

Estudio de *Mycobacterium spp.* en Personas en Riesgo en el Cantón Mejía

FABRICIO ANCHATIPÁN^{1,2}, F. PROAÑO¹, R.SALAZAR³, ISABEL FIERRO², P. PONCE¹ y W. BENÍTEZ^{1,4*}

¹ Centro Internacional de Zoonosis, Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador;

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador;

³ Hospital Carlos Andrade Marín, Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, Quito-Ecuador;

⁴ Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador

* Correspondencia: wbenitez-ciz@ac.uce.edu.ec

Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), 3er piso Hospital del Día, Universidad Central del Ecuador
Apartado 17-03-100. Telefax (539 2) 2904-801. Quito Ecuador

Resumen

La Tuberculosis (TB) bovina es una importante zoonosis causada por *Mycobacterium bovis*, la cual puede producir TB extra-pulmonar en el ser humano, afectando principalmente al aparato genitourinario. Este estudio se realizó en el cantón Mejía, provincia de Pichincha, una importante zona lechera en el norte del Ecuador. El grupo de estudio estuvo integrado por 56 personas con reacción positiva a la prueba de tuberculinización (≥ 5 mm). En total se tomaron 197 muestras de orina, procedentes de 34 trabajadores de haciendas y 22 trabajadores de Camal. El análisis de laboratorio consistió en un examen elemental y microscópico de orina (EMO) y cultivo in vitro en los medios Löwenstein-Jensen y Stonebrink. El análisis de las muestras permitió identificar 14 casos de piuria (25,0%) y 1 caso de hematuria (1,8%), mientras que el cultivo in vitro no detectó el desarrollo de *Mycobacterium spp.* Este estudio pone en evidencia la necesidad de mejorar los protocolos de muestreo para la aplicación de pruebas diagnósticas (EMO, cultivo in vitro y PCR), además de la importancia de la aplicación de una prueba screening, como la tuberculinización a las poblaciones en riesgo de desarrollar TB genitourinaria y/o pulmonar.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, Stonebrink, tuberculosis genitourinaria.

Abstract

Bovine tuberculosis (TB) is an important zoonotic disease caused by *Mycobacterium bovis*, which can produce extra-pulmonary TB in human beings, affecting mainly genitourinary organs. This study was performed in the Mejía canton, Pichincha province, an important dairy region in the north of Ecuador. The studied group comprised 56 people with a positive tuberculin skin reaction (≥ 5 mm). In total, 197 urine samples were taken from 34 field workers and 22 abattoir workers. The laboratory analysis allowed identifying 14 cases of pyuria (25,0%) and 1 case of hematuria (1,8%), whereas in vitro culture could not detect *Mycobacterium spp.* This study shows the need to improve the sampling procedures to apply laboratory tests (EMO, in vitro culture and PCR); furthermore, it has been demonstrated the importance of the tuberculin skin test as screening test in populations at risk to develop renal TB.

Key words: *Mycobacterium bovis*, Stonebrink, genitourinary tuberculosis.

1. Introducción

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa de evolución crónica acompañada de procesos inflamatorios, causada por bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. capare*, *M. canettii*, y *M. pinnipedii*)

[28], de las cuales *M. bovis* se caracteriza por ser patógeno para un amplio rango de hospederos, siendo el ganado vacuno principalmente afectado, el ser humano [2], los animales domésticos y silvestres [30] [11], y además puede transmitirse entre ellos [1].

Una de las principales diferencias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* se describe a nivel metabólico; *M. tuberculosis* utiliza glicerol como principal fuente de carbono en condiciones *in vitro*, no así *M. bovis* debido a una mutación en el gen de la glicerol quinasa y requiriendo en su lugar piruvato de sodio [14].

Personas que trabajan en contacto con animales infectados están en riesgo de contraer la infección tuberculosa por *M. bovis* y posteriormente desarrollar la enfermedad; tales como: agricultores, granjeros, personal de ordeño, cuidadores de ganado, veterinarios, trabajadores de camal, inspectores de carne, comerciantes de animales, entre otros [21].

