

PREVALENCIA DE *MYCOBACTERIUM SPP.* Y ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO EN POBLACIONES EXPUESTAS DEL CANTÓN MEJÍA, ECUADOR

Ricardo Benítez-Capistros¹, Freddy Proaño-Pérez^{2,3},
Lenin Ron-Garrido², Maritza Celi-Erazo², Washington Benítez-Ortiz.^{2,3}

¹ Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador

² Centro Internacional de Zoonosis, Universidad Central del Ecuador

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador

Corresponding author: Freddy Proaño Pérez, Ph.D.
e-mail: fproano-ciz@ac.uce.edu.ec

Resumen. La tuberculosis (TB) es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* en humanos; sin embargo, el agente patógeno de la TB bovina (TBB), *Mycobacterium bovis*, también puede originar la enfermedad en el hombre, causando la TB zoonótica. Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar la prevalencia de *Mycobacterium spp.* en poblaciones de riesgo mediante la prueba cutánea de tuberculina o “tuberculin skin test” (TST), e identificar los factores de riesgo. Esta investigación se aplicó en 157 personas, conformado por trabajadores de haciendas y del Camal municipal del cantón Mejía, provincia de Pichincha – Ecuador. La prevalencia de exposición a *Mycobacterium spp.* fue 29% (0.29 IC95% = 0.22–0.36), los resultados permitieron establecer la existencia de una asociación significativa entre la positividad al TST en relación al género masculino ($P = 0,026$), y consumo de leche proveniente de haciendas ($P = 0,030$); así como, una diferencia altamente significativa con el consumo de quesos elaborados de manera artesanal ($P = 0,003$). El consumo de leche cruda tuvo un valor de *Odds Ratio* (OD) de 4,65 (IC95% = 1,75–12,01). La alta prevalencia de reactores positivos al TST, así como la alta significancia en las pruebas de correlación demuestran la importancia para realizar estudios de control de la tuberculosis bovina en personas y animales.

Palabras claves: *Mycobacterium bovis*, tuberculinización, zoonosis, Ecuador.

Introducción

La tuberculosis (TB) en los humanos es una enfermedad crónica infecciosa causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, y en menor grado por *M. bovis*, el agente etiológico de la tuberculosis bovina, lo cual hace de esta bacteria una especie zoonótica importante (Cosivi *et al.*, 1998). En el hombre la tuberculosis causada por *M. tuberculosis* o *M. bovis* es clínicamente, radiológicamente, y patológicamente indistinguible (Wedlock *et al.*, 2002). La respuesta inmune de la tuberculosis es predominantemente celular, la reacción cutánea de hipersensibilidad de tipo retardada es producida por estimulación de los antígenos presentes en las micobacterias (Reece *et al.*, 2005).

La infección con *M. bovis* de humano a humano es considerada usualmente como un evento raro en algunas regiones. Sin embargo, el aumento de casos de VIH y la presencia de varios factores de riesgo, hacen pensar que la epidemiología de la enfermedad podría cambiar y la transmisión humano-humano aumentar (Ayele *et al.*, 2004).

M. bovis se transmite al humano por la inhalación de aerosoles provenientes de animales infectados (Neill *et al.*, 1989), o por medio de la ingestión de leche no pasteurizada proveniente de dichos animales. Las personas que trabajan en la industria ganadera, trabajadores de camales y veterinarios, son los que se encuentran con mayor riesgo de contraer la infección por *M. bovis* (Cousins y Dawson, 1999). Los bacilos tuberculosos sobreviven más de 14 días en quesos elaborados a partir de leche proveniente de animales infectados, y en el caso de la mantequilla más de 100 días (Gallagher y Jenkins, 1998).

