

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Detección de *Cronobacter* spp. en especias a granel en polvo de tres mercados de Quito**

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

**NICOL CAROLINA BARRIGA BERMEO**

**QUITO, 2021**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la Disertación en Microbiología de la Srta. Nicol Barriga Bermeo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

MSc. Fernando Santacruz

**Director de la Disertación**

**Quito, 26 de noviembre de 2020**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a Dios, mi pilar y gran inspiración, sin él esto no sería posible.

A mi familia, en especial a mis padres Alba Bermeo y Miguel Barriga, sin ellos no sería la  
persona que soy ahora.

A mis hermanas Kelsy y Cintya por siempre motivarme y nunca dejaron que me rinda.

Con amor, una científica que ama los microorganismos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, sin su apoyo incondicional este sueño no sería posible.

A mis amigos de la universidad, en especial a Anabeliza, Emily y Tomás que me apoyaron en esta hermosa aventura.

A mi director de tesis, MSc. Fernando Santacruz por ser un guía en esta investigación y permitirme formar parte de sus proyectos.

A mis profesores de carrera, un afectuoso agradecimiento por compartirme sus conocimientos y experiencias durante la carrera; sus aportes han contribuido a amar lo que hago.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**°C:** grados Celsius

**g:** gramos

**MALDI-TOF:** Desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por un tiempo de vuelo

**ml:** mililitros

**n:** número

**nm:** nanómetros

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

**pH:** potencial de hidrógeno

**UV:** ultravioleta

**µm:** micrómetros

**µg:** microgramos

**µl:** microlitros

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN.-</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.-</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
Muestreo.-.....	15
Aislamiento de <i>Cronobacter</i> spp.-.....	16
Caracterización fenotípica.-.....	17
Ensayos de confirmación.-.....	18
Evaluación del método microbiológico para la detección de <i>Cronobacter sakazakii</i> .-.....	20
Prueba de susceptibilidad antibiótica de <i>C. sakazakii</i> .-.....	21
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
Aislamiento de <i>Cronobacter</i> spp.-.....	22
Evaluación del método microbiológico para la detección de <i>Cronobacter sakazakii</i> .-.....	23
Prueba de susceptibilidad antibiótica de <i>C. sakazakii</i> .-.....	24
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>25</b>
Aislamiento de <i>Cronobacter</i> spp.-.....	25
Métodos de detección de <i>Cronobacter sakazakii</i> .-.....	30
Prueba de susceptibilidad antibiótica de <i>C. sakazakii</i> .-.....	31
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>34</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>35</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cultivo de 24 horas de <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544 en medio ACC. ....	17
<b>Figura 2.</b> Cultivo de 24 horas de <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544 en TSA. ....	17
<b>Figura 3.</b> Perfil bioquímico de los aislados de <i>Cronobacter sakazakii</i> . ....	20
<b>Figura 4.</b> Prueba de sensibilidad antibiótica correspondiente a la muestra SR10 en medio Mueller-Hinton. ....	22
<b>Figura 5.</b> Perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislados de <i>Cronobacter sakazakii</i> . ....	25

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies de la investigación.....	16
<b>Tabla 2.</b> Detección de <i>Cronobacter</i> spp. en especias en polvo.....	23
<b>Tabla 3.</b> Evaluación del método microbiológico para la detección de <i>C. sakazakii</i> .....	24
<b>Tabla 4.</b> Determinación de los parámetros de rendimiento.....	24

## **Detección de *Cronobacter* spp. en especias a granel en polvo de tres mercados de Quito**

### **Detection of *Cronobacter* spp. in powdered bulk spices from three markets in Quito**

**Autores:** Nicol Carolina Barriga Bermeo<sup>1\*</sup> y Fernando René Santacruz Flores<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador.

\*nbarriga523@puce.edu.ec

#### **RESUMEN.-**

Las especias son ingredientes imprescindibles en la gastronomía del Ecuador, se caracterizan por mejorar el sabor, el olor y el color de las comidas; sin embargo, pueden presentar contaminación por microorganismos patógenos. El objetivo del estudio fue determinar la presencia de *Cronobacter* spp. en especias expandidas en tres mercados de Quito para una futura prevención de enfermedades transmitidas por alimentos. Se empleó la metodología microbiológica basada en la ISO 22964:2017 para la detección de esta bacteria y se utilizó el CLSI 2019 para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. De acuerdo con los resultados obtenidos el 80 % de las especias contenían este microorganismo con mayor presencia en pimienta negra y comino, al contrario del achiote y canela. La metodología microbiológica identificó 16 cepas de *C. sakazakii* y una *C. dublinensis*; esta técnica presentó sensibilidad (50 %) y especificidad baja (33,33 %). Las cepas de *C. sakazakii* mostraron sensibilidad antibiótica a todos los fármacos empleados. La investigación concluye que *C. sakazakii* está presente en especias como un contaminante que representaría un riesgo para la inocuidad alimentaria en Quito, este patógeno emergente puede ocasionar enfermedades infecciosas, por lo que su identificación y tratamiento oportuno es primordial.

**PALABRAS CLAVES:** *C. sakazakii*, contaminación, especias, mercados, Quito.

## **ABSTRACT.-**

Spices are essential ingredients in Ecuadorian gastronomy, they are characterized by improving the taste, the smell and the color of the food; however, this type of matrix can present contamination by pathogenic microorganisms. The objective of the study was to determine the presence of *Cronobacter* spp. in spices sold in three markets of Quito for future prevention of foodborne illnesses. The microbiological methodology based on ISO 22964:2017 was used for the detection of this bacterium and the CLSI 2019 was used for the antimicrobial susceptibility test. According to the results obtained, 80 % of the spices contained this microorganism with the greatest contamination in black pepper and cumin, unlike achiote and cinnamon. The microbiological methodology identified 16 strains of *C. sakazakii* and one *C. dublinensis*; this technique presented sensitivity (50 %) and low specificity (33,33 %). The *C. sakazakii* strains showed antibiotic sensitivity to all the drugs used. The research concludes that *C. sakazakii* is present in spices as a contaminant that would represent a risk for food safety in Quito, this emerging pathogen can cause infectious diseases, so its identification and timely treatment is essential.

**KEYWORDS:** *C. sakazakii*, contamination, markets, Quito, spices.

## **INTRODUCCIÓN**

Durante décadas las especias han formado parte de la cultura, la costumbre y la tradición de los países del mundo. A partir del año 5000 a. C. se considera la era del consumo y uso de las especias por los hallazgos encontrados en el Medio Oriente (Xie y Finley 2018). En efecto, estos productos se destacaron por ser utilizados en diversos fines, entre los más reportados se encontraron en matrimonios, comercios, treguas, tratados de guerra, negociaciones, rituales y comunicaciones entre comunidades aborígenes. Hoy en día, las especias tienen diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, agrícola y alimentaria (Sharangi y Acharya 2018). Se estima que para el 2027, se produzcan 3.2 millones de toneladas en los principales países exportadores, conformados por Estados Unidos, China, Alemania, Italia y Tailandia (Global Spices and Seasonings Industry 2019; Krom 2019).

Especia se nombra a cualquier parte de una planta, siendo raíz, corteza, hoja, flor, fruto o semilla. Se destaca por sus compuestos volátiles, fenoles, alcaloides, aceites esenciales y flavonoides que son de interés medicinal (Parveen et al. 2014; Zachariach y Leela 2018). Hoy en día, esta matriz alimentaria es empleada principalmente en la gastronomía para realzar el sabor, el olor y color de las comidas (Devi et al. 2018). Además de ser un agente saborizante proporciona propiedades antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes y antidepresivas (Duygu y Nilüfer 2019); incluso estimula el desarrollo de microorganismos benéficos y promueve la absorción de nutrientes (Peterson et al. 2019).

Los brotes de origen alimentario han conllevado un impacto en la salud pública. Reportes de India, Brasil, Turquía, Vietnam y China han identificado, en su mayoría, contaminación bacteriana en pimienta negra, paprika, cúrcuma, anís y ají (Van Doren et al. 2013). Durante los años comprendidos entre 1996-2014, Estados Unidos ha registrado aproximadamente 530 enfermedades

ocasionadas por la ingesta de especias contaminadas con patógenos (Gould et al. 2017). No obstante, a pesar de una búsqueda bibliográfica referente a la temática, en el país no hay información que proporcione si las especias a granel en polvo expandidas en Quito presentan patógenos alimentarios.

*Cronobacter* es un patógeno emergente perteneciente al filo Proteobacteria, correspondiente a la clase Gammaproteobacteria del orden Enterobacterales de la familia Enterobacteriaceae (Jang et al. 2018); se caracteriza por ser un microorganismo capsulado, bacilo Gram negativo, flagelar peritrico, anaerobio facultativo y no formador de esporas (Garbowska et al. 2015; Ogrodzki y Forsythe 2015). En el pasado este organismo era conocido como *Enterobacter cloacae* de pigmento amarillo, pero en 1980 fue denominado *Enterobacter sakazakii* y años más tarde renombrado *Cronobacter* por Iversen et al. (2008). El género *Cronobacter* incluye a siete especies: *C. dublinensis*, *C. condimenti*, *C. muytjensii*, *C. universalis*, *C. turicensis*, *C. malonaticus* y *C. sakazakii*; las tres últimas están asociadas a enterocolitis necrosantes, meningitis y neumonías en recién nacidos y lactantes con una mortalidad del 40 y 80 % (Li et al. 2017; Ling et al. 2018), incluso los adultos inmunodeprimidos pueden presentar desde infecciones en heridas y tracto urinario hasta enfermedades como septicemia, neumonía, osteomielitis y abscesos esplénicos (Patrick et al. 2014).