La patogenia de la enfermedad humana así como la sintomatología no difieren entre la debida a *M. tuberculosis* y *M. bovis* [13] [33]; sin embargo, se ha notado una gran tendencia al desarrollo de lesiones extrapulmonares en infecciones por *M. bovis*, muy particularmente en la producción de TB renal [18].

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2007 a nivel mundial, la TB fue responsable de aproximadamente 9,27 millones de nuevos casos humanos [29], de los cuales *M. bovis* es responsable de cerca del 3,1% [12]. En Ecuador, de acuerdo al Ministerio de Salud Pública (MSP) el número total de casos nuevos de TB en todas sus formas fue de 4,431, para el año 2007 [3], sin existir reportes de los casos de TB humana debida a *M. bovis* por parte de las instituciones oficiales de salud.

Se estima que a nivel mundial aproximadamente 50 millones de bovinos se encuentran afectados por *M. bovis* [16], causando grandes pérdidas económicas, además del impacto en la Salud Pública; en nuestro contexto, la información referente a la situación de la infección en el ganado es limitada con estudios aislados en ciertas regiones del país.

En el cantón Mejía la prevalencia aparente de tuberculosis bovina es de 3,85%, confirmando la presencia de la enfermedad en esta importante región productora de leche [31]; sin embargo, la prevalencia estimada en fincas medianas y grandes se ha calculado en 5,68% para el año 2007, determinando un mayor riesgo de contraer la enfermedad especialmente en las personas que se encuentran en contacto con dichos animales [32].

En el año 2007, mediante la aplicación del derivado proteico purificado (PPD) en trabajadores de camal y fincas lecheras situadas en el cantón Mejía, considerados en riesgo de poseer la infección tuberculosa, se determinó una reacción positiva al PPD en un 29% [7], lo que indica que buena parte de esa población humana se encuentra expuesta a *Mycobacterium spp.*

El análisis elemental y microscópico de orina (EMO), que evidencia piuria y/o hematuria como posibles indicadores de una TB genitourinaria, el cultivo *in vitro* en medios adecuados para el desarrollo de bacilos tuberculosos [17], y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son aplicables en el diagnóstico de la TB [8].

El objetivo de este trabajo fue identificar *M. bovis* en personas en riesgo y con reacción positiva al PPD en el cantón Mejía, a través del aislamiento microbiológico del agente patógeno, así como por el EMO.

2. Materiales y Métodos

En este trabajo participaron un total de 56 individuos provenientes del cantón Mejía, de los cuales el 41,1% (22/56) fueron personas que laboran en el camal Municipal del cantón Mejía, mientras que el 58,9% (34/56) restante estuvo constituido por trabajadores de 9 fincas lecheras con antecedentes de bovinos afectados por *M. bovis*, ubicadas en la misma región.

El grupo de estudio fue seleccionado de un total de 157 personas que mostraron reacción de hipersensibilidad al PPD en una investigación previa, se consideró a todos los sujetos con una reacción (≥ 5 mm de induración) como reactivos positivos y con la probabilidad de haber desarrollado la enfermedad renal; para poder apreciar el comportamiento del PPD en los estratos de trabajadores del Camal Municipal y trabajadores de las fincas participantes del estudio, referirse a la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de la reacción a la prueba de la tuberculina en trabajadores de finca y camal del Cantón Mejía.

Estrato	Reacción al PPD			
	≤ 5 mm		≥ 5 mm	
	(n)	%	(n)	%
Trabajadores de camal	(52)	57,8	(40)	59,7
Trabajadores de finca	(38)	42,2	(27)	40,3
Total	(90)	100	(67)	100

De los participantes que mostraron una reacción ≥ 5 mm se recolectó 3 muestras de orina (en días consecutivos), y de manera adicional se aplicó la condición de que si tras la aplicación de un examen elemental y

microscópico de orina se llegase a notar rasgos citológicos sugestivos de una TB renal (piuria y/o hematuria), se recolectarán dos muestras adicionales. El número de muestras de orina por persona se describe a continuación:

Tabla 2. Número de muestras de orina por persona.

