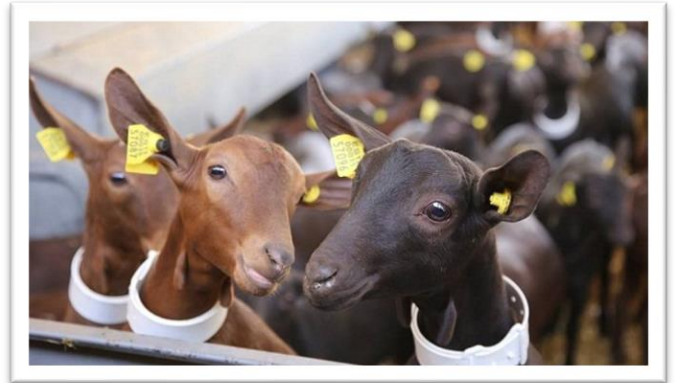


Nemátodos gastrointestinales y su relación con la tuberculosis caprina



Título: *Haemonchus contortus*; Whole mount. Autor: D.



Título: Murciano-granadina. Autor: Kevin Gonzalez

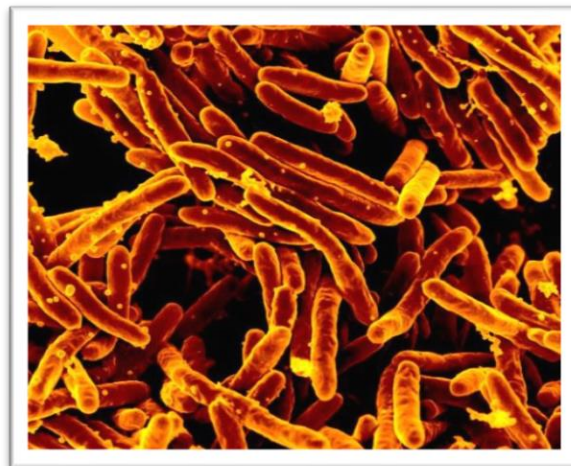


Imagen de microscopía electrónica de *Mycobacterium tuberculosis*

Trabajo de final de máster; Máster oficial en Zoonosis y Una Sola Salud

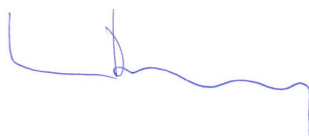
Universitat Autònoma de Barcelona

Dirigido y tutorizado por: Bernat Pérez de Val y Mariano Domingo Álvarez

Presentado por: Arnau Cendón Esteve

firma digital
o manuscrita escaneada

Director: Bernat Pérez de Val

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of connected loops and a final vertical stroke.

firma digital
o manuscrita escaneada

Tutor: Mariano Domingo Álvarez

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized loop at the beginning followed by several smaller, connected strokes.

firma digital
o manuscrita escaneada

Autor: Arnau Cendón Esteve

Índice

<i>Apartado</i>	<i>Número de página</i>
Agradecimientos.....	1
Resumen	1
Introducción	1
Hipótesis y objetivos.....	1, 2
Material y métodos	2, 3
Resultados	4
Discusión.....	5, 6
Conclusiones.....	6
Bibliografía.....	7, 8
Anexos	8 a 19

Agradecimientos

He tenido la gran suerte de contar con un gran número de maravillosas personas que me han ayudado sin reparos a lo largo del proyecto, en todos y cada uno de sus aspectos. No tengo ninguna duda de que este trabajo se ha podido llevar a cabo gracias a su desinteresada amabilidad, dedicación y pasión por la investigación científica. A todas ellas; mi más sincera gratitud. Espero gozar de la oportunidad de corresponderles a lo largo de mi carrera profesional.

Resumen

La tuberculosis es una importante enfermedad con grandes repercusiones en la salud pública. En el sector ganadero implica elevadas pérdidas económicas y supone un riesgo para la salud de los usuarios del sector, así como del consumidor. Así pues, para poder combatir esta enfermedad, es imprescindible encontrar métodos eficaces para tratarla y controlarla. Este trabajo aborda un aspecto poco estudiado para lograr este fin en la producción animal: el estudio de la relación de los helmintos gastrointestinales en la progresión de la infección tuberculosa. Resultados de otros estudios sugieren que los diferentes géneros y especies de simbioses pueden jugar papeles muy distintos frente la tuberculosis. Mediante este trabajo de campo se pretende poner en evidencia esta supuesta variedad de roles, en el caso concreto del ganado caprino. Los resultados obtenidos indican que este campo merece ser estudiado con más profundidad, puesto que podría ofrecer grandes ventajas en la lucha contra esta enfermedad.

Introducción

La filogenia y la ecología nos enseñan que la relación ecológica entre varios organismos suele tender al equilibrio. La interacción continuada entre distintas entidades biológicas en un entorno relativamente estable, frecuentemente favorece aquellos fenotipos más capaces de coexistir. De este modo, la tendencia de las relaciones entre patógenos y hospedadores es la de alcanzar un estado de equilibrio que permite mantener la homeostasis del sistema.¹

Este es el caso del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), un diverso grupo de especies del género *Mycobacterium* causante de la tuberculosis (TB) en un gran número de mamíferos, así como el de la mayoría de los parásitos con sus respectivos hospedadores.^{2,3} En ambos organismos la selección natural ha favorecido la persistencia y proliferación de aquellos fenotipos con mejor capacidad para sobrevivir a los mecanismos de defensa del hospedador y, simultáneamente, los que tienden a causar un menor grado de patología.⁴

Durante los últimos años, un gran número de estudios han demostrado que los helmintos simbioses poseen la capacidad para modular el sistema inmunitario del hospedador, principalmente estimulando una respuesta del tipo T-reguladora, lo cual los convierte en potenciales herramientas para tratar una gran variedad de patologías relacionadas con el sistema inmunitario.^{5,6,7}

Estas premisas son la base teórica fundamental de este estudio de campo, que pretende determinar si dicha interacción helminto-hospedador puede verse relacionado con el grado de patología de la TB.

Hipótesis y objetivos

Considerando las premisas planteadas, la hipótesis inicial de este estudio es que esperaríamos poder clasificar los distintos helmintos en tres tipos; un primer grupo se correlacionaría con una TB de menor intensidad, probablemente siendo estos los parásitos con un potencial patogénico menor para este tipo de ganado. Un segundo grupo se correlacionaría con un agravamiento de la TB, probablemente tratándose de los nematodos

con un potencial patogénico mayor en caprino. Finalmente, el tercer grupo de parásitos no mostrarían ningún tipo de correlación aparente con esta patología.

Este trabajo tiene como objetivo principal definir si existe correlación entre la presencia o abundancia de las distintas especies parásitas de nemátodos del abomaso y el grado de progresión de la TB en cabras.