Años atrás, las técnicas microbiológicas para la detección de *Cronobacter* eran diversas; sin embargo, no proporcionaban una adecuada identificación al emplear protocolos de aislamiento de enterobacterias (Farmer 2015; Forsythe 2015). Hoy en día, existen metodologías tradicionales establecidas por organizaciones internacionales que brindan mayor sensibilidad y especificidad al utilizar fase de enriquecimiento previo, medios cromogénicos y no selectivos, y ensayos de confirmación con el fin de determinar la presencia de esta bacteria (Cortés-Sánchez y Espinosa-

Chaurand 2018), esto ha facilitado el aislamiento de *Cronobacter* en varias matrices, incluyendo muestras clínicas (secreciones, piel y heces), medio ambiente (agua, suelo e insectos) y varios alimentos (leches en fórmula, harina, cereal, frutas, ensalada, enlatados y deshidratados). También, se ha detectado en comida congelada, productos lácteos y cárnicos, y sobre todo en vegetales, hierbas frescas/secas, condimentos y especias (Holý y Forsythe 2014; Brandão et al. 2017; Aksu et al. 2018). No obstante, el hábitat natural de esta bacteria se desconoce, por lo que se le asocia a las plantas como fuente potencial de su reservorio y ruta de contaminación al presentar mayor prevalencia (20,1 %) en este tipo de matriz (Sani y Odeyemi 2015).

La presencia de *Cronobacter* en especias se debe a varias estrategias de supervivencia frente a la desecación. Esta bacteria posee un mecanismo para evitar el daño oxidativo y celular denominado “hipótesis de reemplazo de agua”, así como también la formación de filamentos y la producción de polisacáridos extracelulares (Breeuwer 2014), asimismo posee un heteropolisacárido capsular que le permite adherirse a superficies, de tal manera que puede colonizar partes de la planta y formar biofilms (Forsythe 2015). Además, *Cronobacter* acumula moléculas osmoprotectoras ( $K^+$  y glutamato) frente a condiciones de estrés osmótico y tiene un sistema Cpx, factores sigma (RpoN y RpoS) y genes (dnaK y dnaJ) que se expresan ante una respuesta hiperosmótica y estrés (Burgess et al. 2016). De igual forma, la incidencia de esta bacteria en especias es resultado de las condiciones inadecuadas de almacenamiento, manipuladores, transporte y distribución, proceso incompleto de secado, métodos ineficientes para la inactivación de microorganismos y falta de monitoreos de control de comercialización (Gurtler et al. 2014; Lopez et al. 2018).

Por otro lado, *C. sakazakii* es la especie de mayor importancia y relevancia en la actualidad por su detección en fórmulas lácteas en infantes, seguido de hierbas y especias, llegando a ser mortales para los neonatos menores de 28 días de nacidos (Forsythe et al. 2014; Jason 2015). Además, este

patógeno en desarrollo permanece durante 2 años en las fórmulas (Bennour Hennekinne et al. 2018). *C. sakazakii* tiene la capacidad de sobrevivir a situaciones adversas por formación de biofilms, cápsula de polisacárido, pH ácidos, estrés osmótico, adhesión a superficies, resistencia a la radiación UV y tolerancia a baja actividad de agua ( $a_w \sim 0.2$ ) (Fakruddin et al. 2014; Medina et al. 2014; Feeney et al. 2015). De igual manera, este organismo ha desarrollado resistencia a diversos fármacos, como a Ampicilina, Penicilina, Kanamicina, Gentamicina, Eritromicina, Cefalotina, Cefoxitina, Ácido nalidíxico (Kilonzo-Nthenge et al. 2012; Mossawi y Joubori 2015; Singh et al. 2015; Fei et al. 2018; Parra-Flores et al. 2018; Odeyemi y Sani 2019; Costa et al. 2020) y Colistina (Liu et al. 2017). Al respecto, la actual investigación pretende buscar patrones de sensibilidad de este agente bacteriano a partir de especias, con el fin de conocer la disponibilidad antibiótica para combatirlo de forma eficiente frente a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

La finalidad de este estudio es detectar a *Cronobacter* spp. en especias a granel en polvo adquiridas en tres mercados de la ciudad de Quito mediante la metodología microbiológica basada en la ISO 22964:2017, seguido de la evaluación del método microbiológico a través de una tabla tetracórica para la determinación de sensibilidad, especificidad e intervalo de confianza de Wilson al 95 %. Asimismo, establecer la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados de *C. sakazakii* frente a Ampicilina, Amikacina, Gentamicina, Tetraciclina, Ceftriaxona y Meropenem para precautelar la salud de los consumidores de especias.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestreo.-**

El presente estudio descriptivo se desarrolló mediante un muestreo por conveniencia. Se adquirieron 10 especias a granel en polvo, a excepción del ishpingo que se expende entero no en polvo, en cada uno de los mercados de San Roque y Mayorista en los dos últimos meses de las 2019 y 10 especias del mercado La Ofelia en enero del 2020 (Tabla 1); los mercados del estudio se seleccionaron por su ubicación geográfica, tamaño y distribución mayorista de abastecimiento (Chávez 2016). Las muestras que se obtuvieron fueron pimienta negra, comino, achiote, ají rocoto, canela, orégano, ajo, ishpingo, sal prieta, paprika y cúrcuma por mercado al ser de mayor consumo en la gastronomía ecuatoriana (Alvarado 2014; El Universo 2015); se adquirió más de 100 g de cada especia con su respectivo empaque de acuerdo con la norma NTE INEN 1529-2 (INEN 2013). Cada muestra se colocó en una funda plástica hermética etiquetada con su ficha informativa y fueron transportadas en un *cooler* a una temperatura bajo los 8 °C al laboratorio 107 del edificio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Una vez que las muestras llegaron al laboratorio se realizó el informe de muestreo y se analizaron en un lapso de 24 horas (INEN 2013).

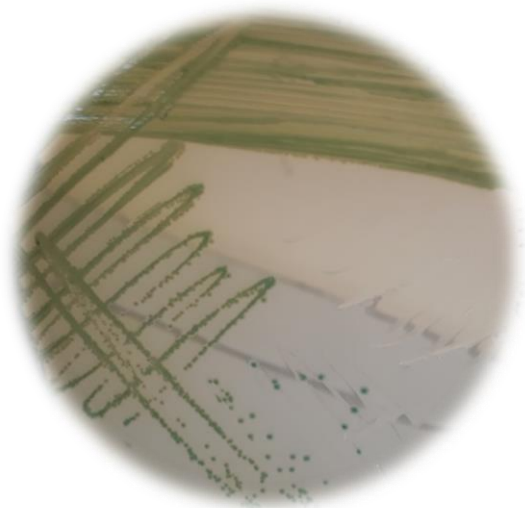
**Tabla 1.** Especies de la investigación.

Mercados					
San Roque		Mayorista		La Ofelia	
Especies	Código	Especies	Código	Especies	Código
Pimienta negra	SR01	Pimienta negra	MY03	Pimienta negra	OF09
Comino	SR02	Comino	MY07	Comino	OF10
Ají rocoto	SR03	Ají rocoto	MY08	Ají rocoto	OF06
Achiote	SR04	Achiote	MY02	Achiote	OF08
Sal prieta	SR05	-	-	Sal prieta	OF05
Canela	SR06	Canela	MY06	Canela	OF01
Orégano	SR07	Orégano	MY05	Orégano	OF02
Ishpingo	SR08	Ishpingo	MY01	Ishpingo	OF04
Ajo	SR09	Ajo	MY04	Ajo	OF07
Cúrcuma	SR10	Cúrcuma	MY10	-	-
		Paprika	MY09	Paprika	OF03

**Aislamiento de *Cronobacter* spp.-**

Se analizaron un total de 30 muestras y fueron procesadas como lo establece la norma ISO 22964:2017 (UNE 2017). En síntesis, se pesaron 10 g (RA310S, Sartorius Basic) por especia y se diluyeron en frascos con 90 ml de Agua Peptonada Tamponada (APT) y se los incubó a 35 °C (INB 500, Memmert) por 18 horas. Tras el período de incubación, se transfirió 100 µl de cada frasco de APT (medio no selectivo) a los tubos de enriquecimiento que contenían 10 ml de Caldo Selectivo *Cronobacter* más Vancomicina (CSCV), los tubos se incubaron a 42,5 °C (ULE 500, Memmert)

por 24 horas. Al día siguiente, se tomó 10 µl de los caldos selectivos y se sembraron por la técnica de aislamiento por agotamiento en Agar Cronobacter Cromogénico (ACC) y las placas se incubaron a 42,5 °C por 24 horas en condiciones de aerobiosis. Una vez que se evidenció crecimiento en las cajas, se seleccionó cinco colonias típicas de color azul a verde azulado de acuerdo con la norma (Figura 1); luego, se sembraron por agotamiento las colonias sospechosas de *Cronobacter* en el medio Tripticasa Soya Agar (TSA, por sus siglas en inglés) y se incubaron a 35 °C por 24 horas (Figura 2). El control positivo, negativo y blanco de la investigación fueron *C. sakazakii* ATCC 29544, *E. coli* ATCC 25922 y agua destilada estéril.



**Figura 1.** Cultivo de 24 horas de *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 en medio ACC.



**Figura 2.** Cultivo de 24 horas de *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 en TSA.

### **Caracterización fenotípica.-**

A partir de las colonias de color amarillo en el medio TSA, se realizó tinción Gram y ensayos de confirmación para la identificación fenotípica de *Cronobacter* spp. (Figura 3). Finalmente, se conservaron los aislados de *Cronobacter* spp. en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) con glicerol al 20 % y se almacenaron a -20 °C.

### **Ensayos de confirmación.-**

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas y metabólicas para la identificación y la confirmación fenotípica de los aislados presuntivos de *Cronobacter* spp.:

#### Oxidasa.-

Se colocó una colonia sobre el disco de oxidasa y se esperó unos minutos para una reacción negativa (color amarillo) (UNE 2017) característico de *Cronobacter* spp. al no presentar enzimas oxidasas (Song et al. 2018).

#### Hidrólisis de un sustrato de 4-nitrofenil $\alpha$ -D-glucopiranosido.-

Se inoculó una colonia en 2 ml de solución salina fisiológica de NaCl al 0,85 % y se añadió 2 ml del sustrato  $\alpha$ -D-glucopiranosido. Después de la incubación en baño María a 37 °C (Agibat, Selecta) por 4 horas, se midió la coloración amarilla en espectrofotómetro a 405 nm (Ultrospec 2000 UV/Visible, Pharmacia Biotech). Tras la medición de la coloración, se consideró positivo los valores de absorbancia > a 0,3 unidades (UNE 2017). Este ensayo se emplea para la detección de la enzima  $\alpha$ -D-glucosidasa a través del 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido, el cual va a actuar como compuesto cromogénico dando una coloración amarilla al ser metabolizado, evidenciándose en la bacteria *Cronobacter* spp. (Iversen et al. 2007; GoldBio 2018).

