

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE *Giardia* spp. A PARTIR DE MUESTRAS COPROLÓGICAS

Kathia Tarqui Terrones ^{1,2,a}, Giovanna Ramírez Carranza ^{1,2,b}, María Beltrán Fabián ^{1,2,c}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar diferentes métodos de concentración para recuperar la mayor cantidad de quistes de *Giardia* spp. a partir de muestras coprológicas. Se analizaron 100 muestras procedentes de hospitales de referencia nacional y se aplicaron cuatro métodos parasitológicos: concentración por sedimentación espontánea en tubo (TSET), Faust, gradiente de sucrosa de una fase y gradiente de sucrosa de dos fases. Se encontró que el método de gradiente de sucrosa de dos fases alcanzó resultados significativamente mejores en concentración de quistes (121 903 quistes/ml) y cantidad de detritos (6%), en comparación con los métodos de Faust (35 355 quistes/ml), concentración por sedimentación espontánea en tubo (20,145 quistes/ml) y gradiente de sucrosa de una fase (18 702 quistes/ml). Se concluye que el método más eficaz para la concentración y purificación de quistes de *Giardia* spp. a partir de muestras coprológicas es el método de gradiente de sucrosa de dos fases, lo que facilitaría los cultivos *in vitro* de *Giardia* spp.

Palabras claves: *Giardia* spp.; Sacarosa; Gradiente de densidad; Sedimentación en tubo; Recuento de células (fuente: DeCS BIREME).

EVALUATION OF METHODS OF CONCENTRATION AND PURIFICATION OF *Giardia* spp. FROM COPROLOGICAL SAMPLES

ABSTRACT

The aim of this study was to compare different methods of concentration to recover the largest number of *Giardia* spp. cysts from coprological samples. One hundred (100) samples from national reference hospitals were analyzed and four parasitological methods were applied: spontaneous tube sedimentation concentration (TSET), Faust, single-phase sucrose gradient, and two-phase sucrose gradient. The two-phase sucrose gradient method was found to achieve significantly better results in cyst concentration (121,903 cysts/ml) and amount of debris (6%), compared to Faust methods (35,355 cysts/ml), spontaneous tube sedimentation concentration (20,145 cysts/ml), and single-phase sucrose gradient (18,702 cysts/ml). It is concluded that the most effective method for the concentration and purification of *Giardia* spp. cysts from coprological samples is the two-phase sucrose gradient method, which would facilitate *in vitro* culture of *Giardia* spp.

Keywords: *Giardia* spp.; Sucrose; Density gradient; Tube sedimentation; Cell count (fuente: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

En el mundo, la giardiasis es una de las principales infecciones gastrointestinales de impacto en salud pública ⁽¹⁾. En Asia, África y América Latina, alrededor de 200 millones de personas padecen esta enfermedad con aproximadamente 500 000 nuevos casos reportados cada año ⁽²⁾. En Perú, la prevalencia de giardiasis se encuentra alrededor de 15% a 18%, con cifras que varían

desde 17,8% en la costa, 15,4% en la sierra y 5% en la Selva ⁽³⁾.

Giardia spp. es un parásito protozoario flagelado de los seres humanos y otros mamíferos, habita en el intestino delgado del hospedero, su infección puede ocasionar malnutrición y retraso del crecimiento ⁽⁴⁾. Su transmisión se da por la ingesta de alimentos o agua contaminada con formas evolutivas del parásito. Presenta dos estadios

¹ Laboratorio de Referencia Nacional de Enteroparásitos, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú

² Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

^a Bióloga, MSc en Epidemiología; ^b bachiller en Microbiología y Parasitología; ^c bióloga
Recibido: 27/12/2018 Aprobado: 15/05/2019 En línea: 28/06/2019

evolutivos claramente diferenciados que se adaptan a distintas condiciones ambientales: el trofozoito, la forma vegetativa que es responsable de los síntomas de la enfermedad; y el quiste, la forma de resistencia que es responsable de la transmisión de huésped a huésped⁽⁵⁾ y principal forma diagnóstica del parásito. El quiste tiene forma oval con un tamaño promedio de 6-10 µm, pudiendo llegar a observarse de dos a cuatro núcleos⁽⁶⁾.