Materiales y métodos

Granja de estudio

La granja de caprino, de raza murciano -granadina, está localizada en la comarca del Bages, cerca del municipio de Manresa. Se trata de una explotación ganadera ecológica con una elevada prevalencia de TB (cerca del 20%), donde los animales no han recibido ningún tratamiento para dicha enfermedad ni tampoco frente a los posibles parásitos que puedan encontrarse en el rebaño.

El rebaño pasta diariamente por los bosques circundantes al parque natural de Montserrat y comparte abrevaderos con la fauna autóctona, entre la que se destacan jabalís, corzos y cabras monteses.

Fases del estudio

El estudio se dividió en tres fases; la primera consistía en un cribaje inicial frente a la TB, usando el ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA), que también nos proporcionó un primer valor cuantitativo frente a esta patología.⁸ Mediante los resultados obtenidos clasificamos los animales del rebaño en cuatro grupos en función de la intensidad de la respuesta inmunitaria frente a la TB.

La segunda consistió en un estudio coprológico de índole cualitativo de un total de 16 animales preseleccionados, de los cuales la mitad pertenecen a los grupos con una respuesta inmunitaria más exacerbada frente a la TB y la mitad restante al grupo con la respuesta más leve. El estudio coprológico nos permitió establecer si dichos individuos estaban parasitados y, de ser así, proporcionarnos una idea general de la diversidad y carga parasitaria.⁹

La última fase consistió en la necropsia de los individuos finalmente seleccionados, el recuperado de los parásitos adultos del abomaso junto a su identificación y recuento y, finalmente, el estudio cuantitativo del grado de progresión de la TB mediante dos variables complementarias: el volumen de las lesiones de los nódulos linfáticos (NL) traqueobronquial y mediastínico caudal, junto a la carga de micobacteria presente en dichos ganglios.

Extracción de sangre y test IGRA

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente por Pérez de Val et al.⁸; se realizó una extracción de sangre de la totalidad de la población adulta de cabras de la explotación y, posteriormente, mediante el test IGRA (ID Screen® Ruminant IFN- γ , ID.vet, Grabels, Francia), se estimuló la sangre usando el preparado antigénico ESAT-6/CFP-10 y se midió la intensidad de la respuesta inmunitaria específica frente al CMT. Los resultados se obtuvieron calculando la diferencia entre los valores de absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 450nm a partir de la sangre estimulada con el preparado antigénico EC y la sangre no estimulada mezclada con PBS.⁸

Estudio coprológico

Se recogieron muestras de heces mediante estimulación anal de un total de 45 individuos preseleccionados. Las muestras fueron debidamente fijadas y preservadas con formalina y procesadas posteriormente en el laboratorio usando la técnica de McMaster mediante solución de sacarosa de alta densidad.^{10,11}

Recuperación de los nódulos linfáticos y abomaso

Un total de 16 individuos fueron aislados y sacrificados mediante una dosis intravenosa letal de pentobarbital sódico.¹² Seguidamente se practicó la necropsia a los animales para recuperar los ganglios linfáticos mediastínico caudal y traqueobronquial, así como el abomaso con todo su contenido. Las muestras fueron debidamente preservadas y almacenadas en refrigeración hasta su procesamiento.^{13,14}

Recuperado de los parásitos, identificación y recuento

Los abomasos fueron trasladados a la sala de necropsias y procesados pocas horas después del sacrificio de los animales, garantizando así la correcta preservación de los helmintos que puedan encontrarse en el órgano. Así se garantiza una correcta identificación microscópica del parásito y se evita el fenómeno de migración postmortem.¹⁴

El contenido gástrico fue tamizado y lavado debidamente para garantizar la recuperación y preservación de los nematodos adultos. El recuperado fue conservado en formalina y se anotó el volumen final de cada muestra.¹⁵

Se tomaron alícuotas representativas de cada una de las muestras del recuperado del contenido de los abomasos. Mediante una lupa de disección, se aislaron todos los nematodos presentes en dichas alícuotas y, mediante microscopía y características morfológicas, se identificaron y contaron los individuos adultos.^{14,16}

Medición de las lesiones tuberculosas ganglionares

El volumen aproximado de las lesiones de los NL fue calculado tomando las medidas pertinentes de cada lesión y usando la fórmula matemática para el cálculo de volumen de la forma geométrica más similar a dicho elemento, tal y como describen Arrieta Villegas et al.¹⁷ Seguidamente, los NL fueron congelados y almacenados para el posterior cultivo y recuento bacteriano.

Cultivo, recuento de las micobacterias y confirmación de la identidad de las colonias

Los ganglios linfáticos se homogeneizaron al completo para obtener una suspensión líquida; pudiendo así diluir las muestras, sembrarlas, cultivarlas y, finalmente, realizar el recuento de micobacterias, según descrito anteriormente por Pérez de Val et al.¹⁸

Finalmente se realizó una PCR para confirmar que las colonias aisladas pertenecen al CMT. Para ello se utilizó el procedimiento descrito por Wilton et al.¹⁹

Análisis estadístico

En primera instancia se aplicó el test de Shapiro-Wilk a todas las variables numéricas planteadas en el estudio para conocer si siguen una distribución normal o, por el contrario, siguen otro tipo de distribución.

Se confirmó que, a excepción de la variable referente a la especie *Teladorsagia circumcincta*, las variables cuantitativas de este estudio no siguen una distribución normal. Por lo que aplicamos test no paramétricos.

Mediante el coeficiente de correlación de Spearman determinamos si existe o no correlación individual entre las distintas variables en los 16 animales del estudio.

Finalmente, se compararon grupos mediante una prueba de rangos con signo de Wilcoxon, procediendo de la siguiente manera: se agruparon los individuos mediante categorías binarias generadas a partir de las variables numéricas de interés. En el caso de las variables relativas a la TB, se clasificaron los animales en dos grupos en función de su volumen de lesiones, carga bacteriana o niveles de IFN- γ obtenidos en el IGRA (dos grupos N=8). En el caso de las variables referentes a los helmintos se dividieron los grupos en función del recuento parasitario (dos grupos N=8). En el caso de *Trichostrongylus* y *Haemonchus*, se agruparon en función de la presencia o ausencia del nematodo (grupos de N=5 y N=11, para ambos casos). Para este análisis, se contrastaron las medianas de ambos grupos mediante la prueba estadística en cuestión y se determinó si existe una diferencia significativa ($p < 0,05$).

Resultados

Las coprologías mostraron que los individuos preseleccionados presentan parasitación, pudiendo así pasar a la siguiente fase del estudio. De hecho, el estudio coprológico pone en evidencia que los individuos de la explotación estudiada están infestados por una gran diversidad de parásitos (datos no mostrados).

