



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN



FALLA DE CR.GEN

Clasificación Tentativa de Brucella por Taxonomía Numérica.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BICLOGA
P R E S E N T A
ALICIA LUNA VAZQUEZ

Director de Tesis:
DRA. AHIDE LOPEZ MERINO

Asesor:
Q. F. I. ANDREA BECERRIL OSNAYA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

RESUMEN

Hoja

I.	INTRODUCCION	1
II.	GENERALIDADES	3
II.1.	Agentes y Fuentes de Infección	3
II.2.	Microbiología del género <i>Brucella</i>	4
II.3.	Aislamiento y Cultivo	5
II.4.	Identificación de Cepas de <i>Brucella</i>	6
II.5.	Estudios de Sensibilidad	8
II.6.	Distribución Geográfica	9
II.7.	Marcadores Epidemiológicos	10
II.8.	Taxonomía Numérica	11
	II.8.1. Historia	11
	II.8.2. Principios de la Clasificación	12
II.9.	Taxonomía del Género <i>Brucella</i>	15
III.	OBJETIVOS	19
IV.	MATERIALES Y METODOS	20
IV.1.	Cepas	20
IV.2.	Pruebas	20
IV.3.	Valores de Similitud	23
V.	RESULTADOS	30
V.1.	Matriz de Similitud Agrupada	30
V.2.	Dendrograma	31
VI.	DISCUSION	35
VII.	CONCLUSIONES	40
VIII.	BIBLIOGRAFIA	41

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Hoja
Cuadro I.- Características Diferenciales de Miembros del Género <i>Brucella</i>	16
Cuadro II.- Espectro Lítico de Fagos para las Especies y Biovariedades de <i>Brucella</i>	17
Cuadro III.- Susceptibilidad In Vitro de <i>B. melitensis</i> a algunos antimicrobianos.	18
Cuadro IV.- Lista de Cepas de <i>B. melitensis</i>	25
Cuadro V.- Sustancias Químicas y Concentraciones.	28
Cuadro VI.- Lista de Antimicrobianos.	29
Fig.1.- Matriz de Similitud Agrupada.	33
Fig.2.- Dendrograma.	34
Fig.3.- Modelo de la Derivación Evolucionaria de <i>Brucella</i>	39

RESUMEN

Por medio de Taxonomía Numérica se determinaron las diferencias existentes entre miembros de una misma especie del género *Brucella*.

Se emplearon 110 cepas identificadas como *B. melitensis* biovariedad 1 pertenecientes al cepario del Laboratorio de Brucelosis del INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos) a las que se les realizaron 50 pruebas que incluían sensibilidad a sustancias químicas y antimicrobianos, tiempo de ureasa y lisis por fagos. Los resultados expresados como + o - fueron integrados a una Matriz de Similitud no Agrupada y se analizaron por medio del paquete de computación TAXON usando el Coeficiente de Similitud Simple-Matching obteniendo así los porcentajes de similitud (Sm) con los que se realizó una Matriz de Similitud Agrupada y un Dendrograma.

En la Matriz de Similitud Agrupada se determinaron cuatro clusters (agrupaciones de organismos con alto grado de similitud) observándose importantes asociaciones de la cepas, mientras que en el Dendrograma aunque se observan agrupaciones de cepas con determinadas características, solo se definieron dos clusters. El valor de corte al 84 % para determinar especie permitió conocer que todas las cepas, a excepción de cinco pertenecen a la especie *B. melitensis*.

El análisis de los clusters de ambas gráficas permitió afirmar que existen diferencias en esta especie, sin embargo es necesario un mayor número de pruebas para proponer una nueva metodología que contribuya a una buena clasificación.

Definir las diferencias que presentan las cepas de esta especie, permite situar a cada una de ellas por sus características particulares, observándose heterogeneidad a nivel de "biovariedad", mostrando de esta manera la gran importancia de la Taxonomía Numérica en la clasificación de estos microorganismos.

I. INTRODUCCION

Uno de los problemas importantes de salud en nuestro país, es sin duda la brucelosis, y los microorganismos causantes de esta enfermedad son los miembros del género *Brucella*, el cual está dividido a su vez en cinco especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* y *B. neotomae* (1).

Esta enfermedad afecta principalmente al ganado bovino, caprino, ovino y porcino, pero otros animales pueden ser infectados; existe cierta preferencia de las diferentes especies de *Brucella* por determinados huéspedes. La infección en el hombre se debe al contacto con animales infectados y sus productos o muestras contaminadas (24).

La brucelosis presenta un problema grave en el país, ya que existe poca difusión sobre la toma y procesamiento de las muestras, lo que trae dificultades para poder aislar adecuadamente al microorganismo, dando como resultado un diagnóstico erróneo o la pérdida del microorganismo en el tratamiento inadecuado de la muestra (27).

Dada esta situación, la información que se tiene de los casos de brucelosis en los diferentes estados de la República no es del todo completa y sobre todo es escasa con respecto a las especies y biovariedades características de cada región.

Estudios bacteriológicos han jugado un papel importante como marcadores epidemiológicos contribuyendo a ubicar tentativamente a las diferentes especies de *Brucella* (7,32).

Actualmente se tienen clasificadas a una gran parte de las cepas aisladas en México como *B. melitensis* biovariedad 1 y las determinaciones se han realizado por métodos estandarizados y de uso internacional. Sin embargo, diferentes estudios han reportado las posibles sub-clasificaciones de varios microorganismos basados en un mayor número de pruebas (53).

Al observar que las cepas de *Brucella* aisladas en el país provienen de diferentes zonas geográficas y fuentes, y en base a reportes sobre los diferentes comportamientos que pueden presentar las especies de este género, surgió el interés de poder definir de una manera más acertada la similitud entre éstas (27).

Resulta entonces conveniente para este fin, hacer uso de una herramienta tan importante como lo es la Taxonomía Numérica, la cual permite definir la similitud existente entre organismos basándose en un buen número de características (pruebas) contribuyendo a una mejor clasificación de ellos.

Este trabajo, por lo tanto, propone realizar un estudio sobre la clasificación (subclasificación) de cepas identificadas hasta este momento como *B. melitensis* biovariedad 1, que ofrezca mayor claridad sobre las diferencias existentes, no solo en especie, sino también en biovariedad.

II. GENERALIDADES

La brucelosis es una enfermedad de animales domésticos y silvestres que puede ser transmitida al hombre y es causada por microorganismos pertenecientes al género denominado *Brucella*, en honor a su descubridor David Bruce en 1887. Esta enfermedad es conocida con diferentes nombres tales como Fiebre de Malta, Fiebre del Mediterráneo, Fiebre recurrente, entre otros (32).

II.1. AGENTES Y FUENTES DE INFECCION

Se considera que el género *Brucella* consta de seis especies: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis* y *Brucella canis*. La brucelosis en el hombre es causada por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* o *B. canis*, pero la especie más importante por el número de casos y por la severidad de la enfermedad es *B. melitensis*. Las tres biovariedades de que consta esta especie no presentan diferencia en su patogenicidad hacia el hombre, y la infección puede ser relacionada directa o indirectamente con la exposición a cabras y ovejas infectadas y sus productos (1,23).

Con respecto a *B. abortus*, esta especie tiene siete biovariedades reconocidas y no existe evidencia de variaciones en su virulencia; la biovariedad 1 es la más frecuentemente involucrada en la enfermedad humana, seguida por las biovariedades 3 y 6 mientras las otras son mucho menos comunes. La fuente de infección más importante es el ganado vacuno; los cerdos no son una fuente significativa de infección por *B. abortus* y la importancia de los caballos y perros en la transmisión no es del todo clara. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el país, pero es menos patógena que *B. melitensis* (23,26).

Las infecciones por *B. suis* están más limitadas geográficamente y las biovariedades que existen para esta especie

son cinco. Las biovariedades 1 y 3 son las causantes de la infección en el humano derivada de cerdos y esta ocurre como resultado del contacto con animales infectados o materiales contaminados por sus descargas (26).

En el caso de *B. canis*, la infección se presenta con más frecuencia en áreas donde la enfermedad canina es prevalente y tiene baja virulencia para el hombre.

11.2. MICROBIOLOGIA DEL GENERO BRUCELLA.

Los microorganismos comprendidos en el género *Brucella* son cocos o cocobacilos Gram negativos de 0.6 a 1.5 μm . de largo por 0.5 a 0.8 μm . de ancho y su asociación puede ser en pares, cadenas o racimos cortos. Con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada se tifen de color rojo observándose la misma morfología (8,33).

La morfología colonial se observa de manera diferente dependiendo del tipo de cepa: lisa, rugosa o mucóide. Las cepas lisas (S) producen colonias circulares, con bordes regulares, transparentes y de color ambar o gris azulado a la luz, además son brillantes; son suaves y forman suspensiones fácilmente. Las cepas rugosas (R) producen colonias semejantes pero varían en color (blanco, amarillo o café), consistencia y textura; difícilmente se desprenden del agar y no forman suspensiones homogéneas, produciendo agregados granulares o filamentosos. Las cepas mucóides (M) son similares a éstas pero su textura es mucóide (25).

Además de estas características las brucelas no presentan en su estructura flagelos, endosporas y cápsulas (53).