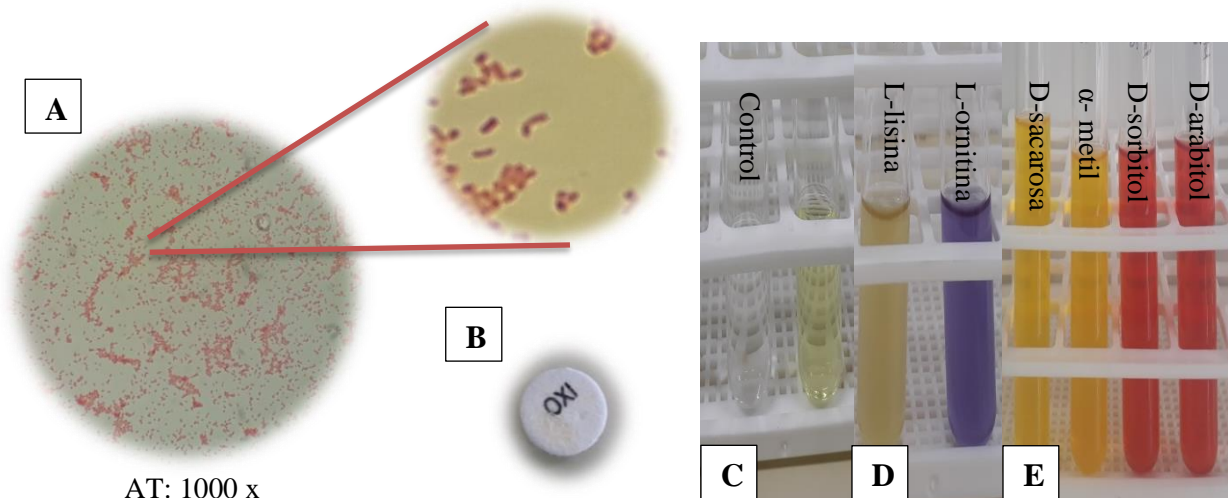
#### Descarboxilasa de L-lisina y L-ornitina.-

Se inoculó una colonia en 5 ml de caldo L-lisina / caldo L-ornitina y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Tras el periodo de incubación, se observó la presencia de enzimas descarboxilasas a través de una coloración violeta (resultado positivo) y una coloración amarilla (resultado negativo) (UNE 2017). *Cronobacter* spp. da una coloración amarilla en el ensayo descarboxilasa L-lisina al no

poseer la enzima lisina descarboxilasa (Lu et al. 2014; HIMEDIA 2019). La prueba de descarboxilasa L-ornitina para esta bacteria da una reacción positiva (coloración violeta) al presentar la enzima ornitina descarboxilasa que actúa en presencia del aminoácido, como resultado se produce la putrescina alcalinizando el medio (Condalab 2019).

#### Fermentación de hidratos de carbono.-

Se preparó el medio básico (digerido enzimático de caseína 10 g, cloruro de sodio [NaCl] 5 g, rojo fenol 0,02 g y agua 1000 ml) y la disolución de D-arabitol,  $\alpha$ -metil-D-glucósido, D-sorbitol y D-sacarosa respectivamente (8 g de hidrato de carbono y agua 100 ml). De cada disolución de hidrato carbono se transfirió 125 ml a su respectivo medio básico en 875 ml y se mezclaron. Se dispensó 10 ml del medio completo filtrado (filtro de 0,2  $\mu$ m) de cada azúcar a tubos estériles. Luego, se suspendió una colonia en cada caldo y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Se evidenció un viraje de color (de rojo a amarillo) considerándolo positivo y sin viraje de color (rojo) un resultado negativo (UNE 2017). *Cronobacter sakazakii* tiene actividad bioquímica en D-sacarosa y  $\alpha$ -metil-D-glucósido dando una coloración amarilla (reacción positiva) al fermentar el azúcar acidificando el medio, en cambio el D-arabitol y el D-sorbitol no fermenta, como resultado se obtiene una coloración roja (Jackson y Forsythe 2016; UNE 2017).



**Figura 3.** Perfil bioquímico de los aislados de *Cronobacter sakazakii*. A) Tinción Gram (bacilo corto gramnegativo en forma de bastón). B) Prueba de oxidasa negativa. C) Prueba de hidrólisis de 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glucopiranosido positiva con absorbancia  $> 0,3$  unidades. D) Prueba de descarboxilación de L-lisina negativa y L-ornitina positiva. E) Prueba de fermentación de hidratos de carbono positiva para D-sacarosa y  $\alpha$ -metil-D-glucósido y negativo para D-sorbitol y D-arabitol.

#### **Evaluación del método microbiológico para la detección de *Cronobacter sakazakii*.**

Se realizó una tabla tetracórica en la que se indicó el número de aislados verdaderos positivos (VP), falsos positivos (FP), falsos negativos (FN) y verdaderos negativos (VN) de *C. sakazakii* (Bravo-Grau y Cruz 2015). Se determinaron VP a las muestras que presentaron positividad tanto en el tubo CSCV como en el medio ACC, al contrario de los VN que registraron una reacción negativa en las dos fases anteriores. Las muestras que dieron negativo en el tubo CSCV, crecimiento positivo en ACC y coloración roja a partir de la fermentación de D-arabitol se consideraron como FP; en cambio, las muestras que resultaron positivas en el caldo de enriquecimiento, pero negativo en el medio selectivo cromogénico se clasificaron como FN. Además, se calculó la sensibilidad, la especificidad (Trevethan 2017) y el intervalo de confianza de Wilson al 95 % (NCSS 2017) del método microbiológico con las siguientes fórmulas:

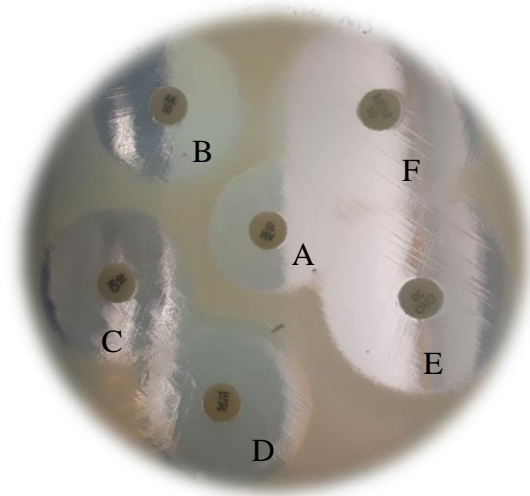
$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{(VP + FN)} * 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{(VN + FP)} * 100$$

$$\text{Intervalo de confianza de Wilson} = \frac{(2n \hat{p} + z_{1-\alpha/2}^2 \pm z_{1-\alpha/2} \sqrt{z_{1-\alpha/2}^2 + 4n \hat{p} (1 - \hat{p})})}{2(n + z_{1-\alpha/2}^2)}$$

### **Prueba de susceptibilidad antibiótica de *C. sakazakii*.**

La prueba de difusión en disco se empleó para el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana como lo indica el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos (CLSI 2019). A partir de un cultivo de *C. sakazakii* de 24 horas, se tomó dos colonias para la suspensión en caldo BHI. Después de 2 horas de incubación a 35 °C, se midió la turbidez en espectrofotómetro a una longitud de 625 nm. Una vez alcanzada la escala McFarland 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) se inoculó la suspensión sobre el medio Agar Mueller-Hinton en tres planos (horizontal, vertical y diagonal) y se rodeó el hisopo alrededor de la caja Petri. Se utilizaron los siguientes discos: Ampicilina (10 µg), Amikacina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Ceftriaxona (30 µg) y Meropenem (10 µg) por ser representantes de grupos antibióticos reportados en ensayos de resistencia antimicrobiana en esta bacteria (Mardaneh y Soltan Dallal 2017; Parra-Flores et al. 2018; Costa et al. 2020; Pakbin et al. 2020). Las cajas se incubaron a 35 °C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis. Tras la incubación, se midió los halos de inhibición de cada antibiótico para reportarlo como sensible, intermedio o resistente como lo determina el CLSI (2019) (Figura 4). Como control positivo se empleó a *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544, mientras que *Escherichia coli* ATCC 25922 como control negativo.



**Figura 4.** Prueba de sensibilidad antibiótica correspondiente a la muestra SR10 en medio Mueller-Hinton. S: Sensible. A) Ampicilina (10 µg) S (20 mm). B) Amikacina (30 µg) S (26 mm). C) Gentamicina (10 µg) S (24 mm). D) Tetraciclina (30 µg) S (26 mm). E) Ceftriaxona (30 µg) S (30 mm). F) Meropenem (10 µg) S (32 mm).

## RESULTADOS

### Aislamiento de *Cronobacter* spp.-

Se analizaron 30 muestras, como resultado se obtuvieron 17 (56,67 %) aislados presuntivos de *Cronobacter* spp., de los cuales 16 (53,33 %) se identificaron a través de pruebas fenotípicas como *Cronobacter sakazakii* y 1 (3,33 %) como *Cronobacter dublinensis*. Adicionalmente, en los tres mercados de estudio se evidenció la presencia de *Cronobacter sakazakii* en las muestras de pimienta negra y comino (18,8 %), seguido de orégano, paprika y cúrcuma (12,5 %) en al menos dos mercados; a diferencia del ají rocoto, ajo, ishpingo y sal prieta (6,25 %) que se encontró en un solo mercado, mientras que el achiote y la canela no presentaron este microorganismo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Detección de *Cronobacter* spp. en especias en polvo.