Una vez finalizada la identificación y cuantificación de los parásitos, se calculó el número total de nematodos adultos de cada cabra a partir de los volúmenes de cada muestra y el de las alícuotas procesadas. Los nematodos se clasificaron en cinco variables distintas en función de género y especie. Dichas variables son: población de *Teladorsagia circumcincta*, población conjunta de *Teladorsagia* y *Ostertagia* no identificados a nivel de especie, población total del género *Haemonchus* y, finalmente, población total del género *Trichostrongylus*.

Los resultados más destacables obtenidos mediante el estudio estadístico se mencionan a continuación:

Tabla 1. Valores del coeficiente de correlación de Spearman al comparar las variables.

	IGRA	Volum LNL	CFUs	Parásitos totales	<i>T. circumcincta</i>	<i>Teladorsagia</i> / <i>Ostertagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Haemonchus</i>
IGRA	1	0.4602	0.6202	-0.0662	-0.1059	-0.2841	0.0358	0.5436
Volum LNL		1	0.5266	0.3469	0.4012	-0.1122	-0.2439	0.5272
CFUs			1	0.0246	0.1044	-0.0584	0.0635	0.4965
Parásitos totales				1	0.8962	0.2563	-0.0501	-0.0787
<i>T. circumcincta</i>					1	0.1617	-0.2432	-0.0429
<i>Teladorsagia</i> / <i>Ostertagia</i>						1	-0.09	-0.3546
<i>Trichostrongylus</i>							1	-0.1913
<i>Haemonchus</i>								1

En color verde se indican todas las correlaciones significativamente estadísticas, en azul aquellas que el p-valor se acerca mucho al valor de significación y en naranja aquellas en que se aprecia cierta tendencia, aunque esté lejos de ser estadísticamente significativa.

Tabla 2. P-valores del análisis de suma de rangos con signo de Wilcoxon.

		Variables cuantitativas						
		IGRA	Volumen LNL	CFUs	Parásitos totales	<i>T. circumcincta</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Haemonchus</i>
Factores	IGRA				0.4581	0.3227	0.3275	0.0424
	Volumen LNL				0.0229	0.0074	0.0710	0.0424
	CFUs				0.2473	0.4392	0.4745	0.0424
	Parásitos totales	0.2209	0.2812	0.3920				
	<i>T. circumcincta</i>	0.1641	0.1585	0.3920				
	<i>Trichostrongylus</i>	0.4135	0.2132	0.2772				
	<i>Haemonchus</i>	0.0259	0.0558	0.0489				

Usando el mismo código de colores que en la tabla 1; en color verde se indican todas las correlaciones significativamente estadísticas, en azul aquellas en que el p-valor se acerca mucho al valor de significación y en naranja aquellas que se aprecia cierta tendencia, aunque esté lejos de ser estadísticamente significativa.

En la tabla 1 se muestran los valores del coeficiente de correlación de Spearman contrastando las distintas variables de interés.

En la tabla 2 figuran los p-valores a una cola de los resultados de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon obtenidos al comparar las medianas de las categorías binarias de cada factor.

Discusión

En la tabla 1 se aprecia que todas las variables referentes al grado de patología de la TB están correlacionadas positivamente entre ellas, en dos casos de manera significativa (IGRA y CFUs; $p = 0.6202$ y $p < 0.05$ / Volum LNL y CFUs; $p = 0.5266$ y $p < 0.05$) y en el caso de la correlación entre IGRA y el volumen de las lesiones de los NL con un valor cercano a la significación ($p = 0.4602$ y $p = 0.0729$), lo cual es coherente teniendo en cuenta que las tres variables actúan como un indicativo del mismo aspecto del estudio.

También se observa una correlación directa entre el grado de parasitación total y *T. circumcincta* ($p = 0.8962$ y $p < 0.05$). Debido a que este nematodo es el más abundante y prevalente en nuestra población, es de esperar que se observe dicha asociación, ya que influye en mayor medida sobre la variable de la parasitación total en comparación al resto de helmintos identificados.

No obstante, lo más remarcable de los resultados mostrados en la primera tabla es que *Haemonchus* muestra una clara tendencia positiva con la gravedad de la TB. Este hecho muestra una gran consistencia, puesto que se refleja en cada una de las variables correspondientes al grado de patología de la TB (comparado con IGRA; $p = 0.5436$ y $p < 0$ / comparado con volumen LNL; $p = 0.5272$ y $p < 0$ / comparado con CFUs; $p = 0.4965$ y $p = 0.0504$). Esto implica que, para un mayor grado de infestación por parte de este género de nematodos, mayor será el riesgo de que el individuo presente una TB agravada.

Este hecho se ve reafirmado en la tabla 2, donde se aprecia que hay diferencia en las medianas de las variables que atañen a la TB cuando comparamos el grupo de individuos que presentan *Haemonchus* frente al grupo de los que están libres del parásito.

Actualmente hay un reducido número de estudios publicados que se centran en la relación que existe entre la TB y los parásitos en pequeños rumiantes, y la mayoría parecen focalizarse en un grado de parasitación general o, por el contrario, en una sola especie parasítica, en vez de contrastar múltiples géneros y especies de simbioses.^{20,21,22}

El estudio más similar al nuestro del que tenemos conocimiento es el de Carrau et al., y hay algunas discrepancias generales con los resultados obtenidos, siendo la más relevante que, en el caso de Carrau et al., no detectan *Haemonchus* spp. en la población de cabras estudiadas. Hay otras características, como el tipo de explotación ganadera y la localización del rebaño, que también podrían influir en tales diferencias.²³ Sin duda, esto pone de manifiesto que más estudios centrados en esta línea de investigación deberían llevarse a cabo para poder dilucidar cuáles son los factores clave que correlacionan los distintos parásitos y la TB caprina.

Cabe destacar, que la mayor parte de la bibliografía relacionada con esta temática repite un notable patrón que podría conciliar nuestra hipótesis inicial con la aparente creencia generalizada de que la totalidad de los parásitos supone un factor de riesgo frente a la TB; se trata de la polarización de la respuesta inmunitaria al tipo Th2.^{21,22,24} Los parásitos suelen caracterizarse por inducir este tipo de respuesta inmunitaria, que da pie a una respuesta celular y humoral capaz de reducir la carga parasitaria o eliminarla al completo. Este sería el claro ejemplo del género *Haemonchus* en cabras, donde se podría apreciar una patología aguda debido tanto a una proliferación exacerbada del nematodo como a una pronunciada respuesta inmunitaria de tipo Th2.^{25,26}

Varios autores afirman que *Haemonchus* spp. es uno de los parásitos con mayor potencial patogénico para el ganado caprino y ovino, siendo *Haemonchus contortus* la especie más prevalente en pequeños rumiantes.²⁵ Si contrastamos las teorías planteadas al principio de este trabajo con la información disponible, concuerda que este nematodo sea el que presente una correlación directa con el grado de patología de la TB.

