

Proteínas de amastigotes de varias especies de leishmanias protegen a seres humanos contra la leishmaniasis en el área endémica de Guatire, Estado Miranda, Venezuela

José A. O'Daly Carbonell, Humberto Spinetti, María B. Rodríguez, Lourdes Acuña, Paúl García, Luis María Castillo, Tania Ovalles, Leyla Zambrano, Angela Yánes, José G. Iannello, Rosa García, Ana Papapietro, Carlos Zamora, Orangel Salinas.

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Microbiología y Biología Celular, Caracas

RESUMEN

En la Urbanización Valle Arriba, situada en las afueras de Guatire, Edo. Miranda, a una hora por carretera al este de Caracas, capital de Venezuela, una zona con una incidencia de leishmaniasis de 24,76 por mil habitantes, hemos aplicado una vacuna contra la enfermedad en agosto de 1991, con un seguimiento de 3191 personas casa por casa de tres años, hasta el momento de escribir este trabajo (septiembre 1994). También hemos aplicado la vacuna en una zona hiperendémica adyacente denominada "El Ingenio" con una tasa de morbilidad de 162,04 por mil habitantes.

La vacuna está constituida por 8-10 proteínas de cuatro especies de leishmanias a juzgar por el patrón obtenido en geles de acrilamida - SDS.

En la Urbanización Valle Arriba tanto el grupo vacunado como el grupo control no vacunado mostró un 24% de intradermoreacción (IDR) positiva a los antígenos de la vacuna antes de la vacunación.

Un mes después de tres dosis de vacuna el 95,67% de los individuos con IDR negativa prevacunal convirtieron a IDR positiva. Esta misma reacción practicada cada año en tres años consecutivos se ha incrementado tanto en los grupos prevacunales positivos como negativos, sin colocar nuevas dosis de vacuna, llegando hasta un diámetro de 20 mm.

El seguimiento casa por casa nos revela en la comunidad de Viena que las personas no vacunadas,

conviviendo junto a las personas vacunadas en la misma casa son las que se infectan preferencialmente, no así los individuos que han recibido la vacuna. La tasa de morbilidad en el grupo vacunado para todas las comunidades de "Valle Arriba" fue de 7,94 por mil, mientras que en el grupo control no vacunado alcanzó 56,17 por mil, es decir, una incidencia de la enfermedad 7,07 veces mayor después de 3 años de seguimiento.

En la comunidad de "El Ingenio", especialmente en "La Planta" existe una hiperendemia, con 41,78% de la población IDR positiva habiendo aumentado la enfermedad desde 1991-1994 cuando aparecieron 82 casos mientras que hasta 1984 se veían sólo 1-2 casos por año, para un total de 122 casos de 1972-1994. En esta comunidad la tasa de morbilidad mayor (205,23 por mil) se encuentra en la población de 0-5 años de edad lo cual atestigua que la transmisión es intradomiciliaria.

Los prevacunales negativos y los positivos aumentaron progresivamente la respuesta a la IDR después de cada dosis de vacuna, llegando en el caso de los negativos a un 95-100% de conversión.

El grupo de vacunados con IDR negativa mostró 15,29% de incidencia de la enfermedad la cual llegó a 58,82% en el grupo de individuos no vacunados con IDR negativa previa.

El tiempo de desaparición de las lesiones en vacunados que se infectaron y no recibieron tratamiento alguno fue similar al de los vacunados e infectados que ameritaron tratamiento con un antimonial pentavalente (Glucantime®). Este tiempo de curación fue nueve veces

mayor en las personas no vacunadas que recibieron una mezcla de promastigotes muertos por calor con BCG y que debido a la ineficacia de dicho tratamiento necesitaron aplicarse Glucantime®.

La comparación de la incidencia de la enfermedad entre vacunados y no vacunados da una diferencia significativa, con un riesgo relativo de contraer la enfermedad en no vacunados de 3,6 y en vacunados de 0,274, valor este último menor de 1,0 lo cual habla a favor de una alta eficiencia de la vacunación con proteínas de amastigotes como la aquí empleada.