Con respecto a sus propiedades bioquímicas no requiere obligatoriamente de carbohidratos como fuente de energía, su metabolismo es oxidativo y las cepas son aeróbicas aunque algunas requieren CO_2 para su crecimiento, especialmente en el primoaislamiento. La actividad de la catalasa es positiva pero la oxidasa es variable; la reducción de nitratos y la producción de

H₂S también varía mientras que el indol es negativo. La actividad ureásica puede ser diferente dependiendo de la especie y las pruebas de citratos, MR y VP son negativos (8,25,32). Como fuente de energía algunas especies utilizan eritritol (2,20).

II.3. AISLAMIENTO Y CULTIVO

La sangre es la muestra más comúnmente examinada para el aislamiento de *Brucella*, el cual es el diagnóstico más confiable de la enfermedad. El aislamiento tiende a ser difícil en algunos de los casos en que las concentraciones en sangre son bajas por su presencia intermitente y la propiedad de poder estar intracelularmente, así como por sus requerimientos nutricionales (23,27). Otra muestra empleada es la médula ósea y permite obtener mayor número de cultivos positivos (15).

El medio que se recomienda en los casos de hemocultivo es el medio bifásico de Ruiz-Castañeda y es aconsejable que la muestra se tome antes del tratamiento con antibióticos ya que puede interferir en el aislamiento; el hemocultivo es de mayor utilidad si se realiza en la fase aguda de la enfermedad. Para el primoaislamiento y por los requerimientos nutricionales de las brucelas se emplean medios tales como Agar Chocolate, Bordet-Gengou y Gelosa Sangre. El citrato es el anticoagulante más apropiado y es reemplazado por polianetol sulfonato en el medio de Ruiz-Castañeda teniendo de esta manera, capacidad de inactivar algunos antibióticos (1).

Los medios selectivos no son del todo necesarios para el cultivo de sangre, médula u otros tejidos, pero si viene contaminada (en el caso de que la muestra sea por ejemplo heces u orina) pueden ser empleados medios de este tipo como el de Farrell (1).

Debe tomarse en cuenta que para aumentar la posibilidad de tener cultivos positivos es necesario que se tomen muestras seriadas por varios días. Después de sembrar la muestra en medio de

Ruiz-Castañeda y observar el crecimiento, se debe resembrar en medios enriquecidos como Agar Brucella, Agar Eugoni, Agar Sangre y Agar Chocolate y la incubación es por varios días; como se trabaja por duplicado, entonces la incubación debe realizarse en aerobiosis y también en atmósfera parcial de CO₂. Los hemocultivos se descartan como negativos después de seis semanas (26). El crecimiento que se presenta es observado microscópicamente por tinción de Gram, además se realizan pruebas de aglutinación con sueros monoespecíficos y crecimiento en colorantes como tionina, fucsina básica y safranina sobre un medio base (24,25). Algunas de estas características se listan en el Cuadro 1.

Es importante señalar que además de los problemas arriba señalados para el aislamiento, otro problema que se presenta es la poca difusión de esta enfermedad y la manera de tomar y procesar una muestra; esto ha llevado a que el número de casos no sea bien establecido y menos aún el control de la enfermedad.

II.4. IDENTIFICACION DE CEPAS

Partiendo del aislamiento en medios enriquecidos, se procede a identificar especie y biovariedad en base a pruebas bioquímicas de la siguiente manera (33):

a) Requerimientos de CO₂.- La cepa se siembra por duplicado en tubos con medio inclinado de TSA (Agar Soya Trypticosa) o Agar Brucella y se incuba un tubo en CO₂ y otro en atmósfera normal, a 37° C por 48 horas.

Posteriormente sembrar un tubo con TSA con la cepa e incubar 37° C por 48 horas, para después resuspender en Caldo Soya Trypticosa estéril y obtener una suspensión de aproximadamente 10⁸ bacterias/ml (tubo No. 4 del nefelómetro de McFarland) (29). De esta suspensión se siembran los siguientes medios (13,25):

b) Medio de Kligler.- Para explorar la capacidad de fermentación de azúcares.

c) Medio de Urea de Christensen.- Producción de ureasa.

d) Medio de SIM.- Observar la inmovilidad de brucelas y la no producción de indol.

e) Tiras de acetato de plomo.- Observar la producción de H₂S.

f) Citrato de Simons.- Observar la no utilización de este sustrato como fuente de carbono.

g) Crecimiento en colorantes.- Esta prueba es de carácter diferencial entre las especies de *Brucella* y los colorantes empleados son cuando menos dos: tionina y fucsina básica, aunque también se emplea safranina, los cuales a diferentes concentraciones son preparados sobre un medio base. Se toma una asada de la suspensión y se hacen por lo menos cinco estrias sobre el medio con colorante. Siempre se emplean tres cepas de referencia, sobre todo cada vez que se prepare un lote de colorantes; esto nos dará seguridad sobre los resultados. En cada caja pueden ser sembradas cuatro cepas.

Incubar a 37°C con y sin CO₂ durante 4 a 5 días y observar si existe o no crecimiento. La prueba es positiva si el crecimiento aparece en 3 o más estrias, ya que si sólo aparece en la primera eso indicaría que en ese lugar estaba más cargado el inóculo, entonces la prueba es negativa (25).

h) Sueros monoespecíficos: se realiza la prueba de aglutinación con los sueros A y M proporcionados por centros de referencia internacional y en los casos en que se dude de la existencia de una cepa rugosa natural se emplea el suero R (25). Ver Cuadro I.

1) Bacteriófagos: en este caso la prueba está basada en la lisis que pueden llevar a cabo sobre cepas de *Brucella* y su utilidad radica en la diferenciación proporcionada entre *B. abortus* y *B. melitensis* que pueden llegar a confundirse, si solo se realizan algunas pruebas. Los fagos usados son el Tbilisi (Tb), Firenze (Fi), Weybridge (Wb), Berkeley (Bk) entre otros. También en

este caso deben usarse cepas de referencia (10,12,35). Ver Cuadro II.

II.5. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD

El número de estudios de susceptibilidad de *Brucella* sp. en la literatura es limitado, y la mayoría fueron pobremente estandarizados; aunque se ha estudiado la sensibilidad de este género a antimicrobianos, los reportes están relacionados a sus efectos *in vivo* y con fin terapéutico. Algunos estudios revelan que ciertas drogas tienen actividad contra *Brucella* *in vitro* pero no siempre tienen relación con su utilidad clínica (3).

La sensibilidad que presentan *in vitro* estas bacterias depende de varios factores como son la especie y biovariedad, la fase en que se encuentre, las condiciones de incubación, el medio que se emplee, la concentración y antibiótico a usar, etc. (29). Entre los antibióticos estudiados a usarse contra las brucelas se encuentran las tetraciclinas y sulfas, además de la rifampicina la cual tiene buena actividad *in vitro* y en combinación con doxiciclina, *in vivo*, promete ser una buena alternativa (4,28).

Algunos antibióticos y sus concentraciones usados en estudios *in vitro* para *B. melitensis* se presentan en el Cuadro III.

Por otra parte, la resistencia a sales inorgánicas ha sido determinada en microorganismos tales como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* principalmente y entre las sustancias reportadas se encuentran el Be, Mg, Al, Cr, Mn, Fe, As, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Sn, Ba, Cd, Hg, Pb, Acriflavina y Bromuro de etidio pero no se tiene conocimiento de que se haya estudiado la resistencia de los miembros del género *Brucella* a estas sustancias (17,18,19,46). Un estudio sólo ha revelado el efecto tóxico del azufre sobre ciertas cepas de este género a concentraciones tan bajas como 0.06 µg por ml. de medio (41).

II.6. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

La brucelosis tiene una distribución geográfica mundial muy diferente dependiendo de la especie y de la biovariedad de que se trate. La distribución en Norteamérica indica que en Canadá, *B. abortus* todavía persiste y *B. canis* no parece ser un problema. *B. melitensis* y *B. suis* ya no están presentes en el país (53).

En Estados Unidos, *B. abortus* biovariedad 1, 2 y 4, han disminuido su prevalencia en algunos estados, mientras que en otros persiste; *B. melitensis* fue erradicada de los animales contrariamente a la infección en perros por *B. canis* la cual es muy extensa. *B. suis* biovariedad 1 y 3 anteriormente fue prevalente pero actualmente la enfermedad por esta especie ha sido controlada (53).

Por otra parte, la variedad de ganadería existente en México ha contribuido enormemente al número de casos de brucelosis humana existente. La brucelosis bovina en 1987 tuvo una incidencia alta en los Estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, y la positividad fue en aumento comparada con la que se presentaba en 1981. De gran importancia por el número de casos humanos que genera, es la brucelosis caprina, ya que este tipo de ganado está ampliamente diseminado en el país y los Estados de mayor frecuencia son Chihuahua, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas y Michoacán (23,27).

Es importante señalar la forma oscilatoria que presentan las tasas promedio en los diferentes años, ya que de 1960 a 1978 se observaba descenso de los casos de esta enfermedad, pero a partir de 1979 la tendencia fue marcadamente ascendente, pues la tasa llegó a 7.8/100,000 hab. en 1987. Así también algunos Estados que anteriormente no ocupaban un lugar preponderante en los casos de brucelosis, se vieron situados en los primeros lugares, como es el caso de Sonora, Durango, Puebla, Sinaloa y Tamaulipas (26).

Un estudio por grupos de edad revela que la población más

afectada es la comprendida entre los 15 y 44 años, y en segundo lugar el grupo de 5 a 14 años (26).

