | Nº de aislado del ST predominante | Porcentaje dentro de la industria | Porcentaje de aislados sin ST asignado |
|-----------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|
| Láctea                | ST570           | 37                   | 7                                 | 19%                               | 5%                                     |
| Cárnica               | ST9             | 28                   | 7                                 | 25%                               | 21%                                    |
| Pesquera              | ST121           | 20                   | 4                                 | 20%                               | 0%                                     |
| Avícola               | ST9             | 15                   | 3                                 | 20%                               | 27%                                    |
|                       | ST121           | 15                   | 3                                 | 20%                               |                                        |
| Hortofrutícola        | ST392           | 9                    | 4                                 | 44%                               | 11%                                    |
| Heladera              | ST1047          | 2                    | 2                                 | 100%                              | 0%                                     |
| Panadera y repostería | ST391           | 1                    | 1                                 | 100%                              | 0%                                     |
| Total                 | ST9             | 112                  | 15                                | 13%                               | 12%                                    |

En la última columna de la Tabla 2 se puede observar que no fue posible asignar ST a todos los aislados, pero estas muestras se mantuvieron en el análisis porque la ausencia de ST asignado no implica un fallo de secuenciación, sino una limitación en la asignación del perfil MLST. Destacan los elevados porcentajes de aislados sin asignar en las industrias cárnica y avícola. La asignación de un ST requiere identificar un alelo válido para cada uno de los siete genes incluidos en el esquema y combinar estos alelos en un perfil concreto (Stessl et al., 2021). La no asignación podría deberse a *loci* incompletos en el ensamblaje o a alelos o perfiles que todavía no están incluidos en la base de datos, lo que podría indicar un ST no descrito previamente (Fagerlund, Idland, et al., 2022; Stasiewicz et al., 2015). Para confirmarlo, sería necesario revisar los perfiles alélicos y compararlos con una versión actualizada de la base de datos BIGSdb-Lm del Instituto Pasteur (Fagerlund, Idland, et al., 2022).

Estos resultados muestran que, aunque en los distintos sectores se identifiquen ST predominantes, no se puede afirmar que exista una asociación exclusiva entre un ST y una única industria, ya que la distribución no es significativa. Además, hay ST compartidos entre sectores, como ST9 y ST121, por lo que determinadas cepas de *L. monocytogenes* pueden encontrarse en distintos entornos alimentarios. La predominancia de ST9 en el conjunto de muestras, en la industria cárnica y en el sector avícola, coincide con estudios previos en alimentos, productos cárnicos y cadenas de procesamiento de aves (Ji et al., 2023; Wang et al., 2026). Del mismo modo, ST121 se ha descrito en productos y ambientes de procesamiento de pescado, lo que concuerda con su predominancia en la industria pesquera (Biggel et al., 2024). La presencia de ambos ST podría relacionarse con mecanismos de adaptación al estrés industrial, mientras que las diferencias observadas para ST570, ST392, ST1047 y ST391 podrían deberse al origen de las muestras o a las características de cada instalación.

Por otra parte, las muestras incluidas en ST9 o ST121 no tienen por qué tener un carácter hipervirulento. En otros estudios se detectaron alteraciones en numerosos aislados pertenecientes a estos ST, que podrían reducir su capacidad de invasión (Ji et al., 2023; Zhao et al., 2026). Tampoco pueden considerarse inocuos, ya que su presencia y permanencia en ambientes industriales pueden favorecer la contaminación de alimentos y la exposición de los consumidores. Por este motivo, la estructura genética de las cepas se evaluó también mediante el análisis filogenético basado en el *core genome* y el estudio de las distancias SNP.

### 4.3. Análisis Filogenético Basado en el Core Genome

A partir del alineamiento con el genoma central (*core genome*) de todas las muestras se construyó un árbol filogenético para poder estudiar la relación genética entre los distintos aislados. Este árbol se muestra en la Figura 3 y se anota de forma conjunta la industria de procedencia (círculo interno) y el ST (círculo externo) de cada aislado. De esta forma se podrá evaluar si la agrupación de las cepas sigue un patrón relacionado con la industria o con el ST. Los árboles anotados de forma separada se incluyen en los Anejos II y III.

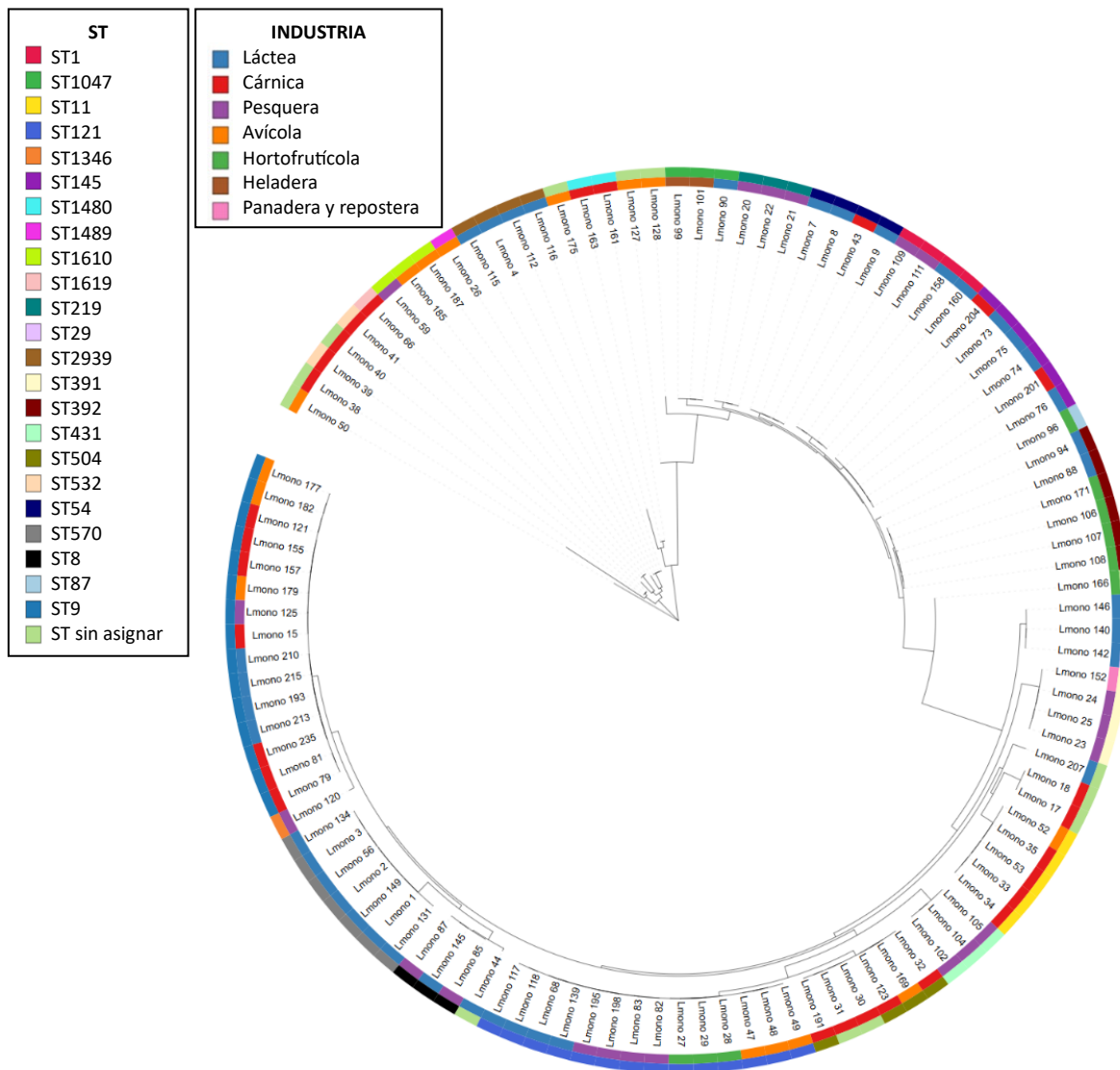


Figura 3. Árbol filogenético basado en el core genome de los aislados de *L. monocytogenes* con anotación de industria y ST.

*Nota:* La proximidad visual entre aislados en la disposición circular no implica necesariamente una mayor cercanía genética, ya que la relación entre cepas se interpreta a partir de la estructura de las ramas, los nodos compartidos y la longitud de las ramas.

En el árbol filogenético presentado en la Figura 3 se puede observar que los aislados no se agruparon de forma estricta en función de su procedencia, ya que en algunos casos muestras de una misma industria aparecieron en clados diferentes del árbol y otras con distinta procedencia estaban situadas en un clado común.

Sin embargo, considerando los ST la agrupación fue mucho más coherente y clara. La mayoría de las cepas con ST asignado se agruparon en zonas próximas del árbol, al mismo tiempo que coincidían con los clados terminales definidos por las ramas que compartían un nodo común. Este patrón indica una fuerte relación genética entre aislados que pertenecen al mismo ST. Los aislados que aparecen dispersos en el árbol son los que carecen de un valor ST asignado, ya que no representan ningún tipo de secuencia definido.

Por tanto, el análisis filogenético basado en el *core genome* refuerza la idea de que la estructura genética de los aislados está más relacionada con el ST y los clados genómicos que con la industria de origen. Esta agrupación resulta coherente, ya que el ST se define a partir de características genéticas, mientras que el tipo de industria no tiene por qué predecir toda la diversidad genómica, aunque no puede descartarse su influencia. Este resultado coincide con el artículo de Mafuna et al de 2021, donde los aislados también se agruparon principalmente según el ST y no según la procedencia (Mafuna et al., 2021). En el estudio llevado a cabo por Fagerlund, Wagner, et al, de 2022 se identificaron aislados muy próximos genéticamente en fábricas diferentes, lo que muestra que el tipo de industria no siempre determina la agrupación genética (Fagerlund, Wagner, et al., 2022). Aun así, la interpretación del árbol debe completarse con el análisis de distancias SNP, ya que este permite cuantificar con mayor precisión la proximidad genética entre aislados.

#### 4.4. Distancias SNP entre Aislados

Para complementar el análisis filogenético, se calcularon las distancias SNP entre aislados a partir del *core genome*. De esta forma se pudo cuantificar con más precisión la proximidad genética entre las cepas y comparar los patrones observados según ST, clado filogenético y tipo de industria. Estos resultados se resumen en la Tabla 3 y se ilustran como mapas de calor en las Figuras 4, 5, 6 y 7.

Tabla 3. Resumen de distancias SNP entre aislados de *L. monocytogenes*.

| Tipo de comparación          | Nº comparaciones | SNP mínimo | SNP mediana | SNP máximo |
|------------------------------|------------------|------------|-------------|------------|
| Todas las comparaciones      | 6216             | 0          | 6063        | 10965      |
| Dentro del mismo ST          | 307              | 0          | 3           | 115        |
| Entre ST diferentes          | 4544             | 522        | 6080        | 10962      |
| Dentro de la misma industria | 1376             | 0          | 6038        | 10951      |
| Entre industrias             | 4840             | 0          | 6068        | 10965      |

Nota: SNP mínimo indica la menor distancia SNP observada entre dos aislados dentro de cada tipo de comparación. SNP mediana corresponde al valor central de las distancias SNP entre todos los pares comparados. SNP máximo indica la mayor distancia SNP observada entre dos aislados dentro de cada categoría.

Atendiendo al conjunto de todas las comparaciones, se observaron distancias SNP muy variables que iban desde 0 hasta 10965 SNPs, con una mediana de 6063. Esta amplitud refleja la diversidad genética existente entre las cepas analizadas.

Al separar las comparaciones según el ST (dentro del mismo y entre diferentes), se observaron diferencias más claras. Entre los aislados del mismo ST, la mediana fue de 3 SNPs, con un mínimo de 0 y un máximo de 115. Sin embargo, entre muestras con distintos ST se calculó una mediana de 6080 SNPs, con un mínimo de 522 y un máximo muy cercano al del total de las comparaciones. Esta diferencia tan grande indica que los aislados pertenecientes al mismo ST fueron mucho más próximos genéticamente que aquellos pertenecientes a ST distintos.

Un aspecto relevante fue el valor de SNP mínimo observado entre ST diferentes (522 SNPs), mientras que en el resto de las comparaciones fue de 0 SNPs. Esto indica que incluso los aislados más próximos de ST distintos mostraron una distancia genética considerable, es decir, no se observaron aislados muy próximos genéticamente que pertenecieran a ST diferentes. Los valores mínimos de 0 SNPs observados en algunas de las comparaciones correspondieron a aislados del mismo ST. Esto no implica que se tratara del mismo aislado, sino que no presentaron diferencias en las posiciones analizadas del *core genome* y fueron indistinguibles mediante este análisis.

Las distancias según el tipo de industria fueron inferiores, ya que en las comparaciones dentro de una misma industria hubo una mediana de 6038 SNPs y en las comparaciones entre industrias la mediana fue de 6068 SNPs. La similitud entre ambos valores refuerza la idea de que la proximidad genética entre aislados no estuvo determinada principalmente por el sector industrial de origen.

El mapa de calor agrupado por clados genómicos permitió visualizar de forma clara la estructura genética del conjunto de aislados (Figura 4). En esta representación, las líneas delimitan clados definidos a partir de las distancias SNP, mientras que la anotación de color indica el ST de cada aislado. Los bloques oscuros situados en la diagonal reflejan grupos de aislados con baja distancia SNP entre sí, lo que indica una mayor proximidad genética dentro de cada clado, y los bloques claros representan grupos de aislados con una elevada distancia SNP.

