

Contaminación por *Brucella* sp. e incumplimiento en medidas de saneamiento básico en la producción de lácteos

Martínez Romero, Aurora*
 Ortega Sánchez, José Luis**
 Cervantes Flores, Maribel***
 Urtiz Estrada, Norma***
 Hernández González, Sandra Isabel*
 Alba Romero, José de Jesús*

Contamination by *Brucella* sp. and lack of compliance in measures of basic sanitation in dairy production

Fecha de aceptación: septiembre 2017

Resumen

La brucellosis se considera una zoonosis causada por *Brucella* sp.; en el ser humano es la expresión accidental de la enfermedad en los animales.

OBJETIVO. Identificar contaminación por *Brucella* sp. e incumplimiento en las medidas de saneamiento básico en la producción de lácteos.

MATERIAL Y MÉTODOS. Estudio observacional, descriptivo y transversal. Se realizaron muestreos de productos lácteos destinados al consumo humano elaborados en los hatos denominados A, B y C de Banco Nacional, Tlahualilo, Durango, en donde se analizaron 300 muestras de productos lácteos, las cuales se cultivaron en agar soya tripticaseína, agar MacConkey y agar Brucella. Se hicieron pruebas bioquímicas así como prueba inmunológica con suero polivalente anti-Brucella. Se procedió a la confirmación en MicroScan autoscáN-4 Siemens®.

RESULTADOS. Se aisló el género *Brucella* sp. en 12% de las muestras analizadas, en 102 (34%) no se pudo determinar la presencia de *Brucella* debido a la alta concentración de flora contaminante, en 54% (162 muestras) los principales agentes etiológicos aislados fueron: *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. y *Escherichia coli*.

CONCLUSIONES. Además del aislamiento de *Brucella* sp. en las muestras de productos lácteos, también se aislaron enterobacterias, lo que sugiere un alto grado de contaminación. Es imprescindible tomar medidas en el manejo higiénico de los productos lácteos. La implementación de las Estrategias de saneamiento básico permitirá aplicar las acciones que ayuden a prevenir y controlar los riesgos presentes en la elaboración de los productos lácteos que se comercializan en la Comarca Lagunera.

Palabras clave: zoonosis, enterobacteria, *Brucella*, Estrategias de saneamiento básico.

Abstract

Brucellosis is considered a zoonosis caused by *Brucella* sp.; in the human is the accidental expression of disease in animals.

OBJECTIVE. To identify contamination by *Brucella* sp. and lack of compliance in basic sanitation measures in dairy production.

MATERIAL AND METHODS. Observational, descriptive and cross-sectional study. Samples of dairy products destined for human consumption were made in the herds named A, B and C of Banco Nacional, Tlahualilo, Durango, where 300 samples of dairy products were analyzed. They were cultivated on tripticasein soy agar, MacConkey agar and Brucella agar; biochemical tests as well as immunoassay with polyclonal anti-Brucella serum were performed. Confirmation was made on MicroScan autoscáN-4 Siemens®.

RESULTS. The genus *Brucella* sp. was isolated in 12% of the analyzed samples; in 102 (34%) it was not possible to determine the presence of *Brucella* due to the high concentration of contaminating flora, in 54% (162 samples) the main etiological agents isolates were: *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. and *Escherichia coli*.

CONCLUSIONS. In addition to the isolation of *Brucella* sp. in the dairy samples, enterobacteria were also isolated, suggesting a high degree of contamination. It is essential to take measures in the hygienic management of dairy products. The implementation of the Basic sanitation strategies will allow the application of actions to prevent and control the risks present in the production of dairy products that are commercialized in the Comarca Lagunera.

Keywords: zoonoses, enterobacteria, *Brucella*, Basic sanitation strategies.

* Laboratorio de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Campus Gómez Palacio, Durango.

** Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo, Durango.

*** Laboratorio de Inmunología e Infectología, Facultad de Cien-

cias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Campus Durango.