II.7. MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS

La fuente de infección en casos de brucelosis en humanos, puede conocerse gracias a la identificación de la especie de *Brucella* aislada. Así, *B. abortus* indica origen bovino, *B. melitensis* caprino u ovino y *B. canis*, origen canino. En el caso de *B. suis*, es más complejo determinar su origen, por lo que es indispensable la identificación de biovariedades que además permitan conocer su posible distribución geográfica; por ejemplo, *B. suis* biovariedad 5 es encontrada en pequeños roedores en la URSS, *B. suis* biovariedad 4 se localiza en las regiones Árticas afectando a los renos, mientras que *B. suis* biovariedad 1 y 2 se encuentran en Norte y Sudamérica y en Europa, respectivamente (26).

La identificación de biovariedades también es usada para *B. abortus* y *B. melitensis* ya que su distribución puede variar entre diferentes localizaciones geográficas (51).

El predominio de pocas biovariedades y de solo una en algunas regiones impone limitaciones sobre el valor de la identificación de biovariedades para propósitos epidemiológicos. Debido a esto, se ha intentado extender la identificación de biovariedades en otros subtipos que tengan cierta preferencia geográfica (30).

Como ejemplo de esto, los patrones de resistencia a antibióticos ha sido usado en U.K. para sub-tipificar a *B. abortus* biovariedad 1 y todas las cepas fueron recuperadas de ganado vacuno durante la fase final del Esquema de Erradicación de Brucelosis y se identificaron contra un número de perfiles los cuales demostraron una preferencia geográfica particular (52).

El uso de resistotipos es, entonces, un método importante a seguir, pero también es necesario el desarrollo de nuevas técnicas que cumplan el papel de marcadores epidemiológicos logrando así

un mejor conocimiento del comportamiento del género *Brucella*.

II.8. TAXONOMIA NUMERICA

II.8.1. Historia.

La idea de cuantificar las relaciones entre las especies surgió en varios taxonomistas desde principios de siglo, pero ninguno de los métodos propuestos fueron adoptados debido a que no estaban diseñados para contemplar la importancia de los coeficientes, los métodos de agrupación ni la "construcción" de alguna clasificación; se empleaban los caracteres sin explicar el papel que tenían en la taxonomía.

La necesidad de usar algunos caracteres y el tedio del análisis de los resultados hacia impráctica a la Taxonomía Numérica, la cual ya era usada en la mitad del siglo XVIII por el botánico francés Francois Adanson de donde se le conocía como Clasificación Adansoniana (5).

Sneath y Sokal definieron a la Taxonomía Numérica en 1973 como "la agrupación por métodos numéricos de unidades taxonómicas dentro de un taxa sobre las bases de sus características" y su auge se debió principalmente al advenimiento de las computadoras y a las controversias sobre las nuevas técnicas con fines de clasificación (45).

Este interés dió origen a la Taxonomía Numérica moderna en sitios diferentes -en Inglaterra y Estados Unidos- de manera independiente. P. Sneath, por ejemplo, trabajó con el género *Chromobacterium* y mostraba desacuerdo con la situación taxonómica para este microorganismo por lo que usando tablas de datos binarios para diferentes cepas y especies, observó la necesidad de Coeficientes de Similitud redescubriendo así el coeficiente de Jaccard. Fue el primer biólogo que usó la computadora para propósitos taxonómicos (43).

Por otra parte, Sokal trabajo con un grupo encabezado por Michener, uno de los principales entomólogos, teniendo como objetivos crear un método para cuantificar relaciones taxonómicas y establecer clasificaciones más valiosas que los métodos tradicionales. Los problemas de codificación y peso de los caracteres fueron considerados por estos investigadores (31).

Otro grupo comprendido por Cain y Harrison esclareció los principios taxonómicos: la relación entre los coeficientes y la importancia de las agrupaciones fue estudiado por Rogers y Tanimoto (31,39).

II.8.2.Principios de la Clasificación.

Clasificación Natural.

Los taxonomistas han aceptado que la clasificación debe ser natural más que artificial y que el termino "natural" en algún sentido implica una verdadera reflexión del orden de los organismos en la naturaleza (14).

Número y tipo de caracteres.

Un problema al que se enfrentaron los taxonomistas numéricos fue el determinar el peso de los caracteres (pruebas). Se consideraba que los caracteres pesaban por si mismos en terminos de número de estados diferenciables que pudieran ser tomados en cuenta para un estudio, y que el peso estaba en proporción a su contenido de información, pero se ha establecido que cada prueba tiene el mismo peso, ya que se demostró que un peso 1000 veces más para 16 de 135 caracteres tiene un efecto insignificante en un estudio de 17 organismos (14).

El número de caracteres a probar no esta definido y aunque se trabajan entre 40 y 100 pruebas, un número mayor (150-200) permite

mostrar una fracción razonable de información genética (7).

Algunas de las pruebas que se usan son los anticuerpos monoclonales, sondas de DNA, análisis electroforético y zimogramas. Sin embargo, las pruebas de mayor uso son las pruebas bioquímicas y los patrones de resistencia (34,53).

Medidas de Similitud.

La noción de semejanza entre dos organismos es la base de los métodos de Taxonomía Numérica y por ello los taxonomistas consideraron la necesidad de desarrollar medidas de semejanza satisfactorias creando así los Coeficientes de Similitud y Disimilitud. Entre los Coeficientes de Similitud se encuentran el Coeficiente de Jaccard usado por Sneath y el Coeficiente Simple-Matching propuesto por Sokal y Michener; estos coeficientes son los de mayor uso en la taxonomía (5,42).

Otros coeficientes son el de Dice, Czakanowsky, Sorensen, Zulczinsky, Kussel, Rao y Roger (5,6).

Expresión de Resultados.

Los resultados pueden ser expresados como (+) o (-), o como (0) o (1) de acuerdo con la ausencia o presencia de un atributo.

Con los organismos u OTU's (Unidades Taxonómicas Operacionales) a clasificar, los caracteres se forma una Matriz de Similitud no Agrupada incluyendo los resultados como arriba se indica. A esta matriz también se le ha llamado Tabla de Contingencias (7).

Estos resultados son analizados por algún coeficiente obteniendo valores de similitud (en porcentajes) entre OTU's. Los valores de similitud se emplean para la realización de Matrices de Similitud Agrupada y Dendrogramas (6).

La Matriz de Similitud Agrupada presenta en ambos ejes todos

los OTU's usados con el mismo orden y sus valores de similitud están comprendidos dentro de rangos que establezca el investigador. Tsukamura definió rangos para *Mycobacterium* (47,50) y para *Nocardia* (48) los cuales eran pequeños (100-96, 95-91, 90-86, 85-81, <80 %) o más grandes (100-91, 90-81, <80%).

En el caso del Dendrograma, éste se realiza empleando una escala de intervalos cortos en el cual se grafican los porcentajes de similitud que presenta cada par de cepas y relacionandolas con otros pares hasta formar grupos compactos. En la construcción de Dendrogramas se usa: a) una misma escala de similitud o b) diferente escala de similitud, para dar origen a los diferentes tipos de ellos (14).

La interpretación de un Dendrograma debe hacerse de manera vertical tomando en cuenta siempre la distancia Euclidiana y no el orden en que se hayan colocado los OTU's (14).

Por otra parte, la realización de ambas figuras (Matriz de Similitud Agrupada y Dendrograma) es indispensable para el análisis por Taxonomía Numérica ya que tiene como fin simplificar la información reemplazando la proximidad entre pares de OTU's por la proximidad entre grupos de OTU's creando de esta manera "clusters" (agrupaciones de OTU's con alto grado de similitud) (5).

En resumen, el análisis taxonómico incluye los siguientes pasos: a) comparar varias configuraciones de OTU's, b) realizar Matrices de Similitud, c) comparar grupos de OTU's y d) definir "cluster's" jerárquicos en forma de Dendrogramas.

Es necesario señalar que el uso de la Taxonomía Numérica como método para fines de clasificación presenta varios inconvenientes entre los que destaca su uso restringido: en este sentido ésta Taxonomía está destinada a trabajos de investigación de mayor peso que involucren un número de pruebas y organismos considerables y no a trabajos de laboratorio de rutina. Es importante considerar también que su aplicación conlleva un presupuesto elevado, además del poco acceso a los paquetes computacionales y el tedioso

análisis de los resultados. Este análisis requiere de personal capacitado.

II.9. TAXONOMIA DEL GENERO BRUCELLA.

La evolución de los principios taxonómicos del género *Brucella* intenta plantear una clasificación adecuada, ya que desde su descubrimiento el género fue denominado *Micrococcus* y posteriormente *Bacterium*, y no es sino hasta 1920 que proponen la creación del género *Brucella* (32).

De la misma manera, para poder definir las especies de este género tuvieron que pasar muchos años antes de que el Subcomité de Taxonomía de *Brucella* presentara solo seis especies con sus respectivas biovariedades.

Actualmente el sistema de identificación de las especies y biovariedades se basa en cierto número de pruebas en las que destacan la lisis por fagos y el metabolismo oxidativo así como la aglutinación con sueros monoespecíficos y crecimiento en colorantes sobre un medio base, pero son raros los estudios que se refieren a una investigación sistemática de este género y a la consideración del uso de la taxonomía como herramienta epidemiológica (8,13,51).

Debido a los escasos estudios de Taxonomía Numérica para el género *Brucella*, se hace más difícil desarrollar este tipo de métodos, sin embargo, existen trabajos realizados en Francia en los cuales se hace énfasis de su uso por la cantidad de información que se puede obtener y de la importancia que tiene una clasificación correcta (5,7).

CUADRO 1

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE MIEMBROS DEL GENERO BRUCELLA

ESPECIE	BIDVAR.	REQ. CO ₂	PROD. H ₂ S	UREASA	1			2			
					TIONINA A	FUCSINA B	SAFRANINA C	A	M	R	
<i>B. mellitensis</i>	1	-	-	var	+	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	var	+	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	var	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	±	+	1-2 h	-	-	+	+	+	-	-
	2	+	+	1-2 h	-	-	-	±	+	-	-
	3	±	+	1-2 h	-	-	+	+	+	-	-
	4	±	+	1-2 h	-	-	+	+	+	-	-
	5	-	-	1-2 h	-	+	+	+	+	-	-
	6	-	±	1-2 h	-	+	+	+	+	-	-
	7	-	±	1-2 h	-	+	+	+	+	+	-
9	±	+	1-2 h	-	+	+	+	+	-	-	
<i>B. suis</i>	1	-	+	0-30 m	+	+	-	-	+	-	-
	2	-	-	0-30 m	-	+	-	-	+	-	-
	3	-	-	0-30 m	+	+	+	-	+	-	-
	4	-	-	0-30 m	+	+	+	-	+	+	-
<i>B. canis</i>		-	-	0-30 m	+	+	-	+	-	+	
<i>B. neotomae</i>		-	+	0-30 m	-	-	-	-	+	-	
<i>B. ovis</i>		+	-	neg	+	+	+	-	-	+	

1. Desarrollo en colorantes sobre un medio base. (A:1/50000, B:1/25000, C:1/5000).

2. Aglutinacion con sueros monoespecificos. (A:suero monoespecifico abortus, B:suero monoespecifico mellitensis, C:suero para antigeno rugosa).

minutos, h:horas, var:variable, neg:negativa.

+positiva, -negativa, ±variable.

Fuente:9,26.

CUADRO II

ESPECTRO LITICO DE FAGOS PARA ESPECIES Y BIOVARIIDADES DE *BRUCELLA*

Nombre	Biovar.	Fase	Lisis con fagos a RTD				
			Tb	Fi	Wb	Bk2	Iz
<i>B. abortus</i>	1-6	S	+	+	+	+	+
	9	R	-	-	-	-	-
<i>B. melitensis</i>	1	S	-	-	(-)	(+)	+ 0 ±
	2	S	-	-	(-)	(+)	+ 0 ±
	3	S	-	-	(-)	(+)	+ 0 ±
<i>B. suis</i>		R	-	-	-	-	(+)
	1	S	-	-	+	+	+ 0 ±
	2	S	-	-	+	+	+ ±
	3	S	-	-	+	+	+ ±
	4	S	-	+	+	+	+ ±
<i>B. neotomae</i>		R	-	-	-	-	+
		S	±	+	+	+	+
<i>B. ovis</i>		R	-	-	-	-	-
<i>B. canis</i>		R	-	-	-	-	-

Tb: Tbilisi, Fi: Firenze, Wb: Weybridge, Bk2: Berkeley, Iz: Izainagar, R: Rugosa, S: Liss.
 ±: lisis completa, ±: lisis parcial, -: no lisis, (-): algunas cepas no lisadas, (+): algunas cepas lisadas.
 RTD: Routine Test Dilution.

Fuente: 53.

CUADRO III

SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE *BRUCELLA MELITENSIS* A ALGUNOS
ANTIMICROBIANOS

ANTIBIOTICO	RANGO MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Ceftizoxime	0.5 - 1
Ceftriaxone	0.25 - 1
Cefotaxime	0.5 - 2
Moxalactam	4 - 16
Cefoperazone	4 - 64
Ceftazidime	16 - 32
Cefuroxime	8 - 64
N-F-thienamycina	0.1 - 2
Tetraciclina	0.1 - 0.5 0.001 - 0.6
Rifampina	0.06 - 1 0.018 - 10 0.02 - 2.5
Cefoxitim	8 - 128
Co-trimoxazole	0.39 - 6.25 5 - 25
Ofloxacin	0.02 - 0.3
Difloxacin	0.06 - 1.25
Ciprofloxacim	1.25 - 2.5
Estreptomycina	0.15 - 5
Doxiciclina	0.06 - 0.25

Fuente: 3,4,16,21,30,37,52.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Clasificar cepas que se tienen identificadas como *Brucella melitensis* biovariedad 1 haciendo uso de la Taxonomía Numérica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el comportamiento general de cepas de *Brucella melitensis* al efectuar pruebas de sensibilidad a sustancias químicas y antimicrobianos, así como pruebas con sustratos y fagos.

Analizar los resultados obtenidos por Taxonomía Numérica y proponer una nueva clasificación de las cepas.

Concluir sobre la importancia de esta clasificación y su uso en el género *Brucella*.

IV. MATERIAL Y METODOS

IV.1. CEPAS

Un total de 110 cepas de *Brucella melitensis* biovariedad 1 en fase lisa fueron empleadas en este estudio, y todas pertenecen al cepario del laboratorio de Brucelosis del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE). Las cepas y sus fuentes son listadas en el Cuadro IV.

Las cepas control usadas fueron: M16 (*Brucella melitensis* biovariedad 1), 544 (*Brucella abortus* biovariedad 1), 1330 (*Brucella suis* biovariedad 1), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli*: ATCC 25922.

Todas las cepas fueron mantenidas en Medio Mínimo para Antibiótico No. 3 (17.5 g/lit) adicionado con Cloruro de Sodio (1.5 g/lit), Dextrosa (9 g/lit), Polipeptona (5 g/lit) y Agar Bacteriológico (2%).

IV.2. PRUEBAS

Las pruebas se realizaron por duplicado y el inóculo usado en las pruebas de sensibilidad fue preparado sembrando cada cepa en Isosensitest Broth (Difco Ltd 23.4 g/lit) adicionándole Agar Noble 2% (Difco). Se dejaron incubar por 30 hrs a 37°C y se hicieron suspensiones con Caldo Biotriptasa 26 g/lit (Bioxon) pH=6 ajustando la turbidez con el tubo No. 1 del Nefelometro de McFarland. Después de ajustadas las suspensiones, se diluyeron 1:20 con el mismo caldo. Las cepas control *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se dejaron incubar 24 hrs. en lugar de 30 hrs. a diferencia de las otras, por su crecimiento rápido (2%).

a) Sensibilidad a Sustancias Químicas.-

La sensibilidad a diferentes sustancias fue determinada en el medio Isosensitest Broth y Agar Noble con un pH final de 7.4. El medio fue esterilizado por autoclave a 121°C por 15 minutos en tubos que contenían 18 ml. de este; se dejó enfriar y cuando se encontraba aproximadamente a 30°C, se agregó 2 ml. de cada solución esterilizada por filtración, de esta manera la sustancia quedó diluida 1:10. Se agitaron para mezclarse bien y se vaciaron a cajas petri desechables. Las sustancias (Sigma y Baker) y concentraciones empleadas que se determinaron por ensayos consecutivos así como las condiciones de solubilidad para algunas de ellas se listan en el Cuadro V.

Las cajas se pusieron a prueba de esterilidad y es necesario señalar que no deben usarse después de 24 hr. de haberse preparado.

Estas placas fueron inoculadas con las cepas ajustadas y diluidas 1:20 por medio de un replicador de Steers; las lecturas fueron realizadas después de 72 hrs. de incubación a 37°C en atmósfera normal.

b) Sensibilidad a Antibióticos.-

Los antibióticos (Sigma) y concentraciones usadas así como los solventes y diluyentes se enlistan en el Cuadro VI (11). El procedimiento fue el mismo que se llevo a cabo con las sustancias químicas. Las concentraciones que se emplearon son las comunmente utilizadas en los sensibiliscos para cada antibiótico, pero como en este caso se trabajó con soluciones, se tuvo que hacer uso de la siguiente fórmula, tomando en cuenta siempre la potencia del producto (22.40):

$$\text{mg Antibiótico} = \frac{\text{vol (ml) deseado} \times \text{conc. (ug/ml) deseada}}{\text{potencia (ug/mg) que marca el productor}}$$

Las lecturas se realizaron después de incubación por 72 hrs.

a 37°C.

Tanto los antibióticos como las sustancias químicas fueron protegidos de la luz y cada semana eran nuevamente preparadas las soluciones; los resultados se reportaron como + o - por la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

c) Lisotipia.-

El medio que se utilizó para esta prueba fué el de Agar Brucella (Bioxon, 43 g/lit), con Dextrosa 2 % (Bioxon) y Glicerol (Sigma) teniendo un pH = 6.7. Las suspensiones que se emplearon fueron las ajustadas con el tubo No. 1 del Nefelómetro pero sin diluir (1).

Con hisopos estériles se tomaron cada una de las suspensiones bacterianas y se sembraron en placas de agar bien secas; se colocó una cepa diferente en cada placa y además se marcó el número de cepa y la posición de las gotas.

Con jeringas de insulina se depositaron en las placas dos gotas de cada uno de los siguientes fagos: Bk (Berkeley), Iz (Izatnagar) y Wb (Weybridge) los cuales fueron preparados a un RTD (Routine Test Dilution) y cuidando siempre que no se tocara la superficie del agar para evitar contaminaciones (10).

Se dejaron reposar las placas hasta que las gotas de fago se secaron y en seguida se incubaron. Las lecturas se realizaron después de 48 hrs. de incubación a 37°C. observándose si existía o no lisis en las cepas. También se incluyeron las cepas control (1).

d) Ureas.-

Se prepararon tubos con Medio Base Urea 29 g/lit (Bioxon) esterilizado por filtración y Agar Bacteriológico (Bioxon) 2 g/100 ml esterilizados por autoclave a 121°C por 15 minutos.

Cada cepa fue sembrada por triplicado a partir de tubos resembrados y sin hacer suspensiones (1).

Se incubaron los tubos a 37°C y las lecturas se realizaron a las 12, 24 y 48 hrs. observándose el cambio de color en los tubos si fueron positivos; se reportaron como + o - para cada uno de estos tiempos.

IV.3. VALORES DE SIMILITUD

Los resultados obtenidos en las pruebas expresados como + o -, fueron integrados a una Matriz de Similitud no Agrupada (cepa vs. caracter) y se analizaron por medio del paquete TAXON, usando el Coeficiente de Similitud Simple-Matching por ser el más sencillo. De esta manera el paquete proporcionó todos los posibles pares de cepas con sus respectivos valores S_m los cuales también pueden ser calculados por la ecuación (47,48,49,50):

$$S_m (\%) = [n_s / (n_s + n_d)] \times 100$$

donde:

n_s = número de caracteres que muestran el mismo signo (++ o --)

n_d = número de caracteres que muestran diferente signo (+-)

Con estos valores se realizó una Matriz de Similitud Agrupada y Sombreada, la cual fué creada tomando la primera cepa que se trabajó y colocando las restantes de mayor a menor similitud con respecto a esta cepa; es indistinto la cepa con la que se inicie la elaboración de esta gráfica.

El orden en que se hayan colocado debe ser el mismo en ambos ejes por lo que quedó entonces una matriz de cepa vs. cepa. Donde hicieron intersección dos cepas, se sombrea según los siguientes intervalos: 100-91, 90-85, 84-80 y <80 %, ya establecidos en trabajos anteriores con otros microorganismos (48,49,50).

Los mismos valores de S_m se usaron para construir un

Dendrograma por el método simple representando primero la similitud de cada par de cepas con otros pares de cepas. Así, todas las cepas se relacionaron a determinado porcentaje de similitud y no se usaron intervalos como en la Matriz de Similitud Agrupada sino que se emplearon los porcentajes reales que se obtuvieron de su análisis por el paquete TAXON (100, 98, 96, 94, %).

La existencia de cluster's se observó al término de la realización de la Matriz de Similitud Agrupada y el Dendrograma. La delimitación de los cluster's se hizo por asesoramiento.

CUADRO IV
LISTA DE CEPAS DE BRUCELLA MELITENSIS.

CEPA	PROCEDENCIA	ORIGEN
LBM 80	HICMR	HUMANO
LBM 81	HICMR	HUMANO
LBM 82	HICMR	HUMANO
LBM 83	HICMR	HUMANO
LBM 85	HICMR	HUMANO
LBM 86	HICMR	HUMANO
LBM 87	HICMF	HUMANO
LBM 88	HICMR	HUMANO
LBM 101	HICMR	HUMANO
LBM 103	HICMR	HUMANO
LBM 105	GUADALAJARA	HUMANO
LBM 108	INDRE	HUMANO
LBM 110	INDRE	HUMANO
LBM 111	INDRE	HUMANO
LBM 112	INDRE	HUMANO
LBM 113	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 114	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 115	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 116	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 117	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 118	CMN	HUMANO
LBM 120	HIM	HUMANO
LBM 121	HIM	HUMANO
LBM 124	HICMR	HUMANO
LBM 125	HICMR	HUMANO
LBM 126	HN	HUMANO
LBM 128	INDRE	HUMANO
LBM 134	INDRE	HUMANO
LBM 135	TECAMAC	ANIMAL (LECHE DE VACA)
LBM 137	LESP-FUEBLA	HUMANO
LBM 138	LESP-FUEBLA	HUMANO
LBM 139	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 141	HIM	HUMANO
LBM 142	HIM	HUMANO
LBM 143	CMN	HUMANO
LBM 146	INP	HUMANO
LBM 148	HICMR	HUMANO
LBM 150	INDRE	HUMANO
LBM 151	HN	HUMANO
LBM 152	INDRE	HUMANO
LBM 153	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 154	HICMR	HUMANO
LBM 155	CMN	HUMANO
LBM 157	HICMF	HUMANO

CUADRO IV (Cont.)

CEPA	PROCEDENCIA	ORIGEN
LBM 158	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 161	INDRE	HUMANO
LBM 163	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 164	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 165	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 168	INDRE	HUMANO
LBM 169	GUADALAJARA	HUMANO
LBM 170	INF	HUMANO
LBM 175	HIM	HUMANO
LBM 176	INDRE	HUMANO
LBM 177	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 178	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 180	INDRE	HUMANO
LBM 181	HICMR	HUMANO
LBM 185	HICMR	HUMANO
LBM 188	HICMR	HUMANO
LBM 189	HICMR	HUMANO
LBM 194	INF	HUMANO
LBM 196	TLAJOMULCO	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 200	HM	HUMANO
LBM 203	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 206	INDRE	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 208	HGZ-53 IMSS	HUMANO
LBM 211	TLAJOMULCO	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 212	CHIHUAHUA	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 213	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 214	HICMR	HUMANO
LBM 215	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 216	INF	HUMANO
LBM 218	HICMR	HUMANO
LBM 219	HICMR	HUMANO
LBM 220	HM	HUMANO
LBM 221	CHIHUAHUA	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 224	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 225	HG MORELIA	HUMANO
LBM 227	CL-25 IMSS	HUMANO
LBM 228	INDRE	HUMANO
LBM 244	LESP-ZAC	ANIMAL (LECHE DE VACA)
LBM 246	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 247	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 249	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 251	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 253	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 255	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 250	LESP-ZAC	HUMANO

CUADRO IV (Cont.)

CEPA	PROCEDENCIA	ORIGEN
LBM 261	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 263	NETZAHUALCOYOTL	ANIMAL (LECHE DE VACA)
LBM 276	NETZAHUALCOYOTL	ANIMAL (LECHE DE VACA)
LBM 278	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 279	LESP-PUEBLA	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 280	LESP-PUEBLA	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 284	LESP-PUEBLA	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 285	LESP-PUEBLA	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 287	HGZ-53 IMSS	HUMANO
LBM 288	LESP-GUERRERO	HUMANO
LBM 290	LESP-PUEBLA	HUMANO
LBM 291	LESP-PUEBLA	ANIMAL (LECHE DE CABRA)
LBM 294	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 295	LESP-GUERRERO	HUMANO
LBM 296	ISSSTE ZARAGOZA	HUMANO
LBM 298	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 317	HCT	HUMANO
LBM 318	HIM	HUMANO
LBM 320	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 321	LESP-ZAC	HUMANO
LBM 322	LESP-ZAC	HUMANO

HICMR - HOSPITAL DE INFECTOLOGIA CENTRO MEDICO LA RAZA
 INDR - INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS
 CL-25 IMSS - CLINICA 25 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 CMN - CENTRO MEDICO NACIONAL
 HIM - HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
 HN - HOSPITAL DE NEUROLOGIA
 INP - INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA
 HGZ-53 IMSS - HOSPITAL GENERAL DE ZONA
 LESP - LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PUBLICA DE LOS ESTADOS
 PUEBLA, ZACATECAS, GUERRERO
 HM - HOSPITAL MILITAR
 HO MORELIA - HOSPITAL GENERAL DE MORELIA
 HCT - HOSPITAL CENTRAL TICOMAN

CUADRO V
SUSTANCIAS QUIMICAS Y CONCENTRACIONES.

SUSTANCIA	SOLN. MADRE	CONC. FINAL
Acido Borico	1.5 %	0.15 %
Acriflavina	0.002 %	0.0002 %
Metabisulfito de Potasio	1.0 %	0.1 %
Metabisulfito de Potasio	1.1 %	0.11 %
Nitrato de Plomo	2.6 %	0.26 %
Sulfato de Cobre	0.8 %	0.08 %
Nitrato de Plata	0.2 %	0.02 %
Nitrato de Plata	0.15 %	0.015 %
Bromuro de Etidio‡	0.04 %	0.004 %
Sulfato de Cobalto‡	0.2 %	0.02 %
Arsenito de Sodio	0.035 %	0.0035 %
Cloruro de Mercurio Verde de Malaquita	0.0075 %	0.00075 %
Verde de Malaquita	0.0025 %	0.00025 %
CTAB	0.02 %	0.002 %
Sulfato de Cadmio	0.015 %	0.0015 %
Arsenato de Sodio	4.0 %	0.4 %
Carbonato de Litio	11.0 %	0.11 %
Sulfato de Zinc	0.7 %	0.07 %
Eritritol	1.0 %	0.1 %
Eritritol	2.0 %	0.2 %
Benzal	1:100	1:1000

‡ Solubles en baño María.

**CUADRO VI
LISTA DE ANTIMICROBIANOS.**

ANTIMICROBIANO	CONC. FINAL ($\mu\text{g/ml}$)	SOLVENTE	DILUYENTE
Ampicilina	10	VII	Agua
Cefoxitin	30	I	Agua
Cefazolin	30	I	Agua
Cefradina	30	VI	Agua
Cinoxacin	100	III	Agua
Eritromicina	10	II	Agua
Furazolidona	30	VIII	Agua
Lincomicina	5	I	Agua
Neomicina	5	I	Agua
Norfloxacin	10	III	Agua
Novobiocina	5	V	Agua
Oxacilina	5	I	Agua
Ac. Oxolinico	5	III	Agua
Streptomycin	2	I	Agua
Tobramicina	1	I	Agua
Moxalactam	30	IV	Agua
Espectinomycin	10	I	Agua
Ac. Nalidixico	30	III	Agua
Kanamicina	5	I	Agua
Oleandomicina	30	V	Agua
Meticilina	5	I	Agua
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	1.25/23.75	II/III	Agua
Ciprofloxacin	5	I	Agua

- I - Agua
- II - Metanol
- III - NaOH 0.1 M
- IV - HCL 0.04 M
- V - Etanol absoluto
- VI - Fosfatos 1 N pH=6

- VII - Fosfatos 0.1 M pH=8
- VIII - Dimetil Formamida

- Para 1 lit:
Fosfato Dipotásico 2 gr
Fosfato Monopotásico 8 gr
- Para 500 ml:
Fosfato Dipotásico 16.73 gr
Fosfato Monopotásico 0.523 gr

Fuente: 11.22.40.

V. RESULTADOS

V.1. MATRIZ DE SIMILITUD AGRUPADA.

Los clusters que se definieron en la Matriz de Similitud Agrupada (Fig. 1) mostraron cada uno diferentes características. El cluster 1 incluye gran parte de las cepas, lo que indica una relación estrecha entre un buen número de los miembros de esta especie, y en él se pueden observar 3 sub-clusters definidos como 1A, 1B y 1C. El subcluster 1A incluye de la cepa 227 a 276, siendo esta última de origen humano de Cd. Netzahualcoyotl, mientras las cepas restantes son, a excepción de la cepa 227, del estado de Zacatecas. Las cepas que forman el subcluster 1B son de la 101 a 158, siendo tres de la Clínica 25 IMES (114, 116 y 158) y todas son de origen humano; el subcluster 1C el cual incluye cuatro cepas (252 a 276) presentan como característica que todas provienen de Zacatecas y son de origen humano. Además de estos subclusters, se observan agrupaciones de cepas importantes como la que presentan las cepas 208, 214 y 219 siendo las dos últimas del Hospital de Infectología del Centro Médico La Raza de origen humano.

Por otra parte, el cluster 2 está formado por las cepas 188, 189, 212 y 218 las cuales provienen del HICMR de humanos, (a excepción de la cepa 212 que es del estado de Chihuahua y fue aislada de leche de cabra), mostrando así la posibilidad de que la fuente de infección sea la misma.

El cluster 3 presenta una característica importante pues las cepas que lo forman (290 a m16) son de laboratorios estatales (Puebla, Guerrero y Zacatecas) y solo la 296 es del ISSSTE de Zaragoza, además, este cluster incluye la cepa tipo m16. Por la localización de esta clínica puede suponerse la relación de las infecciones en esta zona con el consumo o contacto con productos contaminados procedentes de algunos estados.

En el último cluster se observan dos agrupaciones: una de cuatro cepas (168 a 215) de diferente procedencia y la otra formada por las cepas 263, 280, 284 y 285, siendo todas de origen animal y de laboratorios estatales de Puebla de leche cabra, a excepción de la cepa 263 que fue aislada de leche de vaca en Cd. Netzahualcóyotl, mostrando una vez más la relación de cepas de esta zona con las estatales.

Estos resultados permitieron identificar la posible asociación de cepas estatales definiéndose "brotes" como los de Zacatecas y Puebla, así como la agrupación de cepas con las mismas características.

V.2. DENDROGRAMA.

Por otra parte, la interpretación de los resultados obtenidos por medio del Dendrograma (Fig. 2) siempre debe hacerse considerando el porcentaje de similitud entre las cepas, y no el orden en que se encuentren. De esta manera, a un porcentaje menor, un mayor número de cepas estarán incluidas.

En el caso de Dendrograma construido en este trabajo, se consideró un valor de corte del 84 % para determinar "especie", y se observó que casi todas las cepas se encuentran a un porcentaje mayor, lo que demuestra que pertenecen a la especie *B. melitensis*, a excepción de cinco cepas las cuales deben considerarse fuera de ella.

A diferentes porcentajes se pueden observar agrupaciones con diversas características. Al 86 % por ejemplo, se encuentran siete cepas (153, 120, 244, 111, 169, 103 y 121) y todas provienen de diferentes lugares, así también, al 88 % se observan dos grupos a ambos extremos. Uno de estos incluye de la cepa 298 a 83 siendo todas menos una, de HICMR y de LESP-Zacatecas, mientras que el otro, formado de la cepa 115 a 155, agrupa en su mayoría a cepas

de HICMR y se observa la asociación de la 115 y 296 que son de la Clínica 25 del IMSS y del ISSSTE Zaragoza, respectivamente. Las cepas agrupadas al 90 % (321 a 189 y 85 a 294) son de diferente procedencia y origen, resaltando los estados de Puebla y Zacatecas.

El porcentaje que sin duda presenta grupos más definidos es el 92 % y en él se establecieron principalmente dos clusters. El primer cluster (1) incluye diecisiete cepas (165 a 212), que son de diferente procedencia, mientras que el segundo cluster (2) está formado por varios subclusters.

El subcluster 2A está comprendido de la cepa m16 a 218, mostrando la prevalencia de cepas de la Clínica 25 del IMSS, mientras que el subcluster 2B involucra algunas cepas de los estados de Puebla y Zacatecas, al igual que el subcluster 2C. El subcluster 2D es la más importante asociación de cepas, ya que está formado en gran parte por cepas que son del HICMR.

Las cepas restantes (139 a 108) agrupadas en el subcluster 2E son de diferentes lugares.

Si consideramos que al 92 % se localiza la cepa m16, todas las cepas que se sitúan a este nivel deben ser *B. melitensis* biovariedad 1, esto indicaría que todas deberían formar un solo cluster, sin embargo, se definen hasta subclusters, lo que contribuye a tomar en cuenta que aún dentro de una misma biovariedad existen diferencias significativas.

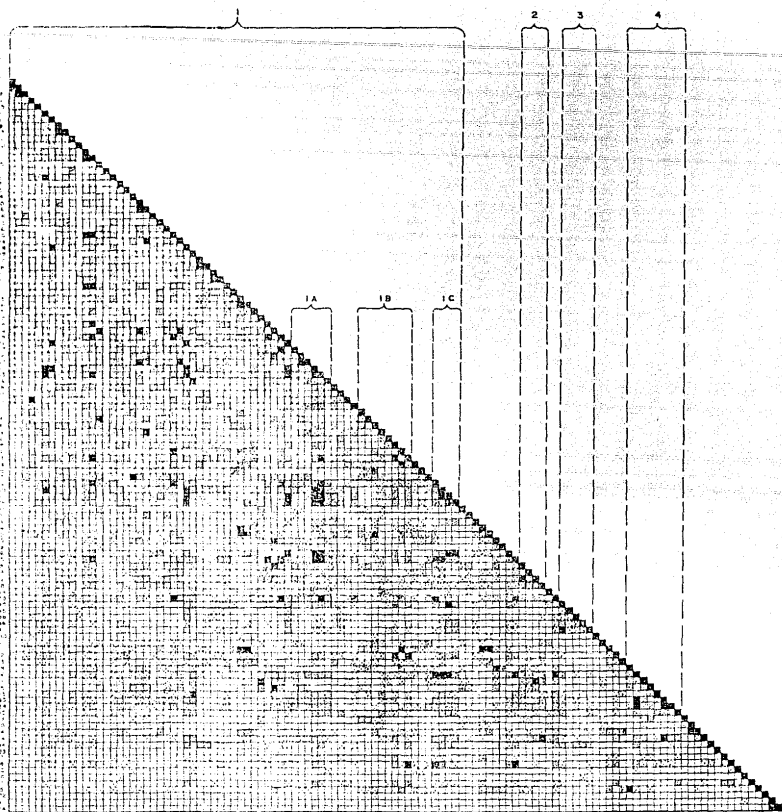
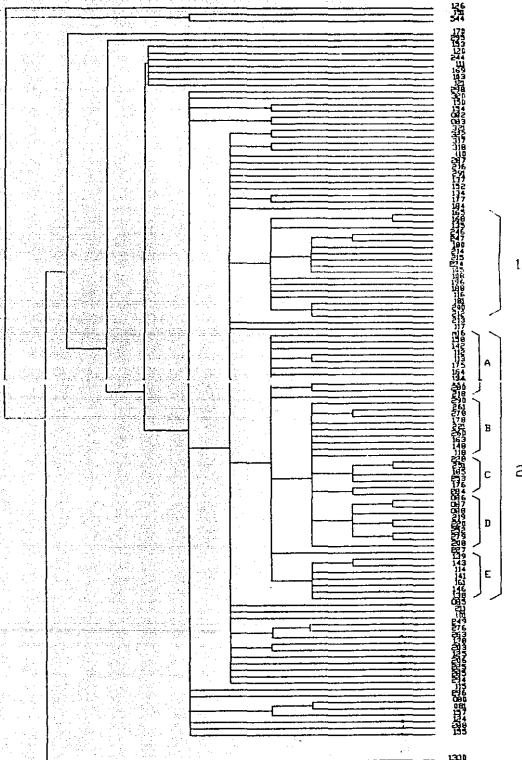


Fig 1 MATRIZ DE SIMILITUD AGRUPADA.

Ssm (%)

76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100



1300

E.coli

Staph

Fig. 2 DENDROGRAMA

VI. DISCUSION

El analisis taxonomico de las cepas de *Brucella*, permitio definir de una manera mas precisa la relacion entre ellas presentandolas en cluster's (grupos) y sugiriendo que existen diferencias importantes dentro de una misma biovariedad que deben ser consideradas. La asociacion constante de cepas de HICMR, CL-25 y algunos Estados confirman esto.

La idea de reclasificar las biovariedades de las diferentes especies no ha sido vaga ya que, por ejemplo, el esquema de clasificacion reconoce solo 8 biovariedades de *B. abortus* siendo que por lo menos 22 han sido reportadas y en *B. suis* se reconocen 4 y unas 5 han sido reportadas. Se ha sugerido tambien que *B. abortus* biovariedades 3 y 6 sean consideradas una sola biovariedad por que solo presentan diferencia en la sensibilidad a Tionina (13).

Las diferencias a nivel especie tambien se han reportado planteando que las especies provienen de un solo progenitor el cual es *B. abortus* biovariedad 2 (Fig. 3) y ademas se ha propuesto que todas las especies y biovariedades del genero *Brucella* pueden ser agrupadas en una sola especie, *B. melitensis*, esto es, *B. abortus* seria *B. melitensis* biovariedad abortus, *B. suis* podria ser *B. melitensis* biovariedad suis, etc. (51).

Aunque estos estudios toman en cuenta la necesidad de sub-clasificar o re-clasificar a los miembros del genero *Brucella*, todos han sido reportes aislados que no usan a la Taxonomia Numerica como metodo de analisis.

Los resultados obtenidos en este trabajo llevo a confirmar que la Taxonomia Numerica es aplicable aun con un numero pequeno de pruebas que en este caso fue 50. El coeficiente de Similitud usado (Simple-Matching) proporciono porcentajes satisfactorios, lo que descarto la posibilidad del analisis por medio de otro coeficiente (6,42).

Si bien es muy tediosa la realización de la Matriz de Similitud Agrupada y el Dendrograma con los porcentajes obtenidos, no puede hacerse un análisis por Taxonomía Numérica sin ellos. La Matriz de Similitud Agrupada por su parte, muestra de una manera más general si existe o no la asociación entre OTU's en cierto rango de similitud mientras que el Dendrograma es una representación más exacta (ya que se grafica el valor real de similitud de cada OTU) y estilizada de estas asociaciones; por esta razón ambas no presentan necesariamente el mismo orden de OTU's, ni los mismos cluster's (grupos).

El uso del paquete de computación TAXÓN, contribuye de manera importante a simplificar el análisis proporcionando los porcentajes de similitud entre pares de OTU's, pero sin duda el tiempo para la realización de las gráficas antes mencionadas y la bibliografía tan escasa hace que los trabajos al respecto sean muy pocos. Algunos estudios reportan el uso de Dendrogramas como método importante para la diferenciación de las especies de *Acetophyllus* influenzae aislados de diferentes tipos de muestra (36,38).

Con respecto a *B. melitensis* se han realizado pruebas con fagos para sub-tipificar a *B. melitensis* biovariedad 2 encontrando 6 sub-biovariedades designadas A a F y en base a las características oxidativas de 5 aminoácidos la especie se ha subdividido en 5 biovariedades (7,13,53); ninguno de estos estudios emplea en su análisis a la Taxonomía Numérica, y los pocos que la han empleado no han sido basados en cepas del país, de esta manera los resultados que aquí se presentan contribuyen a tomar en cuenta que aun a nivel biovariedad no todas las cepas presentan el mismo comportamiento (27).

Entre las aplicaciones importantes de estos resultados, se encuentra el poder identificar brotes permitiendo el conocimiento de la naturaleza y reparto de las biovariedades características de cada región (32). La información aportada por esta clasificación es

indispensable para conocer y trazar las fuentes de infección usando como marcadores epidemiológicos: por medio de un sistema extenso de pruebas va se ha estudiado a *B. melitensis* logrando distinguir 5 biovariedades mostrando cada una, preferencia geográfica particular (53).

Son necesarios muchos años antes de poder establecer un mapa epidemiológico de la distribución y de la frecuencia de los tipos de cepas de *Brucella* responsables de la infección en los animales y por consecuencia en el hombre (32).

Es importante también conocer las pruebas que sirven como caracteres marcadores, tal es el caso de la cepa 544 cuyo carácter ureasa negativo, la diferencia de la casi totalidad de la cepas de *B. abortus* (1). En el caso del presente trabajo la prueba de Eritritol ayuda a definir mejor a las cepas que fueran *B. abortus* y no *B. melitensis* (2,20).

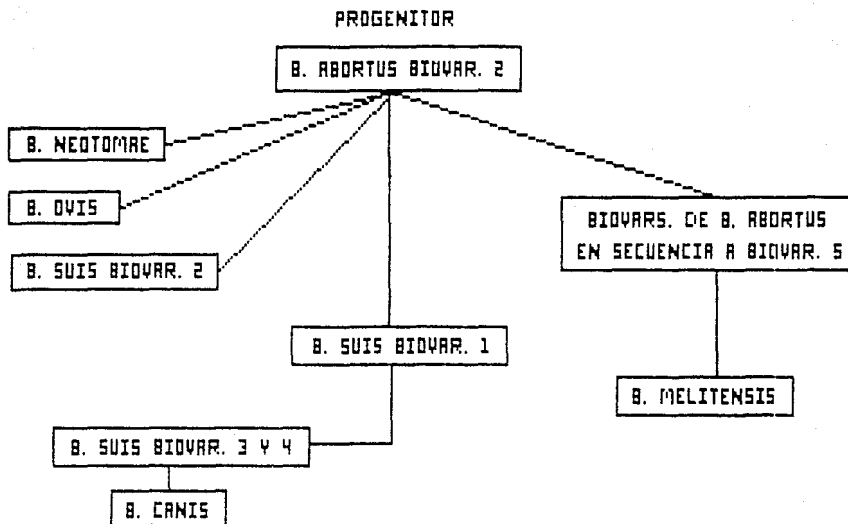
Determinando la naturaleza y frecuencia de las biovariedades del género *Brucella* en una región dada, otra aplicación de estos resultados es la de crear vacunas de acuerdo con las necesidades reales del país. En este sentido, este trabajo va más allá de una simple clasificación, involucra una realidad biológica importante ya que no es seguro que una fracción vacunal determinada tenga la misma eficacia frente a todas las biovariedades, incluso en el seno de una misma especie (32).

En el laboratorio del Instituto los resultados pueden ser aplicables para crear un cepario moderno que facilite el manejo de las cepas por grupos con características similares, formándose de esta manera Resistotipos y Quimiotipos bien establecidos que definan un sistema de pocas pruebas que lleve a un diagnóstico rápido y confiable.

Como se muestra, los resultados obtenidos aportan información valiosa, pero no puede proponerse (como los objetivos plantean) una nueva clasificación, sino más bien una metodología que contribuya a

esta clasificación; aunque se puede analizar su importancia para este género, es todavía difícil concluir sobre su Taxonomía, pues requiere de estudios complementarios.

Fig. 3 MODELO DE LA DERIVACION EVOLUCIONARIA DE *BABUZZIA*



Fuente: 13

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VII. CONCLUSIONES

- El comportamiento general de las cepas marcó agrupaciones entre ellas.
- Permitió conocer sus características comunes y en algunos casos definió "brotes", por lo que estos resultados podrían emplearse para establecer marcadores epidemiológicos.
- Los clusters establecidos indicaron que dentro de una misma biovariedad y especie existen diferencias significativas, lo que hace pensar en la necesidad de crear sub-biovariedades.
- Los resultados pueden también ser útiles en la creación de resistotipos y quimiotipos que definan las pruebas necesarias para un diagnóstico rápido y confiable.
- Es necesario incluir un sistema de pruebas más extenso para poder proponer una clasificación basada en la Taxonomía Numérica para el género *Brucella*, pues aunque este método es aplicable aun con pocas características, un mayor número de ellas permite conocer una fracción considerable de información del genoma bacteriano.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALTON, G.G., JONES, U.M., PIETZ, D.E., (1976). Las Técnicas de Laboratorios en la Brucelosis. 2a. ed., OMS., Ginebra, Suiza. Cap.1: 11-67 pp.
- 2.- ANDERSON, J.D., SMITH, H., The Metabolism of Erythritol by *Brucella abortus*. J. Gen. Microbiol., 38:109-124 (1965).
- 3.- ARIZA, J., BOSCH, J., Relevance of in Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Brucella melitensis* to Relapse Rate in Human Brucellosis. Antimicrob. Agents Chemother., 30(6): 958-960 (1986).
- 4.- ARIZA, J., GUDIOL, F., Comparative Trial of Rifampin-Doxycycline versus tetracycline-Streptomycin in the Therapy of Human Brucellosis. Antimicrob. Agents Chemother., 28(4): 548-551 (1985).
- 5.- ARNAUD-BOSCH, GREMI, F., Search for a Concordance of the Different Strategies of Numerical Taxonomy. Microbiol. Statistics Algorithms. Universidad I' Montpellier, Francia. 1-3 pp.
- 6.- AUSTIN, B., COLWELL, R.F., Evaluation of Some Coefficients for Use in Numerical Taxonomy of Microorganisms. Intern. J. System. Bacteriol., 27: 204-210 (1977).
- 7.- BROUSSON, J.J., (1981). Premiers Resultats de Taxonomie Numerique de *Brucella melitensis* par l'Analyse Factorielle des Correspondances. These. Universite I' Montpellier, France. 1-29 pp.
- 8.- CORBEL, M.J., BRINLEY, M.W.J., Proposal for Minimal Standards of New Species and Biotypes of the Genus *Brucella*. Intern. J. System. Bacteriol., 25: 83-89 (1975).
- 9.- CORBEL, M.J., BRINLEY, M.W.J., (1968), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Williams & Wilkins, U.S.A., 368 pp.

- 10.- CORBEL, M.J., THOMAS, E.L., (1980), The Brucella Phages: their Properties Characterisation and Applications. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Weybridge, U.K., 1-9, 69-74 pp.
- 11.- DIFCO. (1989). Manual Disk Products. 45-49 pp.
- 12.- DOUGLAS, J.T., ELBERG, S.S., "Isolation of *Brucella melitensis* Phage of Broad Bioty and Species Specificity". Infection and Immunity. 14: 306 (1976).
- 13.- GARRY, A.L., (1990), Advances in Brucellosis Research. Ed. Texas A y M University Press, U.S.A., Cap.2: 12-35 pp.
- 14.- GOODFELLOW, M., JONES, D., FRIEST, F.G., (1985), Computer Assisted Bacterial Systematics. Ed. Academic Press., U.S.A., Cap.1 y 2: 1-20, 21-36 pp.
- 15.- GOTTUZO, E., CARRILLO, C., "An Evaluation of Diagnostic Methods for Brucellosis the value of Bone Marrow Culture". J. Infect. Dis.; 153: 122-124 (1986).
- 16.- GUTIERREZ, A.A., DIEZ E.M, PERA G.P, CAMPOS B.A., "In Vitro Activity of N-Formimidoyl Thienamycin Against 98 Clinical Isolates of *Brucella melitensis* Compared with Those of Cefoxitin, Rifampin, Tetracycline, and Co-Trimoxazole". Antimicrob. Agents Chemother. 21(3):501-503 (1982).
- 17.- HASHIMOTO, H., KONDO, K., MITSUHASHI, S., "Elimination of Penicillin Resistance of *Staphylococcus aureus* by Treatment with Acriflavine". J. Bacteriol. 88:261-262 (1964).
- 18.- HEDGES, R.W., BAUMBERG, S., "Resistance to Arsenic Compounds Conferred by a Plasmid Transmissible Between Strains of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 115(1):459-460 (1973).
- 19.- JOHNSTON, L.H., DYKE, K.G., "Ethidium Bromide Resistance, a New Marker on the *Staphylococcal* Penicillinase Plasmid". J. Bacteriol. 100(3):1413-1414 (1969).
- 20.- KEPPIE, J., WILLIAMS, A.E., WITT, K., SMITH, H., "The Role of Erythritol in the Tissue Localization of the Brucellae".

- Br. J. Exp. Pathol., 46:104-108. (1965).
- 21.- KHAN, Y., DIZON, M., KIEL, F., "Comparative In Vitro Activities of Ofloxacin, Difloxacin, Ciprofloxacin, and Other Selected Antimicrobial Agents against *Brucella melitensis*". Antimicrob. Agents Chemother. 33(8):1409-1410 (1989).
 - 22.- LENNETTE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER, W.J., SHADOMY, H.J., (1985), Manual of Clinical Microbiology. 4a. ed. American Society for Microbiology, U.S.A., 1019 pp.
 - 23.- LOPEZ-MERINO, A., (1985), Identificación y Diagnóstico de *Brucella* sp., Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.F.N., México, D.F. 1-35 pp.
 - 24.- LOPEZ-MERINO, A., (1988), Manual de Procedimientos de Laboratorio para Brucelosis, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, S.S.A., México, D.F. 1-29 pp.
 - 25.- LOPEZ-MERINO, A., (1989), Manual de Técnicas y Procedimientos para el Estudio de Brucelosis, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, S.S.A., México, D.F. 1-28 pp.
 - 26.- LOPEZ-MERINO, A., (1991), Brucelosis: Avances y Perspectivas, Monografía, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, S.S.A., México, D.F., 1-30 pp.
 - 27.- LOPEZ-MERINO, A., Comunicación Personal, (1991).
 - 28.- LLORENS-TERROL, J., BUSQUETS, R.M., "Brucellosis Treated with Rifampicin". Rev. Inf. Dis., 45: 335-340 (1978).
 - 29.- MARTINEZ, G.E.C., PEREZ, D.C., (1980), Adaptación del Método Kirby-Bauer para su utilización con *Brucella* spp. Tesis. La Salle. 91 pp.
 - 30.- MEYER, M.E., KASTEN, R.W., "Use of Antibiotic Profiles for Identification and for Evolutionary Studies in the Genus *Brucella*". International Symposium on Human and Animal Brucellosis. Taipei, Taiwan. Mayo 21-22, 1984, 25 pp.

- 31.- MICHENER, C.D., SOKAL, R.R. (1957). Citado en (14).
- 32.- MINISTERIO DE AGRICULTURA., (1977), Recientes Aportaciones Veterinarias sobre Brucelosis. Dirección General de la Producción Agraria, España. 39-58 pp.
- 33.- MORGAN, W.J., CORBEL, M.J.. "Recommendations for the Description of Species and Biotypes of the Genus *Brucella*". International Symposium on Brucellosis. Developing Biology Standards., 31: 27-34 (1985).
- 34.- MORRIS, J.A.. "The Use of Polyacrylamide gel. electrophoresis in taxonomy of *Brucella*". J. Gen. Microbiol., 76:231-237 (1973).
- 35.- MORRIS, J.A., CORBEL, M.J.. "Properties of a New Phage Lytic for *B. suis*". J. Gen. Virol. 21: 539 (1973).
- 36.- MUSSER, J.M., BARENKAMP, S.J., GRANDOFF, D., SELANDER, R.. "Genetic Relationships of Serologically Nontypable and Serotype b Strains of *Haemophilus influenzae*". Infect. Immun., 52(1): 183-191 (1986).
- 37.- PALENQUE, E., OTERO J., NORIEGA A.. "In vitro Susceptibility of *Brucella melitensis* to New Cephalosporins Crossing the Blood-Brain Barrier". Antimicrob. Agents Chemother. 29(1):182-183 (1986).
- 38.- QUENTIN, R., GOUDEAU, A., WALLACE, R.J., SMITH, A.L., SELANDER, R.. "Urogenital, Maternal and Neonatal Isolates of *Haemophilus influenzae*: Identification of Unusually Virulent Serologically Non-typable Clone Families and Evidence for a New *Haemophilus* Species". J. Gen. Microbiol., 136: 1203-1209 (1990).
- 39.- ROGERS, D.J., TANIMOTO, I.I., "A computer program for Classifying Plants. Science., 132: 1115-1118 (1960).
- 40.- SANCHEZ, J., GUINEA, J., FARES, R., (1980), Microbiología Analítica Básica. Ed. JIMS, Barcelona España, 76-81 pp.
- 41.- SCHUHARDT, V.T., RODE, L.J., OGLESBY G.. "Toxicity of

- Elemental Sulfur for Brucellae". J. Bacteriol. 63:123-128 (1952).
- 42.- SNEATH, P.H.A., "Some Thoughts on Bacterial Classification". J. Gen. Microbiol., 17: 184-200 (1957a).
- 43.- SNEATH, P.H.A., "The Application of Computers to Taxonomy". J. Gen. Microbiol., 17: 201-226 (1957b).
- 44.- SNEATH, P.H.A., JOHNSON, R., "The Influence on Numerical Taxonomie Similarites of Error in Microbiological Tests". J. Gen. Microbiol., 72:377-392 (1972).
- 45.- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. (1973). Citado en (14).
- 46.- SUMMERS, A.O., SILVER, S., "Microbial Transformations of Metals". Ann. Rev. Microbiol. 32:637-672 (1978).
- 47.- TSUKAMURA, M., "Adansonian Classification of Mycobacteria". J. Gen. Microbiol., 45:253-273 (1966).
- 48.- TSUKAMURA, M., "Numerical Taxonomy of the Genus Nocardia". J. Gen. Microbiol., 56:265-287 (1969).
- 49.- TSUKAMURA, M., "An Approach to Numerical Identification of Bacterial Species". J. Gen. Microbiol., 95:207-212 (1976).
- 50.- TSUKAMURA, M., MIZUNO S., TSUKAMURA S., "Comprehensive Numerical Classification of 369 Strains of Mycobacterium, Rhodococcus, and Nocardia". Intern. J. System. Bacteriol., 29(2):110-129 (1979).
- 51.- VERGER, J.M., FLOMMET, M., (1985), Brucella melitensis. Ed. Martinus Nijhoff Publishers. The Commission of the European Communities, Holanda, Cap.1,2,3: 1-7, 51-81, 105-123 pp.
- 52.- YOUNG, E.J., CLARRIDGE, J.E., MOORE D., "Antibiotic Sensitivity of Clinical Isolates of Brucellae". International Symposium on Human and Animal Brucellosis. Taipei, Taiwan, Mayo 21-22, 10 pp. (1984).
- 53.- YOUNG, E., CORBEL, M., (1989), Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects, Ed. CRC Press., Florida USA, Cap.1, 3, 4 y 5: 1-10, 25-40, 41,52, 53-72 pp.