Si bien podría pensarse que la razón de esta correlación sea debido a un peor estado de salud general del animal causado por el parásito en cuestión, es importante mencionar que, aparentemente, ninguno de los animales seleccionados presentaba ninguno de los signos más frecuentes de una haemoncosis severa.^{25,27} Este hecho está respaldado por la opinión profesional de veterinarios que examinaron los individuos.

Por lo tanto, las evidencias respaldan las hipótesis preliminares; el tipo de respuesta inmunitaria que induce *Haemonchus* spp. causa un mayor grado de patología frente a la TB.

Por el contrario, cuando se trata de helmintos con un largo proceso de coevolución con el hospedador, el simbiote suele presentar mecanismos para desviar el sistema inmunitario y promover un estado de tolerancia que lleva a una situación de equilibrio entre ambas partes. Este patrón inmunitario se conoce como respuesta reguladora, referida en mucha bibliografía como respuesta de tipo “Treg”.^{5,28} Hipotéticamente, aquellos helmintos que habitualmente suelen ser asintomáticos podrían entrar dentro de esta categoría, poseyendo un gran potencial para reducir el grado de patología de la TB.^{1,29}

Varios estudios ya han correlacionado algunos helmintos gastrointestinales con el fenómeno de la polarización de la respuesta inmunitaria hacia un estado tolerogénico, caracterizado por una respuesta inmunitaria de tipo reguladora que conlleva una mejora de la salud del individuo frente a distintas enfermedades, entre ellas la TB.^{30,31,32}

Si bien podríamos haber esperado observar cierto grado de protección frente a la TB por parte de algunos parásitos detectados en nuestro estudio, como serían los casos de los géneros *Teladorsagia*, *Ostertagia* y *Trichostrongylus*,³³ hay que tener presente que sigue habiendo muchas variables desconocidas en este estudio que pueden interferir en los resultados obtenidos. Entre ellas, la elevada diversidad de parásitos descrita en las coprologías.

A nuestro parecer, los siguientes estudios focalizados en esta nueva línea de investigación deberían trabajar en un escenario donde los individuos presenten una menor diversidad parasitaria, con el objetivo de reducir posibles interacciones que puedan interferir sobre las variables estudiadas. También podrían valorarse otros elementos interferentes, tales como coinfecciones con otros patógenos o niveles de estrés de los animales.

Adicionalmente, sería interesante valorar ciertos aspectos que no se han contemplado en este estudio, como por ejemplo la variedad de cabra; estudiar fenotipos de animales con resistencia intrínseca a *Haemonchus* podría dar información adicional sobre cómo interfiere la respuesta inmunitaria frente a este parásito con la TB.²⁶

Conclusiones

- [1] El grupo de cabras con mayor grado de lesiones tuberculosas en los NL pulmonares, presenta una mayor carga total de parásitos en el abomaso y, en particular, de *Teladorsagia* spp. y *Haemonchus* spp., indicando una asociación entre la carga y/o presencia de estos parásitos y la patología de TB.
- [2] Existe una correlación directa entre la presencia de parásitos del género *Haemonchus* y el grado de progresión de la TB. A demás, el hecho de que los animales no mostraban signos característicos de hemoncosis, sugiere que el agravamiento de la TB es debido a una modulación de la respuesta inmunitaria promovida por dicho nematodo.
- [3] Se observó cierto nivel de correlación entre algunas variables relativas a la progresión de la TB y la abundancia de parásitos, aunque sin llegar a alcanzar un nivel de significación. Este es el caso *Trichostrongylus*, que presenta cierta correlación negativa con la variable del volumen de las lesiones de los NL. El estudio de una población más grande permitiría esclarecer si este nematodo ofrece cierto grado de protección frente a la TB.

Bibliografía

1. Bloomfield, S. F. *et al.* Time to abandon the hygiene hypothesis: New perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. *Perspect. Public Health* **136**, 213–224 (2016).
2. Chai, Q., Zhang, Y. & Liu, C. H. Mycobacterium tuberculosis: An Adaptable Pathogen Associated With Multiple Human Diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 1–15 (2018).
3. Leung, J. M., Graham, A. L. & Knowles, S. C. L. Parasite-microbiota interactions with the vertebrate gut: Synthesis through an ecological lens. *Front. Microbiol.* **9**, 1–20 (2018).
4. Rook, G. W. W. A Darwinian view of the hygiene or ‘old friends’ hypothesis. *Microbe* **7**, 172–180 (2012).
5. Reynolds, L. A. *et al.* Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract. *Gut Microbes* **5**, 522–532 (2014).
6. Giacomini, P., Croese, J., Krause, L., Loukas, A. & Cantacessi, C. Suppression of inflammation by helminths : a role for the gut microbiota ? (2015).
7. Varyani, F., Fleming, J. O. & Maizels, R. M. Helminths in the gastrointestinal tract as modulators of immunity and pathology. (2019). doi:10.1152/ajpgi.00024.2017
8. Pérez de Val, B. *et al.* Assessment of safety and interferon gamma responses of Mycobacterium bovis BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine* **34**, 881–886 (2016).
9. Serrano Aguilera, F. j. *Manual práctico de pasitologia veterinaria. Manual Practico de Parasitologia Veterinaria* **69**, (2010).
10. Hu, X. L. *et al.* Methods of preservation and flotation for the detection of nematode eggs and coccidian oocysts in faeces of the forest musk deer. *J. Helminthol.* **90**, 680–684 (2016).
11. Vadlejch, J. *et al.* Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitol. Res.* **109**, 1387–1394 (2011).
12. Melgar-Riol, M. J. *et al.* Aspectos técnicos y normativos para la eutanasia de los animales de experimentación. **83** (2017).
13. Vidal, E. *et al.* Field evaluation of the efficacy of Mycobacterium bovis BCG vaccine against tuberculosis in goats. *BMC Vet. Res.* **13**, 4–9 (2017).
14. Figueroa-Castillo, J. A. *et al.* Capítulo 4: Recuperación de Helminths a la necropsia. Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. 78–128 (2015).
15. Eysker, M. & Kooyman, F. N. J. Notes on necropsy and herbage processing techniques for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Vet. Parasitol.* **46**, 205–213 (1993).
16. Sepulveda, M. S. & Kinsella, J. M. Helminth collection and identification from wildlife. *J. Vis. Exp.* 1–5 (2013). doi:10.3791/51000
17. Arrieta-Villegas, C. *et al.* Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated Mycobacterium bovis in experimentally challenged goats. *PLoS One* **13**, 1–14 (2018).
18. Pérez De Val, B. *et al.* Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with Mycobacterium caprae. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 1872–1881 (2011).
19. Wilton, S. & Cousins, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *Genome Res.* **1**, 269–273 (1992).
20. Resende Co, T., Hirsch, C. S., Toossi, Z., Dietze, R. & Ribeiro-Rodrigues, R. Intestinal helminth co-

infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **147**, 45–52 (2007).