Correspondencia: Dra. Aurora Martínez Romero
 Laboratorio de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas, Campus Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango.
 Dirección electrónica: quimicaaurora@hotmail.com

Introducción

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas más comunes en el mundo, y representa una gran amenaza para la salud humana y animal. La distribución geográfica de esta enfermedad cambia constantemente como nuevos focos emergentes o reemergentes.¹ En el ser humano es la expresión accidental de la enfermedad infecciosa en los animales, causada por especies del género *Brucella* que morfológicamente es una bacteria Gram negativa.² Según la Organización Mundial de la Salud (oms), la brucelosis es una de las siete zoonosis "olvidadas", un grupo de enfermedades que afecta de manera importante el desarrollo de muchas zonas del planeta. En todo el mundo, más de 70% del ganado (caprino, ovino, vacuno y porcino) se encuentra en países en vías de desarrollo, donde los servicios de salud animal o humana escasean o sencillamente no existen. Los 191 Estados miembros de la Organización de las Naciones Unidas acordaron que para el año 2015 se debían mejorar las condiciones de vida de los estratos sociales más humildes, para ello fijaron lo que denominaron los Objetivos del Desarrollo del Milenio.³

El microorganismo causante de la enfermedad fue descubierto el 9 de julio de 1887 por sir David Bruce, médico de la Armada británica. Lo denominó *Micrococcus melitensis*, luego de aislarlo del bazo de un soldado británico fallecido por la enfermedad. La conexión entre la enfermedad animal y la humana fue descubierta en 1920 por la bacterióloga estadounidense Alice Evans.⁴ Debido a que la morfología del microorganismo y la patología que provocaba eran muy similares en la enfermedad de Bang y en la fiebre de Malta, Evans postuló que la *Bacterius abortus* de Bang y el *Micrococcus melitensis* de Bruce eran el mismo microorganismo.⁵ Con el transcurso del tiempo quedó establecido el nombre de *Brucella* para denominar a los microorganismos que provocan brucelosis, en honor a sir David Bruce.⁶

Las especies del género *Brucella* se transmiten de animales a personas con mayor frecuencia por la exposición ocupacional, la ingestión de productos lácteos no pasteurizados o por contacto accidental con desechos contaminados —por ejemplo, la inhalación de polvo procedente de excrementos secos—, principales fuentes de adquisición de la bacteria provocando una enfermedad grave y debilitante que requiere de tratamiento costoso y de tiempo prolongado, que a menudo deja secuelas permanentes.⁷

La familia Enterobacteriaceae está constituida por bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas⁸ que han sido implicadas en muchos casos de brotes de intoxicación alimentaria.⁹ *Escherichia coli* es un organismo importante en la microbiología de los alimentos, además de que está involucrado en la gastroenteritis transmitida por los alimentos, y se considera un buen indicador de posible contaminación fecal de los productos lácteos.⁹

En los últimos cinco años ha habido un alto índice de casos de brucelosis en algunos municipios de la Comarca Lagunera que, de acuerdo con la Secretaría de Salud (2012), se debe al consumo elevado de quesos frescos contaminados producidos por empresas que no cuentan con la higiene y el control para elaborar productos lácteos con calidad sanitaria.

De acuerdo con las disposiciones y especificaciones sanitarias de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos, la NOM también considera que tener implementado el sistema Inocuidad de Alimentos-Control Sanitario (HACCP) para su proceso, implementación y evaluación de Buenas Prácticas de Higiene (BPH), de Manufactura (BPM) y Agropecuarias (BPA) son condiciones frontera para la producción, manufactura y distribución de alimentos inocuos y saludables.^{10,11} Las condiciones que influyen en mayor medida en el estado de salud de la población son la carencia de saneamiento básico, falta de capacitación o asesoría técnica para caprinocultores que viven del producto de sus animales, escasos ingresos, poco presupuesto estatal, así como deficiencias de cantidad y calidad en la infraestructura y saneamiento básico en cada punto crítico de la producción. El consumo de productos lácteos elaborados con leche sin pasteurizar es un problema de salud en la Comarca Lagunera debido a su disponibilidad y costo reducido. Ésta es una zona árida y semiárida, endémica de brucelosis y de gran importancia para la explotación de la ganadería, favorecida por las condiciones climatológicas caracterizadas por altas temperaturas y baja humedad. Ante tal situación, se planteó la necesidad de hacer la presente investigación cuyo objetivo fue identificar contaminación por *Brucella* sp. y la falta en el cumplimiento de medidas de saneamiento básico en la producción de lácteos.