En el Ecuador, la TB humana es una enfermedad de notificación obligatoria, el Ministerio de Salud Pública (MSP) reportó en el año 2009 a nivel nacional 3.317 nuevos casos de TB pulmonar con baciloscopia positiva (BK+), y 584 nuevos casos de TB extra pulmonar (MSP, 2010). En el país solamente se han documentado dos casos de TB zoonótica, reportados por el Laboratorio Nacional de Higiene “Leopoldo Izquieta Pérez (LIP)” en Guayaquil, identificados en un estudio realizado con cepas recolectadas durante el periodo 1998–2005 (de Kantor *et al.*, 2008).

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de *Mycobacterium* spp. en poblaciones humanas en riesgo, del cantón Mejía en la provincia de Pichincha, mediante una prueba de tuberculinización (TST), y definir los factores de riesgo que se encuentran involucrados en la transmisión de la enfermedad.

Materiales y métodos

Área y población de estudio:

Esta investigación se realizó en 157 personas mayores a 15 años, trabajadores de 9 haciendas y del Camal Municipal de Machachi, cantón Mejía, provincia de Pichincha. Las personas menores a 15 años fueron excluidas del estudio para evitar posibles confusiones provocadas por la vacunación con BCG, otros requisitos de exclusión fueron: no reportar enfermedades crónicas, hipertensión, diabetes, vacunación reciente de contra gripe, y tratamiento inmunosupresor.

Encuesta y tuberculinización:

Se realizó una encuesta a 126 participantes y posteriormente, la inoculación intradérmica en la mitad de la superficie anterior del antebrazo derecho de 0,1 ml (2 UI) del derivado proteico purificado (PPD) RT-23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark, lote n° 685461.7). Se comunicó a cada paciente sobre las posibles molestias causadas por la prueba en la zona de administración, y la importancia de no rascarse o frotarse.

Lectura e interpretación de la reacción: La reacción desarrollada fue palpada y medida a las 72 horas después de la inoculación, se procedió a delimitar los bordes por medio del método “ballpoint” (Sokal, 1975). El resultado de la reacción fue registrado en milímetros de induración, y una reacción ≥ 10 mm fue interpretada como positiva (Wang *et al.*, 2002).

Encuesta: Se aplicó una encuesta a 126 participantes, mediante un cuestionario estructurado para determinar los posibles factores de riesgo para la exposición a TB. Esta encuesta se fundamentó en 4 aspectos: condiciones de vivienda, síntomas de la enfermedad, hábitos de consumo de leche y queso y, contacto con ganado bovino.

Análisis Estadístico:

Se calculó la prevalencia estimada de acuerdo con los resultados positivos al TST, con un 95% de intervalo de confianza (IC). Los resultados del TST fueron comparados utilizando pruebas Chi-cuadrado de asociación para dos variables (Chi-cuadrado de Pearson, Razón de verosimilitudes o Prueba G, y prueba exacta de Fisher); así como, medidas de asociación (Coeficiente de contingencia, el índice de correlación de Spearman) para las variables nominales, y tablas de contingencia, dependiendo el caso (Sánchez, 2006). Adicionalmente, se realizó una comparación de proporciones mediante el *Odds Ratio* (OD). El análisis de correspondencias múltiples (MCA) se realizó para correlacionar las variables que mostraron mayores diferencias significativas (Sánchez, 2006). Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS® versión 13.0 para Windows.

Resultados

El 58,6% de los participantes trabajaban en las haciendas, mientras que 41,4% fueron empleados del Camal. La edad promedio de los participantes fue 37,6 años (15-79), tiempo de trabajo promedio de 10,4 años.

De las 157 personas sometidas al TST, el 97,5% manifestaron que nunca se les había realizado esta prueba con anterioridad, el 2,5% sí se había realizado la TST, y solamente una persona (0,6%) declaró haber tenido una reacción positiva. Ningún paciente manifestó haber sido diagnosticado con TB. El 92,4% de los encuestados recibió al menos una dosis de vacuna BCG; el 21,0% se ha realizado la prueba de VIH, de los cuales ninguno manifestó tener resultado positivo.

El 96,8% (152/157) que se realizó el TST, regresaron luego de 72 horas para la lectura, de ellas, 44 personas tuvieron una reacción positiva a la tuberculina (≥ 10 mm), calculándose una prevalencia estimada de 0.29 (IC95% = 0.22-0.36). La edad promedio de los positivos fue 40,5 años con una Desviación Standard (DS): $\pm 13,05$ años, y el tamaño promedio de la reacción a la tuberculina en este grupo fue 13,80 con una DS: $\pm 3,012$.

De las 157 personas a las que se les realizó la prueba, 126 (80,3%) respondieron la encuesta. El promedio de personas por hogar se ubicó en 4,90 personas. Se estableció que 42,0% de la población en estudio habita en la ciudad de Machachi, 27,0% vive concretamente en las haciendas y un 31,0% de las personas habita en pueblos cercanos a su lugar de trabajo.

El 11,9% de los encuestados manifestó tener tos frecuente, el 11,1% haber presentado alguna vez tos durante más de 15 días. Con respecto a otros síntomas reportados en pacientes con TB, en esta población se encontró que 15,0% manifestó sudoración nocturna, el 15,9% pérdida de peso, el 17,5% dolores estomacales, el 7,1% retorcijones espasmodicos, el 3,2% diarreas frecuentes, el 23,0% dolores renales, y el 8,7% ardor al orinar.

Se encontró que el 88,9% de las personas consume leche, de estos, el 34,8% ha consumido o consume leche cruda, mientras que el 65,2% manifestó no ingerir leche cruda o siempre hervirla. El 65,2% manifestó no consumir leche pasteurizada, mientras que el 34,8% sí lo hace. En cuanto a la procedencia de la leche, el 40,2% consume leche procedente de haciendas, 10,7% consume eventualmente leche de haciendas o compran en tiendas, 16,1% consume leche proveniente de sus propias vacas y 37,0% declaró comprar leche pasteurizada. En lo concerniente al consumo de queso, el 7,1% no consumen este producto y por el contrario la gran mayoría (92,9%) sí lo hace. La procedencia fue: queso artesanal 47,0%, tiendas 47,0% y 6,0% fabrican su propio queso. Adicionalmente, se encontró que 29 personas fabrican queso (23,0%) y, de las cuales, 89,7% declaró utilizar leche cruda para la fabricación del queso mientras que sólo 10,3% utiliza leche pasteurizada para la elaboración de éste.

En este estudio se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el género (masculino o femenino) y la reacción positiva o negativa al TST ($P=0,026$). El grado de asociación entre ambas variables también fue significativo ($P=0,021$). El valor de OR para el factor de riesgo entre ambas variables fue de 2,52 ($IC95\%= 5,61-1,131$) e indica que, comparando entre ambos géneros, los hombres tienen más del doble de probabilidad de resultar positivos al TST respecto a las mujeres (Tabla 1). No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$) entre el resultado del TST y la edad, el tipo de ocupación, el tiempo de trabajo, y el estado de vacunación BCG.

Los resultados obtenidos a partir de la encuesta sobre factores de riesgo y sintomatología permitieron determinar que tampoco existen diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$) entre el resultado positivo o negativo del TST en relación a síntomas indicativos de TB pulmonar y extrapulmonar.

Tabla 1. Agrupación de las medidas de independencia para Tablas de Contingencia

Tabla de contingencia	Prueba Chi-cuadrado de Pearson ²	Prueba de G	Prueba exacta de Fisher (n-colas)	P valor
TST * Tiempo de trabajo	-	7,010	-	0,072 ^{NS}
TST * Género	-	-	x (2)	0,026*
TST * Consumo de leche	-	-	x (2)	0,769 ^{NS}
TST * Tipo de leche	-	-	x (2)	0,000**
TST * Procedencia de la leche	7,025	-	-	0,030*
TST * Procedencia del queso	-	11,562	-	0,003**
TST * Fabricación de queso	-	-	x (2)	0,044*

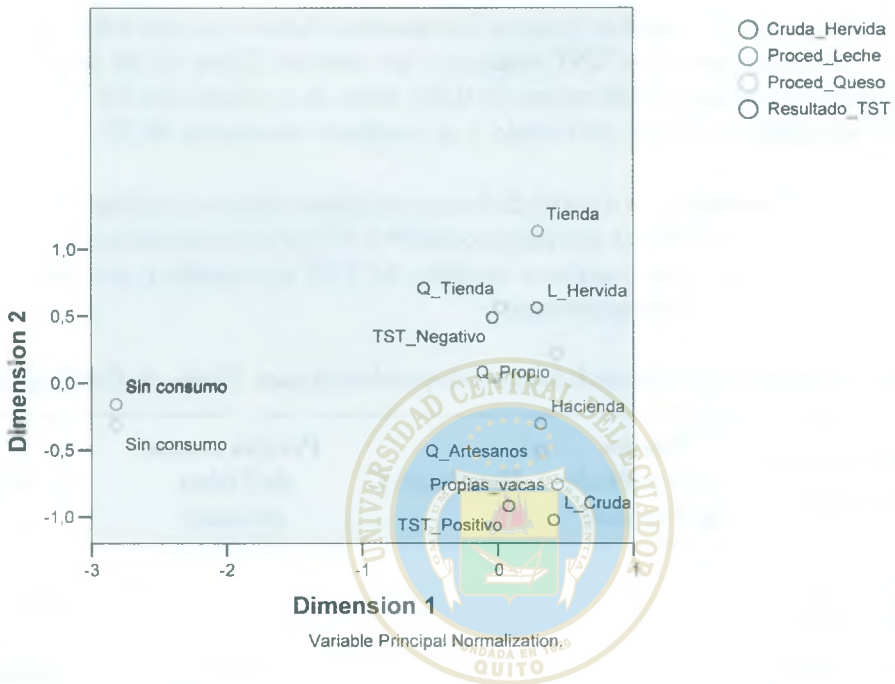
NS = No significativo

*= Asociación significativa

**= Asociación altamente significativa



Joint Plot of Category Points



En relación a los hábitos de consumo de lácteos, se encontró que no existieron diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$) entre el resultado positivo o negativo del TST en relación a la ingesta de leche y/o queso. Sin embargo, en los consumidores de leche cruda o leche hervida se determinó que existen diferencias estadísticas altamente significativas ($P<0,01$) con relación al resultado del TST. El valor de OR para la relación de riesgo entre ambas variables fue calculado en 4,65, lo cual indica que los que ingieren leche cruda tienen más de 4 veces la probabilidad de resultar positivos al TST con respecto a los que ingieren leche hervida. De igual manera, se determinó que existe diferencia significativa y altamente significativa entre la procedencia de la leche ($P=0,030$) y del queso ($P=0,003$) con el resultado del TST, respectivamente. El grado de asociación entre ambas variables fue significativo y estuvo dado por un coeficiente de contingencia de 0,245; es decir, según el orden de las categorías, conforme la leche es menos tratada existe un mayor número de casos positivos al TST.

Así mismo, se encontraron diferencias significativas ($P=0,044$) entre las personas que declararon fabricar queso y aquellas que no lo hacen con respecto al resultado obtenido en el TST. El grado de asociación entre ambas variables fue significativo ($P=0,028$) ob-

teniéndose un valor de correlación de Spearman de 0,198 el cual indica que, de acuerdo al orden de las categorías, el hecho de fabricar queso está asociado con un mayor número de resultados positivos (Tabla 1).

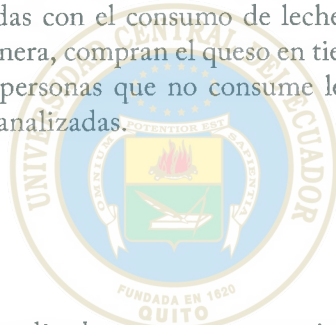
Se analizaron cuatro tablas de contingencia que presentaron diferencias significativas en los análisis de independencia en relación al resultado del TST. Las variables para el análisis fueron: consumo de leche cruda o hervida, procedencia de la leche, procedencia del queso y resultado del TST. Se pudo observar que las personas que presentaron un resultado positivo en este estudio (≥ 10 mm) mayoritariamente estuvieron relacionadas con el consumo de leche cruda, de leche proveniente de haciendas, de aquellos que consumen leche de sus propias vacas y que, además, compran quesos artesanales.

En contraposición, en este estudio las personas que tuvieron un resultado negativo al TST (< 10 mm) estuvieron relacionadas con el consumo de leche hervida, de leche comprada en tiendas, y que, de igual manera, compran el queso en tiendas o los fabrican caseramente. Finalmente, el grupo de personas que no consume leche y/o queso, no tuvo ninguna relación con las variables analizadas.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que casi un tercio de la población muestreada reaccionó al TST (29%), lo que demuestra un elevado porcentaje de contacto con micobacterias. En el país se considera un sub-registro importante de casos de TB, esta situación ha generado que el Programa de Control de la Tuberculosis de la OPS/OMS considere al Ecuador como un país de alta prevalencia/incidencia, encontrándose entre los 10 países con mayor carga de TB. Actualmente se desconoce el número estimado de casos de TBB en humanos (Proaño-Pérez *et al.*, 2011).

Este es el primer estudio en el país relacionado con este tema, que pretendió indagar la relación existente entre la positividad al TST y la exposición a bacterias del complejo *M. tuberculosis* en una población humana en riesgo. A pesar de que los datos no sugieren que el contacto cercano con los bovinos sea un factor de riesgo para un resultado positivo al TST, la alta prevalencia estimada en este estudio, podría reflejar una posible exposición previa a animales tuberculosos en las diferentes localidades de la zona, una transmisión de *M. bovis* desde el ganado hacia los humanos o, simplemente un contacto previo con casos de TB humana en esta región; contradictoriamente, todos los pacientes encuestados manifestaron no haber estado relacionados o conocer casos cercanos de personas con TB activa.



En relación con la mayor probabilidad que tienen los hombres de reaccionar al TST, Cousins y Dawson (1999) explican que esto se debe al hecho de que los varones, de una u otra forma, se encuentran más expuestos a las micobacterias en el momento de trabajar con el ganado. Norval *et al.* (2004) reportan que los resultados falso positivos y falso negativos del TST son causados por la variabilidad intrínseca de la prueba, lo cual comprende posibles variaciones en la dosificación y formulación de la tuberculina, así como en la técnica de administración, la variabilidad en la lectura, la anergia y la sensibilidad a micobacterias no tuberculosas (MNT). En este estudio se minimizó en lo posible esta variación por medio del seguimiento de un protocolo uniforme realizada por una sola persona a lo largo de la fase de campo. En cuanto a la probabilidad de reacciones cruzadas generadas por MNT se estima que estas alcanzarían un 4,0% tal como ha sido reportado por Grabau *et al.* (1995).

Es muy difícil poder determinar con exactitud las vías de transmisión de *M. bovis*, principalmente a causa de la asociación entre este patógeno y la ingestión de productos lácteos infectados, pero también por la probabilidad de infección mediante la vía aérea al momento de respirar aerosoles contaminantes (LoBue *et al.*, 2004). En relación a la posibilidad de transmisión de *M. bovis* desde el ganado hacia los humanos, se ha reportado que el consumo de leche no pasteurizada proveniente de bovinos con TB es un factor de riesgo involucrado en la infección (Winthrop *et al.*, 2005).

Los datos encontrados sugieren la existencia de una alta correspondencia entre el consumo de leche proveniente de hacienda, de leche cruda y de queso artesanal asociada a la positividad al TST. A su vez, los datos sugieren que, por el contrario, la negatividad al TST está asociada con el consumo de leche hervida, en las haciendas, y con el consumo de queso y leche provenientes de comercios formales (pasteurización). En consecuencia, los hábitos de consumo de productos lácteos no pasteurizados, encontrados en esta población, constituirían un factor de riesgo potencial para la infección y transmisión de la TB zoonótica ya que, posiblemente contribuyeron en las reacciones positivas observadas por medio del TST.

En el Ecuador existe un vacío de conocimiento sobre la distribución, los patrones epidemiológicos y la dinámica de transmisión de esta importante zoonosis (Proaño-Pérez *et al.*, 2011), cuyo agente patógeno (*M. bovis*) ha sido aislado por primera vez en Ecuador en bovinos del cantón Mejía (Proaño-Pérez *et al.*, 2006), el último reporte indica que la prevalencia estimada de TBB en el ganado lechero de fincas grandes y medianas del cantón Mejía es de 7.13% para el año 2008 (Proaño-Pérez *et al.*, 2009).

Esta información da la pauta para pensar que existe un riesgo potencial muy elevado de transmisión de la bacteria (por vía aérea y/o digestiva) entre los animales enfermos y los trabajadores que están en contacto cercano, a pesar de que los resultados del presente estudio no mostraron diferencias estadísticas significativas en este aspecto. Sin embar-

go, otros estudios han demostrado que esta posibilidad es una realidad y es un factor predisponente para el desarrollo de la enfermedad en los humanos (Biet *et al.*, 2005), especialmente cuando éstos padecen un debilitamiento del sistema inmune y que, en nuestro contexto, puede ocurrir frecuente y repentinamente debido a las deficiencias en las condiciones de salud y nutrición a las cuales están expuestos los habitantes de la mayoría de sectores rurales de nuestro país.

El principal problema radica en que los trabajadores de haciendas que acostumbran a tomar leche cruda de animales posiblemente enfermos. Por otro lado, en el momento en que la leche proveniente de ganado con TB es vendida a personas individuales o a artesanos, que poseen pequeñas empresas de elaboración de queso, quienes no cumplen con el debido proceso de pasteurización. En el caso de los trabajadores de camal se pudo constatar que éstos, en cierta manera, poseen hábitos de consumo diferentes a los trabajadores de haciendas, principalmente a causa del fácil acceso que tienen a tiendas y comercios dentro de la ciudad de Machachi, ya que en su gran mayoría todos viven en ésta; situación que no se presenta en el caso de los trabajadores de haciendas.

Lo anteriormente expuesto constituiría un motivo para que las personas puedan adquirir productos lácteos pasteurizados, sin embargo, como lo reportan Wilkins *et al.* (2003) el riesgo de infección con *M. bovis*, en el grupo de trabajadores de camal, está dado por la falta de higiene en las instalaciones, por el mercado informal que existe, la ausencia de inspección veterinaria, el desconocimiento de la enfermedad y la carencia en la utilización de medidas de bioseguridad (guantes), lo cual puede facilitar la infección con el patógeno por medio de la vía cutánea, particularmente cuando los trabajadores se cortan con los cuchillos con los cuales han despostado animales enfermos.

En nuestro país, a causa de la falta de políticas bien establecidas, existe un comercio informal que no cumple con normas sanitarias adecuadas y que vende sus productos sin ningún control, a pesar de que las grandes empresas pasteurizadoras adquieren la mayoría de la producción lechera. En este estudio se constató que un alto porcentaje (47%) de personas que manifestaron adquirir queso fresco a comerciantes artesanales, que venden el producto en mercados populares de modo informal, y sin ningún control sanitario.

En conclusión, esta información sustenta la necesidad de cuantificar y evaluar los impactos de la TB zoonótica en las poblaciones humanas para, de este modo, poder proponer a las instancias respectivas, métodos de control costo-efectivos, en especial, para las zonas donde la presencia de la enfermedad es significativa.

Agradecimientos

Los autores presentan sus agradecimientos a todos los participantes del estudio, al Dr. Antonio Viteri, Administrador del Camal Municipal de Machachi y a los propietarios de las haciendas donde se realizó el estudio.



Referencias

- American Thoracic Society (ATS) and Centre for Disease Control and Prevention (CDC). 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161: 1376-1395.
- 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. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8: 924-937.
- Biet, F., Boschirolì, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research* 36: 411-436.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F.A.K., de Kantor, I., Meslin, F.X. 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases* 4: 59-70.
- Cousins, D.V., Dawson, D.J. 1999. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 3: 715-721.
- de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osório Ribeiro M, et al. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88(4):35-65.
- Gallagher, J., Jenkins, P.A. 1998. Mycobacterial diseases. En: *Zoonoses, Biology, Clinical Practice and Public Health Control* (S.R. Palmer, L. Soulsby, D. Simpson, eds) pp. 155-164. Oxford University Press, Oxford, USA.
- Grabau, J.C., DiFerdinando, G.T., Novick, L.F. 1995. False positive tuberculin skin test results. *Public Health Reports* 110: 703-706.
- LoBue, P.A., Betancourt, W., Cowan, L., Seli, L., Peter, C., Moser, K.S. 2004. Identification of a familial cluster of pulmonary *Mycobacterium bovis* disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8: 1142-1146.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). 2006. Situación de la salud del Ecuador. Imprenta Zenitram, Quito, Ecuador.
- Neill, S.D., Hanna, J., O'Brien, J.J., McCracken, R.M. 1989. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *The Veterinary Record* 124:269-271.
- Norval, P.Y., Roustit, C., San, K.K. 2004. From tuberculin to prevalence survey in Cambodia. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8: 299-305.
- Proaño-Pérez, F., Benítez-Ortiz, W., Portaels, F., Rigouts, L., Linden, A. 2011. Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. *Pan American Journal of Public Health* (30)3: 279-296.
- Proaño-Pérez F., Benítez-Ortiz W., Celi M., Ron 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.

Proaño-Pérez, F., Rigouts, L., Brandt, J., Dorny, P., Ron, J., Chávez, M.A., Rodríguez, R., Fissette, K., Van Aerde, A., Portaels, F., Benítez-Ortiz, W. 2006. Preliminary observations on *Mycobacterium* spp. in dairy cattle in Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 318-323.

Reece, S.T., Stride, N., Ovendale, P., Reed, S.G., Campos-Neto, A. 2005. Skin test performed with highly purified *Mycobacterium tuberculosis* recombinant protein triggers tuberculin shock in infected guinea pigs. *Infection and Immunity* 73: 3301-3306.

Sánchez, J. 2006. Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado. Quality Print, Quito, Ecuador.

Sokal, J.E. 1975. Measurement of delayed skin test responses. *The New England Journal of Medicine* 293: 501-502.

Wang, L., Turner, M.O., Elwood, R.K., Schulzer, M., FitzGerald, J.M. 2002. A meta analysis of the effect of bacilli Calmette Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 57: 804-809.

Wedlock, D.N., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Buddle, B.M. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infection and the risk to human populations. *Microbes and Infection* 4: 471-480.

Wilkins, M.J., Bartlett, P.C., Frawley, B., O'Brien, D.J., Miller, C.E., Boulton, M.L. 2003. *Mycobacterium bovis* (bovine TB) exposure as a recreational risk for hunters: results of a Michigan hunter survey, 2001. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 7: 1001-1009.

Winthrop, K.L., Scott, J., Brown, D., Jay, M.T., Rios, R., Mase, S., Richardson, D., Edmonson, A., MacLean, M., Flood, J. 2005. Investigation of human contacts: a *Mycobacterium bovis* outbreak among cattle at a California dairy. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 9: 809-813.

World Health Organization (WHO). 2007. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO Report 2007. Geneva, Switzerland.