Criterio ante el EMO	Número de personas	Número de muestras por persona	Total de muestras
Sospechosos	14	5	70
Sospechoso*	1	4	4
No sospechosos	41	3	123
Total	56		197

* Fue posible únicamente la recolección de cuatro muestras debido a la colaboración de la persona.

Se recolectó un total de 197 muestras con la finalidad de aplicar pruebas de laboratorio tales como el análisis elemental y microscópico así como el cultivo in vitro tanto en el medio de Löwenstein-Jensen cuanto en el de Stonebrink por muestra de paciente, con el objetivo de obtener resultados positivos a este último se conservaron los medios de cultivo en incubación hasta por 5 meses y de manera adicional se aplicó una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en sedimentos de orina (seriados), provenientes de los pacientes sospechosos ante el EMO de poseer tuberculosis renal.

3. Resultados y Discusión

3.1. Resultados

3.1.1. Examen elemental y microscópico de Orina (EMO)

El EMO detectó 14 personas positivas a piuria, es decir, al 25% de la población y 1 caso de hematuria aislada (1,8% del total de participantes); en cuanto al hallazgo de piuria y hematuria de acuerdo al género y la procedencia se pudo estimar que, el número de casos de piuria fue similar tanto en mujeres ($n = 7$) como en hombres ($n = 7$); pero, considerando la procedencia de los mismos se pudo evidenciar que los casos fueron mayores en las personas de las fincas ($n = 9$) que en los trabajadores de camal ($n = 5$); finalmente la hematuria se presentó en una persona del género masculino y procedente de una de las fincas lecheras consideradas en este trabajo tal como se observa en la tabla 3.

Pudo estimarse que los casos de piuria fueron mayores en un grupo de personas con reacción al PPD en el rango comprendido entre los 5 y 10 mm de induración ($n = 10$); la hematuria se ubicó en un punto de corte al PPD mayor a 15 mm de induración ($n = 1$) como puede observarse en la Tabla 4.

Tabla 3. Hallazgo de piuria y hematuria de acuerdo al género y la procedencia.

Piuria					
Resultado	Fincas		Camal		Total
	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Positivo	4 (7,1)	5 (8,9)	3 (5,4)	2 (3,6)	14 (25,0)
Negativo	22 (39,3)	2 (3,6)	13 (23,2)	5 (8,9)	42 (75,0)
Total	26 (46,4)	7 (12,5)	16 (28,6)	7 (12,5)	56 (100)

Hematuria					
Positivo	1 (1,80)	0 (0)	0(0)	0(0)	1 (1,80)
Negativo	25 (44,6)	7 (12,5)	16 (28,6)	7 (12,5)	55 (98,2)
Total	26 (46,4)	7 (12,5)	16 (28,6)	7 (12,5)	56 (100)

Tabla 4. Comparación de resultados del EMO y el TST.

TST (mm)	EMO							
	Piuria				Hematuria			
	Positivo ^a		Negativo		Positivo ^b		Negativo	
	N	%	N	%	n	%	N	%
5-10	10	17,9	19	33,9	0	0	29	51,8
10-15	3	5,4	12	21,4	0	0	15	26,8
15	1	1,8	11	19,6	1	1,8	12	21,4
Total	14	25,0	42	75,0	1	1,8	56	100

^a Se consideró como positivo al hallazgo de piuria, cuando se observó una cantidad mayor a (1-2) piocitos por 40 aumentos, al examen microscópico del sedimento urinario.

^b Se consideró como positivo al hallazgo de hematuria microscópica, cuando se observó una cantidad mayor a (1-2) hematíes por 40 aumentos, al examen microscópico del sedimento urinario.