Material y método

El tipo de estudio fue observacional, descriptivo y transversal. Para el análisis se consideró a la población, que con base en trabajos previos, se tiene identificada porque tiene una mayor incidencia de brucelosis caprina o en la que hay más prevalencia de casos de brucelosis humana. Una vez que detectamos a los productores del ejido muestreado, al realizar una encuesta con cada caprinocultor refirieron que vacunan a las cabras con la vacuna Rev.1 de *B. melitensis* en las zonas endémicas bajo la norma NOM-041-zoo-1995; asimismo comentaron que conocen el procedimiento en la elaboración del producto lácteo desde la obtención de la materia prima, el empaque y distribución del producto final. Se procedió a realizar la toma de muestras de leche, quesos, crema, mantequilla o de algún otro alimento que estuviera elaborado con leche no pasteurizada o que fuera de origen dudoso.

Se hicieron muestreos de productos lácteos destinados al consumo humano elaborados en los hatos caprinos denominados A, B y C de Banco Nacional, Tlahualilo, Durango, en donde se tomaron cinco muestras de cada producto lácteo, cada muestreo se realizó por triplicado. Se analizaron 300 muestras de estos productos. Cada hato de donde se tomaron muestras se consideró como un tratamiento que diera un total de tres, con cinco repeticiones que resultaron en 300 unidades experimentales. El proceso hecho por los caprinocultores es el convencional en la fabricación de quesos; para obtener la crema, la leche se deja serenar una noche, al día siguiente se colecta la capa de grasa, la envoltura que se utiliza es manta de cielo.

Se utilizaron como controles cinco muestras de marca comercial registrada. Para la muestra de queso fresco artesanal se pesaron 10 g y se colocaron en 50 mL de caldo soya tripticaseína estéril, se homogeneizó con una licuadora estéril o empleando un frasco estéril con tapa hermética, y se llevó a 4 °C durante una hora. Con un hisopo estéril se tomó una muestra de la grasa de la superficie, luego se sembró en agar soya tripticaseína (TSA) Dibico®, agar MacConkey (DIBICO®), agar *Brucella* (BD BBL™).

Una vez inoculadas las placas de agar *Brucella*, se llevaron a una atmósfera de CO₂ en una concentración de 5 a 10% y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. De todas las colonias sospechosas de muestras de queso y otros lacticíneos sólidos se pesaron 100 g y se colocaron en 500 mL de agua peptonada estéril y se homogeneizó con una licuadora estéril o empleando un frasco estéril con tapa hermética y se colocó a 4 °C durante una hora. Posteriormente, con un hisopo estéril se tomó una muestra de la grasa que se encontraba en la superficie y se sembró por duplicado en medio de Farrell, con el fin de observar la morfología colonial de *Brucella*.¹¹ El sobrenadante se adicionó con suero anti-*Brucella* incubando durante dos horas a 37 °C, se centrifugó a 6 000-7 000 rpm durante cinco minutos, decantando el sobrenadante. El sedimento se resuspendió y centrifugó de nuevo, sembrándolo en cajas petri contenido medio de farrell. Una vez inoculadas las placas, se colocaron en una atmósfera de CO₂ a una concentración de 5 a 10% y se incuban a 37 °C por lo menos de cuatro a siete días. Todas las colonias sospechosas se resembraron en agar TSA con extracto de levadura o agar *Brucella* con el objetivo de observar la morfología colonial característica. Se efectuaron pruebas bioquímicas, así como la aglutinación con suero polivalente anti-*Brucella*.