La reacción de ELISA practicada antes y después de la vacunación con un grupo numeroso de antígenos de leishmanias no arroja diferencia alguna, lo cual sugiere que la reacción inmunológica en respuesta a la vacuna es eminentemente celular. Tampoco se encontraron diferencias en el patrón de bandas del "immunoblotting" en los sueros de las personas estudiadas antes y después de la vacunación.

SUMMARY

In the "Valle Arriba" neighborhood, located in the outskirts of the town of Guatire, Miranda State, at one hour by road to the east from Caracas, the Capital of Venezuela, with a morbidity of 24,76 per thousand, we have applied an amastigote vaccine against leishmaniasis in 3 191 people with a follow up period of three years until the moment of writing these paper (September 1994). We have also applied the vaccine in the adjacent rural zone "El Ingenio" hyperendemic for leishmaniasis with a morbidity of 162,04 per thousand.

The vaccine contains 8-10 proteins from four leishmania species after treatment of amastigotes with TLCK and NP40.

Before the vaccine application in "Valle Arriba" both the vaccinated and the control unvaccinated groups showed 24% of positivity to the intradermal reaction (IDR) with the antigens of the vaccine. One month after three doses of vaccine 95,67% of vaccinees previously IDR negative showed a conversion to a positive IDR.

The IDR in both pre-vaccinated IDR-negative and IDR-positive vaccinees has increased every year for three consecutive years up to 20 mm of diameter without new doses of vaccine.

The follow up for three years in house by house visit reveals a higher rate of infection in the non-vaccinated than in the vaccinated group both living in the same house and exposed to the same infection factors. The morbidity rate was 7.94 per thousand in the vaccinated group, while it reached 56.17 in the control unvaccinated group, an incidence 7.07 times bigger after three years of the field trial.

In the community of "La Planta" a hyperendemic

zone for leishmaniasis, 41.78% of the population showed a positive IDR before vaccination. The disease increased during 1991-1994 when 82 cases of leishmaniasis were reported, while in the previous years were diagnosed only 1-2 cases per year. In total, from 1972-1994, 122 cases have been diagnosed in this community. The highest morbidity (205.23 per thousand) was found in the age of 0-5 years old, which points out to intradomiciliary transmission of the disease.

The pre-vaccinated IDR negative group showed 95-100% conversion to IDR positive with a progressive increase of the response of the IDR after each doses of vaccine.

In "La Planta", the negative pre-vaccinated IDR people showed 15.29% of leishmaniasis in the vaccinated group, and 58.82% in the control unvaccinated group, a significant difference. The odds ratio in non-vaccinated was 3,6 and in vaccinated 0.274 a value less than 1.0 which speaks about the efficiency of the vaccine.

No difference was found in the ELISA nor in the immunoblotting pattern of sera before and after vaccination which points out that the immunological reaction after the vaccine is not humoral but mainly dependent on cellular immunity.

INTRODUCCION

Las leishmaniasis son enfermedades producidas por protozoarios parásitos intracelulares pertenecientes a diferentes especies del género leishmania, transmitidas por mosquitos denominados anguletas, pertenecientes a los géneros Phlebotomus en el Viejo Mundo y Lutzotmia en el continente americano. Los reservorios están constituidos por el hombre (ciclo antroponóico) o por animales salvajes y domésticos (ciclo zoonóico).

En el ser humano la enfermedad se presenta en cuatro formas clínicas principales clasificadas según la localización del parásito en los tejidos de la persona infectada: la leishmaniasis visceral o kala-azar, la leishmaniasis cutánea, la leishmaniasis muco-cutánea y la leishmaniasis cutánea difusa.

La enfermedad se encuentra diseminada en cuatro continentes y se presenta con carácter de endemia en 82 países, de los cuales 21 pertenecen al Nuevo Mundo y 61 al Viejo Mundo. La incidencia de la enfermedad se estima en unos 600 000 casos nuevos por año reportados oficialmente, con una prevalencia global de 12 millones de casos y una población de 350 millones de personas expuestas al riesgo de contraer la enfermedad (1).