Los métodos coproparasitológicos de concentración son muy útiles para la detección de parásitos; sin embargo, para estudios de cultivo *in vitro* y ensayos de susceptibilidad antiparasitaria se necesita que los quistes puedan recuperarse en mayor cantidad, con el menor número de detritos y sin alteraciones morfológicas⁽⁷⁾. Los métodos de concentración descritos en la literatura se basan en gradientes de densidad o en soluciones con sacarosa^(8,9). Asimismo, se han reportado metodologías basadas en el uso de percoll (sílice coloidal recubierta con polivinilpirrolidona); sin embargo, la osmolaridad de los reactivos puede afectar negativamente la viabilidad del quiste^(10,11).

Este parásito puede llegar a cultivarse, por esta razón, la exquistación *in vitro* es una alternativa que abre horizontes para el desarrollo de pruebas de susceptibilidad antiparasitaria. Sin embargo, uno de los principales problemas es aislar los quistes presentes en las muestras coprológicas y separarlos de los detritos u organismos entéricos.

En el Perú, son escasos los trabajos asociados al cultivo de enteroparásitos, lo que motivó a buscar metodologías efectivas que permitan concentrar parásitos intestinales con poca contaminación, a fin de implementar cultivos axénicos y ensayos de susceptibilidad antiparasitaria. El objetivo del estudio fue comparar métodos de concentración que permitan recuperar la mayor cantidad de quistes de *Giardia* spp. de forma rápida y efectiva, a partir de muestras coprológicas y con menor cantidad de detritos.

EL ESTUDIO

DISEÑO Y MARCO MUESTRAL

Se realizó un estudio observacional descriptivo. Se trabajó con 100 muestras fecales humanas positivas a *Giardia* spp. procedentes de tres hospitales de referencia nacional de Lima (Hospital Arzobispo Loayza, Hospital Cayetano Heredia y Hospital Sergio Bernales), obtenidas por muestreo no probabilístico intencionado durante mayo de 2016 a diciembre de 2017. Se incluyeron muestras que sólo presenten el parásito *Giardia* spp. en una carga parasitaria promedio de cinco quistes por campo microscópico, sin contener ningún fijador parasitológico.

MUESTRAS ANALIZADAS

Se analizaron 100 muestras coprológicas que fueron transportadas en un *cooler* y conservadas a 4 °C por un

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio. En los últimos años se ha incrementado la resistencia a las drogas anti*giardiásicas*. Se ha realizado un estudio que compara diversos métodos de concentración de quistes de *Giardia* spp. a partir de muestras coprológicas.

Principales hallazgos. Los resultados indican que el método de gradiente de sacarosa de dos fases fue el más eficaz para la concentración de quistes, con poca cantidad de detritos, en comparación con los métodos de gradiente de sacarosa de una fase, Faust y de concentración por sedimentación espontánea en tubo.

Implicancias. Este estudio es la base para realizar investigaciones sobre resistencia antiparasitaria *in vitro*.

periodo máximo de 24 horas después de su obtención. Luego fueron confirmadas por microscopía en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteroparásitos, mediante examen parasitológico directo.

Los criterios empleados para evaluar los métodos de concentración fueron: mayor recuperación de quistes por mililitro, menor cantidad de detritos y no presentar cambios en la morfología del quiste.

MÉTODOS EVALUADOS

Las muestras coprológicas (aproximadamente 2 g) se homogenizaron con solución salina y se evaluaron para los siguientes métodos:

Técnica de concentración por sedimentación espontánea en tubo (TSET)

Este método se basa en el uso de agua u otros líquidos de baja densidad (en este caso, solución salina fisiológica), recuperando las formas microscópicas evolutivas de los parásitos en el sedimento que se forma en el fondo del tubo, donde se depositan por su densidad. En este método es posible detectar quistes y trofozoitos de protozoos⁽¹²⁾.

Método Faust

Este método se basa en la propiedad que tiene la solución de mayor densidad para hacer flotar elementos menos densos. Se usa una solución de sulfato de zinc, cuya densidad específica es 1,180 (33%) la cual es más alta que la de la mayoría de los quistes, los residuos se mantienen en el fondo del tubo. La concentración de parásitos por flotación permite verificar la existencia de quistes de protozoos incluso cuando están presentes en pequeñas cantidades; el sobrenadante recuperado se centrifugó a 2300 rpm y se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar el sulfato de zinc⁽¹³⁾.