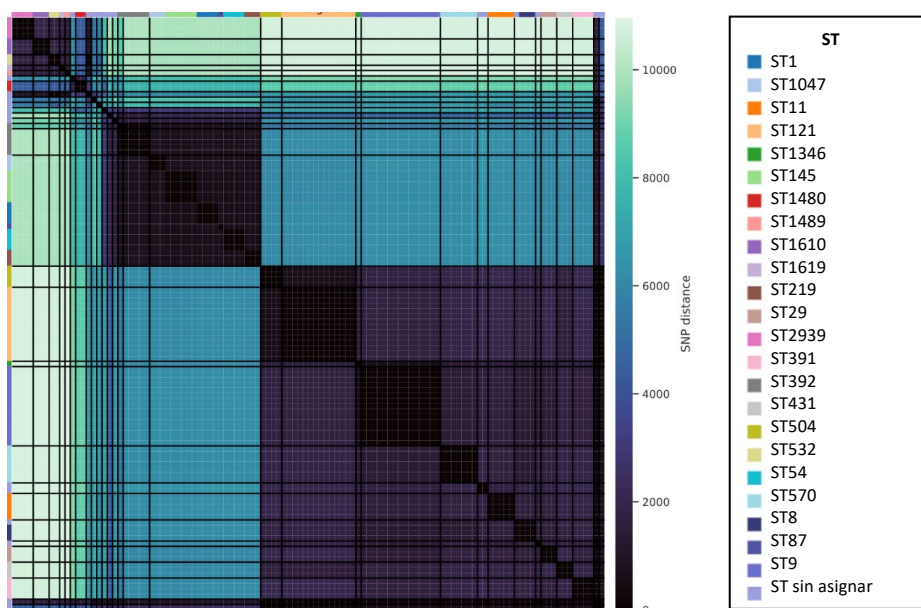


Figura 4. Mapa de calor de distancias SNP entre aislados agrupados por clados genómicos y anotados según ST.

El mapa de calor permitió observar relaciones de proximidad entre algunos clados. En la segunda mitad de las comparaciones, se aprecian bloques oscuros fuera de la diagonal principal, lo que indica que determinados clados y ST presentaron distancias SNP menores entre sí en comparación con otros grupos más alejados. Este patrón coincide con lo observado en el árbol filogenético, donde varios ST se situaban en nodos próximos, sugiriendo una mayor proximidad genética.

La anotación por ST mostró una agrupación casi completa de los aislados con el mismo tipo de secuencia. En varios casos, los clados estuvieron formados mayoritariamente por aislados del mismo ST, pero algunos incluían varios ST. Los aislados sin ST asignado aparecieron más dispersos y no se interpretaron como un grupo clonal definido.

El mapa de calor ordenado por industria (Figura 5) permitió visualizar las distancias SNP entre aislados agrupándolos según su sector de procedencia y las líneas separan los diferentes tipos de industria. Se observaron bloques oscuros de baja distancia SNP dentro de algunas industrias, lo que indica la presencia de aislados genéticamente próximos dentro de un mismo sector, pero también aparecieron bloques claros que indicaban aislados genéticamente alejados dentro de una misma industria. En las comparaciones entre industrias también se observó una gran variedad de distancias SNPs, apareciendo bloques genéticamente cercanos fuera de la diagonal. Aun así, estos bloques no siguieron un patrón homogéneo ni mostraron una coincidencia completa entre industrias distintas.

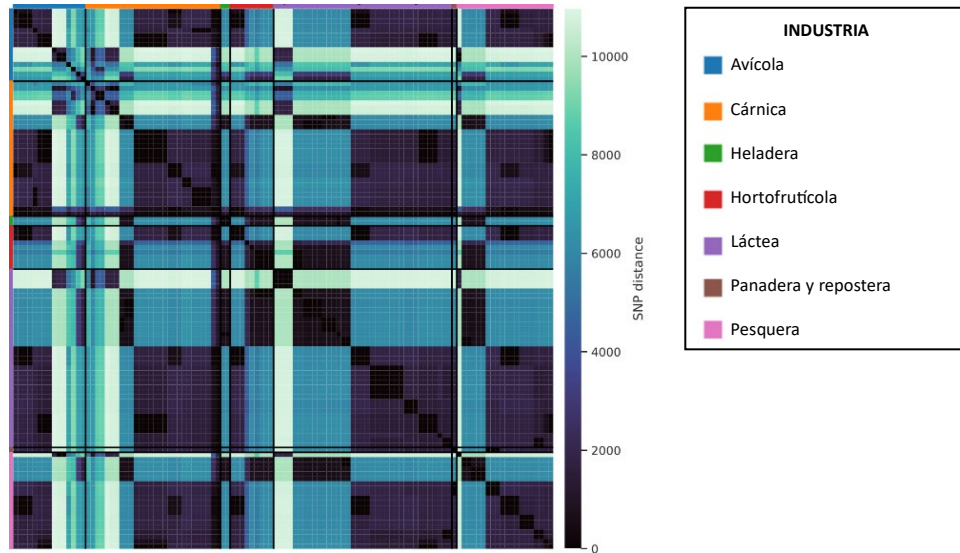


Figura 5. Mapa de calor de distancias SNP entre aislados ordenados según la industria de procedencia.

En cambio, el mapa de calor ordenado por ST (Figura 6) las líneas separan los distintos tipos de secuencia. Este mostró una agrupación más definida y los bloques con menor distancia SNP fueron mucho más consistentes dentro de un mismo ST. Las principales excepciones correspondieron a los aislados sin ST asignado, que no formaron un grupo definido. Además, fuera de la diagonal principal se observaron bloques de proximidad genética entre determinados ST. A diferencia de lo observado en el mapa ordenado por industria, donde las relaciones de baja distancia aparecían de forma parcial entre sectores, en este caso algunos tipos de secuencia completos mostraron distancias SNP bajas frente a otros ST concretos.

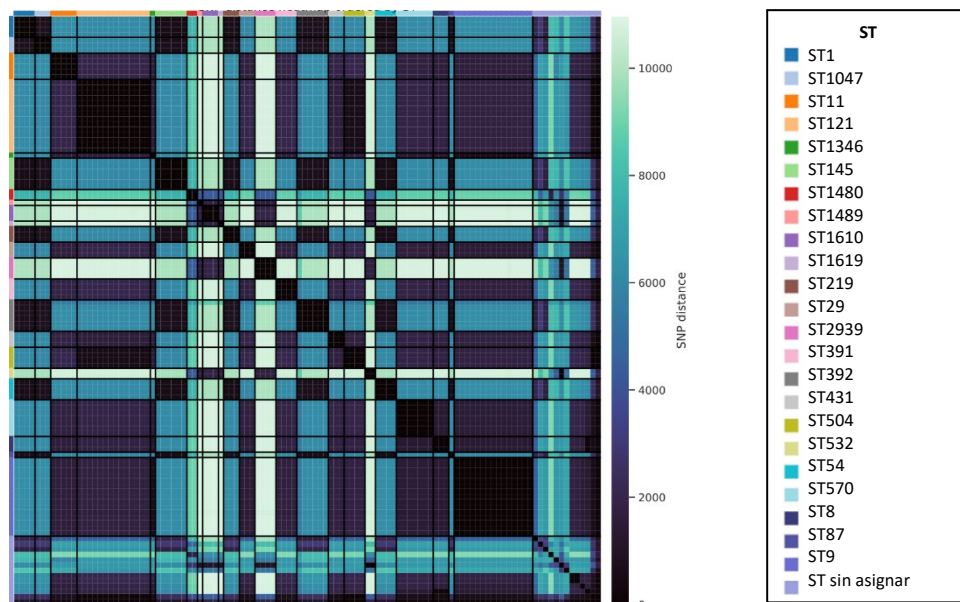


Figura 6. Mapa de calor de distancias SNP entre aislados ordenados según ST.

En los Anejos IV y V se adjuntan el mapa de calor ordenado según la industria de procedencia sin líneas y el mapa de calor ordenado según ST, respectivamente.

La matriz de distancias SNP entre ST (Figura 7) permitió resumir estas diferencias de forma más sencilla. En esta representación se observó que, aunque los ST son grupos diferenciados, algunos tipos de secuencia presentaron distancias SNP muy bajas entre sí, indicando una elevada proximidad genética entre determinados ST. Este patrón coincide con lo observado en el árbol filogenético y en el mapa de calor ordenado por ST, donde algunos ST completos aparecían próximos a otros ST concretos.

Estos resultados coinciden con estudios anteriores en los que los aislados pertenecientes a un mismo ST presentaron distancias SNP reducidas, aunque no fueron necesariamente idénticos. En un artículo científico publicado en 2021 se observaron diferencias máximas de 2 a 41 SNPs dentro de distintos ST (Mafuna et al., 2021), mientras que en otro de 2026 se registraron distancias de entre 0 y 379 SNPs entre aislados del mismo ST (Zhao et al., 2026). Por tanto, la mediana de 3 SNPs observada en este trabajo confirma la gran proximidad genética dentro de los ST y el máximo de 115 SNPs muestra que también existe diversidad interna.

El amplio intervalo observado en el conjunto de las comparaciones también fue similar al descrito en el estudio de Lüth et al en 2021, donde las distancias alcanzaron hasta 12.694 SNPs (Lüth et al., 2021). Estos valores absolutos no se pueden comparar directamente porque pueden variar según el método, el genoma de referencia y las posiciones incluidas en el alineamiento. La detección de aislados muy próximos dentro de una misma industria y entre industrias diferentes concuerda con estudios que identificaron genomas estrechamente relacionados en distintos puntos de una cadena de procesamiento o incluso en instalaciones diferentes (Fagerlund, Wagner, et al., 2022; Wang et al., 2026).

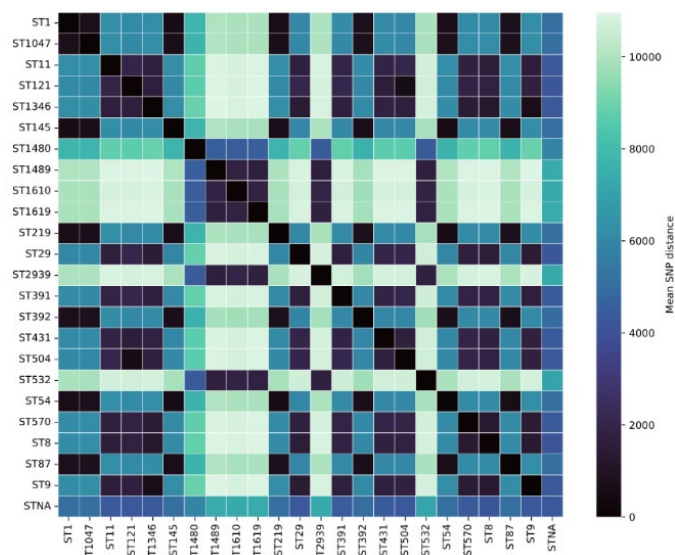


Figura 7. Matriz de distancias SNP entre tipos de secuencias (ST).

Estos resultados confirman que el ST constituye una clasificación genética consistente para diferenciar los principales grupos de aislados. Sin embargo, no refleja toda la variabilidad del *core genome*, ya que se observaron distancias SNP entre aislados del mismo ST y algunos no pudieron asignarse a ningún tipo de secuencia.

#### 4.5. Genes Accesorios Asociados a la Industria

El análisis de genes accesorios mediante Scoary permitió identificar genes asociados o enriquecidos, es decir, presentes con mayor frecuencia en determinados tipos de industria. Cada industria se evaluó como una variable independiente y se comparó frente al resto de aislados.

*Tabla 4. Genes accesorios asociados a industrias alimentarias según el análisis con Scoary.*

| Industria      | Gen        | Anotación funcional                                                         | Diferencia de frecuencia | Odds ratio | p ajustado (Benjamini-Hochberg) |
|----------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------|---------------------------------|
| Avícola        | group_1095 | Integrasa [bacteriófago A118]                                               | 0,45                     | 12,71      | 0,02580                         |
| Avícola        | radD       | Helicasa RadD de reparación del ADN                                         | 0,32                     | 48,00      | 0,02580                         |
| Avícola        | group_4158 | Proteína fágica de la familia HK97 gp10                                     | 0,32                     | 48,00      | 0,02580                         |
| Avícola        | group_6769 | Proteína RadA de reparación del ADN                                         | 0,27                     | inf        | 0,02580                         |
| Avícola        | group_5999 | Proteína FliR de biosíntesis flagelar                                       | 0,27                     | inf        | 0,02580                         |
| Avícola        | group_5576 | Proteína de membrana Yvja de la familia UPF0750                             | 0,27                     | inf        | 0,02580                         |
| Avícola        | qacH       | Transportador SMR de eflujo de compuestos de amonio cuaternario QacH        | 0,27                     | inf        | 0,02580                         |
| Avícola        | group_1285 | 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa                            | 0,27                     | inf        | 0,02580                         |
| Avícola        | group_1195 | 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa                        | 0,27                     | inf        | 0,02580                         |
| Avícola        | group_8279 | Proteína con dominio de unión al origen de replicación plasmídica           | 0,46                     | 8,89       | 0,02580                         |
| Avícola        | group_6779 | Proteína CopG                                                               | 0,46                     | 8,89       | 0,02580                         |
| Avícola        | group_6048 | Enzima de recombinación plasmídica de tipo 2                                | 0,46                     | 8,89       | 0,02580                         |
| Avícola        | emrC       | Subunidad de membrana externa del transportador de eflujo multidroga EmrC   | 0,46                     | 8,89       | 0,02580                         |
| Pesquera       | group_7602 | Proteína con dominio DUF2481                                                | 0,39                     | 60,67      | 0,01054                         |
| Pesquera       | group_9055 | Proteína con dominio de transcriptasa inversa                               | 0,38                     | 30,00      | 0,02363                         |
| Hortofrutícola | group_6081 | Proteína Lin1083                                                            | 0,83                     | inf        | 0,00084                         |
| Hortofrutícola | group_7193 | Proteína con dominio hélice-giro-hélice                                     | 0,65                     | 101,00     | 0,00084                         |
| Hortofrutícola | group_146  | Proteína de superficie de la familia BspA con repeticiones ricas en leucina | 0,65                     | 101,00     | 0,00084                         |
| Hortofrutícola | group_6071 | N-acetiltransferasa                                                         | 0,56                     | inf        | 0,00084                         |
| Hortofrutícola | group_3854 | Proteína con dominio DUF2481                                                | 0,56                     | inf        | 0,00084                         |
| Hortofrutícola | group_3784 | Proteína fágica                                                             | 0,56                     | inf        | 0,00084                         |
| Hortofrutícola | group_1059 | Proteína con dominio HTH tipo Cro/C1                                        | 0,79                     | inf        | 0,00301                         |
| Hortofrutícola | group_6074 | PlyA006                                                                     | 0,55                     | 127,50     | 0,00414                         |
| Hortofrutícola | group_3381 | Proteína con dominio de canal de protones MotA/TolQ/ExbB                    | 0,54                     | 63,13      | 0,00912                         |
| Hortofrutícola | group_2428 | Metaloproteasa de zinc FtsH dependiente de ATP                              | 0,54                     | 63,13      | 0,00912                         |
| Hortofrutícola | group_1122 | ADN polimerasa dependiente de RNA                                           | 0,54                     | 63,13      | 0,00912                         |
| Hortofrutícola | group_329  | Proteína con dominio peptidasa S8/S53                                       | 0,54                     | 63,13      | 0,00912                         |

*Nota:* El valor infinito (inf) aparece cuando el gen no se detecta en ningún aislado del grupo de comparación (el resto de las industrias), por lo que la odds ratio no puede expresarse con un valor numérico finito.