TST = Test Skin Test

EMO = Examen elemental y Microscópico de Orina

La proporción de casos de piuria en relación al consumo de leche cruda fue mayor en aquellas personas que mencionaron consumir leche proveniente de hacienda (n = 7); en el caso del queso los hallazgos fueron mayores en las personas que aludieron alimentarse de quesos elaborados de manera artesanal (n = 4).

3.1.2. Cultivo *in vitro*

De un total de 394 cultivos (197 x 2 = 394) aplicados a todas las muestras, no se obtuvieron resultados con crecimiento alguno; los cultivos fueron revisados una vez por semana por 5 meses y se obtuvo una proporción de cultivos contaminados del 0,50% (2/394).

3.2. Discusión

En nuestro contexto es desconocido el impacto que tiene como zoonosis el patógeno *M. bovis*, el presente es uno de los primeros trabajos de campo que ha pretendido detectar casos de TB zoonótica en personas consideradas en riesgo de desarrollar la forma extrapulmonar, ya sea porque consumen leche o quesos contaminados por el patógeno.

Se menciona que toda persona catalogada como reactiva al PPD debe ser considerada como un caso potencial de enfermedad [10], si bien suele determinarse en la mayor parte de los estudios a una reacción de 10 o más mm de induración como positiva, hay que tomar en cuenta que este punto de corte constituye un límite estadístico y que por lo tanto no es adecuado en todos los casos [6], especialmente cuando se pretende identificar casos de enfermedad, ya que así lo han demostrado Rodríguez *et al* [34], al reportar que de un total de 16 observaciones clínicas de pacientes con TB renal, la reacción a la prueba del PPD fue mayor a 10 mm sólo en 4 pacientes; razón por la cual, en nuestro estudio para evitar este tipo de sesgo, se consideró como posible caso de enfermedad a todo individuo con una reacción tuberculínica ≥ 5 mm de induración.

La principal meta de este trabajo fue la detección de *Mycobacterium bovis* como posible implicado en casos de infección extrapulmonar; específicamente genitourinaria, ya que como lo mencionan Ayele *et al*; Gallagher & Jenkins; Arce *et al* [5] [18] [4], el tracto genitourinario humano es un sitio común de TB extrapulmonar debida a *M. bovis* y debido a que la principal sintomatología en la población de estudio así lo manifestaba.

En nuestra investigación, los principales hallazgos determinados por el EMO fueron la piuria y la hematuria y comparándolos con un estudio de TB genitourinaria efectuado por Najjar y sus colaboradores [27], puede determinarse que los principales hallazgos son la piuria en la mayor parte de los pacientes seguida de la hematuria, determinando entonces que dichos signos constituyen una muy buena referencia, en cuanto a la orientación de casos de TB genitourinaria en pacientes sospechosos.

Pudo determinarse además el caso de una persona del género masculino en la cual se observó la presencia de

hematuria sin piuria, lo cual se asemeja con un reporte presentado por Lewis *et al* [23], quienes refirieron el hallazgo de *M. bovis* en un paciente con infección urogenital para el cual el único hallazgo fue la hematuria; entonces es posible la presencia de casos de enfermedad tuberculosa genitourinaria en los cuales puede estar presente la hematuria como principal hallazgo.

Para obtener resultados positivos al cultivo *in vitro* en cuanto al desarrollo de *Mycobacterium* spp., los medios deben mantenerse en incubación hasta por 8 semanas [35]; sin embargo, para *M. bovis* el tiempo de incubación es mayor [9]; en nuestro trabajo los medios de cultivo fueron incubados hasta por 5 meses realizándose revisiones semanales; pese a lo mencionado no se evidenció crecimiento micobacteriano, esto podría explicarse por las siguientes razones:

Mangiapan *et al* [25] mencionan que con mucha frecuencia los resultados al cultivo *in vitro* son negativos especialmente en las formas paucibacilares de la enfermedad, así en nuestro caso, la eliminación de los bacilos en orina es intermitente, es decir, posee un comportamiento paucibacilar.