Especias	Mercados			N ° de muestras positivas	%	Cepas aisladas	
	SR	MY	OF			<i>C. sakazakii</i>	<i>C. dublinensis</i>
Pimienta negra	1	1	1	3	18,8	3	1
Comino	1	1	1	3	18,8	3	-
Achiote	0	0	0	0	0	0	-
Ají rocoto	0	1	0	1	6,25	1	-
Canela	0	0	0	0	0	0	-
Orégano	1	1	0	2	12,5	2	-
Ajo	0	0	1	1	6,25	1	-
Ishpingo	1	0	0	1	6,25	1	-
Sal prieta	1	-	0	1	6,25	1	-
Paprika	-	1	1	2	12,5	2	-
Cúrcuma	1	1	-	2	12,5	2	-
<b>Total</b>	6	6	4	16	100	16	1

SR: San Roque; MY: Mayorista; OF: La Ofelia; -: no se analizó.

#### **Evaluación del método microbiológico para la detección de *Cronobacter sakazakii*.**

El método microbiológico basado en la ISO 22964:2017 detectó la presencia de 16 (53,33 %) cepas de *C. sakazakii* de 30 especias expandidas en los mercados de San Roque, Mayorista y La Ofelia de Quito (Tabla 3). La técnica empleada presentó una sensibilidad del 50 % con un intervalo de confianza (IC) del 95 % (62,69 a 90,49 %) y una especificidad del 33,33 % con un IC del 95 % (9,51 a 37,31 %) (Tabla 4).

**Tabla 3.** Evaluación del método microbiológico para la detección de *C. sakazakii*.

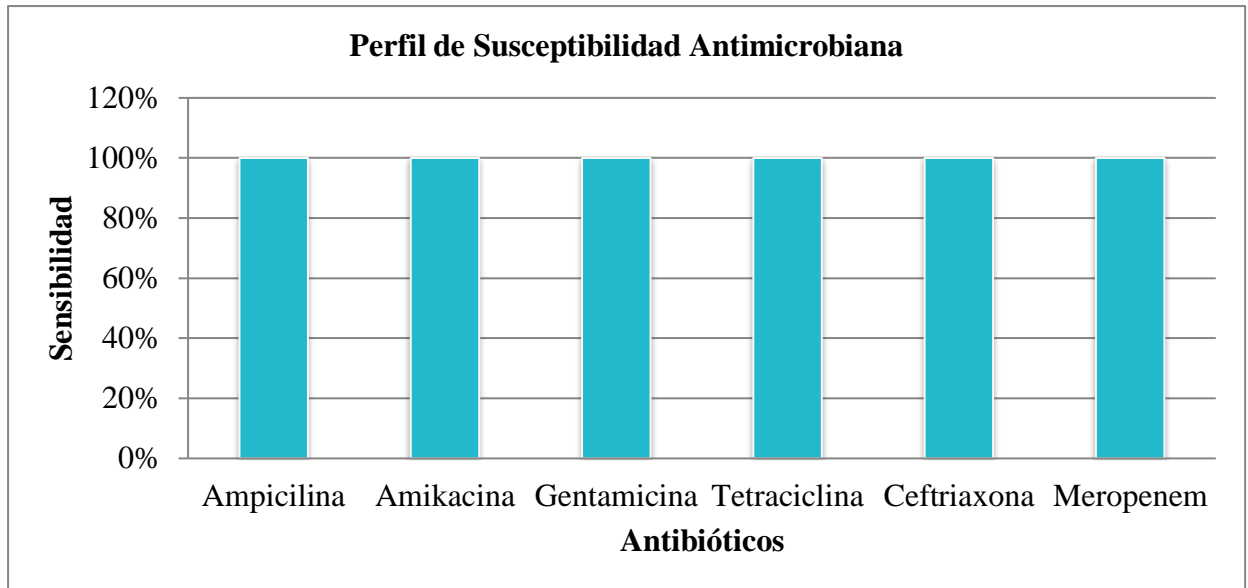
<b>MÉTODO MICROBIOLÓGICO BASADO EN LA ISO 22964:2017</b>				
	<b>BACTERIA PRESENTE</b>	<b>BACTERIA AUSENTE</b>	<b>TOTAL</b>	<b>%</b>
<b>POSITIVO</b>	12	4	16	53,33
<b>NEGATIVO</b>	12	2	14	46,67
<b>TOTAL</b>	24	6	30	100

**Tabla 4.** Determinación de los parámetros de rendimiento.

<b>PARÁMETROS DE RENDIMIENTO</b>		
		<b>IC DE WILSON DEL 95 %</b>
<b>SENSIBILIDAD</b>	50 %	62,69 a 90,49 %
<b>ESPECIFICIDAD</b>	33,33 %	9,51 a 37,31 %

**Prueba de susceptibilidad antibiótica de *C. sakazakii*.-**

Los 16 aislados de *C. sakazakii* presentaron sensibilidad antibiótica (100 %) a todos los antimicrobianos probados (Figura 5).



**Figura 5.** Perfil de susceptibilidad antibiótica de los aislados de *Cronobacter sakazakii*.

## DISCUSIÓN

### Aislamiento de *Cronobacter* spp.-

Durante el periodo comprendido entre 1973 y 2010 se registraron brotes de ETAs a causa de microorganismos contaminantes en especias a nivel mundial, pero ninguna originada por *Cronobacter* spp. Las especias pimienta negra/blanca, paprika, cúrcuma, curry, anís, hinojo y condimentos fueron una fuente potencial de aislamiento de patógenos alimentarios (FDA 2013). No obstante, a nivel local y regional no existen reportes de infecciones y/o enfermedades causadas por ingerir especias contaminadas con *Cronobacter* spp., esto podría ocurrir debido a que este agente etiológico no se encuentra dentro de los microorganismos de notificación obligatoria, lo que dificulta obtener información sobre este organismo (CDC 2019). Además, *Cronobacter* al no ser de reporte obligatorio y causar rara vez infecciones en adultos sanos, el personal de salud posiblemente por desconocimiento descartaría este microorganismo como el agente causal de una ETA a lo mejor atribuyéndole a otro organismo (Brandão et al. 2018; Yong et al. 2018).

El presente estudio detectó a *Cronobacter* spp. en especias a granel en polvo de tres mercados de Quito. Se observó que la pimienta negra (*Piper nigrum*) y el comino (*Cuminum cyminum*) presentaron el mayor número de aislamientos, resultados similares a Belal et al. (2013) al encontrar este agente etiológico en muestras de pimienta negra y comino. En cuanto a la paprika (*Capsicum annum*) se halló una menor contaminación con *Cronobacter* spp., seguido del ajo (*Allium sativum*) como lo describen Li et al. (2017) y Miranda et al. (2017) en varias matrices alimentarias, entre ellas la paprika y el ajo. Los autores Belal et al. (2013) y Singh et al. (2015) reportaron el aislamiento de *Cronobacter* spp. en cúrcuma y de igual manera, el estudio detectó a *C. sakazakii* en cúrcuma (*Curcuma longa*), por lo que los resultados obtenidos concuerdan con la literatura citada. En cambio, Nokwanda y Ijabadeniyi (2013) proporcionaron información de la presencia de *C. sakazakii* en ají (50 %) mientras que Liu et al. (2018) registraron 60 % en ají en polvo; esta investigación encontró menor cantidad (6,25 %) de este organismo en ají rocoto (*Capsicum pubescens*), esto se debe al número de muestras analizadas de esta especia en relación con los otros estudios nombrados que emplean mayor cantidad de muestras de ají.

Además, Jang et al. (2018) identificaron a *C. sakazakii* a partir de muestras de orégano; en el estudio se logró aislar a *C. sakazakii* en orégano (*Origanum vulgare*), de tal manera que la investigación anterior respalda lo encontrado. Con respecto al ishpingo (*Ocotea quixos*) y sal prieta presentaron 6,25 % de contaminación con *Cronobacter*, aunque no existe información disponible sobre la presencia de esta bacteria en las especias ecuatorianas mencionadas, la investigación considera que posiblemente se debe al uso de equipos contaminados con este agente etiológico, herramientas no estériles y/o no desinfectadas correctamente, áreas inadecuadas de manufactura y contaminación cruzada al solo evidenciarse en un mercado (Jaradat et al. 2014; Aksu et al. 2019). Referente a la canela (*Cinnamomum verum*) en polvo no se detectó este microorganismo al igual

que las investigaciones realizadas por Hochel et al. (2012), Brandão et al. (2017) y Arslan y Ertürk (2019), aunque los estudios no señalaron el estado de la especia, es decir, fresca, deshidratada o en polvo. Hasta el momento no existe referencia bibliográfica que afirme o rechace la presencia de *Cronobacter* spp. en achiote (*Bixa orellana*). En definitiva, los resultados encontrados permiten enfatizar la presencia de este microorganismo en especias, que varía según la parte de la planta, es decir 35,3 % en raíz, 34,8 % en fruta/semilla, 27 % en mixto, 18,6 % en hierbas secas y 12,5 % en corteza/flores como lo determinaron FAO y WHO (2014).

Por otro lado, la actual investigación evidenció que los comerciantes utilizaban la misma herramienta para la toma de las muestras, no manipulaban correctamente las especias y estas se encontraban expuestas al medio ambiente; incluso se podría considerar que las matrices alimentarias no tuvieron un buen manejo de almacenamiento al percibir el olor impregnado de una especia en otra. Esto podría indicar que las especias se encuentran expuestas a la contaminación microbiana, por lo que existe la probabilidad de que la salud de la población quiteña de diferentes grupos de edades que consumen especias sin un tratamiento térmico se vea afectada considerablemente por ser una fuente potencial de *Cronobacter* (Ogihara et al. 2014; Li et al. 2017).

En los últimos años se han desarrollado diversas investigaciones de *Cronobacter* en diferentes matrices, entre las más destacadas en especias. Según el estudio de Baumgartner et al. (2009) se aislaron 7 cepas de *Cronobacter* spp. de 26 hierbas y especias analizadas, entre ellas se encontraron pimienta (blanca y negra) molida, curry de Madrás y mezcla de hierbas. Turcovský et al. (2011) reportaron que 13 de 21 especias contenían *Cronobacter* spp., con una mayor prevalencia en pimienta negra. Otra investigación (Li et al. 2014) identificó 13 muestras con *Cronobacter* (6,7 %) de 195 matrices alimentarias, siendo las hierbas y las especias (pimienta negra) la segunda fuente de obtención de este microorganismo con 4,5 %. De igual manera, Mozrová et al. (2014)

determinaron que los productos secos, entre ellas las especias, presentaron un mayor número de aislados de *Cronobacter*. De hecho, Ueda (2017) comprobó la incidencia de *Cronobacter* en múltiples alimentos (deshidratados y frescos) y halló un alto porcentaje de aislamiento en hierbas y especias (15 %).