La tabla completa de Scoary se adjunta en el Anejo VI. Para confeccionar la Tabla 4 se seleccionaron únicamente los genes que cumplieron los siguientes criterios de filtrado:

- $p$  ajustado por Benjamini-Hochberg  $< 0,05$ , porque el análisis evaluó múltiples genes de forma simultánea y este ajuste se basa en el control de la tasa de falsos descubrimientos. El  $p$ -valor sin ajustar puede aumentar el riesgo de falsos positivos, mientras que la corrección de Bonferroni puede resultar demasiado restrictiva (Noble, 2009).
- Diferencia de frecuencia  $\geq 0,20$ , con el objetivo de seleccionar genes cuya presencia fuera relevante desde el punto de vista biológico.
- Presencia en al menos tres aislados de la industria, para evitar que la asociación estuviera muy condicionada al pequeño tamaño muestral.
- La odds ratio se utilizó como medida de fuerza de asociación.
- Significado biológico, se seleccionaron aquellos genes que ya se encontraban anotados.

Las industrias avícola y hortofrutícola fueron en las que apareció un mayor número de genes enriquecidos, seguidos de la industria pesquera. Para el resto de las industrias no se encontraron genes accesorios que superasen todos los criterios. Este resultado indica que la presencia de genes accesorios con asociación significativa no fue homogénea entre sectores, sino que apareció limitada a determinados grupos industriales.

Entre las anotaciones funcionales se observaron genes relacionados con elementos fágicos, proteínas de replicación o recombinación plasmídica, reparación del ADN, transporte de compuestos, motilidad y proteínas de superficie. Estos genes se localizaron en los resultados de Scoary y su función se determinó mediante las anotaciones de los archivos GFF3 generados por Bakta. La presencia de integrasas, proteínas fágicas y transcriptasas inversas indica que parte de las diferencias del genoma accesorio podría estar relacionada con elementos genéticos móviles. También se detectaron transportadores de eflujo y proteínas de superficie, que podrían estar vinculados con la adaptación a determinados entornos, como al estrés por presencia de biocidas.

Estos resultados deben interpretarse como un análisis exploratorio de asociación entre genes accesorios e industria de procedencia, ya que la asociación estadística de un gen con una industria no implica necesariamente una relación causal directa con ese sector al poder estar influida por la estructura clonal de los aislados. Por este motivo, los resultados de Scoary se interpretaron junto con el ST, el árbol filogenético y las distancias SNP.

Los resultados obtenidos mediante Scoary coinciden con un estudio donde la frecuencia de genes accesorios relacionados con la respuesta al estrés y la tolerancia a biocidas varió entre ambientes de procesamiento de carne y salmón (Fagerlund, Wagner, et al., 2022). Lakicevic et al de 2023 también señalan que el genoma accesorio puede contener determinantes que favorecen la supervivencia frente a las condiciones de estrés propias de la industria alimentaria (Lakicevic et al., 2023).

#### 4.6. Genes de Resistencia Antimicrobiana y Tolerancia a Biocidas

El análisis mediante AMRFinderPlus permitió identificar genes relacionados con resistencia antimicrobiana y tolerancia a biocidas en los aislados de *Listeria monocytogenes*. La Tabla 5 muestra los genes detectados por industria, el número de muestras positivas y su frecuencia. Los genes identificados se agruparon en dos categorías principales: genes relacionados con resistencia antimicrobiana, como *fosX*, *tet(S)*, *vga(G)* y *blal*, y genes asociados a tolerancia a biocidas o desinfectantes, como *bcrB*, *bcrC* y *qacH* (Mafuna et al., 2021; Manqele et al., 2024).

Tabla 5. Genes de resistencia antimicrobiana y tolerancia a biocidas detectados por industria.

| Gen           | Clase              | Industria             | Muestras positivas | Muestras totales industria | Frecuencia |
|---------------|--------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|------------|
| <i>bcrB</i>   | Bacitracina        | Avícola               | 1                  | 15                         | 0,07       |
|               | Bacitracina        | Cárnica               | 2                  | 28                         | 0,07       |
|               | Bacitracina        | Láctea                | 4                  | 37                         | 0,11       |
|               | Bacitracina        | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
|               | Bacitracina        | Pesquera              | 4                  | 20                         | 0,20       |
| <i>bcrC</i>   | Bacitracina        | Avícola               | 1                  | 15                         | 0,07       |
|               | Bacitracina        | Cárnica               | 2                  | 28                         | 0,07       |
|               | Bacitracina        | Láctea                | 4                  | 37                         | 0,11       |
|               | Bacitracina        | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
|               | Bacitracina        | Pesquera              | 4                  | 20                         | 0,20       |
| <i>blaI</i>   | Betalactámico      | Avícola               | 1                  | 15                         | 0,07       |
| <i>fosX</i>   | Fosfomicina        | Avícola               | 15                 | 15                         | 1,00       |
|               | Fosfomicina        | Cárnica               | 26                 | 28                         | 0,93       |
|               | Fosfomicina        | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
|               | Fosfomicina        | Hortofrutícola        | 9                  | 9                          | 1,00       |
|               | Fosfomicina        | Láctea                | 37                 | 37                         | 1,00       |
|               | Fosfomicina        | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
|               | Fosfomicina        | Pesquera              | 20                 | 20                         | 1,00       |
| <i>qacH</i>   | Amonio cuaternario | Avícola               | 4                  | 15                         | 0,27       |
|               | Amonio cuaternario | Hortofrutícola        | 3                  | 9                          | 0,33       |
|               | Amonio cuaternario | Láctea                | 4                  | 37                         | 0,11       |
|               | Amonio cuaternario | Pesquera              | 4                  | 20                         | 0,20       |
| <i>tet(S)</i> | Tetraciclina       | Avícola               | 1                  | 15                         | 0,07       |
| <i>vga(G)</i> | Lincosamida        | Avícola               | 11                 | 15                         | 0,73       |
|               | Lincosamida        | Cárnica               | 20                 | 28                         | 0,71       |
|               | Lincosamida        | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
|               | Lincosamida        | Hortofrutícola        | 9                  | 9                          | 1,00       |
|               | Lincosamida        | Láctea                | 33                 | 37                         | 0,89       |
|               | Lincosamida        | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
|               | Lincosamida        | Pesquera              | 19                 | 20                         | 0,95       |

En cuanto a los genes de resistencia antimicrobiana, *fosX* (resistencia a fosfomicina) y *vga(G)* (resistencia a lincosamidas) se detectaron en todas las industrias y fueron los que mayor frecuencia presentaron. Las frecuencias de *fosX* superaron el 0,90 en todas las industrias y las de *vga(G)*, el 0,70. El gen *fosX* se encuentra descrito con frecuencia en *Listeria* spp., por lo que no indica necesariamente una resistencia adquirida diferente entre sectores. También se detectaron *tet(S)* y *blaI*, ambos en la industria avícola, pero con frecuencias muy bajas (0,07). *Tet(S)* se asocia con resistencia a tetraciclina, mientras que *blaI* es un regulador asociado a sistemas de respuesta frente a betalactámicos y no implica por sí solo la presencia de una betalactamasa funcional.

Por otra parte, los genes *bcrB*, *bcrC* y *qacH* resultaron relevantes en el contexto de la industria alimentaria, ya que se relacionan con tolerancia a biocidas o desinfectantes (Mafuna et al., 2021; Manjele et al., 2024). *bcrB* y *bcrC* se relacionan con resistencia a bacitracina y se detectaron en las industrias avícola, cárnica, láctea, panadera/repostería y pesquera. El gen *qacH* se observó en avícola, hortofrutícola, láctea y pesquera con frecuencias similares. La presencia de estos genes

puede tener interés en ambientes sometidos a procesos frecuentes de limpieza y desinfección, donde la tolerancia a biocidas podría favorecer la persistencia de determinados aislados en superficies o instalaciones industriales.

Estos datos deben interpretarse como una caracterización genómica, ya que la detección de genes no sustituye a los ensayos fenotípicos de sensibilidad. La presencia de estos genes indica un potencial genético asociado a resistencia o tolerancia, pero no confirma por sí sola el comportamiento fenotípico de las cepas frente a antibióticos o desinfectantes. Esta diferencia entre genotipo y fenotipo también se observó en un artículo en el que se identificaron genes adquiridos de resistencia, incluido *tet(S)*, pero ninguno de los 144 aislados mostró resistencia frente a los antibióticos ensayados (Zhao et al., 2026). La manifestación de la resistencia puede depender de que el gen sea funcional y se exprese, de su regulación, de su interacción con otros mecanismos celulares y de las condiciones en las que se realiza el ensayo. Por tanto, no siempre es necesaria la presencia de otros genes ni la detección de un gen aislado garantiza que exista resistencia fenotípica.

La detección de *fosX* coincidió con estudios anteriores que lo describieron como un determinante intrínseco frecuente en *L. monocytogenes* (Mangele et al., 2024). Su presencia no implica necesariamente un problema para el tratamiento habitual de la listeriosis, pero el efecto de *tet(S)*, *vga(G)* y *blal* debe confirmarse mediante ensayos fenotípicos.

Los genes *bcrB*, *bcrC* y *qacH* están relacionados con sistemas de expulsión que pueden reducir la sensibilidad a compuestos de amonio cuaternario (Mafuna et al., 2021; Unrath et al., 2021). Esta tolerancia suele ser a dosis muy bajas de biocida y no implica necesariamente la supervivencia frente a concentraciones de desinfectante correctamente aplicadas en la industria alimentaria, pero puede favorecerla ante concentraciones residuales o subletales. Su presencia podría dificultar la eliminación de *L. monocytogenes* y favorecer contaminaciones recurrentes, por lo que el riesgo para la salud pública sería principalmente indirecto.

4.7. Genes Relacionados con la Formación de Biofilms y Persistencia

La búsqueda dirigida de genes relacionados con la formación de biofilms y persistencia permitió detectar ocho genes candidatos en los aislados analizados: *agrB*, *inlL*, *inlA*, *actA*, *degU*, *dltD*, *comK* y *recO* (Tabla 6). Estos genes están relacionados con procesos de adhesión, superficie celular, regulación, motilidad, virulencia o adaptación bacteriana, por lo que pueden aportar información sobre el potencial genómico de los aislados para persistir en ambientes industriales. En la Tabla 6 se muestran los genes detectados por industria, junto con el número de muestras positivas, el total de aislados analizados en cada sector y la frecuencia correspondiente.

Tabla 6. Genes relacionados con la formación de biofilms y persistencia detectados.

| Gen         | Industria             | Muestras positivas | Muestras totales industria | Frecuencia |
|-------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|------------|
| <i>agrB</i> | Avícola               | 15                 | 15                         | 1,00       |
| <i>agrB</i> | Cárnica               | 26                 | 28                         | 0,93       |
| <i>agrB</i> | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
| <i>agrB</i> | Hortofrutícola        | 9                  | 9                          | 1,00       |
| <i>agrB</i> | Láctea                | 37                 | 37                         | 1,00       |
| <i>agrB</i> | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
| <i>agrB</i> | Pesquera              | 20                 | 20                         | 1,00       |

Tabla 6. Genes relacionados con la formación de biofilms y persistencia detectados (continuación).

| Gen         | Industria             | Muestras positivas | Muestras totales industria | Frecuencia |
|-------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|------------|
| <i>inlL</i> | Avícola               | 3                  | 15                         | 0,20       |
| <i>inlL</i> | Cárnica               | 9                  | 28                         | 0,32       |
| <i>inlL</i> | Hortofrutícola        | 1                  | 9                          | 0,11       |
| <i>inlL</i> | Láctea                | 15                 | 37                         | 0,41       |
| <i>inlL</i> | Pesquera              | 2                  | 20                         | 0,10       |
| <i>inlA</i> | Avícola               | 8                  | 15                         | 0,53       |
| <i>inlA</i> | Cárnica               | 16                 | 28                         | 0,57       |
| <i>inlA</i> | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
| <i>inlA</i> | Hortofrutícola        | 9                  | 9                          | 1,00       |
| <i>inlA</i> | Láctea                | 33                 | 37                         | 0,89       |
| <i>inlA</i> | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
| <i>inlA</i> | Pesquera              | 18                 | 20                         | 0,90       |
| <i>actA</i> | Avícola               | 11                 | 15                         | 0,73       |
| <i>actA</i> | Cárnica               | 20                 | 28                         | 0,71       |
| <i>actA</i> | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
| <i>actA</i> | Hortofrutícola        | 8                  | 9                          | 0,89       |
| <i>actA</i> | Láctea                | 33                 | 37                         | 0,89       |
| <i>actA</i> | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
| <i>actA</i> | Pesquera              | 19                 | 20                         | 0,95       |
| <i>degU</i> | Avícola               | 15                 | 15                         | 1,00       |
| <i>degU</i> | Cárnica               | 27                 | 28                         | 0,96       |
| <i>degU</i> | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
| <i>degU</i> | Hortofrutícola        | 9                  | 9                          | 1,00       |
| <i>degU</i> | Láctea                | 37                 | 37                         | 1,00       |
| <i>degU</i> | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
| <i>degU</i> | Pesquera              | 20                 | 20                         | 1,00       |
| <i>dltD</i> | Avícola               | 15                 | 15                         | 1,00       |
| <i>dltD</i> | Cárnica               | 25                 | 28                         | 0,89       |
| <i>dltD</i> | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
| <i>dltD</i> | Hortofrutícola        | 9                  | 9                          | 1,00       |
| <i>dltD</i> | Láctea                | 37                 | 37                         | 1,00       |
| <i>dltD</i> | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
| <i>dltD</i> | Pesquera              | 20                 | 20                         | 1,00       |
| <i>comK</i> | Avícola               | 10                 | 15                         | 0,67       |
| <i>comK</i> | Cárnica               | 13                 | 28                         | 0,46       |
| <i>comK</i> | Hortofrutícola        | 1                  | 9                          | 0,11       |
| <i>comK</i> | Láctea                | 14                 | 37                         | 0,38       |
| <i>comK</i> | Pesquera              | 10                 | 20                         | 0,50       |
| <i>recO</i> | Avícola               | 14                 | 15                         | 0,93       |
| <i>recO</i> | Cárnica               | 26                 | 28                         | 0,93       |
| <i>recO</i> | Heladera              | 2                  | 2                          | 1,00       |
| <i>recO</i> | Hortofrutícola        | 8                  | 9                          | 0,89       |
| <i>recO</i> | Láctea                | 37                 | 37                         | 1,00       |
| <i>recO</i> | Panadera y repostería | 1                  | 1                          | 1,00       |
| <i>recO</i> | Pesquera              | 20                 | 20                         | 1,00       |

Los genes *agrB*, *inlA*, *actA*, *degU*, *dltD* y *recO* se detectaron en todas las industrias analizadas, por lo que no estuvieron restringidos a un sector concreto. Las funciones de cada uno de estos genes son las siguientes: *inlA* se relaciona con la interacción con superficies o células hospedadoras, *dltD* participa en la modificación de los ácidos teicoicos de la superficie celular, *degU* se ha asociado con la regulación de procesos como la motilidad y *recO* con la reparación y protección del ADN, contribuyendo a la supervivencia bacteriana en condiciones de estrés (Finn et al., 2023; Tessa et al., 2025; Wiktorczyk-Kapischke et al., 2023).