Los datos epidemiológicos anteriores no son un

reflejo fiel de la realidad, pues la frecuencia de casos subclínicos de leishmaniasis visceral que pasan desapercibidos es muy grande. Por otra parte, un gran número de personas con leishmaniasis no reciben un diagnóstico adecuado, ya que en las áreas endémicas sólo ocasionalmente se implanta la detección activa de casos y su denuncia obligatoria únicamente se cumple en 30 de los 82 países afectados. Por lo tanto los valores epidemiológicos nombrados están muy por debajo de la magnitud real del problema (1).

Los intentos de vacunación contra la leishmaniasis se remontan a varios siglos atrás cuando los hebreos de Bagdad utilizaban material tomado del "Forúnculo de Bagdad" para inocular a sus niños en las partes cubiertas del cuerpo y prevenir así el desarrollo de cicatrices deformantes en la cara y las manos (2).

La transmisión artificial de la enfermedad se ha usado desde 1910 ya sea mediante la exposición deliberada a la picada de un mosquito infectado (3-5), o por la inoculación a una persona sana de material infectado obtenido de una lesión activa de leishmaniasis cutánea (6) o de parásitos vivos de cultivo (7,8).

El inóculo de parásitos a emplear, para inducir inmunidad en el vertebrado, debe ser de un cultivo reciente pues los parásitos pierden su virulencia en los pasajes sucesivos en el medio de cultivo (9). Por lo tanto un cultivo de *Leishmania* de larga data, no sirve como agente eficiente para inducir protección en el vertebrado vacunado, y nuevos aislamientos de parásitos tomados de animales infectados, deben ser usados a intervalos frecuentes.

Los ensayos de inmunización en seres humanos contra la infección por *Leishmania* mayor con parásitos de cultivo, comenzaron en 1937 en Turquistán (10) en 1939 en el Líbano (7) y en Israel desde 1968. La proporción de infecciones experimentales en los humanos inoculados en 1968 fue de 85,7% pero éstas declinaron progresivamente llegando en 1975 a 13,7%, 3 a 6 meses después de la inoculación (11).

La intradermoreacción (IDR) practicada después de la infección experimental, sólo fue positiva en el 19,5% de los casos a pesar de que se usaron parásitos vivos. Al emplear cepas frescas de *L. major* aisladas de pacientes unos meses antes del ensayo de campo, todos los soldados inoculados mostraron lesiones 2-4 semanas después de la infección experimental (11).

El análisis de la respuesta inmunológica humoral y celular en personas vacunadas con promastigotes vivos de *L. major* revela que los linfocitos de los sujetos vacunados presentan transformación blástica a bajas concentraciones de antígeno, las cuales suprimen la respuesta blastogénica en los linfocitos normales. Los sujetos vacunados con lesiones nodulares o ulceradas desarrollaron anticuerpos detectables por inmunofluorescencia contra *L. donovani* pero no contra *L. major* (12).

En Venezuela, en 1965, se realizaron ensayos de vacunación con parásitos vivos, en los pobladores del área de Cúa y sus alrededores en los Valles del Tuy, Estado Miranda. La vacuna consistió en inyectar por vía intradérmica una sola dosis de *L. brasiliensis* viva (20-25 millones de parásitos), cepa que había perdido su virulencia después de haber sido cultivada en medio de gelosa nutritiva glucosada según Davies por 488 repiques sucesivos. La IDR practicada 7 meses más tarde mostró que el 57,89% de los vacunados con parásitos vivos, previamente negativos a la IDR, convirtieron a una IDR positiva caracterizada por un nódulo dérmico de 4-7 mm de diámetro (13).