En torno a otras fuentes alimentarias, Restaino et al. (2006) hallaron 20 % de vegetales y especias secas, 33 % de cereal y 17,9 % de harina con *Cronobacter*. Además, Kim et al. (2011) indicaron la prevalencia de este género en vegetales, frutas y granos. Lee et al. (2012) reportaron a *Cronobacter* en cereales (16 %), vegetales (14,8 %) y frutas (7,3 %). Ogihara et al. (2014) determinaron que hierbas (47,1 %) y vegetales (35,3 %) presentaron mayor incidencia con *Cronobacter*, al contrario de frutas y hojas de té que no mostraron contaminación con esta bacteria. Vojkowska et al. (2015) encontraron 9,6 % de muestras positivas en vegetales (pepino, zanahoria, lechuga y col) y 2,5 % en frutas (fresa) con *Cronobacter*. De acuerdo con Berthold-Pluta et al. (2017) examinaron hojas de vegetales, coles, frutas y jugos, como resultado 21 muestras (lechuga, brócoli, col, alfalfa, rábano) presentaron *Cronobacter*. Otra línea de investigación en matrices como arroz y trigo han sido relacionadas estrechamente con *Cronobacter* por su alta incidencia en este tipo de alimentos (Lou et al. 2019). Al comparar estas evidencias con los resultados obtenidos permiten reiterar que el posible reservorio de *Cronobacter* es la rizósfera y el potencial hábitat natural de esta bacteria son las plantas tal como lo indicaron Schmid et al. (2009).

En cuanto a las investigaciones de Feng et al. (2014), Fraňková et al. (2014), Sankarankutty y Chede (2017) y Berthold-Pluta et al. (2019) reportaron resultados positivos de la actividad antimicrobiana de algunas especias que reducen o inhiben el crecimiento de *Cronobacter*, en las que se encuentran al orégano, canela, ajo y cúrcuma. Gottardi et al. (2016) indicaron que los componentes activos de este ingrediente alimentario juegan un papel muy importante en la

inhibición de patógenos alimentarios. La allicina y el sulfuro de dialilo del ajo tienen acción bactericida contra *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* mientras que la curcumina (cúrcuma) no permite el crecimiento de ciertos hongos y bacterias. Además, que señalaron la actividad antimicrobiana y antifungal del cuminal (comino) mencionaron que la piperina (pimienta negra) actúa sobre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus*; al contrario de la capsaicina del ají rocoto que no favorece el desarrollo de *S. aureus* y *S. Typhimurium*. En cambio, Viuda-Martos et al. (2012) establecieron que la nisina del achiote inhibe bacterias Gram positivas y Gram negativas. Da Silva Gebara et al. (2020) encontraron que *C. albicans* y *M. tuberculosis* no crecen por los componentes de la paprika. Davidson (2017) y Xie y Findeley (2018) mencionaron que el cinamaldehído y otros compuestos (benzaldehído y acetato de cinamuro) de la canela poseen un amplio espectro de inhibición frente a bacterias y hongos; algo similar indicaron sobre los compuestos activos del orégano. Scalvenzi et al. (2016) demostraron que el ishpingo posee actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos. A cerca de la sal prieta se desconoce el componente activo debido a que es una especia mixta compuesta por maní, maíz molido, comino, sal, achiote y cilantro (Mera y Zavala 2019). Es evidente que las especias poseen una amplia actividad antimicrobiana, pero puede verse afectada por tipo y variedad de planta, condiciones de crecimiento, tiempo de cosecha (madurez), almacenamiento y secado; este último factor está involucrado en la disminución de la efectividad de los componentes activos de las especias contra los patógenos presentes en los alimentos (Pinkas y Keller 2014), por lo que esta determinante podría encaminar a explicar uno de los motivos de la presencia de *Cronobacter* en esta matriz alimentaria.

### **Métodos de detección de *Cronobacter sakazakii*.**

En la última década se han desarrollado técnicas eficaces que permiten la identificación de bacterias causantes de ETAs. Existen diversos métodos de detección y diagnóstico de *Cronobacter* spp., se encuentran técnicas microbiológicas, inmunológicas, PCR, biosensores, MALDI-TOF e hibridación de ARN con flujo lateral (Song et al. 2018). Los protocolos microbiológicos actuales de aislamiento de *Cronobacter* consisten en caldos de enriquecimiento, medios cromogénicos y no selectivos, seguido de pruebas bioquímicas; estos procesos presentan una baja sensibilidad y especificidad por su caracterización fenotípica (UNE 2017; Huertas-Caro et al. 2019).

La metodología microbiológica basada en la ISO 22964:2017 mostró una sensibilidad (50 %) y una especificidad baja (33,33 %), correspondiente a las 16 cepas aisladas de *C. sakazakii* como se indicó en la Tabla 3. Hasta el momento no hay estudios disponibles que permitan apoyar los resultados obtenidos, aunque existe una investigación cercana al estudio realizada por De Benito et al. (2019) donde reportaron el análisis de 24 muestras (ocho réplicas inoculadas con altas y bajas concentraciones de *Cronobacter* spp. y sin inocular) de almidón y lactosa respectivamente, de las cuales se obtuvo baja sensibilidad del 65 % (almidón) y 67 % (lactosa) al presentar un inóculo menor al establecido, y alta especificidad (99 y 100 %) con casos de falsos positivos al mostrar contaminación cruzada utilizando el mismo método. Con respecto al IC de la sensibilidad (62,69 a 90,49 %) y la especificidad (9,51 a 37,31 %) presentaron intervalos estrechos, lo que indica una estimación más precisa. Sin embargo, los rangos obtenidos son amplios, de tal manera que dificultan la precisión de los parámetros de rendimiento y la exactitud de la técnica al emplear un número limitado de muestras (Hess et al. 2012; Hazra 2017).

En la misma línea de investigación se pueden emplear métodos moleculares para la identificación de *C. sakazakii*. Entre ellos se encuentra la técnica de Amplificación Isotérmica mediada por Bucle denominada LAMP por sus siglas en inglés, este ensayo molecular es de alta sensibilidad y especificidad, de bajo costo y rápida detección de patógenos en alimentos (Liu et al. 2012). Esta metodología proporciona múltiples ventajas: alta eficiencia de amplificación, tolerancia a inhibidores presentes en las muestras, uso tanto para material genético monocatenario (ARN) como bicatenario (ADN) y visualización a través de un precipitado y/o bioluminiscencia, incluso no utiliza equipos de nueva generación ni personal experto. Por lo mencionado anteriormente, LAMP es una técnica accesible y de alto rendimiento para la detección de agentes patógenos en la industria alimentaria (Xu 2016). Liu et al. (2009) en su estudio indicaron resultados favorables para la técnica LAMP al obtener alta sensibilidad ( $1,2 \times 10^1$  UFC / 100 g de muestra) y especificidad en la detección de *Cronobacter* spp. en 15 cepas y 61 distintas de este género en fórmulas infantiles. De igual manera, Fan et al. (2012) reportaron una gran especificidad con LAMP al diferenciar 22 cepas de *C. sakazakii* de 52 pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y una sensibilidad 10 veces mejor que el PCR.

### **Prueba de susceptibilidad antibiótica de *C. sakazakii*.**

En la actualidad, la resistencia antibiótica presente en la cadena alimentaria es un problema que repercute en la salud pública (OMS 2020). Los agentes bacterianos pueden transmitir su resistencia a otros grupos de bacterias, entre ellas patógenas, mediante plásmidos, fagos y transposones; de tal manera que favorece el surgimiento de cepas multiresistentes con mayor virulencia (Hudson et al. 2017; Li y Fanning 2017). Los genes de resistencia a los antibióticos (GRAs) se propagan fácilmente como resultado del uso inadecuado de fármacos en los cultivos (agricultura) y la crianza de animales de producción en la cadena alimentaria; además de la resistencia natural donde los

genes de resistencia de una bacteria se transfieren a su descendencia de forma vertical y la resistencia adquirida que se da a través de procesos de conjugación, transformación o transducción (transferencia horizontal de genes) (Founou et al. 2016). Por lo mencionado, el consumo de alimentos de origen animal o vegetal tratados con fármacos podrían albergar patógenos resistentes a los medicamentos y estos ser transferidos a la microbiota intestinal del ser humano (Samanta y Bandyopadhyay 2020). Por consiguiente, aumentaría la mortalidad de las personas y los costos médicos como resultado de la disminución de las opciones terapéuticas (antibióticos) (OPS 2016).

En la investigación los 16 aislados de *C. sakazakii* presentaron sensibilidad a todos los antimicrobianos probados, esto indica la disponibilidad antibiótica para combatir infecciones y/o enfermedades causadas por *C. sakazakii* de forma eficiente en el país. Brandão et al. (2017) reportaron sensibilidad a todos los fármacos empleados frente a *C. sakazakii* al igual que este estudio. Investigaciones afines han reportado resultados similares a los obtenidos como Vasconcellos et al. (2018) y Silva et al. (2019). Sin embargo, Costa et al. (2020) hallaron resistencia a diversos fármacos en aislados de *C. sakazakii* y reportaron Ampicilina (80 %), Nitrofurantoína (15 %), Gentamicina (5 %), Aztreonam (15 %), Ácido Nalidíxico (15 %), Tetraciclina (5 %) y Ceftazidima (15 %). Por tal motivo, es importante la búsqueda de resistencia de *C. sakazakii* a partir de matrices alimentarias, entre ellas especias, porque permitirá conocer los antibióticos adecuados para el control de este microorganismo a través de estudios de vigilancia y monitoreo.

## **CONCLUSIÓN**

La actual investigación es el primer estudio que proporciona la detección de *Cronobacter* spp. en especias a granel en polvo en Quito. Se determinó que las especias adquiridas en los mercados San Roque, Mayorista y La Ofelia son una fuente de aislamiento de *Cronobacter sakazakii*, donde la

pimienta negra y el comino presentaron mayor presencia de este microorganismo al contrario del achiote y canela. Se evaluó la metodología microbiológica basada en la ISO 2296:2017, norma con una aplicabilidad en alimentos y muestras ambientales, que identificó 16 cepas de *C. sakazakii* lo que demuestra ser una técnica idónea para la identificación de esta bacteria a partir de especias a granel en polvo. El estudio determinó que los aislados de *C. sakazakii* no presentaron resistencia antibiótica a ningún fármaco empleado, esto indica que son de disponibilidad terapéutica para combatir a este microorganismo de forma eficaz. En definitiva, *C. sakazakii* es un contaminante presente en especias que representaría un riesgo para la inocuidad alimentaria en Quito. *C. sakazakii* al ser un patógeno emergente podría afectar la salud de grupos de personas de distintas edades de la población quiteña al consumir especias en polvo sin un tratamiento térmico previo. Es por ello que su identificación y tratamiento oportuno es de gran relevancia para combatir enfermedades infecciosas causadas por este agente microbiano.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar análisis moleculares para corroborar la identificación de las 17 cepas de *Cronobacter* spp. Se sugiere que en futuras investigaciones se utilice una mayor cantidad y variedad de muestras (condimentos, hierbas frescas/secas, vegetales, frutas, cereales, harinas, fórmulas lácteas y productos cárnicos) con un perfil de susceptibilidad antimicrobiana con el fin de evaluar la técnica microbiológica basada en la ISO 2296:2017 y obtener más datos relacionados a su resistencia a nivel de país. Adicionalmente, la información abordada en el estudio permite enfocarse en la actividad antimicrobiana de las especias para evaluar su efectividad frente a *C. sakazakii*.

## **AGRADECIMIENTOS**

El estudio fue apoyado por el proyecto “Análisis de la calidad microbiológica de especias vendidas a granel en el Distrito Metropolitano de Quito”, con código contable QINV0211-IINV529010200 perteneciente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Al laboratorio de Herpetología de la PUCE por facilitar el uso de los equipos y a la sala de preparaciones de la FCEN de la universidad por el apoyo brindado durante la fase experimental. De igual manera, agradecemos a todas las personas que hicieron posible el desarrollo y culminación de este proyecto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksu F, Sandikçi Altunatmaz S, Issa G, Aksoy A, Aksu H. 2019. Prevalence of *Cronobacter* spp. in various foodstuffs and identification by multiplex PCR. Food Sci Technol. 39(3):729-734. [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612019000300729](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612019000300729). doi:10.1590/fst.06818.

Aksu F, Sandikçialtunatmaz S, Issa G, Aksoy A, Aksu H. 2018. Prevalence of *Cronobacter* spp. in various food stuffs and identification by multiplex PCR. Food Sci. Technol. 1-6. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0101-20612018005026107&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0101-20612018005026107&lng=en&nrm=iso&tlng=en). doi:10.1590/fst.06818.

Alvarado AC. 2014. Especies ecuatorianas para realzar el aroma de las comidas. <https://ec.emedemujer.com/cocina/especies-ecuatorianas-para-realzar-el-aroma-de-las-comidas/>

Arslan S, Ertürk HG. 2019. Prevalence, phenotypic and genotypic characterization, virulence potential and antimicrobial resistance of *Cronobacter* species from ready-to-eat foods. Research square. doi: 10.21203/rs.2.13644/v1.

Baumgartner A, Grand M, Liniger M, Iversen C. 2009. Detection and frequency of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other infant formula. Int J Food Microbiol. 136(2):189-192. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.009.

Belal M, Al-Mariri A, Hallab L, Hamad I. 2013. Detection of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from medicinal plants and spices in Syria. J Infect Dev Ctries. 7(2):82-89. doi:10.3855/jidc.2222.

Bennour Hennekinne R, Guillier L, Fazeuilh L, Ellsz T, Forsythe S, Jackson E, Meheut T, Gnanou Besse N. 2018. Survival of *Cronobacter* in powdered infant formula and their variation in biofilm formation. *Lett. Appl. Microbiol.* 66(6):496-505. doi:10.1111/lam.12879.

Berthold-Pluta A, Garbowska M, Stefanska I, Pluta A. 2017. Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* 65:221-230. doi:10.1016/j.fm.2017.03.005.

Berthold-Pluta A, Stasiak-Róžańska L, Pluta A, Garbowska M. 2019. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils against *Cronobacter* strains. *Eur Food Res Technol.* 245:1137–1147. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00217-018-3218-x>. doi:10.1007/s00217-018-3218-x.

Brandão ML, Umeda NS, de Filippis I. 2018. *Cronobacter* spp.: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil. *Braz. J. Food Technol.* 21:1-9. [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1981-67232018000100301#B006](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232018000100301#B006). doi:10.1590/1981-6723.7417.

Brandão ML, Umeda NS, Jackson E, Forsythe SJ, de Filippis I. 2017. Isolation, molecular and phenotypic characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. from Brazilian retail foods. *Food Microbiol.* 63:129-138. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000201630363X>. doi:10.1016/j.fm.2016.11.011.

Bravo-Grau S, Cruz JP. 2015. Estudios de exactitud diagnóstica: herramientas para su interpretación. *Rev Chil Radiol.* 21(4):158-164. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchradiol/v21n4/art07.pdf>.

Breeuwer P. 2014. Adaptation of pathogenic microorganisms to dry conditions. In: Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL, editors. *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. New York: Springer. p. 37-48.

Burgess CM, Gianotti A, Gruzdev N, Holah J, Knøchel S, Lehner A, Margas E, Esser SS, Sela S, Tresse O. 2016. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *Int J Food Microbiol.* 221:37-53.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051530194X>.  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.014

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2019. *Cronobacter* infections and infants. Georgia (GA): Centers for Disease Control and Prevention.  
<https://www.cdc.gov/features/cronobacter/index.html>.

Chávez CG. 2016. Plaza mayorista de abasto [tesis]. [Quito]: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/>.

Condalab. 2019. Medio para la descarboxilación de L-ornitina ISO.  
[https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=9171](https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=9171)

Cortés-Sánchez AJ, Espinosa-Chaurand LD. 2018. *Cronobacter sakazakii* un peligro para la salud proveniente de los alimentos. *Revista de Aplicación Científica y Técnica.* 8(11):7-19.  
[http://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Aplicacion\\_Cientifica\\_y\\_Tecnica/vol4num11/Revista\\_de\\_Aplicacion\\_Cientifica\\_y\\_Tecnica\\_V4\\_N11\\_2.pdf](http://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Aplicacion_Cientifica_y_Tecnica/vol4num11/Revista_de_Aplicacion_Cientifica_y_Tecnica_V4_N11_2.pdf).

Costa PV, Vasconcellos L, da Silva IC, de Mello Medeiros V, Forsythe SJ, Brandão ML. 2020. Multi-locus sequence typing and antimicrobial susceptibility profile of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* isolated from corn-based farinaceous foods commercialized in Brazil. *Food Res Int.* 129:1-7. doi:10.1016/j.foodres.2019.108805.

Da Silva Gebara R, Taveira GB, de Azevedo dos Santos L, Calixto SD, Simão TL, Lassounskaia E, Muzitano MF, Teixeira-Ferreira A, Perales J, Rodrigues R, et al. 2020. Identification and characterization of two defensins from *Capsicum annuum* fruits that exhibit antimicrobial activity. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09647-6>.

Davidson PM. 2017. Natural antimicrobials from herbs and spices. In: Jen JJ, Chen J, editors. *Food safety in China*. Chennai: John Wiley and Sons Ltd. p.147-157.

De Benito A, Besse NG, Desforges I, Gerten B, Ruiz B, Tomás D. 2019. Validation of standard method EN ISO 22964:2017-Microbiology of food chain-Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 288:47-52. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.025.

Devi AK, Chanchan M, Sharangi AB. 2018. Why Spices Are Unique? In: Sharangi AB, editor. *Indian Spices*. Cham: Springer International Publishing. p. 31-46.

Duygu A, Nilüfer AT. 2019. Use and Beliefs about Effects of Spices on Health in Adults. *COJ Nurse Healthcare*, 4(4):466-469. <https://doi.org/10.31031/COJNH.2019.04.000595>.

El Universo. 2015. Especies, un elixir de la cocina local. El Universo. <https://www.eluniverso.com/vida-estilo/2015/04/04/nota/4732466/especies-elixir-cocina-local?amp>

Fakruddin M, Rahaman M, Ahmed MM, Hoque MM. 2014. Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. Biol Res. 47(1):1-12. <http://www.biolres.com/content/47/1/63>. doi:10.1186/0717-6287-47-63.

[FAO y WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2014. Summary report: the joint FAO/WHO expert meeting on microbiological hazards in spices and dried aromatic herbs. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. [http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFH/CCFH46/Report\\_Spices\\_Dried\\_Herbs\\_Expert%20Meeting.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFH/CCFH46/Report_Spices_Dried_Herbs_Expert%20Meeting.pdf).

[FDA] Food and Drug Administration. 2013. Draft risk profile: pathogens and filth in spices. US: Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/downloads/food/foodscienceresearch/risksafetyassessment/ucm367337.pdf>

Fan H, Long B, Wu X, Bai Y. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Cronobacter sakazakii*. Foodborne Pathog Dis. 9(12):1111-1118. doi:10.1089/fpd.2012.1193.

Farmer JJ. 2015. My 40-year history with *Cronobacter / Enterobacter sakazakii*-lessons learned, myths debunked, and recommendations. Front. Pediat. 3:84. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2015.00084/full>. doi:10.3389/fped.2015.00084.

Feeney A, Kropp KA, O'Connor R, Sleator RD. 2015. *Cronobacter sakazakii*: stress survival and virulence potential in an opportunistic foodborne pathogen. Gut Microbes. 5(6):711-718. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615781/>. doi:10.4161/19490976.2014.983774.

Fei P, Jiang Y, Gong S, Li R, Jiang Y, Yuan X, Wang Z, Kang H, Ali MA. 2018. Occurrence, genotyping, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from northeast China. *J Food Protect.* 81(3):456-460. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-326.

Feng S, Eucker TP, Holly MK, Konkel ME, Lu X, Wang S. 2014. Investigating the responses of *Cronobacter sakazakii* to garlic-derived organosulfur compounds: a systematic study of pathogenic-bacterium injury by use of high-throughput whole-transcriptome sequencing and confocal micro-raman spectroscopy. *Appl Environ Microbiol.* 80(3):959-971. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911221/>. doi:10.1128/AEM.03460-13.

Forsythe SJ, Dickins B, Jolley KA. 2014. *Cronobacter*, the emergent bacterial pathogen *Enterobacter sakazakii* comes of age; MLST and whole genome sequence analysis. *BMC Genomics.* 15(1):1-14. doi: 10.1186/1471-2164-15-1121.

Forsythe SJ. 2015. New insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter*. In: Ricke SC, Donaldson JR, Phillips CA, editors. *Food Safety*. San Diego (CA): Academic Press. p. 265-308.

Founou LL, Founou RC, Essack SY. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Front Microbiol.* 7:1-19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5120092/>. doi:10.3389/fmicb.2016.01881.

Fraňková A, Marounek M, Mozrová V, Weber J, Klouček P, Lukešová D. 2014. Antibacterial activities of plant-derived compounds and essential oils toward *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus*. 11(10):795-797. doi:10.1089/fpd.2014.1737.

Garbowska M, Berthold-Pluta A, Stasiak-Rozanska L. 2015. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* 49:1-5.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015000088>.

doi:10.1016/j.fm.2015.01.004.

Global Spices and Seasonings Industry. 2019.

<https://www.reportbuyer.com/product/2284872/global-spices-and-seasonings-industry.html>

GoldBio. 2018. 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D- glucopyranoside. <https://www.goldbio.com/product/356/4-nitrophenyl-a-d-glucopyranoside>

Gottardi D, Bukvicki D, Prasad S, Tyagi AK. 2016. Beneficial effects of spices in food preservation and safety. *Front Microbiol.* 7:1-20.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01394/full>.

doi:10.3389/fmicb.2016.01394.

Gould LH, Kline J, Monahan C, Vierk K. 2017. Outbreaks of Disease Associated with Food Imported into the United States, 1996-2014. *Emerg Infect Dis.* 23(3):525-528. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.161462>.

Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL. 2014. The microbiological safety of spices and low-water activity foods: correcting historic misassumptions. In: Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL, editors. *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. New York: Springer. p. 3-13.

Hazra A. 2017. Using the confidence interval confidently. *J Thorac Disc.* 9(10):4125-4130. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5723800/>. doi:10.21037/jtd.2017.09.14.

Hess AS, Shardell M, Johnson JK, Thom KA, Strassle P, Netzer G, Harris AD. 2012. Methods and recommendations for evaluating and reporting a new diagnostic test. *Eur J Clin Microbiol Infect*

Dis. 31(9):2111-2116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3661219/#R4>.  
doi:10.1007/s10096-012-1602-1.

HIMEDIA. 2019. Lysine Decarboxylase Broth. <http://www.himedialabs.com/TD/M376.pdf>

Hochel I, Růžičková H, Krásný L, Demnerová K. 2012. Occurrence of *Cronobacter* spp. in retail foods. J Appl Microbiol. 112(6):1257-1265.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.2012.05292.x>. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05292.x.

Holý O, Forsythe S. 2014. *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. J Hosp Infect. 86(3):169-177.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015000088>.  
doi:10.1016/j.jhin.2013.09.011.

Hudson JA, Frewer LJ, Jones G, Brereton PA, Whittingham MJ, Stewart G. 2017. The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. Trends Food Sci Tech. 69:131-147.  
doi:10.1016/j.tifs.2017.09.007.

Huertas-Caro C, Urbano-Cáceres E, Torres-Caycedo M. 2019. Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. Rev Haban Cienc Méd. 18(3):513-528.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2019000300513](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2019000300513).

[INEN] Instituto Ecuatoriano de Normalización. 2013. NTE INEN 1529-2: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.  
<https://archive.org/details/ec.nte.1529.2.1999/page/n1/mode/2up>

Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. 2007. Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). J Clin Microbiol. 45(11): 3814-3816. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168468/>. doi:10.1128 / JCM.01026-07.

Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S, Stephan R, Joosten H. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. Dublinensis subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. Lausannensis subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. Lactaridi subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 58(6):1442-1447. doi:10.1099/ijs.0.65577-0.

Jackson EE, Forsythe SJ. 2016. Comparative study of *Cronobacter* identification according to phenotyping methods. BMC Microbiol. 16:146. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940867/pdf/12866\\_2016\\_Article\\_768.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940867/pdf/12866_2016_Article_768.pdf). doi:10.1186/s12866-016-0768-6.

Jang H, Woo J, Lee Y, Negrete F, Finkelstein S, Chase HR, Addy N, Ewing L, Beaubrun JJ, Patel I, et al. 2018. Draft genomes of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from dried spices bring unique insights into the diversity of plant-associated strains. Stand Genomic Sci. 13:35. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6267090/>. doi:10.1186 / s40793-018-0339-6.

Jaradat ZW, Mousa WA, Elbetieha A, Nabulsi AA, Tall BD. 2014. *Cronobacter* spp. opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. J Med Microbiol. 63(8):1023-1037. doi:10.1099/jmm.0.073742-0.

Jason J. 2015. The roles of epidemiologists, laboratorians, and public health agencies in preventing invasive *Cronobacter* infection. *Front Pediatr.* 3:1-11.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2015.00110/full>. doi: 10.3389/fped.2015.00110.

Kilonzo-Nthenge A, Rotich E, Godwin S, Nahashon S, Chen F. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Cronobacter sakazakii* isolated from domestic kitchens in middle Tennessee, United States. *J Food Prot.* 75(8):1512-1517. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-442.

Kim JB, Park YB, Kang SH, Lee MJ, Kim KC, Jeong HR, Kim DH, Yoon MH, Lee JB, Oh DH. 2011. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from sunshik, its ingredients and soils. *Food Sci. Biotechnol.* 20(4):941-948. doi:10.1007/s10068-011-0130-6.

Krom A. 2019. Especies: el despertar incipiente de un sector que quiere salir al mundo. *La Nación*. <https://www.lanacion.com.ar/economia/comercio-exterior/especies-el-despertar-incipiente-de-un-sector-que-quiere-salir-al-mundo-nid2222022>

Lee YD, Park JH, Chang H. 2012. Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control.* 24(1):225-230. doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.023.

Li F, Fanning S. 2017. Antimicrobial resistance in food-related bacteria. In: Jen JJ, Chen J, editors. *Food safety in China*. Chennai: John Wiley and Sons Ltd. p.163-184.

Li Y, Chen Q, Zhao J, Jiang H, Lu F, Bie X, Lu Z. 2014. Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control.* 37:109-114. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513004635>.

doi:10.1016/j.foodcont.2013.09.017.

Li Y, Yu H, Jiang H, Jiao Y, Zhang Y, Shao J. 2017. Genetic diversity, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Cronobacter* spp. recovered from spices and cereals. *Front Microbiol.* 8:1-11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02567/full>. doi: 10.3389/fmicb.2017.02567.

Ling N, Li C, Zhang J, Wu Q, Zeng H, He W, Ye Y, Wang J, Ding Y, Chen M, et al. 2018. Prevalence and molecular and antimicrobial characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from raw vegetables in China. *Front Microbiol.* 9:1-10. doi:10.3389/fmicb.2018.01149.

Liu BT, Song FJ, Zou M, Hao ZH, Shan H. 2017. Emergence of Colistin resistance gene *mcr-1* in *Cronobacter sakazakii* producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the same animal. *Antimicrob Agents Ch.* 6(12):1-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5278688/>. doi:10.1128/AAC.01444-16.

Liu C, Zheng W, Zhang H, Hou Y, Liu Y. 2009. Sensitive and rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula by loop-mediated isothermal amplification method. *J Food Saf.* 29:83-94. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2008.00142.x>.

Liu M, Hu G, Shi Y, Liu H, Li J, Shan X, Hu J, Cui J, Liu L. 2018. Contamination of *Cronobacter* spp. in Chinese retail spices. *Foodborne Pathog Dis.* 15(10):637-644. doi:10.1089/fpd.2018.2429.

Liu X, Fang J, Zhang M, Wang X, Wang W, Gong Y, Xi X, Li M. 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *World J Microb Biot.* 28(3):1013-1020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805822>. doi: 10.1007/s11274-011-0899-8.

Lopez ME, Gontijo MT, Boggione DM, Albino LA, Batalha LS, Mendonça RC. 2018. Microbiological contamination in foods and beverages: consequences and alternatives in the era of microbial resistance. In: Holban AM, Grumezescu AM, editors. *Microbial Contamination and Food Degradation*. Academic Press. p. 49-84.

Lou X, Yu H, Wang X, Qi J, Zhang W, Wang H, Si G, Song S, Huang C, Liu T, et al. 2019. Potential reservoirs and routes of *Cronobacter* transmission during cereal growing, processing and consumption. *Food Microbiol.* 79:90-95. doi: 10.1016/j.fm.2018.12.004.

Lu Y, Chen Y, Lu XA, Lv J, Man CX, Chai YL, Jiang YJ. 2014. Comparison of methods for the microbiological identification and typing of *Cronobacter* species in infant formula. *J. Dairy Sci.* 97(2):632-641. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213008527>. doi:10.3168/jds.2013-7147.

Mardaneh J, Soltan Dallal MM. 2017. Study of *Cronobacter sakazakii* strains isolated from powdered milk infant formula by phenotypic and molecular methods in Iran. *Arch Pediatr Infect Dis.* 5(1):1-6. <https://sites.kowsarpub.com/apid/articles/20323.html>. doi:10.5812/pedinfect.38867.

Medina GA, Treviño AL, Aguilar CN. 2014. *Cronobacter sakazakii*: un patógeno emergente transmitido por alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila.* 6(12):24-29. <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%2012/5.pdf>.

Mera SL, Zavala EE. 2019. Análisis de factibilidad técnica para la elaboración de longaniza con Oca (*Oxalis tuberosa*) y sal prieta en la ciudad de Guayaquil [tesis]. [Guayaquil]: Universidad de Guayaquil.

Miranda N, Banerjee P, Simpson S, Kerdahi K, Sulaiman IM. 2017. Molecular surveillance of *Cronobacter* a wide variety of food from 44 different countries by sequence typing of 16S rRNA, rpoB and o-antigen genes. *Foods*. 6(5):1-14. <https://www.mdpi.com/2304-8158/6/5/36>. doi:10.3390/foods6050036.

Mossawi MT, Joubori YS. 2015. Detection of *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*) in powdered food infants (PIF) and raw milk in Iraq. *Bagdad Sci J*. 12(1):63-71. <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=99100>.

Mozrová V, Břeňová N, Mrázek J, Lukešová D, Marounek M. 2014. Surveillance and characterization of *Cronobacter* spp. in Czech retail food and environmental samples. *Folia Microbiol*. 59(1):63-68. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873391>. doi:10.1007/s12223-013-0266-2.

NCSS. 2017. Confidence intervals for one-sample sensitivity and specificity. Program Sample Size Software. [https://www.ncss.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/PASS/Confidence\\_Intervals\\_for\\_One-Sample\\_Sensitivity\\_and\\_Specificity.pdf](https://www.ncss.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/PASS/Confidence_Intervals_for_One-Sample_Sensitivity_and_Specificity.pdf)

Nokwanda M, Ijabadeniyi OA. 2013. Food borne bacteria isolated from spices and fate of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 in black pepper exposed to drying and various temperature conditions. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(12):990-995. <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/A0D957B20607>. doi:10.5897/AJMR2013.2541.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2020. Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2016. Resistencia los antimicrobianos.  
<https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>

Odeyemi OA, Sani NA. 2019. Antibiotic resistance, putative virulence factors and curli frimbrination among *Cronobacter* species. *Microb Pathog.* 136:1-7.  
doi:10.1016/j.micpath.2019.103665.

Ogihara H, Kiribe N, Fukuda N, Furukawa S, Morinaga Y, Igimi S. 2014. *Cronobacter* spp. in commercially available dried food in Japan. *Biocontrol Sci.* 19(4):209-213.  
doi:10.4265/bio.19.209.

Ogrodzki P, Forsythe S. 2015. Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis. *BMC Genomics.* 16:1-15.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4599207/>. doi: 10.1186 / s12864-015-1960-z.

Pakbin B, Mahmoudi R, Mousavi S, Allahyari S, Amani Z, Peymani A, Qajarbeygi P, Hoseinabadi Z. 2020. Genotypic and antimicrobial resistance characterizations of *Cronobacter sakazakii* isolated from powdered milk infant formula: a comparison between domestic and imported products. *Food Sci Nutr.* 8(12):6708-6717.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7723180/>. doi: 10.1002/fsn3.1965.

Parra-Flores J, Aguirre J, Juneja V, Jackson EE, Cruz-Córdova A, Silva-Sanchez J, Forsythe S. 2018. Virulence and antibiotic resistance profiles of *Cronobacter sakazakii* and *Enterobacter* spp. involved in the diarrheic hemorrhagic outbreak in Mexico. *Front Microbiol.* 9:1-9.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6171480/>. doi:103389/fmicb.2018.02206.

Parveen S, Das S, Begum A, Sultana N, Hoque MM, Ahmad I. 2014. Microbiological quality assessment of three selected spices in Bangladesh. *Int. Food Res. J.* 21(4):1327-1330. [http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20\(04\)%202014/9%20IFRJ%2021%20\(04\)%202014%20Parveen%20674.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20(04)%202014/9%20IFRJ%2021%20(04)%202014%20Parveen%20674.pdf).

Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, Boothe E, Lathrop S, Palmer A, Bowen A. 2014. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003-2009. *Emerg Infect Dis.* 20(9):1520-1523. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4178417/>. doi:10.3201/eid2009.140545.

Peterson CT, Rodionov DA, Iablokov SN, Pung MA, Chopra D, Mills PJ, Peterson SN. 2019. Prebiotic potential of culinary spices used to support digestion and bioabsorption. *Evid Based Complement Alternat Med.* 1-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6590564/>. doi:10.1155/2019/8973704.

Pinkas JM, Keller S. 2014. Spices. In: Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL, editors. *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*. New York: Springer. p. 99-110.

Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ. 2006. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. *J. Food Prot.* 69(2):315-322. doi:10.4315/0362-028x-69.2.315.

Samanta I, Bandyopadhyay S. 2020. The emergence of antimicrobial-resistant bacteria in livestock, poultry and agriculture. *Antimicrobial resistance in agriculture: perspective, policy and mitigation*. London: Academic Press. p.19-27.

Sani NA, Odeyemi OA. 2015. Occurrence and prevalence of *Cronobacter* spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis. Springerplus. 4:1-10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4582040/>. doi:10.1186/s40064-015-1324-9.

Sankarankutty KM, Chede N. 2017. Antimicrobial activity of spice extracts against *Cronobacter sakazakii*. European J Biomed Pharm Sci. 4(1):280-285. [https://storage.googleapis.com/journal-uploads/ejbps/article\\_issue/volume\\_4\\_january\\_issue\\_1/1483162916.pdf](https://storage.googleapis.com/journal-uploads/ejbps/article_issue/volume_4_january_issue_1/1483162916.pdf).

Scalvenzi L, Yaguache-Camacho B, Cabrera-Martínez P, Guerrini A. 2016. Actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. y *Piper aduncum* L. Biagro. 28(1):39-46. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1316-33612016000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1316-33612016000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es).

Schmid M, Iversen C, Gontia I, Stephan R, Hofmann A, Hartmann A, Jha B, Eberl L, Riedel K, Lehner A. 2009. Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. Res. Microbiol. 160(8): 608-614. doi:10.1016/j.resmic.2009.08.013.

Sharangi AB, Acharya SK. 2018. Spices in India and Beyond: The Origin, History, Tradition and Culture. In: Sharangi AB, editor. Indian Spices. Cham: Springer International Publishing. p. 1-12.

Silva JN, Vasconcellos L, Forsythe SJ, de Filippis I, Brandão MLL. 2019. Molecular and phenotypical characterization of *Cronobacter* species isolated with high occurrence from oats and lindseeds. FEMS Microbiol Lett. 366(1):1-6. <https://academic.oup.com/femsle/article/366/1/fny289/5266300>. doi:10.1093/femsle/fny289.

Singh N, Goeli G, Raghav M. 2015. Prevalence and characterization of *Cronobacter* spp. from various foods, medicinal plants, and environmental samples. *Curr Microbiol.* 71(1):31-38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25855303>. doi: 10.1007/s00284-015-0816-8.

Song X, Teng H, Chen L, Kim M. 2018. *Cronobacter* spices in powdered infant formula and their detection methods. *Korean J Food Sci An.* 38(2):376-390. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5960834/>. doi:10.5851/kosfa.2018.38.2.376.

Trevethan R. 2017. Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, liabilities and, pitfalls in research and practice. *Front Public Health.* 5:301-307. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5701930/#:~:text=Sensitivity%20%3D%20%5B%20a%20%2F%20\(%20a,%2B%20d%20\)%20%5D%20%C3%97%20100%20](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5701930/#:~:text=Sensitivity%20%3D%20%5B%20a%20%2F%20(%20a,%2B%20d%20)%20%5D%20%C3%97%20100%20). doi:10.3389/fpubh.2017.00307.

Turcovský I, Kuniková K, Drahovská H, Kaclíkova E. 2011. Biochemical and molecular characterization of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) isolated from foods. *Antonie van Leeuwenhoek.* 99(2):257-269. doi:10.1007/s10482-010-9484-7.

Ueda S. 2017. Occurrence of *Cronobacter* spp. in dried foods, fresh vegetables and soil. *Biocontrol Sci.* 22(1):55-59. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/22/1/22\\_55/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/22/1/22_55/_article). doi:10.4265/bio.22.55.

[UNE] Asociación Española de Normalización. 2017. UNE-EN ISO 22964:2017 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección de *Cronobacter* spp. (ISO 22964:2017). Génova: Asociación Española de Normalización.

Van Doren JM, Neil KP, Parish M, Gieraltowski L, Gould LH, Gombas KL. 2013. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973-2010. *Food Microbiol.* 36(2):456-464. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.014>.

Vasconcellos L, Carvalho CT, Tavares RO, Medeiros VM, Rosas CO, Silva JN, Lopes SMR, Forsythe SJ, Brandão MLL. 2018. Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. *Food Res Int.* 107:353-359. doi:10.1016/j.foodres.2018.02.048.

Viuda-Martos M, Ciro-Gómez GL, Ruiz-Navajas Y, Zapata-Montoya JE, Sendra E, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J. 2012. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of extracts from annatto (*Bixa Orellana* L.) leaves and seeds. *J. Food Saf.* 32(4):399-406. doi: 10.1111/j.1745-4565.2012.00393.x.

Vojkowska H, Karpiskova R, Orieskova M, Drahovska H. 2015. Characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food of plant origin and environmental samples collected on farms and from supermarkets in the Czech Republic. *Int J Food Microbiol.* 217:130-136. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.017.

Xie Z, Finley JW. 2018. Herbs and spices. In: deMan JM, Finley JW, Hurst WJ, Lee CY, editors. *Principles of food chemistry*. Cham: Springer International Publishing. p. 457-478.

Xu W. 2016. Detecting targets without thermal cycling in food: isothermal amplification and hybridization. In: Xu W, editor. *Functional nucleic acids detection in food safety: theories and applications*. Singapore: Springer. p. 185-218.

Yong W, Guo B, Shi X, Cheng T, Chen M, Jiang X, Ye Y, Wang J, Xie G, Ding J. 2018. An investigation of an acute gastroenteritis outbreak: *Cronobacter sakazakii*, a potential cause of food-borne illness. *Front Microbiol.* 9:2549. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6214019/pdf/fmicb-09-02549.pdf>. doi:10.3389/fmicb.2018.02549.

Zachariah TJ, Leela NK. 2018. Spices: secondary metabolites and medicinal properties. In: Sharangi AB, editor. *Indian Spices*. Cham: Springer International Publishing. p. 277-316.