Los genes *inlL* y *comK* se detectaron en varias industrias, aunque ninguno apareció en los aislados de los sectores heladero ni en los panaderos y reposteros. Sin embargo, debido al reducido tamaño muestral de estos sectores concretos, no se puede afirmar que estas ausencias sean características intrínsecas de las cepas propias de estos sectores.

La presencia de estos genes indica que los aislados analizados presentan determinantes genéticos relacionados con procesos que pueden contribuir a la adhesión, adaptación y persistencia de *L. monocytogenes* en ambientes alimentarios. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse como una caracterización genómica y esta detección no confirma por sí sola la capacidad real de formar biofilm. Como ya se ha explicado, el proceso de formación de un biofilm depende también de la expresión génica, las condiciones ambientales, la superficie de contacto y la interacción con otros microorganismos. Varios de los genes detectados se han estudiado previamente como posibles marcadores de formación de biofilm o persistencia, el problema es que se han identificado tanto en cepas persistentes como en cepas no persistentes y ningún gen ha permitido explicar por sí solo este comportamiento (Finn et al., 2023).

La presencia de estos genes indica la necesidad de prestar especial atención a los puntos donde la limpieza y desinfección pueden ser menos eficaces (drenajes, juntas, grietas, cintas transportadoras y equipos difíciles de desmontar), ya que la persistencia de *L. monocytogenes* puede estar más relacionada con estos puntos conflictivos que con una característica genética única (Finn et al., 2023; Unrath et al., 2021). También resulta importante eliminar correctamente la materia orgánica, realizar una limpieza mecánica y revisar el diseño y mantenimiento de los equipos. La presencia de estos genes podría relacionarse con una mayor capacidad de supervivencia y recolonización, aunque serían necesarios ensayos fenotípicos y muestreos periódicos para confirmarlo.

#### 4.8. Biobanco Microbiano y Genómico

Finalmente, se generó un catálogo resumido del biobanco microbiano y genómico interno y confidencial de la empresa con la información principal de cada aislado analizado. Este biobanco, alojado en la empresa, incluyó la conservación del material genético de los aislados y de sus archivos FASTQ, FASTA, BAM y GFF3, junto con los resultados derivados de los análisis bioinformáticos. La tabla integró el identificador de muestra, la industria de procedencia, el clado filogenético, el ST, los genes relacionados con resistencia antimicrobiana o tolerancia a biocidas, los genes relacionados con la formación de biofilms/persistencia y las observaciones principales.

Este catálogo permite organizar de forma conjunta los resultados obtenidos durante todo el análisis bioinformático. Además, cada aislado quedó asociado a su origen industrial y a sus principales características genómicas. Al clasificar las muestras por clado filogenético y ST, se puede relacionar la información funcional de cada aislado con la estructura genética del conjunto de cepas.

El biobanco microbiano y genómico y su catálogo constituyen una herramienta útil para conservar y ordenar la información derivada de la caracterización de los aislados de *L. monocytogenes*. Esta

organización facilita la comparación de futuros aislados con los ya caracterizados, la detección de perfiles genéticos recurrentes, la incorporación de nuevas muestras o análisis genómicos y la selección de aislados para estudios posteriores. Debido al carácter confidencial de los genomas y de su procedencia, el repositorio no es de acceso público y su consulta se encuentra restringida al personal autorizado de la empresa. La tabla completa del catálogo se incluye en el Anejo VII.

La utilidad de este biobanco coincide con la descrita para otras colecciones de aislados de *L. monocytogenes*. En un estudio, una colección de 494 aislados del Laboratorio Nacional de Referencia de Alemania permitió comparar distintos métodos de tipado genómico y evaluar la compatibilidad de sus resultados (Lüth et al., 2021). En otro trabajo, una colección formada por aislados obtenidos durante varios años y en distintas industrias se empleó para identificar cepas genéticamente relacionadas y estudiar su posible permanencia o distribución entre instalaciones (Fagerlund, Wagner, et al., 2022).

También se ha visto que la disponibilidad de colecciones genómicas acompañadas de metadatos aumenta la capacidad para comparar nuevos aislados, investigar contaminaciones y reinterpretar resultados anteriores (Fagerlund, Idland, et al., 2022; Stasiewicz et al., 2015).

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró secuenciar y caracterizar genómicamente 112 aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de siete sectores de la industria alimentaria. La calidad obtenida permitió incluir todos los aislados en los análisis bioinformáticos posteriores.

La variabilidad de ST dentro de un mismo tipo de industria y la presencia de aislados sin ST asignado, ponen de manifiesto la importancia de la secuenciación de genoma completo a la hora de caracterizar *Listeria monocytogenes*. El uso exclusivo de la industria de procedencia o del tipado MLST resulta insuficiente para describir la diversidad genética de los aislados, especialmente cuando existen muestras que no pueden clasificarse mediante un ST definido.

Aunque se identificaron ST predominantes en todas las industrias, también aparecieron algunos tipos de secuencias comunes en varias industrias. Además, las distancias SNP dentro de una misma industria y entre las industrias fueron muy similares. Esto indica que un mismo sector alimentario puede contener aislados genéticamente diversos, mientras que cepas procedentes de sectores distintos pueden estar estrechamente relacionadas. Por tanto, la procedencia industrial no explica por sí sola la estructura genética de los aislados.

El ST y los clados filogenéticos explicaron mejor la proximidad genética de las cepas, ya que las distancias SNP dentro de un mismo ST fueron muy inferiores a las observadas entre ST diferentes. Los mapas de calor también sustentan esta hipótesis porque muestran agrupaciones más definidas al ordenar los aislados por ST que al ordenarlos por industria. De esta manera, se destaca la utilidad de combinar MLST, filogenia basada en *core genome* y análisis de SNPs para interpretar correctamente la relación entre aislados.

El análisis del genoma accesorio mostró que algunas diferencias entre industrias pueden estar relacionadas con genes concretos, especialmente en los sectores avícola, hortofrutícola y pesquero. Sin embargo, estas asociaciones deben interpretarse junto con la estructura clonal, ya que un gen enriquecido en una industria puede reflejar la presencia de determinados linajes y no necesariamente una adaptación exclusiva a ese sector.

La detección de genes relacionados con resistencia antimicrobiana, tolerancia a biocidas, formación de biofilms y persistencia indica que los aislados presentan determinantes genéticos de interés para su posible adaptación a ambientes de procesamiento alimentario. Esta información puede ayudar a orientar las medidas de vigilancia, limpieza y desinfección en las instalaciones. En caso de infección, también puede ser de gran utilidad señalar posibles mecanismos de resistencia (que deberían confirmarse mediante ensayos fenotípicos) antes de considerar la elección del tratamiento.

La generación del biobanco microbiano y genómico permitió conservar los aislados e integrar en una misma base de datos la información de origen industrial, ST, clado filogenético y genes de interés de cada aislado. Esta organización facilita la comparación entre cepas y constituye una base útil para futuros estudios de vigilancia genómica de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. Aunque el carácter confidencial de los datos impide su integración en repositorios públicos, la conservación interna del biobanco permitirá realizar comparaciones temporales, incorporar nuevos aislados y seleccionar cepas para futuros estudios genómicos o fenotípicos.

El análisis realizado permitió caracterizar los aislados disponibles procedentes de las muestras recibidas de forma rutinaria en el laboratorio de control de calidad de la empresa. Como el número

## 5. CONCLUSIONES

de aislados no fue el mismo en todos los sectores, las comparaciones entre industrias son limitadas y aplican únicamente para la colección analizada, sin generalizarlas al conjunto de cada sector. De cara a análisis futuros sería interesante incorporar nuevos aislados al biobanco para comprobar si los patrones observados se mantienen con un mayor tamaño muestral. Asimismo, los resultados genómicos obtenidos en este trabajo podrían completarse con futuros ensayos transcriptómicos, proteómicos o fenotípicos (de resistencia antimicrobiana, tolerancia a biocidas y formación de biofilms), que permitan confirmar la expresión y el efecto de los genes detectados.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angelo, K. M., Conrad, A. R., Saupe, A., Dragoo, H., West, N., Sorenson, A., Barnes, A., Doyle, M., Beal, J., Jackson, K. A., Stroika, S., Tarr, C., Kucerova, Z., Lance, S., Gould, L. H., Wise, M., & Jackson, B. R. (2017). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. *Epidemiology and Infection*, 145(5), 848–856. <https://doi.org/10.1017/S0950268816003083>
- Bardsley, C. A., Orsi, R. H., Clark, S., Murphy, C. M., McEntire, J. C., Wiedmann, M., & Strawn, L. K. (2024). Role of Whole Genome Sequencing in Assessing Resident and Transient *Listeria monocytogenes* in a Produce Packinghouse. *Journal of Food Protection*, 87(1). <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100201>
- Biggel, M., Cernela, N., Horlbog, J. A., & Stephan, R. (2024). Oxford Nanopore's 2024 sequencing technology for *Listeria monocytogenes* outbreak detection and source attribution: progress and clone-specific challenges. *Journal of Clinical Microbiology*, 62(11). <https://doi.org/10.1128/jcm.01083-24>
- Biokar Diagnostics. (n.d.). *COMPASS® Listeria Agar*.
- Biosan. (n.d.). *V-1 plus & V-32 Agitadores vórtex*.
- Bombelli, A., Crespo Tapia, N., Tempelaars, M. H., Boeren, S., den Besten, H. M. W., Abee, T., & Liu, Y. (2026). Evolution of *Listeria monocytogenes* to a strong biofilm producer via the overexpression of Lmo1799. *Microbiological Research*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2025.128379>
- Brynildsrud, O., Bohlin, J., Scheffer, L., & Eldholm, V. (2016). Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1108-8>
- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. (2019). *Informe de fin de seguimiento del brote de listeriosis*.
- Comisión de las Comunidades Europeas. (2005). *Reglamento (CE) 2073/2005*.
- Comisión Europea. (2024). Reglamento (UE) 2024/2895. In *EFSA Journal* (Vol. 21, Number 12). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- Comisión Europea. (2025). *Reglamento de Ejecución (UE) 2025/179*. <http://data.europa.eu/eli/dir/2003/99/oj>.
- Fagerlund, A., Idland, L., Heir, E., Møretrø, T., Aspholm, M., Lindbäck, T., Langsrud, S., & Dudley, E. G. (2022). Whole-Genome Sequencing Analysis of *Listeria monocytogenes* from Rural, Urban, and Farm Environments in Norway: Genetic Diversity, Persistence, and Relation to Clinical and Food Isolates *FOOD MICROBIOLOGY*. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Fagerlund, A., Wagner, E., Møretrø, T., Heir, E., Moen, B., Rychli, K., & Langsrud, S. (2022). Pervasive *Listeria monocytogenes* Is Common in the Norwegian Food System and Is Associated with Increased Prevalence of Stress Survival and Resistance Determinants. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(18). <https://doi.org/10.1128/aem.00861-22>

- Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., & Klimke, W. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>
- Fernández-Martínez, N. F., Ruiz-Montero, R., Briones, E., Baños, E., Rodríguez-Alarcón, L. G. S. M., Chaves, J. A., Abad, R., Varela, C., Lorusso, N., Antiñolo, G., Elías, C., López, J. J., López Márquez, M. R., Riazio, C., Luque, R. S., Almela, A. F. de S., Milena, A. P., Smani, Y., de la Torre Cisneros, J., ... Moreno, J. V. (2022). Listeriosis outbreak caused by contaminated stuffed pork, Andalusia, Spain, July to October 2019. *Eurosurveillance*, 27(43). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.43.2200279>
- Finn, L., Onyeaka, H., & O'Neill, S. (2023). *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Associated Environments: A Persistent Enigma. In *Foods* (Vol. 12, Number 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods12183339>
- Ji, S., Song, Z., Luo, L., Wang, Y., Li, L., Mao, P., Ye, C., & Wang, Y. (2023). Whole-genome sequencing reveals genomic characterization of *Listeria monocytogenes* from food in China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1049843>
- Lakicevic, B., Jankovic, V., Pietzka, A., & Ruppitsch, W. (2023). Wholegenome sequencing as the gold standard approach for control of *Listeria monocytogenes* in the food chain. In *Journal of Food Protection* (Vol. 26, Number 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.10.002>
- LBX Instruments. (n.d.). *MC7000 Mini centrifuge*. Retrieved [www.labbox.com](http://www.labbox.com)
- Lecuit, M. (2020). *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. In *Cellular Microbiology* (Vol. 22, Number 4). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cmi.13186>
- Lee, S. H., Lee, S., Park, S. H., & Koo, O. K. (2023). Whole-genome sequencing of *Listeria monocytogenes* isolated from the first listeriosis foodborne outbreak in South Korea. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1182090>
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78–W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Luan, T., Commichaux, S., Hoffmann, M., Jayeola, V., Jang, J. H., Pop, M., Rand, H., & Luo, Y. (2024). Benchmarking short and long read polishing tools for nanopore assemblies: achieving near-perfect genomes for outbreak isolates. *BMC Genomics*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10582-x>
- Lucchini, R., Carraro, L., Pauletto, M., Gallo, M., Andreani, N. A., Weiss, G., Tessaro, C., Babbucci, M., & Cardazzo, B. (2023). Molecular typing and genome sequencing allow the identification of persistent *Listeria monocytogenes* strains and the tracking of the contamination source in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, 386. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110025>
- Lüth, S., Deneke, C., Kleta, S., & Dahouk, S. Al. (2021). Translatability of wgs typing results can simplify data exchange for surveillance and control of *Listeria monocytogenes*. *Microbial Genomics*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000491>