21. Ezenwa, V. O., Etienne, R. S., Luikart, G., Beja-Pereira, A. & Jolles, A. E. Hidden consequences of living in a wormy world: Nematode-induced immune suppression facilitates tuberculosis invasion in African buffalo. *Am. Nat.* **176**, 613–624 (2010).
22. Monin, L. *et al.* Helminth-induced arginase-1 exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis. *J. Clin. Invest.* **125**, 4699–4713 (2015).
23. Carrau, T. *et al.* Parasite prevalence in *Mycobacterium* spp. Infected dairy goats in the region of Murcia (south-east Spain). *OIE Rev. Sci. Tech.* **36**, 905–916 (2017).
24. Potian, J. A. *et al.* Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. *J. Exp. Med.* **208**, 1863–1874 (2011).
25. Alam, R. T. M., Hassanen, E. A. A. & El-Mandrawy, S. M. A. *Haemonchus Contortus* infection in Sheep and Goats: alterations in haematological, biochemical, immunological, trace element and oxidative stress markers. *J. Appl. Anim. Res.* **48**, 357–364 (2020).
26. Escribano, C. *et al.* Resistance to *Haemonchus contortus* in Corriedale sheep is associated to high parasite-specific IgA titer and a systemic Th2 immune response. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
27. Iliev, P. Life - threatening anemia in a goat as a manifestation of *Haemonchus* spp. infection - Case report. (2017).
28. Liu, Z., Liu, Q., Bleich, D., Salgame, P. & Gause, W. C. Regulation of type 1 diabetes, tuberculosis, and asthma by parasites. doi:10.1007/s00109-009-0546-0
29. Tilburg, E. Van & Arrieta, M. Hygiene Hypothesis in Asthma Development : Is Hygiene to Blame ? *Arch. Med. Res.* **48**, 717–726 (2017).
30. Tukvadze, N. *et al.* Development of the food supplement Nyaditum resae as a new tool to reduce the risk of tuberculosis development. *Int. J. mycobacteriology* **5 Suppl 1**, S101–S102 (2016).
31. Bradley, J. E. & Jackson, J. A. Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. *Parasite Immunol.* **26**, 429–441 (2004).
32. Daveson, A. J. *et al.* Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease - a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLoS One* **6**, (2011).
33. Chaney, A. Identification of Internal Parasites of Sheep and Goats. 1–29 (2012).

Anexos

Tabla resumen de los parásitos identificados

ID	Volumen muestra (mL)	Volumen alícuota (mL)	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	<i>Teladorsagia / Ostertagia</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.	No identificables	Total
1817	400	40	42	1	0	0	0	43
9337	350	32	18	2	2	0	0	22
40372	300	24	20	0	0	0	1	21
40989	300	64	24	2	1	0	1	28
40997	400	24	42	0	2	1	5	50
41150	300	32	46	1	0	0	2	49
41157	300	32	25	0	4	0	4	33
41169	300	24	35	4	0	0	3	42
41194	300	56	40	3	0	0	3	46
41208	300	24	18	1	0	0	4	23
58641	300	32	0	2	21	0	5	28
62042	300	32	15	0	0	7	5	27
62074	300	32	23	0	0	2	1	26
62076	300	24	26	3	0	3	0	32
62139	300	24	22	2	0	0	1	25
62141	300	64	14	0	0	1	4	19

Tabla resumen de los posibles parásitos a encontrar y su potencial de interés

Especie	Tipo de parásito	Localización	Prevalencia (%)	Potencial interés
<i>Camelostrongylus mentulatus</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Abomasum	1	1
<i>Marshallagia marshalli</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Abomasum	6	1
<i>Ostertagia leptospicularis</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	6	1
<i>Ostertagia lyrata</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	2	1
<i>Ostertagia occidentalis</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	1	1
<i>Ostertagia ostertagi</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	6	1
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	63 a 73	1
<i>Haemonchus contortus</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Abomasum	46	4
<i>Spiculopteria morph mathevossiani</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	4	-
<i>Spiculopteria morph spiculoptera</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	11	-
<i>Teladorsagia pinnata</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	9	-
<i>Teladorsagia trifurcata</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum	2 a 16	-
<i>Trichostrongylus axei</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Abomasum / Intestino delgado	8	1
<i>Oestrus ovis</i>	Arthropoda ; Diptera	Cavidad Nasal	10	4
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Trematode ; Plagiorchiida	Conductos biliares / Hígado	20	3
<i>Skrjabinema caprae</i>	Nematode ; Secernentea ; Oxyurida ; Oxyuridae	Intestino grueso	95	1
<i>Skrjabinema ovis</i>	Nematode ; Secernentea ; Oxyurida ; Oxyuridae	Intestino grueso	11	1
<i>Chabertia ovina</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino grueso	1 a 21	2
<i>Trichuris spp.</i>	Nematode ; Enoplia ; Enoplida ; Trichuridae	Intestino grueso	12	2
<i>Trichuris ovis</i>	Nematode ; Enoplia ; Enoplida ; Trichuridae	Intestino grueso / Al ciego	11	2
<i>Oesophagostomum venulosum</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Chabertiidae	Intestino grueso ; Intestino ciego y colon / Intestino delgado ; íleon	58	1
<i>Cooperia pectinata</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino delgado	3	2
<i>Strongyloides papillosus</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Strongyloididae	Intestino delgado	3	2

<i>Trichostrongylus capricola</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Intestino delgado	3 a 7	-
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Intestino delgado	16 a 34	-
<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida ; Trichostrongylidae	Intestino delgado	3 a 24	-
<i>Nematodirus abnormis</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino delgado ; Primeros 3-6 m	16	3
<i>Nematodirus filicollis</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino delgado ; Primeros 3-6 m	7 a 10	3
<i>Nematodirus lanceolatus</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino delgado ; Primeros 3-6 m	14	3
<i>Nematodirus sp.</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino delgado ; Primeros 3-6 m	7	3
<i>Nematodirus spathiger</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino delgado ; Primeros 3-6 m	7 a 10	3
<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Intestino delgado ; proximal	13	4
<i>Dictyocaulus filaria</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Pulmones	2	3
<i>Muellerius capillaris</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Pulmones	2	3
<i>Neostongylus linearis</i>	Nematode ; Rhabditida ; Strongylida	Pulmones	2	4