Acerca del número de muestras recolectadas, tal como lo reportaron Rodríguez *et al* [34] en cuanto a resultados bacteriológicos positivos en muestras de orina, esto fue posible entre el tercer y quinto intento de cultivo (en la mayor parte de pacientes), mientras que en una persona sólo fue posible en el séptimo ensayo, con lo cual es evidente que una sola serie de estudios bacteriológicos con resultados negativos, considerando una recolección mínima de tres y máxima de cinco muestras, no descarta la ausencia de la enfermedad.

Otro aspecto a considerar es el límite de detección que posee el método de cultivo para bacilos tuberculosos, así de Waard & Robledo [15], mencionan que este es de 10 a 1000 micobacterias viables por ml de muestra, y además de esto lógicamente, se requiere que los bacilos se encuentren viables para su desarrollo, sospechando entonces que en nuestro caso la cantidad de micobacterias en las muestras de orina no fue la ideal para el desarrollo *in vitro* o que lo fue; pero, que durante el transporte y/o el procesamiento de la muestra [26] perdieron viabilidad y que su número se redujo aún más.

Por otra parte, tal como lo mencionan Llaca *et al* [24], existe una clara diferencia en cuanto a la cantidad de bacilos que contienen tanto las muestras de origen pulmonar (esputo) cuanto las de origen extrapulmonar, siendo mayor en las pulmonares que en las extrapulmonares, hecho por el cual la metodología del cultivo *in vitro* brinda mejores resultados en especímenes pulmonares que en extrapulmonares.

Si bien el cultivo *in vitro* ha demostrado ser un método con sensibilidad adecuada para muestras de origen pulmonar, el inconveniente se suscita al momento de determinar el número de muestras necesarias para aplicarlo en casos extrapulmonares y poder descartar acertadamente los resultados negativos; es entonces que tal como lo describen Golden & Vikram [19], una falla en el cultivo *in vitro* en muestras extrapulmonares no excluye el diagnóstico, requiriendo tal vez en su lugar de pruebas con una mejor sensibilidad y que no presente los inconvenientes ya mencionados.

Entonces al menos en la forma extrapulmonar contemplada en este estudio, el cultivo *in vitro* no representó un método ideal para la detección de *Mycobacterium spp.*, debido a que probablemente la cantidad de micobacterias en las muestras no fue suficiente para llevar a cabo la detección por cultivo y que además los procesos de decontaminación y concentración las redujeron aún más y perdieron su viabilidad; este hecho pudo ser determinado ya que al aplicar de manera adicional una PCR en sedimentos de orina provenientes de pacientes sospechosos ante el EMO, fue posible la detección de dos casos, permitiendo determinar la presencia de *Mycobacterium spp.*

Este hallazgo podría explicarse por las siguientes razones:

Existe la posibilidad de que las bacterias presentes en las muestras de orina perdieron su viabilidad durante el procesamiento previo al cultivo [26] alterando los resultados; sin embargo, esta situación no afecta los resultados que puede ofrecer la PCR ya que por medio de esta metodología se detecta al DNA y no a la viabilidad de la micobacteria.

Además, si contrastamos que la técnica de cultivo empleada cuenta con una capacidad de detección mínima de 10 a 1000 micobacterias viables por ml de muestra [21] y que la PCR utilizada en esta investigación detecta a una cantidad menor a 10 micobacterias [8]; podría entonces determinarse que al menos en los dos casos detectados, la cantidad de micobacterias no fue la ideal para el desarrollo en el cultivo; pero, sí para la prueba de PCR.

4. Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, pudo establecerse que los trabajadores de las fincas lecheras se encuentran en mayor riesgo que los trabajadores de camal para desarrollar la enfermedad tuberculosa debida a *Mycobacterium spp.* ya que así lo demostraron tanto la prueba que determino la exposición micobacteriana mediante el TST así cuanto las pruebas de caracterización tales como la microscopía, cultivo *in vitro* y la PCR.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro Internacional de Zoonosis y al laboratorio de Tuberculosis del Hospital Carlos Andrade Marín por el apoyo prestado para la realización de la investigación.

