



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Detección de *Cronobacter sakazakii* en leche cruda bovina proveniente de Machachi –  
Cantón Mejía**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo**

**SANTIAGO NICOLÁS CARRERA YÁNEZ**

**QUITO, 2023**

## CERTIFICACIÓN DE FINALIZACIÓN

Certifico que el trabajo presentado por la Sr. Santiago Nicolás Carrera Yáñez ha sido concluido de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

**Fernando  
Santacruz** Firmado digitalmente  
por Fernando Santacruz  
Fecha: 2024.03.07  
09:04:48 -05'00'

---

**MSc. Fernando René Santacruz Flores**

Director

Quito, 07 de marzo de 2024

## **DEDICATORIA**

Para las personas que siempre me han apoyado.

Mis hermanas Patricia, Evelyn y mi hermano Marcelo.

De manera especial a mi madre Eva Yáñez, el pilar de mi familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su paciencia y apoyo incondicional.

A mi director de tesis MSc. Fernando Santacruz quien me apoyo de incontables maneras en todas las etapas del desarrollo de esta tesis.

A Solansh Molina, Emilia Montenegro, Samanta Changoluisa, Gabriela Felicita y Alexis Quintana quienes me ayudaron y aconsejaron.

Finalmente, a mis maestros y la sala de preparación de la PUCE, quienes me prestaron materiales y permitieron ocupar equipos que facilitaron e hicieron posible la culminación de este trabajo.

**TABLA DE CONTENIDOS**

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT.....	2
3	INTRODUCCIÓN .....	3
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
4.1	MUESTREO.....	6
4.2	AISLAMIENTO DE <i>CRONOBACTER SPP</i> .....	6
4.3	CARACTERIZACIÓN Y PRESERVACIÓN DE COLONIAS SOSPECHOSAS .....	7
4.4	EXTRACCIÓN DE ADN Y DETECCIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR).....	7
5	RESULTADOS.....	9
5.1	AISLAMIENTO DE <i>CRONOBACTER SPP</i> .....	9
5.2	CARACTERIZACIÓN DE CEPAS SOSPECHOSAS .....	10
5.3	DETECCIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA.....	11
6	DISCUSIÓN.....	13
7	CONCLUSIÓN.....	17
8	RECOMENDACIONES .....	18
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Colonias presuntivas para <i>Cronobacter</i> spp. aisladas en medio CCI.....	10
<b>Figura 2.</b> Colonias presuntivas para <i>Cronobacter</i> spp. aisladas en TSA.....	10
<b>Figura 3.</b> Tinción de cocos Gram negativos agrupados en racimos.....	11
<b>Figura 4.</b> Tinción de bacilos en forma de bastón Gram negativos.....	11
<b>Figura 5.</b> Resultados de la amplificación del gen <i>gyrB</i> por electroforesis en gel de agarosa y controles positivos/negativos.....	12

**LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Resultados obtenidos por el método ISO 22964:2017..... 12

**Tabla 2.** Concentración de ADN y resultados de PCR ..... 13

## 1 RESUMEN

La leche cruda es una de las industrias más importantes de la economía ecuatoriana y forma parte de la alimentación de un gran número de personas alrededor del mundo debido a su composición altamente nutritiva. Esto la hace un vector ideal para la proliferación de microorganismos patógenos hacia el ser humano. *Cronobacter sakazakii* es un patógeno oportunista principalmente relacionado a fórmula infantil e infecciones en infantes y personas inmunodeprimidas. El objetivo de este estudio fue describir la presencia o ausencia de *Cronobacter sakazakii* en muestras de leche cruda y determinar si se trata de un vehículo de propagación. Para esto se analizó 32 muestras bajo la normativa ISO 22964:2017 con ciertas modificaciones para la identificación por cultivo, y doce muestras sospechosas por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para la detección molecular. No se logró aislar cepas de *C. sakazakii* a través del método dependiente de cultivo. Por otro lado, el gen *gyrB* amplificado por PCR reveló tres muestras positivas procedentes de tres haciendas ganaderas distintas. En definitiva, el procedimiento por PCR resultó ser una mejor opción para detectar la presencia de *Cronobacter sakazakii* en leche cruda. Sin embargo, la metodología no fue útil para determinar la viabilidad de las cepas identificadas. Finalmente, se concluyó que la leche cruda es susceptible a contaminación de *C. sakazakii*, y capaz de actuar como vector hacia el ser humano.

**PALABRAS CLAVE:** *Cronobacter sakazakii*, leche cruda, patógeno oportunista, PCR, vector.

## 2 ABSTRACT

Raw milk is one of the most important industries in the Ecuadorian economy and is part of the diet of a large number of people around the world due to its highly nutritious composition. This makes it an ideal vector for the proliferation of pathogenic microorganisms towards humans. *Cronobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen mainly associated with powdered infant food formula and infections in infants and immunocompromised people. The objective of this study was to describe the presence or absence of *Cronobacter sakazakii* in raw milk samples and determine whether it is a propagation vehicle. For this, 32 samples were analyzed under the ISO 22964:2017 standard with certain modifications for identification by culture, and twelve suspicious samples by Polymerase Chain Reaction (PCR) for molecular detection. It was not possible to isolate *C. sakazakii* strains by the culture dependent method. On the other hand, the *gyrB* gene amplified by PCR revealed three positive samples from three different livestock farms. Definitely, the PCR procedure turned out to be a better option to detect the presence of *Cronobacter sakazakii* in raw milk. However, the methodology was not useful to determine the viability of the identified strains. Finally, it concluded that raw milk is susceptible to contamination by *C. sakazakii*, and capable of acting as a vector towards humans.

**KEYWORDS:** *Cronobacter sakazakii*, opportunistic pathogen, PCR, raw milk, vector.

### 3 INTRODUCCIÓN

Ecuador es productor de materias prima, entre ellas se incluyen las industrias petroleras, agrícolas y pecuarias. La exportación de sus productos son la principal fuente de ingreso económico del país. Solo los productos del sector no petrolero como el banano, cacao o leche de vaca representan el 8,2% del Producto Interno Bruto (PIB) (INEC, 2023), además de ser una de las fuentes de empleo más importantes para la población ecuatoriana, tanto es así que, el 29,4% de trabajadores dependen de ella (Chuncho, L., Uriguen, P. y Vivanco, A., 2021). Este sector de la industria abastece casi en su totalidad las necesidades del país, lo que asegura su soberanía alimentaria (Eras, E., Lalangui, M., Cabrera, C., Espinoza, E., Vilela, E. y Velecela L. 2021). Con todo esto en cuenta, es importante resguardar todos los procesos de esta fuente económica.