En el grupo humano bajo estudio aparecieron sólo dos casos de leishmaniasis cutánea en los controles no vacunados con IDR negativa previa. En este grupo, una nueva IDR practicada a los 7 meses de la primera IDR dio 5,83% de positividad, indicando sensibilización por la leishmanina (parásitos muertos), la cual alcanzó a 4,16% si restamos los dos casos que contrajeron leishmaniasis. En este mismo lapso, ninguno de los vacunados presentó la enfermedad. El seguimiento de los pacientes no se continuó, desconociéndose la incidencia de la enfermedad en los grupos vacunados y control más allá de 7 meses después de la vacunación (13).

En 1939, Salles Gomes en Brasil observó que la inyección intravenosa de promastigotes muertos conducía a una regresión de las lesiones en los pacientes con leishmaniasis cutánea activa, postulando que tal procedimiento podría usarse como una profilaxia efectiva contra la enfermedad (14).

En Brasil, el control de la leishmaniasis por vacunación comenzó con los trabajos de Pessoa y Pestana en 1940 (15) Pessoa en 1941 (16) y Curban en 1941 (17). Los ensayos de campo se llevaron a cabo en 6 áreas endémicas en el Estado de Sao Paulo vacunando con suspensiones de leishmanias de cultivo muertas mediante el tratamiento de los

parásitos con una solución de fenol-salina. En los 20 meses siguientes, la enfermedad se presentó en el 3,2% de los vacunados y en el 18% de los controles no vacunados.

En Brasil, 35 años después, Mayrink y col. inician un estudio de campo en 1975 en el Estado de Minas Gerais, en el valle de Barracao donde aparecieron 22 casos de leishmaniasis dos años antes de la vacunación, publicando resultados preliminares en 1979. La vacuna fue preparada con promastigotes de cultivo provenientes de leishmanias aisladas de: 1- Un caso de leishmaniasis cutánea difusa, 2- Un caso de leishmaniasis muco-cutánea, 3- Un caso de leishmaniasis cutánea, 4- Un caso con múltiples lesiones cutáneas y 5- Parásitos aislados de una *Lutzomyia flaviscutellata* hembra naturalmente infectada. Todos los parásitos fueron cultivados en medio LIT por 7 días, recogidos por centrifugación y la mitad de ellos tratados con ultrasonido, conservando la otra mitad indemne. Ambos grupos de parásitos (tratados e indemnes) de las distintas cepas (cada uno entre 12,5 y 25% de concentración) se unieron y luego se resuspendieron en solución tamponada de fosfato-mertiolate 1:10 000 a una concentración de 120 µg/ml. La vacunación se realizó mediante la inoculación de 120 µg la primera semana, 240 µg la segunda y 360 µg la tercera, mediante inyección intramuscular profunda (18).

La IDR realizada 3 meses después de la vacunación dio 78,4% de positividad y en los sueros de los pacientes no se encontraron anticuerpos, pues la inmunofluorescencia practicada con parásitos completos fue negativa. Un año después de la vacunación 73,2% de los vacunados mantenían la positividad a la IDR, dos años después el 54,1% y tres años después, solamente el 30,9% del grupo vacunado mostraron la IDR positiva (18). Sin embargo, a este respecto los autores consideraron una IDR positiva cuando“una pápula o área infiltrada era encontrada en el punto de la inoculación”..... sin ninguna mención al diámetro de la reacción lo cual le resta valor a estas observaciones. La experiencia, por otra parte, no cumplió su cometido pues no se observaron casos de leishmaniasis durante el tiempo en que transcurrió la prueba de campo ya que la enfermedad desapareció en el área geográfica escogida para la vacunación (18).

Dos ensayos nuevos fueron realizados en 1981 y 1983 en conscriptos del ejército brasileño de servicio y entrenamiento en la selva amazónica. En un

primer grupo de soldados que estuvo en la selva 60 días (1981), se encontró una incidencia de 8,7% de leishmaniasis en los vacunados y de 11,1% en el grupo control no vacunado. Un segundo grupo de soldados que estuvo en la selva 23 días mostró 1,2% de leishmaniasis en los vacunados y 1,4% en los controles (19).

El entrenamiento de los soldados brasileños en el año 1983 fue similar a 1981, así como también la proporción de vacunados y controles en los dos grupos, encontrándose una incidencia de 0,6% en los vacunados y 1,3% en los controles, la cual no fue estadísticamente significativa (19).

La vacuna en esta oportunidad fue administrada en dos dosis de 360 µg cada una colocadas en un intervalo de 7 días en 1,5 ml por vía intramuscular profunda; 40-45 días después de la segunda dosis se realizó la IDR. La conversión a una IDR positiva después de las dos dosis de vacuna fue de 35% en 1981 y 68% en 1983 (19).

Un segundo ensayo de campo fue realizado en 4 comunidades rurales en la región de Viana al este de Brasil en el Estado de Espiritu Santo en 1985, observando al final del primer año de seguimiento 1,5% de casos de leishmaniasis en las personas vacunadas y 6,4% en los controles. Al final del segundo año de observación se encontraron 1,7% de casos de leishmaniasis en vacunados y 8,9% en los controles no vacunados, una diferencia estadísticamente significativa (20).

Dado que los intentos de vacunación anteriores no fueron concluyentes realizaron un nuevo ensayo de campo incorporando el *Corynebacterium parvum* como adyuvante a la vacuna polivalente con 5 ó 6 cepas de leishmanias administrada en dos dosis como en el ensayo anterior. En esta oportunidad reportan que no hay diferencias estadísticamente significativas en los índices de estimulación linfocitarios en los vacunados con o sin *C. parvum*, que estos índices fueron mayores en los vacunados que en los controles sin vacunar y que el componente gp63 de la vacuna leish 5 fue inmunogénico en humanos a nivel de anticuerpo y de célula T. El suero de los vacunados precipitó 8 proteínas de la superficie del parásito entre 13,5 y 160 kilodaltons (kDa) (21).

Así mismo la conversión de IDR negativa prevacunal a IDR positiva en todos los grupos vacunados con los distintos preparados mostró una frecuencia similar, oscilando entre 40,9%-58,9% de

las personas, no encontrándose diferencias al vacunar con 5 ó 6 cepas de leishmanias y tampoco con la incorporación o no del *C. parvum* a la vacuna polivalente. En este trabajo, los autores no reportan la incidencia de la enfermedad en los distintos grupos de soldados conscriptos estudiados (21).

Usando el ratón como modelo experimental de la enfermedad, se ha encontrado que la infección cutánea de la cepa de ratones BALB/c con *L. major*, induce una enfermedad progresiva con lesiones grandes y ulceradas en la pata infectada, la cual puede perderse por necrosis, acompañada de diseminación metastásica hacia áreas cutáneas secundarias, visceralización y muerte del animal que es incapaz de controlar la infección.

La vacunación de estos animales con promastigotes irradiados induce una protección substancial, especialmente cuando son inmunizaciones múltiples por vía intravenosa o intraperitoneal (IP) pues la vía subcutánea (SC) no es efectiva. Este resultado es paralelo al obtenido irradiando previamente a los animales antes de la infección lo cual impide la generación de células T supresoras, permitiendo al animal controlar la infección mediante el desarrollo de inmunidad mediada por células (22).

La cepa de ratones C57BL/6 es más resistente a la leishmaniasis producida por *L. major* y esta resistencia puede incrementarse mediante la inoculación IP de promastigotes vivos no teniendo efecto alguno los parásitos muertos. El nivel de resistencia a la enfermedad en BALB/c puede aumentarse si vacunamos a los ratones IP (pero no SC) con macrófagos infectados con *L. major* congelados y descongelados varias veces junto con *C. parvum* (23).

En este modelo el macrófago infectado con amastigotes es el responsable de la inmunidad protectora, ya que el promastigote muerto no dió resultado para la vacunación, pues carece de los antígenos capaces de estimular la resistencia en el huésped (23).

La inoculación SC o IM de promastigotes irradiados o muertos por calor es totalmente ineficiente y aumenta la susceptibilidad del animal al parásito, así como también la progresión de la enfermedad conduciendo al animal a una muerte temprana, contrario a lo que ocurre con la inyección IV de promastigotes irradiados que induce protección significativa contra la enfermedad (24).

El efecto protector de los promastigotes irradiados

inyectados por vía IV es bloqueado si previamente se administran 4 inyecciones de los mismos parásitos por vía SC. Esta inhibición de la protección no depende de la viabilidad del parásito ya que puede ser inducida con leishmanias muertas por calor, mediante la fijación en formol o destruidas por ultrasonido (24).

La transferencia de células T esplénicas de animales inmunizados por vía SC a ratones receptores normales que han sido irradiados, suprime completamente la respuesta protectora inducida por la inmunización por vía IV. La célula supresora es del tipo Lyt-1+2-,L3T4+ y destruye completamente el efecto protector de células T obtenidas después de la inmunización IV cuando ambos grupos de células T provenientes de animales inmunizados por vía SC e IV se mezclan en recipientes irradiados. El efecto bloqueador de la inyección subcutánea sobre el curso de la infección por *L. major* no fue posible obtenerlo con *T. cruzi* pues es un efecto específico del antígeno leishmania (25).

Los cultivos de linfocitos de pacientes con leishmaniasis cutánea producida por *L. major* muestran aumento en la proliferación celular y en la producción de IL-2 e interferon- γ después de la estimulación con antígeno soluble del mismo parásito. Los sobrenadantes de estos linfocitos estimulados con antígeno aumentan la capacidad de los monocitos de destruir amastigotes intracelulares de *L. major* (26).

Los estudios inmunológicos han demostrado que el control de una infección primaria y la resistencia a la reinfección están asociados con el desarrollo y mantenimiento de una sólida inmunidad mediada por células (27). Usando los promastigotes irradiados ha sido posible separar fracciones solubles y componentes de membrana, ninguna de las cuales es capaz de inducir protección, quizás por pérdida de inmunogenicidad después de la rotura de los parásitos. Al unir el antígeno soluble (100 μ g) al *Corynebacterium parvum* se encontró protección significativa (89% de los animales), igual a la obtenida por promastigotes irradiados (28).

En este modelo los ratones BALB/c vacunados IV con promastigotes irradiados o inoculados IP con antígeno soluble + *C. parvum* no desarrollaron reacción de sensibilidad retardada a los antígenos leishmánicos. Las células T de los animales vacunados sí fueron capaces de producir IFN- γ leishmania-específico que activó a los macrófagos que luego fueron capaces de destruir a los parásitos (28).

El antígeno soluble ya descrito ha sido separado en 9 fracciones, de las cuales, la fracción N° 9 confiere protección a la infección por *L. major* (79% de protección) similar a la encontrada con el extracto total, estimula a los linfocitos para producir factores activadores de los macrófagos e induce sensibilidad retardada in vivo. Las otras fracciones separadas por cromatografía no fueron protectoras (29).

Los anticuerpos monoclonales preparados contra *L. mexicana* inhiben la motilidad y el crecimiento de los promastigotes in vitro, pero no causan efecto alguno sobre el crecimiento de los parásitos in vivo. La preinmunización de ratones BALB/c con Ig anti-leishmania purificada de la misma cepa de ratones, o con células T anti-leishmania irradiadas (hibridomas) aisladas de ratones BALB/c infectados y la infección posterior de estos animales con parásitos viables, conduce en los animales preinmunizados con células T a una exacerbación de la enfermedad con incremento del crecimiento parasitario (30).

Los animales inmunizados con células B (hibridomas) producen anticuerpos anti-idiotípicos, pero al ser infectados con parásitos su comportamiento es igual al de los controles no inmunizados (30).