6. Referencia

1. Abalos P. & Retamal P. 2004. Tuberculosis: ¿Una zoonosis re-emergente? Revue scientifique et technique Office International des Epizooties 2: 583-594.
2. Acha P. & Szyfres B. 2001. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Bacterioses and Mycoses. Third edition, Pan American Health Organization. Scientific and technical Publication N° 580. Washington D.C., p. 283-299.
3. Aguilar E. 2008. Reporte epidemiológico del Ministerio de Salud Pública. Quito-Ecuador.
4. Arce A.J., Robales C.A., Mecca R. J. & Coombes A.N. 2007. Tuberculosis Genitourinaria. Revisión de la Patología. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina. N° 169.
5. Ayele W.Y, Neill S.D., Zinsstag J, Weiss M.G. & Pavlik I.2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. The International Journal of tuberculosis and Lung Disease 8: 924-934.

6. **Benenson A. 1997.** Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Informe final de la asociación de estado de la Salud Pública. OPS/OMS. Pan American Health Organization. Scientific and technical Publication N°. 564. Washington D.C.
7. **Benítez R. 2007.** Prevalencia de *Mycobacterium* spp. en poblaciones en riesgo del cantón Mejía, Pichincha. Ecuador. Tesis para la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, p. 39-52.
8. **Bödinghaus B., Rogall T., Flohr T., Blocker H. & Bottger E.C. 1990.** Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1751-1759.
9. **Branch B., Plessis I., Standley M., Buchan K. & Pearson M. 2004.** Infectious Diseases of Livestock. Second edition. Oxford University Press, Oxford New York., p.1965-1977.
10. **Brogliá B., Bonifachich E., Cerqueiro M.C., Díaz N., Díez G., González N., Laube G., Miceli I., Pérez C., Rey J.M., Silberberg R. 2002.** Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. *Archivos Argentinos pediátricos* 2: 159-179.
11. **Corner L.A.L. 2006.** The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to asses the risk. In: *Veterinary Microbiology* 112: 303-312.
12. **Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F., de Kantor I & Meslin F.X. 1998.** Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases* 4: 59-70.
13. **Cosma C.L., Sherman D.R. & Ramakrishnan L. 2003.** The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. *Annual Reviews of Microbiology*. Washington D.C 57: 641-676.
14. **de Kantor I. 2008.** La Tuberculosis (TB) zoonótica en América Latina y el Caribe. Una actualización. In: III Congreso Latinoamericano de Zoonosis, IV Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires. Libro de resúmenes. p, 16.
15. **de Waard J.H. & Robledo J. 2007.** Conventional Diagnostic Methods. In: *Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care*. Palomino J.C., Leão S.C. & Ritacco V., editors. *Tuberculosis Textbook.com*. First edition. BourcillierKamps.com, p. 401-424.
16. **Fend R., Geddes R., Lesellier S., Vordermeier H.M., Corner L.A., Gormley E., Costello E., Hewinson R.G., Marlin D.J., Woodman A.C. & Chambers M.A. 2005.** Use of an Electronic Nose To Diagnose *Mycobacterium bovis* Infection in Badgers and Cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 4: 1745-1751.
17. **Gálvez M., Herranz L.M., Arellano R., Rabadán M. & Pereira I. 2004.** Forma de presentación pseudotumoral de Tuberculosis urogenital: Caso Clínico. Servicio de Urología. Hospital Universitario de la Princesa. *Actas Urológicas Españolas*. Madrid 9: 683- 687.
18. **Gallagher J. & Jenkins P.A. 1998.** Mycobacterial disease. In: *Zoonoses, biology, clinical practice and public health control*. Palmer S.R., Soulsby, L. & Simpson D., editors. Oxford University Press, Oxford, p. 155-164.
19. **Golden M.P. & Vikram H.R. 2005.** Extrapulmonary Tuberculosis: An Overview. *American Family Physician* 72: 1761-1768.
20. **INEC. 2001.** Resultados definitivos del censo de población. In: VI Censo de Población y V de Vivienda, p. 17.
21. **Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H., Schiefer G., Slenczka W., Von Graevenitz A. & Zhaner H. 2003.** Zoonoses infectious diseases transmissible from animals to humans. Third edition. ASM Press. Washington D.C., p. 210-216.
22. **Kritski A. & Fiuza F. 2007.** **Inmunological Diagnosis. In: Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care**. Palomino J.C., Leão S.C. & Ritacco V., editors. *Tuberculosis Textbook.com*. First edition. Bourcillier-Kamps.com, p. 426.
23. **Lewis K.E., Lucas M.G., Smith R. & Harrison N.K. 2003.** Urogenital infection by *Mycobacterium bovis* relapsing after 50 years. *The British Infection Society* 46: 246-248.
24. **Llaca J.M., Aréchiga A.M., Martínez M.G. & Cantú P.C. 2003.** La baciloscopía y el cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. *Revista de Salud Pública y Nutrición de México* 4: 1-11.
25. **Mangiapan G., Vokurka M., Schouls L., Cadranell J., Lecossier D., van Embden J. & Hance A.J. 1996.** Sequence Capture-PCR Improves Detection of Mycobacterial DNA in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1209-1215.
26. **Morán M.C., Aceves D., Peña P.M., Gallegos M.P., Flores S.E., Montoya H., Figuera L.E., Villa L. & Sánchez J. 2000.** Detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en una población seleccionada del noroccidente de México. *Pan American Journal Public Health* 6: 389-394.
27. **Najar M.S., Bhat M.A., Wani I.A., Banday K.A., Reshi A.R., Daga B.A. & Fazili T.H. 2003.** Profile of renal tuberculosis in 63 patients. *Indian Journal Nephrology* 13: 104-107.
28. **National Centre for Biotechnology Information (NCBI). 2008.** Taxonomy Disponible en: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