Dentro de la industria agropecuaria, la producción de leche cruda es una de las más importantes del Ecuador, la cual representa un 1.4% del PIB del país (Ionita, E. 2022). El crecimiento de esta industria es tal, que en 2020 la producción anual de leche en Ecuador alcanzó los 6.2 millones de litros (Barrera, C. 2021, Agrocalidad, s.f.), superando los 4 millones de litros alcanzados en la década pasada (Contero, 2008). De estos, el 77,2% es producido en la Sierra, 17,9 % en la Costa y 4,8% en la Amazonia (Palma, V., 2021), por lo que se trata de una industria en crecimiento que genera ingresos a millones de personas (Elisabeta, 2022). El destino de la leche cruda producida varía entre el consumo fresco, la producción de derivados y el procesamiento industrial. Los datos de consumo fresco en la Sierra son diversos. En la provincia de Chimborazo el consumo crudo alcanza hasta el 39% de la producción (Freire, D., Montero, M., Rodriguez, A., Valles, L. y Avilés, D., 2019) a diferencia del cantón Mejía en Pichincha donde representa el 2% de la producción (Palomo, B. y Alexandra, P., 2019). Es decir que una parte de la producción es destinada al consumo directo sin un proceso que asegure la inocuidad del alimento.

La leche es un alimento nutritivo por su composición rica en nutrientes, proteínas y carbohidratos. Esto hace que el producto, así como sus derivados, sean altamente distribuidos y consumidos alrededor del mundo (Aleena, A., Kumar, S., Kumar, V., y Sharma, R., 2019). Es

importante que se lleven a cabo procesos que adecuen al alimento para su consumo. La pasteurización es un proceso térmico utilizado en la industria láctea. Se lleva a cabo elevando la temperatura de la leche a 70°C durante al menos 30 segundos, lo que asegura que sus características físicas y alimenticias no cambien (Acosta, A., 2022), mientras se reduce la carga microbiana y se eliminan patógenos que pueden estar presentes en la leche cruda.

Los patógenos relacionados con la leche cruda son extensos. Estudios consideran que al menos la tercera parte de la leche cruda es portadora de al menos un patógeno, estos relacionados a diferentes factores la producción, tales como, la higiene del personal e instalaciones, la cantidad de animales, los procesos de extracción de la leche, el transporte o el almacenamiento (Lucey, J., 2015). La composición de la leche, altamente nutritiva, sumado a otro tipo condiciones, como la alta disponibilidad de agua y un pH neutro, hacen de este un medio ideal para la proliferación de una gran cantidad de microorganismos. Los cuales son capaces de causar pérdidas del producto o producir enfermedades en caso de su consumo crudo (Albuja Landi, Escobar Arrieta y Andueza Leal, 2021), es decir sin un proceso de pasteurización. Aunque gran parte de la producción cumple con este proceso antes de su venta, un pequeño porcentaje es destinado al consumo directo o la fabricación artesanal de derivados, tales como quesos o mantequilla (Torres Gutiérrez, X. 2018). Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), los productos no pasteurizados provocan 840 veces más enfermedades que los productos pasteurizados (Costard, S., Espejo, L., Groenendaal, H. y Zagmutt, F., 2017).

Entre los patógenos causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) por leche en Latinoamérica se encuentran principalmente, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp. (Bastan, M., Jalili, M., Pakzad, I., Malekki, A., Ghafourian, S., 2021 y Forero Tores, Y. 2017). Lo que ha derivado en que la mayoría de estudios realizados y esfuerzos se enfoquen principalmente en este grupo microorganismos, descuidando el interés en otros patógenos emergentes, como es el caso de especies del género *Cronobacter*.

*Cronobacter* spp. es un género relativamente nuevo de Enterobacterias. Fue recientemente reclasificado, como consecuencia de estudios basados en la ribotipificación del

gen ADNr 16S realizados en el año 2004. (Morato María, 2017). Son descritos como bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles e incapaces de formar esporas (Henry, M. y Fouladkhah, A. 2019). Está conformado por siete especies distintas (Forsythe Stephen, 2018), algunas con interés clínico, como es el caso de *Cronobacter sakazakii*.

La especie *C. sakazakii*, es la de mayor interés en la salud pública, debido a su creciente relación con brotes epidemiológicos. La bacteria es un patógeno oportunista, principalmente relacionado al consumo de fórmula infantil. De hecho, los lactantes son el grupo de mayor riesgo, debido al alto porcentaje de mortalidad, entre un 40 y 80%, en caso de una infección (Carrión, K., Goetschel, L., Terán, R. 2021), sin embargo, la bacteria es capaz de provocar patologías oportunistas en varios grupos de personas de todas las edades, desde niños hasta adultos inmunodeprimidos (Cortez Sánchez y Chaurand Espinoza, 2018). La distribución de *C. sakazakii* es amplia, ha sido descrita en una variedad de ambientes y muestras, tales como; granos, cereales, carnes, incluso como microbiota común de vectores (Feeney, A., Kropp, K., O'Connor, R., Sleator., R. 2014).

Esto resalta la importancia del estudio y descripción del microorganismo en otro tipo de matrices, en este caso leche cruda. Con el fin de asegurar que el patógeno oportunista no representa un riesgo a los consumidores de leche cruda o sus derivados.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MUESTREO

Se realizó un estudio descriptivo en muestras de leche cruda. El muestreo fue realizado por conveniencia entre el 15 y 28 de febrero del 2023 en el cantón Mejía en la ciudad de Machachi, Ecuador. Se obtuvieron 32 muestras de distintas haciendas ganaderas de la zona. La recolección se realizó directamente de las ubres de la vaca en frascos estériles de orina, etiquetadas con el nombre del animal procedente, fecha y zona.

Finalmente, las muestras fueron transportadas en un *cooler* refrigeradas hasta el laboratorio 605 de Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), donde fueron almacenadas hasta llevar a cabo su análisis.

### 4.2 AISLAMIENTO DE *CRONOBACTER SPP.*

El procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio 605 de biotecnología de la PUCE siguiendo el procedimiento establecido por la norma ISO 22964:2017 (UNE 2017) con ciertas modificaciones. Se realizaron dos enriquecimientos, uno no selectivo y otro selectivo. El primero, en agua peptonada, fue inoculado con 10 ml de cada muestra de leche cruda y se incubó durante 18 horas a 35°C. Transcurrido este periodo, se tomaron alícuotas en tubos cónicos de 50 ml, los cuales fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS. El fin de esto, fue aumentar la probabilidad de aislar cepas de *Cronobacter spp.* Se tomó 100 µl del pellet y se inoculó en el medio selectivo *Cronobacter Selective Broth (CSB)* durante 24 horas a 42,5°C.

Finalmente, se sembró por agotamiento en el medio cromogénico *Cromogenic Cronobacter Isolation Agar (CCI)* con un asa calibrada de 10 µl. Los medios de cultivo CCI fueron incubados durante 24 horas a 42,5°C. Se seleccionaron colonias con una coloración azul-verdosa, descripción definida por el fabricante del medio cromogénico, para ser aisladas e incubadas en Agar Triptona Soya (TSA) durante 24 horas a 37°C.

Los controles positivos y negativos se realizaron en los medios Cronobacter Selective Broth (CSB) y Cromogenic Cronobacter Isolation Agar (CCI) con cepas identificadas de *Cronobacter sakazakii* procedentes de la investigación realizada por Barriga, N. (2021) en especias en polvo y una cepa de *Escherichia coli* respectivamente.

#### **4.3 CARACTERIZACIÓN Y PRESERVACIÓN DE COLONIAS SOSPECHOSAS**

Se realizó una tinción de Gram de las cepas aisladas. Cepas con la descripción adecuada, es decir, bacilos Gram negativos en forma de bastón, fueron conservados en caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) con glicerol al 30%. para finalmente realizar una confirmación bioquímica.

Se realizó las pruebas bioquímicas recomendadas en la Normativa ISO 22964:2017 (UNE 2017): Rojo de Metilo (MR), Voges Proskauer (VP), Citrato, Manitol, Triple Sugar Iron (TSI), Lisina (LIA) y fermentación de carbohidratos (Xilosa, sacarosa, glucosa, dulcitol, lactosa e inositol).

#### **4.4 EXTRACCIÓN DE ADN Y DETECCIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)**

Se llevó a cabo la extracción de ADN de doce de los treinta y dos pellets conservados en PBS con el Kit de MIO BIO PowerSoil DNA Isolation Kit, debido a su disponibilidad. El kit permite obtener ADN con un alto nivel de pureza, lo que nos posibilita realizar procedimientos moleculares, tal como PCR. El ADN extraído se conservó en congelación a -20 °C.

Para el procedimiento de PCR se utilizaron los primers diseñados por Jackson E. (2016) con las secuencias; 5' TGCACCACATGGTATTCG 3' (forward) y 5' TGATCATCTTTCTGCGCGC 3' (reverse) para el gen *gyrB* como objetivo y utilizados en la identificación de especies de *Cronobacter sakazakii*. La solución final de PCR fue de 25 µl por reacción, constituida por 13 µl de GoTaq Green Master Mix 2x, 6,5 µl Agua libre de nucleasa, 0,5 µl Betaína, 3 µl Muestra, 1 µl Reverse Primer (10pm/ µl) y 1 µl Forward primer (10pm/ µl). El termociclador utilizado fue el Cyclor-MaxyGene: Gradient Thermal (Axygen) y se programó

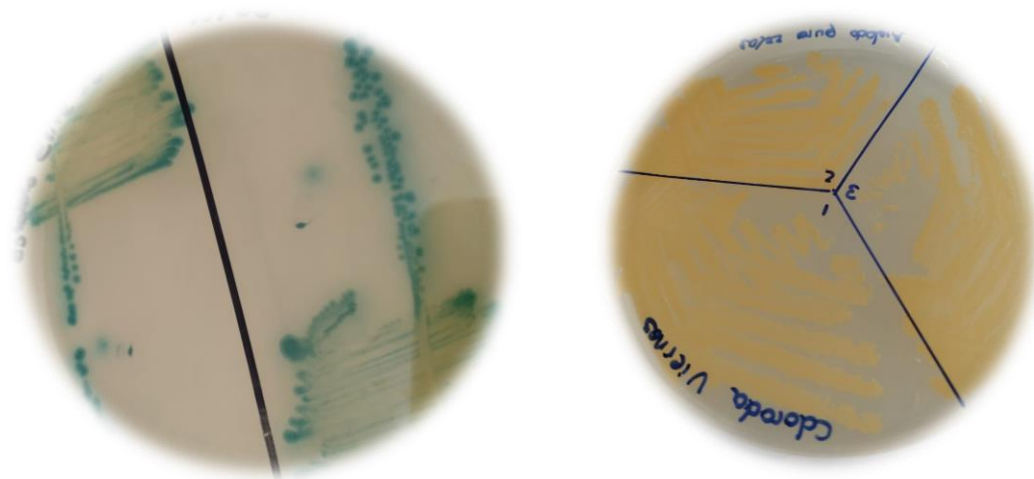
siguiendo las condiciones establecidas por Jolley et al. (2010): Desnaturalización inicial a 96°C por 1 minuto, seguido de treinta ciclos de desnaturalización 96°C por 1 minuto, hibridación 58°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minuto, concluyendo con una extensión final a 72°C por 5 min. Finalmente, las muestras amplificadas fueron conservadas a -20°C en el laboratorio de biotecnología 605 de la PUCE.

Se revelaron las muestras amplificadas por electroforesis en gel de agarosa. El gel fue preparado a una concentración de 1.5% en 100 ml de TBE 1X con 1,5 µl de Sybr Safe. La preparación de las muestras se realizó con 0,5 µl de gel de carga y 4 µl del producto de reacción de PCR. Se cargó la solución en el gel de agarosa y se corrió la electroforesis a 100 voltios durante 45 min. Se agregó una escalera molecular de 100 pb, un control negativo y uno positivo con una cepa identificada de *Cronobacter sakazakii*. Los resultados se observaron en el fotodocumentador Universal Hood II de BioRad del laboratorio de microbiología 601 de la PUCE.

## 5 RESULTADOS

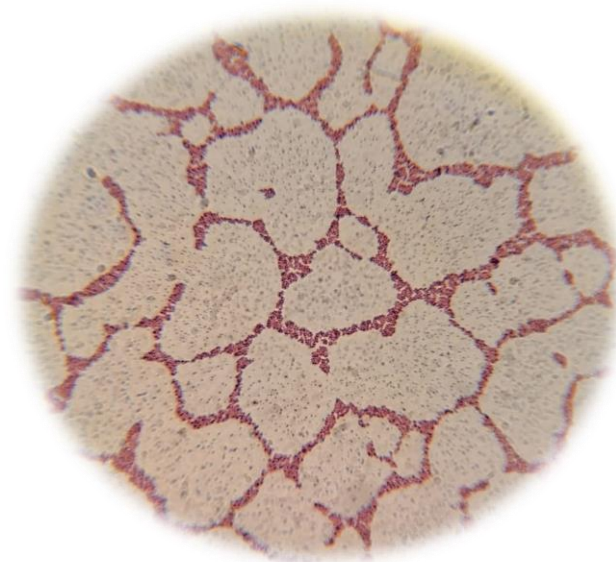
### 5.1 AISLAMIENTO DE *CRONOBACTER* SPP.

Se analizaron 32 muestras de leche cruda, doce (37.5 %) presentaron crecimiento de cepas presuntivas en el medio CCI, es decir con una coloración azul-verdosa (Figura 1.). Once, de las doce cepas aisladas en TSA, se describieron como: colonias blancas, redondas, blanquecinas y parcialmente transparentes, mientras que en la última se observó con colonias irregulares y cremosas, con una pigmentación crema intensa (Figura 2.)

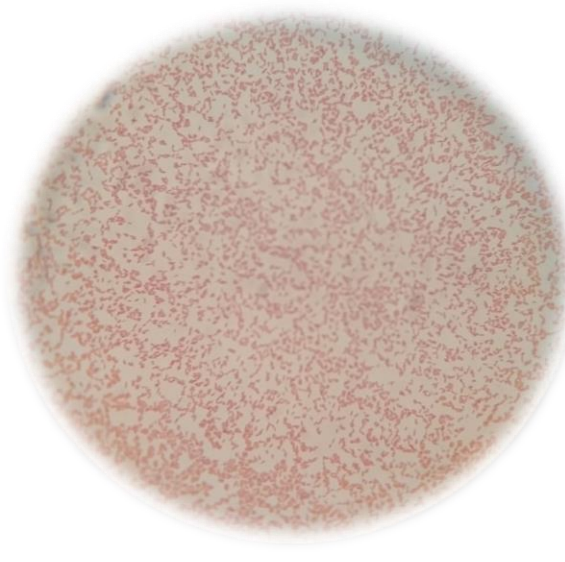


**Figura 1.** Colonias presuntivas para *Cronobacter* spp. aisladas en medio CCI. **Figura 2.** Colonias presuntivas para *Cronobacter* spp. aisladas en TSA

Al realizar una tinción Gram con las cepas sospechosas, se observó una morfología microscópica de cocos Gram negativos en once aislados (Figura 3.). Por otro lado, en la cepa con crecimiento pigmentado se observó una morfología de Bacilo Gram negativo en forma de bastón (Figura 4). Esta última se conservó para la confirmación a través de pruebas bioquímicas, teniendo en cuenta que su descripción concordaba con la del género *Cronobacter*.



**Figura 3.** Tinción de cocos Gram negativos agrupados en racimos



**Figura 4.** Tinción de bacilos en forma de bastón Gram negativos

## 5.2 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS SOSPECHOSAS

Las pruebas bioquímicas realizadas revelaron que la cepa conservada es capaz de fermentar glucosa, lactosa, sacarosa, lisina, xilosa, dulcitol, además de producir gas y utilizar el citrato como única fuente de carbono. La prueba de MR fue positiva, mientras que para VP y manitol fue negativa. Los resultados no coinciden con las características metabólicas de *Cronobacter* sp. Principalmente, por los obtenidos en las pruebas de MR/VP. *Cronobacter* sp. en el 99% de los casos presenta resultados opuestos. Es poco probable que el microorganismo aislado se trate de una especie de este género. Por tanto, de las treinta y dos muestras analizadas no se logró aislar cepas de *Cronobacter* sp. por métodos dependientes de cultivo.

**Tabla 1.** Resultados obtenidos por el método ISO 22964:2017

Descripción					Bioquímicas		
#	Muestra	Código	Colonias sospechosas	Morfología	Gram	MR	VP
1	Establo Cocinera 22	CL-001	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
2	Establo Cocinera 25	CL-002	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
3	Establo Cocinera 27	CL-003	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
4	Chaupi Alma 28	CL-004	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
5	Establo Elite 27	CL-005	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
6	Chaupi Jacinto 25	CL-006	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
7	Chaupi Princesa 22	CL-007	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
8	Chaupi Princesa 26	CL-008	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
9	Chaupi Remi 22	CL-009	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
10	Chaupi Remi 26	CL-010	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
11	Chaupi Alma 22	CL-011	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
12	Chaupi Alma 24	CL-012	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
13	Balvina Establo 23	CL-013	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
14	Pequeña Establo 23	CL-014	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
15	Elite Establo 22	CL-015	Si	Bacilos	Negativa	Positivo	Negativo
16	Paty Puichig 2	CL-016	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
17	Jose Damiana 25	CL-017	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
18	José Colorada 25	CL-018	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
19	José Colorada 23	CL-019	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
20	Puichig Rosita 4	CL-020	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
21	Puichig Rosita 3	CL-021	Si	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
22	Chaupi Alma 26	CL-022	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
23	Chaupi Remi 25	CL-023	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
24	Chaupi Jacinto 28	CL-024	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
25	Establo Linda 23	CL-025	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
26	Chaupi Jacinto 26	CL-026	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
27	Puichig Rosita 23	CL-027	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
28	Puichig Rosita 1	CL-028	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
29	Viernes Colorada	CL-029	Si	Cocos	Negativa	N.A.	N.A.
30	Puichig Paty 2	CL-030	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
31	Jose Damiana 23	CL-031	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
32	Establo Balvina 25	CL-032	No	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

**MR: Rojo de Metilo VP: Voges Proskauer N.A.: No Aplica**

### 5.3 DETECCIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA

Se procesaron 12 muestras de PCR a través de electroforesis junto con dos controles y dos escaleras moleculares en el primer y décimo séptimo carril (Figura 5.). El control positivo se observa en el segundo carril de la electroforesis con un peso mayor a 500 pb. Por otro lado, el control negativo, realizado con ADN de *Bacillus subtilis*, se encuentra en el tercer carril, sin

ninguna banda que indique una amplificación durante la PCR. Del total de las muestras, se observaron tres amplificaciones del gen *gyrB* en los carriles 6, 10 y 12, además de una reacción inespecífica en el carril 4.

El peso molecular de las amplificaciones del gen *gyrB* (6, 5 y 12) son similares al control realizado, lo que indicaría la presencia del género *Cronobacter sakazakii* en el 25 % de las muestras utilizadas para este procedimiento, aunque no su viabilidad.



**Figura 5.** Resultados de PCR a partir de muestras sospechosas de *Cronobacter* sp. revelados por electroforesis en gel de agarosa. (M) Marcador molecular 100pb, (+) control positivo, (-) Control negativo, (Carril 6, 10 y 12) muestras positivas, (4) amplificación inespecífica.

**Tabla 2.** Concentración de ADN y resultados de PCR

#	Código	Concentración	Índice de Pureza	PCR
1	CL-002	11 µl	2	Negativo
2	CL-003	10 µl	1,7	Negativo
3	CL-004	11 µl	1,7	Negativo
4	CL-006	9 µl	2	Inespecífico
5	CL-012	10 µl	1,6	Negativo
6	CL-015	9 µl	1,8	Positivo
7	CL-020	20 µl	2	Negativo
8	CL-022	10 µl	1,7	Negativo
9	CL-023	11 µl	1,8	Negativo
10	CL-026	10 µl	1,8	Positivo
11	CL-028	10 µl	1,7	Negativo
12	CL-029	11 µl	2	Positivo

## 6 DISCUSIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAS) son una de las problemáticas más importantes a nivel mundial (Aguilera, A., Urbano, E., Jaime, C. 2014). De hecho, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 1 de cada 10 personas sufre una intoxicación alimentaria y 1.8 millones de personas fallecen por patologías relacionadas a la ingesta de alimentos (Tenecela, E., Ortiz, E. 2023 y Aguilera, A., Urbano, E. Jaime, C. 2014). En Ecuador en el año 2021, el Ministerio de Salud Pública reportó un total de 3340 casos, relacionados a patógenos como: Hepatitis A, *Salmonella* sp, *Shigella* sp. y *Vibrio Cholerae* (Ministerio de Salud Pública, 2021). Sin embargo, no existen reportes sobre infecciones provocadas por *Cronobacter* sp. Es un hecho que la descripción y estudio, a nivel nacional, de este microorganismo en alimentos es limitada. Esto se puede deber a que *Cronobacter skakzakii* ha sido asociada casi exclusivamente a fórmula infantil y, por supuesto, a infecciones en infantes y neonatos, además de no ser descrita como causante de brotes relacionados a otros alimentos. Esto realza la importancia de estudiar al microorganismo en distintas matrices, así como su hábitat de origen.

Para describir a *Cronobacter sakazakii* en muestras de leche cruda se utilizó el método ISO 22964:2017, normativa utilizada para la detección del microorganismo en una amplia variedad de muestras. La metodología ha sido validada y comparada en innumerables estudios. Para destacar, De Benito, et al. (2019) concluyeron que el procedimiento tenía una especificidad entre el 99 y 100%, además de una sensibilidad entre el 65 y 100% al entregar muestras con distintos niveles de inoculación a diecisiete laboratorios distintos. Otro estudio similar realizado por Chen, et al. (2022), en doce laboratorios, determinó una sensibilidad del 97%. Los ensayos citados indican que se trata de una metodología confiable.

En el presente estudio se analizaron treinta y dos muestras por la metodología previamente mencionada. Como resultado no se logró aislar cepas viables de *Cronobacter* sp. Estos resultados son idénticos a los publicados en investigaciones similares. Los autores Baumgartner et al. (2010) y Lehner et al. (2010) analizaron 875 y 100 muestras de leche cruda respectivamente, sin aislar con éxito ninguna colonia de *Cronobacter* spp en ambos casos. Otro caso aproximado, es el publicado por Sharma et al. (2022), estudio en el cual se identificó una colonia de *C. sakazakii*, lo que representaba el 0,6% del total de las 30 muestras de leche cruda bovina procesadas. Como contraste, Berhilevych. et al. (2017) detectaron 34 aislados positivos para *Cronobacter* sp. lo que representó el 19,4% de las muestras de estudio.

En base a los resultados presentados y la bibliografía citada se puede inferir que la presencia de *Cronobacter* sp. no es inherente de las leches crudas, sino que es circunstancial y se ve influenciado por factores externos relacionados a su procesamiento. Es probable que su presencia se deba a una contaminación causada por el ambiente, condiciones del ganado o instrumentos utilizados durante la producción de la leche. *Cronobacter* spp. es una bacteria de amplia distribución y se ha descrito en una gran variedad de ambientes, entre estos: alimentos, plantas e incluso vectores como moscas (Feeney, A., Kropp, K., O'Connor, R., Sleator, R., 2015). La capacidad de adherirse a superficies debido a la producción de fimbrias, cápsulas e incluso biofilms (Hee Jo, S., Bum Baek, S., Hyoung Ha, J., Do Ha, S., 2010; Ling, N., Jiang, Y., Zeng, H., Ding, Y., Forsythe, S. 2021) sumado a sus amplios atributos de supervivencia a condiciones ambientales adversas (Hennekinne, R., Guillier, L., Fazeuilh, L., Ells, T., Forsythe,

S., Jacson, E., Meheut, T., Gnanou, N., 2018), son importantes y pueden explicar la presencia de *Cronobacter* sp. en una gran variedad de muestras. El estudio publicado por Chase et al. (2017), realizado en instalaciones de producción de fórmula infantil, demostró que *Cronobacter* spp. fue capaz de sobrevivir hasta 4 años en equipos de producción. lo que manifiesta la importancia de realizar estudios enfocados en los procesos e instalaciones relacionadas a la producción de leche, así como un control frecuente de estos.

Para contrastar los resultados obtenidos previamente, se realizó un ensayo de PCR con el gen *gyrB* como objetivo. Este se encarga de codificar la subunidad B del ADN girasa, una enzima encargada del desenrollamiento en la replicación del ADN. (Mashoufi, A., Ghazvini, K., Mohammad, H., Mobarhan, M., Vakili, V. y Afshari, A. 2018). Se trata de un gen de mantenimiento único presente en el cromosoma de todas las bacterias y con una elevada tasa de evolución, incluso mayor al del gen ARNr 16S (Chen, W.; Ai, L., Yang, J., Ren, J., Li, Y. y Guo, B. 2013). Amplificar este segmento permite identificar a *C. sakazakii* como demostraron Huang et al. (2013) al describir la bacteria y discriminarla de otras enterobacterias. En este estudio el gen *gyrB* se encontró en tres de doce muestras procesadas. La procedencia de estas es diversa, cada una fue recolectada en tres haciendas ganaderas distintas. Los genes amplificados podrían no tratarse de una misma cepa del microorganismo. De la misma manera, las fuentes de contaminación implicadas pueden ser amplias y variadas si se considera la extensa diversidad de ambientes en las que se puede desarrollar. Sin embargo, nuevos estudios son necesarios para asegurar su diversidad y origen.

A pesar de la descripción del gen *gyrB* de *C. sakazakii* por PCR, las cepas no pudieron ser aisladas por cultivos. Es posible que el microorganismo se encontrara en un estado inviable o viable pero no cultivable (VBNC). El estado VBNC se ha observado en una variedad de microorganismos y se trata de una respuesta de supervivencia como resultado al estrés ambiental. Los microorganismos en este estado son viables, pero se reduce su capacidad de crecer en medios de cultivo (Zhang, XH., Ahmad, W., Zhu, XY., Chen, J., Austin, B. 2021). *C. sakazakii* es capaz de entrar en este estado como lo comprobaron Fakruddin, et al. (2017), al realizar un ensayo en el que se sometió a cepas de *C. sakazakii* a una temperatura de 4°C durante distintos periodos de tiempo, lo que resultó en una disminución en la capacidad de aislar colonias

de manera proporcional al tiempo de tratamiento. *C. sakazakii* VNBC representa un peligro para la salud. Se ha demostrado que el microorganismo en este estado continua la expresión genes de virulencia (Fakruddin, et al., 2017). Un estudio realizado en ratas infectadas con *C. sakazakii* por Zhou, et al. (2021), determinó que la bacteria en un estado VBNC aún provocaba daños patológicos, aunque en menor medida.

En el presente estudio, el estado VNBC se pudo desarrollar durante la conserva de las muestras a -20°C, debido al estrés ambiental, lo que dificultaría su detección y puede explicar los resultados obtenidos por métodos dependientes de cultivo con falsos negativos como resultado (Hu, L., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, W., Wang, S. 2022), por lo que, es importante determinar un método para la identificación de *Cronobacter sakazakii* VBNC.

Se evidencia una ventaja de los métodos moleculares sobre los basados en cultivo. Se tratan de procedimientos de mayor sensibilidad y especificidad (Angarita, M., Torres, M. y Díaz, A. 2017), además de permitir identificar microorganismos a nivel de especie. Procedimientos como la tipificación multilocus de secuencias (MLST) ha demostrado ser útil para la descripción de *Cronobacter* spp. en una gran variedad de muestras de alimentos, ambientales y humanas (Hu, J., Xiaofang, L., Xiaoli, D., Zhigang, C. y Jinghua, C. 2019). El método permite discriminar entre las siete especies del género a partir de la amplificación de los genes *atpD*, *ppsA*, *gyrB*, *glnS*, *fusA*, *infB* y *gltB* (Joseph, S y Forsythe, S. 2017). Por otro lado, estudios como el realizado por Mashoufi, et al. (2018) demuestran que el gen *gyrB* es adecuado para la descripción de *C. sakazakii* por PCR, al lograr identificarlo en muestras de formula infantil.

De la misma forma, los procedimientos moleculares son ideales para la detección de estados no cultivables de *C. sakazakii* y diferenciar de cepas inviables. El procedimiento de Amplificación Isotérmica Cuantitativa en combinación con propidio monoazida (PMA-QLAMP) ha sido utilizado por Hu, et al. (2022) con esta finalidad. El reactivo PMA o propidio monoazida es capaz de penetra células muertas y enlazarse con el ADN, lo que impide la amplificación del mismo. Células viables y no cultivables no son afectadas por este proceso, lo que asegura la amplificación de genes y, por lo tanto, la identificación y cuantificación de *C. sakazakii* con una alta especificidad y sensibilidad.

## 7 CONCLUSIÓN

Se describió a *Cronobacter sp.* en un bajo porcentaje de las muestras analizadas de leche cruda. Es decir que la leche cruda puede ser un vehículo de diseminación bacteriana hacia el consumidor. Los resultados obtenidos y la bibliografía citada indican que la matriz estudiada no es una fuente común de contaminación. Es importante determinar las fuentes de origen del microorganismo, así como su diseminación a otros ambientes, con el fin de evitar la contaminación cruzada a los alimentos. Por otro lado, se observó una limitación en la metodología dependiente de cultivos para la identificación del género. La capacidad de *Cronobacter sp.* de entrar en un estado no cultivable (VBNC), debido al estrés ambiental, es de suma importancia y abre un nuevo enfoque de estudio. Los métodos moleculares son adecuados y más precisos para la detección rápida del género como se observó en el estudio realizado e incluso permitiría su descripción a nivel de especie. Finalmente, *Cronobacter sp.* puede ser un contaminante de leche cruda, lo que representa un peligro para sus consumidores, además de enfatizar la importancia del tratamiento térmico de la leche. Es relevante llevar a cabo nuevos estudios enfocados en este microorganismo en una mayor variedad de matrices, así como en las instalaciones relacionadas estas, con el fin de identificar fuentes de contaminación y asegurar alimentos inocuos.

## 8 RECOMENDACIONES

El estudio reveló la presencia del genero *Cronobacter sakazakii* en muestras de leche cruda, sin embargo, es necesario realizar procedimientos de secuenciación en las amplificaciones del gen *gyrB* obtenidas con el fin de conocer si se tratan de la misma cepa o, por el contrario, cepas de distinto origen.

La incapacidad de conocer si el ADN amplificado pertenece a una cepa viable o una en estado VBNC es un sesgo de suma importancia, por lo que es necesario determinar metodologías que permitan describir a *Cronobacter sakazakii* en estado VBNC de células no viables.

Por otro lado, se debe enfatiza en las condiciones y tiempos de preservación de las muestras, con el fin de evitar estados bacterianos que impidan la descripción de *Cronobacter sakazakii*. en caso de realizarlo por cultivos. Como alternativa, se sugiere realizar los ensayos inmediatamente después de la toma de muestra.

*Cronobacter sakazakii* ha sido descrito en una variedad de muestras de alimentos, por lo que, es importante que los estudios continúen en una nueva variedad de matrices. No solo con el fin de determinar si representa un riesgo para los consumidores, si no de resolver la distribución y origen del género.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta Pérez, A. (2022). *Simulación del proceso de pasteurización de la leche*. Disertación de pregrado. Universidad de la Laguna, San Cristóbal de la Laguna, España
- Aguilera-Becerra, A. M., Urbano-Cáceres, E. X., y Jaimes-Bernal, C. P. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83–93. doi: 10.19053/01228420.3860
- Albuja Landi, A., Escobar Arrieta, S., y Andueza Leal, F. (2021). Calidad bacteriológica de la leche cruda bovina almacenada en el centro de acopio Mocha, Tungurahua, Ecuador. *Siembra*, 8(2). doi: 10.29166/siembra.v8i2.3176
- Aleena, A., Kumar, S., Kumar, V., y Sharma, R. (2019). Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18). doi: 10.1080/10408398.2019.1674243
- Angarita Merchán, Maritza, Torres Caicedo, María Inés, y Díaz Torres, Andrea Katherine. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796-807.
- Barrera, C. (2021). *Análisis de la productividad, rentabilidad y sostenibilidad de los productores de leche cruda en el cantón de Píllaro, cantón de Tungurahua*. Tesis de maestría. Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Quito, Ecuador.
- Baumgartner, A., y Niederhauser, I. (2010). Occurrence of Cronobacter spp. in raw milk. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 5(2), 253–253. Doi: 10.1007/s00003-010-0589-8

- Bennour Hennekinne, R., Guillier, L., Fazeuilh, L., Ells, T., Forsythe, S., Jackson, E., Meheut, T., y Gnanou Besse, N. (2018). Survival of *Cronobacter* in powdered infant formula and their variation in biofilm formation. *Letters in Applied Microbiology*, 66(6), 496–505. Doi: 10.1111/lam.12879
- Berhilevych, O., y Kasianchuk, V. (2017). Identification of *Cronobacter* spp (*enterobacter sakazakii*) from raw milk and environmental samples of dairy farms. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 6(11 (90)), 4–10. Doi: 10.15587/1729-4061.2017.114637
- Chase, H. R., Gopinath, G. R., Eshwar, A. K., Stoller, A., Fricker-Feer, C., Gangiredla, J., Patel, I. R., Cinar, H. N., Jeong, H., Lee, C., Negrete, F., Finkelstein, S., Stephan, R., Tall, B. D., y Lehner, A. (2017). Comparative Genomic Characterization of the Highly Persistent and Potentially Virulent *Cronobacter sakazakii* ST83, CC65 Strain H322 and Other ST83 Strains. *Frontiers in Microbiology*, 8. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01136
- Chen, W., Ai, L., Yang, J., Ren, J., Li, Y., y Guo, B. (2013). Development of a PCR assay for rapid detection of *Cronobacter* spp. from food. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(10), 656–661. Doi: 10.1139/cjm-2013-0243
- Chen, W., Chen, J., Yang, J., Xu, J., Liu, M., Hu, Y., Jiang, Y. y Zhang, X. (2022). An Interlaboratory Method Comparison Study of GB 4789.40- 2016 and ISO 22964:2017 Detection of *Cronobacter* spp. in Powdered Infant Formula. *Research Square*. Doi; 10.21203/rs.3.rs-1555562/v1
- Chuncho, L., Uriguen, P. y Apolo, N. (2021). Ecuador: Análisis económico del desarrollo del sector agropecuario e industrial en el periodo 2000-2018. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 8(1), 08-17. Doi: 10.26423/rctu.v8i1.547
- Contero, R. (2008). La calidad de la leche: un desafío en el Ecuador. *La Granja*, 7(1), 25–28. Doi: 10.17163/lgr.n7.2008.05

- Cortés Sánchez, A., y Espinosa Chaurand, L. (2018). *Cronobacter sakazakii* un peligro potencial para la salud proveniente de los alimentos. *Revista de Aplicación Científica y Técnica*, 4(11), 7–19.
- Costard, S., Espejo, L., Groenendaal, H., y Zgmutt, F. J. (2017). Outbreak-Related Disease Burden Associated with Consumption of Unpasteurized Cow's Milk and Cheese, United States, 2009–2014. *Emerging Infectious Diseases*, 23(6), 957–964. Doi: 10.3201/eid2306.151603
- De Benito, A., Gnanou Besse, N., Desforges, I., Gerten, B., Ruiz, B. Y Tomás, D. (2019). Validation of standard method EN ISO 22964:2017-Microbiology of the food chain-Horizontal method for detection of *Cronobacter* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 288, 47-52. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.025
- Elisabeta Ionita. (2022). La producción de leche en Ecuador. Veterinaria Digital. Recuperado de <https://www.veterinariadigital.com/articulos/la-produccion-de-leche-en-ecuador/>
- Elutade, O. O., Imohiosen, J. J. I., y Akinola, O. T. (2023). Bacteriological quality of raw cow milk at a collection center in Iwo, Osun State, Nigeria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1219(1), 012002. Doi: 10.1088/1755-1315/1219/1/012002
- Eras, E., Lalangui, M., Cabrera, C., Espinoza, E., Vilela, E. y Velecela L. (2021). El Sector Agropecuario en el Ecuador: análisis descriptivo del impacto en la sostenibilidad por el COVID-19. *South Florida Journal of Development*. 2(3), 4105-4122. Doi: 10.46932/sfjdv2n3-024
- Fakruddin, Md., Rahaman, Md. M., Hossain, Md. N., y Ahmed, M. M. (2017). Induction and Resuscitation of *Cronobacter sakazakii* into Viable but Non-culturable State at Low Temperature in Water Microcosm. *Asian Journal of Biological Sciences*, 10(2), 64–71. Doi: 10.3923/ajbs.2017.64.71