Gradiente de sacarosa de una fase

Este método se basa en la separación de las partículas según su densidad de flotación⁽⁸⁾. Se añadieron 9 ml de

solución salina al sedimento y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. Luego se agregaron 4 ml de PBS (Phosphate-buffered saline) y 4 ml de solución de sucrosa (densidad 1,275) a través de las paredes. Se centrifugó a 2300 rpm durante 10 minutos. La fase de sucrosa-sedimento se aspiró con una pipeta de transferencia, luego se centrifugó y se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar la sucrosa.

Gradiente de sucrosa de dos fases

Este método también se basa en la separación de elementos según su densidad de flotación y se utilizan dos soluciones de diferentes densidades de azúcar^(14,15). El sedimento se mezcló volumen / volumen con solución de sucrosa 0,85 M, luego se centrifugó a 2300 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se recuperó la fase sucrosa-agua y se realizaron 3 lavados con agua destilada. Posteriormente, se preparó un tubo con gradiente de 0,85 M a 0,4 M y se agregó cuidadosamente el sedimento en la parte superior, se centrifugó a 2300 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recolectó la interfase. Luego se centrifugó a 2300 rpm a 4 °C durante 5 minutos para eliminar la sucrosa.

PROCEDIMIENTOS

La estimación de la carga parasitaria obtenida de cada método se realizó a través del recuento de quistes por mililitro, se empleó un volumen conocido de muestra (30 µl) y la fórmula que se utilizó fue la siguiente:

$$N^{\circ} \text{ de quistes de } Giardia \text{ spp (q/ml)} = \frac{(\text{Número de quistes contados}) \times 10^3}{\text{factor volumen} \times \text{factor de dilución}}$$

Factor volumen= volumen analizado de la muestra en microlitros (µl)

Asimismo, se evaluó si las soluciones empleadas en los métodos de concentración inducían alguna alteración en la morfología del parásito, cambios en la forma oval o redondeada del quiste de *Giardia* spp.; adicionalmente se evaluó la cantidad de detritos observados en las muestras (escasos, moderados o abundantes) luego de la aplicación de los métodos en la lectura microscópica.

ANÁLISIS DE DATOS

Se analizó el rendimiento de cada método, a través de la comparación de medias obtenidas en los recuentos de

quistes por mililitro (q/ml). Se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, a fin de determinar si existían diferencias significativas; asimismo, se realizó la comparación múltiple de medias con la prueba *post hoc* de HSD Tukey. En el caso de las variables cualitativas (morfología del quiste y cantidad de detritos) se expresaron como porcentajes. Se aceptó un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 23 para Windows.

HALLAZGOS

Se realizó la lectura de las 100 muestras según cada método estudiado; fue evaluado por triplicado mediante examen parasitológico directo. Las medias de recuento por muestra se detallan en el Anexo 1.

El método de concentración por sedimentación espontánea en tubo concentró, en promedio, 20 145 quistes/ml, pero tuvo la limitación de presentar demasiados detritos (Figura 1a). El método de Faust concentró, en promedio, 35 355 quistes/ml con escaso detritos (8%); sin embargo, el sulfato de zinc alteró la morfología de la pared quística de *Giardia* spp. en mayor proporción (Figura 1b).

Al evaluar los métodos basados en soluciones de sucrosa, encontramos que la solución con densidad 1,275 g/ml, correspondiente al método de gradiente de sucrosa de una fase concentró, en promedio, 18 702 quistes/ml y presentó 94% de muestras con moderado a abundante detrito (Figura 1c). El método de gradiente de sucrosa de dos fases logró concentrar, en promedio, 121 903 quistes/ml y presentó sólo 6% de detritos (Figura 1d). En relación a las alteraciones morfológicas de los quistes según microscopia, se observó que el método Faust presentó un mayor porcentaje de deformidad de la pared quística (93%), comparado con los otros métodos evaluados, sugiriendo su inviabilidad para cultivo (Tabla 1).

Según las pruebas de ANOVA y de Tukey existe diferencia significativa entre los métodos evaluados ($p < 0,01$), siendo el método de gradiente de sucrosa de dos fases el más eficaz en comparación a los otros métodos (Tabla 2, Figura 2).