Tabla del recuento de unidades formadoras de colonias

ID	Recuento lesiones linfonódulos TB					Recuento lesiones linfonódulos MD					CFU totales/Lns	Fecha cultivo	Extracción colonias PCR			
	Peso Ln TB	-2	-3	-4	Total CFU Ln TB	Peso Ln MD	-2	-3	-4	Total CFU Ln MD			Fecha	Ln	Resultado	Spoligo
1817	6.6	13	1	0	1150	24.3	22	5	0	5000	6150	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
9337	1.7	0	0	0	0	10.6	3	0	0	300	300	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
40372	2.5	0	0	0	0	11.6	0	0	0	0	0	6/25/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
40989	3.2	9	0	0	900	19.5	40	11	0	11000	11900	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
40997	2.6	0	0	0	0	27.5	34	12	0	12000	12000	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
41150	7.4	0	0	0	0	10.4	0	0	0	0	0	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
41157	1.4	0	0	0	0	9.3	0	0	0	0	0	6/25/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
41169	5.2	0	0	0	0	14.4	2	0	0	200	200	6/25/2020	7/14/2020	TB	NEGATIVO	-
41194	7.7	7	3	0	3000	18	21	2	0	2050	5050	6/23/2020	7/14/2020	MD	POSITIVO	SB0416
41208	1.8	0	0	0	0	10.2	0	0	0	0	0	6/25/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
58641	3.5	0	0	0	0	9.6	0	0	0	0	0	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
62042	7.4	11	0	0	1100	36.7	57	5	0	10700	11800	6/23/2020	7/14/2020	MD	POSITIVO	SB0416
62074	12.2	59	2	0	3950	8.3	0	0	0	0	3950	6/23/2020	7/14/2020	TB	POSITIVO	SB0416
62076	40.7	24	3	0	5400	57.8	35	2	0	2750	8150	6/23/2020	7/14/2020	MD	POSITIVO	SB0416
62139	3.3	0	0	0	0	13.5	0	0	0	0	0	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-
62141	11.5	0	0	0	0	17.6	0	0	0	0	0	6/23/2020	7/14/2020	MD	NEGATIVO	-

Tablas de todas las variables utilizadas para el estudio:

ID	IGRA_cuantit	IGRA_cualitat	mm3_Ln_TB	mm3_Ln_MD	mm3_Totales	Tamaño_Ln	cm3_Totales	Lesión_Pulm	CFU_Totales	CFU_cualitat
62139	0.051	Leve	0	0	0	Pequeño	0	SLA	0	Pocas
41157	0.072	Leve	0	18.85	18.85	Pequeño	0.02	LCT	0	Pocas
58641	0.255	Fuerte	181.43	2.36	183.78	Pequeño	0.18	SLA	0	Pocas
41208	0.074	Leve	2.36	237.81	237.81	Pequeño	0.24	LCT	0	Pocas
40372	0.065	Leve	0	13878.51	13878.51	Grande	13.88	LCT	0	Pocas
41150	0.308	Fuerte	18620.22	3730.14	22350.36	Grande	22.35	LCT	0	Pocas
41169	0.225	Leve	5921.12	574.91	6496.03	Grande	6.5	LCT	200	Pocas
9337	0.063	Leve	0	3824.1	3824.1	Pequeño	3.82	SLA	300	Elevadas
41194	0.235	Fuerte	0	0	0	Pequeño	0	LCT	5050	Elevadas
1817	0.076	Leve	18441.15	43126.74	61567.89	Grande	61.57	LCT	6150	Elevadas
40989	3.254	Fuerte	0	2464.26	2464.26	Pequeño	2.46	LCT	11900	Elevadas
62141	0.086	Leve	0	0	0	Pequeño	0	LCT	0	Pocas
40997	0.316	Fuerte	0	18822.36	18822.36	Grande	18.82	LCT	12000	Elevadas
62074	0.518	Fuerte	29147.96	944.83	30092.8	Grande	30.09	LCT	3950	Elevadas
62076	0.284	Fuerte	215403.3	69586.28	284989.58	Grande	284.99	SLA	8150	Elevadas
62042	0.317	Fuerte	14940.77	83281.88	98222.65	Grande	98.22	LCT	11800	Elevadas

ID	N_paras_tot	G_Parasitación	N_T_circumci	GP_T_circumci	N_Telad_Oster	GP_Telad_Oster	N_Trichostron	GP_Trichostron	N_Haemonch	GP_Haemonch
62139	313	Alta	275	Alta	25	Alta	0	Absente	0	Absente
41157	309	Alta	234	Alta	0	Baja	38	Presente	0	Absente
58641	263	Baja	0	Baja	19	Alta	197	Presente	0	Absente
41208	288	Alta	225	Baja	13	Alta	0	Absente	0	Absente
40372	263	Baja	250	Alta	0	Baja	0	Absente	0	Absente
41150	459	Alta	431	Alta	9	Baja	0	Absente	0	Absente
41169	525	Alta	438	Alta	50	Alta	0	Absente	0	Absente
9337	241	Baja	197	Baja	22	Alta	22	Presente	0	Absente
41194	246	Baja	214	Baja	16	Alta	0	Absente	0	Absente
1817	430	Alta	420	Alta	10	Alta	0	Absente	0	Absente
40989	131	Baja	113	Baja	9	Baja	5	Presente	0	Absente
62141	89	Baja	66	Baja	0	Baja	0	Absente	5	Presente
40997	833	Alta	700	Alta	0	Baja	33	Presente	17	Presente
62074	244	Baja	216	Baja	0	Baja	0	Absente	19	Presente
62076	400	Alta	325	Alta	38	Alta	0	Absente	38	Presente
62042	253	Baja	141	Baja	0	Baja	0	Absente	66	Presente

Tabla del volumen de las lesiones de los nódulos linfáticos

ID	V Ln Traqueobronquial	V Ln Mediastínico (mm3)	V Total LCT (mm3)	Pulmones	Observaciones
1817	18441.15	43126.74	61567.89	LCT	LCT = Lesiones compatibles con Tuberculosis
9337	SLA	3824.1	3824.1	SLA	SLA = Sin Lesiones Aparentes
40372	SLA	13878.51	13878.51	LCT	LCT Ln ileocecal
40989	SLA	2464.26	2464.26	LCT	LCT bazo e hígado
40997	SLA	18822.36	18822.36	LCT	
41150	18620.22	3730.14	22350.36	LCT	LCT Ln Mesentérico
41157	SLA	18.85	18.85	LCT	
41169	5921.12	574.91	6496.03	LCT	Parásitos en pulmón
41194	SLA	SLA	0	LCT	
41208	2.36	237.81	237.81	LCT	
58641	181.43	2.36	183.78	SLA	LCT MD dudosa
62042	14940.77	83281.88	98222.65	LCT	LCT Ln Ms
62074	29147.96	944.83	30092.8	LCT	
62076	215403.3	69586.28	284989.58	SLA	LCT Ln Ms por histopatología. Lesiones linfonodos TB y MD compatibles con absceso bacteriano
62139	SLA	SLA	0.00	SLA	
62141	SLA	SLA	0.00	LCT	