- Mafuna, T., Matle, I., Magwedere, K., Pierneef, R. E., & Reva, O. N. (2021). Whole Genome-Based Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates Recovered From the Food Chain in South Africa. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669287>
- Manqele, A., Adesiyun, A., Mafuna, T., Pierneef, R., Moerane, R., & Gcebe, N. (2024). Virulence Potential and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates Obtained from Beef and Beef-Based Products Deciphered Using Whole-Genome Sequencing. *Microorganisms*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061166>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Ministerio de la Presidencia. (1997). *Real Decreto 664/1997*.
- Noble, W. S. (2009). How does multiple testing correction work? In *Nature Biotechnology* (Vol. 27, Number 12, pp. 1135–1137). <https://doi.org/10.1038/nbt1209-1135>
- Orto Alresa. (n.d.). *Centrifuga DIGICEN 21*.
- Oxford Nanopore Technologies. (n.d.-a). *Bacterial & Fungal Genomes*. EPI2ME Documentation. Retrieved June 15, 2026, from <https://epi2me.nanoporetech.com/epi2me-docs/workflows/wf-bacterial-genomes/>
- Oxford Nanopore Technologies. (n.d.-b). *Dorado*. Oxford Nanopore Technologies. Retrieved June 15, 2026, from <https://nanoporetech.com/software/other/dorado>
- Oxford Nanopore Technologies. (2025). *SQK-RBK114.24*.
- Oxford Nanopore Technologies. (2026). *SQK-RPB114.24*.
- Oxoid. (n.d.). *24 LEB Complete CM1154*.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2002). *Reglamento (CE) No 178/2002*.
- Parlamento Europeo y Consejo de la Unión Europea. (2004). *Reglamento (CE) N° 852/2004*.
- Schiavano, G. F., Ateba, C. N., Petruzzelli, A., Mele, V., Amagliani, G., Guidi, F., De Santi, M., Pomilio, F., Blasi, G., Gattuso, A., Di Lullo, S., Rocchegiani, E., & Brandi, G. (2022). Whole-genome sequencing characterization of virulence profiles of *Listeria monocytogenes* food and human isolates and in vitro adhesion/invasion assessment. *Microorganisms*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010062>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000685>
- Seemann, T. (2026). *SNP-dists: Pairwise SNP distance matrix from a FASTA sequence alignment*. GitHub. <https://github.com/tseemann/snp-dists>
- Stasiewicz, M. J., Oliver, H. F., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). Whole-genome sequencing allows for improved identification of persistent *Listeria monocytogenes* in food-associated environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 6024–6037. <https://doi.org/10.1128/AEM.01049-15>

- Stessl, B., Wagner, M., & Ruppitsch, W. (2021). Multilocus sequence typing (mlst) and whole genome sequencing (wgs) of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2220, pp. 89–103). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0982-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0982-8_7)
- Sutter, J. P., Kocheise, L., Kempfski, J., Christner, M., Wichmann, D., Pinnschmidt, H., Schmiedel, S., Lohse, A. W., Huber, S., & Brehm, T. T. (2024). Gentamicin combination treatment is associated with lower mortality in patients with invasive listeriosis: a retrospective analysis. *Infection*, 52(4), 1601–1606. <https://doi.org/10.1007/s15010-024-02330-w>
- Tessa, T., Marieke, M., Charlotte, P., Evelien, D. C., Peter, V., Katleen, R., Paco, H., & Imca, S. (2025). Unravelling *Listeria monocytogenes* persistence in frozen potato processing: Insights from whole genome sequencing analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 441. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111334>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *SimpliAmp™ Thermal Cycler*.
- Thermo Fisher Scientific. (2021). *Qubit™ 4 Fluorometer User Guide*.
- Thermo Fisher Scientific. (2022). *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit*.
- Thønnings, S., Knudsen, J. D., Schønheyder, H. C., Søgaard, M., Arpi, M., Gradel, K. O., Østergaard, C., Jensen, U. S., Koch, K., Smit, J., & Pinholt, M. (2016). Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(8), 725–730. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.006>
- Tonkin-Hill, G., MacAlasdair, N., Ruis, C., Weimann, A., Horesh, G., Lees, J. A., Gladstone, R. A., Lo, S., Beaudoin, C., Floto, R. A., Frost, S. D. W., Corander, J., Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2020). Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02090-4>
- Truchado, P., Gil, M. I., Querido-Ferreira, A. P., Capón, C. L., Álvarez-Ordoñez, A., & Allende, A. (2022). Frozen Vegetable Processing Plants Can Harbour Diverse *Listeria monocytogenes* Populations: Identification of Critical Operations by WGS. *Foods*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/foods11111546>
- Unrath, N., McCabe, E., Macori, G., & Fanning, S. (2021). Application of whole genome sequencing to aid in deciphering the persistence potential of *Listeria monocytogenes* in food production environments. In *Microorganisms* (Vol. 9, Number 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091856>
- Wang, Y., Huang, C., Wu, S., Jia, J., Pan, T., Wang, R., Li, J., Wang, Z., Meng, C., Yin, Y., & Jiao, X. (2026). Whole genome sequencing reveals transmission dynamics and persistence of *Listeria monocytogenes* along the poultry slaughtering and processing chain. *International Journal of Food Microbiology*, 448. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111568>
- Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., & Wałęcka-Zacharska, E. (2023). Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*—overview of selected aspects. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1161486>
- Zhao, J., Li, L., Li, M., Yang, D., Yan, L., Nong, Y., Yan, S., & Bai, L. (2026). Whole-genome sequencing of *Listeria monocytogenes* isolated from retail enoki mushrooms in China highlights public

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

health risk. *International Journal of Food Microbiology*, 444.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111449>

Zymo Research. (2023). *ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit for microbiome or metagenome analyses*.

## ANEJO I. Estadísticas de calidad individuales para todos los ensamblajes.

| Muestra   | Tamaño<br>ensamblaje (pb) | Número<br>contigs | N50 (pb) | Contig más largo (pb) | GC (%) | Cobertura<br>media (x) |
|-----------|---------------------------|-------------------|----------|-----------------------|--------|------------------------|
| Lmono_1   | 2912591                   | 5                 | 782233   | 930888                | 37,96  | 33,47                  |
| Lmono_101 | 2941350                   | 1                 | 2941350  | 2941350               | 38,00  | 156,50                 |
| Lmono_102 | 3032828                   | 5                 | 991107   | 1313251               | 37,88  | 71,65                  |
| Lmono_104 | 3047902                   | 3                 | 3029999  | 3029999               | 37,91  | 32,36                  |
| Lmono_105 | 3035030                   | 2                 | 3029914  | 3029914               | 37,92  | 78,21                  |
| Lmono_106 | 2918767                   | 3                 | 1572928  | 1572928               | 38,01  | 96,91                  |
| Lmono_107 | 2926297                   | 2                 | 2909155  | 2909155               | 38,05  | 174,55                 |
| Lmono_108 | 2932062                   | 2                 | 2926038  | 2926038               | 38,07  | 63,32                  |
| Lmono_109 | 2943083                   | 3                 | 2920445  | 2920445               | 38,03  | 76,20                  |
| Lmono_111 | 2943292                   | 1                 | 2943292  | 2943292               | 38,03  | 121,24                 |
| Lmono_112 | 2966003                   | 3                 | 2891767  | 2891767               | 37,39  | 200,23                 |
| Lmono_115 | 2917049                   | 4                 | 1569916  | 1569916               | 37,38  | 76,22                  |
| Lmono_116 | 3003790                   | 4                 | 1603668  | 1603668               | 37,32  | 137,03                 |
| Lmono_117 | 3100493                   | 3                 | 3033172  | 3033172               | 37,93  | 86,87                  |
| Lmono_118 | 3099260                   | 4                 | 3015307  | 3015307               | 37,92  | 155,55                 |
| Lmono_120 | 3129572                   | 5                 | 1627560  | 1627560               | 37,81  | 176,04                 |
| Lmono_121 | 3057041                   | 5                 | 1592876  | 1592876               | 37,93  | 95,04                  |
| Lmono_123 | 3141567                   | 3                 | 3122814  | 3122814               | 37,82  | 96,41                  |
| Lmono_125 | 3057640                   | 4                 | 2975986  | 2975986               | 37,97  | 92,01                  |
| Lmono_127 | 6458028                   | 122               | 107645   | 340465                | 37,39  | 24,95                  |
| Lmono_128 | 5360570                   | 165               | 509247   | 2197257               | 37,61  | 33,48                  |
| Lmono_131 | 2910377                   | 21                | 369614   | 631151                | 38,03  | 13,96                  |
| Lmono_134 | 2910804                   | 2                 | 2893483  | 2893483               | 37,96  | 143,15                 |
| Lmono_139 | 3100955                   | 3                 | 3032968  | 3032968               | 37,93  | 119,78                 |
| Lmono_140 | 2941100                   | 3                 | 2918427  | 2918427               | 38,02  | 81,39                  |
| Lmono_142 | 2927162                   | 4                 | 1188280  | 1228246               | 37,97  | 29,01                  |
| Lmono_145 | 2998722                   | 2                 | 2992766  | 2992766               | 37,96  | 44,67                  |
| Lmono_146 | 2942220                   | 2                 | 2936448  | 2936448               | 38,04  | 51,35                  |
| Lmono_149 | 2921289                   | 3                 | 2913443  | 2913443               | 38,00  | 22,50                  |
| Lmono_15  | 3027149                   | 8                 | 657354   | 861144                | 37,90  | 29,00                  |
| Lmono_152 | 3052330                   | 3                 | 2966257  | 2966257               | 37,94  | 109,51                 |
| Lmono_155 | 3048719                   | 4                 | 2960549  | 2960549               | 37,95  | 122,13                 |
| Lmono_157 | 3056594                   | 4                 | 2975880  | 2975880               | 37,96  | 48,95                  |
| Lmono_158 | 2937118                   | 3                 | 1586978  | 1586978               | 38,08  | 91,36                  |
| Lmono_160 | 2971771                   | 12                | 1753606  | 1753606               | 38,13  | 13,97                  |
| Lmono_161 | 2900948                   | 4                 | 1604947  | 1604947               | 37,38  | 23,47                  |
| Lmono_163 | 2910764                   | 2                 | 2904742  | 2904742               | 37,43  | 100,48                 |
| Lmono_166 | 3983185                   | 97                | 213017   | 471985                | 38,05  | 15,91                  |
| Lmono_169 | 2993163                   | 7                 | 801999   | 1327581               | 37,84  | 20,93                  |
| Lmono_17  | 2973222                   | 2                 | 2968321  | 2968321               | 38,00  | 22,47                  |
| Lmono_171 | 2776916                   | 211               | 24762    | 75936                 | 37,97  | 10,27                  |
| Lmono_175 | 5859743                   | 122               | 90827    | 416266                | 36,90  | 9,15                   |

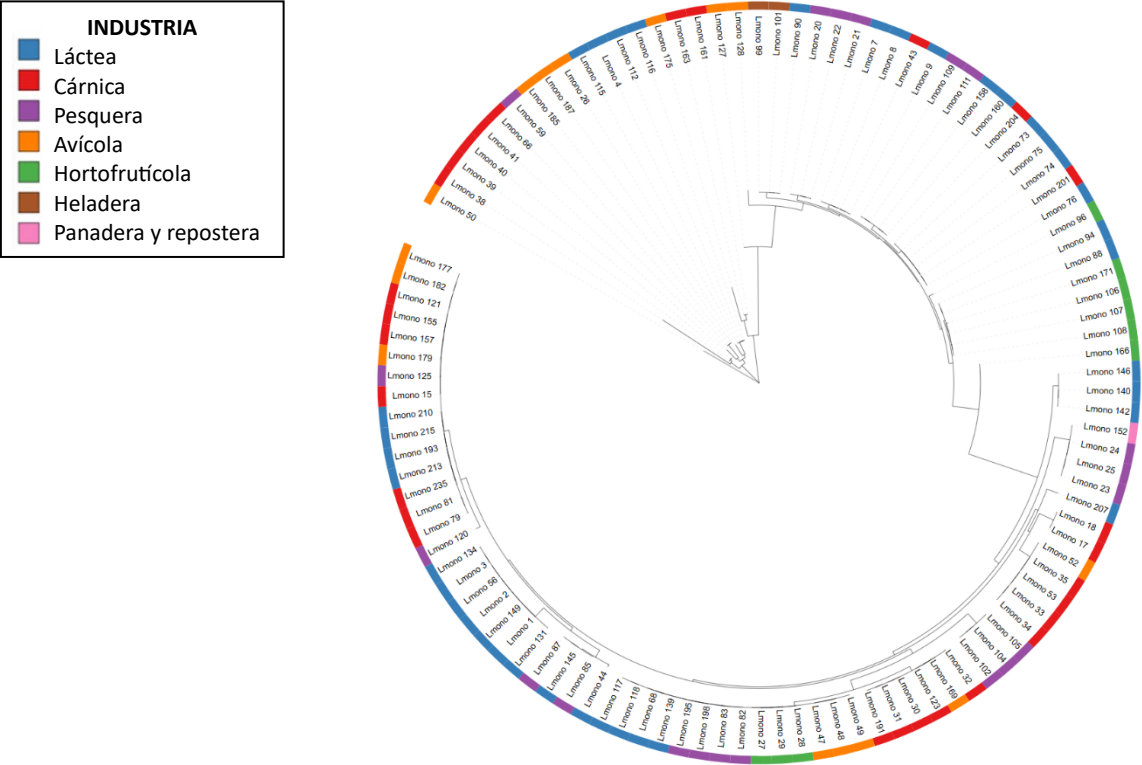
ANEJO I. Estadísticas de calidad individuales para todos los ensamblajes.