Las placas en las que se obtuvo crecimiento se sometieron a pruebas bioquímicas para su mejor identificación. Triple-azúcar-hierro (TSI) BD Bioxon™, citrato de Simmons

(DIBICO®), lisina-hierro-agar (LIA) BD Bioxon™, motilidad-indol-ornitina (MIO) (DIBICO®), sulfuro-indol-motilidad (SIM) Bioxon™ y urea DIBICO®. Posteriormente se procedió a la confirmación en MicroScan autoscáner Siemens®, así como a la prueba inmunológica con suero polivalente anti-*Brucella* (MCSA®), que es un suero de conejo que está dirigido a las cepas en fase s de *B. abortus* y *B. melitensis*.

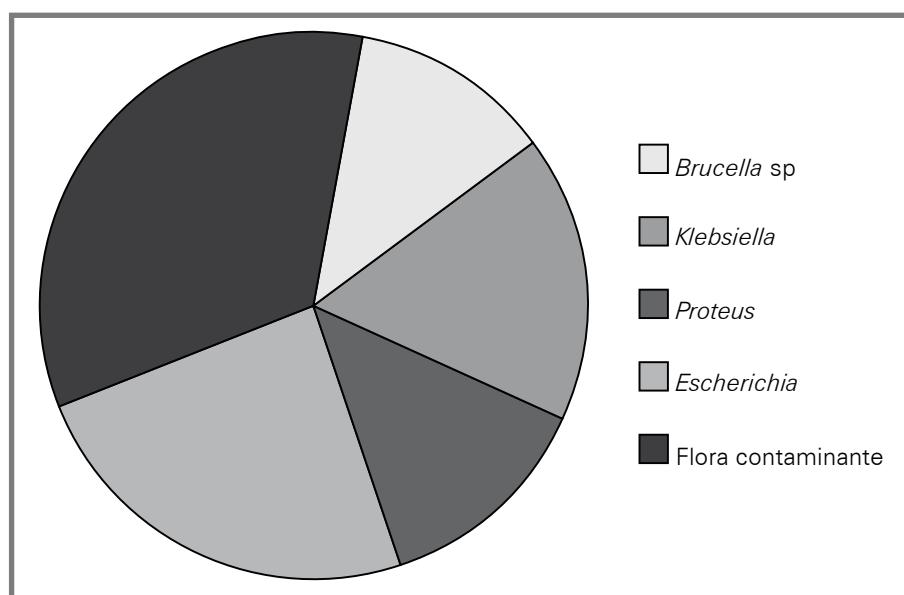
Para el cultivo de leche se colocan 20 mL de la muestra en el refrigerador a 4 °C durante una noche, y al día siguiente se utiliza la crema de la superficie como inóculo. Se centrifuga a 6 000-7 000 rpm durante 15 minutos, en tubos estériles individuales se mide un volumen igual de muestra de cada curto o pezón. Las muestras de crema se centrifugan y se utiliza tanto la capa cremosa de la superficie como el sedimento. Se toma una asada de aproximadamente 0.1-0.2 mL de crema de la superficie en dos placas, una con medio de Farrell y otra con TSA con suero.

Los resultados se presentan con estadística descriptiva. Investigación aprobada (R-2014-123301538X0201-005) por el Comité de Ética en Investigación núm. 123301538X0201 de la Cofepris.

Resultados

Tras analizar 300 muestras de productos lácteos, se encontraron 36 muestras con *Brucella* que correspondieron al 12%. En 102 de ellas (34%) no se pudo determinar la presencia de *Brucella* debido a la alta concentración de flora contaminante. En 162 muestras (54%) se aisló *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. y *Escherichia coli* (gráfica 1). De las cinco muestras de marca comercial utilizadas como controles, que contaban con etiqueta que certifica su calidad en términos sanitarios, los resultados para aislamiento del género *Brucella* y enterobacterias fueron negativos.