29. **OMS. 2009.** Global tuberculosis control–epidemiology, strategy, financing. WHO Report. WHO/HTM/TB/2009.411.
30. **Phillips C.J., Foster C.R., & Morris P.A. & Teverson R. 2003.** The transmission of Mycobacterium bovis infection to cattle. Research in Veterinary Science 74: 1-15.
31. **Proaño P.F., Rigouts L., Brandt J., Dorny P., Ron J., Chávez M.A., Rodríguez R., Fissette K., Vanaerde A., Portaels F. & Benítez W. 2006.** Preliminary observation on Mycobacterium spp. in dairy cattle in Ecuador. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2: 318-323.
32. **Proaño-Pérez F., Benítez-Ortiz W., Celi-Eraza M., Ron-Garrido L., Benítez-Capistros R., Portaels F., Rigouts L., Linden A. 2009.** Comparative intradermal tuberculin test in dairy cattle in the north of Ecuador and risk factors associated with bovine tuberculosis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 81:1103-1109.
33. **Remacha M.A., Parra M.I. & Esteban A. 2006.** Pulmonary tuberculosis due to Mycobacterium bovis in León. Journal of Tubercle and Lung Disease 3: 349- 350.
34. **Rodríguez W., Caffarena E., Bidegáin M.A., Figueroa S., Rodríguez S. & Pugh A. 1986.** Tuberculosis Renal en Pediatría. Revista Chilena de Pediatría 3: 244-248.
35. **Salpeter S., Baquero R., Genoni C. 2001.** Tuberculosis Clínica: Una guía para el nuevo milenio. Génesis ediciones. Quito, p 1-83.
36. **SICA, 2000.** Servicio de informática y Censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Tercer Censo Nacional Agropecuario. <http://www.sica.gov.ec/censo/docs/nacionales/tabla6htm>
37. **Singh M. & Espitia C. 2007.** Immunological Diagnosis. In: Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care. Palomino J.C., Leão S.C. & Ritacco V., editors. Tuberculosis Textbook.com. First edition. Bourcillier-Kamps.com, p. 426.