Tabla de los resultados del IGRA:

ID	CUT-OFF						
	PBS	E/C	E/C-PCBS	0.05	0.1	0.2	0.5
41190	0.033	0.026	-0.007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41272	0.025	0.051	0.026	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40383	0.071	0.042	-0.029	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62093	0.082	0.086	0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41208	0.113	0.187	0.074	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41143	0.026	0.023	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41160	0.053	0.136	0.083	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
40970	0.023	0.03	0.007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9320	0.051	0.048	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41182	0.022	0.03	0.008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40978	0.018	0.056	0.038	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41140	0.079	0.243	0.164	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62055	0.059	0.15	0.091	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62072	0.021	0.122	0.101	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
41169	0.032	0.257	0.225	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
62059	0.022	0.012	-0.01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41057	0.095	0.111	0.016	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41137	0.033	0.085	0.052	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
48842	0.029	0.067	0.038	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62081	0.045	0.124	0.079	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62049	0.036	0.091	0.055	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41151	0.018	0.068	0.05	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41165	0.021	0.052	0.031	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62110	0.011	0.184	0.173	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
41198	0.145	0.04	-0.105	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41152	0.143	0.075	-0.068	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40395	0.284	0.141	-0.143	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40393	0.18	0.075	-0.105	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62133	0.107	0.065	-0.042	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40380	0.09	0.102	0.012	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41142	0.106	0.088	-0.018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41170	0.025	0.22	0.195	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
41162	0.058	0.068	0.01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62067	0.047	0.029	-0.018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62125	0.036	0.026	-0.01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41256	0.046	0.059	0.013	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48822	0.047	0.176	0.129	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
48837	0.11	0.071	-0.039	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40395	0.073	0.044	-0.029	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41062	0.037	0.045	0.008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41159	0.024	0.041	0.017	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62156	0.42	0.467	0.047	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48826	0.048	0.021	-0.027	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64794	0.036	0.023	-0.013	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41279	0.028	0.119	0.091	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62076	0.018	0.302	0.284	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

++++	6
+++	9
++	23
+	31
Sumatorio	69
Prevalencia	19.77

64796	0.013	0.027	0.014	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62042	0.075	0.392	0.317	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
62123	0.071	0.179	0.108	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62040	0.039	0.025	-0.014	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40361	0.011	3,886	3,875	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
48825	0.019	0.067	0.048	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41164	0.015	0.011	-0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40379	0.218	0.134	-0.084	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48816	0.041	0.01	-0.031	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41053	0.013	0.073	0.06	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62064	0.065	0.028	-0.037	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40975	0.138	0.067	-0.071	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41064	0.008	0.034	0.026	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62051	0.01	0.03	0.02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58624	0.046	0.087	0.041	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40984	0.056	0.073	0.017	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62058	0.024	0.151	0.127	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
58625	0.125	0.075	-0.05	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41153	0.087	0.068	-0.019	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62114	0.037	0.103	0.066	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41191	0.006	0.019	0.013	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40394	0.021	0.012	-0.009	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48813	0.009	0.023	0.014	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62099	0.008	0.022	0.014	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62085	0.012	0.01	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62061	0.024	0.062	0.038	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2189	0.014	0.039	0.025	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62044	0.049	0.022	-0.027	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48815	0.008	0.017	0.009	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58629	0.013	0.492	0.479	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
41150	0.009	0.317	0.308	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
62054	0.012	0.022	0.01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62052	0.008	0.007	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41063	0.006	0.006	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40959	0.011	0.252	0.241	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
62050	0.019	0.057	0.038	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41264	0.019	0.058	0.039	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62103	0.006	0.023	0.017	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62108	0.016	0.055	0.039	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41233	0.027	0.05	0.023	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40400	0.007	0.028	0.021	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41184	0.017	0.024	0.007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40962	0.02	0.015	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62113	0.038	0.026	-0.012	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62152	0.092	0.021	-0.071	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62078	0.064	0.035	-0.029	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62074	0.059	0.577	0.518	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
41203	0.045	0.024	-0.021	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41187	0.085	0.101	0.016	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41177	0.009	0.102	0.093	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

62131	0.044	0.128	0.084	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62046	0.046	0.028	-0.018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41138	0.034	0.054	0.02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62119	0.012	0.016	0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62097	0.013	0.167	0.154	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
2223	0.01	0.173	0.163	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
40972	0.146	0.075	-0.071	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6188	0.014	0.026	0.012	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62083	0.046	0.016	-0.03	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62134	0.017	0.014	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62139	0.029	0.08	0.051	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62116	0.07	0.036	-0.034	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58636	0.031	0.017	-0.014	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62065	0.014	0.126	0.112	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62118	0.055	0.05	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62041	0.015	0.047	0.032	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48849	0.012	0.039	0.027	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62079	0.017	0.013	-0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62145	0.098	0.071	-0.027	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41163	0.053	0.04	-0.013	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48801	0.147	0.112	-0.035	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11056	0.041	0.155	0.114	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62112	0.03	1,082	1,052	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
48819	0.014	0.077	0.063	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41244	0.019	0.055	0.036	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41213	0.018	0.052	0.034	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40387	0.219	0.062	-0.157	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41059	0.076	0.075	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48820	0.037	0.067	0.03	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41204	0.143	0.06	-0.083	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62057	0.073	0.096	0.023	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2228	0.106	0.048	-0.058	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62066	0.114	0.026	-0.088	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41193	0.038	0.06	0.022	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40388	0.053	0.072	0.019	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62140	0.032	0.215	0.183	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62071	0.022	0.032	0.01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40989	0.056	3.31	3,254	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
62077	0.03	0.022	-0.008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62151	0.042	0.085	0.043	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48940	0.05	0.055	0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58641	0.027	0.282	0.255	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
41194	0.105	0.34	0.235	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
64793	0.088	0.078	-0.01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62095	0.03	0.016	-0.014	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62142	0.074	0.059	-0.015	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62155	0.024	0.015	-0.009	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62104	0.067	0.084	0.017	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62101	0.025	0.213	0.188	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
41176	0.018	0.155	0.137	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