- Feeney, A., Kropp, K., O'Connor, R. y Sleator, R. (2015). Cronobacter sakazakii: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. *Gut Microbes*, 5(6), 711–718. Doi: 10.4161%2F19490976.2014.983774
- Forero Torres, Y., Galindo Borda, M. y Ramírez, G. (2017). Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. *Revista Chilena de Nutrición*, 44(4), 325–332. Doi: 10.4067/S0717-75182017000400325
- Forsythe, S. J. (2018). Updates on the *Cronobacter* Genus. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 23–44. Doi: 10.1146/annurev-food-030117-012246
- Guevara-Freire, D., Montero-Recalde, M., Rodríguez, A., Valle, L. y Avilés-Esquivel, D. (2019). Calidad de leche acopiada de pequeñas ganaderías de Cotopaxi, Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1), 247–255. Doi; 10.15381/RIVEP.V30I1.15679
- Henry, M. y Fouladkhah, A. (2019). Outbreak History, Biofilm Formation, and Preventive Measures for Control of Cronobacter sakazakii in Infant Formula and Infant Care Settings. *Microorganisms*, 7(3), 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030077>
- Hu, J., Li, X., Du, X., Cui, Z. y Cui, J. (2019). Identification and Characterization of Cronobacter Strains Isolated from Environmental Samples. *Current Microbiology*, 76(12), 1467–1476. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01776-8>
- Hu, L., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, Y., Zhang, W. y Wang, S. (2022). Quantitative Detection of Viable but Nonculturable Cronobacter sakazakii Using Photosensitive Nucleic Acid Dye PMA Combined with Isothermal Amplification LAMP in Raw Milk. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(17). <https://doi.org/10.3390/foods11172653>
- Huang, C.-H., Chang, M.-T. y Huang, L. (2013). Use of novel species-specific PCR primers targeted to DNA gyrase subunit B (gyrB) gene for species identification of the Cronobacter sakazakii

and *Cronobacter dublinensis*. *Molecular and Cellular Probes*, 27(1), 15–18.

<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.08.004>

Instituto Nacional de Estadística y Censos (2023). Boletín técnico, Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). Recuperado de [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac\\_2022/Bolet%C3%ADn\\_tecnico\\_ESPAC\\_2022.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/Bolet%C3%ADn_tecnico_ESPAC_2022.pdf)

Jo, S.-H., Baek, S.-B., Ha, J.-H. y Ha, S.-D. (2010). Maturation and Survival of *Cronobacter* Biofilms on Silicone, Polycarbonate, and Stainless Steel after UV Light and Ethanol Immersion Treatments. *Journal of Food Protection*, 73(5), 952–956. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.5.952>

Jolley, K. A., Bray, J. E. y Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>

Joseph, S. y Forsythe, S. (2017). Multilocus Sequence Typing (MLST) for *Cronobacter spp.* *Diagnostic Bacteriology*, 241–248. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7037-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7037-7_16)

Lehner, A., Fricker, C., Gschwend, K. y Stephan, R. (2010). Identification of Enterobacteriaceae and *Cronobacter spp.* in raw milk, milk concentrate and milk powder prevalence and genotyping. *Schlütersche Verlagsgesellschaft*, 61(1). Doi: <http://dx.doi.org/10.2376/0003-925X-61-22>

Ling, N., Jiang, Y., Zeng, H., Ding, Y. y Forsythe, S. (2021). Advances in our understanding and distribution of the *Cronobacter* genus in China. *Journal of Food Science*, 86(2), 276–283. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15577>

Lucey, J. (2015). Consumo de leche cruda: riesgos y beneficios. *Nutrition Today*. *Nutrition Today*, 50(4), 189–193.

- Mashoufi, A., Ghazvini, K., Hashemi, M., Mobarhan, M. G., Vakili, V. y Afshari, A. (2019). A novel primer targeted *gyrB* gene for the identification of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formulas (PIF) and baby foods in Iran. *Journal of Food Safety*, 39(2).  
<https://doi.org/10.1111/jfs.12609>
- Morato Rodríguez, M. (2017). *Determinación de la presencia de Cronobacter spp en feculas de maíz y de plátano distribuidas en la ciudad de Bogotá*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Palma Arreaga, V. (2021). *Caracterización de producción y comercialización de leche bovina en Ecuador*. Disertación de grado. Universidad Técnica de Babahoyo. Los Ríos, Ecuador
- Palomo Chasipanta, B. V. y Pérez Morillo, P. A. (2019). *Incidencia del grado de eficacia de la gestión de la cadena de suministros en la productividad del sector lácteo de los cantones Mejía y Rumiñahui*. Disertación de grado. Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador.
- Sharma, N. y Prakash, A. (2022). Isolation and rapid detection of *cronobacter sakazakii* in milk and milk products from the unorganized sectors of agra region. *International Journal of Creative Research Thoughts*, 10(11), 709–2018. <https://ijcrt.org/papers/IJCRT2211560.pdf>
- Tenecela Valencia, E. y Ortiz Tejedor, J. (2023). Análisis bacteriológico de leche cruda expendida en Tarqui-Ecuador. *Anatomía Digital*, 6(3), 116–131.
- Torres Gutiérrez, X. (2018). *Estudio de la producción de la industria láctea del cantón Cayambe en el período 2009-2015*. Universidad Andina Simón Bolívar, Quito, Ecuador.
- Zhang, X.-H., Ahmad, W., Zhu, X.-Y., Chen, J. y Austin, B. (2021). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine

microorganisms. *Marine Life Science & Technology*, 3(2), 189–203.

<https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3>

Zhou, A., Wang, L., Zhang, J., Yang, X., Ou, Z. y Zhao, L. (2021). Survival of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* in macrophages contributes to infections. *Microbial Pathogenesis*, 158, 105064. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105064>