Gráfica 1
Representación gráfica de los microorganismos aislados en quesos frescos. Existe predominio de las enterobacterias como contaminantes de productos lácteos



De las encuestas realizadas para conocer los productos elaborados por los pequeños productores, se obtuvo que el tipo de producto lácteo que se consume con más frecuencia es el queso fresco; y que la procedencia de estos productos que llegan a la Comarca Lagunera son los estados de Zacatecas y Durango (Tlahualilo, Santa Clara y Cuencamé), y que en general la comunidad consume los mismos productos que se comercializan en la región. Los pequeños productores manifestaron que tienen todas las medidas higiénicas requeridas para el proceso del producto lácteo, además de que utilizan agua potable en el lavado del material y equipo utilizados. Con base en los resultados microbiológicos, se vio la necesidad de otorgar asesoría técnica a los caprinocultores en cuanto a las normas de saneamiento básico en la elaboración de sus productos.

Discusión

El objetivo de la presente investigación fue conocer los puntos críticos de control en la elaboración de productos lácteos, con el objetivo de aplicar una estrategia de saneamiento básico en la prevención de la brucelosis humana en la Comarca Lagunera de Durango y Coahuila. Los aislamientos de *Brucella* correspondieron a 12% del total de muestras analizadas, este resultado representa un factor de riesgo para contraer esta bacteria y producir la enfermedad de brucelosis, con lo que se deduce que se carece de la aplicación de estrategias de saneamiento básico en su prevención y control por parte de los pequeños productores en la elaboración de los productos lácteos.

Al realizar un diagnóstico social en el estado de Tlaxcala, México, se mostró que la brucelosis como enfermedad la conoce el 45.5% de los productores; el 100% de ellos no hiere la leche para procesar el queso porque consideran que se altera el sabor y no mejora el precio del producto; 46.9% sabe de las campañas de vacunación, pero sólo 19.7% vacuna a sus animales. En Huamantla sólo 36.4% conoce el peligro de la brucelosis y únicamente 12.1% ha sabido de personas enfermas.¹²

Es probable que esta situación que prevalece en diversos estados del país se deba a que falta monitoreo de los hatos caprinos y bovinos en cuanto a la serie de infecciones que pudieran presentar, así como la carencia de análisis de los alimentos que emanan de los animales de traspaso, incluso se debe evaluar la matriz del alimento en cuanto a sus unidades formadoras de colonias por gramo de alimento, las cuales deben estar ausentes en todo alimento.

Después de lo expuesto anteriormente, es importante señalar que en su investigación Viadas y Rodríguez concluyeron que los consumidores activos de quesos frescos artesanales elaborados con leche sin pasteurizar a menudo son los más afectados por las bacterias del género *Brucella* sp., causándoles brucelosis.¹³ En nuestro estudio, 54% los principales agentes etiológicos aislados fueron los géneros *Klebsiella*, *Proteus* y *Escherichia*, los cuales son indicativos de gran contaminación fecal. Esto coincide con el trabajo realizado por Maha y Ashmawy, quienes encontraron una alta frecuencia de microorganismos aislados de la familia Enterobacteriaceae, principalmente *E. coli*.¹⁴ Sin embargo,

cabe resaltar que en 2004 Parente y Cogan realizaron un trabajo en el cual reconocieron que los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae se consideran parte natural de la microbiota de muchos quesos, particularmente en los quesos artesanales elaborados con leche cruda y fermentos lácticos naturales obtenidos a partir de leche o de suero de leche.¹⁵ Es probable que estas coincidencias se deban a que no hay un rastreo sanitario durante el proceso de elaboración de productos lácteos de los pequeños productores, y que se carece de control de calidad durante todos los puntos críticos de la elaboración de los mismos. Incluso, en el estudio realizado en el año 2003, Marino y colaboradores discurrieron que la presencia de enterobacterias en quesos generalmente es indicativa de un producto lácteo elaborado con mala calidad microbiológica.¹⁶ Respecto a los controles que utilizamos, muestras de quesos de marcas comerciales reconocidas, el resultado negativo en cuanto al aislamiento de microorganismos indica que las empresas tienen un control de operaciones de acuerdo con las buenas prácticas agropecuarias y de manufactura.