Tabla 1. Evaluación entre cantidad de detrito y morfología de quistes en la muestras analizadas, según método evaluado

Métodos	Cantidad de detritos		Morfología del quiste	
	Escaso (%)	Moderado/Abundante (%)	Deformidad (%)	Normal (%)
TSET (n=100)	0	100	5	95
Faust (n=100)	92	8	93	7
Sucrosa de una fase (n=100)	6	94	6	94
Sucrosa de dos fases (n=100)	94	6	6	94

TSET: Técnica de concentración por sedimentación espontanea en tubo

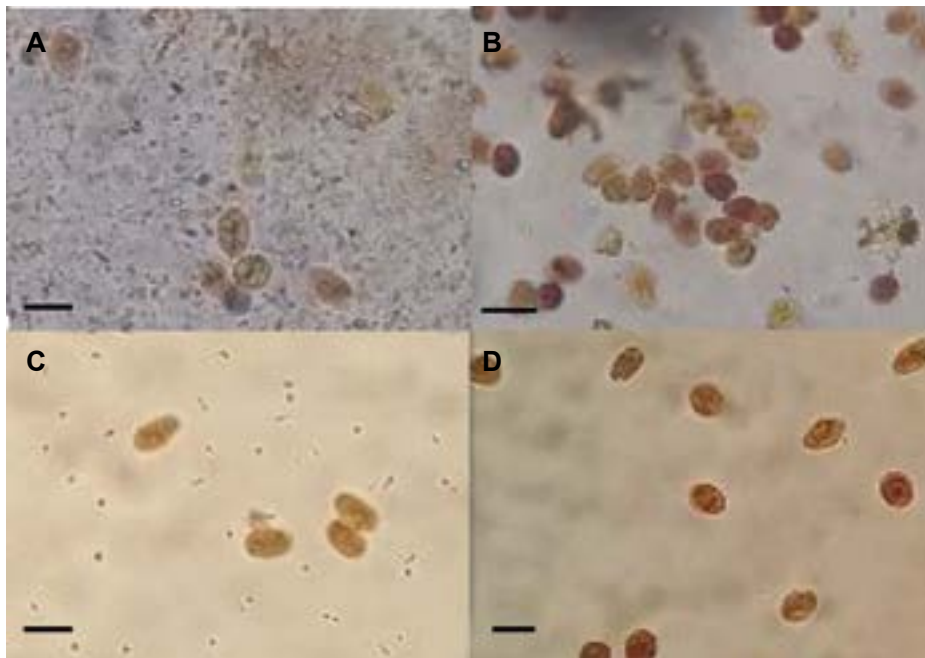


Figura 1. Visualización microscópica de quistes de *Giardia* spp. a 400X posterior a la aplicación de métodos de concentración. a) Los quistes después de la purificación con el Método Faust. b) Los quistes después de la purificación con sedimentación espontánea en tubo. c) Los quistes después de la purificación por el método de gradiente de sucrosa de una fase. d) Los quistes después de la purificación con una gradiente de sucrosa de dos fases. La barra indica 10 µm.

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que el método de concentración basado en gradiente de sucrosa de dos fases (0,4M y 0,8M) permite extraer una mayor cantidad de quistes de *Giardia* spp. a partir de muestras coprológicas, en comparación con los otros métodos evaluados ($p < 0,001$). La ventaja de este método es evidente y se refrenda con los reportes de Al-Tukhi *et al.* ⁽¹⁴⁾, Hautus *et al.* ⁽¹⁵⁾ y Visvesvara ⁽¹⁶⁾, quienes emplean este método para ensayos de cultivo *in vitro*, pero

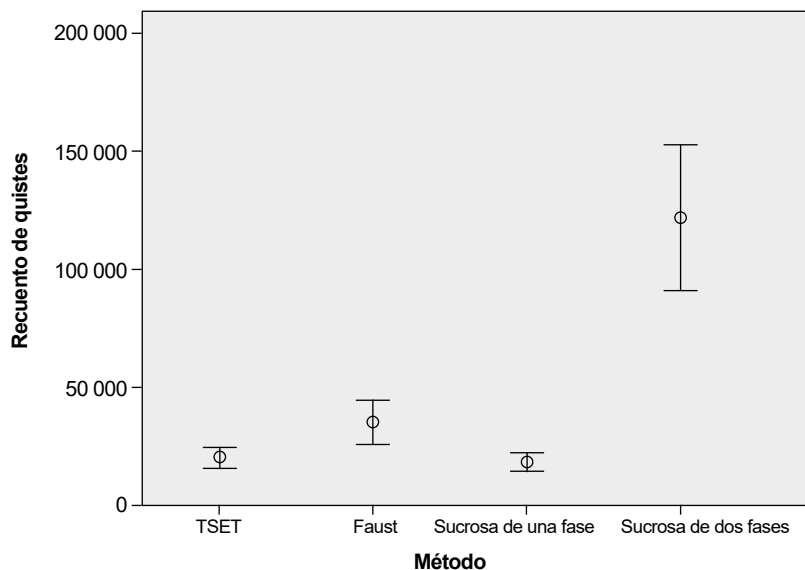
no especifican la carga parasitaria obtenida por muestra. Asimismo, cuando trabajamos con el método de sucrosa de una sola fase, contrariamente a lo reportado por otros autores ^(8,9), se observó que la recuperación de quistes era baja y la presencia de detritos era de moderada a elevada en el 94% de las muestras. Además, se mostró las limitaciones del método de concentración basado en sedimentación simple, tanto en recuperación de quistes, como en presencia de abundantes detritos, motivo por el que se recomienda sólo con fines diagnósticos ⁽¹²⁾.

Tabla 2. Comparaciones múltiples según métodos evaluados de acuerdo al recuento de quistes

Métodos	Recuento de <i>Giardia</i> spp. (quistes/ml)		Valor de p*	
	Media	DE		
TSET	Faust	35 354	4663	0,556
	Sucrosa de una fase	18 701	1795	0,999
	Sucrosa de dos fases	121 903	15 440	<0,001
Faust	TSET	20 145	2311	0,556
	Sucrosa de una fase	18 701	1795	0,477
	Sucrosa de dos fases	121 903	15 440	<0,001
Sucrosa de una fase	TSET	20 145	2311	0,999
	Faust	35 354	4663	0,477
	Sucrosa de dos fases	121 903	15 440	<0,001
Sucrosa de dos fases	TSET	20 145	2311	<0,001
	Faust	35 354	4663	<0,001
	Sucrosa de una fase	18 701	1795	<0,001

TSET: Técnica de concentración por sedimentación espontánea en tubo, DE: Desviación estándar

*Prueba de HSD Tukey



Barras de error: Intervalo de confianza de 95%
TSET: Técnica de concentración por sedimentación espontánea en tubo

Figura 2. Recuento promedio de quistes de *Giardia spp.* según método evaluado

En relación al uso de reactivos empleados para quistes libres de contaminantes, nuestros resultados fueron similares a los reportados por otros autores^(17,18), quienes indican que químicos como el sulfato de zinc afectan las propiedades físicas y biológicas de los quistes, esto fue corroborado al evaluar el método Faust, que ocasionó deformación de la pared quística en 93% de las muestras, lo que dificultaría los posteriores procesos de exquistación del parásito *in vitro*, situación que no ocurre al emplear cloruro de sodio o sucrosa, donde se reporta una ligera deformidad en 5% a 6% de las muestras, respectivamente. Otros autores recomiendan la remoción de contaminantes por filtración⁽¹⁹⁾; sin embargo, se considera un método no muy práctico. De igual manera Barazesh *et al.*⁽⁷⁾ y Duque *et al.*⁽²⁰⁾ usaron la solución de Percoll, para purificar quistes, no obstante, resulta ser un reactivo caro y causal de deformaciones de la pared quística.

Una de las limitaciones del estudio fue no determinar la viabilidad de los quistes recuperados por cada método, no permitiendo valorar la existencia de una relación significativa entre la alteración de la morfología del quiste y los patrones de exquistación de los mismos. Sin embargo, consideramos que los resultados de este estudio son importantes, ya que evidencian que es posible separar a

los quistes parasitarios de los detritos fecales sin necesidad de técnicas muy complejas.

Se concluye que el método más eficaz para la concentración y purificación de quistes de *Giardia spp.* a partir de muestras coprológicas es el método de gradiente de sucrosa de dos fases, siendo un método sencillo y barato que podría emplearse como paso previo a los ensayos de cultivo y susceptibilidad parasitaria *in vitro*.

Agradecimientos: Agradecemos a los laboratorios de parasitología de los hospitales nacionales por el apoyo en la realización del presente proyecto.

Contribuciones de los autores: KTT participó en la concepción, diseño del artículo, análisis e interpretación de resultados. GRC realizó los experimentos y la base de datos. MBF participó en la interpretación de los resultados. Todos participaron en la redacción del artículo y aprobaron la versión final.

Fuentes de financiamiento: La presente investigación fue financiada con recursos de Fondo Nacional de Ciencia y tecnología (FONDECYT), Convenio N° 136-2015.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la realización de este trabajo.

Material suplementario: Disponible en la versión electrónica de la RPMESP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vásquez O, Campos T. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Rev. del Centro de Inv. (Méx.). 2009;8(31):75-90.
- Thompson A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol. 2004;126:15-35. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.008.
- Martínez E, Cerpa L, Liu M. Prevalencia de giardiasis en guarderías infantiles de Tiabaya-Arequipa, Perú 2006. Neotrop Helminthol. 2011;5(2): 257-64.
- Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, Lopez SL, Black MM. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. Lancet. 2002; 359(9306):564-71. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07744-9.
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):447-75. doi: 10.1128/CMR.14.3.447-475.2001.
- Midlej V, Benchimol M. *Giardia lamblia* behavior during encystment:

- how morphological changes in shape occur. *Parasitol Int.* 2009; 58(1): 72-80. doi: 10.1016/j.parint.2008.11.002.
7. Barazesh A, Majidi J, Fallah E, Gholikhani R. Introducing a simple and economical method to purify Giardia lamblia cysts. *Afr J Biotechnol.* 2011;10(42): 8498-8501. doi: 10.5897/AJB11.391.
 8. Polverino D, Molina N, Minvielle M, Lozano E, Basualdo J. Técnicas de purificación y ruptura de quistes de Giardia spp. *Rev argent Microbiol.* 2006; 36(7):97-100.
 9. Molina N. Epidemiología molecular de Giardia lamblia en comunidades urbanas y rurales de Buenos Aires y Mendoza, Argentina [Tesis de Magister]. Buenos Aires: Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata; 2009.
 10. Sauch J. Purification of Giardia muris Cysts by Velocity Sedimentation. *Appl Environ Microbiol.* 1984;(48) 2:454-5.
 11. Sauch J. Improved primary isolation for Giardia cysts. New Orleans: 83rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology; 1983.
 12. Terashima A, Marcos L, Maco V, Canales M, Samalvides F, Tello R. Técnica de sedimentación en tubo de alta sensibilidad para el diagnóstico de parásitos intestinales. *Rev Gastroenterol Perú.* 2009;29 (4):305-310.
 13. Beltrán M, Otárola J, Tarqui K. Manual de Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Serie de normas técnicas N°37. 2da Edición. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2014. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/165_NT37.pdf
 14. Al-Tukhi MH, Al-Ahdal MN, Peters WA. simple method for excystation of Giardia lamblia cysts. *Ann Trop Med Parasitol.* 1991; 85(4), 427-31. doi: 10.1080/00034983.1991.11812587.
 15. Hautus MA, Kortbee LM, Vetter JC, Laarman JJ. In vitro excystation and subsequent axenic growth of Giardia lamblia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82: 858-861. doi: 10.1016/0035-9203(88)90019-3.
 16. Visvesvara G. Axenic growth of Giardia lamblia in Diamond's TPS-1 medium. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(2):213-215. doi: 10.1016/0035-9203(80)90249-7.
 17. Blagg W, Schlogel EL, Mansour N. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg.* 1955;4(1): 23-28. doi: 10.4269/ajtmh.1955.4.23.
 18. Walderich B, Mueller L, Bracha R, Knobloch J, Burchard G. A new method for isolation and differentiation of native Entamoeba histolytica and E. dispar cysts from fecal samples. *Parasitol Res.* 1997;83: 719-721. doi:10.1007/s004360050.
 19. Alvarado M., Wasserman M. Quick and efficient purification of Giardia intestinalis cysts from fecal samples *Parasitol Res.* 2006; 99: 300-2. doi: 10.1007/s00436-006-0143-x.
 20. Duque-Beltran S, Nicholas-Orejuela R, Arévalo-Jamaica A, Guerrero-Lozano R, Montenegro S, James M. Detection of Giardia duodenalis antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(8):1165-8. doi: 10.1590/S0074-02762002000800018.

Correspondencia: Kathia Mariela Tarqui Terrones.

Dirección: Jr. Capac Yupanqui 1400 Jesús María, Lima, Perú.

Teléfono: (+51) 997033653

Correo electrónico: kathiax@yahoo.com



**REVISTA PERUANA DE MEDICINA
EXPERIMENTAL Y SALUD PÚBLICA**

**¡Ahora puede subir su artículo,
a través de nuestro sistema
Open Journal System (OJS)!**

www.rpmesp.ins.gob.pe



**MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Salud**

Síguenos en:



MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexo 1. Recuento promedio (quistes/ mililitro) en las muestras analizadas de acuerdo a los cuatro métodos evaluados

Cod. muestra	TSET	FAUST	Sucrosa-Una Fase	Gradiente de Sucrosa	Cod. muestra	TSET	FAUST	Sucrosa-Una Fase	Gradiente de Sucrosa	Cod. muestra	TSET	FAUST	Sucrosa-Una Fase	Gradiente de Sucrosa	Cod. muestra	TSET	FAUST	Sucrosa-Una Fase	Gradiente de Sucrosa
M1	14133	29633	367	150400	M26	1333	1933	1533	74600	M51	23733	34533	24167	100000	M76	124067	28800	34867	310000
M2	200	400	300	89600	M27	10933	17867	13400	92200	M52	3933	10467	6533	31800	M77	45933	18200	14000	98000
M3	17033	27500	15433	172200	M28	14267	66100	31900	439200	M53	1200	3800	1600	118000	M78	104400	20133	29133	204000
M4	4267	22800	12933	129600	M29	3067	5800	3733	120800	M54	2500	11400	3467	115000	M79	33733	17200	21133	314000
M5	3833	14533	567	115600	M30	2933	4133	3200	280400	M55	18767	34100	27500	505000	M80	97133	27733	33600	159050
M6	767	1933	833	48600	M31	967	3267	1867	13500	M56	2600	3867	2833	1310000	M81	13600	7867	7067	60000
M7	17733	30433	20767	10600	M32	2933	5100	3400	123600	M57	2167	5267	2733	14750	M82	16800	7867	10400	96000
M8	23167	43933	27967	82200	M33	17500	74267	31733	110300	M58	20933	136733	67600	98800	M83	13600	4800	3867	17200
M9	7733	31767	16800	78000	M34	17067	38067	27867	142800	M59	32733	177467	71933	53600	M84	27767	9200	9733	101000
M10	3200	4633	3933	93800	M35	9200	67267	29833	75200	M60	21733	33133	26867	38800	M85	25267	6267	6533	86000
M11	500	633	467	81800	M36	94933	140267	96533	80600	M61	20767	36200	28267	27800	M86	7267	4400	4800	23000
M12	10933	29667	19067	34000	M37	14200	23400	16600	58400	M62	24733	33967	29200	162400	M87	4333	3467	3267	9000
M13	4600	12400	7533	69600	M38	3200	7500	3633	12000	M63	16800	36600	29200	58000	M88	4533	3400	3800	32000
M14	7533	54467	32867	38400	M39	2800	4200	3067	61800	M64	25167	88000	32733	58000	M89	65867	21600	8067	86000
M15	30833	82667	41200	100300	M40	26633	127467	34200	10900	M65	22400	54133	27933	42400	M90	24200	3267	3733	122000
M16	18200	76533	36967	112200	M41	10067	25733	15200	72200	M66	30133	234267	57800	230000	M91	71400	35867	36800	103000
M17	10267	16400	9533	133600	M42	29200	92400	33600	345200	M67	22867	57600	30200	123000	M92	10133	2800	4067	60400
M18	33067	66867	38267	101800	M43	34100	228400	70800	103600	M68	33400	160967	32533	450000	M93	49267	24067	32867	61000
M19	18400	26400	7867	30200	M44	13933	30867	23400	78400	M69	41133	132800	43400	61000	M94	4467	3200	3933	16000
M20	8267	23200	19400	90400	M45	23100	58600	27500	134300	M70	45133	32267	33267	196000	M95	7867	5067	6267	13000
M21	1200	8667	2133	121800	M46	17067	33467	27433	69100	M71	3467	2067	2600	6200	M96	19667	8133	9200	28000
M22	4267	5333	2867	255100	M47	15267	27733	20433	110600	M72	7267	3267	3867	58000	M97	5867	3467	3733	65000
M23	15600	26400	25067	254800	M48	2167	5267	3200	75000	M73	5867	3400	3800	46000	M98	11533	7500	9733	19000
M24	3067	13500	4100	112400	M49	16600	104200	28100	205000	M74	71600	21200	13400	28000	M99	48733	27333	32933	204000
M25	2133	3067	2267	301400	M50	20467	33233	24200	215000	M75	6067	2667	3133	35000	M100	5133	3367	4200	23000