|           |         |    |         |         |       |        |
|-----------|---------|----|---------|---------|-------|--------|
| Lmono_177 | 3046868 | 6  | 895239  | 1361986 | 37,94 | 24,61  |
| Lmono_179 | 3060954 | 4  | 2972920 | 2972920 | 37,97 | 48,45  |
| Lmono_18  | 2965244 | 5  | 866676  | 1310096 | 37,96 | 37,77  |
| Lmono_182 | 3039391 | 5  | 2933049 | 2933049 | 37,94 | 22,07  |
| Lmono_185 | 3065469 | 2  | 2995961 | 2995961 | 37,39 | 52,10  |
| Lmono_187 | 3070987 | 4  | 2977976 | 2977976 | 37,41 | 123,69 |
| Lmono_191 | 2991755 | 7  | 924678  | 1160653 | 37,85 | 22,90  |
| Lmono_193 | 3066345 | 1  | 3066345 | 3066345 | 37,96 | 21,11  |
| Lmono_195 | 3150421 | 8  | 845362  | 1047434 | 37,85 | 21,05  |
| Lmono_198 | 3133964 | 55 | 132305  | 423794  | 37,92 | 13,93  |
| Lmono_2   | 2920850 | 2  | 2915743 | 2915743 | 38,00 | 94,85  |
| Lmono_20  | 3050378 | 4  | 2046256 | 2046256 | 37,90 | 49,97  |
| Lmono_201 | 2908094 | 3  | 1587615 | 1587615 | 38,00 | 21,93  |
| Lmono_204 | 2912310 | 7  | 668581  | 1294697 | 38,03 | 22,23  |
| Lmono_207 | 2957209 | 3  | 2934594 | 2934594 | 37,99 | 27,37  |
| Lmono_21  | 2988491 | 4  | 1499922 | 1499922 | 38,00 | 59,46  |
| Lmono_210 | 3062345 | 3  | 1014673 | 1520042 | 37,94 | 26,22  |
| Lmono_213 | 3062072 | 3  | 2157591 | 2157591 | 37,94 | 171,78 |
| Lmono_215 | 3133571 | 6  | 2765010 | 2765010 | 37,94 | 100,00 |
| Lmono_22  | 3058474 | 5  | 2046470 | 2046470 | 37,93 | 70,78  |
| Lmono_23  | 3012753 | 3  | 1965553 | 1965553 | 37,92 | 37,44  |
| Lmono_235 | 3171008 | 11 | 2151422 | 2151422 | 37,92 | 34,26  |
| Lmono_24  | 3018005 | 4  | 1965610 | 1965610 | 37,94 | 59,77  |
| Lmono_25  | 3019685 | 3  | 2933678 | 2933678 | 37,95 | 112,90 |
| Lmono_26  | 3013525 | 4  | 1631988 | 1631988 | 37,32 | 37,59  |
| Lmono_27  | 3020155 | 5  | 977528  | 1295149 | 38,04 | 36,40  |
| Lmono_28  | 3016685 | 7  | 1301347 | 1477787 | 38,06 | 15,27  |
| Lmono_29  | 3030782 | 3  | 2962554 | 2962554 | 38,09 | 50,30  |
| Lmono_3   | 2913943 | 3  | 1967151 | 1967151 | 37,97 | 53,49  |
| Lmono_30  | 1060490 | 3  | 1039714 | 1039714 | 38,22 | 38,20  |
| Lmono_31  | 602300  | 3  | 581391  | 581391  | 38,24 | 52,59  |
| Lmono_32  | 3012490 | 3  | 2994687 | 2994687 | 37,90 | 27,21  |
| Lmono_33  | 2961457 | 3  | 1965529 | 1965529 | 37,88 | 41,60  |
| Lmono_34  | 2960921 | 3  | 1620252 | 1620252 | 37,87 | 43,16  |
| Lmono_35  | 2974581 | 2  | 2968560 | 2968560 | 37,94 | 33,28  |
| Lmono_38  | 6135229 | 67 | 248389  | 991413  | 37,66 | 60,39  |
| Lmono_39  | 2949785 | 4  | 2291750 | 2291750 | 37,47 | 51,16  |
| Lmono_4   | 3008963 | 2  | 2939820 | 2939820 | 37,35 | 135,02 |
| Lmono_40  | 2046963 | 4  | 1261644 | 1261644 | 37,63 | 34,22  |
| Lmono_41  | 2920229 | 3  | 2834906 | 2834906 | 37,56 | 98,12  |
| Lmono_43  | 2930764 | 2  | 2924765 | 2924765 | 38,03 | 159,81 |
| Lmono_44  | 2919004 | 2  | 2912978 | 2912978 | 38,02 | 89,88  |
| Lmono_47  | 3029298 | 6  | 798829  | 810964  | 37,96 | 41,60  |
| Lmono_48  | 3040079 | 3  | 2974048 | 2974048 | 38,00 | 43,18  |
| Lmono_49  | 3024033 | 3  | 2958017 | 2958017 | 38,10 | 53,70  |
| Lmono_50  | 6013534 | 51 | 194560  | 635666  | 37,53 | 19,71  |
| Lmono_52  | 2960137 | 3  | 1620252 | 1620252 | 37,87 | 53,53  |

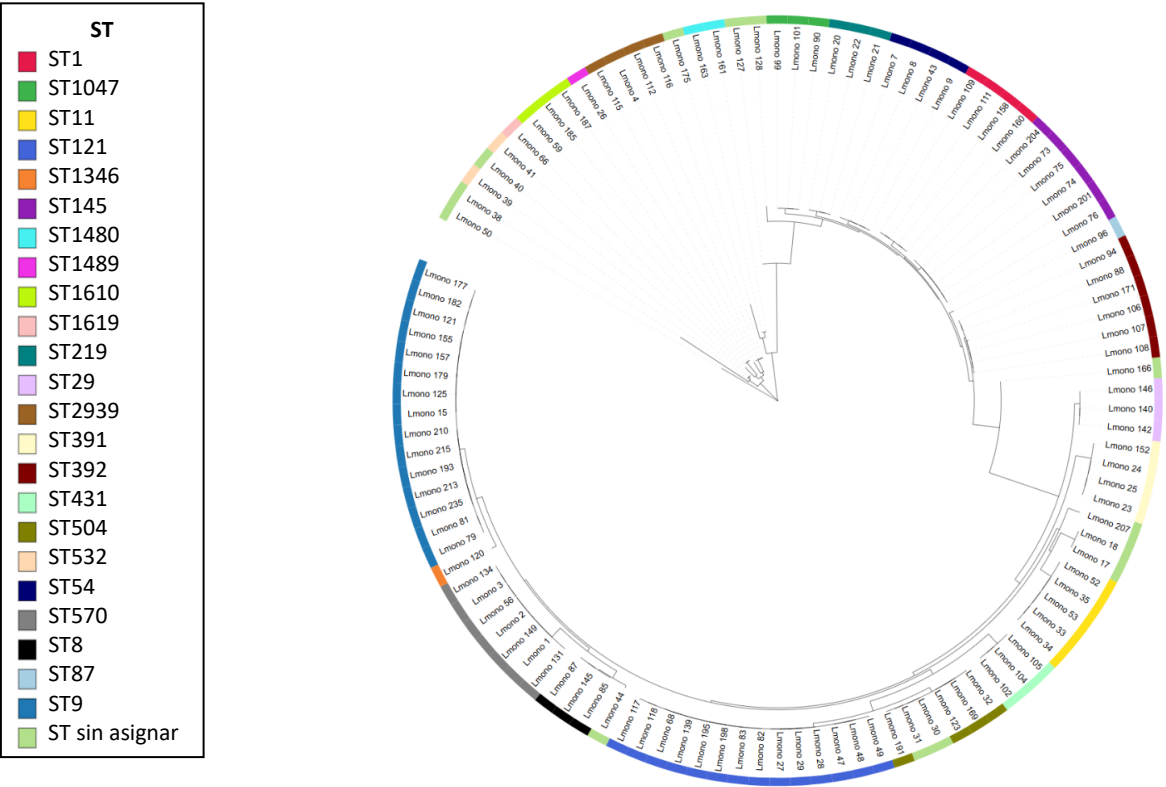
|          |         |   |         |         |       |        |
|----------|---------|---|---------|---------|-------|--------|
| Lmono_53 | 2974567 | 2 | 2968561 | 2968561 | 37,94 | 80,57  |
| Lmono_56 | 2921754 | 2 | 2915743 | 2915743 | 38,01 | 87,18  |
| Lmono_59 | 3062746 | 4 | 1594804 | 1594804 | 37,40 | 36,19  |
| Lmono_66 | 2883553 | 4 | 1559720 | 1559720 | 37,47 | 38,31  |
| Lmono_68 | 3101195 | 3 | 3032966 | 3032966 | 37,93 | 110,07 |
| Lmono_7  | 2924248 | 3 | 1979832 | 1979832 | 38,00 | 38,84  |
| Lmono_73 | 2910100 | 3 | 1599339 | 1599339 | 38,01 | 31,52  |
| Lmono_74 | 2914459 | 4 | 1520582 | 1520582 | 38,04 | 20,01  |
| Lmono_75 | 2908552 | 3 | 1587627 | 1587627 | 38,00 | 187,79 |
| Lmono_76 | 2915088 | 2 | 2898566 | 2898566 | 38,04 | 141,87 |
| Lmono_79 | 3042774 | 5 | 2951762 | 2951762 | 37,92 | 85,86  |
| Lmono_8  | 2924494 | 3 | 1980197 | 1980197 | 38,00 | 53,87  |
| Lmono_81 | 3054122 | 2 | 2974777 | 2974777 | 37,93 | 183,04 |
| Lmono_82 | 3023316 | 4 | 1649143 | 1649143 | 38,06 | 84,12  |
| Lmono_83 | 3030896 | 3 | 2962416 | 2962416 | 38,09 | 70,28  |
| Lmono_85 | 2973421 | 4 | 2938008 | 2938008 | 37,97 | 83,38  |
| Lmono_87 | 2964304 | 3 | 2954007 | 2954007 | 37,97 | 89,81  |
| Lmono_88 | 2967675 | 3 | 2944545 | 2944545 | 38,01 | 92,47  |
| Lmono_9  | 2930127 | 2 | 2924766 | 2924766 | 38,02 | 96,10  |
| Lmono_90 | 2946459 | 2 | 2941350 | 2941350 | 38,02 | 82,09  |
| Lmono_94 | 2982690 | 6 | 1620849 | 1620849 | 38,03 | 31,51  |
| Lmono_96 | 2904113 | 3 | 1564036 | 1564036 | 38,01 | 100,44 |
| Lmono_99 | 2940784 | 3 | 2918421 | 2918421 | 38,00 | 92,33  |

*Nota:* N50 indica la longitud para la cual el 50 % del genoma ensamblado está contenido en contigs de ese tamaño o mayores. Un contig es una secuencia continua de DNA formada al ensamblar lecturas solapadas. La cobertura se refiere al número medio de veces que se ha leído cada posición del genoma.

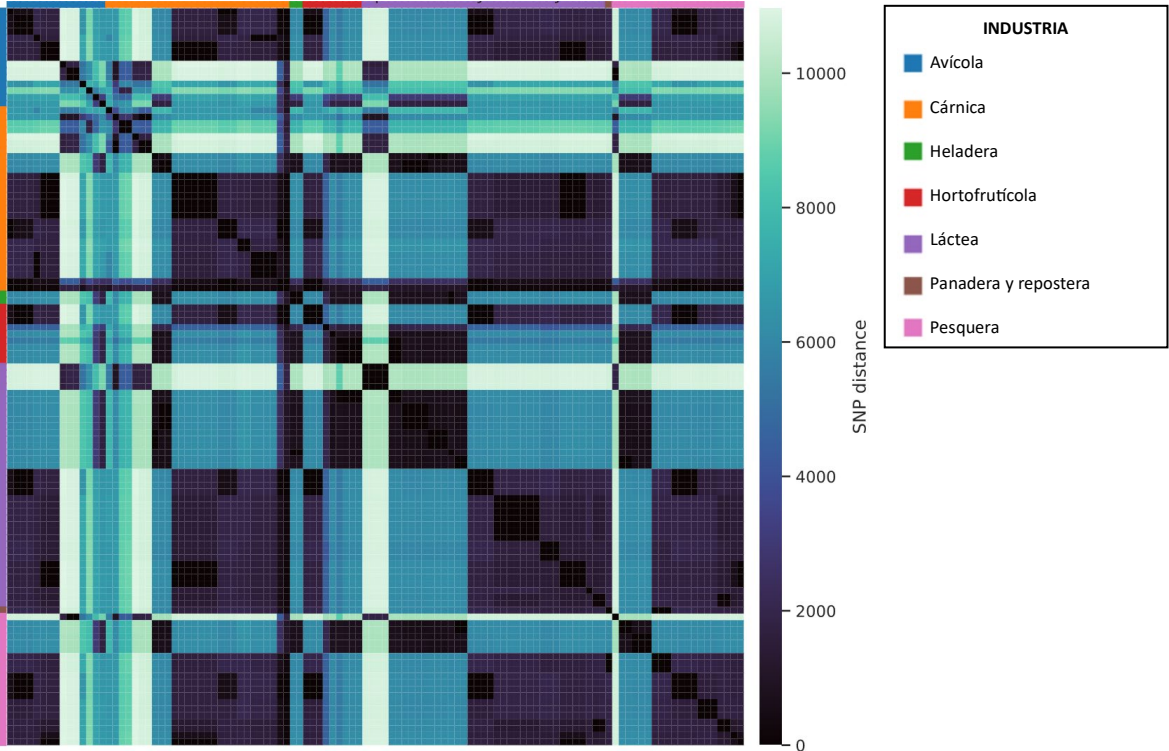
ANEJO II. Árbol filogenético basado en el *core genome* según la industria de procedencia.