Recientemente, Adamu y colaboradores publicaron un estudio epidemiológico de brucelosis bovina en un estado de Nigeria para identificar estrategias de control y erradicación de esta enfermedad. Sus resultados indicaron que la brucelosis es endémica entre el ganado de las áreas analizadas. En estas zonas es frecuente la brucelosis clínica, y algunas de sus consecuencias en los animales son abortos, enteritis, orquitis y artritis, por lo que se sugiere que el tamizaje de estos signos se realice incluso antes del sacrificio, de manera que las medidas de control como vacunación, cuarentena, pruebas y políticas de sacrificio, así como la eliminación adecuada de los fetos abortados se mantenga para evitar la propagación de la brucelosis a seres humanos y otros animales.¹

En México, en fechas recientes la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa), en el marco de la Campaña Nacional contra la Brucelosis, otorgó el reconocimiento de Fase de Erradicación al estado de Nayarit, con esta distinción la entidad eleva la competitividad de los productores de ganado bovino, caprino y ovino¹⁷ aplicando una estrategia de saneamiento básico en la prevención y control de brucelosis en el país. Asimismo, con esta investigación es posible que se logre no sólo controlar sino erradicar la brucelosis en los estados de Durango y Coahuila. A principios del presente año, la Sagarpa otorgó apoyo económico a la población dedicada al manejo de ganado mediante el programa de campaña zoosanitaria para lograr hato libre de brucelosis o dictamen de prueba de brucelosis o constancia de vacunación contra brucelosis.¹⁸ Respecto a las medidas higiénicas que manifestaron los pequeños productores en la elaboración de los productos lácteos, éstas no se pudieron confirmar debido a la cantidad de microorganismos aislados durante nuestra investigación.

Los animales enfermos son la principal fuente de diseminación de la bacteria, ya que un animal enfermo en un hato puede fácilmente diseminar la enfermedad en los animales sanos o incluso en hatos cercanos. Es primordial fomentar la cultura de la vacunación, pues en México el sacrificio de los animales infectados es una medida muy difícil de llevar cabo, debido a que los pequeños productores

dependen económicamente de la producción lechera y sus derivados. Sin embargo, es importante otorgar asesoría técnica y capacitación para generar en el caprinocultor la cultura de procesar y distribuir productos lácteos con leche hervida. Además de continuar participando en las campañas "Hato libre" y "Hato en control" organizadas por la Sagarpa.

Se determinaron las principales fuentes de contaminación y se estableció que los productos lácteos que se comercializan en la Comarca Lagunera de Durango y Coahuila son de riesgo elevado para contraer brucelosis y, potencialmente, gastroenteritis. Estos productos tienen en común que son artesanales y carecen de registro sanitario.

Se hace imprescindible que las autoridades sanitarias se encarguen de monitorear la productividad de diversos productos lácteos en comunidades de la Comarca Lagunera, identificando peligros específicos con el objetivo de desarrollar medidas de control apropiadas que garanticen la inocuidad de los alimentos y así tomar acciones preventivas, más que correctivas, para evitar diseminar las infecciones entre la población. Se requiere implementar y supervisar

buenas prácticas de manufactura: desde el aseo de manos, trastos y utensilios antes de procesar o manipular la materia prima del alimento, manejo óptimo de los ingredientes utilizados durante el proceso de producción y desinfección o esterilización del agua que se utiliza tanto en la preparación de alimentos como en el lavado de utensilios necesarios para la producción. En este estudio se observó que no se trabaja con las normas de higiene requeridas para obtener un producto libre de *Brucella* y enterobacterias, ya que su presencia en los productos es indicador de un posible defecto en el procesamiento térmico de los alimentos: elaborar los productos lácteos con leche sin hervir o procesar el alimento sin tomar en cuenta acciones preventivas consideradas en las buenas prácticas de manufactura.

La implementación de las Estrategias de saneamiento básico permitirá aplicar las acciones que ayuden a prevenir y controlar los riesgos presentes en la producción de los productos lácteos que se comercializan en la Comarca Lagunera de Durango y Coahuila.