9337	0.045	0.108	0.063	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41235	0.085	0.125	0.04	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48836	0.022	0.014	-0.008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64792	0.017	0.055	0.038	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40377	0.015	0.063	0.048	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62056	0.045	0.03	-0.015	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58632	0.025	0.082	0.057	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41145	0.026	0.053	0.027	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62153	0.071	0.087	0.016	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62136	0.026	0.15	0.124	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62111	0.015	0.031	0.016	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62045	0.028	0.028	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41173	0.016	0.012	-0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9333	0.054	0.07	0.016	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48853	0.031	0.156	0.125	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62089	0.052	0.018	-0.034	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25466	0.076	0.075	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62098	0.035	0.048	0.013	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9311	0.034	0.014	-0.02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62029	0.018	0.02	0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62128	0.034	0.035	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62094	0.07	0.133	0.063	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62149	0.04	0.039	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62038	0.08	0.062	-0.018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62086	0.065	0.129	0.064	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62105	0.045	0.052	0.007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48843	0.087	0.071	-0.016	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62039	0.036	0.117	0.081	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62073	0.014	0.045	0.031	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40372	0.03	0.095	0.065	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
25528	0.022	0.036	0.014	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62069	0.021	0.057	0.036	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62132	0.067	0.092	0.025	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41054	0.031	0.029	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41202	0.056	0.643	0.587	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
26290	0.059	0.064	0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62115	0.034	0.065	0.031	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62143	0.046	0.052	0.006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41180	0.169	0.062	-0.107	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62084	0.018	0.013	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62082	0.027	0.012	-0.015	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40384	0.017	0.022	0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48850	0.07	0.186	0.116	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62130	0.026	0.062	0.036	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1817	0.04	0.116	0.076	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
6207	0.165	0.259	0.094	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62070	0.369	0.037	-0.332	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62126	0.014	0.015	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41060	0.013	0.017	0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41149	0.014	0.698	0.684	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

62135	0.061	0.05	-0.011	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62124	0.038	0.066	0.028	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62121	0.083	0.062	-0.021	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40375	0.061	0.062	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62148	0.157	0.229	0.072	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41251	0.032	0.182	0.15	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
41157	0.03	0.102	0.072	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62062	0.023	0.201	0.178	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62150	0.068	0.074	0.006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62048	0.11	0.059	-0.051	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49525	0.08	0.123	0.043	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6212	0.157	0.094	-0.063	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41051	0.134	0.076	-0.058	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62060	0.1	0.025	-0.075	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48844	0.044	0.197	0.153	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62120	0.032	0.053	0.021	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41247	0.058	0.087	0.029	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62138	0.038	0.04	0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62021	0.013	0.021	0.008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62043	0.075	0.079	0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2185	0.077	0.167	0.09	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
41250	0.072	0.212	0.14	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
47587	0.028	0.03	0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49555	0.042	0.08	0.038	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62091	0.112	0.071	-0.041	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40997	0.078	0.394	0.316	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
64797	0.033	0.069	0.036	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41243	0.144	0.07	-0.074	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40979	0.049	0.067	0.018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64	0.016	0.011	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48829	0.011	0.007	-0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48833	0.008	0.132	0.124	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
48817	0.008	0.035	0.027	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62146	0.009	0.004	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58635	0.017	0.028	0.011	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6166	0.012	0.029	0.017	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6167	0.013	0.011	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41141	0.007	0.008	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41055	0.005	0.056	0.051	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
40396	0.006	0.005	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41253	0.004	0.005	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41178	0.005	0.018	0.013	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41183	0.006	0.006	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
281	2,927	2.27	-0.657	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62080	0.012	0.035	0.023	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62106	0.007	0.006	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62090	0.006	0.017	0.011	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9331	0.004	0.006	0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62088	0.005	0.05	0.045	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40994	0.004	0.04	0.036	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

62107	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
282A	0.007	0.005	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
283A	0.011	0.009	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
284A	0.006	0.009	0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
285A	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
286A	0.004	0.004	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
287A	0.004	0.004	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
288A	0.005	0.003	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
289A	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
290A	0.006	0.006	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
280A	0.01	0.01	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
279A	0.008	0.007	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
278A	0.007	0.007	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
277A	0.004	0.004	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
276A	0.004	0.003	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
275A	0.004	0.005	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
274A	0.008	0.008	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
273A	0.006	0.007	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
272A	0.009	0.009	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
271A	0.007	0.009	0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
270A	0.005	0.009	0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
269A	0.005	0.007	0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
268A	0.004	0.007	0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
267A	0.005	0.007	0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
266A	0.014	0.011	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
265A	0.011	0.007	-0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
264A	0.012	0.006	-0.006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
263A	0.01	0.005	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
262A	0.012	0.104	0.092	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
261A	0.011	0.006	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
251A	0.014	0.008	-0.006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
252A	0.016	0.009	-0.007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
253A	0.011	0.009	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
254A	0.007	0.006	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
255A	0.006	0.005	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
256A	0.006	0.005	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
257A	0.012	0.012	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
258A	0.01	0.007	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
259A	0.006	0.005	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
260A	0.009	0.008	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
301A	0.01	0.008	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
302A	0.007	0.006	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
303A	0.007	0.007	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
304A	0.005	0.004	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
305A	0.006	0.005	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
306A	0.005	0.004	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
307A	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
308A	0.008	0.009	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
309A	0.011	0.011	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
310A	0.006	0.007	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

321A	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
322A	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
323A	0.005	0.004	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
324A	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
325A	0.007	0.007	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
326A	0.01	0.007	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
327A	0.011	0.008	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
328A	0.006	0.006	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
329A	0.005	0.004	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
330A	0.005	0.006	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
331A	0.004	0.005	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
332A	0.005	0.008	0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
333A	0.005	0.005	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
334A	0.008	0.008	0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
335A	0.01	0.011	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
336A	0.007	0.01	0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
337A	0.007	0.012	0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
338A	0.005	0.009	0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
339A	0.005	0.009	0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
340A	0.036	0.03	-0.006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
311A	0.057	0.037	-0.02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
312A	0.032	0.028	-0.004	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
313A	0.026	0.036	0.01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
314A	0.078	0.019	-0.059	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
315A	0.016	0.011	-0.005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
316A	0.038	0.023	-0.015	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48757	0.033	0.031	-0.002	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
317A	0.041	0.049	0.008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
318A	0.026	0.033	0.007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
319A	0.018	0.019	0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
320A	0.029	0.028	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40382	0.032	0.047	0.015	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6215	0.035	0.032	-0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
241A	0.022	0.039	0.017	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48939	0.025	0.04	0.015	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58642	0.062	0.043	-0.019	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58639	0.028	0.101	0.073	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62018	0.032	0.095	0.063	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
62127	0.045	0.034	-0.011	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62129	0.027	0.16	0.133	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
242A	0.031	0.049	0.018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
243A	0.026	0.029	0.003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41270	0.025	0.099	0.074	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
40374	0.065	0.09	0.025	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48824	0.023	0.056	0.033	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
64791	0.036	0.044	0.008	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
244A	0.032	0.039	0.007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58637	0.053	0.066	0.013	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58627	0.044	0.043	-0.001	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62022	0.054	0.089	0.035	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

245A	0.077	0.052	-0.025	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62141	0.021	0.107	0.086	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
40986	0.063	0.081	0.018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo