UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

CATEDRA DE REUMATOLOGIA

# ESTUDIO DE ANTIGENOS DE CLASE I Y HAPLOTIPOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN FAMILIAS CON BRUCELOSIS.

ANTONIO RAFAEL CALIZ CALIZ

Granada, 1989.

# UNIVERSIDAD DE GRANADA

## ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 19 89 a 1990 Folio 65 Número 130

Reunido en el dia de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Antonio Rafael Cáliz Cáliz, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente habia elegido: "Estudio de antígenos de clase I y los aplotipos de histocompatibilidad en familias con bocio"

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de Apto CUM LAUDE (por unanimidad)

Granada 20 de Octubre de 1989

EL PRESIDENTE,

Fdo.: J. de la Higuera

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: J. Guillén

EL VOCAL,

Fdo.: Manuel Ruiz Rejón

EL VOCAL,

Fdo.: Rafael Solano Lara

EL VOCAL,

Fdo.: J. González Domínguez

FIRMA DEL GRADUANDO,

Dpto. de Medicina (Hematología)

FACULTAD DE MEDICINA
CATEDRA DE REUMATOLOGIA
Prof. Dr. SALVATIERRA RIOS
GRANADA

EL PROFESOR DR. DON DOMINGO SALVATIERRA RIOS, CATEDRATICO DE REUMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, Dª ANTONIO RAFAEL CALIZ CALIZ, sobre el tema "ESTUDIO DE ANTIGENOS DE CLASE I Y HAPLOTIPOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN FAMILIAS CON BRUCELOSIS", ha sido realizado bajo su dirección durante los últimos tres años, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del titulo de Doctor siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, Septiembre de 1.989

FACULTAD DE MEDICINA
CATEDRA DE REUMATOLOGIA
Prof. Dr. SALVATIERRA RIOS
GRANADA

LA DOCTORA DOÑA PILAR PAULE SASTRE, DOCTORA EN MEDICINA POR LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, Dº ANTONIO RAFAEL CALIZ CALIZ, sobre el tema "ESTUDIO DE ANTIGENOS DE CLASE I Y HAPLOTIPOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN FAMILIAS CON BRUCELOSIS", ha sido realizado bajo mi dirección durante los últimos tres años, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor, en condiciones tan aventajadas que le hacen acreedor del titulo de Doctor siempre que asi lo considere el citado Tribunal.

Granada, Septiembre de 1.989

Facultad de Medicina GRANADA CATEDRA DE REUMATOLOGIA

P. Paule

*A la Gloria de mi Padre.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sinceros agradecimientos:

- Al Prof. SALVATIERRA RIOS, por su inestimable ayuda en la realización de este trabajo, así como por el aprendizaje recibido a lo largo de todo mi periodo de formación como Residente.

- A la Profesora PAULE SASTRE, que con su gran dedicación, apoyo y y confianza, ha sabido infundir en mi, el estímulo necesario para que la ardua labor de cada dia no se convirtiera en monótona y rutinaria.

- A todo el Servicio de Inmunología de la C.S. Virgen de las Nieves, y en especial al Profesor, F. GARRIDO TORRES-PUCHOL, sin cuya disposición y cooperación hubiese sido difícil la realización de la presente tesis,, y a D. F. L. DIAZ, por su valiosa ayuda técnica.

- Al Profesor MARTIN ANDRES, Catedrático de Bioestadística de la Facultad de Medicina, por su clara labor y orientación en el tratamiento estadístico de los resultados.

- Al Dr. ABELLAN, al Dr. MEJIA y al resto de mis compañeros del Servicio de Reumatología y del Departamento de Medicina Interna, por su colobaración a lo largo de estos años.

- A Magdalena y a Socorro, por toda la ayuda que siempre me han prestado.

- A todos los miembros de las familias, que en todo momento han colaborado en nuestro estudio.

- *A todas aquellas personas, que de una u otra forma han colaborado en la realización de esta tesis.*

## A. INTRODUCCION

### A. I.- PREAMBULO.

### A. II.- BRUCELOSIS.

1. Historia.
2. Factores epidemilógicos.
3. Etiologia.
4. Anatomia Patológica.
5. Manifestaciones Clinicas.
6. Diagnóstico.
7. Tratamiento.

### A. III.- SISTEMA HLA.

1. Historia.
2. Estructura.
3. Genètica.
4. Nomenclatura.
5. Expresión.
6. Defincion serologica.
7. Biología.

### A. IV.- HLA Y ENFERMEDAD.

1. HLA y enfermedades asociadas.
2. Mecanísmos de asociación HLA-Enfermedad.
3. Enfermedades asociadas al sistema HLA.

### A. V.- HLA Y BRUCELOSIS.

### A. VI.- OBJETIVOS.

B. MATERIAL Y METODOS.

I. MATERIAL.

1. Poblaciones estudiadas.

2. Material y técnicas de laboratorio.

3. Material gráfico.

II. METODO.

1. Método de tipaje de los Locus A, B y C.

2. Método recogida de datos.

3. Método estadístico.

III. RESULTADOS.

IV. DISCUSION.

V. CONCLUSIONES.

VI. RESUMEN.

VII. BIBLIOGRAFIA.

INDICE

INDICE.


Página

A. INTRODUCCION

A. I.- Preámbulo ..... 1

A. II.- Brucelosis ..... 3

1. Historia ..... 3

2. Factores epidemiológicos..... 7

2.1. Mecanismos de transmisión..... 7

2.1.a. Contacto..... 7

2.1.b. Ingestión..... 8

2.1.c. Inhanalación..... 8

2.1.d. Inoculación..... 9

2.2. Sujetos susceptibles..... 11

2.2.a. Edad..... 11

2.2.b. Sexo..... 11

2.2.c. Profesión..... 12

2.3. Otros factores epidemiológicos... 13

2.4. Situación actual de la brucelosis en España..... ..... 13

3. Etiologia..... 19

3.1. Taxonomia..... 19

3.2. Morfologia..... ..... 21

3.3. Estructura antigènica..... 22

3.4. Fagos..... 22

INDICE


| | Página |
|---|---|
| 3.5. Propiedades bioquímicas..... | 23 |
| 3.6. Propiedades biológicas..... | 23 |
| 3.7. Condiciones de crecimieto..... | 24 |
| 4. Patogenia y Anatomía Patológica..... | 25 |
| 5. Manifestaciones clínicas..... | 27 |
| 5.1. Formas de comienzo..... | 28 |
| 5.2. Periodo de estado..... | 30 |
| 5.2.1. Forma septicémica o febril.. | 31 |
| 5.2.2. Formas viscerales..... | 32 |
| 5.2.2.a. Aparato Locomotor.. | 32 |
| 5.2.2.b. Sistema Nervioso... | 35 |
| 5.2.2.c. Hígado..... | 36 |
| 5.2.2.d. Aparato Circulatorio. | 37 |
| 5.2.2.e. Aparato Genitourinario | 38 |
| 5.2.2.f. Otras localizaciones.. | 39 |
| 5.2.3. Síndrome Biológico..... | 39 |
| 6. Diagnóstico..... | 41 |
| 6.1. Diagnóstico bacteriológico... | 41 |
| 6.2. Diagnóstico serológico..... | 43 |
| - Reacción de Aglutinación... | 44 |
| - Rosa de Bengala..... | 47 |

INDICE


Página

- Prueba de Coombs anti-brucella 47
- Inmunofluorescencia indirecta 48
- Prueba ELISA..... 49

7. Tratamiento..... 50

7.1. Antibióticos de escasa significación..... 50

7.2. Antibióticos fundamentales..... 51

7.2.1. Tetraciclinas..... 51

7.2.2. Estreptomicina..... 52

7.2.3. Rifampicina..... 53

7.2.4. Trimetropin-Sulfametoxazol. 53

7.3. Pautas de tratamiento..... 54

A. III.- El sistema HLA..... 56

1. Introducción e historia..... 56

2. Estructura del complejo HLA..... 62

- Moléculas de clase I..... 62
- Moléculas de clase II..... 64
- Moléculas de clase III..... 67

3. Genética..... 68

4. Nomenclatura..... 72

5. Expresión de los productos del sistema HLA..... 78

INDICE


| | | Página |
|---|---|---|
| | 6. Defincion serológica de los antigenos Clase I y II..... | 80 |
| | 7. Biologia del sistema HLA..... | 83 |
| A. IV.- | HLA y enfermedad..... | 87 |
| | 1. HLA y enfermedades asociadas..... | 87 |
| | - Espondilitis Anquilosante..... | 88 |
| | - Artritis Reactivas..... | 89 |
| | - Diabetes tipo I..... | 91 |
| | - Psoriasis..... | 91 |
| | - Artritis Reumatoidea..... | 93 |
| | - Otras enfermedades..... | 95 |
| | 2. Mecanismos patogénicos de la asociación HLA-Enfermedad..... | 97 |
| | 3. Enfermedades infecciosas asociadas al sistema HLA..... | 99 |
| | 3.1. Artritis Reactivas..... | 99 |
| | 3.2. Lepra..... | 100 |
| | 3.3. Tuberculosis..... | 101 |
| | 3.4. Infección posestreptocócica... | 101 |
| | 3.5. Hepatitis B..... | 101 |
| | 3.6. Herpes Virus..... | 102 |
| | 3.7. Otras infecciones..... | 102 |

INDICE


Página

A. V.- HLA y Brucelosis..... 104

A. VI.- Objetivos..... 108

B. MATERIAL Y METODOS.

B. I. MATERIAL..... 109

B.I.1. Poblaciones estudiadas..... 109

B.I.1.1. Población Control..... 109

B.I.1.2. Población Familias..... 109

B.I.1.2.a. Criterios de Selección..... 109

B.I.1.2.b. Criterios de Exclusión..... 112

B.I.1.2.c. Distribución..... 114

B.I.2. Material y técnicas de Laboratorio... 115

B.I.2.1. Instrumental..... 115

B.I.2.2. Reactivos y sueros..... 116

B.I.3. Material Gráfico..... 116

B. II. METODO..... 135

B.II.1. Método para el tipaje de los Locus A, B y C..... 135

B.II.1.1. Preparación placas Terasaki. 135

B.II.1.2. Preparación suero de conejo. 136

B.II.1.3. Obtención linfocitos totales. 137

INDICE


| | Página |
|---|---|
| B.II.1.4. Técnica de contaje..... | 137 |
| B.II.1.4. Siembra..... | 138 |
| B.II.1.5. Lectura de resultados..... | 138 |
| B.II.2. Método de recogida de datos..... | 140 |
| B.II.3. Método estadistico..... | 143 |
| B.II.3.1. Tratamiento estadistico.... | 143 |
| B.II.3.2. Determinación de cálculos.. | 143 |
| C. RESULTADOS | |
| 1. Exposición de Resultados..... | 145 |
| 2. Análisis de Resultados..... | 153 |
| 2.1. Comparación de las frecuencias fenotipicas.. | 153 |
| 2.1.1. Entre Grupo Control y Familias..... | 154 |
| 2.2. Estudio de la asociación gamética (Desequilibrio de enlance) y su signifiación..... | 156 |
| 2.3. Estudio de haplotipos compartidos en parejas de hermanos..... | 158 |
| 3. Figuras y Tablas..... | 159 |
| D. DISCUSION ..... | 243 |
| E. CONCLUSIONES..... | 262 |

INDICE


| | Página |
|---|---|
| F. RESUMEN..... | 262 |
| G. BIBLIOGRAFIA..... | 266 |

## A.- INTRODUCCION.

A. I.- PREAMBULO.

Aunque son conocidos múltiples aspectos de la enfermedad brucelar, aún se desconoce porque los sujetos expuestos a un mismo riesgo (Brucella), se comportan de forma tan diferente, tanto para contraer o no la enfermedad, como ya una vez establecida presentar gran diversidad de manifestaciones clinicas.

También es sabido que el ambiente familiar es un factor de riesgo importante en la epidemiologia de la brucelosis, teniendo ciertas caracteristicas clinicas y epidemiológicas diferentes a las que ocurren cuando se manifiestan en la población general.

Desde que se conoció el sistema HLA se han realizado numerosos trabajo de investigación para conocer bien su su papel en la respuesta inmune, asi los factores genéticos que influyen en la susceptibilidad e inicio de determinades enfermedades.

Por esto el propósito de este trabajo es continuar la linea de investigación, ya inciada, sobre el estudio de la predisposición genética en la brucelosis humana. En el citado estudio se observó una disminución en la frecuencia de un determinado antigeno de Clase I (HLA-CW2). y se consideró que podria actuar como indicador de protección de la enfermedad brucelar. En este estudio intentamos de profundizar más en la vertiente genéticas, pero sin obviar y teniendo en cuenta el

ambiente epidemiológico.

Por todo ello, y para que nuestros resultados sirvan para conocer mejor ciertos aspectos de la enfermedad brucelar y su relación con el sistema HLA, hemos desarrollado el presente trabajo, realizando el estudio de antigenos de Clase I en familias en que uno o más miembros esten enfermos de brucelosis, con la intención de que exista una mayor homogeniedad genética y los resultados puedan aportar más claridad al problema.

A. II.- BRUCELOSIS.

## 1. HISTORIA

La brucelosis es una enfermedad cuyo conocimiento se remonta al siglo V a. C., aunque éste no se base en documentos suficientemente fidedignos que lo corroboren. Se considera que dicho proceso se recoge en la literatura a partir de los siglos XVIII y XIX, época en que se cita repetidamente, pero sin que se le trate como entidad.

Va a ser, en el siglo XIX, durante la invasión de los ingleses a la isla de Malta, cuando se reconozca la enfermedad como un serio problema para la salud, en este caso de los soldados británicos.

BRUCE, médico militar inglés, consiguió demostrar microscópicamente en 1886 y mediante cultivos en 1887, un pequeño gérmen gramnegativo, que consiguió aislar en el bazo de soldados muertos de fiebre de Malta, y al que denominó Micrococus melitensis

Gracias a sus importantes aportaciones , es por lo que en la actualidad,y en su honor, al gérmen se le denomina brucela y a la enfermedad brucelosis (citado por ROUX, 1982).

Otro de los hallazgos importantes que se llevaron a cabo a lo largo del siglo XIX, fué el de los profesores ALMOTh WRIGRTH y SEMPLE en 1897, que describieron la prueba de

aglutinación en suero, utilizando los antigenos de los cultivos muertos de los micrococus de Bruce.

En general, deben destacarse las importantes aportaciones del Departamento Médico del ejército británico en relación a la brucelosis. Dicho Departamento, creó una Comisión para el estudio de la fiebre Meditarrea que siguió investigando en Malta del 1905-7, elaborando 7 informes sobre las caracteristicas de la enfermedad.

Nuevamente en 1907, se demostró la conexión existente entre la ingestión de leche fresca de cabra maltesa y la aparición de brucelosis humana en la epidemia acontecida entre la tripulación de un barco.

También en 1905, el Dr. ZAMMIT,observó la relación directa que tenía la enfermedad humana con la ingestión de leche cruda de cabras enfermas portadoras de gérmenes. HORROCKS, ZAMMIT y KENNEDY, encontraron los micrococos tipicos en sangre, leche y orina de cabras maltesas (citadas por WENDELL HALL, 1982).

Estudios posteriores amplios y comparativos permitieron demostrar a EVANS en 1918, la estrechas relación existente entre las bacterias aisladas en el hombre por un lado, y de vacunos,cabras y ovejas por otro, incluyéndose todas ellas en un género al que se denominó Brucela en 1920 a propuesta de MAYER y SHAW en honor de Bruce (citado por ROUX, 1982).

Hay que tener en cuenta que el germen responsable de la brucelosis, antes de concocerse como brucela, habia recibido otras denominaciones tales como bacilo de Bang o micorocus abortus (debido a los trabajos de BANG y ESTRIBOLT que cultivaron en 1897 el bacterium abortus bovis y lo identificaron como responsable de abortos bovinos repetidos en Dinamarca).

Un hallazgo importante en la historia de la brucelosis fué el descubrimiento por BURNET en 1922 de la intradermoreacción a la melitina (citado por ROUX, 1982).

Va a ser en 1923, cuando por recomendación de HUDLESON, se distinguen en el género brucela tres especies (también llamadas tipos o variantes): Brucela abodrtus, Bruecela melitensis y Brucela suis.

En años posteriores el hallazgo cada vez más frecuente de brucela en las especies animales más variadas, asi como el aislamiento de microorganismos semejantes a ella en abortos y otros procesos patológicos, dieron motivo a distintas propuestas taxonómicas de clasificación de género brucela asi como de las especies.

Finalmente pueden señalarse otros datos importantes aportados a la historia de la brucelosis, como son los trabajos de PARNAS y POPHADZE, quienes introdujeron el estudio de la

fagotipia para la diferenciación de las distintas especies de brucelas, asi como los estudios de CAMERON y la Escuela de MORGAN, que establecieron las diferencias de las brucelas en función de su capacidad oxidativa sobre distintos caracteres polisacáridos y lipidicos (citado por WENDELL HALLL, 1982; MORGAN. 1982).

## 2. FACTORES EPIDEMIOLOGICOS.

La brucelosis es una zoonosis que afecta especialmente a algunos animales domésticos, tales como cabras, ovejas, vacas y cerdos, aunque también a otros animales que pueden ser así mismo domésticos (caballos, mulos, rara vez perros y gatos), peridomésticos (rata) ó salvajes (búfalos, conejos, perdices, jabalíes)

El contagio de animal a animal suele ser venéreo ó por ingesta de carne ó leches infectadas. Los animales enfermos eliminan las brucelas con las heces, orina y leche, que además se encuentra en los productos de los abortos y en la carne. Desde ellos la enfermedad llega al hombre mediante diferentes vías.

### 2.1. Mecanismos de transmisión.

Podemos considerar cuatro mecanismos principales de transmisión de la brucelosis: contacto, ingestión, inhalación e inoculación.

#### 2.1.a. Contacto.

Es definido por la mayoría de los autores (FLYNN, 1983; SANCHEZ RODIRIGUEZ, 1.983) como la causa más frecuente de contagio. Ocurre a través de pequeñas soluciones de continuidad

de la piel (escoriaciones, grietas, pequeñas heridas).

En general, puede afirmarse que la transmisión de brucelas por contacto se calcula en 60-70% (USEROS FERNANDEZ; ZAPATERO VILLALONGA y LOPEZ ENCINAR, 1981).

En contraposición otros autores conceden menos importancia a estos mecanismos de transmisión, así CORTINA GREUS en Valencia encuentra riesgo profesional en 36% ó PINEDO SANCHEZ y SANCHEZ GARCIA Ciudad Real, un 47% de casos en relación con la profesión.

2.1.b. Ingestión.

La vía digestiva mediante ingestión de leche fresca no higienizada, sueros poco ácidos, nata etc. se consideran la forma de contagio habitual por la mayoría de los autores (EDWUARD, 1975; ECKMAN, 1975).

Puede constituir a su vez un mecanismo de contagio el consumo de agua contaminada por estiércol situado alrededor de los pozos o manantiales (MEZQUITA LOPEZ, 1971). Estas aguas contaminadas por orina o deyecciones de animales infectados, si se emplean para el riego de verduras y hortalizas pueden ocasionar la enfermedad en el hombre (ROUX, 1979).

2.1.C. Inhalación.

Es otro mecanismo importante en la transmisión de la

brucelosis. Lo constituye la inhalación de polvo, que puede proceder de excrementos, pelos, lana ... de animales infectados.

En este caso la puerta de entrada será la vía respiratoria, pituitaria ó conjuntivas, y su importancia radica en la frecuencia con que aparece en granjeros, personas que trabajan en establos contaminados, personal dedicado al transporte de animales (ROUX, 1979).

2.1.d. Inoculación.

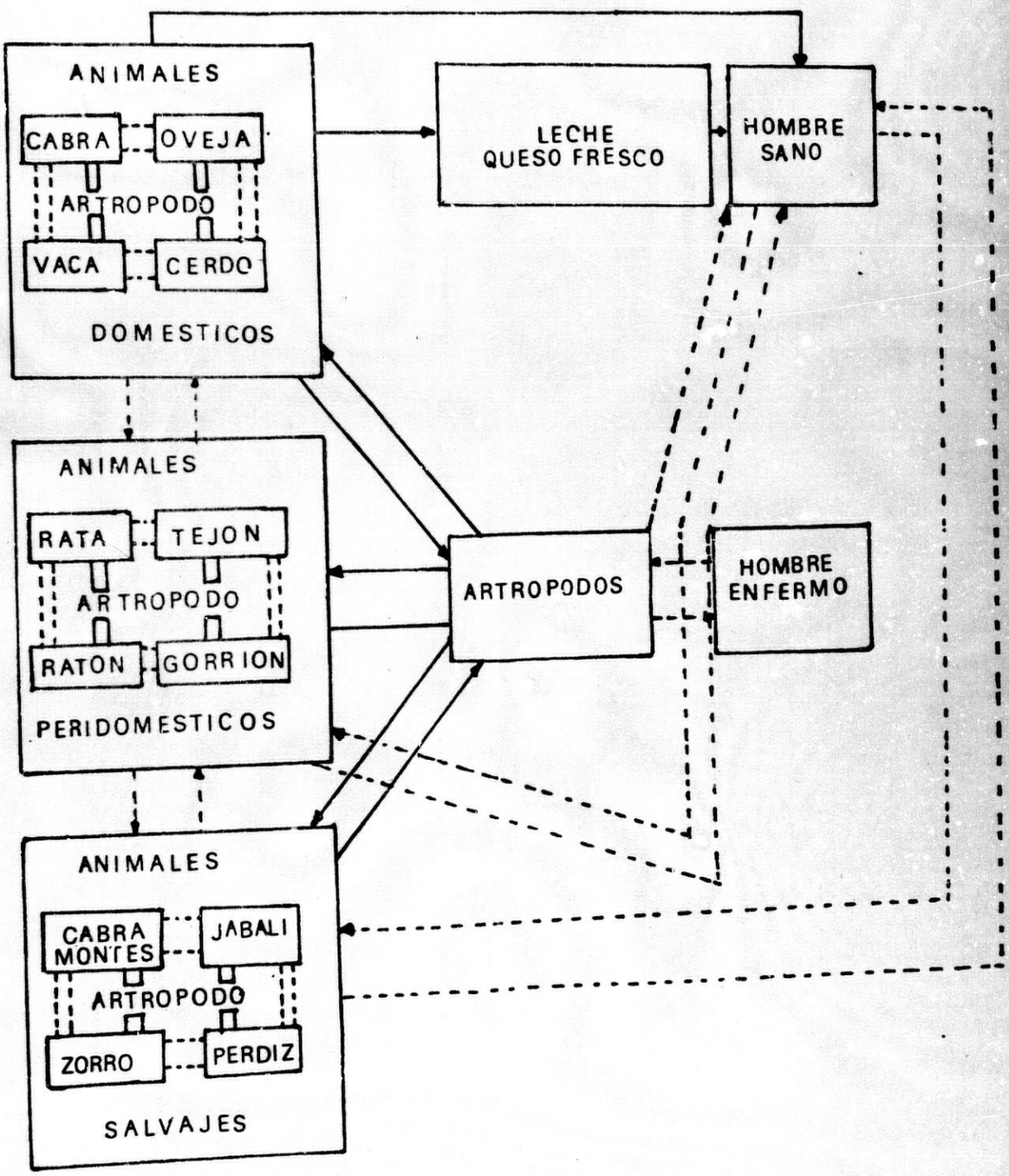
NAVAL en 1985 confirma la importancia de la intervención de insectos y artrópodos en la transmisión de la brucelosis, ya que las brucelas conservan su virulencia hasta 27 meses en más de 14 especies de garrapatas.

Dentro de este mecanismo de transmisión hemos de hacer referencia a la posible inoculación del germen a través de transfusiones sanguíneas (MEDARDE FERNANDEZ, 1979).

En la Figura 1 se resumen de forma esquemática, los mecanismos de contagio en la brucelosis.

*FIGURA 1*

*ESQUEMA DE LOS MECANISMOS DE CONTAGIO EN LA BRUCELOSIS*



## 2.2. Sujetos susceptibles.

Cualquier sujeto puede ser susceptible a padecer brucelosis y aunque su frecuencia de presentación es mayor en medio rural que en urbano, cada dia se van observando más pacientes con brucelosis en la ciudad, siendo consecuente en este hecho un mayor contacto de los habitantes de la ciudad con los pueblos y el campo en general (NAVAL, 1985)..

### 2.2.a. Edad

Muchos autores se han interesado por este aspecto de la brucelosis, oscilando las edades de presentación de unos trabajos a otros, pero coinciendo todos ellos que la mayor incidencia se observa en personas adultas, activas laboralmente.

Hacemos referencia al estudio llevado a cabo por MEZQUITA LOPEZ en 1971: menores de 10 años el 6%, entre los 10 y 19 años el 16,5%,entre 20-29 años el 16,4%, de 30-39 años un 24,4%, de 40 a 50 años el 18,3% y mayores de 50 años el 18,2%. No suele presentarse causas de brucelosis en lactantes. (MEZQUITA LOPEZ, 1971).

### 2.2.b. Sexo.

Parece haber unanimidad en un predominio del sexo masculino en la morbilidad global de brucelosis, y sobre en las

zonas rurales. En las ciudades la proporción entre ambos sexos suele estar igual, e incluso hay un discreto predominio del sexo femenino (BUSCH y PARKER, 1972).

2.2.c. Profesión.

La brucelosis se considera como una enfermedad profesional, y así se determina en las actuales disposiciones legales vigentes en España.

Son varios los trabajos que concluyen que las profesiones de mayor posibilidad de contraer la enfermedad son los ganaderos, agricultores, empleados de industrias alimenticias etc., lo cual es lógico, si tenemos en cuenta que entre las distintas formas de contagio, el contacto directo a través de la piel es vía fundamental para contraer la enfermedad (ROUX ,1979; PIEDROLA ANGULO, GALVEZ VARGAS Y MAROTO VELA, 1980).

Aunque la mayoría de de la literatura revisada considera la brucelosis como enfermedad profesional, autores como COLMENERO Y cols, no observan relación profesional en el 71,22%; y en un estudio reciente efectuado por él, observa un 64% de la enfermedad en sujetos sin antecedentes profesionales (COLMENERO, 1986).

## 2.3 Otros factores epidemiológicos.

Otra caracteristica de la epidemiolgia de la brucelosis va a ser su presentación en forma de ondas epidémicas, que comprenden periodos de 4-5 años. Actualmente nos encontramos en un periodo de ascenso (Figura 2).

Otro factor que hemos de tener en cuenta, va a ser la diferente distribución estacional que presenta la enfermedad.En general puede afirmarse que los meses de invierno son los menos propicios para la aparición de brucelosis. Con la llegada de la primavera empieza a aumentar el número de enfermos, siendo Abril, Mayo, Junio y Julio los meses de mayor incidencia.

Este hecho aparece frecuentemente repetido en la bibliografia nacional y extranjera. Esto es lógico, ya que en estos meses las condiciones climatológicas son las más favorables para la transmisión de las brucelas, y es en la época en la que el hombre está más en contacto con la naturaleza y, sobre todo con las fuentes de infección, ya que es la época habitual de la paridera en el ganado caprino y ovino y comienza la producción de queso.

## 2.4. Situación actual de la brucelosis en España.

La brucelosis es extraordinariamente frecuete en nuestro pais, que presenta las tasa de incidencia más altas entre todos los paises europeos y mediterráneos (MARTINEZ

NAVARRO, 1978).

Por otra parte, aunque se presentan oscilaciones polianuales en el número de casos declarados, es actualmente la única enfermedad bacteriana transmisible que no muestra una tendencia decreciente de forma sostenida.

En 1984 se registrarón 8,698 casos (22,33 por 100.000 habitantes), la cifra más alta de todo el periodo en que se dispone de datos. En 1985 se notificarón 6.214 (15,80 por 100.000 habitantes.

Los datos correspondientes a 1987 son aún incompletos, pero el indice epidémico en Febrero era similar al registrado en el año precedente. Es necesario resaltar que probablemente los caso declarados son de tres a cinco veces inferiores a la incidencia real como consecuencia de la falta de declaración.

La distribución geográfica de la brucelosis en España se refeleja en la fig. 3 que se refiere al periodo 1980-1984; simplificando la situación, la mayor parte del centro de la peninsula y las provincias de Andalucia Oriental constituyen una zona de muy alta endemia brucelósica. En esta amplia zona algunas provincias presentan tasas superiores al 50 por 100.000 habitantes.

En Cataluña, Levante, Andalucia Oriental, Navarra, Pais

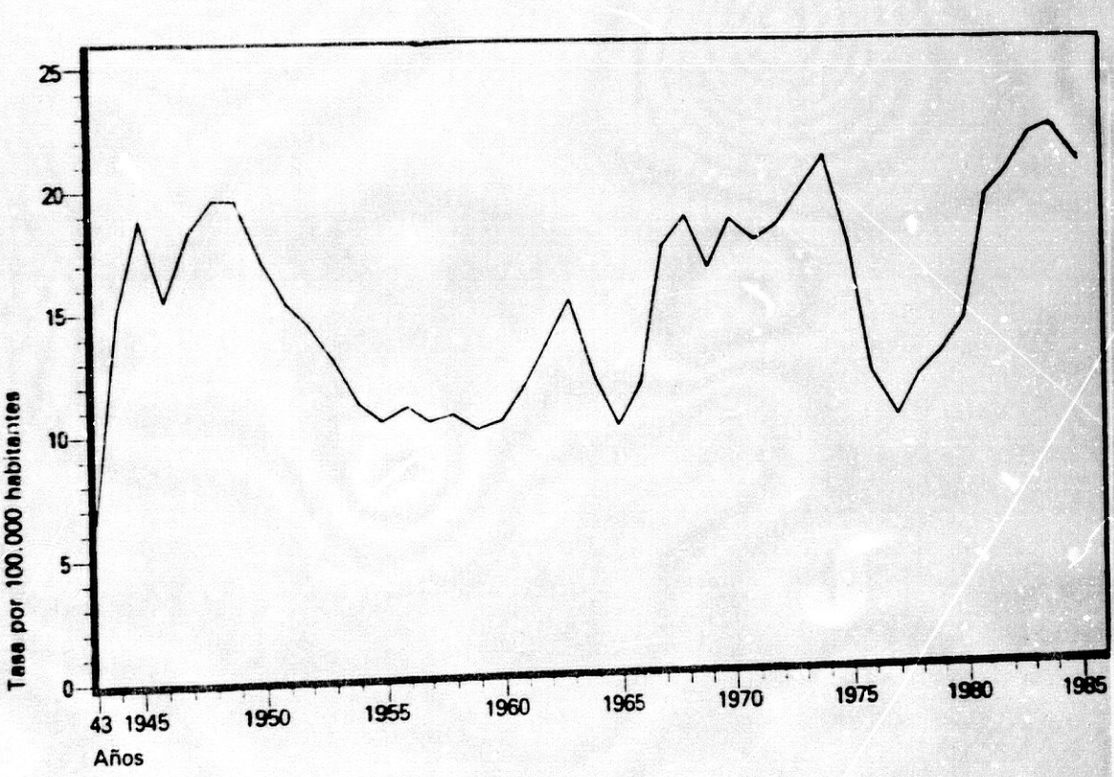
Vasco, y Cantabria la endemia es importante; en Galicia y Baleares la incidencia es baja, y en Canarias la enfermedad es casi inexistente. Esta distribución coincide substancialmente con la del censo de ganado ovino y caprino, principales fuentes de infección en nuestro país.

En España el 98% de los casos de brucelosis están producidos por B. melitensis (RODRIGUEZ TORRES, 1984).

En la fig. 4 se recoge la distribución geográfica de las especies y biovariedades de Brucella aisladas en casos humanos y tipadas en el Laboratorio Regional de Brucelosis de Valladolid.

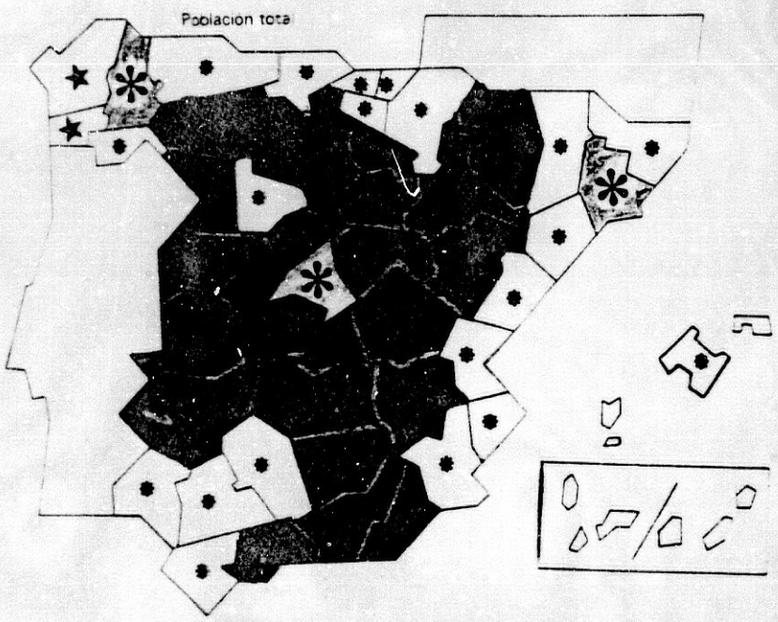
## FIGURA 2

PRESENTACION DE LA BRUCELOSIS EN LOS ULTIMOS AÑOS EN ESPAÑA.



## FIGURA 3

DISTRIBUCION DE LA MORBILIDAD POR BRUCELOSIS HUMANA EN ESPAÑA EN EL PERIODO 1980-1984. TASA POR 100.000 HABITANTES.




Brucelosis 1980-1984

Tasas por 100.000 habitantes

Tasas de incidencia

- Muy baja 0,1645
- Baja 0,1645-0,9020
- Media 0,9020-4,9457
- Alta 4,9457-27,1782
- Muy alta > 27,1782

Intervalo de clase (geométrico): 5,4

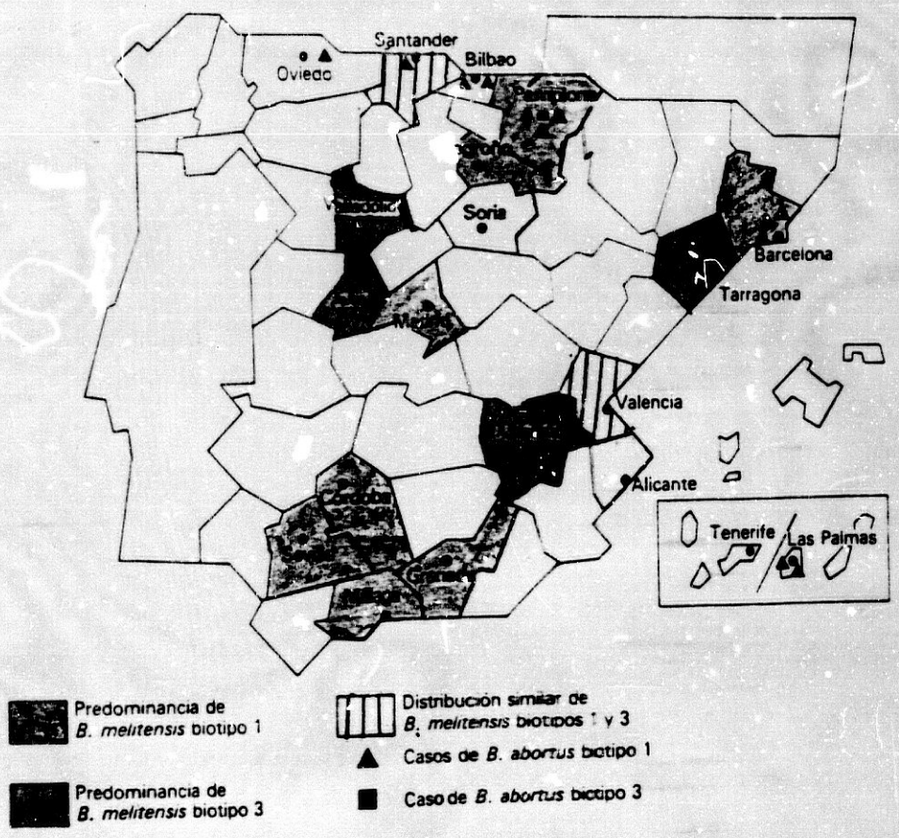
Valor máximo: 148,70

Valor mínimo: 0,03

(Tomado del Boletín Epidemiológico Semanal del Ministerio de Sanidad y Consumo).

## FIGURA 4

ESPECIES Y BIOTIPOS RESPOSABLES DE LA BRUCELOSIS HUMANA EN ESPAÑA.




(Laboratorio Regional de Brucelosis de Valladolid desde 1974 a 1987).

## 3. ETIOLOGIA

### 3.1. Taxonomia.

El género Brucela se incluye en el Manual de bacteriologia Sistemática en el grupo de cocos y bacilos gram-negativos aerobios no asignados a ninguna familia, lo que indica la dificultad de su clasificación bacteriológica. Se incluyen seis especies (CORBEL y BRINLEY-MORGAN, 1.984);

- Brucela melitensis
- Brucela abortus
- Brucela suis
- Brucela neotomae
- Brucela ovis
- Brucela canis

De acuerdo con determinados caracteres biológicos se han individualizado biovariedades en sus tres especies más importantes. En la tabla I se recogen de forma simplificada las principales diferencias entre las especies y dentro de ellas, según el Subcomité Internacional de Taxonomia de Brucela.

De acuerdo con los resultados de la experiencia de hibridación del ADN bacteriano, se propuso en 1.985 (VERGER y cols), que el género Brucela sólo debería incluir una especie, cuyo nombre sería B. melitensis, considerándose a las actuales

## TABLA I

CARACTERES DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GENERO BRUCELA Y SUS BIOVARIADES.

| Especie | Biotipos | Exigencia en $CO_2$ | Producción de $SH_2$ | Crecimiento en presencia de | | Lisis a la DHP por los fagos | | | | Aglutinación con sueros monoespecíficos[b] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Tionina[a] | Fuchsina[a] | Tb | Wb | Bk | R/C | A | M | R |
| *B. melitensis* | 1 | − | − | + | + | − | − | + | − | − | + | − |
| | 2 | − | − | + | + | − | − | + | − | + | − | − |
| | 3 | − | − | + | + | − | − | + | − | + | + | − |
| *B. abortus* | 1 | (+)[1] | + | − | + | + | + | + | − | + | − | − |
| | 2 | (+) | + | − | − | + | + | + | − | + | − | − |
| | 3 | (+) | + | + | + | + | + | + | − | + | − | − |
| | 4 | (+) | + | − | + | + | + | + | − | − | + | − |
| | 5 | − | − | + | + | + | + | + | − | − | + | − |
| | 6 | − | (−) | + | + o − | + | + | + | − | + | − | − |
| | 9 | (−)[1] | + | + | + | + | + | + | − | − | + | − |
| *B. suis* | 1 | − | + | + | − o + | − | + | + | − | + | − | − |
| | 2 | − | − | + | − | − | + | + | − | + | − | − |
| | 3 | − | − | + | + | − | + | + | − | + | − | − |
| | 4 | − | | + | (+) | − | + | + | − | + | + | − |
| *B. neotom.* | | − | + | − | − | ± | + | + | − | + | − | − |
| *B. ovis* | | + | − | + | (+) | − | − | − | + | − | − | + |
| *B. canis* | | − | − | + | − | − | − | − | + | − | − | + |

(Según el Subcomité Internacional de Taxonomía de Brucella, simplificado).

especies como biovariedades.

Sin embargo, las tres especies mayores actualmente aceptadas (B. melitensis, B.abortus y B. suis) responsables de la brucelosis humana, presenta una distribución geográfica diferente, una especificidad de especie animal muy característica, aunque no exclusiva, y pecularidades en su acción patógena, por lo que parece aconsejable el mantenimiento de la actual distribución de especies

En relación con el diagnóstico de brucelosis humana la exigencia de $CO_2$ para el crecimiento, que pueden presentar las biovariedades 1 a 4 de B. abortus (sobre todo durante el aislamiento) es la característica más importantes de las señaladas en la tabla I.

3.2. Morfología.

Cocos, cocobacilos o bacilos cortos de 0,5-0,7 µm de diametro y 0,6-1,5 µm de longitud. Están dispuestos de forma única o menos frecuentemente de forma de pares de cadenas cortas o pequeños grupos. No poseen verdaderas cápsulas. Carecen de esporos. Desde el punto de vista tintorial son Gram-negativos. Aerobios. Son inmoviles, careciendo de flagelos.

Las colonias que crecen sobre agar con suero, dextrosa u otros medios, son transparentes, elevadas, convexas y con un borde entero no deflecado y una superficie brillante y lisa.

Tienen un color pálido como la miel cuando se observan a la luz.

3.3. Estructura antigénica.

La constitución antigénica es compleja. En su conocimiento ha sido fundamentales los trabajo de DIAZ (1.968; 1.973). La brucelas contiene un liposacárido (LPS) en su pared celular, estructuralmente similar al de otras baceterias gram-negativas.

El LPS es un complejo antigénico que interviene en las reacciones serológicas habituales con antígeno particulado (bacterias enteras),como aglutinación, rosa de Bengala, prueba de Coombs y fijación de complemento. El complejo LPS es diferente en las brucelas en fase lisa y en la fase rugosa.

Las brucelas presentan además dos haptenos de naturaleza polisacárida y antigenos proteicos que se demuestran con reacciones de inmunoprecipitación.

3.4. Fagos y tipajes de Fagos.

Han sido descrito un gran número de bacteriófagos activos sobre miembros del genero brucela. Todos los fagos de brucela pertenecen a la misma familia, siendo morfológicamente iguales. Son relativamente estables a los solventes orgánicos y

detergentes aniónicos e inactivados por el calor y oxidantes.

Los fagos son de gran valor taxonómico para la identificación del género y especies.

2.5. Propiedades bioquímicas.

Dentro de las propiedades bioquímicas hemos de de señalar las siguientes:

- No lisan gelatina ni el suero coagulado.
- No producen indol en agua de peptona, pero si $SH_2$ encantidad variable, dependiente de las distintas especies.
- Son catalasa positiva y algunas cepas oxidasa positiva.
- Hidrolizan la urea y fermentan la glucosa sin gas.

2.6. Propiedades biológicas.

Son muy sensibles a la acción del calor (destruyéndose a 60 grados durante una hora) y a los antisépticos. Se mantienen vivos en la leche conservada en nevera y mueren pronto se se producen la acidificación como consecuencia de la acción de otros organismos. Se destruye rápidamente tras la pasteurización. Se conservan en el queso fresco.

## 3.7. Condiciones de crecimiento y nutrición.

Las brucelas crecen lentamente en los medios de cultivos ordinarios (caldo, gelatina, agar), requiriendo en ocasiones medios enriquecidos para su multiplicación. Aunque son aerobios estrictos, algunas cepas de B. abortus requieren para su crecimiento 5-10% de $CO_2$ que favorece en general la multiplicación de todas las brucelas. Cualquiera de los medios sólidos pueden servir de base para la elaboración de medios de cultivo selectivos.

## 4. PATOGENIA Y ANATOMIA PATOLOGICA.

Las brucelas penetran en el organismo a través de la piel, a menudo de las manos, y de mucosas, en especial por la orofaringea. Sin embargo, también es posible a través de la mucosa conjuntival y respiratoria.

En el tejido conjuntivo subcutáneo ó en la submucosa, entran en contacto con los leucocitos polinucleares neutrófilos y con los monocitos de la sangre respectivamente. Entonces son fagocitados y habitan en el interior de los fagosomas de estas células, donde no sólo no son destruidas, sino que se multiplican. Siguiendo la vía linfática llegan a los ganglios linfáticos. Por eso en clinica es frecuente el hallazgo de adenopatías laterocervicales, supraclaviculares y axilares.

Si existe inmunidad, estas células destruyen a los gérmenes, pero en caso contrario persisten vivos y con capacidad de multiplicarse en su interior durante meses o años. Además, por vía hematógena, las brucelas liberadas pueden llegar a casi todos los órganos ( bazo, hígado y médula ósea), ricos en células del sistema mononuclear fagocítico, que atrapan a las células, pero pueden metastatizar también a las articulaciones, huesos, meninges, endocardio, pulmones y testículos, entre otras estructuras.

Es de señalar, que las brucelas que se albergan en el seno de las células, se encuentran protegidas de los antigenos

y a la acción de los antibióticos, lo que explica su persistencia, así como las recaídas.

Desde el punto de vista anatomopatológico, la reacción histica de la brucelosis consiste en la formación de granulomas, constituidas por células epiteliodes, células gigantes de Langhans y de de cuerpo extraño por linfocitos, infeferenciables de los sarcoidóticos y de los tuberculoides.

La B. melitensis es capaz de originar la supuración de los granulomas, con la aparición de abscesos, y la B. suis la formación de caseosis central, que puede calcificarse. En la brucelosis aguda es frecuente hallar granulomas por biopsia en el hígado (espacio porta), médula ósea y otros órganos ricos en el sistema mononuclear fagocitotico, como en el bazo y ganglios linfáticos.

## 5. MANIFESTACIONES CLINICAS

Sistematizar la clínica de la brucelosis es objetivo difícil por el extremado polimorfismo de la enfermedad. Por otra parte, como sucede en otros procesos infecciosos, parece haberse modificado la expresividad clínica, siendo frecuentes los modos de presentación distinto a la clásica "fiebre ondulante", como consecuencia de los mejores medios de diagnóstico y a la precocidad en la instauración del tratamiento, que impide asistir a un ciclo febril completo.

Para establecer una correcta descripción de los caracteres clínicos que aparecen en la brucelosis, se ha optado por los distintos autores diversas clasificaciones sobre esta entidad nosológica.

WILSON y GERACI, desde un punto de vista ya estrictamente clínico, establecen que dentro del estudio clínico de la brucelosis hay que diferenciar tres formas: brucelosis asintomática, brucelosis aguda y brucelosis crónica.

Nosotros describiremos las formas de comienzo, así como las diversas manifestaciones en el periodo estado como la describen RODRIGUEZ TORRES Y FERMOSO GARCIA (1987).

5.1. Brucelosis asintomática.

WILSON y GERACI (1983) afirman que las infecciones asintomáticas contituyen la forma más frecuente de brucelosis.

Se han observado que aproximadamente el 50% de los empleados de plantas envasadoras de carne (GILBERT, 1980), asi como el 33% de los veterinarios, presentaban titulos serológicos positivos para la brucelosis, sin que hubieran sufrido infección aguda previa alguna.En los niños, es frecuente obsevar las formas asintomáticas.

5.1. Formas de comienzo.

El período de incubación que presenta la enfermedad, suele ser de 5 a 14 dias, aunque a veces va a pasar varios meses entre el momento de la infección, y la aparición de los primeros sintomas. RICO IRLES y SALAZAR-VILLALOBOS, afirman que dicho periodo de incubación resulta en ocasiones muy dificil de precisar, especialmente en los pacientes que viven en medios rurales expuestos a la infección (RICO IRLES y SALAZAR-VILLALOBOS, 1977).

La brucelosis puede comenzar:

- Como una enfermedad febril, de incio agudo, con sudoración profusa, desproporcionada a la fiebre, de predominio nocturno, y junto a distinas algias de localización articular, sin artritis, muscular o neuralgica. Es la forma clásica de

comienzo septicémico o "fiebre álgico-sudoral".

La fiebre suele aumentar paulatinamente a lo largo de los días, suele presentar remisiones matutinas, acompañándose de una profusa sudoración de olor peculiar a "paja mojada" (SANS -SABRAFEM, 1978).

- Como una enfermedad febril, de inicio menos abrupto, con escasa afección del estado general. La fiebre puede ser vespertina, o continua, pero no merma, en principio, la actividad del paciente. Suele plantear múltiples diagnósticos diferenciales como un cuadro de "fiebre de origen desconocido".

La mayoría de los autores que han efectuado trabajos de investigación sobre la brucelosis, han encontrado en sus enfermos un alto porcentaje en los que se presenta la fiebre. Como título indicativo mencionaremos a CONDE YAGUE y cols. que la encuentran en un 97,53%, RIVERO PUENTE y cols. en un 97%. (1981; 1982).

De forma general, la fiebre va a presentarse de manera ondulante, sin embargo algunos autores encuentran en el estudio de sus pacientes con bruecelosis un predominio de fiebre en picos (41,77%) y continua (34,17%) frente a la ondulante 24,05% (CONDE YAGUE y cols., 1981).

A la fiebre suelen seguirle en frecuencia de

presentación e intimamente ligada a ella los sintomas generales que engloban la astenia, anorexia, malestar general, etc.

- Otra forma de inicio es como un proceso articular, de carácter migratorio, con escasa o nula actividadd inflamatorio local, sin hipertermia objetivable y quizás con una discreta alteración del estado general (RIVERA PEREZ y cols., 1979; WILSON y GERACI, 1983).

- Como una enfermedad sistémica, de inicio variable, de instauración aguda o lenta y cuya clinica dependera de la topografia de la afección (sistema nervioso, aparato locomotor, hepatopatia, aparato genitourinario).

- Como una enfermedad latente, en la que le diagnóstico se establece por un hallazgo exploratorio (hepatomegalia, esplenomegalia,...), radiológico (espondilodiscitis, sacroileitis, osteomielitis) o de laboratorio, al efectuar un estudio en profesionales de riesgo.

En este grupo se incluirá la inoculación accidental de vacuna Abortus-B19, caso de existir es muy leve y se resume en cefalea mal definida con febricula.

5.2. <u>Periodo de estado</u>.

A partir de las diversas formas de comienzo señaladas,

o como una recidiva de una brucelosis previamente diagnOósticada y a veces tratada, es posible deslindar dos formas clinicas de brucelosis en la fase de estado; La forma septicémica y las formas viscerales.

5.2.1. Forma septicémica o febril, con predominio de la sintomatologia general sobre la patologia de órgano o sistema que, sin embargo también suele estar presente. El sintoma fundamental, sin duda, es la fiebre, con las caracteristicas ya mencionadas anteriormente.

Constituyen la fiebre, hiperhidrosis y las algias, la triada clásica de la brucelosis aguda.

Otras manifestaciones clinicas registrables en esta forma de la enfermedad son las siguientes;

- Esplenomegalia y hepatomegalia, que se recoge por distintos autores en porcentajes variables en 20% y 60%. blanda, lisa, indolora, de discreto tamaño.

- Adenomegalias, que en esta forma de brucelosis suele ser de pequeño tamaño. Se evidencia con frecuencia variable (10-20%) en las distintas series, y se localizan en la región axilar, inguinal o lataero-cervial, como adenopatias rodaderas o indoloras.

- La bradicardia relativa es un dato significativo.

5.2.2. Formas viscerales, donde predominan los síntomas y signos focales o de sistema. Las formas viscerales pueden ser: agudas, como endocarditis, meningitis y artritis, o crónicas como la neuropatia, nefropatia o hepatopatia.

Estas formas suelen recogerse por otros autores como complicaciones, pero nosotros al igual que RODRIGUEZ TORRES (1987), preferimos valorarlas como formas anatomo-clinicas, y no como complicaciones, no siendo infrecuente que constituyan la forma de comienzo de la enfermedad.

La presentación de las diferentes manifestaciones puede hacerse de modo aislado como acabamos de señalar, o integrandóse en la forma septicémica anteriormente citada. Teoricamente se pueden afectar todos los sistemas de la economia., pero las formas anatomoclinicas mas llamativas y frecuentes son :

5.2.2.a. Aparato locomotor.

La afectación osteoarticular está presente en más de la mitad de los enfermos de brucelosis. En un estudio sobre 100 pacientes con brucelosis, se encuentra que las complicaciones osteoarticulares son las que aparecen con mayor frecuencia (34%), siendo la espondilitis y la sacroileitis las

localizaciones más observadas (COLMENERO y cols., 1986)

Se describen bursitis agudas en bolsas olecranenas o prerrotulianas, tenosinovitis de flexores o extensosres y, sobre todo, artritis que afectan a las articulaciones periféricas (rodillas, codos, hombros, coxofemorales) o de la columna vertebral.

Las artritis agudas periféricas, mono u oligosintomáticas, son de curso agudo y muestran signos inflamatorios, siendo frecuentes la existencia de derrame articular, en la que se debe investigar la presencia del microorganismo, estando unas veces presentes (verdadera artritis septica) y otras veces no (artritis reactivas).

La localización coxofemoral presenta el cuadro clinico unilateral de una coxalgia con la que plantea el diagnóstico diferencial más importante.

La sacroileitis brucelar afecta preferentemente a varones jóvenes, y son tardias en su presentación. El cuadro clinico no apunta hacia la etiologia, siendo necesaria la investigación radiológica y bacteriológica. En la actualidad la afección sacroiliaca es tanto o más frecuente que la espondilitis.

La espondilitis brucelar es forma de aparición inicial

o precoz de la enfermedad. Afecta sobre todo a la región lumbar, y suele referirse la inflamación a una o dos vertebras traduciendóse en dolor intenso, de predominio nocturno y que se alivia o cede solamente con el reposo absoluto.

La imagén radiológica más conocida es la que corresponde a la epifisitis del angulo antero-superior del cuerpo vertebral descrito por PEDRO PONS (1972), y que adopta imàgenes distintas dependiendo del territorio vertebral afecto.

En el resto de las articulaciones afectas, siempre articulaciones de carga, es valorable, al menos como se señala en la literatura, la importancia de un factor mecánico en su localizacion (BALCELLS GORINA y ROTES QUEROL, 1971).

El espacio intervertebral suele estar estrechado y las carillas articulares, superior y/o inferior, erosionados. La espondilitis con absceso puede condicionar una compresón medular, de dificil diagnóstico etiológico (RICO IRLES y SALAZAR ALONSO-VILLALOBOS, 1977).

La afección ósea extra-vertebral, como osteomielitis brucelar, de curso agudo o crónico, muestra incidencias muy escasas y puede localizarse en diverso huesos como costillas, cráneo, metáfisis de huesos largos, iliacos, metatarsianos, falanges o calcáneo.

5.2.2.b. Sistema Nervioso.

El acusado neurotropismo de la B. melitensis sugiere que la localización nerviosa debería ser frecuente, pero la incidencia porcentual de la neurobrucelosis como forma de expresividad clínica, es en la actualidad rara (WILSON y GERACI,1983), siendo inferior al 5% en la mayoría de las series.

Se admiten diversas posibilidades patogénicas, desde la invasión directa de la fase bacteriémica hasta los mecanismos tóxicos o de tipo inmunológico tardío.

Las formas anatomoclínicas descritas son numerosas, afectando prácticamente a la totalidad del sistema nervioso central y periférico. Los cuadros más frecuentes son los meningeos o meningoencefalíticos y los síndromes medulares aislados o bien como meningomielitis o meningoradiculoneuritis.

Otras manifestaciones neurológicas son (RICO IRLES y SALAZAR ALONSO-VILLALOBOS, 1977):

- Vasculomeningoencefalitis subaguda-crónica angioespástica, descrita por JAMBON y RIMBAUD, con sordera, crisis hemidesistésicas y reacción meningea.

- Ciática brucelar,

especialmete importante por su frecuencia en las formas evolutivas (10 al 20% de los pacientes).

En un análisis retrospectivo la distribución anatomoclinica en nuestro medio, sobre un total de 293 enfermos con brucelosis, solamente 14 se incluyeron como neurobrucelosis(RODRIGUEZ TORRES,1987).

5.2.2.c. Hígado y brucelosis.

Puede aparecer en la forma aguda de la enfermedad y se considera como una "forma reaccional inespecifica".Otra hepatopatia mucho más infrecuente es la granulomatosis hepática, que puede presentarse de modo aislado o acompañado a un síndrome febril, osteoarticular u otro. Excepcionalmente existe ictericia o se altera de forma importante la función hepática, con citolisis y colestasis.

Diversos autores ponen de relieve la elevada incidencia de afectación hepática cuando es producida por la B. suis, escasa incidencia en España (GOMEZ AGUDO, 1982).Las calcificaciones intrahepáticas, como forma natural de evolución del proceso, puede ser de ayuda diagnóstica. Los granulomas son más pequeños y estan peor delimitados que los tuberculosos, y asocian un infiltrado portal de células redondas con fibrosis de la zona.

La B. abortus es el responsable más común de esta hepatopatía, mientras que B. suis es más invasora, pudiendo producir supuración hepática en ocasiones (CONDE YAGUE y cols., 1981).

Aunque se ha descrito la evolución hacia una cirrosis hepáticas, ésta es excepcional.

La esplenomegalia es fundamentalmente hiperplásica, pero en casos en que hay cirrosis hepática, tiene también un componente congestivo. El aspecto radiológico característico es el de esplenomegalia con múltiples lesiones calcificadas, o calcificaciones concéntricas en forma de ojo de buey (WILSON y GERACI, 1983).

5.2.2.d. Aparato Circulatorio.

En general las manifestaciones cardiacas de la brucelosis son raras (CUISINER y cols., 1982). Si bien es cierto que las endocarditis melitocócias son bien conocidas, con lesiones preferentemente en válvula aortica, de pronóstico sombrío. El cuadro clínico es el de una endocarditis lenta, con manifestaciones derivadas de la propia lesión valvular y otras causadas por émbolos a diversos territorios.

La pericarditis asociada a endocarditis ha sido tambien descrita, siendo más rara la forma de pericarditis brucelar como

única afección de la enfermedad.

SANCHEZ RODRIGUEZ y cols. (1983) en un estudio sobre 100 casos de brucelosis, encuentran dos casos de pericarditis aguda en el curso de una brucelosis aguda, y otro en la fase crónica.

5.2.2.e. Aparato Genitourinario.

B. suis es el agente etiológico más frecuente de la brucelosis renal, caracterizada a menudo por abscesos perinefríticos o por una pielonefritis granulomatosa crónica. Las brucelas pueden aislarse a partir de cultivos de orina (WILSON y GERACI, 1983)

La infección por B. suis, se asocia a trastornos testiculares con mayor frecuencia que la producida por otras especies, aunque no suele provocar esterilidad en varones (SANCHEZ RODRIGUEZ y cols., 1983)

Otras posibilidades descritas, aunque muy raras, son los nódulos epididimarios aislados, salpingitis, quistes ováricos y cistopielitis .

Han existido multitud de opiniones con respecto a las consecuencias de la brucelosis durante el embarazo, aunque la mayoría de los autores consideran que la infección placentaria

no es frecuente, y que su incidencia no es, probablemente, mayor que la de cualquier otra infección bacteriana que curza con bacteriemia.

5.2.2.f. Oras localizaciones.

- La neuropatia brucelar es rara; puede existir formas laringeas y traqueobronquiales, asi como neumonias y pleuroneumonias con derrame tipo exudado o empiema. Tambièn la adenopatias hiliares y/o mediastinicas pueden demostrarse en la brucelosis

- De manera infrecuente, y sobre todo en la brucelosis de los profesionales, se han recogido diversas lesiones dermatológicas con exantema, púrpura y dermatitis ampollosas con vesiculas, en cuyo contenido se puede aislar brucelas.

- También se ha descrito una miositis granulomatosa brucelar, de muy escasa incidencia y cuyas caracteristicas clinicas son el dolor y la topografia rizomélica y simétrica.

- Desde el punto de vista oftalmológico, la brucelosis puede originar oftalmoplejia o neuritis óptica, como expresión de neurobrucelosis; además de úlceras corneales, hemorragias retinianas, iritis o iridociclitis.

5.2.3. Sindrome Biológico.

En la forma aguda puede registrarse una anemia normo o microcítica, hipocrómica, ferropénica con leucopenia granulocitopénica. También en el inicio del proceso se puede registrar una moderada leucocitosis. La anemia hemolítica es una eventualidad de la brucelosis.

Puede existir trombopenia a veces responsable de alteraciones hemorrágicas. La trombopenia unida a leucopenia neutropénica puede plantear diagnóstico diferencial con hemopatías primarias. El mecanismo más aceptado para la disminución de plaquetas, con médula ósea normal, reside en una alteración inmunológica a partir de la existencia de anticuerpos antiplaquetas, sin olvidar el papel que el hiperesplenismo puede desempeñar.

La velocidad de eritrosedimentación celular puede elevarse de modo discreto, salvo en las formas hiperagudas con gran inflamación y/o necrosis, en la que puede ser superior a 60 mm Hg.

El laboratorio puede aportar otros muchos datos patológicos de la brucelosis, reflejo o medida de distintas anomalías funcionales de diferentes órganos.

## 6. DIAGNOSTICO.

La sospecha clínica de brucelosis, no siempre evidente ante el polimorfismo de la enfermedad, no es suficiente para el diagnóstico, siendo el uso de métodos de laboratorio una etapa imprescindible.

Podemos clasificar los métodos empleados en el mismo en dos grandes grupos: (RODDRIGUEZ TORRES, 1988)

- Diagnóstico directo o bacteriológico: consiste en la demostración e identificación del microorganismo causal.

- Diagnóstico indirecto: encargado de la búsqueda de anticuerpos circulantes específicos, o la demostración de un estado de hipersensibilidad a la infección.

### 6.1. Diagnóstico bacteriológico.

Las brucelas pueden aislarse de muy diversos productos patológicos, pero el método de elección es el hemocultivo. El aislamiento de los líquidos orgánicos, derrames, LCR, tiene interés en ciertas manifestaciones localizadas de la enfermedad.

La brucelemia es más constante en las primeras fases de la enfermedad, sobre todo en las presentaciones agudas, y menos en la forma de evolución crónica, en las que las brucelas se

hallan acantonadas en bazo, higado, médula ósea, etc. y pasan al torrente circulatorio de forma intermitente.

En la fase aguda de la enfermedad la positividad del hemocultivo es la regla, siendo positivo en un 85-100% (RODIRIGUEZ TORRES, 1988). Sin embargo, para otros autores la rentabilidad no es tan alta. COLMENERO y cols. (1986) obtuvo 62% de postividad.

Las diferencias de rentabilidad del hemocultivo pueden ser debidas, al menos en parte, a que en muchas osaciones las muestras no son extraidas tras un tiempo suficiente de supresión antibiótica, sembradas todas ellas en un medio idóneo y mantenidas el tiempo suficiente; resultando el aislamiento del germen difícil (BAQUERO, 1971; COLMENERO y cols., 1986).

El hemocultivo debe practicarse antes de comenzar el tratamiento antibiótico, y si ello no fuera posible, suspendiendo la administración de antimicrobianos durante 48 horas.

Las brucelas crecen muy lentamente, por lo que los cultivos deben incubarse durante un tiempo no inferior a 30 dias, y preferiblemente durante 45 dias (TORRES DIAZ, 1988).

El método Castañeda, en el que la sangre se siembra en un frasco bifásico con medio liquido y medio sólido, es el

procedimiento de elección.

Los hemocultivos deben incubarse a 37° C y en atmósfera con un 10% de $CO_2$, bien porque la lleve el propio frasco, lo cual es absolutamente deseable, o mediante la utilización de una estufa que ofrezca esta posibilidad.

La lentitud del crecimiento obliga a no cosiderar ningún hemocultivo como negativo antes de las 4 semanas, siendo preferible mantenerla durante 6 semanas (ARIZA y cols., 1983).

El crecimiento de brucela en frasco de Castañeda es muy característico, en forma de numerosas colonias, convexas, translúcidas, de color miel y lisas.

6.2. Diagnóstico serológico.

El diagnóstico indirecto mediante la demostración de anticuerpos especificos en el suero del enfermo es extremadamente útil en la brucelosis humana.

También forma parte del diagnóstico indirecto la utilización de pruebas intradérmicas que demuestren una hipersensibilidad retardada a preparaciones brucelares. Sin embargo, su uso en el diagnóstico humano y aún en encuestas epidemiologicas carece de justificación (TORREZ DIAZ, 1988).

En el momento actual, el diagnóstico serológico de la brucelosis, en la práctica, reposa sobre las pruebas de seroaglutinación, de Coombs anti-Brucella y de rosa de Bengala.

Las pruebas serológicas convencionales se realizan con bacterias enteras, y por ello, detectan anticuerpos (IgM, IgG, e IgA) frente al S-LPS. La especie utilizada como antigeno es diferente, puesto que la respuesta serológica es similar sea cual fuere la brucela causal; habitualmente se utiliza B. abortus, siendo obligado que la cepa que se utilice esté en fase lisa.

La reacción de aglutinación es la pueba utilizada más ampliamente (FOZ, 1981; RODRIGUEZ TORRES. 1987). Sigue teniendo gran valor y es de realización sencilla.

Su práctica, sin embargo, requiere el empleo de antigenos de calidad, preparados de forma rigurosa y adecuadamente estandarizados. La existencia de un suero patrón internacional de referencia permite al laboratorio comprobar los antigenos aglutinantes y expresar los resultados en unidades internacionales (UI).

La aglutinación es bastante especifica, por lo que los titulos positivos indican un contacto previo con brucelas, pero la definición brucelar activa tropieza con serias dificulatades. Un titulo de 1/80 (~ 160 UI) en medio urbano o en zona endémica, en ausencia de historia previa, es altamente

indicativo de brucelosis.

En las zonas rurales endémicas, la interpretación debe ser más cauta. Ante titulos más bajos se hace necesaria la práctica de la prueba de Coombs y la repetición tras una semana.

En la fase aguda de la enfermedad, la aglutinación ofrece en general titulos altos (>1/320). No es muy frecuente, pero puede ocurrir un fenómeno de prozona con negatividad de la reacción con el suero poco diluido y positividad en diluciones más altas.

La evolución de los titulos de aglutinación en los casos de brucelosis aguda con resultado satisfactorio tras tratamiento en un total de 197 sueros correspondientes a 53 casos de brucelosis fue la siguiente (RODRIGUEZ TORRES, 1987a):

- 33 de 47 sueros estudiados durante el primer mes presentaban titulos >1/640. y los restantes, titulos menores pero también significativos. Los titulos muy altos (1/2560) desaparecen rápidamente, siendo escasos a partir del segundo mes.

- Hacia el cuarto mes se inició un franco descenso de los titulos en conjunto, y a partir del sexto mes más de la mitad de los sueros (27/51) muestran titulos inferiores a 1/80.

- La negativización completa de los titulos no es, sin embargo, muy frecuente en el curso de 14 meses. En esta serie sólo ocurrió en 7 de los 53 enfermos estudiados. Por otra parte, es frecuente el mantenimiento de titulos superiores o iguales a 1/40 después del sexto mes, persistiendo durante más de un año algunos titulos de 1/60 y 1/80.

Los titulos de aglutinación observados en un medio altamente endémico, son algo superiores a los señalados por FOZ en Barcelona (1981); por otra parte, la negativización en ausencia de evidencia clincia de actividad es más tardia.

El hecho, repetidamenate observado por RODRIGUEZ TORRES (1988), de mantenimiento de algunos titulos superiores o iguales a 1/80 un año después del comienzo de la enfermedad y sin sintomatologia clinica, obliga en ambiente endémico a ser prudenate en la significación diagnóstica.

COLMEMERO y cols. (1986), al igual que otros autores, consideran aconsejable elevar los titulos serológicos a 1/160 en zonas hiperendémicas, para no incluir como casos, a pacientes con titulos residuales de enfermedad pasada clinica o subclinicamente, ya que a veces las aglutinaciones en tubo permanecen positivas 12-24 meses después del brote agudo.

La brucelosis de evolución crónica muestran con mucha frecuencia titulos bajos o negatividad de la aglutinación. Este

hecho, biene conocido, obedece a la presencia de anticuerpos no aglutinantes detectables por la prueba de Coombs, que se convierte asi en un complemento muy adecuado y necesario a la aglutinación.

**El rosa de Bengala** es una prueba rápida de aglutinación en placa,que se introdujo para la detección de la enfermedad en los animales. El antigeno es una suspensión de brucelas, en tampón de lactato a p.H 3,6, teñidas con rosa de Bengala.

Se ha generalizado en los últimos años, como prueba de det-cción, por su simplicidad y concordancia con la aglutinación (DIAZ, 1977).

Los resultados del rosa de Bengala deben confirmarse por una aglutinación convencional, y presentan las mismas limitaciones que los resultados de ésta. La rapidez y sencillez del método permite la instauración temprana de tratamiento en espera del resultado de otras pruebas, siendo muy útil en las brucelosis agudas.

**La prueba de Coombs anti-Brucella** permite la demostración de anticuerpos no aglutinantes. Es una técnica de realización más compleja e igualmente especifica.

El titulo ha de ser como minimo el de la aglutinación y habitualmente es mucho más elevado (de 4 a 100 veces). La prueba de Coombs muestra titulos altos en la brucelosis de

evolución crónica o prolongada, en las que con frecuencia la aglutinación es negativa o muestra titulos bajos.

La definición de titulo significativo de infección brucelar activa presenta las mismas dificultades que hemos señalado para la aglutinación. Un titulo de 1/160 en medio urbano o zona no endémica, en ausencia de historia previa, es muy indicativo.

Con considerable frecuencia en medio endémico se debe identificar la actividad brucelar en pacientes que desde hace tiempo, meses o años, relatan una historia de brucelosis, con sintomatologia larvada.

En los enfermos con infecciones por Yersisnia enterocolitica serotipo O:9 y en los vacunados frente a Vibrio cholerae pueden existir reacciones serológicas postivas por la comunidad antigénica con Brucella, en general a titulos bajos. En cualquier caso, ambas circunstancias son excepcionales en nuestro pais.

La inmunofluorescencia indirecta (DAZA, 1981) se ha preconizado por diversos autores. No está estandarizada y su lectura e interpretación resulta muy subjetiva. Según RODRIGUEZ TORRES (1988) cuando utiliza un conjugado anti-Ig total no aporta ventajas teóricas sobre la prueba de Coombs.

Las pruebas de ELISA permiten diferenciar las distintas clases de Ig y seguir su evolución, lo cual resulta sin duda muy importante en la historia natural de la infección brucelar.

Un problema fundamental de estas pruebas es el antigeno a utilizar. Algunos trabajos han utilizado bacterias enteras, antigeno corpuscular, con conjugado de Ig total, lo cual parece poco fundamentado teóricamente (HUNTER y cols., 1986).

Las experiencias más prometedoras utilizan como antigeno S-LPS purificado, y parece conveniente que las experiencias se amplien al estudio de anticuerpos frente a los haptenos y antigenos proteicos (HUNTER y cols., 1981).

Las pruebas de ELISA para el diagnóstico de la brucelosis se están ensayando en diferentes laboratorios (MAGEE, 1980) y no están comercializadas. Parece prudente esperar a una mayor experiencia con ellas antes de proponer la substitución de las pruebas clásicas.

## 7. TRATAMIENTO.

Las bases del tratamiento de la brucelosis se encuentran indirectamente en relación con la epidemiología y la fisiopatología de la enfermedad, mientras que dependen directamente de los datos farmacológicos y antibacterianos de los medicamentos elegidos entre aquellos antibióticos más eficaces. La conducta terapeútica debe adoptarse en función de la forma clínica de la enfermedad y del terreno sobre el que se manifiesta (MICOUD, 1984).

La brucela es sensible "in vitro" a la mayoría de los antibióticos, pero el carácter intracelular del germen, que sobrevive en el interior de los macrófagos del SRE, hace que una gran parte de estos fármacos sean ineficaces (ARIZA. 1984).

### 7.1 Antibióticos de escasa significación

Dentro de ellos pueden destacarse : la ampicilina, única penicilina con notable actividad en vitro frente a las diversas especies de brucelas (HALL Y HANNION, 1970).

La actividad in vitro de la amoxicilina es algo superior. Se han descrito como sinérgica la asociación de amoxicilina, rifampicina y aminoglucósidos (GWYNN y ROLINSON, 1980).

A pesar de todo ello, los estudios experimentales de otros autores en brucelosis humana, fueron decepcionantes (PHILIPPON y KAZMIEREZAK, 1972)

El cloranfenicol, posee una actividad in vitro relativamente buena. La experiencia clinica acumulada es escasa, constatándose un alto porcentaje de recaidas (SPINK, y cols., 19-1)

7.2. Antimicrobianos fundamentales.

Las tetraciclinas, la estrptomicina y la rifampicina se consideran en la actualidad, los antimicrobianos fundamentales para el tratamiento de la brucelosis humana.

7.2.1 Tetraciclinas.

Son agentes bacteriostáticos, dotados de una actividad antibrucelar excelente, con gran penetración intracecular, considerados los antibióticos más eficaces. A pesar de ello no consigue erradicar totalmente los gérmenes en situación intracelular, lo que explica el porcentaje de recidivas que conlleva la monoterapia.

Puede afirmarse que la actividad de la dimetilclortetraciclina, el clorhidrato de tetraciclina y la oxitetraciclina es muy similar, algo inferior la clortetraciclina y superior la doxiciclina.

Las tetraciclinas administradas por via oral se absorben rápida y casi completamente (93%) en el caso de la doxiciclina.

Se utiliza clorhidrato de tetraciclina a la dosis de 500 mg cada 6 horas por via oral. La constatación de que la doxiciclina, a la dosis de 100 mg/12 horas produce resultados similares al clorhidrato de tetraciclina en las pautas de 45 dias de duración, ha condicionado utilizarla como tratamiento sistemático de elección.

7.2.2. Estreptomicina.

La administración más importante en la brucelosis, va a ser la asociación a las tetraciclinas, lo que ha hecho que la O.M.S. siga recomendando esta asociación en la actualidad (O.M.S., 1975).

Hay que señalar que si bien para RICHARDSON y HOLT la estreptomicina ejercen una acción facilitadora de la penetración intracelular de las tetraciclinas, (RICHARDSON y HOLT, 1962), otros autores afirman que disminuyen este paso en un 50% (ROUX y OBERTI, 1975).

A pesar de estas incertidumbres, la mayoria de los autores han encontrado en sus estudios clinicos, que la

asociación tetraciclina-esttreptomicina produce una tasa inferior de recidivas.

La estreptomicina normalmente se administra a la dosis de 20mg/Kg/dia (dosis máxima 750 mg, 1 g en personas más de 60 años).

7.2.3. Rifampicina.

Ha mostrado una buena actividad "in vitro", lo que unido a una notable penetración intracelular, le señalan como un antibiótico de primera linea en el tratamiento de esta enfermedad (GUTIERREZ y cols., 1982).

Las experiencias clinicas iniciales de los autores italianos y argentinos en brucelosis humana fueron prometedores, aunque señalaron la necesidad de utilizar pautas prolongadas para evitar la presentación de recaidas.(PANDOLFO y VILLEGAS, 1970).

La tendencia general ha sido utilizar dosis iniciales de 15 mg/Kg/dia (900 mg/dia de promedio), disminuyendo posteriormente a 600 mg/dia, hasta completar 45 dias de tratamiento.

7.2.4. Trimetropin-sulfametoxazol.

En los años 70, numerosos trabajos destacaron la eficacia de esta asociación en el tratamiento de la brucelosis humana (LAL y cols., 1970). Los estudios de sensibilidad in vitro indican que las brucelas son sensibles exclusivamente al sulfametoxazol y resitentes al trimetropin.

Por todo lo anterior, el papel del cotrimoxazol, es hoy en dia de escasa importancia, pues está bien demostrado que su eficacia es muy inferior a la de la combinación clásica (ARIZA y cols., 1983)

7.3. Pautas de tratamiento.

El régimen terapeútico que se utiliza es la asociación de la doxiciclina 200/dia por via oral durante 45 dias con estreptomicina 1 grmo/dia intramuscular durante 15 dias. Los fallos terapeúticos con esta asociación varia de unos autores a otros. Asi encontramos que RODRIGUEZ TORRES obtiene un número total de fallos terapeúticos del 7,6% y RODRIGUEZ ZAPATA un 5% (RODRIGUEZ TORRES, 1983; RODRIGUEZ ZAPATA y cols., 1983).

La asociación de rifampicina y tetraciclinas es menos utilizada. Los fracasos terapeúticos son muy similares a la anterior asociación. Ambos regimenes presentan una excelente tolerancia y pocas recidivas.

Como inconvientes de la rifampicina cabe señalar su elevado costo y los imprevisibles efectos de su utilización

nasiva sobre la resistencia adquirida de M. tuberculosis, en un pais como el nuestro, en que ambas enfermedades, la tuberculosis y la brucelosis son tan frecuentes.

Por tanto la rifampicina estaria indicada como monoterapia en el embarazo, en niños menores de 7 años bien sola o asociada a cotrimoazol y como tratamiento alternativo en asociación con tetraciclinas (ARIZA CARDENAL y cols,1983); aunque otros autores ratifiquen o no las posibles ventajas de la asociación con rifampicina (BERTRAND y cols, 1980).

En casos graves, como endocarditis y algunos casos de afección del SNC, la adición de rifampicina a la combinación de tetraciclinas y estreptomicina pueden proporcionar una mayor actividad bactericida (ARIZA, 1985).

Los efectos secundarios hallados por COLMENERO, en una serie de 100 casos de brucelosis en tratamiento con tetraciclinas y estreptomicina fueron: 16% de malestar gástrico, 6% de fotosensibilidad, debidas a las tetraciclinas, y 1% de fiebre medicamentosa y 1% de ototoxicidad por la estrptomicina (COLMEMERO y cols., 1986).

Es probable que, en un futuro nuevos antibióticos puedan ofrecer otras alternativas terapeúticas.

## A. III.- SISTEMA HLA.

1. INTRODUCCION E HISTORIA.

Durante la primera mitad de este siglo GORER y SNELL, efectuaron trabajos pioneros sobre transplantes cutáneos y tumorales en ratones, viéndose que el rechazo de los mismos venia determinado por la disparidad en unos antigenos que formaban un sistema denominado H2.

Entre 1920 y 1950 se pusieron de manifiesto por un grupo de investigadores italianos, la existencia en el suero de substancias leucoliticas. Estos trabajos impulsaron la búsqueda de un sistema similar en el hombre.

DAUSSET Y WEGENER en 1952, al descubrir la presencia de aglutininas en el suero de enfermos politransfundidos, de origen inmunológico, sentaron las bases para el descubrimiento de unos antigenos de superficie leucocitarios, hoy llamados HLA (human lymphocyte systema).

Posteriormente definieron el primer antigeno leucocitario, que denominaron Mac. Pero a pesar de haber sido reconocidos estos importantes hallazgos no se produjeron avances significativos hasta la aplicación de métodos estadisticos para el análisis de los resultados serológicos obtenidos, describiéndose de esta forma el primer sistema de Grupos leucocitarios.

Este estudio fué realizado enfrentando sueros de multiparas con capacidad leucoaglutinante a un panel de leucocitos de sujetos sanos, efectuándose el estudio estadistico entre el factor de reacción de cada suero y el compartimento de los demás.

Esto fué realizado teniendo encuenta que las aglutininas tambien podian producirse en el curso de un embarazo por estimulo feto-materno, tal como habian observado simultáneamente VAN ROOD y PAINES y PELFS. Se pensó por tanto que los anticuerpos iban dirigidos contra antigenos linfocitarios fetales heredados por el padre (VAN ROOD, 1959; PAINES, 1958).

Más tarde, VAN ROOD, usando métodos estadisticos y tablas de contigencia 2x2, demostró la existencia de un segundo locus que codificaba un antigeno linfocitario, que denominó locus FOUR, con dos alelos, 4a y 4b. Su suposición inicial de que se trataba de un simple polimorfismo con dos alelos, se vio pronto corregida al detectarse varios alelos adicionales del locus FOUR.

PAYNE y cols., confirmaron la existencia de los loci previamente descritos por DAUSSET Y VAN ROOD, añadiendo además nuevos antigenos.

Pero el mayor estímulo para el estudio de los antigenos, parte de la gran importancia que cobraron los transplantes renales, al observarse que cuando estos se realizaban entre gemelos univitelinos, la supervivencia eran superior a los que se realizaban entre sujetos que no lo eran, ya que en los primeros el huésped y el receptor tenian antigenos idénticos.

Por ello, numerosos laboratorios de inmunologia se dedicaron al estudio de estos antigenos, pudiendo de esta forma aunar criterios lo que permitió agrupar estos antigenos en un solo sistema denominado en principio HL-1, más tarde designado como HL-A (Hum leucocyte Group A).

El progreso en el conocimiento del sistema HLA se debe a las reuniones internacionales sobre histocompatibilidad (Horskshop), celebradas periódicamente, donde son aceptados los nuevos antigenos descubiertos y se realizan intercambios de antisueros y células homocigóticas para el tipaje. Asi mismo, se analizan y clasifican los antigenos que son aceptados provisionalmente. La primera reunión fué organizada por B. AMOS en 1964.

En cada uno de los diferentes Horskshop celebrados hasta ahora, se han ido unificando criterios y denominaciones tras confrontar los trabajos realizados, siguiendo la misma metódica en los diferentes laboratorios. De este modo, se definieron los locus A y B, anteriormente cococidos como "LA" y "locus FOUR".

DAUSSET y CEPELLI, mediante estudios familiares demostraron que ambos loci estan situados en el mismo cromosoma (CEPELLINI, 1967), siendo KISSENEYER NIELSEN el que primero descubrió un caso de sobrecruzamiento entre ambos loci, lo que representó una prueba de existencia de dos loci separados (KISMEYER, NIELSEN, 1976).

Nuevos datos obtenidos, hacian dificil mantener el modelo de los loci. Se dedujo la existencia de un tercer locus, HLA-C, del que se probo la existencia en los años setenta, mediante el uso de la técnica de Capping, basado en la movilidad de las proteinas en la membrana lipidica. En este nuevo locus se definieron 8 especificidades antigénicas, denominadas HLA-CW1 a HLA-CW8.

CEPELLINI en 1971. REBILLARD en 1972 y JONES y WOLFORD en 1975, presuponen la existencia de un quinto locus, cuyos antigenos pueden ser ser equivalente en el hombre a los antigenos Ia detectados en los linfocitos B del ratón.

Pero fué necesario para su conocimiento, el prefeccionamiento de técnicas de separación de linfocitos B, basadas en su capacidad de adherencia al nylon o bién a la separación con un gradiente de densidad, ya que los linocitos B periféricos representan tan solo del 10 al 20% de los linfocitos totales de sangre periférica.

En el Workshopo de 1977 se reconocieron 7 antigenos del locus DR, dejando otros en estudio. Se le denominó DR por su posible relación con el antigeno HLA-D, ya que sus alelos se encuntran situados en la región D/DR del SMH.

Se estableció asi aisno la relación de los antigenos del locus DR con algunas enfermedades que anteriormente se habian considerado ligados a otros locus previamente descritos.

En los últimos años se ha reconocido la existencia de otros sistemas de aloantigenos de células B, denominados sistema MT y MB, cuya significación no es bien conucida.

En el 8º Worskshop celebrado en 1980, en Los Angeles (EE.UU.) y organizado por TERASAKI, se dieron nuevas directrices y fueron aceptados nuevas asociaciones entre HLA y diversas enfermedades.

A partir de 1980 han continuado realizandose trabajos sobre el sistema HLA, lo que ha permitido el reconocimiento de nuevos antigenos durante el 9º Worskshop celebrado en 1884, bajo la dirección del ALBRIT.

Los antigenos de clase I situados en los linfocitos T fueron denominados provisionalmte, unos han pasado a su clasificación definitiva, mientras que otros se han mostrado como splits de antigenos ya clasificados. Todos ellos

corresponden a los locus A y B, ya que el C ha permanecido invariable.

Las moléculas de clase II ligados a linfocitos B. han sufrido algunas variaciones. Asi en el el locus DR ha sido adicionados nuevos antigenos, algunos de los cuales eran considerados del sistema MT.

Los antigenos MT y MB han sido integrados en el sistema HLA-DQ. Por último el primitivo grupo de antigenos SB ha sido identificado en 1984 como sistema DP.

Los antigenos del locus D reconocidos por cultivo mixto de linfocitos han visto incrementado su número, observándose asociados a especificidades DR, como ya venia definiendose locus D/DR, por su localización dentro del brazo corto del cromosoma 6.

## 2. ESTRUCTURA DEL COMPLEJO HLA.

El sistema HLA está constituido por cuatro loci de genes importantes (A,B,C,y D), agrupados muy próximamente entre si, y situados en el brazo corto del cromosoma 6 (ARNET, 1986).(Fig 5)

Los genes HLA A, B, C Y D ,determinan los antigenos glucoproteicos que se expresan en la superficie de todas las células nucleadas.

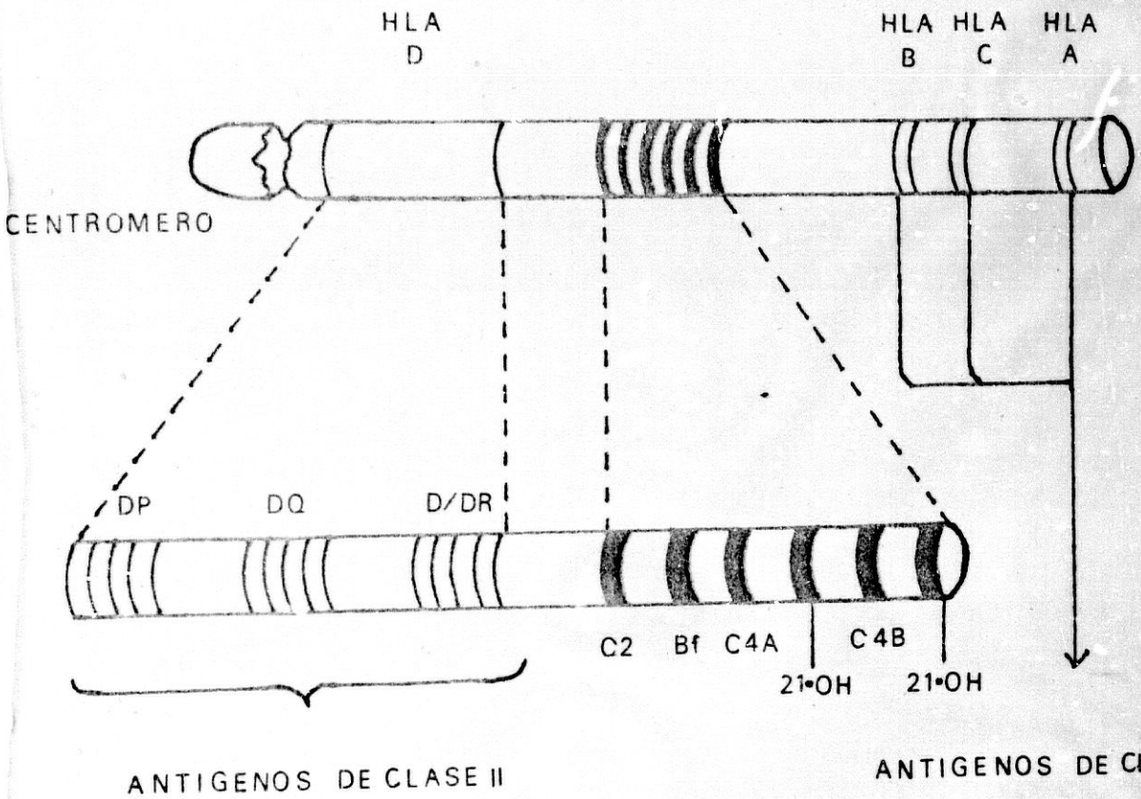
Las moléculas de clase I corresponden a los antigenos codificados por los loci A, B y C del sistema HLA y con las regiones H-2k y H-2D del MHC murino. También se denominan antigenos clásicos de transplante, porque los linfocitos T citotóxicos que ocasionan el rechazo de un injerto no histocompatible van dirigidos contra ellos. Estos antigenos se hallan presentes en todas las celulas nucleadas.

Las moléculas de clase I están compuestas por 2 cadenas polipeptidicas (fig.6): una pesada y otra ligera con pesos moleculares de 45.000 y 12.000 dalton, respectivamente.

La cadena ligera es la ß-2 microglobulina, cuyos genes no se hallan en la región HLA, sino en un cromosoma distinto (cromosoma 15 humano); sin embargo para que las moléculas de clase I puedan expresarse en la membrana, es imprescindible que la cadena pesada se pueda unir al la ß-2 microglobulina.

FIGURA 5

COMPLEJO GENETICO HLA



La estructura terciaria de la cadena pesada incluye tres dominios, denominados α1, α2 y α3, los dos últimos estabilizados por enlaces disulfuro intracadena (SIVASTAVA y cols., 1985). En los tramos α1-α2 radican las variabilidades de la secuencia de aminoácidos que determinan la aloantigenicidad, es decir las diferencias entre las moléculas de clase I de los distintos individuos de una misma especie.

Estos tres dominios, junto con la ß-2 microglobulina se hallan expuestos fuera de la superficie celular. En el dominio α-2 existen cadenas de hidratos de carbono. La cadena pesada presenta una porción hidrófoba que se inserta en la membrana celular, y una membrana o cola hidrófila en su extremo carboxiterminal que penetra dentro del citoplasma.

**Las moléculas de clase II** comprenden a los antigenos codificados por el locus D del sistema HLA (D/Q, DQ Y DP). Estan compuestos por 2 cadenas polipeptidicas ( Fig. 7), distintas denominadas α y ß, con un peso molecular de 32.000 y 28.000 dalton respectivamente. Ambas cadenas poseen deplegamientos, formando sendos dominios globulares, denominados α1 y α2 y ß1 y ß2; todos ellos, excepto el α1, se hallan estabilizados por enlaces disulfuro intracadena (TROWNSDALE y cols., 1975).

FIGURA 6

ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS DE CLASE I

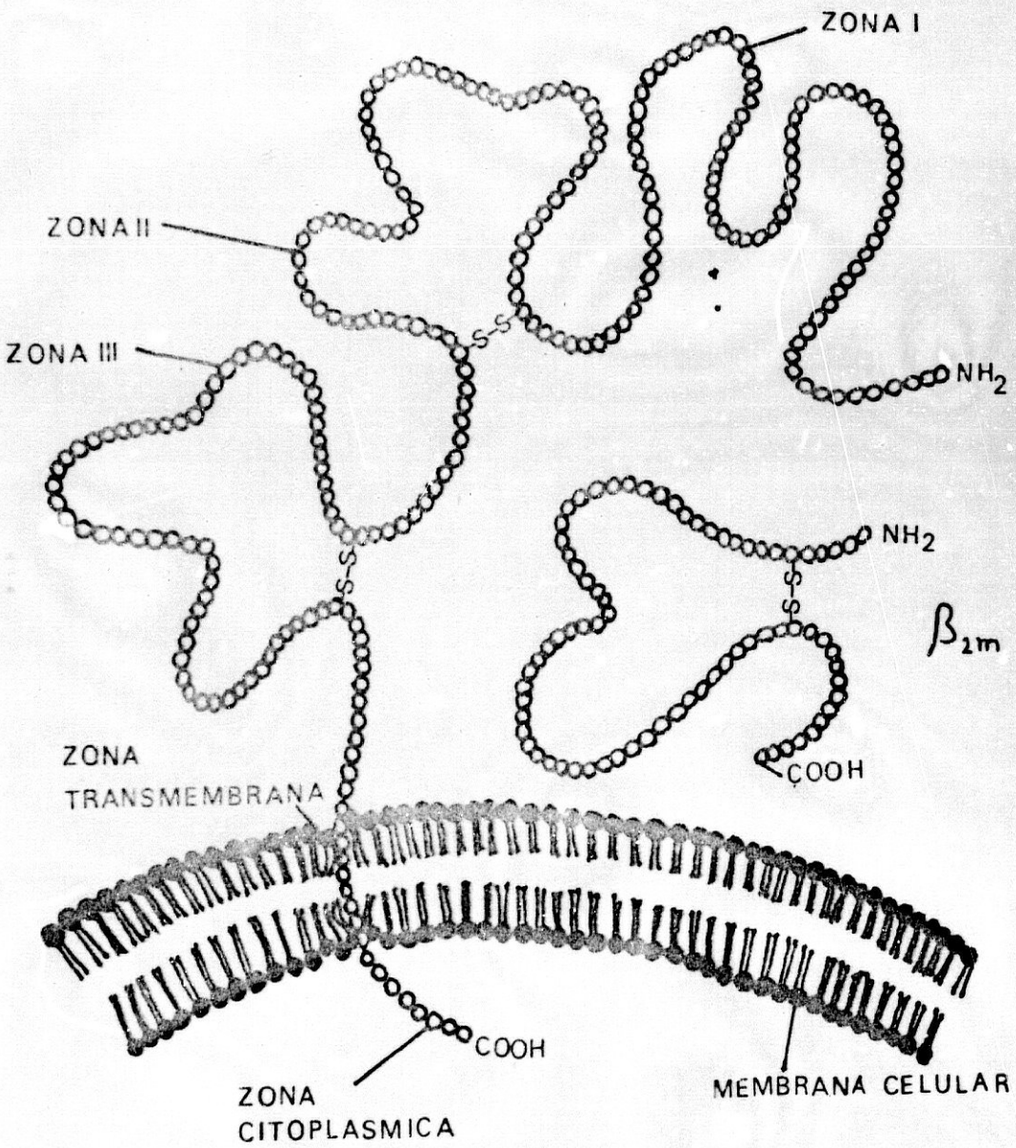
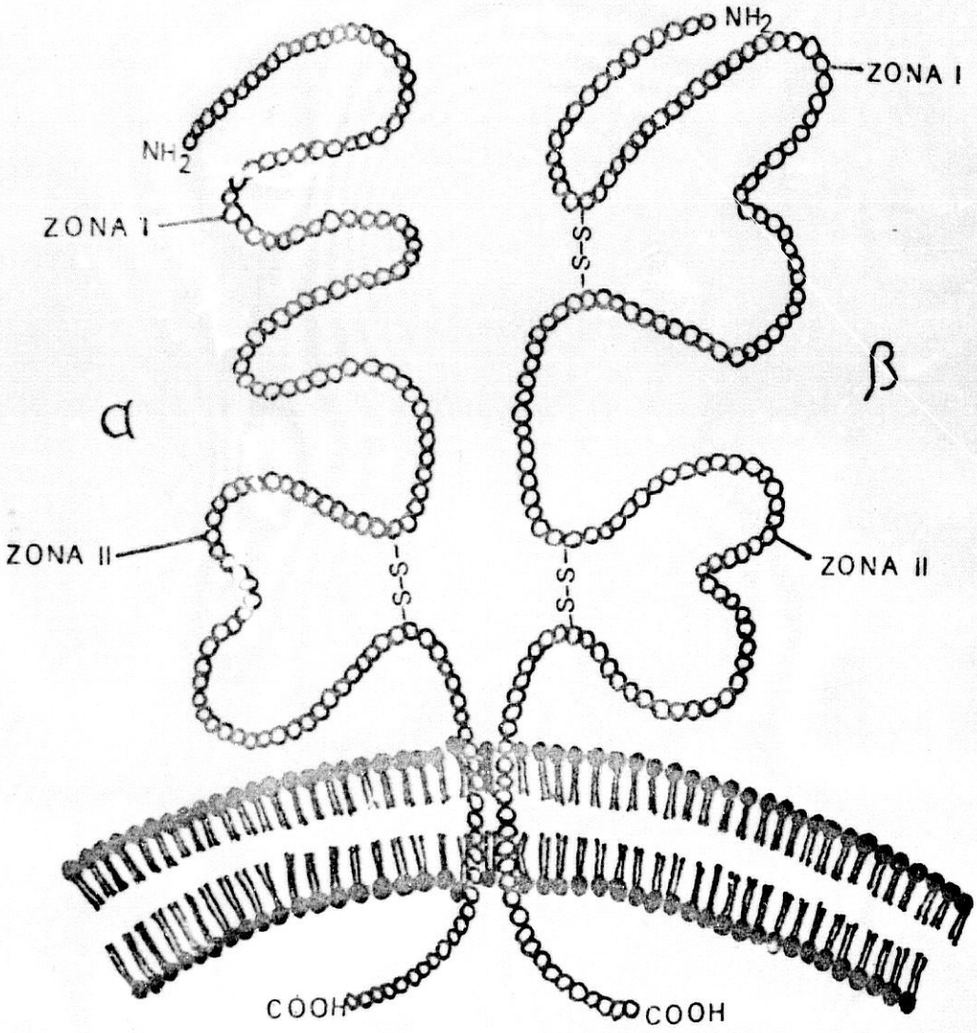


FIGURA 7

ESTRUCTURA DE LOS ANTIGENOS CLASE II



**Los genes de la clase III** situados entre los loci de clase B y D, determinan la estructura de varios componentes del sistema de complemento: C2, C4 y el factor B. El C2 y el factor B están codificados por loci únicos; la proteina C4 lo está por 2 loci de genes (C4 A y C4 B) que están fisicamente separados por el gen que codifica la enzima 21-OH (ERCILLA y CARRETE, 1988).

3. GENETICA.

Los antigenos HLA se heredan de forma mendeliana con un carácter codominante. Cada uno de los padres aporta a la descendencia un cromosoma 6 que contiene sus alelos HLA A, B, C y D. La disposición lineal de los genes HLA-A, B, C y D representan en cada uno de etos cromosomas paternos se denomina naplotipo.

Si ambos padres poseen el mismo alelo en uno o más loci, el hijo recibirá el mismo alelo de ambos, lo que producirá un estado de homocigoto para un antigeno HLA dado. Ya que la forma de herencia es dominante, cada uno de los descendientes tiene una posibilidad del 50 % de obtener cualquier antigeno de uno de los padres que es heterocigoto para ese antigeno, y una probabilidad del 100 % si el padre es homocigoto.

Cada haplotipo paterno se transmite en bloque, excepto en aquellos casos infrecuentes (menos del 2 %) en los que se ha producido un cruzamiento genético o recombinación entre los loci HLA.

Ciertos haplotipos HLA aparecen en la población con una frcuencia mayor de la esperada según el azar. En lugar de producirse una dispersión al azar de los alelos de estos loci cuando se recombinan, ciertos antigenos HLA aparecen

frecuentemente juntos en el mismo haplotipo. Este fenómeno se denomina **desequilibrio de enlace.**

Un ejemplo muy significativo en los grupos de raza blanca es el del gen desnudo A1, Cw7, B8, DR3, DRw52, DQw2 y C4A. En la tabla II se muestran los desequilibrios de enlaces positivos en la población española.

El concepto de desequlibrio de enlance es importante para comprender el sistema HLA y su asociación con las enfermedades. Un antigeno concreto HLA que sea frecuente en ciertas enfermedades no representa a veces en si mismo el gen que produce la enfermedad. Puede constituir únicamente un marcador de la proximidad al gen que produce la enfermedad, con el cual está en desequilibrio de enlance.(ARNET, 1986; ZINKERNAGEL, 1987).

## TABLA II

DESEQUILIBRIUS POSITIVOS DE ASOCIACION EN LA POBLACION ESPAÑOLA.

| HAPLOTIPOS | D | H | P |
|---|---|---|---|
| A1-B8 | 22 | 27 | 0.001 |
| A1-B17 | 13 | 18 | 0.001 |
| A2-B15 (N62) | 11 | 23 | 0.02 |
| A2-B21 | 24 | 44 | 0.05 |
| A3-B7 | 17 | 23 | 0.05 |
| A10-B16 | 7 | 9 | 0.001 |
| A11-B22 | 6 | 7 | 0.001 |
| A11-B27 | 15 | 17 | 0.01 |
| A11-BN35 | 9 | 15 | 0.01 |
| A11-BN44 | 46 | 65 | 0.05 |
| A29-B27 | 14 | 20 | 0.05 |
| AN30-B13 | 4 | 4 | 0.001 |
| AN30-B18 | 11 | 14 | 0.001 |
| AN32-BN40 | 5 | 7 | 0.01 |
| AN33-B14 | 14 | 15 | 0.001 |
| B27-CN1 | 36 | 38 | 0.001 |
| BN62-CN3 | 31 | 34 | 0.001 |
| BN35-CN4 | 46 | 50 | 0.001 |
| BN44-CN5 | 24 | 34 | 0.001 |
| B7-DR2 | 31 | 37 | 0.001 |
| B8-DR3 | 27 | 34 | 0.001 |

TABLA II-a

| HAPLOTIPOS. | D | H | P |
|---|---|---|---|
| B18-DR3 | 45 | 61 | 0.001 |
| B21-DR5 | 21 | 31 | 0.05 |
| Bw44-DR7 | 57 | 90 | 0.001 |

D= Grado de Asociación x 1.000

H= Frecuencia de Haplotipo x 1.000

P= Significación estadistica

## 4. NOMENCLATURA.

En un principio la denominación de los antigenos fué muy compleja, ya que se iba dando numeración correlativa a cada nuevo antigeno descubierto sin distinción de Locus al que pertenecia (por eso la numeración de los locus A y B no es correlativa), por lo que fué necesario la creación de un comité de nomenclatura patrocinado por la OMS que recomendaba la terminologia para los antigenos recien aceptados en el Worskshop Internacional y que se reunia después de éste, salvandóse asi las diferencias existentes en la nomenclatura anterior.

Este comité acordó llamar al sistema HLA (H "Human" y L "Leucocyte") por ser éste tipo de célula en que primero se estudió y A por "First System".

Asi los antigenos se nombrarian primero con el prefijo HLA para todo el sistema seguido de la letra o letras que indica el locus a que pertenece y por último el número que defina la especificidad particular dentro de este locus. Ejemplo HLA A2, HLA B14 , etc.

Pero cuando la especificidad es provisionalmente identificada se coloca la letra W entre la letra correspondiente al locus y el número respectivamente (HLA Bw35); suprimiendose cuando no existe duda de la seguridad y

reproductividad de la definición del antigeno, al ser aceptado en el Workshop Internacional correspondiente.

Pero existe una expcepci'n y es la correspondiente al locus C en que los antigenos en su nomenclatura llevan w con el fin de que no sean confundidos con las siglas de los factores del compleanto, y no porque no estén debidamente reconocidos.

En las Tablas III, IV ,V y V-a se expresan la especificidades alélicas de las moléculas de clase I y II reconocidas en el último Worskshop (1988).

## TABLA III

ANTIGENOS HLA DE CLASE I (10° WORKSHOP, 1988).

| HLA A | HLA B | | | HLA C |
|---|---|---|---|---|
| A1 | B5 | B14 (12) | BW64 (14) | CW1 |
| A2 | B7 | B45 (12) | BW65 (14) | CW2 |
| A3 | B8 | BW46 | BW67 | CW3 |
| A9 | B12 | BW47 | BW70 | CW4 |
| A10 | B13 | BW48 | BW71 (70) | CW5 |
| A11 | B14 | B49 (21) | BW72 (70) | CW6 |
| AW19 | B15 | BW50 (21) | BW73 | CW7 |
| A23 (9) | B16 | B51 (5) | BW75 (15) | CW8 |
| A24 (9) | B17 | BW52 (5) | BW76 (15) | CW9 (W3) |
| A25 (10) | B18 | BW53 | BW77 15) | CW10 (W3) |
| A26 (10) | B21 | BW54 (W22) | | CW11 |
| A28 | BW22 | BW55 (W22) | BW4 | |
| A29 (W19) | B27 | BW56 (W22) | BW6 | |
| A30 (W19) | B35 | BW57 (17) | | |
| A31 (W19) | B37 | BW58 (17) | BW59 (17) | |
| A32 (W19) | B38 (16) | | | |
| AW33 (W19) | B39 (16) | | BW59 | |
| AW34 (10) | B40 | BW60 (40) | | |
| AW36 | BW41 | BW61 (40) | | |
| AW43 | BW42 | BW62 (15) | | |
| AW66 (10) | BW63 (15) | | | |
| AW68 (28) | | | | |
| AW69 (28) | | | | |
| AW74 (W19) | | | | |

## TABLA IV

ANTIGENOS DE CLASE II ( 10° WORKSHOP, 1988)

| HLA D | HLA DR | HLA DQ | HLA DP |
|---|---|---|---|
| DW1 DW24 | DR1 | DQW1 | DPW1 |
| DW2 DW25 | DR2 | DQW2 | DPW2 |
| DW3 DW26 | DR3 | DQW3 | DPW3 |
| DW4 | DR4 | DQW4 | DPW4 |
| DW5 | DR5 | DQW5 (W1) | DPW5 |
| DW6 | DRW6 | DQW6 (W1) | DPW6 |
| DW7 | DR7 | DQW7 (W3) | |
| DW8 | DRW8 | DQW8 (W3) | |
| DW9 | DR9 | DQW9 (W3) | |
| DW10 | | | |
| DW11 (W7) | | | |
| DW12 | | | |
| DW13 | | | |
| DW14 | | | |
| DW15 | | | |
| DW16 | | | |
| DW17 (W7) | | | |
| DW18 (W6) | | | |
| DW19 (W6) | | | |
| DW20 | | | |
| DW21 | | | |
| DW22 | | | |
| DW23 | | | |

## TABLA V

ESPECIFICIDADES CLASE I Y SPLITS (10° WORKSHOP, 1988).

| HLA | SPLITS |
|---|---|
| A9 | A23, A24 |
| A10 | A25, A26, AN34, AN66 |
| AN19 | A29, A30, A31, A32, AN33, AN74 |
| A28 | AN68, AN69 |
| B5 | B51, BN52 |
| B12 | B44, B45 |
| B14 | BN64, BN65 |
| B15 | BN62, BN63, BN75, BN76, BN77 |
| B16 | B38, B39 |
| B17 | BN57, BN59 |
| B21 | B49, BN50 |
| BN22 | BN54, BN55, BN57 |
| B40 | BN60, BN61 |
| BN70 | BN71, BN72 |
| CN3 | CN9, CN10 |

TABLA V-a

ESPECIFICIDADES CLASE II Y SPLITS ( 10° WORKSHOP, 1988)

| HLA | SPLITS |
|---|---|
| DR2 | DRw15, DRw16 |
| DR3 | DRw17, DRw18 |
| DR5 | DRw11, DRw12 |
| DRw6 | DRw13, Drw14 |
| DQw1 | DQw5, DQw6 |
| DQw3 | DQw7, DQw8, DQw9 |
| Dw6 | Dw18, Dw19 |
| Dw7 | Dw11, Dw17 |

## 5. EXPRESION DE LOS PRODUCTOS HLA.

La expresión de las moléculas en las células del organismo está relacionada con su función biológica, siendo básica para el reconocimiento especifico de los antigenos por los linfocitos. Fisiologicamente los linfocitos reconocen el antigeno conjuntamente con moléculas HLA propias.

Las moléculas de clase I que se expresan en la mayoria de células nucleadas del organismo (a excepción de neuronas y trofoblastos) son reconocidas conjuntamente con el antigeno por los linfocitos T citotóxicos.

Las moléculas de clase II tambien lo hacen fisiológicamente en células que presentan el antigeno al sistema inmune (macrófagos, células dendriticas).

El linfocito T cooperador tambien expresa moléculas de clase II cuando es activado, siendo fundamentales estas células fundamentales para la cooperación con los linfocitos B (que expresan normalmente moléculas de clase II) para la sintesis de anticuerpos especificos (BOTAZZO, 1985).

La expresión de las moléculas HLA puede ser modificada por diferentes linfocinas y mediadores biológicos. Los interferones, y espcialmente el interferón gamma, tiene la propiedad de incrementarla en las moléculas de la clase I,

producen un ausento de la expresión de moléculas de clase II en los macrófagos.

## 6. DEFINICION SEROLOGICA DE LOS ANTIGENOS HLA CLASE I Y II.

La definición serológica de los antigenos es puesta en evidencia mediante una reacción antigeno-anticuerpo sobre la membrana celular desencadenada por el complemento, al unirse al complejo antigeno-anticuerpo.

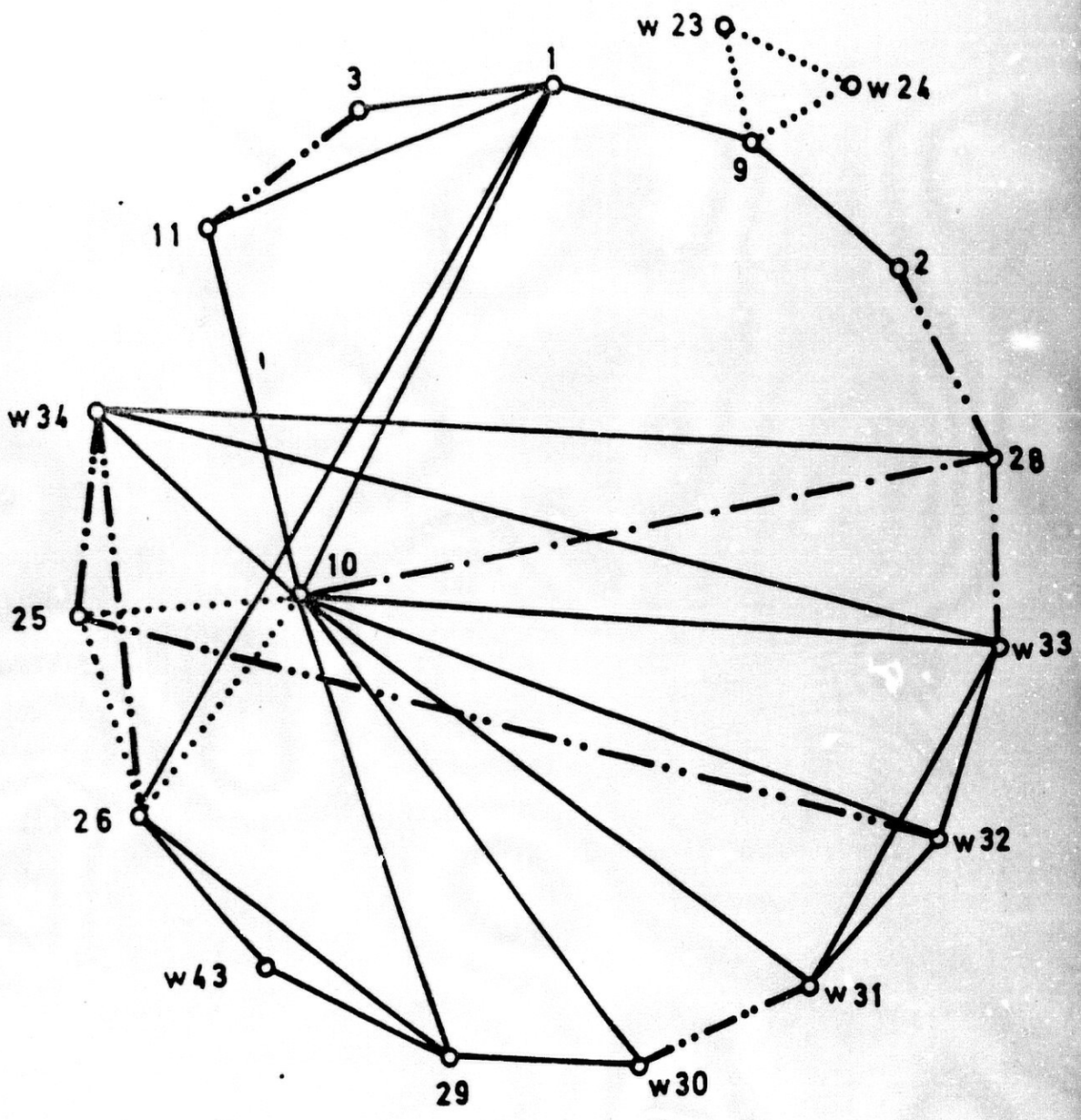
Se utiliza como célula portadora de antigeno el linfocito T para los antigenos de los Locus A, B y C el linfocito B para los Locus D, D/R, DQ y DP. Como anticuerpos se utilizan sueros especificos procedentes de diferentes laboratorios.

En ocasiones es dificil y laborioso definir serológicamente un antigeno, ya que se observan reacciones cruzadas entre antigenos de un mismo Locus, no dándose entre antigenos de un Locus diferentesdiferentes. A ésto se le denomina Splits ( Tablas V y V-a: Figuras 8 y 8-a).

De esta forma se sabe en la actualidad que algunos antigenos HLA están compuestos por otros antigenos más especificos, asi ocurre con el B12, que está compuesto por BW44 y BW45. Por tanto si una célula es muerta por antisueros BW44 y BW45, tambien lo es por anti B12, sin embargo las células matadas por anti B12 eran muertas por uno sólo de los sueros anti BW 44 ó anti Bw 45 y nunca por los dos a la vez.

FIGURA 8

REACCIONES CRUZADAS ENTRE ANTIGENOS HLA-A




Muy frecuente

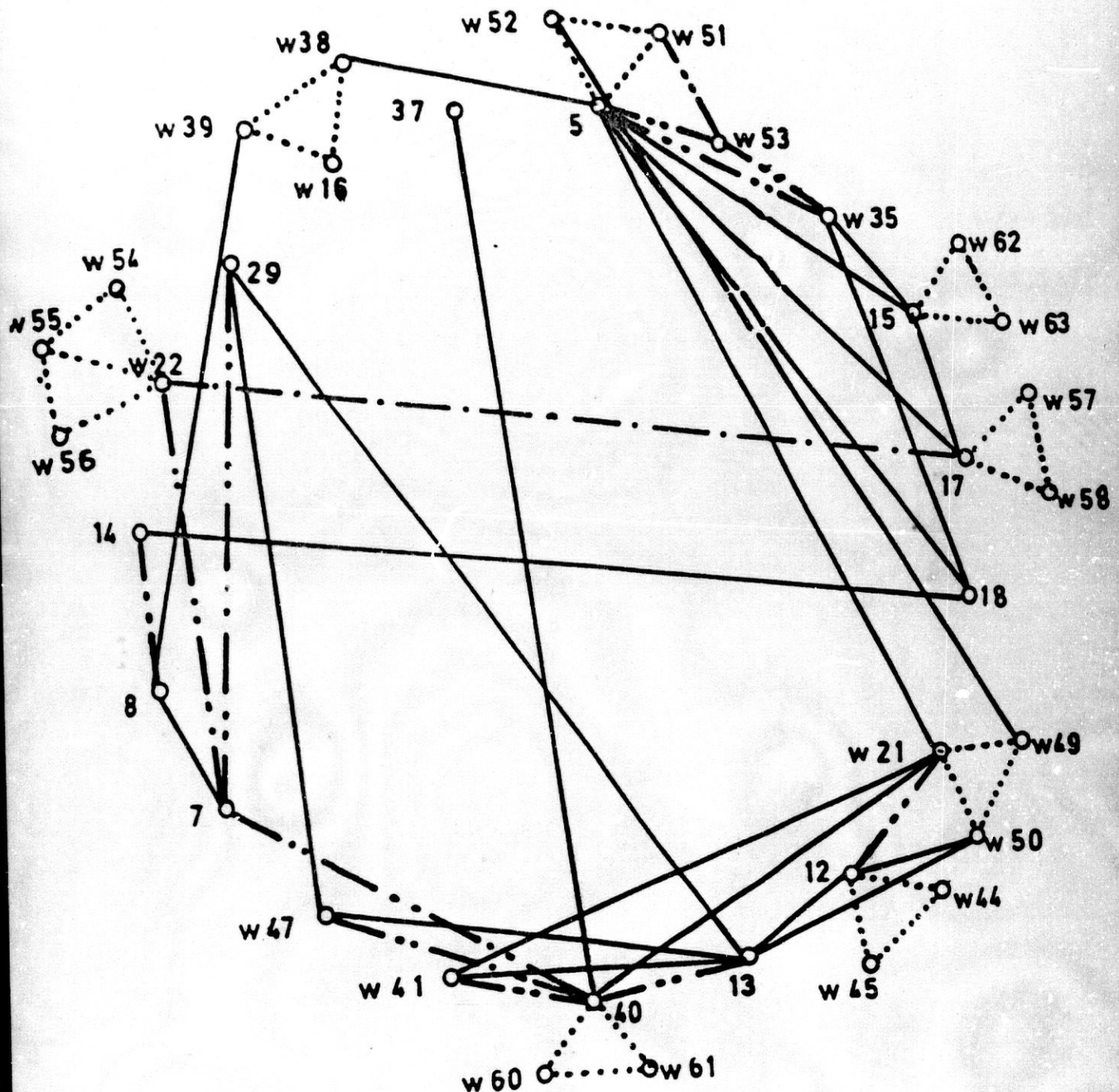
Frecuente

Raro

Splits

FIGURA 8a

REACCIONES CRUZADAS ENTRE ANTIGENOS HLA-B




Muy frecuente

Frecuente

Raro

Splits

## 7. BIOLOGIA DEL SISTEMA HLA.

La función principal de las moléculas del complejo HLA es influir en la manera mediante la cual, los antigenos extraños son reconocidos por los receptores de los linfocitos derivados del timo.

Desde hace algunos años, se sabe que las células citotóxicas T y las células T activadas pueden ser distinguidas por la presencia sobre la superficie de antigenos tipicos de la supeficie celular.

Los linfocitos T citotóxicos, que solo pueden interaccionar con los antigenos si el contexto se expresan moléculas HLA de la clase I; los linfocitos T supresores y facilitadores solo puede percartarse de la presencia de un antigeno si en el ambiente aparecen moléculas de la clase II (McDEVIT, 1986).

Las células T no pueden responder al antigeno que les presenta el macrófago, a menos que la combinación célula-presentadora exprese determinantes de la clase II. El receptor de la célula T puede fijarse a la vez al fragmento antigénico y a la molécula de la clase II mediante una triple interacción, de la que se sigue el estimulo necario para que prolifere la célula supresora o facilitadora. Esta misma condición es necesaria para que las células facilatadoras interactúen con

las células B.

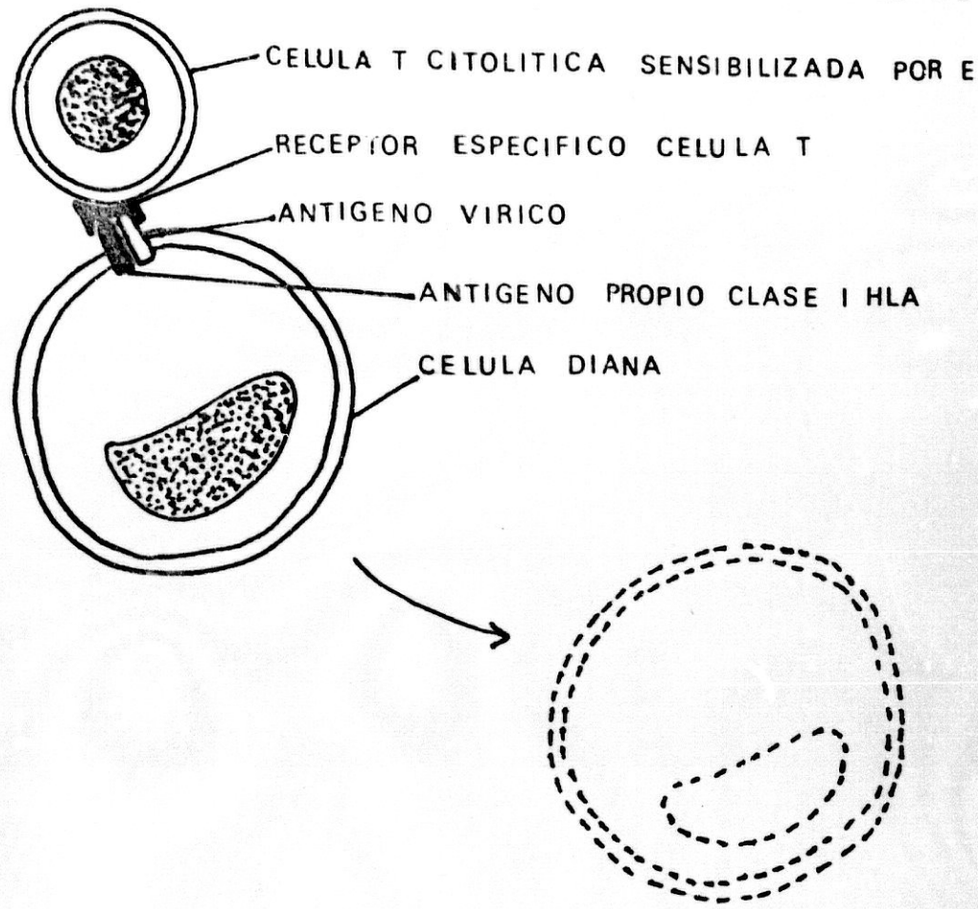
No es suficiente con que el receptor de la célula T entre en contacto con el antigeno sobre la inmunoglogulina de superficie de la célula B. La célula ha de reconocer a la vez el antigeno y a la molécula de clase II, probablemente mediante una aposición física, ó disponiéndose lo suficientemente cerca como para que el receptor pueda unirse a los dos en el mismo acto.

En las secuencias de esas interacciones la molécula clase II ejerce una influencia pr grabada genéticamente sobre la respuesta inmunológica.

El primer paso en la mayoria de las respuestas inmunes es la captación del antigeno extraño por parte de los macrófagos. Estos digieren parcialmente el material antigénico y posteriormente manifiestan en su superficie una cantidad variable, en continuo cambio, de antigenos nativos y fragmentos antigénicos en diferentes estados de digestión. De esta forma es como las células "presentan" el antigeno a las células T (Figuras 9 y 10).

FIGURA 9

FUNCION DE LAS MOLECULAS CLASE I EN LA RESPUESTA INMUNE



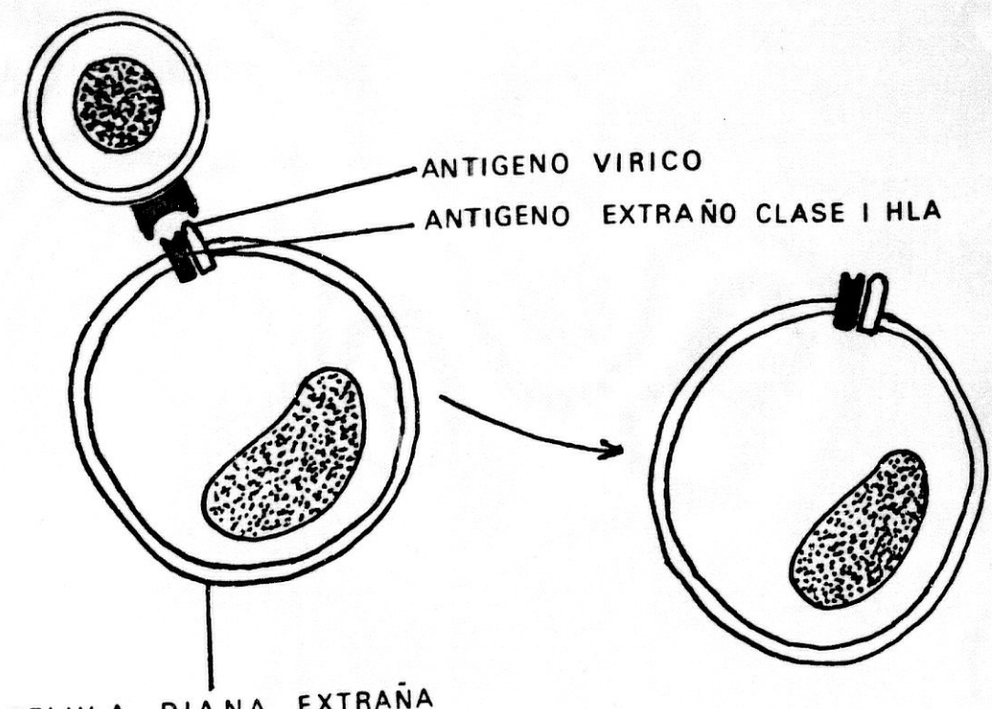
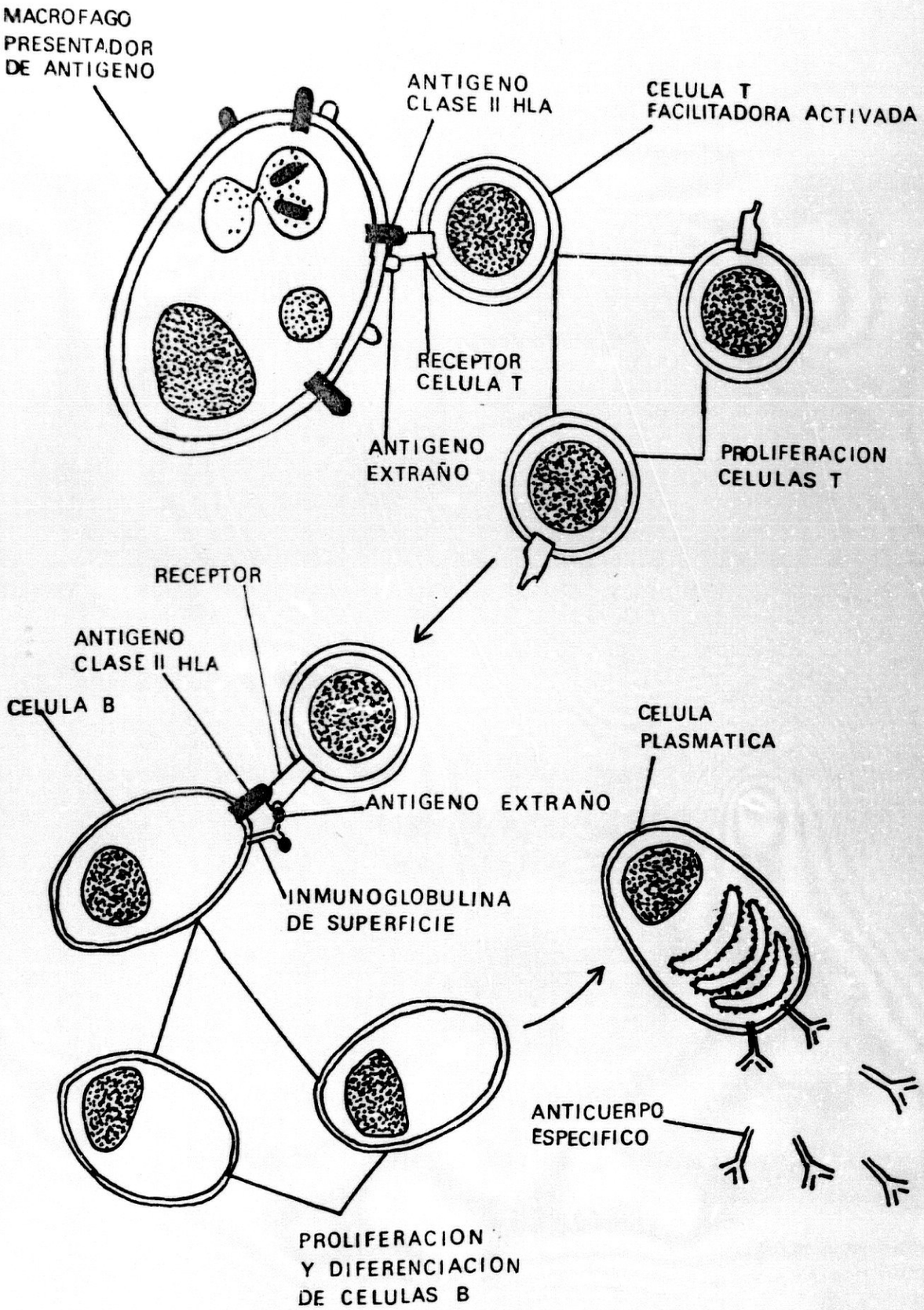



FIGURA 10

FUNCION DE LAS MOLECULAS CLASE II EN LA RESPUESTA INMUNE



A. IV.- HLA Y ENFERMEDAD.

## 1. HLA y ENFERMEDADAES ASOCIADAS

El descubrimiento del sistema H2 del ratón y la arelación existente entre este sistema, la leucemia provocada en cepas puras de ratones y la enfermedad causada por virus de coriomeningitis linfocitica, sirivió como punto de partida a muchos autores para buscar asociaciones entre ciertas enfermedades humanas de origen neoplásico, autoinmune e infeccioso los antigneos del sistema HLA.

AMIEL en 1967, estudió la frecuencia de antigenos HLA en un grupo de pacientes afectos de la enfermedad de Hodgkin, observando aumento de un antigeno del Locus B (4c), al compararlo con el grupo control. Más tarde se comprobó que este se correspondia con varios antigenos, que conocemos en la actualidad como B5, BW35 y B18.

Pero estos primeros hallazgos fueron polémicos, ya que no todos los autoires estuvieron de acuerdo, hasta que KISSMEYER-NIELSEN en 1971, confirmó este conocimiento previo,viéndose en el trascurso de los años que esta acociación era correcta y solo la complejidad del originario antigeno "4c" habia complicado el hallazgo, aceptandóse por tanto, la posible asociación entre HLA y enfermedad.

En 1972 FALCHUK y cols., señalaron la mayor frecuencia del antigeno HLA-B8 en Dermatitis Herpertiforme (58 %) y la

enfermedad celiaca (78 %) frente al 28 % de los sujetos control.

Una vez aceptado esto, se efectuarón numerosos estudios, teniendo especial siginficación el realizado por BREWERTON en 1973, estableciendo la relación entre Espondilitis Anquilosante y HLA-B27, con una frecuencia de la presencia de esta antigeno el 90 % de los enfermos, frente a 8-10 % en el grupo control de la población caucasoide (BREWERTON, 1973; 1974).

Este hecho notable ha sido refrendado por numerosos trabajos realizados por diferentes autores, siempre preocupados por el descubrimiento, aún obscuro, de las enfermedades reumáticas.

El hecho de que esta asociación sea tan estrecha hace pensar a algunos autores que existe una relación directa entre espondilitis y HLA-B27, mientras que, para otros la interpretación de los hallazgos es diferente, atribuyéndolo a la posibilidad de que existen otros factores que están involucrados en la patogénesis de esta enfermedad, puesto que no todas las espondilitis anquilosantes son HLA-B27 positivo.

De todas formas, este suceso que despertó el interés de reumatólogos, genetistas e inmunólogos, ha servido para

esclarecer algunos hechos. Se sabia desde hace tiempo que era elevada la frecuencia de Espondilitis Anqilosante en determinadas familias, por lo se puede atribuir a un determinante genético, ya sea el B27, ó un variante genético como marcador de la enfermedad.

Aunque la Espondilitis Anquilosante ha sido el prototipo de la enfermedad reumática asociada al B27, BREWERTON y cols., en 1973 estudiaron un grupo de paciente afectos de enfermedad de Reiter (caracterizada por conjuntivitis, uretritis y afectactación articular) encontrando una presencia del 76 % del antigeno B27, frente al 6 % y 9 % en los sujetos-control con uretritis y conjuntivitis simple, lo cual hace pensar en la proximidad patogênica en Espondilitis Anquilosante y Sindrome de Reiter (BREWERTON, 1973).

Un hecho similar ocurre en un grupo de enfermedades cuya asocicación con el antigeno B27 es evidente y que se incluye bajo la denominación de espondilartropatias seronegativas, caracterizadas por ausencia del factor reumatoide en el examen serológico y con afectación inflamatoria a nivel de columna vertebral, articulaciones sacroiliacas y articulaciones periféricas.

AHO y cols., en 1975 estudian los antigenos de 49 enfermos afectos de artritis por Yersinia, encontrando la presencia del B27 en 43 de ellos, no estando en aquellos

pacientes que no presentan afectación articular (AHO, 1974).

Lo mismo ocurrió en los procesos con afectación de articulaciones sacroiliacas y en el grupo de artropatias enteropáticas (artritis periféricas o axiales asociadas a colitis ulcerosa, enteritis regional ò enfermedad de Chron y enfermedad de Hiple) en que la frecuencia del B27 fué muy elevada frente a los sujetos control.

De todo esto se dedujo que el B27 era un importante marcador genético de susceptibilidad y que el causante o desencadenante, tal vez fuese infeccioso. Esto motivó que se barajara con entusiasmo la presencia de este agente desestabilizador.

En el caso de la espondilitis anquilosante se atribuyó a la Klebsiella, y en otros, al agente infeccioso productor de la artritis reactiva consiguiente, bien la Clamydia Traconatis, Yersinia, Shigella, Campylobacter,o bien otros.

La enfermedad de Beçhet se encuentra asociada al B5, como ocurre en la polimialgia reumática, aunque esta tambien està con el antigeno Bw38.

El antigeno B8 se observó, asi mismo, fuertemente asociado a determinadas enfermedades (dermatitis herpertiforme, miastenia gravis, hepatitis crónica activa, enfermedad de

Graves, enfermedad de Adisson) (SVEJGARD, 1973).

Numerosos trabajos han establecido firmemente la asociación de la diabetes insulino-dependiente con el sistema HLA. La diabetes tipo I presentaba estrecha asociación no sólo con el B8, sino tambien con el B15 y B18, en posible desequilibrio de unión que motivaria la predisposición a padecer la enfermedad (DAUSSET y SVEJGAARD, 1977).

También se ha observado una asociación de la enfermedad con Dw/DR3 y Dw/DR4, encontrandose en desequilibrio de enlance con el antigeno B15 y B18 respectivamente (SHERNTHANER y cols., 1978; RODEY y cols., 1979).

El psoriasis vulgar, se confirmó fuertemente asociado al CW6 y en menor intensidad con el B13 y el B17 en caucasoides, como se habia observado con anterioridad. Esto fué explicado por un posible desequilibrio de asociación entre el Locus B y el CW6; es pues, la primera enfermedad asociada al Locus C como marcador genético.

DICK (1978), tratando de ordenar los descubrimientos obtenidos, establece 3 grupos de enfermedad a las que habia encontrado asociación con el sistema HLA, quedando sin clasificar un grupo de enfermedades que no reunian caracteristicas apropiadas para ser incluidas en esta apartado y que constituyen una gran miscelánea, tal es el caso de la

enfermedad de Beçhet, relacionada con el HLA-B5 (OHNO, 1973), ó la hemocromatosis en estrecha unión con A3-B7 ó A3-B14 (BROMMFORD, 1977).

El primer grupo incluye las enfermedades en las que se sospecha un componente hereditario. En él se han encontrado las asociaciones más fuertes, sobre todo en aquellos en que habiendo una relación familar, no se encontraba ningún modelo dae herencia. La enfermedad más característica de este grupo es la espondilitis anquilosante, aunque existen otras, como la poliartritis crónica juvenil con afectación de sacroiliacas.

Un segundo grupo lo constituyen aquellas enfermedades en las que parece encontrarse una base inmunológica, con presencia, en algunos casos, de autoanticuerpos en suero y cierta tendencia familiar, así como enfermedades de una etiología múltiple, las cuales suelen asociarse con el antigeno B8 como son la dermatitis herpertiforme), enteropatia por gluten , la diabetes juvenil , enfermedad de Graves y enfermedad de Adisson .

Un tercer grupo es el consitituido por las enfermedades malignas, en especial hematológicas, y dentro de ellas, las leucemias, sin que sus resultados hayan sido muy concluyentes.

El desarrollo de métodos estadisticos y de técnicas especializadas, permitió en 1977 definir serológicamente el

Locus D, y observar que las enfermedades autoinmunes tienen una asociación más fuerte con antigenos de este Locus.

Así se observó que la artritis reumatoidea se encuentra fuertemente asociada a este Locus (HLA-DR4), y no al Locus B, como se habia supuesto con anterioridad (STASNY, 1975); sin embargo la artritis crónica juvenil está asociada al DR5.

Algunos trabajos sugieren que la asociación es menos intensa con el antigeno Dw4, definido con cultivo mixto linfocitario en células homocigotas, que con DR4,lo cual indicaria que serian haplotipos distintos.

Los haplotipos portadores de la especificidad DR4 pueden clasficarse en una familia de haplotipos distintos bbasados en la reactividad con células homocigotas. El antigeno DR4 puede asociarse a Dw4, Dw14, Dw10, Dw13 y Dw15 (DUQUESNOY Y MARRANY, 1984).

Además, la especificidad DR4 se halla en desequilibrio de asociación con el antigeno DQw. El haplotipo DR4, Dw4 se encuentra asociado frecuentemente con artritis reumatoide.

El antigeno DQ3 que se asocia a DR4 presenta dos variedades en la cadena DQß, denominadas DQw3.1 que es reconocida por el anticuerpo monoclonal TA10 (especificidad

denominada como DQw7) y DQw3.2 que reaciona con el anticuerpo monoclonal 2B3 (KIM y cols., 1985).

La presencia de DQ3.1 definido por RFLP (fragmentos polimórficos de restricción), se asocia a la gravedad de la enfermedad : 77 % de los pacientes con artritis grave son portadores de DQ3.1 y sólo el 48 % de los pacientes con manifestaciones leves (PAWELEC y cols., 1983).

Alrededor del 95 % de los pacientes con el sindrome de Felty son DR4 positivos, la mayoria de los cuales son TA10 positivos. Los pacientes con formas más graves de artritis reumatoide son tambièn portadores de TA10, y el haplotipo B44, BfS, C4bfS, C4BQ0, DR4, TA10 es el más probablemente asociado a las formas más graves.

La heterogenidad en las formas clinicas de artritis crônica juvenil condiciona que los estudios de asociación de esta patologia al sistema HLA sean de dificil valoración, sin embargo, se pueden describir asociacionesen algunas formas determinadas.

En la variedad de inicio oligoarticular temprano (menores de 5 años) se ha descrito un incremento de los antigenos DR5 y DR8. Recientemente se ha descrito la asociación del antigeno DPw2 en los pacientes con esta forma de inicio de la enfermedad y a la presencia de de idridociclitis crónica.

Existe otra forma de incio oligoarticualr tardia que afecta especialmente a varones mayore de 8 años. Esta variedad se asocia a menudo al antigeno B27 y evoluciona con frecuencia a una espondilitis anquilopoyètica.

La artritis crôncia juvenil seopositiva se asocia a DR4, formando parte de los haplotipos DR4-Dw4 y Dr4-Dw14 que poseen la mayoria de los pacientes. En estos enfermos no se observa ninguna preferencia alèlica por las variantes DQ3.1 o DQ3.2 (MORLING y cols., 1985).

El DR3 se ha visto fuertemente asociado a la cirrosis biliar primaria y la glomerulonefritis membranosa, con una frecuencia dle 85 % en los enfermos, frente al 19 % en la población sana.

Otras enfermedades asociadas al DR3 son la dermatitis herpertiforme, enfermedad celiaca, enfermedad de Graves, miastenia gravis y hepatitis crónica activa. Sin embargo, la asociación existente entre este antigeno y el sindrome de Sjögren es menos fuerte (BENET).

La esclerosis múltiple previamente a los antigenos en desequilibrio (B7 y A3), se confirmó frecuentemente ligada al DR2 en el VII Worskshop (1977). Este antigeno se encuentra tambien vinculado con el sindrome de Good-Pasteure y la púrpura

trombopénica inmune.

Pero no olvidemos otras moléculas de clase II distintas a los antígenos DR, se muestran asociados, en mayor ó menor grado, a ciertas enfermedades.

## 2. MECANISMOS DE LA ASOCIACION HLA-ENFERMEDAD

Los mecanismos que explicarian la asociación del sistema HLA con determinadas enfermedades,no son del conocidos.Los antigenos de clase I sirven para regular la interacción de los linfocitos T citotóxicos con otras células y a través de esto regular los determinantes antigènicos que las células T cititóxicas son capaces de reconocer, que es antigeno-especifica pero independiente de la producción de anticuerpos, e implica la rotura de la integridad de membrana de la célula diana.

VNIES y cols. (1977), demostraron la respuesta de la proliferación de células T al virus de la vacuna realizado en dos grupos. La menor respuesta tenia una alta frecuencia de HLA-CW3,sugeriendo un efecto supresor del CW3. Semejantes estudios re realizaron en la población, y ambos demostraron la regulación de estas respuestas relacionadas con al HLA.

Aùn es menos conocido el mecanismo patogénico a nivel molecular. La regulación aberrante de la respuesta inmune puede ocurrir por algunos de estos mecanismos hipotéticos:

- Un antigeno extraño pudiera eludir la respuesta al reconociento inmunológico en aquellos individuos que tuvieran un determinado antigeno HLA parecido al antigeno extraño (SNELL, 1968).

- Un antigeno parecido pudiera facilitar una respuesta ás fuerte con un deterainado antigeno (SHELL, 1968).

- GECZY y cols. (1980), han sugerido que un factor producido por una Klebsiella interaccionaria con células B27 positivas. Esta obaservaciòn es de particular revelancia en la patogenia de la espondilitis anquilopoyética.

Otra posibilidad ás especulativa aún es que las aoléculas facilitarian la penetraciòn celular por aicroorganisaos (HELENIUS, 1978).

- Una reciente teoria propuesta por BOTAZZO postula que las enfersedades autoinsunitarias podrian explicarse por la expresiòn ectópica de aolèculas de clase II en territorios o células en los que norsalsente no se expresan, coso células epiteliales o endoteliales, los cuales servirian para presentrar los autoantigenos norsales de estos terrritorios a los linfocitos T cooperadores, con lo que se inicieria una respuesta insunitaria suy selectiva contra dichos autoantigenos.

## 3. ENFERMEDADES INFECCIOSAS ASOCIADAS AL SISTEMA HLA.

Si bien los genes de la región D (región I en el ratón) fueron detectados originalsente por el fracaso del ratón para responder a antigenos concretos, al realizar en este sentido estudios en humanos, no se han obtenido resultados concluyentes de la predisposición del sistema HLA con enfersedades infecciosas, y sobre todo en relación con el el tipo DR. interpretación de diferentes trabajos de HLA e infección.

### 3.1. HLA y artritis reactivas

La sás fuerte y consistente asociación entre HLA y enfersedades infecciosas, ocurre en aquellos procesos en los que aparece en el curso de la enfersedad una artritis inflasatoria y en la que no se indentifica el gérsen causante en las articulacines afectas, siendo eneste grupo la enfersedad sás evidente el sindrose de Reiter.

La infección entérica por Shigella dysenteras y Shigella Flexneri (DAVIES, 1966), Salsonella enteritidis, usualsente Salsonella typhisurius (BERGÖFF, 1963) y Yersinia enterocolitica (AHVONEN y cols., 1969) pueden originar un un cuadro articular indistinguible del anterior.

La enteritis debido al Campylobacter yeyuni tasbién ha sido isplicado en la patogenia del sindrose de Reiter (URMAN y cols.,1977).

También es ampliamente aceptado que la uretritis no gonocócica transmitida sexualmente y en los que los gérmenes implicados más frecuentemente son Clamydia tracomatis y Ureoplasma urealitycum desarrollan un sindrome de Reiter (TAYLOR-ROBINSON,1980).

Estas formas de artropatias reactivas estan fuertemente asociadas al B27 en todos los grupos étnicos estudiados.

3.2 Lepra

Un defecto de la inmunidad celular y la evidencia de estudios en gemelos, habian sugerido que en la lepra se originaria una anormal respuesta inmune, influenciado por un control genético.

Inicialmente los estudios de casos-control buscaban determinantes especificos para locus A y B, no encontrando relación con ninguna una de las formas de lepra (KASLOW Y SHMAN, 1981).

Sin embargo, VRIES y cols. (1976), han encontrado en familias haplotipos indénticos en hermanos con lepra, estadisticamente significativos, para la forma lepromatosa y no para la tuberculoide.

También se ha observado una alta frecuencia de DR2 en familias con lepra, pero no en casos esporàdicos, por lo que

sugiere que todas las formas de la enfermedad no son patogénicamente idénticas.

3.3. Tuberculosis.

Se han realizado varios estudios sobre tuberculosis y HLA, obteniendose resultados discordantes. AL-ARIF y cols. ( 1978), encuentra una asociación frecuente con B15 en negros de EE.UU. SELBY (1978), demuestra la asociación con B8 en blancos canadienses. Tambien se ha demostrado en varios grupos étnicos una negativa asociación con B12 (TAKATA y cols., 1978).

3.4. Infección estreptocócia.

No se han encontrado una relación clara para demostrar una asociación del sistema HLA con la fiebre reumática, glomerulonefritis y carditis postestreptocócica (WARD y cols., 1976: GORODEZKY y cols., 1977: SASAZUKI y cols., 1979).

GREENBERG (1975), no encontró relación con B5, un antigeno que primariamente estaba relacionado con la respuesta a los antigenos estreptocócicos.

3.5. Hepatitis B

Un amplio número de estudios se han centrado en el posible papel del sistema HLA en la hepatitis B.

La hepatitis crónica activa ha sido claramente asociada con HLA-B8 y HLA-DR3 (MACKAY y cols., 1980).

Sin embargo, cuando los resultados de los análisis son correspondientes a enfermos con hepatitis B con antigeno de superficie positivo ( HBs Ag), no hay relación definitiva con este antigeno. Otros estudios han demostrado relación de hepatitis crónica activa HBs-Ag positivo con Bw35 (FREUDENBERG, 1977).

3.6. Infección por herpes virus.

Diversos autores han intentado relacionar con la variedad de manifestaciones clinicas del herpes virus, sin obtener resultados significativos ( BERLE,1980).

3.7. Otras infecciones.

Un grupo de investigadores australianos encontraron asociación de la rubeola con B8 (MENSER y cols., 1974). Posteriormente observaron que esta elevación de la frecuencia dependia más del grupo étnico donde se habia realizado el estudio que de la enfermedad.

La presencia de HLA-D en una frecuencia inusual en poliomielitis paralitica estimuló el interés en la posibilidad del predisposición inmunogenética, al igual que la esclerosis

múltiple (PIETSCH D, 1974). Posteriormente en otros estudios no se ha demostrado una frecuencia elevada significativa del B7.

SALAM EA y cols.(1979), observaron que el riesgo relativo para hepatomegalia en la esquistosomiasis en la presencia de A1 (riesgo relativo = 29), B5 (riesgo relativo = 19) ó la combinación de A1 y B5 (riesgo relativo = 56) es llamativa.

La brucelosis humana se comporta desde el punto de vista clinico con un extraordinario polimorfismo sintomatológico debido a las diversas formas y localizaciones con que puede presentarse esta enfermedad.Tambien es sabido la mayor incidencia en ambiente familiar, debiendose principalmente a factores heredo-consitucionales, epidemilógicos, habitat...

Estas caracteristicas, junto a la diferente susceptibilidad que presetan los sujetos al padecimiento de la brucelosis y considerando como punto de partida los últimos logros en el campo de la inmunologia en el estudio del sistema HLA, nos sugirió profundizar en la vertiente inmunogenética de esta enfermedad infeciosa.

HONDINKA y cols., en Hungria (1978) estudian la frecuencia del antigeno B27 en 68 pacientes con brucelosis producida por B. Abortus, y concluyeron su trabajo con la hipótesis de que todo paciente portador del antigeno B27 posee un alto riesgo de padecer una afectación axial si contrae una brucelosis crónica.

ALARCON y col.s (1980), realizaron un estudio sobre antigenos de histocompatibilidad en enfermos con brucelosis aguda, cuyo agente etiológico era la B. melitenesis, no encontrando diferencia significativa de al frecuencia del antigeno HLA-B27 en ambos grupos de enfermos, tal como habia sido referido por HODINKA. Sin embargo, observaron una escasa incidencia del antigneo HLA-A2, lo cual les hizo sugerir que la

presencia de este antigeno podria ser un factor de protección frente a la enfermedad.

DAMES y GHOSH (1985), realizaron un un estudio de 12 casos de brucelosis humana,. producida por B. abortus. Sus resultados diferian con los obtenidos por ALARCON, encontrando una elevación significativa del antigeno A2, en enfermos con brucelosis, con o sin artritis.

PAREJA y cols. (1985), realizaron un amplio estudio sobre antigenos de histocompatiblidad de clase I yII en 106 enfermos diagnosticados de brucelosis, cuyo agente era B. melitensis. El más importante hallazgo obtenido fué la disminución. estadísticamente significativa del antigeno HLA-CW2 en el grupo de pacintes comparados con los controles, considerándolo como factor de protección de la enfermedad. No hubo diferencia significativa en la frecuencia de los antigenos de histocompatibilidad entre paciente con o sin manifestaciones osteo-articulares.

ALARCON y cols., en 1985 realizaron un estudio de brucelosis humana, en 8 familias con uno o mas miembros con brucelosis, por B. melitensis. Se tiparon tanto enfermos como familiares, no encontrado una distorsión en la segregacvión de los haplotipos entre los enfermos con brucelosis, con o sin artritis, faltando en este estudio la demostración de la asociación de la enfermedad al complejo HLA.

Han sido muy numerosos los trabajos realizados buscando la posible asociacion entre los antigenos del sistema HLA y determinadas enfermedades, no siendo muy prodigados los relacionados con enfermedades infecciosas.

La brucelosis humana al tener entre sus manifestaciones clinicas más frecuentes las relacionadas con el aparato locomotor, se ha intentado estudiar dentro de las consideradas como artritis reactivas (KEAT, 1983).

Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos, que hemos comentado anteriormente, han sido en su mayoria discrepantes.

Nosotros hemos orientado mas este estudio bajo la hipótesis de la relación de un antigeno de histocompatibilidad con la brucelosis como enfermedad infecciosa, considerando las manifestacines clinicas de forma global, sin ofrecer especial interés a las desarrolladas en el aparato locomotor.

GOTUZZO y cols (1987), realizaron en 39 familias peruanas un estudio de las caracteristicas clinicas de la brucelosis en el ambiente familiar, encontrando mayor incidencia de la enfermedad entre los miembros de las familias qu en la población general.

RODRIGUEZ MARTIN (1986) obsesrvó un aumento del riesgo

relativo de padecer la enfermedad entre los convivientes de los enfermos con brucelosis, con respecto a la población general, concluyendo que la mayoria de los factores que explican este aumento se encuentran en el ambiente familiar, siendo los epidemilógicos y genético los más importantes.

Por ello, nos indujo a realizar este estudio en familias, permitiendo además homogenizar los factores epidemilógicos mediante la realización de una encuesta epidemiológica, para un mejor interpretación y razonamiento de los resultados.

Se ha determinado únicamente el tipaje de los antigenos de histocompatibilidad de Clase I, porque diversos autores postulan que en los mecanismos patogénicos de la enfermedad infecciosa, ya sea producida por virus o bacterias, juegan un papel importante las células T citotóxicas, reguladas por las moléculas de Clase I ( KASLOW, 1981: PAULE SASTRE, 1985: McDEVITT, 1986).

Asi pues el hecho de haberse realizado los anteriores estudios en diferentes grupos étnicos, ser diferente el agente causante de la enfermedad, el no haber demostrado cualquier desequilibiro de union entre haplotipos y enfermedad y el con nuar con una linea de trabajo, nc. deja planteada una serie de dudas, lo que nos ha inducido a realiza: el presente trabajo con los siguientes <u>objetivos</u>:

## A. VI.- OBJETIVOS.

1. Estudio de los antigenos de histocompatibilidad de Clase I (Locus A, B y C) en un grupo de sujetos sanos considerados como control.

2. Estudio de los antigenos de histocompatibilidad de Clase I en familias, en las que existan uno o más afectados de brucelosis.

3. Estudio de haplotipos en familias, en la cuales uno o más de sus miembros padezcan la enfermedad brucelar.

4. Estudiar la presencia o ausencia de un determinado antigeno que pudiera ser marcador en enfermos con brucelosis o bien protector en los miembros sanos de las distintas familias.

5. Estudiar la presencia de un determinado haplotipo que actuara de marcador en los enfermos con brucelosis o protector en los sujetos sanos de las diferentes familias.

6. Estudiar la segregación de los haplotipos entre los diferentes miembros de cada familia.

## B.- MATERIAL Y METODO.

B. I.- MATERIAL.

## 1.1 POBLACIONES ESTUDIADAS.

### 1.1.1 Población control.

Integrado por 274 sujetos sanos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 7 y 60 años, Caucasoides, de diferentes profesiones, y de la misma zona geográfica donde se realizaba este trabajo.

Entre todos ellos se descartó la existencia de cualquier proceso patológico, mediante realización de una historia clinica detallada y un estudio analitico básico consistente en hemograma con VSG, bioquimica sérica y analisis elemenleal de orina.

### 1.1.2. Población de Familias.

Se estudiaron 32 familias, con uno más enfermos con brucelosis, diagnosticados en los servicios de Reumatologia y Medicina Interna de la Cátedras de Reumatologia y de Patologia General del Hospital Universitario de Granada.

#### 1.1.2.a. CRITERIOS DE SELECCION.

1. Enfermos.

a.- Clinicos: Mediante historia clinica detallada y exploración fisica.

b.- Biológicos: A todos los enfermos les fueron

realizadas analitica básica (hemograma completo con VSG, orina elemental con sedimento, determinaciones séricas de calcio, fósforo, glucemia basal, colesterol, acido úrico, urea, proteinas totales, albúmina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina, LDH y GOT mediante autoanalizador SMA-12/60 Technicon España.

c.- Serológicos: A todos los enfermos les fueron efectuadas pruebas serológicas por el Departamento de Microbiologia del Hospital Universitario de Granada.

Teniendo en cuenta todas y cada una de las caracteristicas de nuestros enfermos, así como el medio en que nos desenvolvemos elegimos los procederes más prodigados tanto por su precisión, especificidad y costo, como por su rentabilidad ya que además de contribuir al diagnóstico nos permirtian seguir la evolución del proceso, valorandolos conjuntamente y no de forma aislada. Estos fueron:

- Seroglutinación a Brucellas.- Realizada en dos fases: una cualitativa en placa de Kline utilizando Brucella-latex, que actúa en parte con antigeno rápido y otra cuantitativa en tubo siguietndo la técnica de WRIGHT, en la que se emplea antigeno anti-Brucella recomendado por la FAO/OMS Comité de Expertos en Brucelosis en 1958. Fueron consideradas positivas para el diagnóstico la titulaciones superiores a 1/160.

- Prueba de Coombs anti-Brucella.- Fué realizada utilizando el suero de Coombs (Bio-Merinex) que contiene anticuerpos anti IgG, anti IgM, anti IgA y anti C3.

El antigeno brucelar utilizado está compuesto por una suspensión de Brucella abortus cepa 99 inactivada con fenol y calor, titulado respecto al standar de la OMS.

d.- Radiológicos: A todos los pacientes se les practicó estudio radiológico de cualquier articulación sospechosa de patologia, bien por el interrogatorio o la exploración clinica.

e.- Tomográficos: Se realizó estudio tomográfico en aquellos pacientes que se consideró de utilidad tras la observación del estudio radiológico simple.

Ambos estudios (Radiológico y Tomográfico) fueron llevado a cabo por el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital Universitario de Granada.

f.- Gammagrafia ósea: Fué efectuada por el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario de Granada, a todos aquellos pacientes que presentaban clinica sospechosa de afectación ósea y/o articular, o bien tras analizar el estudio radiológico y/o tomográfico fuese considerado oportuno.

Para la realización del examen gammagráfico del

sistema óseo se utilizó Meliten Difosfonato de Sodio marcado con 99m Tc (LINOSCINT, IRE, BRUCELLES, BELGIE) en solución salina esteril apirógena y pH comprendido entre 4 y 5, inyectado por via intravenosa siendo la dosis calculada en relación al peso de cada paciente.

El examen fué efectuado pasadas 3 horas de haber sido inyectado, mec ante gammacámara.

2. Familias.

Una vez diagnósticados los enfermos de brucelosis, se estudiaron sus respectivas familias, utilizando los siguientes criterios:

a.- Clinicos y serológicos: A todos los miembros de las familias se le realizó historia clinica detallada, exploración fisica, aglutinaciones y prueba de Coobs anti-brucella bien para descartar antencendente patológico, o bien para diagnosticar un nuevo caso de brucelosis.

b.- Encuesta epidemilógica (Tabla VI): A todos los miembros de las familias, se les realizó una ficha epidemiológica, con objeto de que todos estuvieran en una misma unidad familiar, y sometidos a casi a los mismos factores epidemiológicos.

1.1.2.b. CRITERIOS DE EXCLUSION.

a.- Tanto las familias como los pacientes que no cumplieran los criterios anteriormente expuestos.

b.- Aquellos pacientes sospechosos de exposición o contacto con antígenos brucelares, bien con fines diagnósticos, terapéuticos y/o profesionales.

c.- Pacientes vacunados frente a vibrión colérico, en plazo inferior a 6 meses, o bien que hubiese padecido la enfermedad.

d.- Todos aquellos pacientes en los que existien sospecha de enfermedad infecciosa de cualquier etiología diferente a al bruecelar.

e.- Aquellas familias en la que alguno de sus miembros se dispersara o no estuviese presente en el momento del estudio.

f.- Aquellos pacientes en los que hubiese sido diagnósticado anteriormente de brucelosis.

Una vez aplicados los diferentes criterios, se seleccionaron 20 familias, con uno o más afectados de brucelosis, con un total de 92 miembros, con edades comprendidas entre 7 y 60 años, y de los cuales 27 son enfermos (21 hombres y 6 mujeres) con edades entre los 14 y 60 años.

- I.1.2.c. DISTRIBUCION.

Una vez efectuado la selección de las 20 familias, se distribuyeron en los siguientes grupos:

1) Pacientes:

- 27 enfermos con brucelosis (21 hombres y 6 mujeres).

2) Familias:

- 8 familias en las que sólo se afectan a hijos.
- 4 familias en las se afectan padres e hijos.
- 8 familias en las que sólo se afectan alguno de los padres.

A todos los sujetos que componen el presente estudio, tanto al grupo control, como a los miembros y pacientes de las familias, les fueron determinados los antigenos de histocompatibilidad de clase I por el Servicio de Inmunologia de la Ciudad Sanitaria Virgen de Las Nieves de Granada (Prof. Garrido-Torres Puchol): utilizando las especificidades reconononocidas en el 9º Workshop en 1984 (ALBERT) (Tabla V a la V-a).

## I.2. MATERIAL Y TECNICAS DE LABORATORIO.

### I.2.1. Instrumental.

- Matraz de Erlenmeyer de 25 cc.
- Perlas de vidrio.
- Jeringas de 15 cc.
- Tubos cónicos graduados de centrifuga de 15 ml.
- Pipetas de Pasteur.
- Centrifuga de mesa Jouan Mod. CR. 1000.
- Jeringa de Hamilton de 1 y 6 puntas.
- Cámara de Neubauer (Casa Bosco).
- Microcospio invertido Mod. Leitz.
- Placas de tipaje Terasaki (Casa Greiner).
- Estufa mod. Selecta.
- Tubos universales de centrifuga.
- P H M 64 Research Mater.

I.2.2. Reactivos.

- P B S (Fosfate Buffer Saline).
- Solución de Ficoll 400 (Pharmacie Fine Chemicale).
- R P M I Medium 1640 (Casa Gibco Europe) 200 cc por célula (placa).
- Festal Bovine Serum (Flow Laboratories).
- Clh 0,1 N (Suministrado por la casa Merck)
- Agua bidestilada.
- Parafina liquida (Casa Merck).
- Eosina amarillenta indicador y para microscopia al 5% (Casa Merck).
- Formaldehido al 3o % (Casa Probus).
- Suero de conejo.
- Sueros con especificidad reconocida en el 9°WORKSHOP, celebrado en 1984 (Tabla VI y VI-a).

I.3. MATERIAL GRAFICO.

La impresión de esta memoria ha sido realizada con un micro-ordenador marca ATARI SC1224, provisto de almacén de datos en un disco de 3.5" e impresora ATARI SMM804. Fueron utilizados los programas; Procesador de textos 1ST WORD PLUS y uno de gráficas NEOCROME.

## TABLA VI

ANTIGENOS HLA DEFINIDOS EN 1984 (ALBERT).

| LOCUS A | LOCUS B | | | LOCUS C |
|---|---|---|---|---|
| A1 | B5 | B44 | Bw64 | Cw1 |
| A2 | B7 | B45 | Bw65 | Cw2 |
| A3 | B8 | Bw66 | Bw67 | Cw3 |
| A9 | B12 | Bw47 | Bw70 | Cw4 |
| A10 | B13 | Bw48 | Bw71 | Cw5 |
| A11 | B14 | B49 | Bw72 | Cw6 |
| Aw19 | B15 | Bw50 | Bw73 | Cw7 |
| A23 | B16 | B51 | | Cw8 |
| A24 | B17 | Bw52 | Bw4 | |
| A25 | B18 | Bw53 | Bw6 | |
| A26 | B21 | Bw54 | | |
| A28 | Bw22 | Bw55 | | |
| A29 | B27 | Bw56 | | |
| A30 | B35 | Bw57 | | |
| A31 | B37 | Bw58 | | |
| A32 | B38 | Bw59 | | |
| Aw33 | B39 | Bw60 | | |
| Aw34 | B40 | Bw61 | | |
| Aw36 | Bw41 | Bw62 | | |
| Aw43 | Bw42 | Bw63 | | |
| Aw66 | | | | |
| Aw68 | | | | |
| Aw69 | | | | |

## TABLA VI-A

ASOCIACION DE LOS ANTIGENOS DEL LOCUS B CON EL BW4 Y BW6.

| BW4 | BW6 |
|---|---|
| B5, BW51, BW52 | B18 |
| BW53 | B35 |
| B27 | B7 |
| | BW22 |
| | BW42 |
| | BW54 |
| B15 | B15 |
| B17 | BW46 |
| B12 (BW44) | B12 (BW45) |
| B17 (BW49) | BW21 (BW50) |
| B13 | B40 |
| BW47 | BW41 |
| | BW48 |
| BW16 (BW38) | BW16 (BW39) |
| B37 | B8 |
| | B14 |

- Sueros con especificidad conocida que definen el:

LOCUS A

| ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| A1 | WARREN |
| A1 | CO-139 |
| A1 + A36 | ROSBECK |
| A1 + A36 | HOUSE-1106 |
| A2 | FER-85 |
| A2 | CO-156 |
| A2 | BB7.2 |
| A2 | FGR-692 |
| A3 | MO-AB |
| A3 | Z-44 |
| A3 | FGR-300 |
| A9 | MTC-8334 |
| A9 | FGR-4 |
| A9 | GR-837 |
| A10 | REID |
| A10 +B8 | SEVI-81 |
| A11 | GR-643 |
| A11 | MADRYC-338 |
| A11 + X | VH-104 |
| AW23 | LOOK |
| AW23 | CT-4858 |

| LOCUS A<br>ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| AW24 | DEIR-1214 |
| AW24 | FGR-5 |
| A25 + 26 + 34 | CO-155 |
| AW25 | 9W085 (STRASBOH) |
| A28 | W-7 |
| A28 | Fe-67 |
| A28 | CATBUSH |
| A29 | BI-52 |
| A29 | HTC-8125 |
| A29 | Fe-71 |
| A29 + B13 | VLC-238 |
| A30 + CW5 | Fe-82 |
| A30 + 31 | TF-402.P |
| A30 + 31 | MTO-8021 |
| A30 + 31 | VLC-198 |
| A31 | Fe-78 |
| A32 + 25 | VLC-181 |
| A32 + 25 | CATA |
| A32 | Fe-77 |
| A33 + 10 | DEKEISER-1108 |
| A33 | GR-66747 |

LOCUS A.

| ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| A33 | SEVI-20 |
| A33 | Fe-88 |
| A34 | HAMON |

| LOCUS ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| B5 | BARNA-11 |
| B5 | VH-10 |
| B5 | SEVI-169 |
| B5 | FdR-13 |
| B7 | FGR-595 |
| B7 + 22 | FGR-3 |
| B7 + 27 + 40 | MADRYC-13B |
| B8 | SEVI-19 |
| B8 | PEREZ MATEO |
| B8 | CO-74 |
| B12 | MTC-8126 |
| B12 | BAR-8581 |
| B12 | HONEYWOOD |
| B12 | FGR-20 |
| B13 | VLC-182 |
| B13 | SEVI-39 |
| B13 | HATCHGR-1187 |
| B14 | HEIBC |
| B14 | SEVI-55 |
| B14 | FGR-1013 |
| B14 | FGR-6 |
| B14 + 33 | MADRYC-373 |

LOCUS B

| ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| B15 | 9W285 |
| B15 + 17 | SANT-2889 |
| B15 | Fe-24 |
| B15 + 17 | COB-81 |
| B15 | CT-562 |
| B16 + A10 | CO-1063 |
| B17 | SPRIGGS |
| B17 | SEVI-465 |
| B17 | Za-43 |
| B17 | GR-83727 |
| B18 | Fe-31 |
| B18 | MADRYC-68 |
| B18 | CT-5513 |
| B21 | VLC-107 |
| B21 + 12 | FGR-1 |
| B22 + 41 | LACK |
| B22 | SEVI-338 |
| B22 | SEVI-185 |
| B27 | FGR-1020 |
| B27 | GR-720 |
| B27 | SEVI-148 |

LOCUS B

| ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| B35 + 5 | MADRYC-48B |
| B35 + 5 | Za-68 |
| B35 + 5 | CO-1089 |
| B35 + 5 | MELERO |
| B35 | FGR-85 |
| B35 | MADRYC-348 |
| B37 | TYT-12400 |
| B37 | BW597 |
| B37 | Fe-142 |
| B38 + A25 | EPA |
| B39 + A2 | CLB-235 |
| B39 | RAFF |
| B39 | SEVI-34 |
| B40 | CO-91 |
| B40 | LAMB |
| B40 + 48 + 7 | CO-83 |
| B40 | 811275 |
| B41 + 44 | MO-58496 |
| B41 | CLB-196 |
| B44 | FGR-29 |
| B44 | FGR-28 |
| B44 | Za-87 |

LOCUS B

| ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| B44 | M°CABE-1253 |
| B49 | Fe-99 |
| B49 | SP-722 |
| B51 | WATSON |
| B51 | SEVI-383 |
| B51 | NOVE-10W174 |
| BW62 | CC464-3 |
| BW62 | 9W-256VR57467 |
| B60 + CW4 | GERRTZ |
| BW4 | SP-100 |
| BW4 | VH-49 |
| BW6 | BLOOM VR-52622 |
| BW6 | CO-100 |
| BW6 | SP-926 |

LOCUS C

| ESPECIFICIDAD | NOMBRE DEL SUERO |
|---|---|
| CW1 | CLB-908 |
| CW1 | Fe-124 |
| CW1 | SIMO-10W512 |
| CW2 | V-207 |
| CW2 | CLB-123 |
| CW2 | MADRYC-7B |
| CW3 | 813535/10 |
| CW3 | CARF |
| CW3 | 802973C/10 |
| CW4 | HARPER |
| CW4 | CLB-105 |
| CW4 | FIORE-55 |
| CW5 | BECH |
| CW5 | MANNING |
| CW5 | MADRYC-26 |
| CW6 | LEES |
| CW6 | WINZER-1269 |
| CW7 | CLB-147/3 |

Todos estos sueros fueron cedidos por diferentes Laboratorios:

- Dr. VIVES Servicio de Inmunologia del Hospital Clinico. Barcelona:

A11 + x..... VH-104

B15.....BARNA-11

B12.....BAR-8581

BW4.....VH-49

- DR. FESTENSTEIN Departement of Inmunology London. Hospital Medical College. London England.

A1..... HARREN

A10.....REID

AW23.....LOOK

A29.....CATBUSH

B12.....HONEYWOOD

B22 + 41.....LACK

B49 + 50.....PERENDOR

B51.....WATSON

CW4.....HARRER

CW5.....MANNING

CW6.....LESS

- Dr. GARRIDO Servicio de Inmunologia de la Facultad de Medicina. Córdoba.

A1.....CO-139

A2.....CO-156

A25 + 26 + 34.....CO-155

B5.....CO-74

B16 + A10.....CO-1063

B21 + 12.....CO-1011

B35 + 5.....CO-1089

B40.....CO-91

BW6.....CO-100

- Dr. MONTORO Servicio de Inmunologia de la Ciudad Sanitaria la Fe. Valencia:

A29 + B13.....VLC-238

A30 + 31.....VLC-198

A32 + 25.....VLC-181

B13.....VLC-182

B21.....VLC-107

- Dr. KREISLER Servicio de Inmunologia Clinica Puerta de Hierro. Madrid.

A9.....MTC-8123

A30 + 31.....MTC-8021

A29.....MTC-8125

B12.....MTC-8126

- Dr. GERDA de LANE Depatament Inmunohaematology Central Laboratoriy of Nethherlands red cross blood Transfusion, Amsterdan. Holand?.

B15 + 17.....CLB-81

B39 + 12.....CLB-235

B40 + 48 + 7.....CLB-83

B41.....CLB-196

CW1.....CLB-908

CW2.....CLB-123

CW4.....CLB-105

CW7.....CLB-147/3

- Dra. GARCIA MASDEWALL Laboratorio de Inmunologia Ciudad Sanitaria "Enrique Sotomayor". Bilbao:

A29.....BI-52

- Dr. FERRARA Centro Riserche Inmunoematologiche, Ospedale General Provinciale Massa. Italie:

A29.....Fe-67

A29.....Fe-71

A30 + CW5.....Fe-82

A31.....Fe-78

A32.....Fe-77

A33.....Fe-88

B15.....Fe-24

B18.....Fe-31

B49.....Fe-99

B37.....Fe-142

CW1.....Fe-124

- Dr. NUÑEZ Laboratorio de Inmunologia Ciudad Sanitaria Virgen del Rocio. Sevilla:

A10 + B8 + B5.....SEVI-81

A33.....SEVI-20

B8.....SEVI-19

B5.....SEVI-169

B13.....SEVI-39

B14.....SEVI-55

B17.....SEVI-465

B22.....SEVI-338

B22.....SEVI-185

B27.....SEVI-148

B51.....SEVI-383

- Dr. ARNAIZ Servicio de Inmulogia Centro Especial Ramón y Cajal:

A11.....MADRYC-33B

B7 + 27.....MADRYC-13B

B14 + B33.....MADRYC-37B

B18.....MADRYC-68

B35.....MADRYC-48B

B35.....MADRYC-34B

CW2.....MADRYC-7B

CW5.....MADRYC-2B

- Dr. MARZO Servicio Regional de Hematologia Ciudad Sanitaria "José Antonio Primo de Rivera". Zaragoza:

B44.....Za-87

B17.....Za-43

B35 + 5.....Za-68

- Dr. GANTES Servicio de Reumatologia (Histocompatibiliadad) Hospital General y Clinico de la Universidad de la Laguna. Tenerife:

A30 + 31.....TF-402-P

- Dr. MACHADO Centro de HIstocompatibilidad, Lisboa. Portugal:

B49.....SP-722

BW4.....SP-100

BW6.....SP-926

- Prof. GARRIDO TORRES PUCHOL Servicio de Inmunologia de la Ciudad Sanitaria Virgen de la Nieves. Granada:

A1.....FGR-851

A2.....FGR-692

A3.....FGR-300

A9.....FGR-4

A9.....GR-837

A11.....GR-643

AW24.....FGR-54

A28.....Nº 7

B5 (51).....FGR-13

B7.....FGR-595

B7 + 22.....FGR-2

B12.....FGR-20

B14.....FGR-1013

B14.....FGR-6

B17.....GR-83725

B21 + 12.....FGR-1

B27.....FGR-1020

B27.....GR-720

B35.....FGR-85

B35 + 5.....HELERO

B44.....FGR-29

B44.....FGR-28

BH57.....FGR-114

- Dr. MAYER Centre Regionnal de Tranfusion Sanguine. Strasbourg.France.

AW25.....9W085 STRASBOCK

B15.....9W285 STRASBOCK

B37.....9W597 STRASBCK

CW3.....CARF

CW5.....BEC

CW2.....V-207

- Dr. FAUCHET Centre Regional de Transfusion Sanguine. Rennes. France.

A34.....HAMMON.

B38 + A25.....EPAI

B39.....RAFF

B40.....LAMB

B51.....NOVE-10W174

CW1.....SIMO-10W512

- Dr. STASTNYN Depart of Internal Medice. Texas. USA.

B17.....SPRINGS

- DR. HANSEN Genetic Systems Corporation. Seatle. USA.

A1 + 36.....HOUSE 106

A33 + 10.....DEKEISER 1108

AW24.....DEIR 4214

B13.....HATCHER 1187

B44.....M°CABE

CW6.....WINZER

- Dr.HACKBART The Blood Center of Southeastern. Wisconsi. USA.

A1 + 36.....HOUSE

B60 + CW4.....GERRITZ

- Dra. BODMER Imperial Cancer Research Fund Laboratories. London.England.

A2.....BB7-2

- DR. NEUMEYER Universidad de Göttingen. FRA.

CW3.....813535/10

CW3.....8029731/10

- Dr. POLCACK Memorial Sloan-Keltoning Cancer Center. New York. USA.

CW4.....FIDRE-55

- Dr.GAHP Institut fur Blutgruppenserologie. Austria.

B14.....HEILB

- Eurotransplant University Hospital, Leiden. Holland.

BW62.....9W256

- TDIT Provincial Laboratorie for Tissue Inaunology. Sout-Africa.

AW23.....CT 4858

B18.....CT 5513

B15.....CT 562

B. II.- METODO.

B.II.1 Método para el tipaje de los locus A, B y C

Para la detección de los antigenos del Sistema HLA, se utilizó una técnica serológica basada en la propiedad que tiene el complemento de que al unirse al complejo antigeno-anticuerpo es capaz de lesionar la membrana de la célula permitiendo de esta forma la penetración de colorantes vitales, lo cual facilita la valoración microcóspica de muerte celular.

Es la técnica de Microlintocitotoxicidad mediada por complemento (AMOS, 1979), y estandarizada por el I.N.H (National Institute of Hearlh, USA).

Se trata de una reacción inmunológica de tipo II en la que sus componentes son : antigeno (HLA de los linfocitos circulantes), anticuerpos (suero anti-HLA) y complemento (complemento de conejo).

B.II.1. Preparación de las placas de TERASAKI.

Las placas fueron recubiertas con parafina liquida, situando en cada uno de los pocillos 1 microlito de suero con los anticuerpos que definian los antigenos HLA conocidos (expuestos en el apartado de reactivos) y que cumplian las caracteristicas exigidas para es fin (monoespecificidad o como máximo biespeicifidad, fácil reproductibilidad de resultados y clara definición de positividad o negatividad).

De esta forma fueron preparadas en total 273 placas para la determinación de antigenos del los Locus A, B y C.

Estas placas fueron congeladas a -40°C y dispuestas para usarlas gradualmente.

B.II.1.2.. Preparación del suero de conejo.

Se obtiene por sangrado de un pool de conejos sanos y no vacunados, recogido en tubos de cristal y situado en estufa a 37°C durante 45 minutos con posterio recogida del suero previa centrifugación durante 15 minutos, temperatura que se mantiene durante toda la manipulación.

Fué utilizada como fuente de complemento la dilución 1/2 obtenida de la titulación del mismo, por la propiedad de combinarse con la mayoria de los complejos antigeno-anticuerpo de las células sensibilizadas y de provocar muerte celular.

B.II.1.3. Obtención de Linfocitos totales.

Para ello se extrae una muestra de 15 cc de sangre periférica mediante punción venosa, que se vierte en un matra ERLENMEYER de 25 cc que contiene unas bolitas de vidrio.

Se desfibrina mediante agitación suave, durante 10 minutos. Una vez desfibrinada se diluye la sangre con P.B.S. (Fosfate Buffer Salina), a partes iguales.

En tubos de centrifuga de 15 ml. se pone 5 cc. de Ficoll (Ficoll Pharmacie Chemicals) y sobre él con mucho cuiado, para evitar que haya mezcla, se pone la sangre con pipeta haciendóla resbalar lentamente. Se coloca en centrifuga durante 2o minutos a 2.000 r.p.m.

A continuación se aspiran con pipeta PASTEUR los halos de linfocitos que quedan en la interfase Ficoll-PBS + suero.

Estos linfocitos son lavados 2 ó 3 veces con PBS en tubo universal y centrifugados a 2.000 r.p.m. durante 7 minutos cada vez.

B.II.1.4. <u>Técnica de contaje</u>.

Los linfocitos obtenidos, a continuación en el microcospio óptico de contraste de fases u utilizando una cámara de NEUBAUER, se procede a contar las células, ajustando la concentración celular a 3 x $10^6$/ml, desechando para el montaje aquellas células que morfológicamente aparezcan muertas.

B.II.1.4.

En una placa de TERASAKI que contiene los sueros anti-A, B y C, depositamos un microlitro de la suspensión celular en cada pocillo, por medio de una jeringa de HAMILTON de 50 ml.

Se incuban las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces, añadimos en cada pocillo 5 microlitros de complemento de conejo como fuente de complemento y se vuelve a incubar durante 60 minutos, al cabo de los cuales se pone Eosina al 5% (3mcl) y Formol al 5o% (6 mcl) por pocillo, y se procede a la lectura de las placas.

B.II.1.5. Lectura de resultados y asignación de especificidades.

Se realiza en el microcospio de contraste de fases invertido y binocular, a 200 aumentos.

Buscamos los pocillos en los que hay linfocitos muertos. Las células muertas pierden brillo y se oscurecen, manera por la que podemos leer la placa al microcospio.

Se valora la reacción según el procentaje de células muertas en cada pocillo utilizano los siguientes indices:

Indice 0 _____ 0-20% células muertas.

Indice 1 _____ 21-40% células muertas.

Indice 2 _____ 41-60% células muertas.

Indice 3 _____ 61-80% céulas muertas.

Indice 4 _____ 81-100% células muertas.

Asignamos el valor 8 al 80-100% de muerte celular, 6 al 75%, 4 al 50%, 2 al 25%, y si están vivas todas las células, entonces se el da el valor 1.

La presencia de la especificidad fue definida cuando:

a) La reacción de muerte celular alcanzó como minimo el 60 %.

b) Cuando fue positivas con todos los sueros que definian un mismo antigeno.

La interpretación del fenotipo se hizo de acuerdo con el plano de la bateria de sueros empleados en cada placa que indica la localización y especificidad de los sueros.

B.11.3. METODO RECOGIDA DE DATOS.

La recogida de datos a las familias con objeto de la selección se ha realizado mediante una encuesta epidemiológica para intentar que los miembros de las distintas familias estuvieran en una misma unidad y bajo la influencia de los mismos factores epidemilógicos, asi como los datos clinicos referentes a los enfermos; estos datos quedan reflejados en fichas (Tabla VII y VII-a).

## TABLA VII

### ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA

DATOS PERSONALES

Nombre.....

Sexo.....Edad.....Profesion.....

Domicilio.....Población.....

ANTECEDENTES PATOLOGICOS

¿ Ha padecido alguna enfermedad¿.....

¿ Ha padecido Fiebres de Malta ?.....

ANTECEDENTES EPIDEMIOLOGICOS

¿ Consume Leche?.....

Si consume leche: Tipo de leche (Cabra, vaca, oveja).....

¿ Es la misma leche que toma todos los convivientes de la familia?.....

¿ Toma leche fuera de su domicilio?.....

¿Consume queso fresco, requeson....?

Que todos los miembros de la familias.....

Ademas toma fuera (Bar, vecino).....

¿Bebe agua de abrevaderos?.....

¿Posee ganado?.....

Lo cuida personalmente, ordeña etc.....

Contacto indirecto.

Tipo de vivienda

¿tiene establo ?.....Dentro.....Exterior.....

TABLA VII-a

DATOS FAMILIARES

Número de miembros.....

Número de convivientes afectados.....

Relación (Enfermo/Sano).....

¿Tiene los mismos hábitos? (Comida, trabajo etc).....

Relación con el enfermo (cónyuge, juega, misma habitación etc)

.....

DATOS CLINICOS

Comienzo de la enfermedad.....

Fiebre ( Continua, ondulante, en agujas).....

Intensidad de la fiebre.....

Manifestaciones clínicas.....

Complicaciones.....

Casos de vecindad.....

DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

Clínico, Serológico, hemocultivo.....

Fármacos empleados y dosis.....

TIPAJE.....

B. II.3. METODO ESTADISTICO

- Chi cuadrado de bondad del ajuste.
- Test exacto de FISHER.
- Métodos de BONFERRONI Y NEUMAN-KEULS.
- Método de la Chi-Cuadrado inversa de FISHER (Metaanálisis)

B.II.3.2. Determiación de los cálculos.

- Frecuencia fenotipica relativa: fi= Oi/N, donde Oi es el número de individuos en los cuales eta presente un determinado antigeno en una ustra de N sujetos.

- La frecuencia génica se ha determinado por la fórmula (HALDANE):

$$pi = 1-\sqrt{1-fi}$$

- La frecuencia génica de un alelo no conocido se ha calculado por la fórmula:

$$q = 1 - \Sigma p$$

- La frecuencia de Haplotipo (H) se ha obtendio por la fórmula:

$H = p1.p2 + \hat{}$ , donde p1p2 es el producto de la frecuencia de dos genes.

- La asociación gamética o desequilibrio de enlance (^) entre alelos de dos locus ha sido determiando por el método de MATTIUZ y cols (1970).

- Para el modelo de múltiples locus se ha utilizado una fórmula

derivada de la clásica $D = P_{AB} - P_A \times P_B$, donde $P_A$ y $P_b$ son la frecuencia de genes y $P_{AB}$ la frecuencia del haplotipo observada;

$D = P_{ABC} - P_A \times P_B \times P_C$

La $D_s$ estandarizada ha sido calculada por la fórmula;

$Ds = D/D\ max.$ donde $D\ max = P_A ( 1 - P_B \times P_C )$

- El riesgo relativo hasido determinado por el método clásico de WOLFF (1955).

- También el riesgo relativo ha sido calculado por la fórmula de BENGTSSON y THOMSON (1981).

C. RESULTADOS.

C.I.-EXPOSICION DE RESULTADOS.

## 1. EXPOSICION DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en el presente estudio se expresan en forma de Figuras y Tablas.

A.- Tipaje de las familias, en las que se incluyen a todos los miembros. (Figuras XI a XI-s).

En la exposición de los tipajes representamos con signo "-" o "Blanco", la ausencia de antigeno en el citado Locus.

B.- Haplotipos de los enfermos con brucelosis (Tablas VIII, VIII-a).

C.- Haplotipos de los familiares no afectados ( Tablas IX, IX-a y IX-b).

D.- Presencia de cada uno de los antigenos de Clase I (Locus A, B y C) representados en las siguientes Tablas.

D-1.- Grupo control (Tablas X, X-a y X-b).

D-2.- Grupo de todos los miembros de las familias (Tablas X, X-a y X-b).

D-3.- Grupo total de enfermos con Brucelosis (Tablas X, X-a y X-b).

D-4.- Grupo total de familiares no afectados (Tablas X, X-a y X-b).

E.- Frecuencia fenotipica relativa expresadas en la siguientes Tablas.

E-1.- Grupo total de todos los miembros de las familias (Tablas XI, XI-a y XI-b).

E-2.- Grupo total de enfermos con brucelosis (Tablas XII, XII-a y XII-b).

E-3.- Grupo de familiares no afectados (Tablas XII, XIII-a y XIIII-b).

F.- Frecuencia fenotipica de los antigenos de Clase I (Locus A, B y C) expresados en %, representadas en las siguientes Tablas:

F-1.- Grupo Control (Tablas XXIV, XXIV-a, XXIV-b,XXV, XXV-a, XXV-b,XXVI, XXVI-a y XXVI-b).

F-2.- Grupo total de todos los miembros de las familias (Tablas XXIV, XXIV-a y XXIV-b).

F-3.- Grupo de enfermos con brucelosis de las familias. (Tablas XXV, XXV-a,XXV-b, XXVII, XXVII-a y XXVII-b).

F-4.- Grupo de familiares no afectados. (Tablas XXII, XXII-a,XXII-b,XXV, XXV-a y XXV-b).

G.- Frecuencia génica expresadas en las siguientes tablas.

G.1- Grupo total de todos los miembros de las familias (Tablas XI, XI-a y XI-b).

G.2.- Grupo de los enfermos con Brucelosis (Tablas XII,

XII-a y XII-b).

G-3.- Grupo total de los familiares no afectados ( Tablas XIII, XIII-a y XIII-b).

H.- Presencia de haplotipos formados por alelos de dos Locus, expresados en la siguientes tablas:

H-1.- Locus A y B.

1. Grupo total de todos los miembros de las familias (Tablas XIV).
2. Grupo de pacientes con brucelosis (Tabla XVII).
3. Grupo total de sujetos no afectados ( Tabla XX).

H.2.- Locus B y C.

1. Grupo de todos los miembros de las familias (Tabla XV)
2. Grupo de enfermos con brucelosis (Tabla XVIII).
3. Grupo total de sujetos no afectados (Tabla XXI).

H.3.- Locus A y C.

1. Grupo de todos los miembros de las familias (Tabla XVI)
2. Grupo de enfermos con Brucelosis (Tabla XIX).
3. Grupo familiares no afectados ( Tabla XXII).

H.4. Locus A, B y C.

1. Grupo de enfermos con Brucelosis (Tablas VIII y VIII-a)
2. Grupo total de sujetos no afectados (Tablas IX, IX-a y IX-b).
3. Grupo de enfermos con brucelosis y que se han incluido en el grupo de de sujetos no afectados.(Tabla XXIII).

I.- Estudio comparativo de la frecuencia fenotipica de cada uno de los antigenos de Clase I, expresados en %, entre:

I-1.- Grupo Control y el grupo de Familias, expuesto en las Tablas XXIV, XXIV-a y XXIV-b.

Siendo estadisticamente significativos los antigenos:

- HLA-A2 en el 44.89% de los controles y el 56.52% en los miembros de las familias con Valor P de 0.0067.
- HLA-A9 en el 21.89% del grupo control frente al 8.69 %de la familias con Valor P de 0.009.
- HLA-A24 en el 1,46% y 14.13% respectivamente con Valor P de 0.000000012.
- HLA-B12 en el 16.42% de los controles frente al 3.26% de las familias.
- HLA-BW41 en 0% y 11.96% de los repectivos grupo

con un Valor de P de 0.000000016.

- HLA-B Blanco en el 31.02% del grupo control frente al 14.13% de las familias con un Valor de P de 0.00096.

I-2.- Grupo Control y el de enfermos con Brucelosis, expuesto en las Tablas XXV, XXV-a y XXV-b, siendo estadisticamente significativos:

- HLA-BW41 en el 0% de los controles frente al 18.52% de los enfermos, con una P de 0.0000041.

I-3.- Grupo Control y el de Familiares no afectados, expuesto en las Tablas XXVI, XXVI-a y XXVI-b. Siendo estadisticamente significativos los antigenos:

- HLA-A24 en el 1.46% del grupo control frente al 13.85% del grupo de los no afectados, con un Valor de P de 0.000000043.

I-4.- Grupo de Enfermos y el de sus familiares no afectados, expuesto en las Tablas XXVII, XXVII-a y XXVII-b, no encontrándose ningún antigeno estadisticamente significativo.

J.- El Riesgo Relativo se ha calculado en aquellos antigenos que han resultado estadisticamente significativos cuando se

han comparado los distintos grupos en este trabajo o en otros estudios.

Los resultados se expresan en la Tabla XXVIII.

K.- La Fracción Etiológica, al igual que el Riesgo Relativo solo ha sido calculado en los antigenos que han sido significativos la asocicación en este trabajo o en otros estudios, y se expresan en la Tabla XXVIII.

L.- El Desequilibrio de Enlance entre alelos de dos Locus diferentes.

L-1.- Grupo de todos los miembros de las familias (Tablas XXIX, XXIX-a, XXVIX-b, XXVIX-c y XXVIX-d).

L-2.- Grupo de familiares no afectados (Tablas XXX, XXX-a, XXX-b, XXX-c y XXX-d).

L-3.- Grupo total de los enfermos con Brucelosis (Tablas XXXI, XXXI-a, XXXI-b, XXXI-c y XXXI-d).

M.- Frecuencia de Haplotipos formado por alelos de 2 Locus diferentes.

M-1.- Grupo de todos los miembros de las familias (Tablas XXIX, XXIX-a, XXIX-b, XXIX-c y XXIX-d).

M-2.- Grupo de familiares no afectados ( Tablas XXX, XXX-a, XXX-b, XXX-c y XXX-d).

M-3.- Grupo total de enfermos con brucelosis ( Tablas

XXXI, XXXI-a, XXXI-b, XXXI-c y XXXI-d).

N.- Significación de la asociación entre alelos de dos Locus diferentes (Locus A, B y C) del:

N-1.- <u>Grupo de todos los miembros de las Familias</u>, expuesto en las Tablas XIX, XIX-a, XIX-c y XIX-d. Siendo estadisticamente significativos las asociaciones de los antigenos de dos Locus:

- A1 B8 con un valor de P de 0.0000031.
- A2 B21 con una P de 0.000066.
- A3 B7 con un valor de P de 0.00025.
- A3 B35 con un Valor de P de 0.00025.
- A24 B13 con una Valor de P de 0.000015.
- A24 B15 con P= 0.00028.
- A28 B14 con un Valor de P de 0.00000014.
- A29 B44 con una P de 0.0000014.
- B27 CW1 con un Valor de P de 0.000000007.
- B40 CW3 con una P de 0.00000000075.
- B35 CW4 con un Valor de P < 0.000000000000001.

B13 CW6 con un Valor de P de 0.0000098.

N-2.- <u>Grupo de Familiares no afectados</u>, expresado en las tablas XXX, XXX-a, XXX-b, XXX-c y XXX-d. Siendo significativos las asociaciones entre los antigenos:

- A1 B7 con un Valor P de 0.00017.

- A2 B21 con una P de 0.0001.
- A24 B15 con un Valor de P de 0.00023.
- A28 B14 con un Valor de P = 0.000015.
- A29 B44 con un valor P de 0.000015.
- A-- B35 con una P = 0.00013.
- B27 CW1 con una P de 0.00000039
- B40 CW3 con un Valor de P de 0.000000012.
- B35 CW4 con un Valor de P de 0.00000041.

N-3.- Grupo total de enfermos con Brucelosis, expresado en las Tablas XXXi, XXXI-a, XXXI-b, XXXI-c y XXXI-d. Siendo estadisticamente significativo la asociación entre:

- B35 CW4 con un Valor de P 0.000001.

O.- La segregación de los Haplotipos entre los miembros de las familias, expuesta en las Tablas XXXII y XXXII-a.

P.- Estudio comparativo de la frecuencia observada y la esperada de haplotipos compartidos expresado en la Tabla XXXIII, entre:

P-1.- Parejas de hermanos, uno con Brucelosis y el otro sano, con un Valor de $X^2$ = 0.156, no siendo estadisticamente significativo.

## C.II.- ANALISIS DE RESULTADOS

## 2. ANALISIS DE RESULTADOS

### 2.1.- COMPARACION DE LAS FRECUENCIAS FENOTIPICAS.

El objetivo es comparar las frecuencias de presentación de cada antigeno del sistmea HLA en dos grupos de individuos (Controles y Familias, por ejemplo).

Dado de que las muestras son independientes, la técnica adaecuada seria la del Test $X^2$ en tabla 2 x 2. Sin embargo, el hecho de que se van a hacer comparaciones múltiples ( lo que exige obtener Valor de P bastantes precisos) y que el Test $X^2$ es un método aproximado ( lo que implica que los pequeños valores de P sean poco fiables, y justamente en ellos es donde radicaran las significaciones), parece conveniente analizar el problema por el método exacto, conocido por el Test de FISHER.

Para determinar los antigenos en los que se producen las significaciones, habria de compararse los citados valores de P con el error global $\alpha$ planificado de antemano, aunque las comparaciones múltiples que se van a realizar aconsejan compararlo con el el valor $\alpha/K$, siendo K el número de comparaciones realizadas ( Método de BONFERRONI). Con ello, un test dara significativo cuando suceda que su valor P sea inferior o igual que $\alpha/K$.

El procedimiento se complementa con el Método de NEWMAN-

KEULS, que permiten recoger a veces alguna significación, que antes no lo era.

2.1.1.- Comparación de las frecuencias fenotipicas entre el grupo Control y el grupo Familias.

Las Tablas XXIV, XXIV-a y XXIV-b contienen las frecuencias absolutas de cada antigeno de Clase I en cada grupo con sus porcentajes. Los valores P de la misma aluden a los encontrados por el test exacto de FISHER. A pie de Tabla se indican los valores teóricos utilizados por el test. Asi, en el primer paso $\alpha = 0.05/50 = 1 \times 10^{-3}$, declarándose significativos todos aquellos valores de P inferior a dicho número, lo que produce 6 resultados significativos.

Para el segundo paso será $\alpha = 0.0544 = 1.136 \times 10^{-3}$. puesto que ya sólo restan 50-6 = 44 test no significativos; como con este segundo paso no se incorpora ninguna otra significación, el procedimiento finaliza.

El análisis del estudio estadistico está expresado con:

a).- "SI": resultados con significación estadistica.

b).- "NO": resultados sin significación estadistica.

El Riesgo Relativo sólo se ha calculado en los antigenos que hansido significativos en este trabajo o en otros estudios,

por el método clásico de WOOLF ( 1955):

| | Nº de individuos | |
|---|---|---|
| | Con el antigeno | Sin el antigeno |
| Familias | a | b |
| Controles | c | d |

$$RR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

El Riesgo relativo ( δ ) calculado por la fórmula de BENGTSSON y THOMSON (1981) en aquellos antigenos que han sido significativos en este trabajo o en otros estudios:

$$\sigma = \frac{(FAD - FAP)}{(1 - FAP)}$$

donde FAD y FAP indican la frecuencia del antigeno entre los individuos de un grupo y el otro. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla XXVIII.

La descripción del método es similar para el resto de los grupos comparados: Grupo Control frente al Grupo total de enfermos con Brucelosis (Tablas XXV, XXV-a y XXV-b), Grupo Control frente al Grupo de Familiares no afectados ( Tablas XXVI, XXVI-a, y XXVI-b), Grupo Total de enfermos frente al Grupo de Familiares no afectados ( Tablas XXVII, XXVII-a y XXVII-b).

## 2.2- ESTUDIO DE LA ASOCIACION GAMETICA Y SU SIGNIFICACION.

El objetivo es comprobar si la presencia de un alelo condiciona la presencia de otro determinado alelo o asoc o a la enfermedad (Brucelosis), es decir, si existe asociacion o no entre dos antigenos dados de dos diferentes Locus.

### 2.2.1.- Grupo de Familias ( Tablas XXIX, XXIX-a, XXIX-b, XXIX-c y XXIX-d).

En una muestra de 92 sujetos (184 haplotipos), se determinanel número de fenotipos observados con los antigenos presentes (O++), el número de fenotipos con el primer antigeno presente y el segundo ausente (O+-), el número de fenotipos con el primer antigeno ausente y el segundo presente (O-+) y el número de fenotipos observados con los dos antigenos ausentes (O--).

Los resultados pueden presentarse en un formato de Tabla de contingencia 2 x 2 como el siguiente:

| | | Antigeno A + | Antigeno A - | Total |
|---|---|---|---|---|
| Antigeno B | + | O++ | O+- | O+. |
| | - | O-+ | O-- | O-. |
| Total | | O.+ | O.- | O.. |

cuyo análisis se hace por el test exacto de FISHER.

El resto de las tablas contienen el valor de P, por el método de FISHER y su significación obtenida por el método de BONFERRONI y NEWMAN-KEULS, descrito anteriormente.

El análisis del estudio estadistico está expresado con:

a.- "SI": resultados con significación estadistica.

b.- "NO": resultados sin significación estadistica.

En dichas Tablas se incluye también el valor ^ ( Grado de asociación gamética o desequilibrio de unión), para todos los haplotipos, si bien unicamente deberian ser considerados aquellos obtenidos en la haplotipos en los que se encontró significación. El mencionado valor ha sido obtenido por la fórmula clásica ( Mattiuz, 1970):

$$\hat{} = \sqrt{\frac{O--}{O..}} - \sqrt{\frac{(O.-)(O-.)}{O^2..}}$$

La última columna expresa el valor de H (frecuencia de Haplotipos), que ha sido obtenido por la fórmula:

$$H = p1.p2 + \hat{}$$

donde p1 y p2 es el producto de la frecuencia génica de dos

alelos. La frecuencia génica a su vez ha sido calculada por la fórmula ( HALDANE):

$$pi = 1 - \sqrt{1-fi}$$

siendo fi la frecuencia relativa fenotipica. Los resultados tanto de la frecuencia fenotipica como de la génica son expresados en las Tablas XI, XI-a, XI-b, XII, XII-a y XII-b.

La descripción, tanto del método estadistico como la determinación de los cálculos, es similar para el resto de los grupos: Grupo total de enfermos con brucelosis (Tablas XXI a XXI-d), Grupo de Familiares no afectados ( Tablas XXX a XXX-d).

2.3.- Estudio de los haplotipos compartidos en Parejas de hermanos.

La Tabla XXXIII presenta las frecuencias observadas (Oi) y esperadas (Ei) bajo la hipótesis de segregación al azar. Su análisis por chi-cuadrado de $X^2$ exp = 0.156 que, con 2 grados de libertad, no es significativa.

Por tanto no hay evidencias de la distorsión en la segregación de los haplotipos paternos. Aunque las cantidades esperadas son bajas ( dos de ellas menor de 5), el bajo valor encontrado permite confiar en la validez de la conclusión del test.

C. III.- FIGURAS Y TABLAS.

**FIGURA 11**

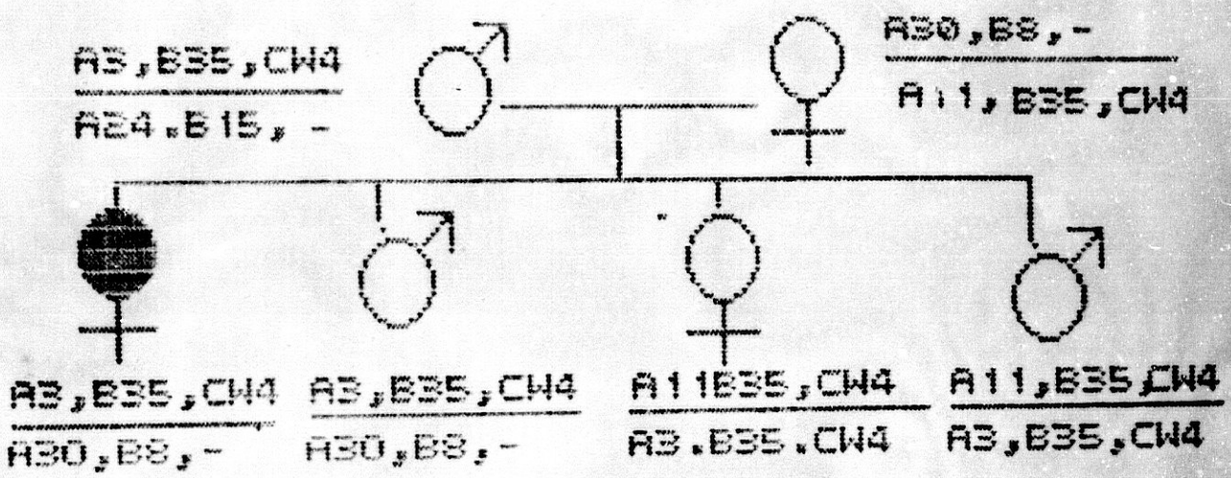

A3,B35,CW4
A24,B15,-
A30,B8,-
A11,B35,CW4
A3,B35,CW4
A30,B8,-
A3,B35,CW4
A30,B8,-
A11B35,CW4
A3,B35,CW4
A11,B35,CW4
A3,B35,CW4

FIGURA 11-a

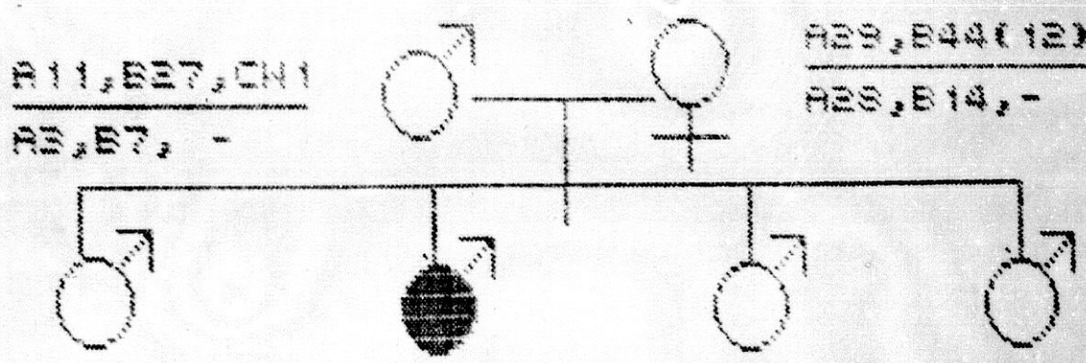

A11,B37,CN1
A3,B7, -
A29,B44(12)-
A28,B14,-
A11,B37,CN1
A28,B14,-
A11,B37, CN1
A3,B44(12)-
A3,B7,-
A29,B44(12)-
A3,B7,-
A28,B14,-

FIGURA 11-b

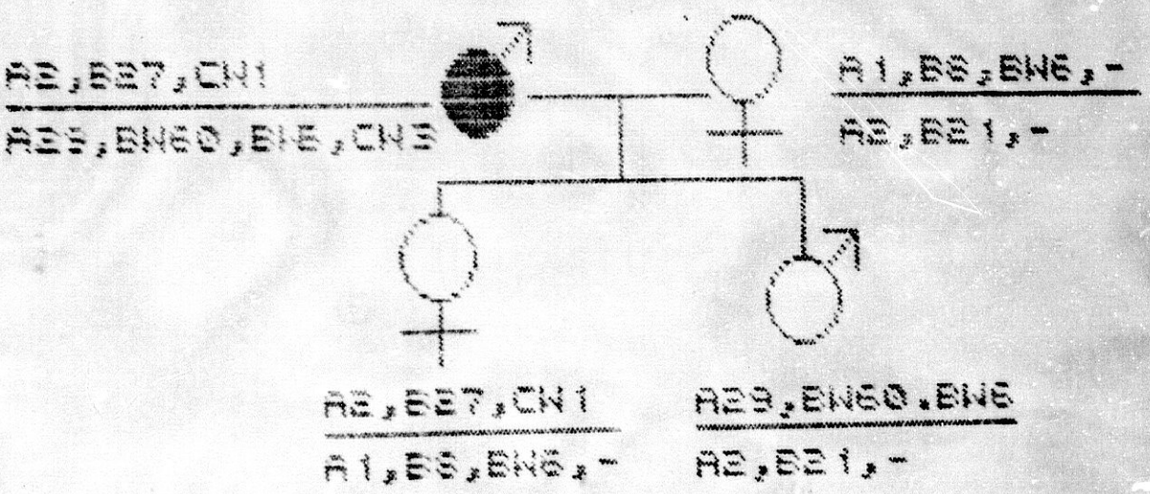

A3,B37,CN1
A35,BN60,BN6,CN3
A1,B8,BN6,-
A2,B21,-
A2,B37,CN1
A1,B8,BN6,-
A29,BN60,BN6
A2,B21,-

**FIGURA 11-c**

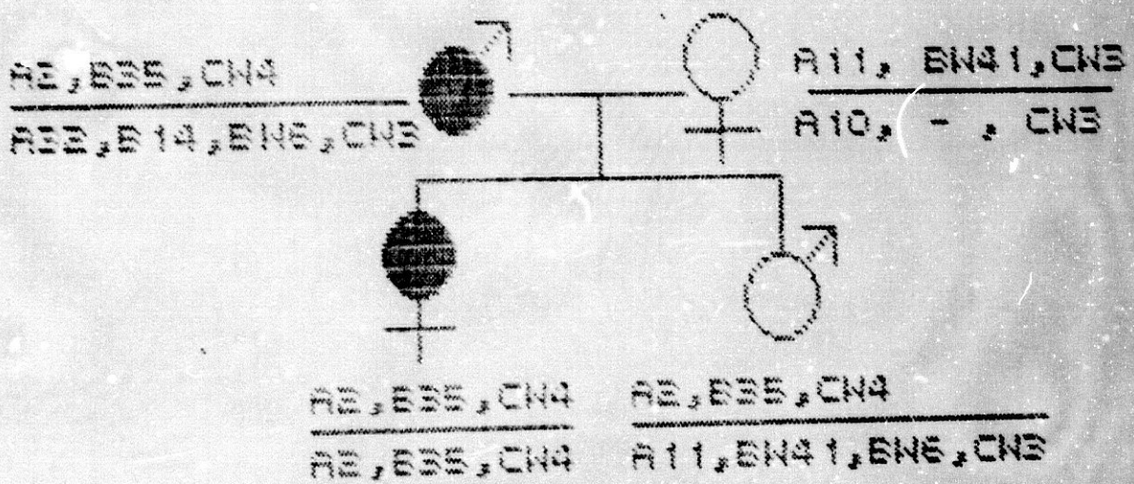

A2,B35,CN4
A33,B14,BN6,CN3
A11, BN41,CN3
A10, - , CN3
A2,B35,CN4
A2,B35,CN4
A2,B35,CN4
A11,BN41,BN6,CN3

**FIGURA 11-d**

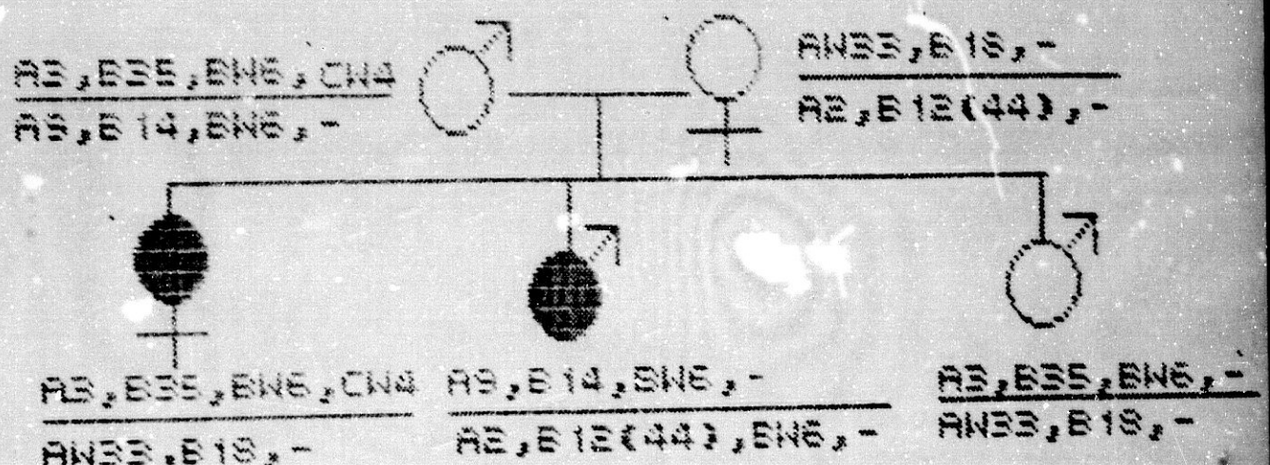

A3,B35,BW6,CW4
A9,B14,BW6,-
AW33,B16,-
A2,B12(44),-
A3,B35,BW6,CW4
AW33,B16,-
A9,B14,BW6,-
A2,B12(44),BW6,-
A3,B35,BW6,-
AW33,B16,-

**FIGURA 11-e**

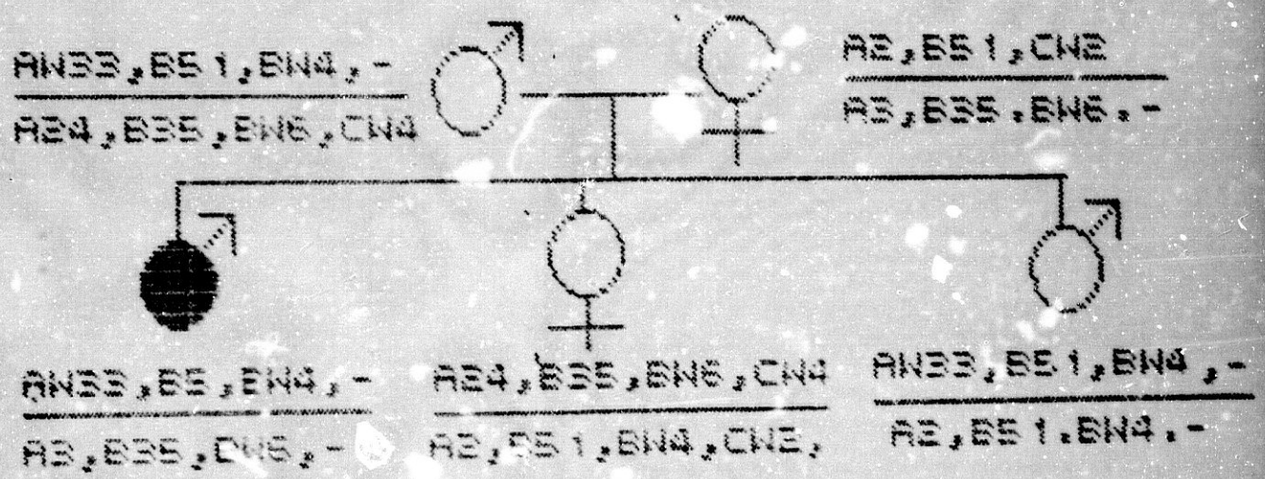

AN33,B51,BN4,-
A24,B35,BN6,CN4
A2,B51,CN2
A3,B35,BN6,-
AN33,B5,BN4,-
A3,B35,CN6,-
A24,B35,BN6,CN4
A3,B51,BN4,CN2,
AN33,B51,BN4,-
A2,B51,BN4,-

*FIGURA 11-f*

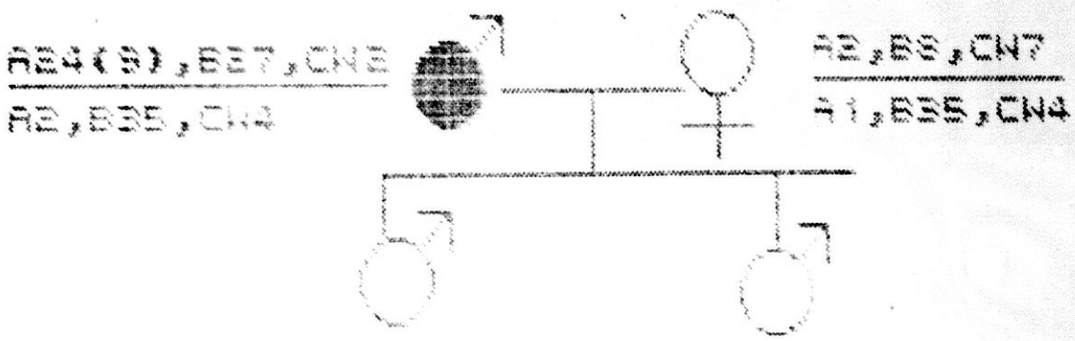

A24(9),B37,CN8
A2,B35,CN3
A2,B8,CN7
A1,B35,CN4
A24(9),B37,CN8
A2,B5,CN7
A24(9),B37,CN2
A1,B35,CN4

*FIGURA 11-a*

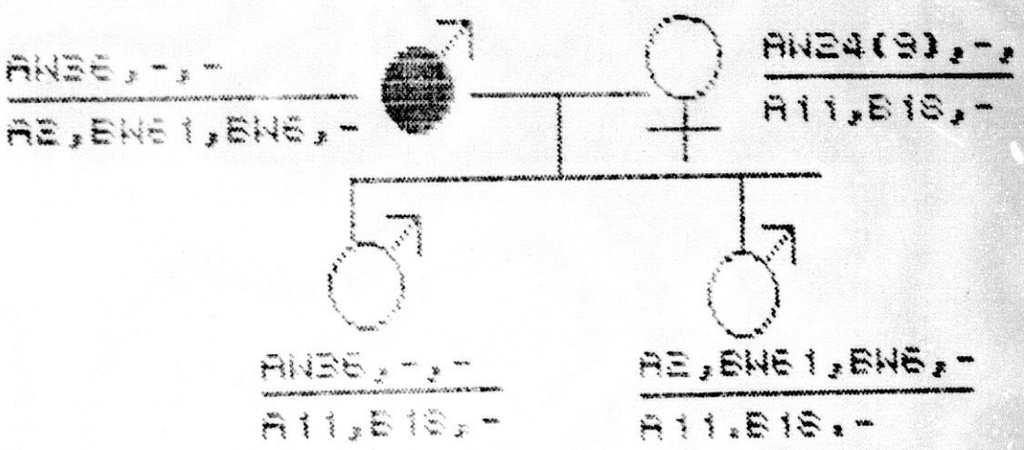


FIGURA 11-h

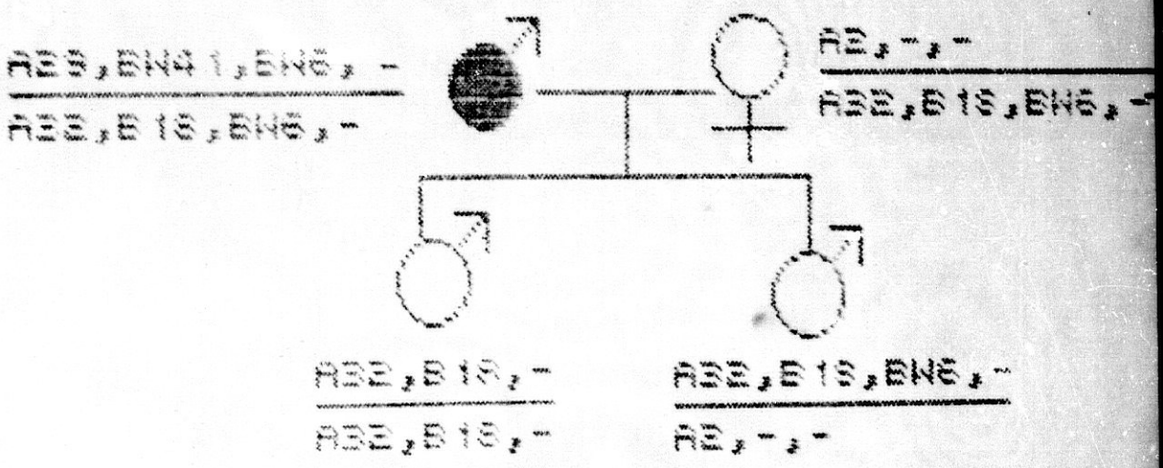

A23,B44,B46,-
A32,B18,BW6,-
A2,-,-
A32,B18,BW6,-
A32,B18,-
A32,B18,-
A32,B18,BW6,-
A2,-,-

FIGURA 11-1

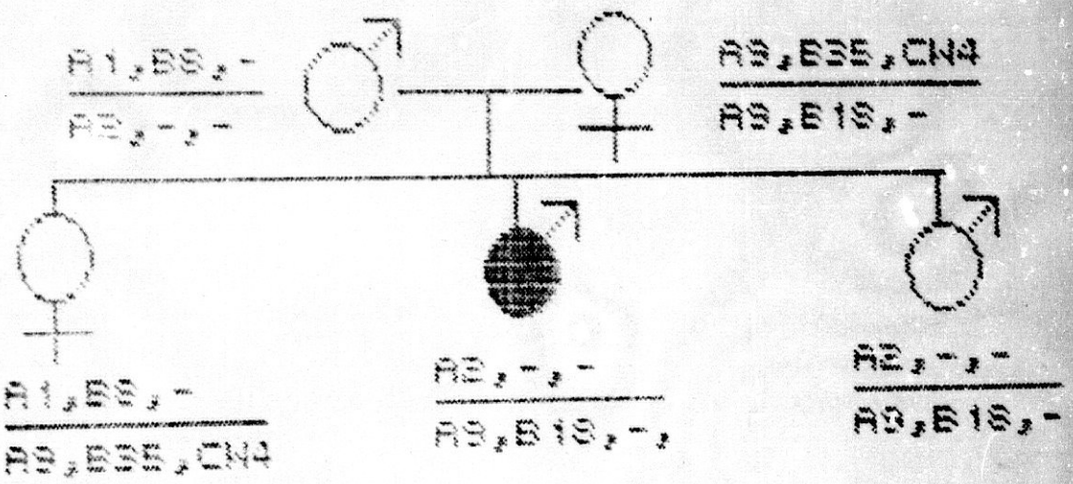


FIGURA 11-1

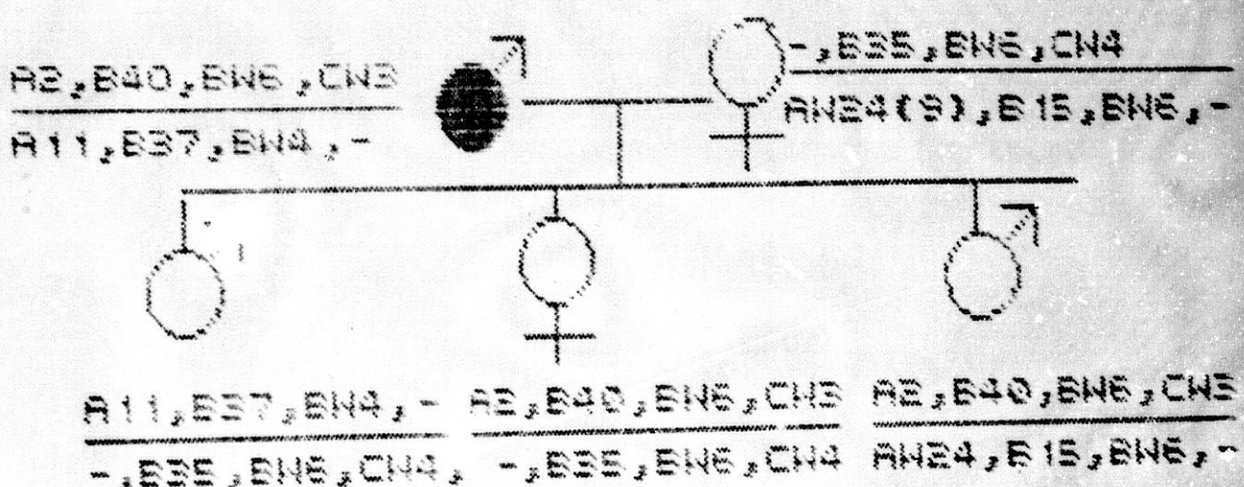

A2,B40,BN6,CN3
A11,B37,BN4,-
-,B35,BN6,CN4
AN24(9),B15,BN6,-
A11,B37,BN4,-
-,B35,BN6,CN4
A2,B40,BN6,CN3
-,B35,BN6,CN4
A2,B40,BN6,CN3
AN24,B15,BN6,-

**FIGURA 11-k**

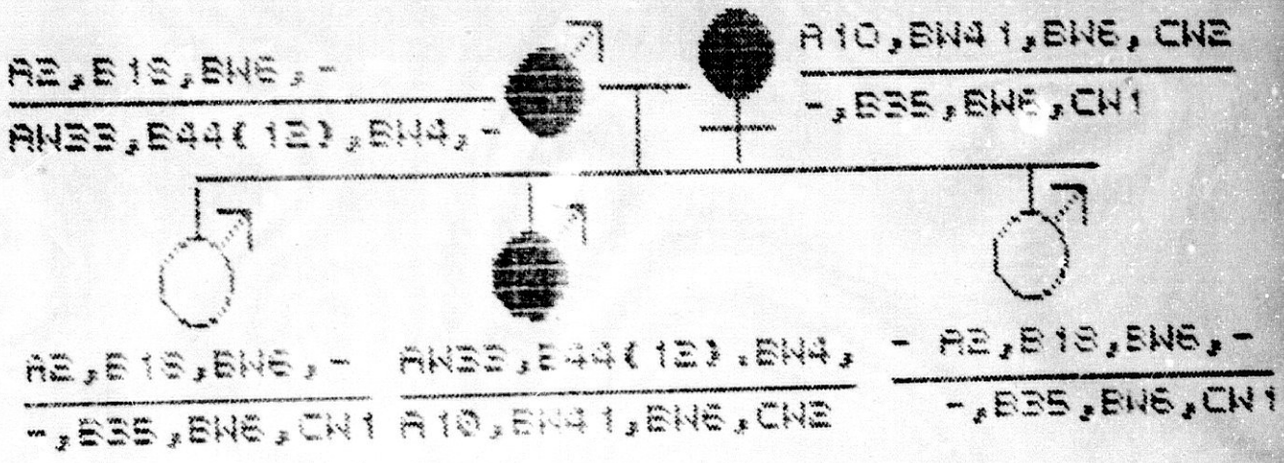

A2,B18,BN6,-
AN33,B44(12),BN4,-
A10,BN41,BN6,CN2
-,B35,BN6,CN1
A2,B18,BN6,-
-,B35,BN6,CN1
AN33,B44(12),BN4,
A10,BN41,BN6,CN2
- A2,B18,BN6,-
-,B35,BN6,CN1

**FIGURA 11-1**

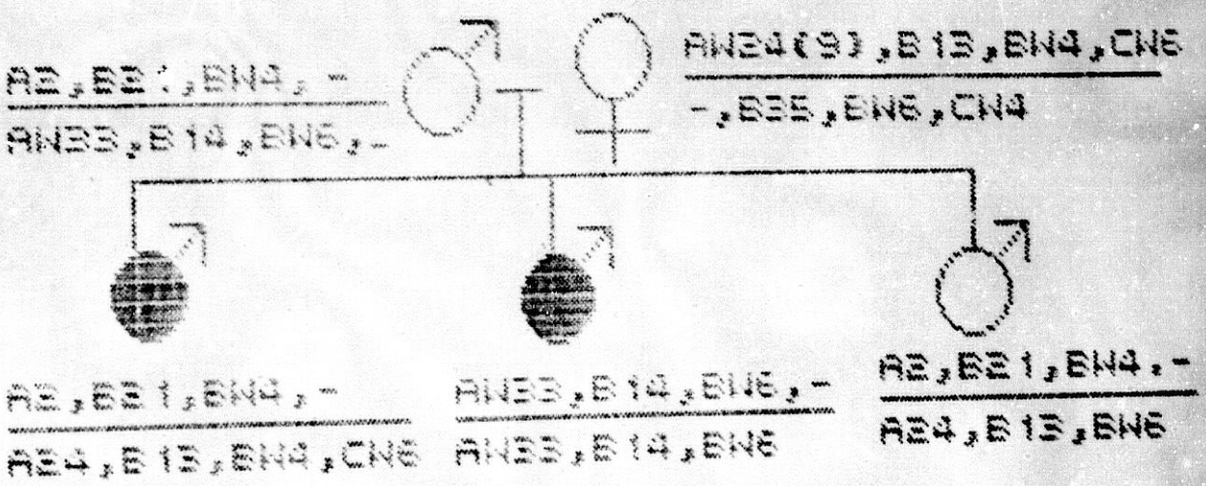

A2,B21,BN4,-
AN33,B14,BN6,-
AN24(9),B13,BN4,CN6
-,B35,BN6,CN4
A2,B21,BN4,-
A24,B13,BN4,CN6
AN33,B14,BN6,-
AN33,B14,BN6
A2,B21,BN4,-
A24,B13,BN6

**FIGURA 11-a**

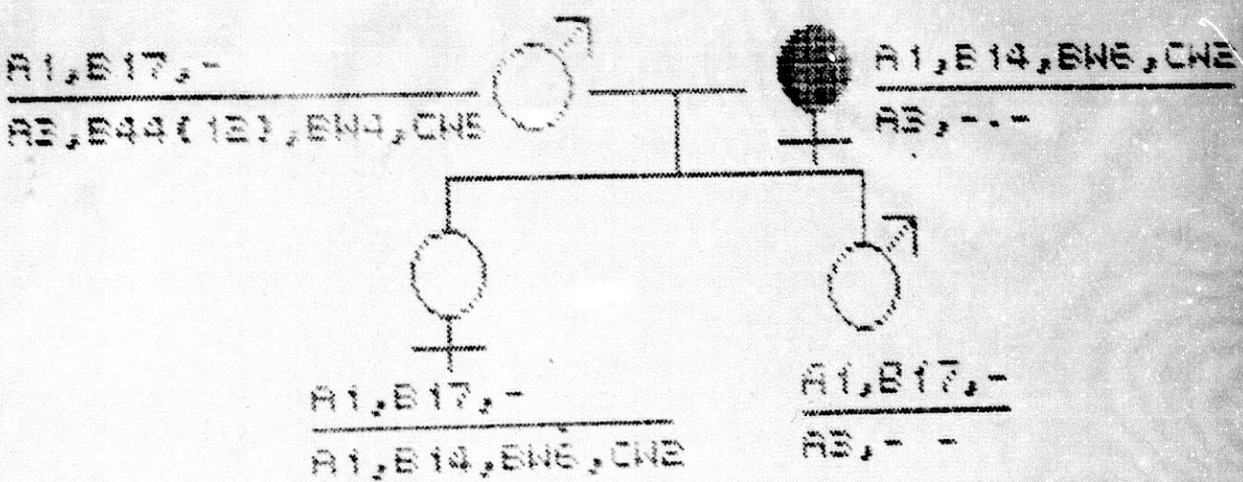

A1,B17,-
A3,B44(13),BN4,CN8
A1,B14,BN6,CN2
A3,-,-
A1,B17,-
A1,B14,BN6,CN2
A1,B17,-
A3,- -

FIGURA 11-D

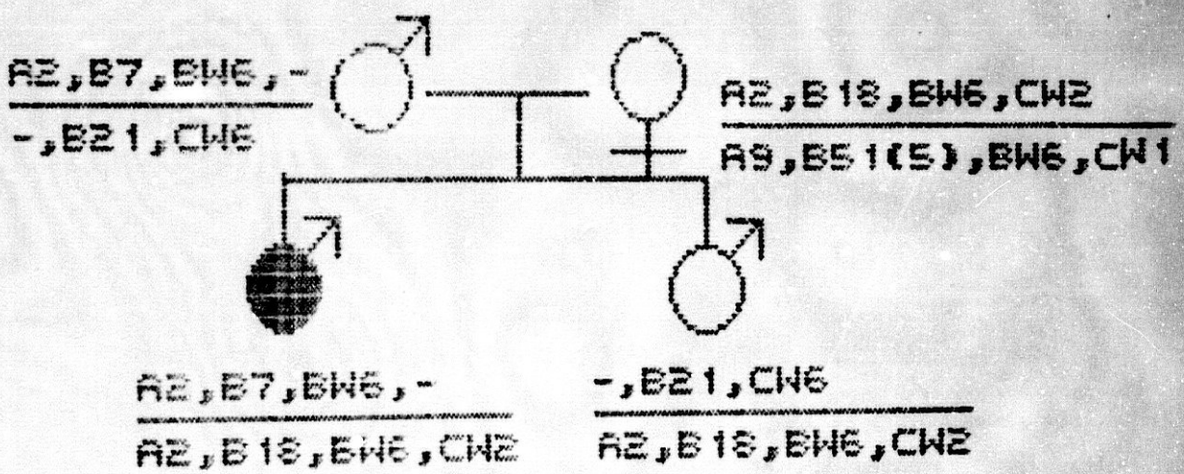

A2,B7,BW6,-
-,B21,CW6
A2,B18,BW6,CW2
A9,B51(5),BW6,CW1
A2,B7,BW6,-
A2,B18,BW6,CW2
-,B21,CW6
A2,B18,BW6,CW2

*FIGURA 11-b*

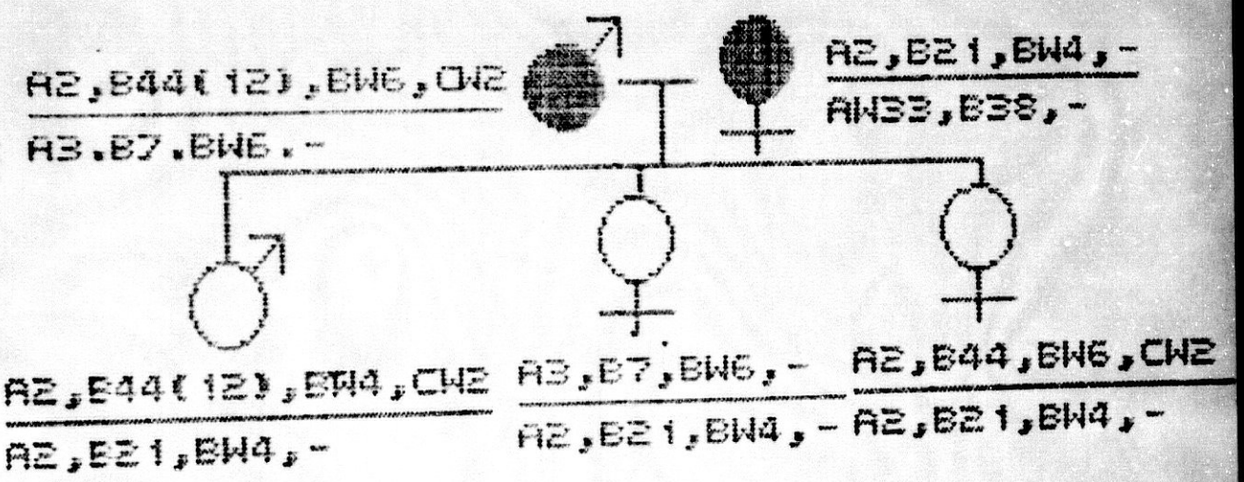

A2,B44(12),BW6,CW2
A3,B7,BW6,-
A2,B21,BW4,-
AW33,B38,-
A2,B44(12),BW4,CW2
A2,B21,BW4,-
A3,B7,BW6,-
A2,B21,BW4,-
A2,B44,BW6,CW2
A2,B21,BW4,-

*FIGURA 11-D*

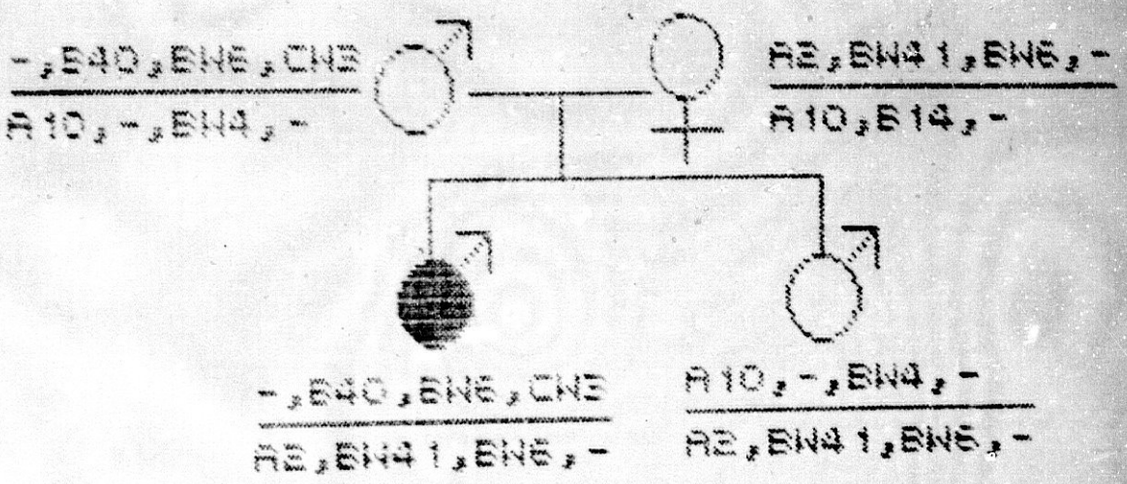

-,B40,BN6,CN3
A10,-,BN4,-
A2,BN41,BN6,-
A10,B14,-
-,B40,BN6,CN3
A3,BN41,BN6,-
A10,-,BN4,-
A2,BN41,BN6,-

FIGURA 11-9

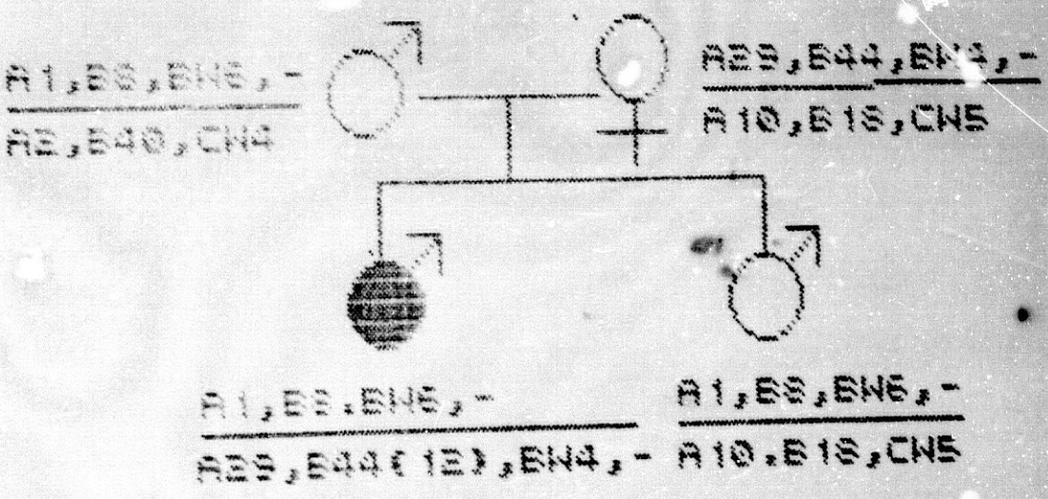

A1,B8,BW6,-
A2,B40,CW4
A29,B44,BW4,-
A10,B18,CW5
A1,B8,BW6,-
A29,B44(12),BW4,-
A1,B8,BW6,-
A10,B18,CW5

FIGURA 11-r

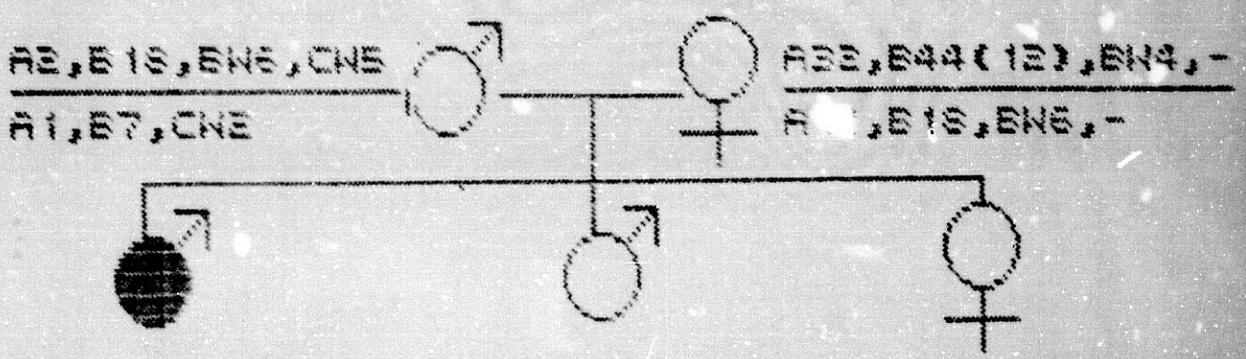
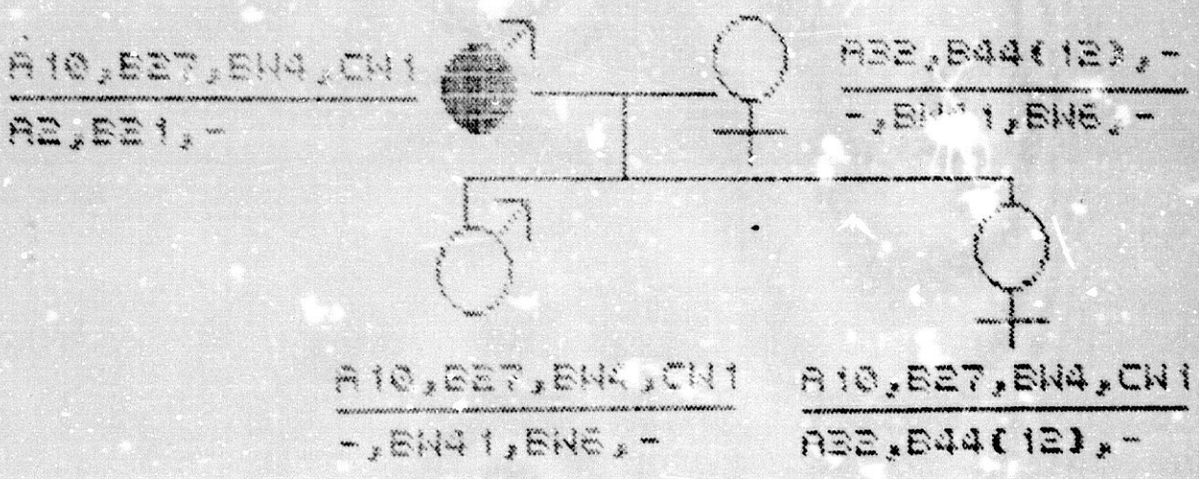

A2,B18,BN6,CN5
A1,B7,CN2
A33,B44(12),BN4,-
A[illegible],B18,BN6,-
A2,B18,BN6,CN5
A33,B44(12),BN4,-
P2,B18,BN6,CN5
A11,B18,BN6,-
A2,B18,BN6,CN5
A11,B18,BN6,-

FIGURA 11-5


A10,B27,BN4,CN1
A2,B21,-
A32,B44(12),-
-,BN41,BN5,-
A10,B27,BN4,CN1
-,BN41,BN5,-
A10,B27,BN4,CN1
A32,B44(12),-

## TABLA VIII

HAPLOTIPOS DEL SISTEMA HLA DE LOS PACIENTES CON BRUCELOSIS.

| Caso | Haplotipos | | |
|---|---|---|---|
| 1. | A3, B35, Cw4 | // | A30, B8, Cw- |
| 2. | A11, B27, Cw1 | // | A29, B44(12), Cw- |
| 3. | A2, B35, Cw4 | // | A32, B14, Bw6, Cw- |
| 4. | A3, B35, Bw6, Cw4 | // | A33, B18, Cw- |
| 5. | A1, B8, Cw- | // | A2, B-, Cw- |
| 6. | A2, B-, Cw- | // | A9, B18, Cw- |
| 7. | A10, B41, Bw6, Cw2 | // | A-, B35, Bw6, Cw1 |
| 8. | A33, B44(12). Bw6, Cw- | // | A10, B41, Bw6, Cw2 |
| 9. | A33, B14, Bw6, Cw-, | // | A24(9), B13, Bw4, Cw6 |
| 10. | A1, B14, Bw6, Cw2 | // | A3, B-, Cw -, |
| 11. | A2, B21, Bw4, Cw- | // | A33, B38. Cw- |
| 12. | A2, B41, Bw6, Cw- | // | A-. B40, Bw6, Cw3. |
| 13. | A10, B27, Bw4, Cw1 | // | A2, B21, Cw- |
| 14. | A33, B51, Bw4, Cw- | // | A24, B35, Cw4 |
| 15. | A24(9), B27, Cw2, | // | A2, B35, Cw4 |
| 16. | A2, B18, Bw6, Cw5 | // | A29, B44(12), Bw4, Cw- |
| 17. | A29, B41, Bw6, Cw- | // | A32, B18, Cw- |
| 18. | A36, B-, Cw- | // | A2, B61, Bw6, Cw- |
| 19. | A2, B40, Bw6, Cw3 | // | A11, B37, Bw4, Cw- |
| 20. | A2, B18, Bw6, Cw- | // | A33, B44(12), Bw4, Cw- |
| 21. | A2, B7, Bw6, Cw- | // | A2, B18, Bw6, Cw2 |
| 22. | A1, B8, Bw6, Cw- | // | A29, B44(12), Bw4, Cw- |

## TABLA VIII-a

| Caso | Haplotipos |
|---|---|
| 23. | A2, B44(12), CW2, // A3, B7, BW6, CW- |
| 24. | A2, B27, CW1 // A29, B60, BW6, CW3 |
| 25. | A2, B21, BW4, CW- // A24(9), B13, BW4, CW6 |
| 26. | A2, B35, CW4 // A11, B41, BW6, CW3 |
| 27. | A9, B14, BW6, CW- // A2, B12(44),CW- |

Nota: "-" significa Blanco.

( Ejemplo: " B-", B-Blanco)

## TABLA IX

HAPLOTIPOS DEL SISTEMA HLA DE LOS FAMILIARES NO AFECTADOS.

| Caso | Haplotipos |
|---|---|
| 1 | A3, B35 Cw4 // A24, B15, Cw- |
| 2 | A30,B8, Cw- // A11, B35, Cw4 |
| 3 | A3, B35, Cw4 // A30, B8, Cw- |
| 4 | A3, B35, Cw4 // A30, B8, Cw- |
| 5 | A3, B35, Cw4 // A11, B35, Cw4 |
| 6 | A11, B27, Cw1 // A3, B7, Cw- |
| 7 | A29, B44,Cw- // A28, B14, Cw- |
| 8 | A11, B27, Cw1 // A28, B14, Cw- |
| 9 | A3, B7, Cw- // A29, B44, Cw- |
| 10 | A3, B7, Cw- // A28, B14, Cw- |
| 11 | A1, B8, Bw6, Cw- // A2, B21, Cw- |
| 12 | A2, B27, Cw1 // A1, B8, Bw6, Cw- |
| 13 | A29, Bw60, Bw6, Cw- // A2, B21, Cw- |
| 14 | A11, Bw41, Cw3 // A10, B-, Cw3 |
| 15 | A2, B35, Cw4 // A11, Bw41, Bw6, Cw3 |
| 16 | A3, B35, Bw6, Cw4 // A9, B14, Bw6, Cw- |
| 17 | Aw33, B18, Cw- // A2, B12,Cw- |
| 18 | A3, B35, Bw6, Cw- // Aw33, B18, Cw- |
| 19 | A2, B51, Bw4, Cw2 // A3, B35, Bw6, Cw- |
| 20 | Aw33, B51, Bw4, Cw- // A3, B35, Bw6, Cw- |
| 21 | A24, B35, Bw6, Cw4 // A2, B51, Bw4, Cw2 |
| 22 | Aw33, B51, Bw4, Cw- // A2, B51, Bw4, Cw- |

TABLA IX-a

| Caso | Haplotipos |
|---|---|
| 23 | A2, B8, CW7 // A1, B35, CW4 |
| 24 | A24(9), B27, CW2 // A2, B8, CW7 |
| 25 | A24(9), B27, CW2 // A1, B35, CW4 |
| 26 | A24, B-, CW- // A11, B18, CW- |
| 27 | AW36, B-, CW- // A11, B18, CW- |
| 28 | A2, B-, CW- // A32, B18, BW6, CW- |
| 29 | A32, B18, CW- // A32, B18, CW- |
| 30 | A32, B18, CW- // A2, B-. CW- |
| 31 | A9, B35, CW4 // A9, B18, CW- |
| 32 | A1, B8, CW- // A9, B35, CW4 |
| 33 | A2, B- CW- // A9, B18, CW- |
| 34 | A-, B35, BW6, CW4 // A24(9),B15,BW6, CW- |
| 35 | A11, B37, BW4, CW- // A-, B35, BW6, CW4 |
| 36 | A2, B40, BW6, CW3 // A-, B35, BW6, CW4 |
| 37 | A2, B40, BW6, CW3 // A24(9), B15, BW6, CW- |
| 38 | A2, B18, BW6, CW- // A-, B35, BW[illegible], CW1 |
| 39 | A2, B18, BW6, CW- // A-, B35, BW6, CW1 |
| 40 | A2, B21, BW4, CW- // AW33. B14, BW6, CW- |
| 41 | A24(9), B13, BW4, CW6 // A-. B35, CW6, CW4 |
| 42 | A2 B21, BW4, CW- // A24(9), B13, BW6, CW- |
| 43 | A1, B17, CW- // A3, B44(12) BW6, CW5 |
| 44 | A1, B17, CW- // A3. B-. CW- |
| 45 | A2, B7, BW6, CW- // A-, B21, BW6, CW- |

TABLA IX-b

| Caso | Haplotipos |
|---|---|
| 46 | A2, B18, BW6, CW2 // A9, B51(5), BW4, CW1 |
| 47 | A-, B21, CW6 // A2, B18, BW6, CW2 |
| 48 | A2, B44(12), BW4, CW2 // A2, B21, BW4, CW- |
| 49 | A3, B7, BW6, CW- // A2, B21, BW4, CW- |
| 50 | A2, B44(12), BW4, CW2 // A2, B21, BW4, CW- |
| 51 | A-, B40, BW6, CW3 // A1-. B-, BW4, CW- |
| 52 | A2, BW41, BW6, CW- // A10, B14, CW- |
| 53 | A2, B41, BW6 CW- // A10, B-, BW4, CW- |
| 54 | A1, B8, BW6, CW- // A2, B40, CW4 |
| 55 | A29, B44, BW4, CW- // A10, B18, CW5 |
| 56 | A1, B8, BW6, CW- // A10, B18, CW5 |
| 57 | A2, B18, BW6, CW5 // A1, B7, CW2 |
| 58 | A29, B44(12), BW4, CW- // A11, B18, BW6, CW- |
| 59 | A2, B18, BW6, CW5 // A11, B18, BW6, CW- |
| 60 | A2, B18,BW6, CW5, // A11, B18, BW6, CW- |
| 61 | A32, B44(12), CW- // A-, BW41, BW6, CW- |
| 62 | A10, B27, BW4, CW1 // A1, BW41, BW6 |
| 63 | A10, B27, BW6, CW1 // A32, B44(12), BW4, CW- |
| 64 | A2, BW61, CW- // A11, B18, CW- |
| 65 | A1, B17 CW- // A1, B14, BW6, CW2 |

Notas: "-" Significa Blanco

(Ejemplo: CW- = CW Blanco)

## TABLA X

PRESENCIA DE CADA ANTIGENO DE CLASE I EN EL GRUPO CONTROL Y FAMILIAS.

| LOCUS | Controles | Individuos totales | Pacientes con Brucelosis | Familiares no afectados |
|---|---|---|---|---|
| HLA-A1 | 54 | 15 | 3 | 12 |
| HLA-A2 | 123 | 52 | 18 | 33 |
| HLA-A3 | 47 | 18 | 4 | 14 |
| HLA-A9 | 60 | 8 | 2 | 6 |
| HLA-A10 | 26 | 11 | 3 | 8 |
| HLA-A11 | 46 | 17 | 3 | 14 |
| HLA-A24(9) | 4 | 13 | 4 | 9 |
| HLA-Aw25(10) | 18 | 0 | 0 | 0 |
| HLA-A28 | 12 | 3 | 0 | 3 |
| HLA-A29(w19) | 36 | 11 | 5 | 6 |
| HLA-A30(w19) | 24 | 3 | 1 | 2 |
| HLA-A31(w19) | 3 | 0 | 0 | 0 |
| HLA-A32(w19) | 16 | 7 | 2 | 5 |
| HLA-w33 | 14 | 11 | 6 | 5 |
| HLA-Aw36 | 0 | 2 | 1 | 1 |
| HLA-A BLANCO | 76 | 13 | 2 | 11 |
| TOTAL SUJETOS | 274 | 92 | 27 | 65 |

TABLA X-a

| LOCUS | Controles | Individuos totales | Pacientes con Brucelosis | Familiares no afectados |
|---|---|---|---|---|
| HLA-B5 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| HLA-B7 | 39 | 8 | 2 | 6 |
| HLA-B8 | 24 | 13 | 3 | 10 |
| HLA-B12 | 45 | 3 | 1 | 2 |
| HLA-B13 | 3 | 3 | 2 | 1 |
| HLA-B14 | 46 | 11 | 4 | 7 |
| HLA-B15 | 22 | 3 | 0 | 3 |
| HLA-B16 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| HLA-B17 | 14 | 3 | 0 | 3 |
| HLA-B18 | 35 | 29 | 6 | 23 |
| HLA-B21 | 15 | 18 | 9 | 9 |
| HLA-BW22 | 19 | 0 | 0 | 0 |
| HLA-B27 | 21 | 2 | 4 | 6 |
| HLA-B35 | 61 | 30 | 8 | 22 |
| HLA-B37 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| HLA-B38(16) | 8 | 1 | 1 | 0 |
| HLA-B39(16) | 4 | 0 | 0 | 0 |
| HLA-B40 | 23 | 6 | 2 | 4 |
| HLA-BW41 | 0 | 11 | 5 | 6 |
| HLA-B44(12) | 43 | 15 | 6 | 9 |
| HLA-B51(5) | 11 | 7 | 1 | 6 |
| HLA-BW60(40) | 0 | 2 | 1 | 1 |
| HLA-BW61(40) | 0 | 2 | 1 | 1 |

TABLA X-b

| LOCUS | Controles | Individuos totales | Pacientes con Brucelosis | Familiares no afectados |
|---|---|---|---|---|
| HLA-Bw4 | 127 | 27 | 9 | 18 |
| HLA-Bw6 | 138 | 60 | 22 | 38 |
| HLA-B BLANCO | 85 | 13 | 4 | 9 |
| TOTAL SUJETOS | 274 | 92 | 27 | 65 |
| HLA-Cw1 | 11 | 11 | 4 | 7 |
| HLA-Cw2 | 70 | 15 | 6 | 9 |
| HLA-Cw3 | 25 | 10 | 4 | 6 |
| HLA-Cw4 | 59 | 24 | 6 | 18 |
| HLA-Cw5 | 23 | 6 | 1 | 5 |
| HLA-Cw6 | 20 | 5 | 2 | 3 |
| HLA-Cw7 | 10 | 2 | 0 | 2 |
| HLA-Cw8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HLA-Cw BLANCO | 256 | 111 | 31 | 80 |
| TOTAL SUJETOS | 274 | 92 | 27 | 65 |

TABLA XI

FRECUENCIA FENOTIPICA Y GENICA EN LOS MIEMBROS DE LAS DISTINTAS FAMILIAS (92 CASOS).

| HLA-A | Número de individuos | Frecuencia fenotipica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| A1 | 15 | 0.163 | 0.085 |
| A2 | 52 | 0.565 | 0.341 |
| A3 | 18 | 0.195 | 0.103 |
| A9 | 8 | 0.087 | 0.044 |
| A10 | 11 | 0.112 | 0.062 |
| A11 | 17 | 0.112 | 0.062 |
| Aw24 | 13 | 0.141 | 0.073 |
| Aw25 | 0 | 0 | 0 |
| A28 | 3 | 0.033 | 0.016 |
| A29 | 11 | 0.112 | 0.062 |
| A30 | 3 | 0.033 | 0.016 |
| A31 | 0 | 0 | 0 |
| A32 | 7 | 0.076 | 0.039 |
| Aw33 | 11 | 0.112 | 0.062 |
| A BLANCO | - | - | 0.003* |

Nota: (*)= 1 - Σpi

TABLA XI-a

| HLA-B | Número de individuos | Frecuencia fenotipica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| B5 | 0 | 0 | 0 |
| B7 | 8 | 0.087 | 0.044 |
| B8 | 12 | 0.130 | 0.067 |
| B12 | 3 | 0.033 | 0.012 |
| B13 | 4 | 0.043 | 0.022 |
| B14 | 11 | 0.112 | 0.062 |
| B15 | 3 | 0.033 | 0.016 |
| B16 | 0 | 0 | 0 |
| B17 | 3 | 0.033 | 0.016 |
| B18 | 29 | 0.315 | 0.172 |
| B21 | 12 | 0.130 | 0.067 |
| Bw22 | 0 | 0 | 0 |
| B27 | 12 | 0.130 | 0.067 |
| B35 | 30 | 0.326 | 0.179 |
| B37 | 2 | 0.022 | 0.011 |
| B38 | 1 | 0.011 | 0.005 |
| B39 | 0 | 0 | 0 |
| B40 | 6 | 0.065 | 0.033 |
| Bw41 | 11 | 0.112 | 0.062 |
| B44 | 15 | 0.161 | 0.085 |
| B51 | 7 | 0.76 | 0.039 |
| Bw60 | 2 | 0.022 | 0.011 |
| Bw61 | 2 | 0.022 | 0.011 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| B BLANCO | - | - | 0.004- |

Nota: ($_{\alpha}$)= 1 - $\Sigma pi$

TABLA XI-b

| HLA | Número de individuos | Frecuencia fenotipica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| Cw1 | 11 | 0.112 | 0.062 |
| Cw2 | 15 | 0.163 | 0.085 |
| Cw3 | 10 | 0.109 | 0.56 |
| Cw4 | 24 | 0.260 | 0.140 |
| Cw5 | 6 | 0.065 | 0.033 |
| Cw6 | 5 | 0.054 | 0.028 |
| Cw7 | 2 | 0.022 | 0.011 |
| Cw8 | 0 | 0 | 0 |
| Cw BLANCO | - | - | 0.585* |

Nota: (*)= 1 - Σpi

TABLA XII

FRECUENCIA FENOTIPICA Y GENICA EN LOS ENFERMOS CON BRUCELOSIS (27 CASOS),

| HLA-A | Casos totales de brucelosis | Frecuencia fenotipica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| A1 | 3 | 0.111 | 0.057 |
| A2 | 17 | 0.630 | 0.391 |
| A3 | 4 | 0.148 | 0.077 |
| A9 | 2 | 0.074 | 0.038 |
| A10 | 3 | 0.111 | 0.157 |
| A11 | 3 | 0.111 | 0.057 |
| AN24 | 4 | 0.148 | 0.077 |
| AN25 | 0 | 0 | 0 |
| A28 | 0 | 0 | 0 |
| A29 | 5 | 0.185 | 0.097 |
| A30 | 1 | 0.037 | 0.019 |
| A31 | 0 | 0 | 0 |
| A32 | 2 | 0.074 | 0.038 |
| AN33 | 6 | 0.222 | 0.118 |
| AN36 | 2 | 0.074 | 0.038 |
| A BLANCO | - | - | 0.288* |

Nota: (*)= 1- Σpi

TABLA XII-a

| HLA-B | Casos totales de brucelosis | Frecuencia fenotipica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| B5 | 0 | 0 | 0 |
| B7 | 2 | 0.074 | 0.038 |
| B8 | 3 | 0.111 | 0.057 |
| B12 | 1 | 0.037 | 0.019 |
| B13 | 2 | 0.074 | 0.038 |
| B14 | 4 | 0.148 | 0.077 |
| B15 | 0 | 0 | 0 |
| B16 | 0 | 0 | 0 |
| B17 | 0 | 0 | 0 |
| B18 | 6 | 0.222 | 0.118 |
| B21 | 3 | 0.111 | 0.057 |
| Bw22 | 0 | 0 | 0 |
| B27 | 4 | 0.148 | 0.077 |
| B35 | 8 | 0.296 | 0.161 |
| B37 | 1 | 0.037 | 0.019 |
| B38 | 1 | 0.037 | 0.019 |
| B39 | 0 | 0 | 0 |
| B40 | 2 | 0.074 | 0.038 |
| Bw41 | 5 | 0.185 | 0.097 |
| B44 | 6 | 0.222 | 0.118 |
| B51 | 1 | 0.037 | 0.139 |
| Bw60 | 1 | 0.037 | 0.019 |
| Bw60 | 1 | 0.037 | 0.019 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| $B_{N61}$ | 1 | 0.037 | 0.019 |
| B BLANCO | - | - | 0.001* |

TABLA X-b

Nota: (*)= 1 − Σpi

TABLA XII-b

| HLA-C | Casos totales de brucelosis | Frecuencia fenotipica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| Cw1 | 4 | 0.148 | 0.077 |
| Cw2 | 6 | 0.222 | 0.118 |
| Cw3 | 4 | 0.148 | 0.077 |
| Cw4 | 6 | 0.222 | 0.118 |
| Cw5 | 1 | 0.037 | 0.019 |
| Cw6 | 2 | 0.074 | 0.038 |
| Cw7 | 0 | 0 | 0 |
| Cw8 | 0 | 0 | 0 |
| Cw-BLANCO | - | - | 0.553* |

Nota: (*)= 1 - Σpi

## TABLA XIII

FRECUENCIA FENOTIPICA Y GENICA EN MIEMBROS SANOS (65 CASOS).

| HLA-A | Número de individuos sanos | Frecuencia fenotipica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| A1 | 12 | 0.185 | 0.091 |
| A2 | 35 | 0.538 | 0.231 |
| A3 | 14 | 0.215 | 0.114 |
| A9 | 6 | 0.092 | 0.047 |
| A10 | 8 | 0.123 | 0.063 |
| A11 | 14 | 0.215 | 0.114 |
| AN24 | 9 | 0.1238 | 0.072 |
| AN25 | 0 | 0 | 0 |
| A28 | 3 | 0.046 | 0.023 |
| AN29 | 6 | 0.092 | 0.045 |
| AN30 | 2 | 0.031 | 0.016 |
| AN31 | 0 | 0 | 0 |
| AN32 | 5 | 0.077 | 0.039 |
| A33 | 5 | 0.077 | 0.039 |
| A36 | 1 | 0.0153 | 0.008 |
| A BLANCO | - | - | 0.001* |

Nota: (*)= 1 - Σpi

TABLA XIII-a

| HLA-B | Número de Individuos sanos | Frecuencia fenotípica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| B5 | 0 | 0 | 0 |
| B7 | 6 | 0.092 | 0.047 |
| B8 | 9 | 0.138 | 0.072 |
| B12 | 2 | 0.031 | 0.016 |
| B13 | 2 | 0,031 | 0.016 |
| B14 | 7 | 0.108 | 0.055 |
| B15 | 3 | 0.046 | 0.023 |
| B16 | 0 | 0 | 0 |
| B17 | 3 | 0.046 | 0.023 |
| B18 | 23 | 0.343 | 0.189 |
| B21 | 9 | 0.138 | 0.072 |
| Bw22 | 0 | 0 | 0 |
| B27 | 8 | 0.123 | 0.063 |
| B35 | 22 | 0.338 | 0.197 |
| B37 | 1 | 0.0153 | 0,008 |
| B38 | 0 | 0 | 0 |
| B39 | 0 | 0 | 0 |
| B40 | 4 | 0.061 | 0.031 |
| Bw341 | 6 | 0.092 | 0.047 |
| B44 | 9 | 0.138 | 0.072 |
| B51 | 6 | 0.092 | 0.047 |
| Bw60 | 1 | 0.0153 | 0.008 |
| Bw61 | 1 | 0.0153 | 0.008 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| B BLANCO | - | - | 0.016 |

Nota: (*)= 1 - Σpi

TABLA XIII-b

| HLA-C | Número de individuos sanos | Frecuencia fenotípica | Frecuencia génica |
|---|---|---|---|
| Cw1 | 3 | 0.108 | 0.055 |
| Cw2 | 9 | 0.138 | 0.072 |
| Cw3 | 6 | 0.092 | 0.047 |
| Cw4 | 18 | 0.277 | 0.150 |
| Cw5 | 5 | 0.077 | 0.039 |
| Cw6 | 3 | 0.046 | 0.023 |
| Cw7 | 2 | 0.031 | 0.016 |
| Cw8 | 0 | 0 | 0 |
| Cw BLANCO | - | - | 0.598* |

Nota: (*)= 1 - Σpi

## TABLA XIV

PRESENCIA HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS A Y B EN TODOS LOS MIEMBROS DE LAS FAMILIAS (92 CASOS)

| LOCUS/A B | A1 | A2 | A3 | A9 | A10 | A11 | A24 | A25 | A28 | A29 | A30 | A31 | A32 | A33 | A36 | A- |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B7 | 1 | 2 | 5 | 2 | | | | | | | | | | | | |
| B8 | 6 | 2 | 3 | | | | | | | 1 | 3 | | | | | |
| B13 | | | | | | | 4 | | | | | | | | | |
| B14 | 2 | | | | 1 | | | | 3 | | | | 2 | 3 | | |
| B15 | | | | | | | 3 | | | | | | | | | |
| B17 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| B18 | | 10 | | 3 | 2 | 6 | | | | | | | 5 | 3 | | |
| B21 | 2 | 10 | | | | | | | | | | | | | | |
| B27 | | 2 | 8 | | 3 | 3 | 3 | | | | | | | | | |
| B35 | 2 | 4 | | 2 | | 3 | 2 | | | | | | | | 7 | |
| B37 | | | | | | 2 | | | | | | | | | | |
| B40 | 2 | 4 | | | 1 | | | | | | | | | | | 2 |
| BW41 | | 4 | | | 2 | 3 | | | 1 | | | | | | | 2 |
| B44 | | 3 | 2 | | | | | | 6 | | | | 2 | | | |
| B51 | | | | 1 | | | | | | | | | 3 | | | |
| B60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B61 | | 2 | | | | | | | 2 | | | | | | | |
| B - | | 4 | 4 | | 2 | | 1 | | | | | | | | 2 | |

## TABLA XV

PRESENCIA DE LOS HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS B Y C EN TODOS LOS MIEBROS DE LAS FAMILIAS (92 CASOS)

| LOCUS C / B | CW1 | CW2 | CW3 | CW4 | CW5 | CW6 | CW7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B5 | | | | | | | |
| B7 | | 2 | | | | | |
| B8 | | | | | | | 2 |
| B12 | | | | | | | |
| B13 | | | | | | 3 | |
| B14 | | 1 | | | | | |
| B15 | | | | | | 1 | |
| B17 | | | | | | | |
| B18 | 1 | 3 | | | 6 | 1 | |
| B21 | | | | | | 1 | |
| B27 | 5 | 3 | | | | | |
| B35 | | 2 | | 17 | | | |
| B37 | | | | | | | |
| B40 | | 2 | 7 | 1 | | | |
| Bw41 | | | | | | | |
| B44 | | 2 | 1 | | 1 | | |
| B51 | 1 | 2 | | | | | |
| Bw60 | | | | | | | |
| Bw61 | | | 1 | | | | |

## TABLA XVI

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS A Y C EN TODOS LOS MIEMBROS DE LAS FAMILIAS (92 CASOS)

| LOCUS/C / A | Cw1 | Cw2 | Cw3 | Cw4 | Cw5 | Cw6 | Cw7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 | | 3 | | 3 | | | |
| A2 | 2 | 9 | 3 | 7 | 4 | | 1 |
| A3 | | | | | 1 | | |
| A9 | 1 | | | 1 | | | |
| A10 | 3 | 2 | | | 2 | | |
| A11 | 1 | | 3 | 1 | | | |
| A24 | | 2 | | 2 | | 3 | |

TABLA XVII

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS A Y B EN LOS ENFERMOS CON BRUCELOSIS 27 (CASOS)

| LOCUS/A B | A1 | A2 | A3 | A9 | A10 | A11 | A24 | A25 | A28 | A29 | A30 | A31 | A32 | A33 | A36 | A- |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B7 | | 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| B8 | 6 | | | | | | | | | | 3 | | | | | |
| B12 | | 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| B13 | | | | | | | 4 | | | | | | | | | |
| B14 | 2 | | | 2 | | | | | | | | | 2 | 3 | | |
| B18 | | 10 | | 3 | | | | | | | | | | 3 | | |
| B21 | | 10 | | | | | | | | | | | | | | |
| BW22 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B27 | | 2 | | | | 3 | 3 | | | | | | | | | |
| B35 | | 4 | 8 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| B40 | 2 | 4 | | | 1 | | | | | | | | | | | 2 |
| Bw41 | | 2 | | | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| B44 | | 3 | 2 | | | | | | | 6 | | | | | | |
| B51 | | | | | | | | | | | | | | 3 | | |
| Bw60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bw61 | | 2 | | | | | | | | 2 | | | | | | |
| B- | | 4 | 4 | | | | | | | | | | | | 2 | |

## TABLA XVIII

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS B Y C EN LOS ENFERMOS CON BRUCELOSIS

| LOCUS/C / B | CW1 | CW2 | CW3 | CW4 | CW5 | CW6 | CW7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B13 | | | | | | | 3 |
| B14 | | 1 | | | | | |
| B18 | 1 | 3 | | | 6 | | |
| B27 | 5 | 3 | | | | | |
| B35 | 2 | | | 17 | | | |
| B40 | | 2 | 7 | | | | |
| BW41 | | | 1 | | | | |
| BW60 | | | | | | | |
| BW61 | | | 1 | | | | |

## TABLA XIX

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOS LOCUS A Y C EN ENFERMOS CON BRUCELOSIS (27 CASOS).

| LOCUS/C / A | Cw1 | Cw2 | Cw3 | Cw4 | Cw5 | Cw6 | Cw7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 | | 3 | | 3 | | | |
| A2 | 2 | 8 | 3 | 7 | 4 | | |
| A3 | | | | 5 | | | |
| A9 | | | | | | | |
| A10 | | 2 | | | | | |
| A11 | 3 | | 3 | 2 | | | |
| A24 | | 2 | | 2 | | 2 | |

TABLA XX

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS A Y B EN FAMILIARES NO AFECTADOS (65 CASOS)

| LOCUS/A | A1 | A2 | A3 | A9 | A10 | A11 | A24 | A25 | A28 | A29 | A30 | A31 | A32 | A33 | A36 | A- |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B7 | 1 | 1 | 4 | | | | | | | | | | | | | |
| B8 | 5 | 8 | | | | | | | | | 2 | | | | | |
| B12 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| B13 | | | | | | | 2 | | | | | | | | | |
| B14 | 1 | | | 1 | 1 | | | | 3 | | | | | 2 | | |
| B15 | | | | | | | 3 | | | | | | | | | |
| B18 | | 7 | | 2 | | 6 | | | | | | | 3 | 2 | | |
| B21 | | 8 | | | | | | | | | | | | | 2 | |
| B27 | | 1 | 1 | | 2 | 2 | 2 | | | | | | | | | |
| B35 | 2 | 1 | 7 | 2 | | 3 | 1 | | | | | | | | | 6 |
| B37 | | | | | | 1 | | | | | | | | | | |
| B40 | | 3 | | | | | | | | | | | | | 1 | |
| Bw41 | | 2 | | | 2 | 2 | | | | 1 | | | | | 2 | |
| B44 | | 2 | 1 | | | | | | | 4 | | | 2 | 1 | | |
| B51 | | 3 | | 1 | | | | | | | | | | 2 | | |
| Bw61 | | | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| B- | | 3 | 1 | | 2 | | 1 | | | | | | | | 1 | |

## TABLA XXI

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LCOUS B Y C EN FAMILIARES NO AFECTADOS (65 CASOS)

| LOCUS C / B | Cw1 | Cw2 | Cw3 | Cw4 | Cw5 | Cw6 | Cw7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B7 | | 2 | | | | | |
| B8 | | | | | | | 2 |
| B12 | | | | | | | |
| B13 | | | | | | 1 | |
| B14 | | | | | | | |
| B15 | | | | | | | |
| B18 | 1 | 2 | | | 4 | | |
| B21 | | | | | | 1 | |
| B27 | 5 | 2 | | | | | |
| B35 | 1 | | | 11 | | | |
| B40 | | | 5 | | | | |
| Bw41 | | | | | | | |
| B44 | | 2 | | | | | |
| B51 | 1 | 2 | | | | | |
| Bw60 | | | | | | | |

TABLA XXII

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS A Y C EN FAMILIARES NO AFECTADOS (65 CASOS).

| LOCUS C/A | Cw1 | Cw2 | Cw3 | Cw4 | Cw5 | Cw6 | Cw7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 | | 2 | | 2 | | | |
| A2 | 1 | | 2 | 3 | 3 | | |
| A3 | | | | 3 | 1 | | |
| A9 | 1 | | | 1 | | | |
| A10 | 2 | | | | 2 | | |
| A11 | 2 | | 2 | 1 | | | |
| A24 | | 1 | | 1 | | 1 | |

## TABLA XXIII

PRESENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE LOS LOCUS A,B Y C EN ENFERMOS CON BRUCELOSIS (27 CASOS).

| HAPLOTIPOS | Número de casos |
|---|---|
| A10 Bw41 Cw2 | 2 |
| A24 B13 Cw- | 1 |
| A29 B44 Cw- | 3 |
| A29 Bw41 Cw- | 1 |
| Aw33 B44 Cw- | 2 |
| Aw33 B38 Cw- | 2 |

## TABLA XXIV

ESTUDIO COMPARATIVO DE CADA ANTIGENO DE CLASE I ENTRE EL GRUPO CONTROL(274 CASOS) Y TODOS LOS MIEMBROS DE LAS FAMILIAS (92 CASOS).

| HLA | nº de casos(%) Controles | Familias | Valor P | Significación (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| A1 | 54 (20.00) | 15 (16.30) | 0.539 | NO |
| A2 | 123 (44.89) | 52 (56.52) | 0.000689 | SI * |
| A3 | 47 (17.32) | 18 (19.56) | 0.637 | NO |
| A9 | 60 (21.93) | 8 ( 8.69) | 0.000906 | SI * |
| A10 | 26 (16.23) | 11 (11.96) | 0-549 | NO |
| A11 | 46 (16.83) | 17 (18.48) | 0.185 | NO |
| A24 | 4 ( 1.73) | 13 (14.13) | 0.0000000123 | SI * |
| Aw25 | 18 ( 6.82) | 0 | 0.00929 | NO |
| A28 | 12 ( 6.82) | 3 ( 3.26) | 0.769 | NO |
| A29 | 36 (13.37) | 11 (11.96) | 0.594 | NO |
| A30 | 24 ( 8.73) | 3 ( 3.26) | 0.769 | NO |
| A31 | 3 ( 1.25) | 0 | 0.575 | NO |
| A32 | 16 ( 6.07) | 7 ( 7.61) | 1 | NO |
| Aw33 | 14 ( 5,22) | 11 (11.96) | 0.0317 | NO |
| Aw36 | 0 | 2 ( 2.18) | 0.0627 | NO |
| A Blanco | 76 (27.87) | 13 (14.13) | 0.0110 | NO |
| B5 | 11 ( 5.11) | 0 | 0.723 | NO |
| B7 | 39 (14.23) | 8 ( 8.69) | 0.208 | NO |
| B8 | 24 ( 8.76) | 12 (13.04) | 0.00764 | NO |

TABLA XXIV-a

| HLA | nº de casos (%) Controles | Familias | Valor P | Significación (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| B12 | 45 (16.42) | 3 ( 3.26) | 0.00052 | SI * |
| B13 | 3 (1.09) | 4 ( 4.35) | 0.343 | NO |
| B14 | 46 (16.79) | 11 (11.57) | 0.320 | NO |
| B15 | 22 ( 8.03) | 3 ( 3.26) | 0.152 | NO |
| B16 | 13 ( 4.74) | 0 | 0.0444 | NO |
| B17 | 14 ( 5.11) | 3 ( 3.26) | 0.025 | NO |
| B18 | 35 (12.77) | 29 (31.62) | 0.^880 | NO |
| B21 | 15 ( 5.47( | 12 (13.04) | 0.0216 | NO |
| Bw22 | 19 ( 6.93) | 0 | 0.011 | NO |
| B27 | 21 ( 7.66) | 12 (13.04) | 0.285 | NO * |
| B35 | 61 (22.26) | 30 (32.61) | 0.123 | NO |
| B37 | 0 | 2 ( 2,18) | 0.25 | NO |
| B38 | 8 ( 2.92) | 1 ( 1.09) | 0.459 | NO |
| B39 | 4 ( 1.46) | 0 | 0.363 | NO |
| B40 | 23 ( 8.39) | 6 ( 6.52) | 0.382 | NO |
| Bw41 | 0 | 11 (11.96) | 0.000000158 | SI * |
| B44 | 43 (15.69) | 15 (16.30) | 1 | NO * |
| B51 | 11 ( 4.01) | 7 ( 7.61) | 0.263 | NO |
| Bw60 | 0 | 2 ( 2.17) | 0.0667 | NO |
| Bw61 | 0 | 2 ( 2.17) | 0.067 | NO |
| Bw4 | 127 (46.35) | 27 (29.34) | 0.0489 | NO |
| Bw6 | 138 (50.36) | 60 (65.21) | 0.155 | NO |
| B Blanco | 85 (31.02) | 13 (14.13) | 0.000964 | SI |

TABLA XXIV-b

| HLA | nº de casos (%) Controles | Familias | Valor P | Significación (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| Cw1 | 11 ( 4.01) | 11 (11.56) | 0.0201 | NO * |
| Cw2 | 70 (25.55) | 11 (11.56) | 0.0863 | NO * |
| Cw3 | 25 ( 9.12) | 10 (10.87) | 0.682 | NO |
| Cw4 | 59 (21.53) | 24 (26.09) | 0.563 | NO |
| Cw5 | 23 ( 8,39) | 6 ( 6.52) | 0.833 | NO |
| Cw6 | 20 ( 7.30) | 5 ( 5.43) | 0.350 | NO |
| Cw7 | 10 ( 3.65) | 0 | 0.540 | NO |
| Cw Blanco | 256 (93.43) | 57 (61.95) | 0.340 | NO |

Nota: Valor teórico para el primer paso: $\alpha = 1 \times 10^{-3}$

Valor teórico para el segundo paso: $\alpha = 1.36 \times 10^{-3}$

* SE CALCULA RR Y $\delta$

## TABLA XXV

ESTUDIO COMPARATIVO DE CADA ANTIGENO DE CLASE I ENTRE EL GRUPO CONTROL (274 CASOS) Y ENFERMOS CON BRUCELOSIS DE LAS FAMILIAS (27 CASOS)

| | nº de casos (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| HLA | Controles | Pacientes con Brucelosis | Valor P | Significacion (al 5%) |
| A1 | 54 (19.71) | 3 (11.11) | 0.319 | NO |
| A2 | 123 (44.89) | 17 (62.92) | 0.145 | NO |
| A3 | 47 (17.15) | 4 (14.81) | 0.800 | NO |
| A9 | 61 (21.89) | 2 ( 7.41) | 0.0841 | NO |
| A10 | 26 ( 9.49) | 3 (11.11) | 0.179 | NO |
| A11 | 46 (16.79) | 3 (11.11) | 1 | NO |
| Aw24 | 4 ( 1.46) | 4 (14.81) | 0.00284 | NO |
| Aw25 | 18 ( 6.57) | 0 | 0.240 | NO |
| A28 | 12 ( 4.38) | 0 | 0.399 | NO |
| A29 | 36 (13.14) | 5 (18.52) | 0.554 | NO |
| A30 | 49 (17.88) | 1 ( 3.70) | 0.492 | NO |
| A31 | 3 ( 1.09) | 0 | 1 | NO |
| A32 | 16 ( 5.84) | 2 ( 7.41) | 1 | NO |
| Aw33 | 14 ( 5.11) | 6 (22.22) | 0.00479 | NO |
| Aw36 | 0 | 1 ( 3.70) | 0.0897 | NO |
| A Blanco | 76 (27.73) | 2 ( 7.41) | 0.0355 | NO |
| B5 | 11 ( 5.11) | 0 | 0.607 | NO |
| B7 | 39 (14.23) | 2 ( 7.40) | 0.397 | NO |
| B8 | 24 ( 8.76) | 3 (11.11) | 0.720 | NO |

TABLA XXII-a

| HLA | nº de casos (%) Controles | con Brucelosis | Valor P | Significación (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| B12 | 45 (16.42) | 1 ( 3.70) | 0.0945 | NO |
| B13 | 3 (1.09) | 2 ( 7.40) | 0.065 | NO |
| B14 | 46 (16.79) | 4 (14.81) | 1 | NO |
| B15 | 22 ( 8.03) | 0 | 0.239 | NO |
| B16 | 13 ( 4.74) | 0 | 0.387 | NO |
| B17 | 14 ( 5.11) | 0 | 0.380 | NO |
| B18 | 35 (12.77) | 6 (22.22) | 0.551 | NO |
| B21 | 15 ( 5.47) | 3 (11.11) | 0.386 | NO |
| Bw22 | 19 ( 6.93) | 0 | 0.236 | NO |
| B27 | 21 ( 7.66) | 4 (14.81) | 0.259 | NO * |
| B35 | 61 (22.26) | 8 (29.63) | 0.809 | NO |
| B37 | 0 | 1 ( 3.70) | 0.0897 | NO |
| B38 | 8 ( 2.92) | 1 ( 3.70) | 1 | NO |
| B39 | 4 ( 1.46) | 0 | 1 | NO |
| B40 | 23 ( 8.39) | 2 ( 7.40) | 1 | NO |
| Bw41 | 0 | 5 (18.52) | 0.00000405 | SI * |
| B44 | 43 (15.69) | 6 (22.22) | 0.411 | NO |
| B51 | 11 ( 4.01) | 1 ( 3.70) | 1 | NO |
| Bw60 | 0 | 1 ( 3.70) | 0.0897 | NO |
| Bw61 | 0 | 1 ( 3.70) | 0.0897 | NO |
| Bw4 | 127 (46.35) | 9 ( 3.33) | 0.227 | NO |
| Bw6 | 139 (50.36) | 22 (81.48) | 0.0207 | NO |
| B Blanco | 85 (31.02) | 4 (14.81) | 0.119 | NO |

TABLA XXIII-b

| HLA | nº de casos (%) Controles | Enfermos con Brucelosis | Valor P | Significación | |
|---|---|---|---|---|---|
| Cw1 | 11 ( 4.01) | 4 (14.81) | 0.0353 | NO | |
| Cw2 | 70 (25.55) | 6 (22.22) | 0.492 | NO | * |
| Cw3 | 25 ( 9.12) | 4 (14.82) | 0.491 | NO | |
| Cw4 | 51 (21.53) | 46 (22.22) | 1 | NO | |
| Cw5 | 23 ( 8.39) | 1 ( 3.70) | 0.497 | NO | |
| Cw6 | 20 ( 7.30) | 2 ( 7.41) | 1 | NO | |
| Cw7 | 10 (3.65) | 0 | 0.607 | NO | |
| Cw8 | 0 | 0 | 1 | NO | |
| C Blanco | 256 (93.43) | 17 (62.92) | 0.248 | NO | |

Nota: Valor teórico para el primer paso: $\alpha = 1 \times 10^{-3}$

Valor teórico para el segundo paso: $\alpha = 1.020 \times 10^{-3}$

* SE CALCULA RR Y $\delta$

## TABLA XXVI

ESTUDIO COMPARATIVO DE CADA ANTIGENO DE CLASE I ENTRE EL GRUPO CONTROL (274 CASOS) Y LOS INDIVIDUOS SANOS DE LAS FAMILIAS (65 CASOS).

| | nº de casos (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| HLA | Controles | Individuos no afectados | Valor P | Significacion (al 5%) |
| A1 | 54 (19.71) | 12 (18.44) | 0.864 | NO |
| A2 | 123 (44.89) | 35 (53.85) | 0.0378 | NO |
| A3 | 47 (17.15) | 14 (21.54) | 0.472 | NO |
| A9 | 60 (21.89) | 6 ( 9.232) | 0.026 | NO |
| A10 | 26 ( 9.49) | 8 (12.30) | 0.475 | NO |
| A11 | 46 (16.79) | 14 (21.54) | 0.0813 | NO |
| Aw24 | 4 ( 1,46) | 6 (13.85) | 0.0000000427 | SI * |
| Aw25 | 18 ( 6.57) | 0 | 0.0569 | NO |
| A28 | 12 ( 4.38) | 3 ( 4.26) | 1 | NO |
| A29 | 36 (13.14) | 6 ( 9.23) | 0.292 | NO |
| A30 | 24 ( 8.76) | 2 ( 3.007) | 0.320 | NO |
| A31 | 3 ( 1.09) | 0 | 0.622 | NO |
| A32 | 16 ( 5.84) | 5 ( 7.69) | 1 | NO |
| Aw33 | 14 ( 5.11) | 5 ( 7.69) | 0.238 | NO |
| Aw36 | 0 | 1 ( 3.70) | 0.191 | NO |
| A Blanco | 76 (27.73) | 11 (16.92) | 0.828 | NO |
| B5 | 11 ( 5.11) | 0 | 0.132 | NO |
| B7 | 39 (14.23) | 6 ( 8.23) | 0.319 | NO |

TABLA XXVI-a

| HLA | nº de casos (%) Controles | Individuos no afectados | Valor P | Siginificacion (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| B8 | 24 ( 8.76) | 9 (13.85) | 0.00221 | NO |
| B12 | 45 (16.42) | 2 ( 3.07) | 0.00212 | NO |
| B13 | 3( 1.09) | 2 ( 3.07) | 1 | NO |
| B14 | 46(16.79) | 7 (10.77) | 0.260 | NO |
| B15 | 22 ( 8.03) | 3 ( 4.62) | 0.437 | NO |
| B16 | 13 ( 4.74) | 0 | 0.141 | NO |
| B17 | 14 ( 5.11) | 3 ( 4.62) | 1 | NO |
| B18 | 35 (12.77) | 23 (35.38) | 0.078 | NO |
| B21 | 15 ( 5.47) | 9 (13.85) | 0.0284 | NO |
| B22 | 19 ( 6.93) | 0 | 0.0308 | NO |
| B27 | 21 ( 7.66) | 8 (12.31) | 0.451 | NO |
| B35 | 61 (22.26) | 22 (33.85) | 0.106 | NO |
| B37 | 0 | 1 ( 1.54) | 1 | NO |
| B38 | 8 ( 2.92) | 0 | 0.225 | NO |
| B39 | 4 ( 1.46) | 0 | 0.592 | NO |
| B40 | 23 ( 8.39) | 4 ( 6.15) | 0.437 | NO |
| Bw41 | 0 | 6 ( 9.23) | 0.0000409 | SI |
| B44 | 43 (15.69) | 9 (13.85) | 0.567 | NO |
| B51 | 11 ( 4.01) | 6 ( 9.23) | 0.108 | NO |
| Bw60 | 0 | 1 ( 1.54) | 0.192 | NO |
| Bw61 | 0 | 1 ( 1.54) | 0.192 | NO |

TABLA XXIII-b

| HLA | nº de casos (%) Controles | Individuos no afectados | Valor P | Significacion (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| Bw4 | 127 (46.35) | 18 (27.69) | 0.00777 | NO |
| Bw6 | 138 (50.36) | 38 (58.46) | 0.270 | NO |
| B Blanco | 85 (31.02) | 9 (13.85) | 0.003 | NO |
| Cw1 | 11 ( 4.01) | 7 (10.77) | 0.108 | NO |
| Cw2 | 70 (25.55) | 9 (13.05) | 0.103 | NO |
| Cw3 | 25 ( 9.12) | 6 ( 9.23) | 1 | NO |
| Cw4 | 59 (21.53) | 5 ( 7.69) | 1 | NO |
| Cw5 | 23 ( 8.39) | 5 ( 7.69) | 1 | NO |
| Cw6 | 20 ( 7.30) | 3 ( 4.62) | 0.273 | NO |
| Cw7 | 10 ( 3.65) | 2 ( 3.07) | 1 | NO |
| Cw8 | 0 | 0 | 1 | NO |
| C Blanco | 256 (93.43) | 40 (61.54) | 0.148 | NO |

Nota: Valor teórico para el primer paso: $\alpha = 1 \times 10^{-3}$

Valor teórico para el segundo paso: $\alpha = 1.020 \times 10^{-3}$

* SE CALCULA RR Y δ

## TABLA XXVII

ESTUDIO COMPARATIVO DE CADA ANTIGENO DE CLASE I ENTRE EL GRUPO DE PACIENTES CON BRUCELOSIS (27 CASOS) Y EL GRUPO DE INDIVIDUOS NO AFECTADOS ( 65 CASOS) DE LAS FAMILIAS.

| HLA | nº de casos (%) Pacientes con Brucelosis | Individuos no afectados | Valor P | Significacion (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| A1 | 3 (11.11) | 12 (18.44) | 0.539 | NO |
| A2 | 17 (62.92) | 35 (53.85) | 0.477 | NO |
| A3 | 4 (14.81) | 14 (21.54) | 0.571 | NO |
| A9 | 2 ( 7.41) | 6 (9.23) | 1 | NO |
| A10 | 3 (11.11) | 8 (12.30) | 0.0138) | NO |
| A11 | 3 (11.11) | 14 (21.54) | 0.151 | NO |
| AW24 | 4 (14.81) | 6 (13.85) | 0.571 | NO |
| AW25 | 0 | 0 | 1 | NO |
| A28 | 0 | 3 ( 4.62) | 0.553 | NO |
| A29 | 5 (18.52) | 6 ( 9.23) | 0.151 | NO |
| A30 | 1 ( 3.70) | 2 ( 3.07) | 1 | NO |
| A32 | 2 ( 7.41) | 5 ( 7.69) | 1 | NO |
| AW33 | 6 (22.22) | 5 ( 7.69) | 0.0753 | NO |
| AW36 | 2 ( 3.70) | 1 ( 3.70) | 1 | NO |
| A Blanco | 2 ( 7.41) | 11 (16.92) | 0.332 | NO |
| B5 | 0 | 0 | 1 | NO |
| B7 | 2 ( 7.40) | 6 ( 9.23) | ).577 | NO |
| B8 | 3 (11.11) | 9 (13.85) | 0.253 | NO |
| B12 | 1 ( 3.70) | 2 ( 3.07) | 1 | NO |

TABLA XXVII-a

| HLA | nº de casos (%) Pacientes con Brucelosis | Individuos no afectados | Valor P | Significacion (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| B13 | 2 ( 7.40) | 2 ( 3.07) | 1 | NO |
| B14 | 4 (14.81) | 7 (10.77) | 0.725 | NO |
| B15 | 0 | 3 ( 4.62) | 0.552 | NO |
| B16 | 0 | 0 | 1 | NO |
| B17 | 0 | 3 ( 4.62) | 0.0552 | NO |
| B18 | 6 (22.22) | 23 (35,38) | 0.787 | NO |
| B21 | 3 (11.11) | 9 (13,85) | 0.755 | NO |
| Bw22 | 0 | 0 | 1 | NO |
| B27 | 4 (14.81) | 8 (12.31) | 1 | NO |
| B35 | 8 (29.63) | 22 (33.85) | 0.625 | NO |
| B37 | 1 ( 3.70) | 1 ( 1.54) | 0.293 | NO |
| B38 | 1 ( 3.70) | 0 | 0.293 | NO |
| B39 | 0 | 0 | 1 | NO |
| B40 | 2 ( 7.40) | 4 ( 6.15) | 0.628 | NO |
| Bw41 | 5 (18.52) | 6 ( 9.23) | 0.289 | NO |
| B44 | 6 (22.22) | 9 (13.85) | 0.338 | NO |
| B51 | 1 ( 3.70) | 6 ( 9.23) | 0.443 | NO |
| Bw60 | 1 ( 3.70) | 1 ( 1.54) | 1 | NO |
| Bw61 | 1 ( 3.70) | 1 ( 1.54) | 1 | NO |
| Bw4 | 9 (33.33) | 18 (27.69 | 0.620 | NO |
| Bw6 | 22 (81.48) | 38 (58.46) | 0.0533 | NO |
| B Blanco | 4 ( 14.81) | 9 (13.85) | 1 | NO |

TABLA XXVII-b

| HLA | nº de casos (%) Pacientes con Brucelosis | Individuos afectados | Valor P | Significacion (al 5%) |
|---|---|---|---|---|
| Cw1 | 4 (14.81) | 7 (10.77) | 0.472 | NO |
| Cw2 | 6 (22,22) | 9 (13.85 | 0.760 | NO |
| Cw3 | 4 (14.81) | 6 ( 9.23) | 0.472 | NO |
| Cw4 | 6 (22.22) | 18 (27.69) | 0.795 | NO |
| Cw5 | 1 ( 3.70) | 5 ( 7.69) | 0.443 | NO |
| Cw6 | 2 ( 7.41) | 3 ( 4.62) | 0.577 | NO |
| Cw7 | 0 | 2 ( 3.07) | 0.587 | NO |
| Cw8 | 0 | 0 | 1 | NO |
| C Blanco | 17 (62.92) | 40 (61.54) | 1 | NO |

Nota: Valor teórico para el primer paso: $\alpha = 1 \times 10^{-3}$

* SE CALCULA RR Y $\hat{e}$

## TABLA XXVIII

RIESGO RELATIVO (RR) Y GRADO DE ASOCIACION (δ) DE ALGUNOS ANTIGENOS HLA CON LA ENFERMEDAD.

| ANTIGENO | RR* | δ* |
|---|---|---|
| **BRUCELSOSIS VERSUS CONTROLES** | | |
| A2 | 2.09 | 0.32 |
| A24 | 11.86 | 0.12 |
| B27 | 1.98 | 0.06 |
| Cw2 | 0.83 | -0.04 |
| **BRUCELOSIS VERSUS SANOS** | | |
| A2 | 1.45 | 0.19 |
| A24 | 1.02 | 0.001 |
| B27 | 1.27 | 0.02 |
| Cw2 | 1.77 | -0.11 |
| **SANOS VERSUS CONTROLES** | | |
| A2 | 1.43 | 0.16 |
| A24 | 10.96 | 0.11 |
| B27 | 1.69 | 0.050 |
| Cw2 | 0.46 | -0.15 |
| **FAMILIAS VERSUS CONTROLES** | | |
| A2 | 1.63 | 0.20 |
| A24 | 11.23 | 0.12 |
| B27 | 1.80 | 0.05 |
| Cw2 | 0.56 | -0.12 |

Nota: a.b. han sido calculados de acuerdo a la fórmula de WOLF y a la de BENGTSSON y THOMSON, y sólo en aquellos antígenos que han sido significativos, o mencionados en otros trabajos.

## TABLA XXIX

ESTUDIO DEL DESEQUILIBRIO DE UNION, SIGNIFICACION Y FRECUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE DOS LOCUS EN TODOS LOS MIEMBROS DE LAS FAMILIAS (92 CASOS)

| HAPLOTIPOS | nº observados (♂) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 B7 | 1 | 14 | 7 | 162 | 1 | NO | 1 | 3 |
| A1 B8 | 7 | 8 | 5 | 165 | 0.00000317 | SI | 15 | 21 |
| A1 B14 | 2 | 13 | 9 | 160 | 0.222 | NO | 3 | 9 |
| A1 B17 | 3 | 12 | 0 | 169 | 0.000445 | SI | 8 | 10 |
| A1 B35 | 2 | 13 | 28 | 141 | 1 | NO | -1 | 1 |
| A2 B7 | 2 | 50 | 6 | 126 | 1 | NO | -1 | 12 |
| A2 B8 | 2 | 50 | 10 | 122 | 0.514 | NO | -5 | 20 |
| A2 B12 | 2 | 50 | 1 | 131 | 0.193 | NO | 4 | 11 |
| A2 B18 | 10 | 42 | 19 | 113 | 0.500 | NO | 6 | 64 |
| A2 B21 | 10 | 42 | 2 | 130 | 0.0000665 | SI | 22 | 45 |
| A2 B27 | 2 | 50 | 10 | 122 | 0.514 | NO | -5 | 19 |
| A2 B35 | 4 | 48 | 26 | 106 | 0.0741 | NO | -16 | 38 |
| A2 B40 | 4 | 48 | 2 | 130 | 0.0544 | NO | 8 | 18 |
| A2 Bw41 | 3 | 49 | 8 | 124 | 1 | NO | -1 | 20 |
| A2 B44 | 3 | 49 | 12 | 120 | 0.562 | NO | -14 | 13 |
| A2 Bw51 | 3 | 49 | 4 | 128 | 0.405 | NO | 10 | 24 |
| A2 Bw61 | 2 | 50 | 0 | 132 | 0.0787 | NO | 5 | 11 |
| A2 B- | 5 | 47 | 8 | 124 | 0.522 | NO | 53 | 77 |
| A3 B7 | 5 | 13 | 3 | 167 | 0.000252 | NO | 18 | 22 |
| A3 B27 | 1 | 17 | 11 | 155 | 1 | NO | -0.5 | 6 |

TABLA XXVIIII-a

| HAPLOTIPOS | nº observados (♀) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A3 B35 | 9 | 9 | 21 | 145 | 0.000477 | SI | 19 | 35 |
| A3 B44 | 1 | 17 | 14 | 152 | 1 | NO | -14 | 6 |
| A3 B- | 2 | 16 | 11 | 155 | 0.620 | NO | 2 | 9 |
| A9 B14 | 2 | 6 | 9 | 167 | 0.0748 | NO | 2 | 9 |
| A9 B18 | 3 | 5 | 26 | 150 | 0.114 | NO | 5 | 12 |
| A9 B35 | 2 | 6 | 28 | 148 | 0.619 | NO | 2 | 8 |
| A9 B51 | 1 | 7 | 6 | 170 | 0.271 | NO | 2 | 4 |
| A10 B- | 2 | 9 | 13 | 160 | 0.222 | NO | 3 | 7 |
| A10 B14 | 1 | 10 | 10 | 163 | 1 | NO | 1 | 5 |
| A10 B18 | 2 | 9 | 13 | 160 | 0.222 | NO | 3 | 13 |
| A10 B27 | 3 | 8 | 9 | 154 | 0.0261 | NO | -2[illegible] | -18 |
| A10 B40 | 1 | 10 | 4 | 169 | 0.268 | NO | 2 | 4 |
| A10 Bw41 | 2 | 9 | 9 | 164 | 0.133 | NO | 4 | 7 |
| A11 B18 | 6 | 11 | 23 | 144 | 0.0321 | NO | 10 | 20 |
| A11 B27 | 3 | 14 | 9 | 158 | 0.0855 | NO | 6 | 10 |
| A11 B35 | 3 | 14 | 27 | 140 | 1 | NO | 1 | 10 |
| A11 B37 | 2 | 15 | 1 | 166 | 0.0290 | NO | 5 | 6 |
| A11 Bw41 | 3 | 14 | 8 | 159 | 0.068[illegible] | NO | 6 | 9 |
| A24 B13 | 4 | 9 | 0 | 171 | 0.0000155 | SI | 10 | 12 |
| A24 B15 | 3 | 10 | 0 | 171 | 0.000281 | SI | 8 | 9 |
| A24 B- | 1 | 12 | 12 | 159 | 1 | NO | 0.2 | 5 |
| A24 B27 | 3 | 10 | 9 | 162 | 0.0420 | NO | 6 | 11 |
| A24 B35 | 2 | 11 | 28 | 143 | 1 | NO | -0.4 | 11 |

TABLA XXIX-b

| HAPLOTIPO | nº observados (β) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signigf. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A28 B14 | 3 | 0 | 8 | 173 | 0.000165 | SI | 8 | 9 |
| A29 Bw41 | 1 | 10 | 10 | 163 | 1 | NO | 1 | |
| A29 Bw60 | 2 | 9 | 0 | 173 | 0.00327 | NO | 5 | 6 |
| A30 B8 | 3 | 0 | 9 | 173 | 0.000215 | SI | 8 | 9 |
| A29 B44 | 7 | 4 | 8 | 165 | 0.00000143 | SI | 18 | 22 |
| A32 B14 | 1 | 6 | 10 | 167 | 0.355 | NO | 2 | 4 |
| A32 B18 | 4 | 3 | 25 | 152 | 0.0126 | NO | 9 | 15 |
| A32 B44 | 2 | 5 | 13 | 164 | 0.102 | NO | 7 | 10 |
| Aw33 B14 | 3 | 8 | 8 | 165 | 0.0203 | NO | 7 | 10 |
| Aw33 B18 | 3 | 8 | 26 | 147 | 0.384 | NO | 4 | 14 |
| Aw33 B51 | 3 | 8 | 4 | 169 | 0.00494 | NO | 18 | 20 |
| Aw33 B44 | 2 | 9 | 13 | 160 | 0.222 | NO | -1 | 3 |
| Aw36 B- | 2 | 0 | 11 | 171 | 0.0130 | NO | 5 | 7 |
| A- B40 | 2 | 11 | 4 | 167 | 0.0589 | NO | 4 | 7 |
| B- Bw41 | 2 | 11 | 9 | 162 | 0.176 | NO | 3 | 8 |
| A- B21 | 2 | 11 | 10 | 161 | 0.203 | NO | 3 | 9 |
| A- B35 | 7 | 6 | 23 | 148 | 0.00133 | NO | 15 | 33 |
| B27 Cw1 | 8 | 5 | 3 | 173 | 0.00000007 | SI | 21 | 25 |
| B35 Cw1 | 2 | 28 | 3 | 145 | 1 | NO | 1 | 10 |
| Bw51 Cw1 | 1 | 11 | 10 | 162 | 1 | NO | 1 | 3 |
| B18 Cw1 | 1 | 28 | 10 | 145 | 0.698 | NO | -2 | 7 |
| B7 Cw2 | 2 | 6 | 13 | 167 | 0.103 | NO | 4 | 7 |
| B14 Cw2 | 1 | 10 | 14 | 159 | 1 | NO | 1 | 4 |

## TABLA XXIX-c

| HAPLOTIPO | nº observados (♀) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B18 CW2 | 3 | 26 | 12 | 143 | 0.798 | NO | 2 | 15 |
| B27 CW2 | 3 | 9 | 12 | 160 | 0.0618 | NO | 6 | 11 |
| B40 CW2 | 2 | 4 | 13 | 165 | 0.0770 | NO | 4 | 7 |
| B51 CW2 | 2 | 5 | 13 | 165 | 0.102 | NO | -9 | -7 |
| B44 CW2 | 2 | 13 | 13 | 156 | 0.614 | NO | -14 | -8 |
| B40 CW3 | 7 | 1 | 3 | 173 | 0.00000007 | SI | 19 | 20 |
| B44 CW3 | 1 | 14 | 9 | 159 | 1 | NO | -2 | 2 |
| BW61 CW3 | 1 | 1 | 9 | 182 | 0.106 | NO | 2 | 3 |
| B35 CW4 | 17 | 13 | 7 | 147 | $8 \times 10^{-14}$ | SI | 13 | 35 |
| B40 CW4 | 1 | 5 | 23 | 157 | 1 | NO | 6 | 11 |
| B18 CW5 | 5 | 24 | 5 | 150 | 0.00993 | NO | 10 | 15 |
| B44 CW5 | 1 | 14 | 5 | 164 | 0.404 | NO | 2 | 4 |
| B13 CW6 | 3 | 0 | 2 | 179 | 0.0000091 | SI | 8 | 9 |
| B15 CW6 | 1 | 2 | 4 | 177 | 0.0197 | NO | 2 | 3 |
| B18 CW6 | 1 | 28 | 5 | 155 | 1 | NO | 1 | 3 |
| B21 CW6 | 1 | 11 | 5 | 167 | 0.336 | NO | 2 | 4 |
| B8 CW7 | 2 | 10 | 0 | 172 | 0.00392 | NO | 32 | 32 |
| A1 CW2 | 3 | 12 | 12 | 157 | 0.109 | NO | 5 | 5 |
| A2 CW1 | 2 | 50 | 0 | 123 | 0.520 | NO | -4 | 17 |
| A2 CW4 | 7 | 45 | 17 | 115 | 1 | NO | 1 | 48 |
| A2 CW2 | 8 | 44 | 7 | 125 | 0.0350 | NO | 12 | 152 |
| A2 CW7 | 1 | 51 | 10 | 122 | 0.184 | NO | -7 | -4 |
| A2 CW3 | 3 | 49 | 7 | 125 | 1 | NO | 1 | 18 |

## TABLA XXIX-d

| Haplotipo | nº observados (β) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A2 Cw5 | 4 | 48 | 2 | 130 | 0.0545 | NO | 7 | 18 |
| A3 Cw4 | 5 | 13 | 19 | 147 | 0.0649 | NO | 8 | 22 |
| A3 Cw5 | 1 | 14 | 5 | 164 | 0.404 | NO | 1 | 5 |
| A11 Cw1 | 3 | 13 | 9 | 158 | 0.0855 | NO | 5 | 9 |
| A11 Cw3 | 3 | 14 | 7 | 160 | 0.0525 | NO | 6 | 9 |
| A9 Cw1 | 1 | 7 | 16 | 160 | 1 | NO | 1 | 3 |
| A9 Cw4 | 1 | 7 | 23 | 153 | 1 | NO | -0.1 | 5 |
| A10 Cw1 | 3 | 8 | 10 | 163 | 0.0329 | NO | 6 | 10 |
| A10 Cw2 | 2 | 9 | 13 | 160 | 0.222 | NO | 3 | 8 |
| A10 Cw5 | 2 | 9 | 2 | 171 | 0.183 | NO | 5 | 7 |
| A11 Cw4 | 1 | 16 | 23 | 144 | 0.479 | NO | -4 | 5 |
| A24 Cw2 | 2 | 11 | 13 | 158 | 0.604 | NO | 3 | 8 |
| A24 Cw4 | 2 | 11 | 22 | 149 | 1 | NO | 1 | 17 |
| A24 Cw6 | 3 | 10 | 2 | 169 | 0.00257 | NO | 7 | 9 |

Notas: 1) Valor teórico para el primer paso: $\alpha = 4.85 \times 10^{-4}$

Valor teórico para el segundo paso: $\alpha = 5.62 \times 10^{-4}$

2) +-, por ejemplo, indica que el primer antigeno esta presente y el segundo ausente.

3) ^ : Grado de asociación gamética entre alelos de dos locus. Su valor es expresado por $10^3$.

H: Frecuencia de haplotipo. Su valor es expresado por $10^3$.

β: Número observados, siendo el total 184 (92 X 2)

## TABLA XXX

ESTUDIO DEL DESEQUILIBRIO DE UNION, SIGNIFICACION Y FRECUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE DOS LOCUS EN LOS MIEMBROS NO AFECTADOS DE LAS FAMILIAS (65 CASOS).

| HAPLOTIPOS | nº observados (β) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 B7 | 1 | 11 | 5 | 113 | 1 | NO | 2 | 6 |
| A1 B8 | 5 | 6 | 4 | 115 | 0.000172 | SI | 17 | 25 |
| A1 B14 | 1 | 11 | 6 | 112 | 1 | NO | 2 | 4 |
| A1 B17 | 3 | 9 | 0 | 118 | 0.000615 | NO | 11 | 12 |
| A1 B35 | 2 | 10 | 20 | 98 | 1 | NO | -0.1 | 17 |
| A2 B7 | 1 | 34 | 5 | 90 | 0.682 | NO | -3 | 13 |
| A2 B8 | 2 | 33 | 7 | 88 | 1 | NO | -2 | 20 |
| A2 B12 | 1 | 34 | 1 | 94 | 1 | NO | 2 | 7 |
| A2 B18 | 9 | 26 | 14 | 81 | 1 | NO | -2 | 42 |
| A2 B21 | 8 | 27 | 1 | 94 | 0.00010 | SI | 25 | 48 |
| A2 B27 | 1 | 34 | 88 | 7 | 0.448 | NO | -5 | 14 |
| A2 B35 | 1 | 34 | 21 | 74 | 0.0153 | NO | -25 | 14 |
| A2 B40 | 3 | 32 | 1 | 94 | 0.0593 | NO | 9 | 18 |
| A2 Bw41 | 2 | 33 | 4 | 91 | 1 | NO | 2 | 18 |
| A2 Bw51 | 3 | 32 | 3 | 92 | 0.342 | NO | 6 | 22 |
| A2 Bw61 | 1 | 34 | 0 | 95 | 0.269 | NO | 3 | 4 |
| A2 B44 | 2 | 33 | 7 | 88 | 1 | NO | -2 | 16 |
| A2 - | 3 | 32 | 8 | 87 | 1 | NO | 2 | 10 |

TABLA XXX-a

| HAPLOTIPOS | nº observados (♀) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A3 B7 | 4 | 10 | 2 | 114 | 0.00115 | NO | 13 | 19 |
| A3 B27 | 1 | 13 | 15 | 101 | 1 | NO | 3 | 10 |
| A3 B35 | 7 | 7 | 15 | 101 | 0.0248 | NO | 20 | 41 |
| A3 B44 | 1 | 13 | 8 | 108 | 1 | NO | 1 | 8 |
| A3 - | 1 | 13 | 10 | 106 | 1 | NO | -1 | 3 |
| A9 B14 | 1 | 5 | 6 | 118 | 0.287 | NO | 3 | 5 |
| A9 B18 | 2 | 4 | 21 | 103 | 0.589 | NO | 4 | 14 |
| A9 B35 | 2 | 4 | 20 | 104 | 0,589 | NO | 4 | 14 |
| A9 B51 | 1 | 5 | 5 | 119 | 0.251 | NO | 3 | 5 |
| A10 - | 2 | 6 | 9 | 113 | 0.137 | NO | 5 | 7 |
| A10 B14 | 1 | 7 | 6 | 116 | 0.366 | NO | 2 | 5 |
| A10 B18 | 2 | 6 | 21 | 101 | 0.631 | NO | 2 | 14 |
| A10 B27 | 2 | 6 | 6 | 116 | 0.0772 | NO | 6 | 10 |
| A10 B40 | 0 | 8 | 4 | 118 | 1 | NO | -1 | 0 |
| A10 Bw41 | 0 | 8 | 6 | 116 | 1 | NO | -1 | 0 |
| A11 B18 | 6 | 8 | 17 | 99 | 0.0184 | NO | 5 | 27 |
| A11 B17 | 2 | 12 | 6 | 110 | 0.207 | NO | 5 | 11 |
| A11 B35 | 3 | 11 | 19 | 97 | 0.705 | NO | 3 | 24 |
| A11 B37 | 1 | 13 | 1 | 115 | 0.204 | NO | 3 | 4 |
| A11 Bw41 | 2 | 12 | 4 | 112 | 0.126 | NO | 6 | 11 |
| A24 B13 | 2 | 7 | 0 | 121 | 0.0429 | NO | 7 | 8 |

## TABLA XXX-b

| HAPLOTIPOS | nº observados (ϕ) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A24 B15 | 3 | 6 | 0 | 121 | 0.000235 | SI | 11 | 12 |
| A24 - | 1 | 8 | 10 | 111 | 1 | NO | 1 | 2 |
| A24 B27 | 2 | 7 | 6 | 115 | 0.0961 | NO | 6 | 9 |
| A24 B35 | 1 | 7 | 21 | 101 | 1 | NO | -1 | 8 |
| A28 B14 | 3 | 0 | 4 | 123 | 0.000097 | SI | 11 | 12 |
| A29 BN41 | 1 | 5 | 5 | 119 | 0.251 | NO | 3 | 5 |
| A29 BN60 | 1 | 5 | 0 | 124 | 0.461 | NO | 4 | 4 |
| A30 B8 | 2 | 0 | 7 | 121 | 0.00429 | NO | 7 | 8 |
| A29 B44 | 4 | 2 | 5 | 119 | 0.0000156 | SI | 14 | 17 |
| A32 B14 | 0 | 5 | 7 | 118 | 1 | NO | -1 | 0 |
| A32 B18 | 3 | 2 | 20 | 105 | 0.0385 | NO | 9 | 17 |
| A32 B44 | 2 | 3 | 7 | 118 | 0.0384 | NO | 7 | 9 |
| AN33 B14 | 1 | 4 | 6 | 119 | 0.245 | NO | 3 | 5 |
| AN33 B18 | 2 | 3 | 21 | 104 | 0.214 | NO | 5 | 13 |
| AN33 B51 | 2 | 3 | 4 | 121 | 0.0168 | NO | 7 | 9 |
| AN33 B44 | 1 | 4 | 7 | 118 | 0.276 | NO | 3 | 5 |
| AN36 B- | 1 | 1 | 10 | 118 | 0.162 | NO | 3 | 3 |
| A- B21 | 2 | 9 | 1 | 118 | 0.0187 | NO | 7 | 10 |
| A- B35 | 7 | 3 | 15 | 105 | 0.000138 | SI | 23 | 31 |
| A- B40 | 1 | 10 | 3 | 116 | 0.301 | NO | 3 | 4 |
| A- BN41 | 2 | 9 | 4 | 115 | 0.0812 | NO | 6 | 8 |
| B18 CW1 | 1 | 22 | 6 | 101 | 1 | NO | -1 | 9 |
| B27 CW1 | 5 | 3 | 2 | 120 | 0.00000039 | SI | 18 | 21 |

TABLA XXX-c

| HAPLOTIPOS | nº observados (β) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B51 Cw1 | 1 | 4 | 5 | 120 | 1 | NO | 3 | 5 |
| B7 Cw2 | 2 | 4 | 7 | 117 | 0.0555 | NO | 6 | 10 |
| B14 Cw2 | 0 | 7 | 9 | 114 | 1 | NO | -2 | 0 |
| B18 Cw2 | 2 | 21 | 7 | 100 | 1 | NO | 2 | 16 |
| B27 Cw2 | 2 | 6 | 7 | 115 | 0.961 | NO | 6 | 10 |
| B51 Cw2 | 2 | 4 | 7 | 117 | 0.0555 | NO | 6 | 10 |
| B44 Cw2 | 2 | 7 | 7 | 114 | 0.119 | NO | 6 | 10 |
| B40 Cw3 | 5 | 1 | 1 | 123 | 0.0000123 | SI | 11 | 13 |
| Bw61 Cw3 | 0 | 1 | 6 | 123 | 1 | NO | -0.1 | 0 |
| B44 Cw3 | 0 | 9 | 6 | 115 | 1 | NO | -0.1 | 0 |
| B35 Cw4 | 11 | 11 | 7 | 101 | 0.00000041 | SI | 35 | 63 |
| B40 Cw4 | 1 | 3 | 17 | 109 | 1 | NO | 2 | 6 |
| B18 Cw5 | 4 | 19 | 1 | 106 | 0.00343 | NO | 13 | 21 |
| B44 Cw5 | 1 | 8 | 4 | 117 | 0.305 | NO | 3 | 5 |
| B13 Cw6 | 1 | 1 | 2 | 126 | 0.0458 | NO | 4 | 4 |
| B15 Cw6 | 1 | 2 | 3 | 125 | 0.0682 | NO | 3 | 4 |
| B18 Cw6 | 1 | 22 | 2 | 105 | 1 | NO | 2 | 5 |
| B21 Cw6 | 1 | 8 | 2 | 119 | 0.195 | NO | 3 | 5 |
| B8 Cw7 | 2 | 7 | 0 | 121 | 0.00429 | NO | 6 | 10 |
| A1 Cw2 | 2 | 10 | 7 | 111 | 0.195 | NO | 5 | 11 |
| A1 Cw4 | 2 | 10 | 16 | 102 | 1 | NO | 1 | 13 |
| A2 Cw1 | 1 | 34 | 6 | 89 | 0.673 | NO | -4 | 10 |
| A2 Cw3 | 2 | 33 | 4 | 91 | 1 | NO | 2 | 17 |

## TABLA XXX-d

| HAPLOTIPOS | nº observados (β) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A2 Cw5 | 3 | 32 | 2 | 93 | 0.120 | NO | 7 | 20 |
| A2 Cw7 | 1 | 34 | 1 | 94 | 1 | NO | 2 | 7 |
| A3 Cw4 | 3 | 11 | 15 | 101 | 0.411 | NO | 5 | 20 |
| A3 Cw5 | 1 | 13 | 4 | 112 | 1 | NO | 2 | 6 |
| A9 Cw1 | 1 | 5 | 6 | 118 | 0.287 | NO | 3 | 5 |
| A9 Cw4 | 1 | 5 | 17 | 107 | 1 | NO | 1 | 8 |
| A10 Cw1 | 2 | 6 | 5 | 117 | 0.0597 | NO | 6 | 9 |
| A10 Cw2 | 0 | 8 | 9 | 113 | 1 | NO | -2 | 0 |
| A10 Cw5 | 2 | 6 | 3 | 119 | 0.303 | NO | 7 | 9 |
| A11 Cw1 | 2 | 12 | 5 | 111 | 0.165 | NO | 5 | 10 |
| A11 Cw3 | 2 | 12 | 4 | 112 | 0.126 | NO | 6 | 11 |
| A11 Cw4 | 1 | 13 | 17 | 99 | 0.691 | NO | 4 | 11 |
| A24 Cw2 | 1 | 8 | 8 | 113 | 1 | NO | 1 | 5 |
| A24 Cw4 | 1 | 8 | 17 | 104 | 1 | NO | -1 | 6 |
| A24 Cw6 | 1 | 8 | 2 | 119 | 0.195 | NO | 3 | 4 |

Notas: 1) Valor teórico para el primer paso: $\alpha = 4.85 \times 10^{-4}$

Valor teórico para el segundo paso: $\alpha = 5.32 \times 10^{-4}$

2) +-, por ejemplo, indica que el primer antígeno está presente y el segundo ausente.

3) ^ : Grado de asociación gamética entre alelos de dos locus, cuyo valor calculado es expresado por $10^3$

H : Frecuencia de haplotipo, cuyo valor calculado es

expresado por $10^3$

4) $\beta$ : nº observados, cuyo total es 130 ( 92 sujetos x 2 haplotipos).

## TABLA XXXI

ESTUDIO DEL DESEQUILIBRIO DE ENLANCE, SIGNGIFIACACION Y FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS FORMADOS POR ANTIGENOS DE DOS LOCUS EN ENFERMOS CON BRUCELOSIS (27 CASOS).

| HAPLOTIPOS | nº observados(ϕ) ++ | +- | -+ | ++ | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 B7 | 0 | 3 | 2 | 51 | 1 | NO | -1 | 0 |
| A1 B8 | 2 | 1 | 1 | 50 | .00620 | NO | 17 | 26 |
| A1 B14 | 1 | 2 | 3 | 48 | 0.209 | NO | 8 | 12 |
| A1 B17 | 0 | 3 | 0 | 51 | 1 | NO | 0 | 0 |
| A1 B35 | 0 | 3 | 8 | 43 | 1 | NO | -4 | 0 |
| A2 B7 | 1 | 16 | 1 | 36 | 1 | NO | 4 | 11 |
| A2 B8 | 2 | 15 | 1 | 36 | 0.230 | NO | 12 | 30 |
| A2 B12 | 1 | 16 | 0 | 37 | 0.318 | NO | 7 | 11 |
| A2 B18 | 3 | 14 | 3 | 34 | 0.365 | NO | 13 | 52 |
| A2 B21 | 2 | 15 | 1 | 36 | 0.230 | NO | 12 | 33 |
| A2 B27 | 1 | 1 | 3 | 34 | 1 | NO | -6 | 26 |
| A2 B35 | 3 | 14 | 5 | 32 | 1 | NO | 6 | 59 |
| A2 B40 | 1 | 16 | 1 | 26 | 1 | NO | 36 | -20 |
| A2 Bw41 | 1 | 16 | 4 | 33 | 0.666 | NO | 7 | 14 |
| A2 B51 | 0 | 17 | 1 | 36 | 1 | NO | 4 | 4 |
| A2 Bw61 | 1 | 16 | 0 | 37 | 0.318 | NO | 7 | 15 |
| A2 B44 | 1 | 16 | 0 | 37 | 0.318 | NO | 7 | 13 |
| A2 B- | 2 | 15 | 0 | 37 | 0.0314 | NO | 15 | 23 |

## TABLA XXXI-a

| HAPLOTIPOS | nº de casos (♀) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A3 B7 | 1 | 3 | 1 | 49 | 0.144 | NO | 6 | 11 |
| A3 B27 | 0 | 4 | 4 | 46 | 1 | NO | -3 | 2 |
| A3 B35 | 2 | 2 | 6 | 44 | 0.1 | NO | 14 | 27 |
| A3 B44 | 0 | 4 | 6 | 44 | 1 | NO | -4 | 5 |
| A3 B- | 1 | 3 | 1 | 49 | 0.142 | NO | 8 | 9 |
| A9 B14 | 1 | 1 | 3 | 49 | 0.144 | NO | 8 | 11 |
| A9 B18 | 1 | 1 | 5 | 47 | 0.212 | NO | 7 | 12 |
| A9 B35 | 0 | 2 | 8 | 44 | 1 | NO | -3 | 3 |
| A9 B51 | 0 | 2 | 1 | 51 | 1 | NO | -0.3 | 0 |
| A10 - | 0 | 3 | 2 | 49 | 1 | NO | -1 | 0 |
| A10 B14 | 0 | 3 | 4 | 47 | 1 | NO | -2 | 1 |
| A10 B18 | 0 | 3 | 6 | 45 | 1 | NO | -3 | 2 |
| A10 B27 | 1 | 2 | 3 | 48 | 0.209 | NO | 7 | 12 |
| A10 B40 | 1 | 2 | 2 | 49 | 0.160 | NO | 8 | 10 |
| A10 Bw41 | 2 | 1 | 3 | 48 | 0.206 | NO | 17 | 21 |
| A11 B13 | 0 | 3 | 6 | 45 | 1 | NO | -3 | 2 |
| A11 B27 | 1 | 2 | 3 | 48 | 0.209 | NO | 8 | 12 |
| A11 B35 | 0 | 3 | 8 | 43 | 1 | NO | -4 | 1 |
| A11 B37 | 1 | 2 | 0 | 51 | 0.055 | NO | 9 | 10 |
| A11 B41 | 1 | 2 | 4 | 47 | 0.257 | NO | 7 | 12 |
| A24 B13 | 2 | 2 | 0 | 50 | 0.00419 | NO | 18 | 21 |
| A24 B15 | 0 | 1 | 0 | 49 | 1 | NO | 0 | 0 |

## TABLA XXXI-b

| HAPLOTIPOS | nº observados (♀) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signf. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A24 B27 | 1 | 3 | 3 | 47 | 0.272 | NO | 7 | 13 |
| A24 B35 | 1 | 3 | 7 | 43 | 1 | NO | 4 | 12 |
| A24 B- | 0 | 4 | 4 | 46 | 1 | NO | -7 | 5 |
| A28 B14 | 0 | 0 | 4 | 49 | 1 | NO | 0 | 0 |
| A29 Bw41 | 0 | 5 | 5 | 45 | 1 | NO | -5 | 5 |
| A29 Bw60 | 1 | 4 | 0 | 49 | 0.0926 | NO | 9 | 11 |
| A30 B8 | 1 | 0 | 2 | 51 | 0.555 | NO | 9 | 10 |
| A29 B44 | 3 | 2 | 3 | 46 | 0.00736 | NO | 24 | 36 |
| A32 B14 | 1 | 1 | 3 | 49 | 0.142 | NO | 8 | 11 |
| A32 B18 | 1 | 1 | 5 | 47 | 0.212 | NO | 8 | 12 |
| A32 B44 | 0 | 2 | 6 | 46 | 1 | NO | -2 | 2 |
| Aw33 B14 | 1 | 5 | 3 | 45 | 0.383 | NO | 6 | 15 |
| Aw33 B18 | 1 | 5 | 5 | 43 | 1 | NO | 3 | 13 |
| Aw33 B44 | 1 | 5 | 5 | 43 | 1 | NO | 3 | 18 |
| Aw33 B51 | 1 | 5 | 0 | 48 | 0.111 | NO | 9 | 10 |
| Aw36 B- | 1 | 1 | 3 | 49 | 0.144 | NO | 8 | 9 |
| A- B21 | 0 | 2 | 3 | 49 | 1 | NO | -1 | -1 |
| A- B35 | 1 | 1 | 7 | 45 | 0.277 | NO | 7 | 7 |
| A- B40 | 1 | 1 | 1 | 51 | 0.0734 | NO | 8 | 9 |
| A- Bw41 | 0 | 2 | 5 | 47 | 1 | NO | -2 | -2 |
| B27 Cw1 | 3 | 1 | 1 | 49 | 0.0000635 | SI | 26 | 32 |

## TABLA XXXI-c

| HAPLOTIPOS | nº observados (δ) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B35 Cw1 | 1 | 7 | 3 | 43 | 1 | NO | 4 | 16 |
| B51 Cw1 | 0 | 1 | 4 | 49 | 1 | NO | -0.1 | 0 |
| B18 Cw1 | 0 | 6 | 4 | 49 | 1 | NO | -4 | 0 |
| B14 Cw2 | 1 | 3 | 5 | 45 | 0.385 | NO | 6 | 15 |
| B18 Cw2 | 1 | 5 | 5 | 43 | 1 | NO | 3 | 11 |
| B27 Cw2 | 1 | 3 | 5 | 45 | 0.385 | NO | 5 | 15 |
| B51 Cw2 | 0 | 1 | 6 | 47 | 1 | NO | -1 | 3 |
| B44 Cw2 | 0 | 6 | 6 | 42 | 1 | NO | -7 | 7 |
| B40 Cw3 | 2 | 0 | 2 | 50 | 0.000419 | NO | 18 | 21 |
| B44 Cw3 | 1 | 5 | 3 | 45 | 0.385 | NO | 5 | 13 |
| Bw61 Cw3 | 1 | 1 | 3 | 49 | 0.144 | NO | 8 | 9 |
| B35 Cw4 | 6 | 2 | 0 | 46 | 0.0000001 | SI | 52 | 71 |
| B40 Cw4 | 0 | 2 | 6 | 46 | 1 | NO | -2 | 2 |
| B18 Cw5 | 1 | 5 | 0 | 48 | 0.111 | NO | 8 | 11 |
| B44 Cw5 | 0 | 6 | 1 | 47 | 1 | NO | -1 | 0 |
| B13 Cw6 | 2 | 0 | 0 | 52 | 0.0000699 | NO | 18 | 19 |
| B15 Cw6 | 0 | 0 | 2 | 52 | 1 | NO | 0 | 0 |
| B18 Cw6 | 0 | 6 | 2 | 46 | 1 | NO | -2 | 2 |
| B21 Cw6 | 0 | 3 | 2 | 49 | 1 | NO | -1 | 0 |
| B8 Cw7 | 0 | 3 | 0 | 51 | 1 | NO | 0 | 0 |
| B7 Cw2 | 0 | 2 | 6 | 46 | 1 | NO | -2 | 2 |
| A1 Cw2 | 1 | 2 | 5 | 46 | 0.303 | NO | 6 | 13 |
| A1 Cw4 | 1 | 2 | 5 | 46 | 0.303 | NO | 6 | 13 |

## TABLA XXXI-d

| HAPLOTIPOS | nº observados (♀) ++ | +- | -+ | -- | Valor P | Signif. | ^ | H |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A2 CW1 | 1 | 16 | 3 | 34 | 1 | NO | -3 | 3 |
| A2 CW2 | 3 | 14 | 3 | 34 | 0.036 | NO | 13 | 41 |
| A2 CW3 | 1 | 16 | 3 | 34 | 1 | NO | -3 | 22 |
| A2 CW4 | 4 | 13 | 2 | 35 | 0.0707 | NO | 24 | 68 |
| A2 CW5 | 1 | 16 | 0 | 37 | 0.315 | NO | 8 | 16 |
| A2 CW7 | 0 | 17 | 0 | 37 | 1 | NO | 0 | 0 |
| A2 BW61 | 1 | 16 | 0 | 37 | 0.318 | NO | 7 | 15 |
| A3 CW4 | 2 | 2 | 4 | 46 | 0.0566 | NO | 15 | 25 |
| A3 CW5 | 0 | 4 | 1 | 49 | 1 | NO | -1 | 1 |
| A9 CW1 | 0 | 2 | 4 | 48 | 1 | NO | -1 | 1 |
| A9 CW4 | 0 | 2 | 6 | 46 | 1 | NO | -2 | -17 |
| A10 CW1 | 1 | 2 | 3 | 48 | 0.209 | NO | 5 | 11 |
| A10 CW2 | 2 | 1 | 4 | 47 | 0.0298 | NO | 13 | 24 |
| A10 CW5 | 0 | 3 | 1 | 50 | 1 | NO | -0.5 | 0 |
| A11 CW1 | 1 | 2 | 3 | 48 | 0.209 | NO | 8 | 12 |
| A11 CW3 | 1 | 2 | 3 | 48 | 0.209 | NO | 8 | 12 |
| A11 CW4 | 0 | 3 | 6 | 45 | 1 | NO | -3 | -27 |
| A24 CW2 | 1 | 3 | 5 | 45 | 0.384 | NO | 6 | 17 |
| A24 CW4 | 1 | 3 | 5 | 45 | 0.384 | NO | 6 | 15 |
| A24 CW6 | 2 | 2 | 0 | 50 | 0.00419 | NO | 18 | 21 |

Notas: 1) Valor teórico para el primer paso: $\alpha = 4.85 \times 10^{-4}$

Valor teórico para el segundo paso: $\alpha = 4.90 \times 10^{-4}$

2) +-, por ejemplo, indica que el primer antigeno está presente y el segundo está ausente.

3) ^ : Grado de asociación gamética entre alelos de dos locus, cuyo valor calculado es expresado por $10^3$

H : Frecuencia de haplotipo, cuyo valor calculado es expresado por $10^3$

4) $\beta$ : número observados, cuyo total es 54 (27 sujetos x 2 haplotipos).

## TABLA XXXII

SEGREGACION DE HAPLOTIPOS EN LAS DIFERENTES FAMILIAS.

| FAMILIA | PADRES | HIJOS |
|---|---|---|
| 1. | a/b c/d | a°/c a/c a/d a/d |
| 2. | a/b c/b | a/d a°/c b/d b/d |
| 3. | a°/b c/d | a/c b/d |
| 4. | a°/b c/d | a°/c a/c |
| 5. | a/b c/d | a°/c b°/d a/c |
| 6. | a°/b c/d | a/d b/c a/c |
| 7. | a°/b c/d | a/c a/d |
| 8. | a°/b c/d | a/d b/d |
| 9. | a°/b c/d | b/d b/c |
| 10. | a°/b c/d | a/d b°/c b/d |
| 11. | a°/b c/d | b/c a/c a/d |
| 12. | a°/b c°/d | a/d b/c a/d |

## TABLA XXXII-a

| FAMILIA | PADRES | HIJOS |
|---|---|---|
| 13. | a/b c/d | a°/c b°/c a/c |
| 14. | a/b c°/d | a/c a/d |
| 15. | a/b c/d | a°/c b/c |
| 16. | a°/b c°/d | a/c b/c a/c |
| 17. | a/b c/d | a°/c b/c |
| 18. | a/b c/d | a°/c a/d |
| 19. | a/b c/d | a°/c a/d a/d |
| 20. | a°/b c/d | a/d a/c |

Notas: °Enfermo con brucelosis

## TABLA XXXIII

### DISTIRIBUCION DE HAPLOTIPOS ENTRE PAREJAS DE HERMANOS

| | HAPLOTIPOS COMPARTIDOS | | |
|---|---|---|---|
| | 2 | 1 | 0 |
| Frecuencia esperada | 0.25 | 0.50 | 0.25 |
| Frecuencia observada | 0.26 | 0.46 | 0.28 |

$X^2 = 0.156$ ( 2 g.l.)

Nota: N = 16 parejas de hermanos, compuesta cada una de ellas uno enfermo y otro sano.

## D.- DISCUSION.

El presente estudio fué plantedado con el fin de encontrar un marcador genético que indicara susceptibilidad o resistencia a padecer la enfermedad, asi como su influencia en el ambiente familiar que junto con otros factores hacen que la brucelois sea más frecuente en este ambiente.

El Sistema HLA es el sistema genético más polimorfo que se ha descubierto en el hombre, con un alto nivel de heterozigotos en cada Locus. La metodología que es utilizada para la demostración de la predisposición o asociación del Sistema HLA a una enfermedad muchas veces no es concluyente, teniéndose que apoyar en la recopilación de datos y compararlos con otros estudios. Al comparar dos poblaciones, una de las dificultades es la que ofrece la población considerada como control, constituida por sujetos sanos, ya que debe tenerse en cuenta que debe ser lo más homogénea con respecto al otro grupo a estudiar, debiéndose ser del mismo grupo étnico ya que la diferencia racial influye de forma considerable en la frecuencia de los antigenos (BODMER y cols.,1973).

Otra dificultad ,no relacionada con el estudio matemático, es la posibilidad de que algunos sueros, que contengan anticuerpos anti-víricos, puedan reaccionar con los linfocitos de ciertos pacientes, siendo más sensitivos a la acción de los anticuerpos anti-antigenos del Sistema HLA. La otra situación, reacciones falsos-negativos, también han sido

observadas (BODMER y cols.,1972).

Los mecanismos que explicarian la asociación HLA-Enfermedad son desconocidos. Ultimamente ha sido postulado que podrian ser debidos a un defecto heterogéneo molecular.No es sorprendente que muchas enfermedades asociadas al sistema HLA, lo hagan con varios alelos de diferentes Locus, lo que explicaria la heterogendidad genética, y esto haria necesarios la implicación de los factores ambientales en la patogénesis de la enfermedad (THOMSON, 1988)

El hecho de que de muchos estudios no han encontrado asociación o estas han sido contradictorias, probablemente sea debido a que son desconocidos los mecanismos etipatogénicos de las enfermedades estudiadas, y desde el punto de vista genético el que intervengan otros sistemas distintos al complejo HLA.

Por tanto, la combinación de esta serie de dificultades ( el polimorfismo del sistema HLA, desconocimiento de los mecanismos de asociación con la enferfemedad, la configuración de los grupos controles, la metodología utilizada,tanto los falsos positivos como los negativos, la heterogenidad de los mecanismos patogénicos de las enfermedades...) explicarian la complejidad de todo estudio orientado a demostrar una asociación entre la enfermedad, en este caso la brucelosis, y el sistema HLA.

Una vez hecho estas observaciones, pasamos a desarrollar los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio tras la comparación con otros trabajos de la literatura.

En primer lugar obtuvimos un grupo de sujetos sanos que consideramos como control, perteneciente al mismo grupo étnico que el grupo de las familias a estudiar para el análisis comparativo. Se tiparon antigenos de Clase I a un total de 274 sujetos, para 16 especificidades antigénicas del Locus A, 25 para el Locus B y 8 para el Locus C. Para ello fué utilizada la técnica de microlinfotoxicidad mediada por complemento.

La presencia asi como la frecuencia fenotipica han quedado expuestos en las Tablas X , XIV a XIV-b, XVa XV-b y XVI a XVI-b.

Se efectuó el mismo tipaje al grupo formado por 20 familias, con un total de 92 sujetos, cuyos criterios de selección y distribución estan indicados en el capitulo de Material. La presencia de los antigenos y de los haplotipos, la frecuencia fenotipica, la frecuencia de haplotipos,el cálculo del Riesgo Relativo , asi como el estudio del desequilibrio de ligamiento han quedado expuestos en el capitulo de Resultados.

En primer lugar comparamos las dos poblaciones, para obtener información sobre la existencia de algún marcador genético común en ambiente familiar que actuara de

predisponente de la enfermedad brucelar.

Este primer paso, a pesar de no ser el método más apropiado como comentaremos posteriormente, también indica la existencia o no, de una alteración en la distribución de genes (un desequilibrio genético de una población) como consecuencia de una selección natural o de una mutación.

Aunque existen varios métodos para comparar la distribución génica de dos poblaciones, nosotros hemos utilizado la asociada a la frecuencia fenotipica, ya que su evaluación estadistica es suficiente y menos laboriosa.

Al realizar la comparación de la frecuencia fenotipica entre los controles y todos los componentesde las familias ( ablas XXIV a XXIV-b) encontramos en el Locus A un aumento de la frecuencia fenotipica del antigeno A2 estadisticamente significativo en el grupo de las familias ( 56.52 %) frente a controles (48.89 %) con un valor de P = 0.000689.

Una vez observada la frecuencia de este antigeno , hemos clasificado a los miembros de las familias en dos grupos: uno de sanos y otro de enfermos, comparando cada uno de ellos con el grupo control.

Los resultados obtenidos no muestran diferencias en lo referente a los miembros sanos. Sin embargo, se observa un

aumento llamativo de la frecuencia del antigeno A2 (62.92 %) cuando el grupo estudiado es el de enfermos, que si bien no es estadisticamente significativo ( hecho que atribuimos al número pequeño de la muestra, lo consideramos un hallazgo importante.

Por último, no hemos observado diferencias entre miembros sanos y los enfermos con brucelosis de las distintas familias.

Realizado el análisis de los resultados obtenidos con el antigeno A2 y al compararlo con los de otros autores, pasamos a hacer unos comentarios de forma más amplia y detallada.

En primer lugar cabe destacar como diferencia importante que nuestro trabajo se ha realizado en familias a diferencia del resto, que fueron realizados en la población general. A este hecho se le podria atribuir el aumento de la frecuencia del antigeno A2 obtenido, debido a una mayor homogeneidad genética por consanguinidad y como consecuencia una mayor probabilidad de aparición del A2. Sin embargo, no se obtiene aumentos significativos en las frecuencias de otros antigenos como cabria esperar según este razonamiento. Por otro lado el que existan algunos trabajos con resultados referentes a la frecuencia del A2, nos ha hecho valorar este hallazgo con el fin de sacar unas conclusiones que nos fuesen de utilidad.

En 1981 , ALARCON y cols. comunicaron que en los pacientes afectos de brucelosis con o sin artritis la frecuencia del antigeno HLA-A2 estaba muy disminuido con respecto al grupo control (28.6 % y 18.7 %) respectivamente al 67.3 % del grupo control con $p \leq 0.001$.

Nuestros resultados difieren por tanto de los expresados por el autor anteriormente citado, pero es preciso tener en cuenta como diferencias importantes que la frecuencia fenotipica es distinta en ambas poblaciones determinado por ser diferentes grupos étnicos ( Peruana 67.8 % y Granadina 45.22 %) y que el número de sujetos, tanto controles como enfermos, es diferente, ya que nuestro estudio lo constituian 274 controles y 27 enfermos, el realizado por ALARCON lo componian 52 y 32 respectivamente.

For tanto, no podemos confirmar los hallazgo comentados por este autor sobre la baja incidencia del antigeno A2, ya que en nuestro estudio encontramos un aumento de la frecuencia en los enfermos y posiblemente la discordancia esté en relación con la diferencia del grupo étnico.

DAWES y GHOSH (1.985) observaron en un estudio restropectivo un aumento de la frecuencia del antigeno A2. De 12 pacientes diagnosticados de brucelosis, en 8 se encontraba la presencia de dicho antigeno ( 66.6 %), mientras en la población general es 51 %.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por estos autores, realizándose el estudio en un mismo grupo étnico ( Reino Unido), y aunque el germen es diferente (B. abortus), lo que no explicaría la coincidencia de resultados en este estudio ni la discrepancia en el trabajo de ALARCON, como comentaremos con posterioridad.

De gran interés para nosotros resulta la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por PAULE SASTRE (1985), ya que la causística en lo referente al número de enfermos es elevada (107) y que el estudio se ha realizado en una población perteneciente al mismo grupo étnico y ubicada en la misma región geográfica (Provincia de Granada). Por lo que todo lo anterior supone una mayor homogenización genética y unos mismos factores epidemilógicos (mismo germen, reservorio...).

No hemos encontrado diferencia alguna en lo referente a la frecuencia del antigeno A2 con respecto al estudio anterior, que solo lo podríamos explicar al hecho de que nuestro trabajo se ha realizado en familias y a que el número de enfermos es diferente, ya que la metodología utilizada ha sido la misma.

Una vez observado el aumento del antigeno A2,al dividir las familias en sanos y enfermos, la frecuencia sigue siendo alta, pero más importante en el grupo de los enfermos con brucelosis (62.92 %) que en los sanos (53.85).

Cuando estudiamos el Riesgo Relativo, éste es mayor en el grupo de enfermos ( 2.09) que en los familiares no afectados (1.45). La fuerza de la asociación genética entre espeicificidades del sistema HLA y brucelosis, calculada por la fórmula $\phi$ y cuyos resultados quedan expuestos en la Tabla XXVIII, sigue mostrando un valor más elevado del antigeno A2 en el grupo de enfermos (0.32) con relación a los sanos (0.16).

De todo ello podemos considerar ante el hecho de que la incidencia del antígeno A2 es más elevada en el grupo de familias al compararlas con el grupo control, siendo RR y $\phi$ mayor en los enfermos y el no existir diferencias entre los miembros de las familias, que este antigeno es un marcador genético predisponente de la enfermedad brucelar en el ambiente familiar, en el que posiblemente esten asociados otros antigenos de otros Locus, es decir que su presencia podria predisponer a la enfermedad, pero que también necesitaría la implicación de factores ambientales para el desarrollo de la brucelosis.

En el resto de las especificidades del Locus A está aumentada la frecuencia del HLA-A24 en el grupo de familias de forma estadisticamente significativa. Este hecho no va paralelo como cabria esperar a ninguna alteración de la frecuencia del antigeno A9, del cual este antigeno es "split", por tanto pensamos que dado que el antigeno HLA-A24 es el

"split" más frecuente del antigeno A9 y que incluso su frecuencia es baja, el aumento del A24 no es valorable en nuestro trabajo.

Cuando analizamos el Locus B es obligado comentar los resultados sobre el antigeno HLA-B27, debido a la importancia que tiene como marcador en las enfermedades infecciosas que son consideradas dentro del grupo de las artritis reactivas.

La frecuencia del antigeno B27 no resultó distinta en el grupo control ni en los diferentes grupos en familias ( sanos y enfermos con brucelosis), hecho superponible a lo observado practicamente por todos los autores (ALARCON, 1981,1985: DAWES, 1985: PAULE SASTRE, 1985). Al ser contradictorios con los observados por HODINKA en 1978, fueron ya muy comentados, por lo que no entraremos más en detalle.

La asociación genética (β) calculada en el antigeno B27 fué de 0.06 en el grupo de enfermos, lo que apoya que este antigeno no es marcador de la enfermedad brucelar.

Asi mismo, observamos un aumento en la frecuencia del antigeno BW41 tanto en el grupo de enfermos como en la familiares sanos estadisticamente significativos, al que nosotros no damos valor, porque pensamos que todavia esta dentro del grupo de especificiades consideradas como

provisionales, conservando todavia en el último Workshop la nomenclatura de la letra "W". Además nosotros hemos utilizado más sueros para la espcificidad BW41, hecho al que se puede atribuir el aumento de la frecuencia de este antigeno con respecto al grupo control.

Al analizar el Locus C no hemos encontrando ninguna diferencia al comparar los distintos antigenos entre el grupo control y el grupo de las familias con división en enfermos y sanos.

PAULE SASTRE (1985) encontró un hallazgo sorprendente al analizar el Locus C, como fué el hecho de encontrar una disminución estadisticamente significativa del antigeno HLA-CW2, con una frecuencia fenotipica de 4.71 % en el grupo de enfermos brucelares frente al 25.75 % del grupo control, con $p \leq 0.0000084$, concluyendo que este antigeno actúa como protector de la bruecelosis.

Nosotros encontramos una frecuencia fenotipica disminuida del antigeno CW2 en el grupo de Familias ( 11.56 %) frente al grupo Control (25.55 %), sin ser estadisticamente significativa, que nuevamente volvemos atribuir a la diferencia en el número de las muestras. Pero un hecho importante a destacar es que al hacer los dos grupos con los miembros de las familias (Sanos y enfermos), se observa que la frecuencia del antigeno CW2 es más baja en los sanos (13.05 %)

que en los enfermos (22.22%), siendo también bajos respecto al grupo control (25.55 %).

También esto se pone de manifiesto al calcular Riesgo Relativo , tanto por la fórmula de WOLFF como por la de BENGTSSON-THOMSON, dando valores más bajos y negativos en sujetos sanos (0.46 y - 0.15) que en los enfermos con brucelosis (0.83 y - 0.04). Por lo que analizar estos datos observamos una asociación negativa del antigeno CW2 con la enfermedad, lo que apoyariamos la asociacion de la enfermedad con el Locus C, actuando como protector.

Una vez analizado los resultados nos parece intersante una reflexión respecto a la metodologia utlizada hasta ahora.

En primer lugar, la variación en el número de cada muestra, por muy pequeña que sea, puede modificar algo de forma errónea la interpretación de los resultados. Asi por ejemplo, los resultados obtenidos con la misma enfermedad, en el mismo grupo racial, variara de un trabajo a otro, sólo con que las muestras sean diferentes.

En segundo lugar, que el grado de asociación entre un determinado gen y una enfermedad es mejor cuatificado realizando el cálculo por la fórmula de BEGTSSON-THOMSON, en lugar de la utilizada por WOLFF (Riesgo Relativo).

Una vez conocido la existencia de un marcador que nos indica la alteración de un determinado Locus, el siguiente paso debe ser desequilibrio genético o desequilibrio de enlance entre alelos de diferentes Locus.

El objeto es determinar si la población estudiada ( Familias con brucelosis) se encuentra en desequilibrio genético producto de una selección natural ( en este caso motivado por un agente externo). También puede utilizarse para saber si un antigeno marcador se encuentra asociado con antigenos de otro Locus, lo que explicaria la heterogenidad genética en esta enfermedad.

El concepto de desequilibrio de enlance es importante para comprender el sistema HLA y su asociación con las enfermedades. Un antigeno concreto que sea frecuente en ciertas enfermedades no presenta a veces en si mismo el gen que produce la enfermedad. Puede constituir únicamenente un marcador de proximidad al gen que produce la enfermedad, con el cual está en desequilibrio de enlance.

En primer lugar observamos desequilibrio de enlance con signifiación estadistica entre alelos de diferentes Locus, es decir que estos alelos aparecen juntos con una frecuencia superior a la que corresponderia al azar. Pasamos a comentarlos de forma separada y detallada, para ir sacando conclusiones.

En las familias observamos las siguientes asociaciones estadisticamente positivas (Tablas XXVIX a XXVIX-d):

A1B8 con un grado de asociacion (~) = 15 , valor P=0.00000317 y una frecuencia de haplotipo (H) = 21; A1B17 ( ~ = 8, H= 10 y valor de P= 0.000445) , A2 B21 ( ^ = 22, H = 45, P = 0.0006); A3 B35 ( ^ = 19, H= 35, P= 0.0004); A24 B13 ( ^ = 10, ^ = 12, P= 0.0000155); A28B14 (^ = 8, H= 9, P = 0.00016), A29 B44 ( ^ = 8, H= 22, P= 0.00000143), B27 CW1 ( ^ = 21, H= 25, P= 0.00000007), B40 CW3 ( ^ = 19, H= 20, P = 0.00000007), B35 CW4 (^ = 13, H = 35, P = 6 x $10^{-14}$), B13 CW6 ( ^ = 8, H= 9, P = 0.0000091) y B15 CW6 ( ^= 2, H = 3, P = 0.0197).

Observamos un elevado desequilibrio entre alelos de los Locus A y B . Al comparar nuestros resultados con La Población Española y con la Población Causasoide resentada en el 9° Workshop ( BAUR. 1984) en familias sanas, coinciden los Haplotipos A1 B8, A1 B17 y el A2 B21 con la población Española y el A3 B35, A29 B44 con el otro estudio.

En definitiva, estos desequilibrios positivos son explicables no solo por pertenecer al mismo grupo étnico ( ya que la frecuencia de genes difiere de una población a otra), sino también y por la baja tasa de recombinación que mantienen estos Locus.

El que no coincidan todos los haplotipos en las dos poblaciones que hemos utilizado para esta comparación, aunque pertenezcan al mismo grupo étnico, creemos sigue siendo debido al número de las muestras.

El haplotipo A2 B21, al tener la presencia del A2, marcador de la brucelosis en nuestro estudio, aunque se podría considerar que esta asociación es producida por una selección natural debido a la enfermedad, nosotros no lo valoramos por el factor racial comentado anteriormente, así como por la baja tasa de recombinación que existe entre estos Locus, que explicaría por sí solo su presencia.

El resto de los haplotipos que no coinciden con la población general: A29 B44, A30 B8, A24 B13, Y A28 B14 están formados por antígenos que son "splits", y cada "split" puede unirse a otro Locus, por lo en principio no valoramos estos desequilibrios como asociados a la enfermedad brucelar.

Entre los Locus B y C los desequilibrios de enlace fueron los haplotipos B27 CW1 Y B35 CW4, estando ambos presentes en la población general, siendo también explicable por estar muy próximos estos dos Locus.

Un hecho destacable es que nosotros tampoco hemos observado desequilibrios de enlances significativos entre los alelos de estos Locus A y C, coincidiendo por tanto con la

Poblacion Española y por el estudio realizado por BAUR.

Al realizar el estudio del desequilibrio de enlance y de la frecuencia del haplotipo en los familiares sanos, se mantienen aproximadamente los mismos valores que han sido ya comentados anteriormente.

Los mismos razonamientos pueden ser aplicados a estos desequilibrios, ya que este grupo está formado por sujetos sanos y que al corresponder a un mismo grupo racial es prácticamente homogéneo a los grupos empleados para el estudio de población.

Al analizar los haplotipos en los enfermos con brucelosis, nos llaman la atención varios hallazgos que nos parecen muy interesantes, como son por una parte que algunos haplotipos no aprecen en estos enfermos, como es el caso de los A24 b15, Y A28 B14, o bien como otros haplotipos que son más frecuentes ( A29 B44 , A24 B13 y B40 CW3), en los enfermos que en los sanos de las distintas familias.

Los haplotipos " brucelares" más frecuentes son el A29,B44,CW- y el A10,BW41,CW2, estando al menos uno de los 2 en (16%) en los enfermos. Consideramos haplotipos "brucelares" aquellos que solo estan presentes en los enfermos.

De estos dos haplotipos, nosotros consideramos al A29,B44,CW - más asociado a la enfermedad, ya que la medida de la asociación es más elevada en este haplotipo ( $D_a$ = 0.89) que el A10,BW41,CW2 ($D_a$ = 0.5).Otra observación en el haplotipo A29,B44,CW- sobre la nos basamos para considerarlo asociado a la brucelosis es el hecho relevante de que el segmento incial aparece en los sujetos sanos pero asociado al antigeno CW4, lo que nos hace suponer que este antigeno podria actuar como protector de la enfermedad brucelar.

Este hecho no haria más que presuponer que el Locus C estaria en asociación con la brucelosis, pero con un efecto protector, y en el que sus especificidades solamente haria de marcador de este Locus, como en el estudio de PAULE SASTRE (1985), siendo el antigeno CW2 el marcador del Locus C, encontrando uan frecuencia fenotipica baja en los enfermos con brucelosis ( 4.71 % ) frente al 25.75 del grupo control con una $p \leq 0.0000084$.

Esta hipótesis no aparece aislada en la revision bibliográfica revisada. CHEERS y col, en 1980, habian observado diferencias importantes en la capacidad de resistencia a la infección por la Brucella entre diferentes cepas de ratones y por tanto con diferentes haplotipos H-2.

En esta linea, HO y col, en 1982, indicaron que la resistencia que mostraban los ratones a la infección crónica

por Brucella abortus estaba en relación con el fenotipo del donante de la médula ósea que le habia sido previamente trasplantada.

En la misma dirección, apuntan los trabajos de OTH y col en 1978, en los que indican que en el ratón la esplenomegalia y las moficaciones de la actividad siguiente a la inyección de B. abortus muertas, estaba influenciada por el haplotipo H-2.

Por último se ha realizado un estudio de la segregación de los haplotipos entre los pacientes con brucelosis, no existiendo una disgregación entre los genes,por lo que se encontrarian en equilibrio genético. El estudio de haplotipos compartidos en parejas de hermanos no demostraron la herencia de algún gen relacionado con la brucelosis (Tabla XXXIII).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por ALARCON y col,en 1985 al estudiar 8 familias con más de un afectado con brucelosis producido por B. melitensis, no observando diferencia significativa entre la frecuencia obtenida y la esperada.

Con nuestro trabajo concluimos, aunque no queda cerrado, una linea de investigación para encontrar un marcador genético en la brucelosis. En un principio se intentó relacionar con las manifestaciones articulares, abandonándose practicamente esta hipótesis, ante los diferentes resultados

obtenidos. Con posterioridad se buscó algún antigeno relacionado con la brucelosis pero considerándola como enfermedad infeciosa, apareciendo ya una asociación al Locus C, que fué interpretado como protector de la enfermedad.

Nuestra investigación ha sido original porque se ha realizado, no solo el estudio de un antigeno, sino la relacion de varios alelos de distintos Locus, ya que actualmente el concepto de haplotipo y el de desequilibrio de enlace tiene actualmente más valor para el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad,puesto que un antigeno solamente es el indicador de una region del cromosoma, que es donde radicaria la alteración.

En este estudio por tanto, y ante los datos obtenidos podemos considerar varios hechos. El primero, la observación de un marcador genético común de a enfermedad en ambiente familiar y que es distinto al de la poblacion general, seria el antigeno A2.

En segundo lugar, se necesitaria un sinergismo, al menos entre dos locus,para que se originara una alteración en la respuesta inmunune que pudiera explicar la patogénesis de la enfermedad. En nuestro estudio, se ha producido entre Locus A y B, de ahi el desequilibrio de enlance entre alelos de estos dos locus por una selección natural, como es el caso de nuestro

haplotipos brucelares A29,B44, y A10, BW41,. Pero a pesar de este sinergismo entre locus, si aparece un antigeno protector no se desarrollaria la enfermedad. En nuestro tarabajo vuelve apararecer antigenos del Locus C.

En tercer lugar no hay una disgregación al azar de los genes ni tampoco hay haplotipos identicos entre parejas de hermanos.

Por por todo lo anterior, consideramos a la brucelosis como una enfermedad heterogénea y multifactorial. Desde el punto de vista genético multialélica y con una expresividad variable,lo que explicaria en gran medida el polimorfismo clinico de la enfermedad, necesitando además la implicación de los factores externos para el desarrollo de la enfermedad,lo que explicaria la mayor incidencia en el ambiente familiar, siendo el sistema HLA únicamente un factor más a tener encuenta.

## E.- CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

1ª.- Hemos observado una ausento significativo de la frecuencia del antigeno HLA-A2 en el grupo de las Familias con respecto al grupo Control.

2ª.- No encontramos diferencias significativas en la frecuencia del antigeno HLA-B27, ni en ninguna otra especificidad del Locus B al comparar cada uno de los grupos con el Control.

3ª.- Hemos observado desequilibrios positivos de asociación entre alelos de los locus A y B en el grupo de las Familias con brucelosis comparándolas con la Población Caucasoide sana.

4ª.- El haplotipo A29 B44 se encuentra en desequilibrio y con una frecuencia mayor en los enfermos con brucelosis con respecto a la Población Caucasoide. Interpretamos este sinergismo de alelos entre los Locus A y B como factor genético de susceptibilidad a padecer la brucelosis.

5ª.- No existen desequilibrios positivos de enlace entre los Locus A y C en los grupos estudiados respecto a la Población General.

6ª.- Hemos observado una asociación negativa de las especificiadades del Locus C entre los grupos estudiados y el grupo Control (calculado por la fórmula

de BENGTSSON-THOMSON). Consideramos que el efecto protector para la brucelosis puede radicar en el Locus C.

7ª.- En los enfermos con brucelosis los haplotipos formados por alelos de los Locus A, B y C son el A29 B44 CW- y el A10 BW41 CW2 son los más frecuentes.

8ª.- Pensamos ante los datos de este trabajo, que el sistema HLA por si sólo no lo podemos considerar como único factor de susceptibilidad al padecimiento de la brucelosis en el ambiente familiar, necesitando la implicación, entre otros, de factores ambientales para el desarrollo de la enfermedad.

F.- RESUMEN.

RESUMEN

Los genes de la región HLA ( brazo corto del cromosoma 6) controlan una variedad de funciones que afectan a la respuesta inmune, influyendo en la susceptibilidad de muchas enfermedades.

El propósito de este trabajo es el estudio de la asociación HLA-Brucelosis, con el fin de encontrar un marcador genético que indicara susceptibilidad o resistencia a padecer la enfermedad, asi como su influencia en el ambiente familiar donde es más frecuente la brucelosis.

Se tiparon antigenos de Clase I a 27 enfermos con brucelosis y a 65 familiares, pertenecientes a 20 familias , para 16 especificidades antigénicas del Locus A, 25 para el Locus b y 8 para el Locus C.Para ello fué utilizada la técnica de microlinfocitotoxicidad mediada por complemento. Las especificiades fueron definidas en el 9º WORSKSHOP.Se realizó el mismo tipaje a 274 sujetos sanos considerados como grupo Control

Se han determinado y estudiado los siguientes parámetros: frecuencias fenotipicas, génicas y de haplotipos, desequilibrio de unión entre alelos de diferentes Locus, riesgo relativo, segregación de haplotipos entre los miembros de las familias y los haplotipos compartidos en parejas de hermanos. Se han analizado los resultados con los métodos adecuados a cada planteamiento.

Se ha observado un aumento de la frecuencia del antigeno HLA-A2 significativo en el grupo de las Familias, un sinergismo entre los Locus A y B, reprentado por la asociación positiva de los antigenos que forman los haplotipos A29 B44 y A10 Bw41 en los enfermos con brucelosis, una asociación negativa de las especificidades del Locus C con la enfermedad. No se ha observado una la alteración de la distribución de genes diferente de la que ocurriria al azar.

Consideramos que la influencia del sistema HLA en la predisposición de la brucelosis es multialélica. Los haplotipos formados por antigenos de los Locus A y B (A29 B44, A10 BW41) estarian asociados a la enfermedad mientras que en Locus C radicaria el efecto protector. El sistema HLA no es el único factor de susceptibilidad al padecimiento de la brucelosis en el ambiente familiar, necesitando, entre otros, los factores ambientales para el desarrollo de la enfermedad.

## 6.- BIBLIOGRAFIA.

AHO, K. et al. (1974). HI-A 27 in reactive arthritis: a study of Yersinia arthritis and Reiter's disease. Arthr. and Rheuma., 17, 521.

AHVOVEN, P.: SIEVERS, K. (1969). Arthritis associated with Yersinia enterocolitica infection. Acta Rheumatol. Scand., 15, 232-253.

AL-ARIF, L.I. et al (1979). HLA-Bw 15 and tuberculosis in a North American black population. Am. Rev. Resp. Dis., 120, 1.275-1.278.

ALARCON, G.S. et al. (1981). Reactive Arthritis Associated with Brucellosis: HAL Studies. J. Rheumatol. 8, 621-625.

ALARCON, G.S. et al. (1985). HLA studies in brucellar spondylitis. Clin. Rheumatol., 4, 312-314.

ALARCON, G.S. et al. (1985). Familial studies in human brucellosis. Tissue Antigens, 26, 77-79.

AMIEL, J.L. Study of leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. Histocompatibility Testing 1967. Mundksgaard, Copenhagen. pp. 79.

ANDONOPOULOS, A. et al. (1986). Brucella Arthritis. Scan. J. Rheumatology, 15, 377-380.

ARIZA CARDENAL, J. et al. (1983). Current antimicrobial treatment of brucellosis. Med. Clin.81, 870-876.

ARIZA, J.(1984). Brucelosis 1984. Med. Int., 2, 113-1648.

ARIZA CARDENAL, J. (1985). Brucelosis 1985. Med. Clin. (Barc) 86 60-62.

ARNETT, F.C.; MC CLUSKY, O.E.; SHECTER, B.Z.(1976). Incomplete features and HLA 27 in diagnosis. Ann. Intern. Med., 84, 8-12.

ARNETT, F.C. (1987). (1987). Genes HLA y predisposición a las enfermedades reumáticas. Hospital Practice , 2, 7-15.

ASHA KAPADIA, M. D. et al. (1974). Familial Herps Simplex Infection with Activation of the Complement System. Am. J. Med., 67, 122-126.

BENGTSSON B.O; THOMSON,G. (1981) A new measure estimating the strength of associations between HLA antigens and diseases. Tissue Antigens, 18, 356-363.

BERGLÖFF F.E. (1963). Arthritis and intestinal infection. Acta Rheuma Scand.,9, 141-149.

BERTRAND, A. et al. (1980). Le traitement antibiotique de la brucellosa a la clinique des maladies infectioses de Montpellier de 1960 a 1980. 2 and. Mediterranean Congress Chemotherapy. pp 37-43.

BALCELLS GORINA,A.; ROTES QUEROL, A. (1971). Lesiones osteoarticulares de la brucelosis. Ponencia a la IX Reunión de la Sociedad Española de Medicina Interna. pp. 25-28.

BALE, M. et al. (1982). HLA antigens in leprosy patients. Tissue Antigens. 20, 141-143.

BAQUERO GIL, G. (1970). Causas del frecuente error serodiagnóstico de la fiebre de Malta. Rev. Diag. Biol., 20, 189-196.

BAUR, M.P.; NEUGEBAUER, M.; ALBERT, E.D. (1985). Reference Tables of Two-Locus Haplotype frecuencies for All MHC Marker Loci. En: Albert, E.D et al. Histocompatibility Testing 1984. New York, Springer-Verlag, pp. 677-691.

BENACERRAF, B.; McDEVITT, H. (1972). Histocompatibility-Linked Immune Response Genes. Science, 175, 273-279.

BERLE, E.J.(1980). Recurrent herpes labialis and HLA. In: Terasaki P.I, Histocompatibility Testing.. Los Angeles. UCLA Tissue Typing Laboratory. 328-329.

BOTAZZO, G.F. et al. (1980). Complement-fixing islet-cell antibodies in type -diabetes: possible monitors of active beta-cell damage. Lancet, 1, 668-672.

BOTAZZO, G.F. et al. (1985). Hypotesis: role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in the induction of endocrine autoimmunity. Lancet, 2, 1.115-1119.

BREWERTON, D.A. et al. (1973). Reiter's disease and HL-A 27. Lancet, 2, 996.

BREWERTON, D.A. et al. (1973). Ankilosing sponylitis and HL-A 27. Lancet, 1, 904-907.

BREWERTON, D.A. et al. (1973). Acute anterior uveitis and HL-A 27. Lancet, 2, 994.

BREWERTON, D.A. et al. (1974). HL-A 27 and the artropaties associated with ulcerative colitis and psoriasis. Lancet, 2, 956.

BUSCH, L.A,; PARKER, R.L. (1972). Brucelosis in the United States. J. Infect. Dis., 125, 289-284.

CANNAT, A.; SERRE,A. (1984). Genetic factors involved in murine resitance to experimental brucellosis. Dev. Biol. Stand., 56, 307-313.

CEPELLINI, R. et al. (1967). Report of a conference and Workshop hel at Torino and Saint-Vicent. Histocompatibily Testing. Ed. Munksgaard. Copenhagen; 149.

COLMENERO, J.D. et al. (1983). Brucelosis: estudio propectivo de 100 casos. Med. Clin.(Barc), 86, 43-48.

CONDE YAGUE, R. et al. (1981). Brucelosis: estudio basado en una serie de 18 pacientes. Rev. Cli. Esp., 161, 335-338.

CONTU, L. et al. (1982). HLA haplotype study of 53 juvenile insulin-dependente diabetic (I.D.D.) families. Tissue Antigens, 20, 123-140.

CORBEL, M.J.; BRINLEY-MORGAN, W.J.(1984). Genus Brucella. En: NR. Krieg,Bergey's. Manual of sistematic bacteriology. Wildins,Baltimore, Vol 1, 9ºed. 377-378.

CORTINA GREUS, P; (1973).Estudio epidemiológico de la brucelosis en Valencia. Rev. San. Hig. Pública, 47, 685-716.

CUDWORTH, A. G.; WOODROW, J.C. (1975). Evidence for HL-A-linked Genes in "Juvenile" Diabetes Mellitus. Br. Med. J., 3, 133-135.

CUETO, A. et al. (1983). Epidemilogía de brucellosis. Infectologika, 4, 61.

CUISINIER, Y. et al. (1982). Pericarditis en el curso de la brucelosis. Nov. Pres. Med., 11, 43-46.

CHEERS, C. et al. (1980). Macrophage activation during experimental murine brucellosis. Do macrophage exert feedback control during brucellosis?. Cell. Immunolol., 49, 168-177.

DAVIES, N.E.; HAVERTY, J.R.; BOATWRIGGHT M. (1969). Reiter's disease associated with shigellosis. South. Med. J., 62, 1.011-.10114.

DAWES, P. T.; GHOSH, K. (1985). Tissue typing in brucellosis. Ann. Rheum. Dis., 44, 526-528.

DAZA, R.M.; DAMASO, D.; MORENO, M. (1981). Estudio comparativo de diversas pruebas en el diagnóstico serológcio de la brucelosis. Med. Clin., 76, 57-60.

DE VRIES, R.P. et al. (1976). HLA-Linked genetic control of host response to Mycobacterium leprae. Lancet, 2, 1.328-1.330.

DE BROES, R.P. et al. (1891). HLA-linked control susceptibility to tuberculoide leprosy and asociation with HLA-DR types. Tissue Antigens, 16, 294-304.

DERHAAG, P.J. et al. (1988). A familial study of the inheritance of HLA-B27 positivite acute anterior uveitis. Am. J. Ophtalmol., 105, 603-606.

DIAZ, R. et al. (1986). Surface antigens of smooth brucellae. J. Bacteriol., 96, 893:901

DIAZ, R.; BOSSERAY, A. (1973). Identification d'un composé antigenique specifique de la phase ruguese (R) des Brucella. Ann. Rech. Vet., 4, 283-292.

DIAZ, R. (1977). Valor de la prueba de rosa de Bengala y la demostración de anticuerpos anti-proteina de Brucella en el diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis. Med. Clin. (Barc). 63, 463-466.

DICK, H.M. (1978). HLA and disease: Introductory review. British Med. Bull., 34, 271.

ECKMAN, M.R. (1975). Brucellosis: linked to Mexican Cheese. J. Am. Med. Ass., 232:636.

EDWARD, J.M. (1975). Brucellosis outbreak atributed to ingestion of unpasteurized good cheese clinical features,. Arch. Inter. Med., 135, 240-245.

ERCILLA, M.G.; CAÑETE, J.D. (1988). El sistema HLA en las enfermedades reumáticas. Medicine (Madr.), 20, 841-847.

FALD, J.A. et al. (1973). A study of HLA-A antigen phenotype in rheumatic fever and rheumatic hear disease patients. Tissue Antigens, 3, 173-178.

FLYNN, M.P. (1983). How does brucella abortus infect human beings?. Lancet, 2, 1.180.

FOZ, A. (1981). Brucelosis. En: Foz, A. Drobnic, L. Gudiol, F. Patologia infecciosa básica. Enfermedades bacterianas. Madrid, Idepsa, pp 270-284.

FREUDENBERG, J. et al.(1977) HLA in different formes of chronic active hepatitis. Digestion, 15, 260-270.

GALLART, T.; VIVES, J. (1988). Complejo principal de histocompatibilidad humano o sistema HLA. En: Farreras, P.; Rozman, C. Medicina Interna. Barcelona, Doyma, Volumen II, pp. 2.453-2461.

GARCIA SAN MIGUEL, J. (1988). Brucelosis. En: Farreras, P.; Rozman, C. Medicina Interna. Barcelona, Doyma, Volumen II, pp. 2.090-2.096.

GECZY, A.F. et al. (1980). Characterization of a factor(s) present in Klebsiella culture filtrates that specifically modifies an HLA-B27 associated cell-surface component. J. Exp. Med., 152, 331-340.

GILBERT, G.L. et al. (1980). An epidemilogical survey of human brucellosis in theree victorian abattoirs. Med. J. Aus., 17, 482-486.

GOMEZ AGUDO, G. et al. (1982). Brucellar hepatic abcess. Rev. Clin. Esp., 165, 211-214.

GORODEZKY, C.; ULLOA, L.; ESCOBAR-GUTIERREZ, A.(1977). HLA antigens and rheumatic heart disease in Mexico. J. Rheumatol. (suppl), 4, 112.

GOTUZZO, E. et al. (1987). Brucellar arthritis: a study of 39 Peruvian families. Ann. Rheum. Dis., 46, 506-509.

GRANGE, D. et al. (1984). Linkage Between HLA-A, C, B, Bf and DR Alleles: Haplotytpe Study of Healthy Families by Factorial Correspondence Analysis. En: Albert, D. et al.

Histocompatibility Testing 1984. New York, Springer-Verlang, pp 326-329.

GREENBERG, L.J.; GRAY, E.D.; YUNIS, E.J. (1975). Association of hl-A5 and inaune responsiveness in vitro to strptococcal antigens. J. Exp. Med., 141, 934-935.

GRIFFITHS, P.; CLARKE, C.; RICHARDS, M. (1980). Family outbreak of rkublle with encephalopathy occuring in sibling with maternal HLA crossover. Lancet, 1, 1.143.

GUTIERREZ, A. et al. (1982). In vitro activity of N-feraimidoyl thienamicin against 98 clinical isolates of Brucella melitensis compared whith those of cefoxitin, rifampicin, tetracycline and cotrimoxazole. Antimicrob. Agents Heomother., 21, 501-503.

GWYNN, M.; ROLINSON G.N. (1980). Bactericidal action of amoxycilllin alone and combined with gentamicin an rifampicin against Brucellla melitensis. J. Infect., 2, 61-65.

HALDANE, J.B.S. (1956). The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. Ann. Hum. Genet., 20, 309-311.

HALL, W.H.; HANNION R.E. (1978). In vitro suceptiblity of brucella to various antibiotica. Appl. Microbiol., 20, 600-604.

HO, M.; CHEERS, C. (1982). Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection IV. Genetic and cellular basis of resistance to chornic infecction with Brucella abortus. J. infect. Dis.,146, 381-387.

HONDIKA, L. et al. (1979). HLA-B27 associated spondyloarthritis in chronic brucellosis. Lancet, i, 499.

HUNTER, SB. et al. (1986). Enzyme-linked inmunosorbent assay in the laboratory diagnosis of brucelosis. J. Clin. Microbiol., 24, 566-572.

INGRAM, D; BLOCH,R.F. (1984). Statistical Methods in Human Genetics and Inmunology. En: Ingram,D ; Bloch, R.F. Mathematical Methods in Medicine. John Wiley y Sons Ltd, pp. 161-223.

IVANYI, P. (1988). Los subtipos HLA-B27 y la espondilitis anquilosante. Rev. Esp. Reumatol., 15, 1-4.

KHAN, M. A. et al. (1983). Study of HLA antigens in familial and sporadic rheumatoid arthritis. Tissue Antigens, 21, 35-38.

KHAN, M. A. et al. (1987). HLA DR4 and B27 Antigens in Familial and Sporadic Rheumatoid Arthritis. Scand. J. Rheumatology. 16, 433-436.

KASLOW, R; COLIN,A.; SIMON, D. (1980). Reiter's syndrome and reactive arthritis following Salmonella heidelberg gastroenteritis. Arthritis Rheum., 23, 702.

KASLOW, R.; SHAW, S. (1981). The role of Histocompatibility Antigens (HLA) in infection. Epidemiol. Reviews, 3, 90-114.

KEAT,A.C. (1983). Reiter's syndrome and reactive arthritis in perspective. N. Engl. J. Med. 309, 1.606-1615.

KISMEYER, NIELSEN F. Histocompatility Testing. 1975. Ed. Munksgaard. Copenhagen.

KOCCOGLU, T. et al. (1986). Lymphocyte population and T Lymphocyte susbsets in brucellosis analized by monoclonal antibodies. Mickrobiyol. Bul., 20. 221-229.

LAL, S. et al. (1970). Acute brucellosis treated with trimetoprim and sulphamethoxazole. Br. Med. J., 3, 256-257.

LE-GARREC, Y.; GARRIDO-CALDERON, M.; PILET, C. (1976). Influence of the mouse genotype on the sensitivity to Brucella abortus 544. Dev. Bio. Stand., 31, 287-292.

LOPEZ-LARREZ, C; BOOTELLO, A.; ARNAIZ-VILLENA, A. (1981). Linkage of GLO with HLA in a Sample of the Spanish Population. Hum. Genet., 57, 317-320.

MACKAY, I.R.; TAIT, B.D. (1980). HLA associations with autoimmune-tipe chronic heptitis: identification of B8-DRw3 haplotype by family studies. Gastroenterology, 79, 955-98.

MAGEE, J.T. (1980). An enzyme-labelled inmunosorbent assay for Brucella abortus antibodies. J. Med. Microbiol., 13, 167-172.

MENSER, M.A. et al. (1974). HL-A antigens, and congenital rubella. Lancet, 2, 1508-1509.

MARTINEZ NAVARRO, J.F. (1978). Estudio epidemilógico de la brucelosis en España. Rev. San. Hig. Pública, 52, 1177-1230.

MATTIUZ, P. L. et al. (1970). New approaches to the population genetic aand segregation analysis of the HLA systema. En: Terasaki. Histocompatibility Testing 1970. Baltimore. Williams and Wilkins Company, pp. 197-203.

McDEVITT, H; BODMER, F. (1974). HL-A, Immune-Response Genes, and Disease. Lancet, ii, 1.269-1.275.

McDEVIT, H.O.(1980). Regulation of the Inaune Response by the Major Histocompatibility Systen. N. Eng. J. Med., 25,1514-1517.

McDEVITT,H.O.(1986). El sistena HLA y su relación con la enfernedad. Hospital Practice, (Ed. Esp.) 1, 93-107.

MEDARDE FERNANDEZ, A. et al. (1972). Brucellosis and blood donors. Rev. San. Hig. Pública, 53, 829-835.

MEZQUITA LOPEZ, M. (1971). Aspectos sanitarios de la brucelosis husana en España. Rev. Esp. Hig. Pública, 45, 355-359.

MICOUD, M. (1844). Trataniento de la Brucelosis. Med. et Hyg., 42, 8056-814.

MIDDLETON, D.; SLEATOR, C.; MILLIKEN, T. (1988). Frequency of human lymphocyte antigens in patients with brucellosis (letter). J. Infect., 16, 207-208.

MORGAN, W.J.B.(1.982). Brucella abortus. En : Blober,H.; Schiliber, T.H. Handbuch der badeteriellen infectionen. Stuttgar, Verlag, IV, pp. 53-213.

MORTON, N. E. et al. (1983). Estination of haplotype frequencies. Tissue Antigens, 22, 257-262.

NAVAL, J.L. (1985). Un reto a las profesiones sanitarias. La Brucelosis. Prev. San. Ac., 13, 16-18.

OHNO, S. et al. (1973). HLA-5 and Behçet's disease. Lancet, 2, 1383.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD.(1971). Serie de Inf. Tec. 464. Comité Mixto FAO/OMS de Espertos de en Brucelosis. V Informe. Ginebra.

OTH, D; SABOLOVIC, D. (1978). Further studies on the H-2 linkage dependence of the adjuvant action of Brucella abortus. Immunology, 34, 807-814.

PANDOLFO, G.P.; VILLEGAS, C. (1970). Tratamiento de la brucelosis con rifampicina. Diag. Médico, 42, 215-220.

PAREJA, E. et al. (1985). HLA Antigens in Brucellosis. Immunogenet., 2, 1-3.

PAULE SASTRE, P. (1985). Antigenos de Histocompatibilidad de Clase I y II y Brucelosis. Tesis Doctoral. Univsersidad de Granada. Facultad de Medicina.

PAYNE R., ROLFS M.R. (1958). Fetomaternal leucocyte incompatibility. J. Clin. Invest. 1958; 37: 1756.

PETUKHOV, V. L. (1981). Genetic problems of cattle resistance to brucellosis. I. The age of having the disase, the paternal influence and strain affiliation in the incidence of brucellosis morbiditky. Genetika, 17. 1.080-1.087.

PHILIPPON, A.; KAZMIEREZAK, A. Rifampicine et tetracycline dans la traitment de la brucellose experimentale de la souris. Ann. Inst. Pasteur, 123, 123: 459-462.

PIEDROLA ANGULO, G.; GALVEZ VARGAS, R.; MAROTO VELA, M.C. Brucelosis. Epidemiología y Medicina Preventiva. Importancia actual del problema en España. Lucha Antibrucelosica. En; Pumarola Busquets,A. Medicina Preventiva y Social. Higiene y Sanidad Ambiental. Madrid, Amaro,6° ed., pp. 773-785.

PIETSCH, M.C.; MORRIS P.J. (1974). An assciation of HL-A3 and HL-A7 with paralytic poliomyelitis. Tissue Antigens, 4, 50-55.

PINEDO SANCHEZ A.; RUBIO PARRAN, V.; SANCHO GARCIA E. (1978). La brucelosis en la provincia de Ciudad Real: caracteristicas epidemiológicas y sociales. Rev. San. Hig. Pública, 52, 919-932.

RAY, J. et al. (1976). NIH lymphocyte microcytotoxicity tecnique. En: Ray, et al. Manual of tissue typing techniques 1976-1977, DHEW publication N°77-545, pp. 22-24.

REGUEIRO, J. R.; ARNAIZ-VILLENA, A. (1987). Human MHC Class III (Bf, C2, V40 genes and GLO: their association with other HLA antigens and extended haplotypes in the Spanish population. Tissue Antigens, 31, 14-25.

REIS, P. et al. (1974). HL-A antigens in leprosy. Lancet.2, 1.384.

RICHARDSON, M.; HOLT, J.N. (1962). Synergistic action of strptomycin with other antiobiotics on intracelular " Brucella abortus in vitro". J. Bacteriol., 84, 638-646.

RICO IRLES, J.; SALAZAR ALONSO-VILLALOBOS, V. (1977). Brucelosis. En: PELAEZ REDONDO J., y cols. Patologia Médica. Madrid, Paz Montalvo, Volumen II, pp. 523-528.

RIVERA-PEREZ, L. et al. (1979). Brucellosis in the provincial hospital of Alicante. Review of 90 cases. Rev. Clin.Esp., 153, 97-102.

RIVERO-PUENTE, A. cols. Brucellosis: study of 222 cases.Clinical aspects of acute brucellosis. Rev. Clin. Esp., 166, 59-63.

RODRIGUEZ MARTIN, A. (1986). Estudio epidemiológico de la brucelosis en la provincia de Granada. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

RODRIGUEZ TORRES, A. (1984). Brucella. En : Pumarola, A. et al. Microbiologia y Parasitologia Mèdica. Barcelona, Salvat, pp. 462-468.

RODRIGUEZ TORRES, A.; FERMOSO GARCIA, J. (1987). Brucelosis. Medicine (Madr.), 76, 3165-3177.

RODRIGUEZ TORRES, A. (1988). Diagnóstico de la brucelosis humana. Rev. Esp. Reumatol., 15, 204-214.

RODRIGUEZ ZAPATA, M. et al. (1985). Evaluación de dos Regimenes Diferentes en el Tratamiento de la Brucelosis: Rifampicina-Doxiciclina vs.Estreptomicina-Doxiciclina.Resultados preliminares. N. Arch. Med., 43, 171-175.

ROTES-QUEROL,J. (1957). Osteo-articular sites of brucellosis. Ann. Rheum. Dis., 16, 63-68.

ROUX, J.; SRRE, A. (1971). Prophylaxie indiduelle et vaccination contre les brucelloses humains por une fraction antigenique de brucella melitensis. Complexe proteines glyconsaminopeptides. Rev. Epidem. Med. Sante. Publ., 503-516.

ROUX, J.; OBERTI, J. (1975). Effects des associations d'antibiotiques sur la penetration intracellulaires de chlortetracycline. Patho. Biol., 19, 596-605.

SAIZ, C. et al. (1984). Estudio Epidemilógico de la brucelosis en Valencia (1973-1884). Salud Publica, 184-188.

SALAM, E.A: ISHAAC, S.; MAHMAUD A.F.(1979). Histocompatibility-linked susceptibility for hepasplenomegaly in human schistosomiasis mansoni. J. Inmunol., 123, 1829-1831.

SANCHEZ RODRIGUEZ, A. et al. (1983) Retrospective study of 100 cases of Malta fever. Clinical and therpautic evaluation related to an established protocol. Rev. Clin. Esp.,16, 25-31.

SANZ CALLEJAS, M. (1972) Situación actual de la brucelosis animal en Cataluña. An. Col.Of. Vet., 29, 5-19.

SAZAZUKI, I. et al. (1979). HLA and acute poststreptococcal glomerulonephritis. N. Engl. J. Med., 301, 1184-1185.

SELBY, R. et al. (1978). Tuberculosis asscoiated with HLA-B8, BfS in Newfoundland community study. Tissue Antigens, 11, 403- 408.

SHIGAEVA, M.L. (1979). Effect of heredity on cattle morbidity from brucellosis. Tsitol. Genet., 13, 216-220.

SKIRROW, M.B. (1977). Campylobacter enteritis: a "new" disease. Br. Med.J., 2, 9-11.

SNELL,G.D. (1968). The H-2 locus of the mouse: observation and speculactions concerrning its comparative genetics and its polimorphisms. Folia Biol. (Praha), 14, 335-358.

SPENCER, M.J. et al. (1976), HL-A antigens and antibody response after influenza a vaccination. N. Engl. J. Med., 249, 13-16.

SPINK, W. W. (1954). Family studies on brucellosis. Am. J. Med. Sci., 222, 128-133.

SPINK, W.W.; HALL, W.H.; MAGOFFIN, R.(1955). Follow-up study of therapty in forty-eight culturallyproved case of brucellosis. Arch. Inter. Med., 88, 419-432.

STANTIC-PAVLINIC, M.; CEC, V.; MEHLE, J. (1983. Brucellosis in spouses and the posibility of interhuman infection. Infection, 11, 313-314.

STASNY, P. (1974). Mixed lymphocyte culture typing cells from patients whith Rheumatoide Arthritis. Tissue Antigens, 4, 571.

STASTNY, P. (1980). Rheumatoid arthritis. En: Terasaki. Histocompatibility Testing. Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, pp. 673-680.

SVEJGAARD, A. et al. (1974). HLA antigens and disease satistical and genetical considerations. Tissue Antigens., 4, 95-105.

SVEJGAARD, A. et al. (1975). HL-a and disease asociations. Tranplant. Rev., 22, 3-43.

SVEJGAARD, A.; PLATZ, .P; RYDER, L. (1980). Insulin-depedent diabetes mellitus. En: Terasaki. Histocompatibility Testing. Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, pp. 638-656.

SVEJGAARD, A. et al. (1981). HLA in Rheumatology. J. Rheum., 8, 541-546.

SVEJGAARD, A.; PLATZ, P.; RYDER, L.P. (1984). HLA and disease 1982. A survey. Immunological Rev., 70, 193.

TAKATA, H. et al. (1978). HLA andmycobacterial infctions: increased frequency of B8 in Japanese leprosy. Tissue Antigens, 11, 61-64.

THAPAR, M. K.; YOUNG, E. J. (1986). Urban outbreak of goat cheese brucellosis. Pediatr. Infect. Dis., 5. 640-643.

THOMSON, G. (1988). HLA Disease Associations. Ann. Rev. Gen. 23, 31-50.

URMAN, J.D.; ZURIER, R.B.; ROTHFIELD, N.F. (1977). Reiter's syndrome associated with Campylobacter fetus infection. Ann. Intern. Med., 86, 444-446.

USEROS FERNANDEZ, J.L.; ZAPATERO VILLALONGA, E.; LOPEZ ENCINAR F. (1981). Epiedemiologia y profilaxis. Phatos, 2, 18-35.

VAN ROOD, J.J.; VAN LEEUWEN, A.; EERNISSE,J.G. (1959) Leucoyte antiboides in sera of pregnant women. Vox. Sang (Basel), 4, 427.

VERGER, J.M.; GRAYON, M.; GRAVOVIL, F. (1975). Brucella isolées en France: indentification et typage. Ann. Rech. Vétér., 6. 187-205.

WARD, C.; GELSTHORPE, K.; DOUGHTY, R.W.(1976) A relation between HLA antigens and clinical features in patients with acquired valvular herard disease. Br. Med. J., 1, 1499-1501.

WENDELL HALL, H. (1982). Brucellosis. En: Feldman, H.A. Bacterial infections of humans. Epidemology and control. Plenum Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 119-135.

WILSON, W.; GERACI, J.E. (1983). Brucella, Francisella tularensis, Pasteurella y Yersinia. En : STEIN J. et al. Medicina Interna. Barcelona, Salvat, Tomo II, pp. 1.444-1.446.

ZINKERNAGEL, R.; DOBERTY P.(1987). Structure of MHC Protein Solved. Science, 238, 613-614.