Referencias

1. Adamu, S.G., Atsanda, N.N., Tijjani, A.O., Usur, A.M., Sule, A.G. y Gulani, I.A., "Epidemiological study of bovine brucellosis in three senatorial zones of Bauchi State, Nigeria", *Vet World*, 2016, 9: 48-52.
2. Lim, J.J., Kim, D.H., Lee, J.J., Kim, D.G., Min, W., Lee, H.J. et al., "Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice", *J Vet Sci*, 2012, 13: 287-292.
3. Organización Mundial de la Salud, "Primer informe sobre la reducción del impacto mundial de las enfermedades tropicales desatendidas (ETDS)", 2010, disponible en: <http://www.unav.es/nuestrotiempo/temas/investigacion-servicio-las-enfermedades-desatendidas>.
4. Dellamea, A.B., "Nueva vacuna contra la brucellosis", *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 2006, 40: 83-88.
5. Laval, R.E., "Contribución al estudio histórico de la brucellosis en Chile", *Rev Chil Infect*, 2006, 23: 362-366.
6. Mantur, B.G. y Mangalgi, S.S., "Evaluation of conventional castaneda and lysis centrifugation blood culture techniques for diagnosis of human brucellosis", *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 4327-4328.
7. Bonomi, H.R., Marchesini, M.I., Klinke, S., Ugalde, J.E., Zylberman, V., Ugalde, R.A. et al., "An atypical riboflavin pathway is essential for *Brucella abortus* virulence", *PLOS ONE*, 2010, 5: e9435.
8. Owen, F., Scarlata, G. y Nastasi, A., "Glucuronidase activity in Enterobacteriaceae", *Boll Ist Sieroter Milan*, 2010, 60: 26-30.
9. Kawasaki, S., Nazuka, E., Bari, M.L., Amano, Y., Yoshida, M. e Isshiki, K., "Comparison of traditional culture method with dox system for detecting coliform and *Escherichia coli* from vegetables", *Food Sci Technol Res*, 2003, 9: 304-308.
10. Secretaría de Salud, "Inocuidad en la elaboración de quesos con respecto a la NOM-243-SSA1-2010", 2012, disponible en: <http://bmedidores.mx/inocuidad-en-la-elaboracion-de-quesos-con-respecto-a-la-nom-243-ssa1-2010>.
11. Villanueva-Valencia, M., Martínez-Herrera, D.I., Peniche-Cerdeña, A., López-Merino, A., Rosas-Sastré, T. de J., Morales-Estrada, A.I. et al., "Frecuencia de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en quesos frescos sin pasteurizar colectados en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río", *Research Gate*, 2010.
12. García-Juárez, G., Ramírez-Bribiesca, E., Hernández-Vázquez, M., Hernández-Calva, L.M., Díaz-Aparicio, E. y Orozco-Bolaños, H., "Brucellosis: condición socioeconómica familiar y calidad de vida en dos zonas contrastantes del estado de Tlaxcala, México", *Salud Pública Méx*, 2012, 56: 355-362.
13. Viadas, C. y Rodríguez, M., "Transcriptome analysis of the *Brucella abortus*BvrR/BvrS two-component regulatory system", *PLOS ONE*, 2010, 5: e10216.
14. Maha, A.M. y Ashmawy, A.L., "Prevalence of Enterobacteriaceae in table eggs with particular reference to enterovirulent *Escherichia coli* strains", *Int J Poultry Sci*, 2013, 12: 430-435.
15. González, R.D., Tamagnini, L.M., Olmos, P.D. y Souza, G.B. de, "Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods", *Food Microbiol*, 2003, 20: 601-604.
16. Marino, M., Maifreni, M. y Rondinini, G., "Microbiological characterization of artisanal Montassio cheese, analysis of its indigenous lactic acid bacteria", *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 229: 133-140.
17. Sagarpa, "Eleva Sagarpa estatus zoosanitario de brucellosis en Nayarit", 2015, disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B392.aspx>.
18. Sagarpa, "Manejo de ganado", 2017, disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/.../2017/.../Manejo%20de%20Ganado%20201>.