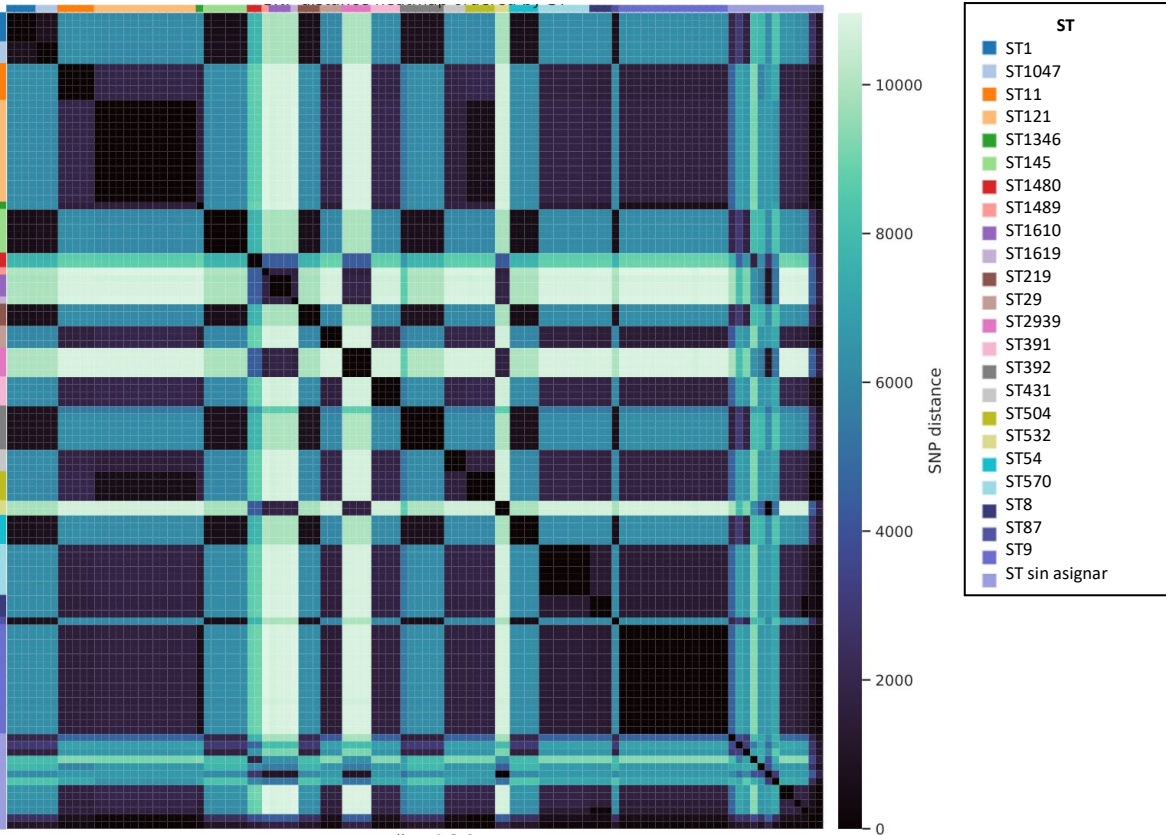
ANEJO III. Árbol filogenético basado en el *core genome* según el ST.



**ANEJO IV. Mapa de calor de distancias SNP entre aislamientos ordenados según la industria de procedencia sin líneas.**



**ANEJO V. Mapa de calor de distancias SNP entre aislamientos ordenados según ST sin líneas.**



**ANEJO VI. Tabla completa de Scoary.**

| Industria | Gen        | Anotación funcional                                                         | Diferencia de frecuencia | Odds ratio | p ajustado (Naive) | p ajustado (Bonferroni) | p ajustado (Benjamini-Hochberg) |
|-----------|------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------|--------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Avícola   | group_1835 | hypothetical protein                                                        | 0,39                     | 64,00      | 0,00001            | 0,13376                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_1095 | Integrase [Bacteriophage A118]                                              | 0,45                     | 12,71      | 0,00010            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_8662 | hypothetical protein                                                        | 0,32                     | 48,00      | 0,00012            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | radD       | Putative DNA repair helicase RadD                                           | 0,32                     | 48,00      | 0,00012            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_4158 | HK97 gp10 family phage protein                                              | 0,32                     | 48,00      | 0,00012            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_8460 | Uncharacterized protein YacL                                                | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_6769 | DNA repair protein RadA                                                     | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_5999 | Flagellar biosynthetic protein FliR                                         | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_5576 | UPF0750 membrane protein YvjA                                               | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | qacH       | quaternary ammonium compound efflux SMR transporter QacH                    | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_3255 | hypothetical protein                                                        | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | radA       | hypothetical protein;DNA repair protein RadA                                | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | yacL       | hypothetical protein;Uncharacterized protein YacL                           | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_1285 | 2-C-methyl-D-erythritol 24-cyclodiphosphate synthase;hypothetical protein   | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_1195 | 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase;hypothetical protein | 0,27                     | inf        | 0,00022            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_8279 | Plasmid replication protein origin binding domain-containing protein        | 0,46                     | 8,89       | 0,00033            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_6779 | Protein CopG                                                                | 0,46                     | 8,89       | 0,00033            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_6048 | Plasmid recombination enzyme type 2                                         | 0,46                     | 8,89       | 0,00033            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | group_6045 | hypothetical protein                                                        | 0,46                     | 8,89       | 0,00033            | 1,00000                 | 0,02580                         |
| Avícola   | emrC       | multidrug efflux transporter outer membrane subunit EmrC                    | 0,46                     | 8,89       | 0,00033            | 1,00000                 | 0,02580                         |

|          |            |                                                                   |      |       |         |         |         |
|----------|------------|-------------------------------------------------------------------|------|-------|---------|---------|---------|
| Cárnica  | group_2291 | type I site-specific deoxyribonuclease                            | 0,38 | 7,40  | 0,00007 | 0,72330 | 0,08265 |
| Cárnica  | group_1447 | hypothetical protein                                              | 0,39 | 6,92  | 0,00008 | 0,74381 | 0,08265 |
| Cárnica  | group_4674 | hypothetical protein                                              | 0,24 | 27,67 | 0,00022 | 1,00000 | 0,12268 |
| Cárnica  | group_3874 | YopX protein domain-containing protein                            | 0,24 | 27,67 | 0,00022 | 1,00000 | 0,12268 |
| Cárnica  | group_961  | hypothetical protein                                              | 0,24 | 27,67 | 0,00022 | 1,00000 | 0,12268 |
| Cárnica  | group_4374 | HTH cro/C1-type domain-containing protein                         | 0,30 | 8,78  | 0,00029 | 1,00000 | 0,12268 |
| Cárnica  | group_3675 | CopY                                                              | 0,30 | 8,78  | 0,00029 | 1,00000 | 0,12268 |
| Cárnica  | group_8652 | Protein gp20 [Bacteriophage A118]                                 | 0,37 | 5,77  | 0,00030 | 1,00000 | 0,12334 |
| Cárnica  | group_77   | L-alanyl-D-glutamate peptidase; DUF5776 domain-containing protein | 0,32 | 6,25  | 0,00046 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_8436 | hypothetical protein                                              | 0,36 | 5,31  | 0,00046 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_3662 | Gp39                                                              | 0,36 | 5,31  | 0,00046 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_8481 | hypothetical protein                                              | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_7571 | Transposase;hypothetical protein                                  | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_7244 | WYL domain-containing protein;hypothetical protein                | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_6929 | DUF4391 domain-containing protein                                 | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_6826 | hypothetical protein                                              | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_6653 | hypothetical protein                                              | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_4702 | hypothetical protein                                              | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_4416 | DNA-binding protein                                               | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Cárnica  | group_4329 | Plasmid replication protein                                       | 0,29 | 7,22  | 0,00064 | 1,00000 | 0,14328 |
| Heladera | group_4234 | TIGR04197 family type VII secretion effector                      | 0,99 | inf   | 0,00048 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_3693 | DUF5082 domain-containing protein                                 | 0,99 | inf   | 0,00048 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_3613 | DUF5085 domain-containing protein                                 | 0,99 | inf   | 0,00048 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_4778 | hypothetical protein                                              | 0,98 | inf   | 0,00097 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_4750 | hypothetical protein                                              | 0,98 | inf   | 0,00097 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_2321 | DUF4236 domain-containing protein                                 | 0,98 | inf   | 0,00097 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_3940 | hypothetical protein                                              | 0,96 | inf   | 0,00338 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_2125 | Restriction endonuclease                                          | 0,96 | inf   | 0,00338 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera | group_5784 | Lin0606 protein                                                   | 0,95 | inf   | 0,00450 | 1,00000 | 1,00000 |

|                |            |                                                                      |      |        |         |         |         |
|----------------|------------|----------------------------------------------------------------------|------|--------|---------|---------|---------|
| Heladera       | group_3146 | Biotin transporter                                                   | 0,95 | inf    | 0,00450 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_3481 | CRISPR-associated exonuclease Cas4                                   | 0,94 | inf    | 0,00579 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_3648 | hypothetical protein                                                 | 0,93 | inf    | 0,00724 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_2485 | Peptidase M48                                                        | 0,92 | inf    | 0,00885 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_1657 | hypothetical protein                                                 | 0,90 | inf    | 0,01255 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_6639 | hypothetical protein;Bacterial Ig-like domain-containing protein     | 0,89 | inf    | 0,01464 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_6532 | hypothetical protein                                                 | 0,89 | inf    | 0,01464 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_3054 | Crp/Fnr family transcriptional regulator                             | 0,89 | inf    | 0,01464 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_8055 | Gp61                                                                 | 0,88 | inf    | 0,01689 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_1632 | hypothetical protein;Integral membrane protein                       | 0,88 | inf    | 0,01689 | 1,00000 | 1,00000 |
| Heladera       | group_6808 | hypothetical protein                                                 | 0,87 | inf    | 0,01931 | 1,00000 | 1,00000 |
| Hortofrutícola | group_6871 | hypothetical protein;Enhanced serine sensitivity protein SseB        | 0,90 | inf    | 0,00000 | 0,00017 | 0,00008 |
| Hortofrutícola | group_6859 | hypothetical protein                                                 | 0,90 | inf    | 0,00000 | 0,00017 | 0,00008 |
| Hortofrutícola | group_6081 | Lin1083 protein                                                      | 0,83 | inf    | 0,00000 | 0,00840 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_7261 | hypothetical protein;NINE protein                                    | 0,65 | 101,00 | 0,00000 | 0,00922 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_7193 | Helix-turn-helix domain-containing protein                           | 0,65 | 101,00 | 0,00000 | 0,00922 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_146  | BspA family leucine-rich repeat surface protein;hypothetical protein | 0,65 | 101,00 | 0,00000 | 0,00922 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_6073 | hypothetical protein                                                 | 0,56 | inf    | 0,00000 | 0,00925 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_6071 | N-acetyltransferase                                                  | 0,56 | inf    | 0,00000 | 0,00925 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_3854 | DUF2481 domain-containing protein                                    | 0,56 | inf    | 0,00000 | 0,00925 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_3784 | Phage protein                                                        | 0,56 | inf    | 0,00000 | 0,00925 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_3128 | hypothetical protein                                                 | 0,56 | inf    | 0,00000 | 0,00925 | 0,00084 |
| Hortofrutícola | group_1059 | HTH cro/C1-type domain-containing protein                            | 0,79 | inf    | 0,00000 | 0,03614 | 0,00301 |
| Hortofrutícola | group_6074 | PlyA006                                                              | 0,55 | 127,50 | 0,00001 | 0,05378 | 0,00414 |
| Hortofrutícola | group_6890 | hypothetical protein;BspA family leucine-rich repeat surface protein | 0,54 | 63,13  | 0,00002 | 0,18234 | 0,00912 |
| Hortofrutícola | group_4326 | hypothetical protein                                                 | 0,54 | 63,13  | 0,00002 | 0,18234 | 0,00912 |

|                      |            |                                                                        |      |       |         |         |         |
|----------------------|------------|------------------------------------------------------------------------|------|-------|---------|---------|---------|
| Hortofrutícola       | group_3381 | MotA/TolQ/ExbB proton channel domain-containing protein                | 0,54 | 63,13 | 0,00002 | 0,18234 | 0,00912 |
| Hortofrutícola       | group_2432 | hypothetical protein                                                   | 0,54 | 63,13 | 0,00002 | 0,18234 | 0,00912 |
| Hortofrutícola       | group_2428 | ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH                                | 0,54 | 63,13 | 0,00002 | 0,18234 | 0,00912 |
| Hortofrutícola       | group_1122 | RNA-directed DNA polymerase                                            | 0,54 | 63,13 | 0,00002 | 0,18234 | 0,00912 |
| Hortofrutícola       | group_329  | Peptidase S8/S53 domain-containing protein                             | 0,54 | 63,13 | 0,00002 | 0,18234 | 0,00912 |
| Láctea               | thsB       | Thoeris protein ThsB TIR-like domain-containing protein                | 0,22 | inf   | 0,00008 | 0,79986 | 0,08743 |
| Láctea               | group_2702 | CvpA family protein                                                    | 0,22 | inf   | 0,00008 | 0,79986 | 0,08743 |
| Láctea               | group_106  | hypothetical protein                                                   | 0,40 | 6,58  | 0,00009 | 0,84468 | 0,08743 |
| Láctea               | group_6548 | hypothetical protein                                                   | 0,30 | 9,61  | 0,00009 | 0,87428 | 0,08743 |
| Láctea               | group_8059 | hypothetical protein                                                   | 0,24 | 13,52 | 0,00023 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_6556 | DNA 3'-5' helicase                                                     | 0,19 | inf   | 0,00028 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_3750 | hypothetical protein                                                   | 0,19 | inf   | 0,00028 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_3188 | Swt1-like HEPN domain-containing protein                               | 0,19 | inf   | 0,00028 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_3043 | DUF5343 domain-containing protein                                      | 0,19 | inf   | 0,00028 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_1462 | SIR2-like domain-containing protein                                    | 0,19 | inf   | 0,00028 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_1416 | Endonuclease GajA/Old nuclease/RecF-like AAA domain-containing protein | 0,19 | inf   | 0,00028 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_208  | NACHT domain-containing protein                                        | 0,19 | inf   | 0,00028 | 1,00000 | 0,10923 |
| Láctea               | group_512  | Lmo2321 protein                                                        | 0,35 | 5,13  | 0,00035 | 1,00000 | 0,12826 |
| Láctea               | group_4252 | hypothetical protein                                                   | 0,20 | 20,41 | 0,00055 | 1,00000 | 0,13726 |
| Láctea               | group_7252 | hypothetical protein                                                   | 0,29 | 5,91  | 0,00057 | 1,00000 | 0,13726 |
| Láctea               | group_8055 | Gp61                                                                   | 0,24 | 7,51  | 0,00075 | 1,00000 | 0,15358 |
| Láctea               | group_1674 | hypothetical protein;YopX protein domain-containing protein            | 0,18 | 17,27 | 0,00171 | 1,00000 | 0,24702 |
| Láctea               | group_5631 | hypothetical protein                                                   | 0,24 | 5,52  | 0,00190 | 1,00000 | 0,26475 |
| Láctea               | group_1716 | hypothetical protein                                                   | 0,24 | 5,52  | 0,00190 | 1,00000 | 0,26475 |
| Láctea               | group_733  | YdhG-like domain-containing protein                                    | 0,32 | 3,83  | 0,00237 | 1,00000 | 0,30372 |
| Panadera y repostera | group_4230 | hypothetical protein                                                   | 1,00 | inf   | 0,00893 | 1,00000 | 1,00000 |

|                    |   |            |                                                            |      |     |         |         |         |
|--------------------|---|------------|------------------------------------------------------------|------|-----|---------|---------|---------|
| Panadera repostera | y | group_2837 | DUF2786 domain-containing protein                          | 1,00 | inf | 0,00893 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_5628 | hypothetical protein                                       | 0,99 | inf | 0,01786 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_5626 | Putative antiholin                                         | 0,99 | inf | 0,01786 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_1959 | YopX protein domain-containing protein;YopX family protein | 0,99 | inf | 0,01786 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_8573 | Phage tail assembly protein                                | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_7533 | Phage head closure protein                                 | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_7491 | Phage tail protein                                         | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_7490 | hypothetical protein                                       | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_7426 | Phage protein                                              | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_6952 | Phage tail tape measure protein                            | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_6950 | Carbohydrate-binding protein CenC;hypothetical protein     | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_6719 | hypothetical protein                                       | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_6690 | hypothetical protein                                       | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_4814 | hypothetical protein                                       | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_4713 | AP2 domain-containing protein                              | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_4084 | Head-tail connector protein                                | 0,98 | inf | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |

|                    |   |             |                                                          |      |       |         |         |         |
|--------------------|---|-------------|----------------------------------------------------------|------|-------|---------|---------|---------|
| Panadera repostera | y | group_3807  | DUF3168 domain-containing protein                        | 0,98 | inf   | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_3396  | RNA polymerase subunit sigma                             | 0,98 | inf   | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Panadera repostera | y | group_3367  | Phage terminase small subunit P27 family                 | 0,98 | inf   | 0,02679 | 1,00000 | 1,00000 |
| Pesquera           |   | group_1677  | hypothetical protein                                     | 0,44 | 74,45 | 0,00000 | 0,00272 | 0,00272 |
| Pesquera           |   | group_7602  | DUF2481 domain-containing protein                        | 0,39 | 60,67 | 0,00000 | 0,02108 | 0,01054 |
| Pesquera           |   | group_9055  | Reverse transcriptase domain-containing protein          | 0,38 | 30,00 | 0,00001 | 0,09451 | 0,02363 |
| Pesquera           |   | group_7983  | hypothetical protein                                     | 0,38 | 30,00 | 0,00001 | 0,09451 | 0,02363 |
| Pesquera           |   | group_8291  | Lmo2302 protein                                          | 0,37 | 19,78 | 0,00003 | 0,31047 | 0,06209 |
| Pesquera           |   | group_1705  | Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta                | 0,44 | 10,02 | 0,00005 | 0,45769 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_1952  | hypothetical protein;Phage protein                       | 0,39 | 11,73 | 0,00008 | 0,81169 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_8432  | YopX protein domain-containing protein                   | 0,36 | 14,67 | 0,00008 | 0,83382 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_4544  | hypothetical protein                                     | 0,29 | 39,00 | 0,00010 | 0,99072 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_2255  | hypothetical protein                                     | 0,29 | 39,00 | 0,00010 | 0,99072 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_6090  | hypothetical protein                                     | 0,25 | inf   | 0,00012 | 1,00000 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_6087  | Cytosine-specific methyltransferase                      | 0,25 | inf   | 0,00012 | 1,00000 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_4412  | hypothetical protein                                     | 0,25 | inf   | 0,00012 | 1,00000 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_3296  | HNH nuclease domain-containing protein                   | 0,25 | inf   | 0,00012 | 1,00000 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_3135  | Lmo2315 protein                                          | 0,25 | inf   | 0,00012 | 1,00000 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_2438  | N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase                       | 0,25 | inf   | 0,00012 | 1,00000 | 0,07115 |
| Pesquera           |   | group_964   | hypothetical protein                                     | 0,44 | 7,70  | 0,00014 | 1,00000 | 0,08392 |
| Pesquera           |   | lapB~~~ispD | hypothetical protein;LapB repeat-containing protein;ispD | 0,46 | 7,22  | 0,00023 | 1,00000 | 0,12780 |
| Pesquera           |   | group_1678  | Protein Gp66                                             | 0,36 | 8,59  | 0,00032 | 1,00000 | 0,16767 |
| Pesquera           |   | group_6858  | IS3 family ISLmo1 transposase ORF A                      | 0,28 | 19,29 | 0,00036 | 1,00000 | 0,17559 |

*Nota:* El valor infinito (inf) aparece cuando el gen no se detecta en ningún aislado del grupo de comparación (el resto de las industrias), por lo que la odds ratio no puede expresarse con un valor numérico finito.

**ANEJO VII. Catálogo resumido del biobanco microbiano y genómico.**

| Muestra  | Industria      | Clado filogenético | ST     | Genes de resistencia a biocidas | Genes asociados a biofilms/persistencia  | Observaciones  |
|----------|----------------|--------------------|--------|---------------------------------|------------------------------------------|----------------|
| Lmono_1  | Láctea         | C21                | ST570  | fosX; vga(G)                    | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO | -              |
| Lmono_2  | Láctea         | C21                | ST570  | fosX; vga(G)                    | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO | -              |
| Lmono_3  | Láctea         | C21                | ST570  | fosX; vga(G)                    | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO | -              |
| Lmono_4  | Láctea         | C1                 | ST2939 | bcrB; bcrC; fosX                | agrB; degU; dltD; comK; recO             | -              |
| Lmono_7  | Láctea         | C16                | ST54   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_8  | Láctea         | C16                | ST54   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_9  | Láctea         | C16                | ST54   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_15 | Cárnica        | C20                | ST9    | fosX; vga(G)                    | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_17 | Cárnica        | C22                | STNA   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO | ST no asignado |
| Lmono_18 | Cárnica        | C22                | STNA   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO | ST no asignado |
| Lmono_20 | Pesquera       | C16                | ST219  | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_21 | Pesquera       | C16                | ST219  | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_22 | Pesquera       | C16                | ST219  | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_23 | Pesquera       | C28                | ST391  | bcrB; bcrC; fosX; vga(G)        | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_24 | Pesquera       | C28                | ST391  | bcrB; bcrC; fosX; vga(G)        | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_25 | Pesquera       | C28                | ST391  | bcrB; bcrC; fosX; vga(G)        | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_26 | Avícola        | C5                 | ST1489 | fosX; qacH                      | agrB; degU; dltD; comK; recO             | -              |
| Lmono_27 | Hortofrutícola | C18                | ST121  | fosX; qacH; vga(G)              | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_28 | Hortofrutícola | C18                | ST121  | fosX; qacH; vga(G)              | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_29 | Hortofrutícola | C18                | ST121  | fosX; qacH; vga(G)              | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_30 | Cárnica        | C30                | STNA   | No detectado                    | degU                                     | ST no asignado |
| Lmono_31 | Cárnica        | C29                | STNA   | No detectado                    | No detectado                             | ST no asignado |
| Lmono_32 | Cárnica        | C17                | ST504  | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_33 | Cárnica        | C23                | ST11   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_34 | Cárnica        | C23                | ST11   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_35 | Cárnica        | C23                | ST11   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_38 | Cárnica        | C10                | STNA   | fosX; vga(G)                    | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | ST no asignado |

ANEJO VII. Catálogo resumido del biobanco microbiano y genómico.

|           |                |     |        |                                  |                                                |                |
|-----------|----------------|-----|--------|----------------------------------|------------------------------------------------|----------------|
| Lmono_39  | Cárnica        | C3  | ST532  | fosX                             | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_40  | Cárnica        | C8  | STNA   | fosX                             | agrB; degU; comK; recO                         | ST no asignado |
| Lmono_41  | Cárnica        | C3  | ST532  | fosX                             | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_43  | Cárnica        | C16 | ST54   | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_44  | Láctea         | C24 | STNA   | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | ST no asignado |
| Lmono_47  | Avícola        | C18 | ST121  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_48  | Avícola        | C18 | ST121  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_49  | Avícola        | C18 | ST121  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_50  | Avícola        | C9  | STNA   | blal; fosX; qacH; tet(S); vga(G) | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | ST no asignado |
| Lmono_52  | Avícola        | C23 | ST11   | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_53  | Cárnica        | C23 | ST11   | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_56  | Láctea         | C21 | ST570  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_59  | Pesquera       | C2  | ST1610 | fosX                             | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_66  | Cárnica        | C4  | ST1619 | fosX                             | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_68  | Láctea         | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)               | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_73  | Láctea         | C16 | ST145  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_74  | Láctea         | C16 | ST145  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_75  | Láctea         | C16 | ST145  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_76  | Láctea         | C16 | ST145  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_79  | Cárnica        | C20 | ST9    | bcrB; bcrC; fosX; vga(G)         | agrB; inlA; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_81  | Cárnica        | C20 | ST9    | bcrB; bcrC; fosX; vga(G)         | agrB; inlA; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_82  | Pesquera       | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)               | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_83  | Pesquera       | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)               | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_85  | Pesquera       | C24 | ST8    | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_87  | Pesquera       | C24 | ST8    | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_88  | Láctea         | C15 | ST392  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_90  | Láctea         | C16 | ST1047 | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_94  | Láctea         | C15 | ST392  | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_96  | Hortofrutícola | C16 | ST87   | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_99  | Heladera       | C16 | ST1047 | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_101 | Heladera       | C16 | ST1047 | fosX; vga(G)                     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |

|           |                       |     |        |                          |                                                |                |
|-----------|-----------------------|-----|--------|--------------------------|------------------------------------------------|----------------|
| Lmono_102 | Pesquera              | C27 | ST431  | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_104 | Pesquera              | C27 | ST431  | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_105 | Pesquera              | C27 | ST431  | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_106 | Hortofrutícola        | C15 | ST392  | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_107 | Hortofrutícola        | C15 | ST392  | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_108 | Hortofrutícola        | C15 | ST392  | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_109 | Pesquera              | C16 | ST1    | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_111 | Pesquera              | C16 | ST1    | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_112 | Láctea                | C1  | ST2939 | bcrB; bcrC; fosX         | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_115 | Láctea                | C1  | ST2939 | bcrB; bcrC; fosX         | agrB; degU; dltD; recO                         | -              |
| Lmono_116 | Láctea                | C1  | ST2939 | bcrB; bcrC; fosX         | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_117 | Láctea                | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)       | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_118 | Láctea                | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)       | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_120 | Pesquera              | C19 | ST1346 | bcrB; bcrC; fosX; vga(G) | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_121 | Cárnica               | C20 | ST9    | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_123 | Cárnica               | C17 | ST504  | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_125 | Pesquera              | C20 | ST9    | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_127 | Avícola               | C11 | STNA   | fosX; qacH; vga(G)       | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK             | ST no asignado |
| Lmono_128 | Avícola               | C13 | STNA   | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | ST no asignado |
| Lmono_131 | Láctea                | C21 | ST570  | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_134 | Láctea                | C21 | ST570  | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_139 | Láctea                | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)       | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_140 | Láctea                | C26 | ST29   | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_142 | Láctea                | C26 | ST29   | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_145 | Láctea                | C24 | ST8    | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_146 | Láctea                | C26 | ST29   | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_149 | Láctea                | C21 | ST570  | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO       | -              |
| Lmono_152 | Panadera y repostería | C28 | ST391  | bcrB; bcrC; fosX; vga(G) | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_155 | Cárnica               | C20 | ST9    | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_157 | Cárnica               | C20 | ST9    | fosX; vga(G)             | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_158 | Láctea                | C16 | ST1    | fosX; vga(G)             | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |

ANEJO VII. Catálogo resumido del biobanco microbiano y genómico.

|           |                |     |        |                        |                                                |                |
|-----------|----------------|-----|--------|------------------------|------------------------------------------------|----------------|
| Lmono_160 | Láctea         | C16 | ST1    | fosX; vga(G)           | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_161 | Cárnica        | C7  | ST1480 | fosX                   | agrB; degU; dltD; recO                         | -              |
| Lmono_163 | Cárnica        | C7  | ST1480 | fosX                   | agrB; degU; dltD; recO                         | -              |
| Lmono_166 | Hortofrutícola | C12 | STNA   | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; inlA; degU; dltD; comK             | ST no asignado |
| Lmono_169 | Avícola        | C17 | ST504  | fosX; vga(G)           | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_171 | Hortofrutícola | C14 | ST392  | fosX; vga(G)           | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_175 | Avícola        | C6  | STNA   | bcrB; bcrC; fosX; qacH | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | ST no asignado |
| Lmono_177 | Avícola        | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_179 | Avícola        | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_182 | Avícola        | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_185 | Avícola        | C2  | ST1610 | fosX                   | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_187 | Avícola        | C2  | ST1610 | fosX                   | agrB; degU; dltD; comK; recO                   | -              |
| Lmono_191 | Cárnica        | C17 | ST504  | fosX; vga(G)           | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_193 | Láctea         | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_195 | Pesquera       | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_198 | Pesquera       | C18 | ST121  | fosX; qacH; vga(G)     | agrB; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO       | -              |
| Lmono_201 | Cárnica        | C16 | ST145  | fosX; vga(G)           | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_204 | Cárnica        | C16 | ST145  | fosX; vga(G)           | agrB; inlA; actA; degU; dltD; recO             | -              |
| Lmono_207 | Láctea         | C25 | STNA   | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; recO       | ST no asignado |
| Lmono_210 | Láctea         | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_213 | Láctea         | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_215 | Láctea         | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |
| Lmono_235 | Cárnica        | C20 | ST9    | fosX; vga(G)           | agrB; inlL; inlA; actA; degU; dltD; comK; recO | -              |