Células T o Ig sérica de ratones inmunizados con células T aisladas de animales preinmunizados con células T o Ig de ratones infectados se usaron para inmunizar ratones sanos, encontrando en algunos de ellos protección contra la infección por *L. mexicana*, lo cual sugiere la posibilidad de usar vacunas anti-idiotípicas contra antígenos de leishmania para controlar la enfermedad (30).

Antígenos de promastigotes de *L. amazonensis* solubilizados con NP-40 y deoxicolato se han usado para inmunizar ratones contra la infección, resultando que la mejor inmunización es con una dosis de antígenos solubles equivalente a 5×10^7 parásitos por vía intravenosa, la cual es superior a la inmunización por vía intraperitoneal o subcutánea (31).

En los animales inmunizados se encontraron títulos altos de IgG anti-leishmania pero sin correlación con la protección contra la enfermedad. La sola inmunización no indujo niveles significativos de IFN- γ en el suero ni tampoco reacciones de sensibilidad retardada, pues ambos fenómenos aparecieron sólo después de la infección de los ratones con parásitos vivos al tiempo en que los

animales control tenían respuestas suprimidas (31).

La proteína gp63, muy abundante en la superficie de promastigotes de *L. mexicana* y el lipofosfoglican, un glicolípido también de la superficie, son antígenos que participan en la adhesión de los parásitos al macrófago. Estos antígenos fueron reconstituidos en un liposoma a fin de vacunar ratones contra la enfermedad. Este antígeno mixto, induce una protección apreciable contra la enfermedad la cual puede ser transferida a ratones sanos inyectando células T de los ratones así inmunizados (32).

Antígenos de 94-67 kDa, 30-20 kDa y menores de 20 kDa de promastigotes de *L. infantum* aislados por electroelución de geles de SDS-poliacrilamida se usaron para vacunar IV a ratones C57BL/6 y SC a ratones BALB/c. Un mes después de la vacunación los ratones se infectaron con promastigotes de *L. major*, encontrando en todos ellos protección contra la enfermedad. Los vacunados con los antígenos de 94-67 kDa resistieron una segunda infección con amastigotes de *L. major* (33).

Los mismos antígenos de 97-64 kDa en conjunción con muramyl dipéptido protegieron a los ratones contra la infección por *L. mexicana* y *L. major*, indujeron anticuerpos capaces de neutralizar la infectividad de los promastigotes, así como también reacciones específicas de sensibilidad retardada, generando poblaciones de macrófagos peritoneales capaces de destruir amastigotes in vitro (34).

El gen que codifica a la proteína gp63 de la superficie de los promastigotes de *L. major* ha sido expresado como una proteína de fusión con la enzima glutation-S-transferasa y fue reconocida por anticuerpos policlonales contra el polipéptido nativo gp63 de la superficie de las leishmanias. La proteína de fusión gp63 ha sido usada para vacunar ratones susceptibles y resistentes contra la enfermedad, pero en ningún caso se encontró protección al infectar a los animales con promastigotes vivos (35).

El gen de la proteína gp63 ya nombrada fue incorporado al genoma de la cepa AroA- de *Salmonella typhimurium* (SL3261) usada para vacunar contra la fiebre tifoidea. El producto obtenido expresa el antígeno gp63 in vitro, por lo cual se inmunizaron ratones por vía oral con las bacterias así transformadas. Las células esplénicas de estos animales desarrollaron anticuerpos y respuestas proliferativas de células T a *L. major*, sin embargo los animales no expresaron reacciones de sensibilidad retardada (DTH). Las células T activadas

pertencen al grupo CD4+ y secretan IL-2 e IFN- γ pero no IL-4 correspondiendo al subgrupo TH-1. Los animales desarrollaron una resistencia significativa a la enfermedad, al ser infectados con *L. major* (36).

El glicoconjugado gp10/20 aislado de *L. amazonensis* induce una respuesta de sensibilidad retardada y una exacerbación de la enfermedad con aumento significativo del tamaño de la lesión (37). Este antígeno es también capaz de anular el efecto protector inducido por una inyección intravenosa de promastigotes irradiados. Una célula T específica contra el glicoconjugado gp10/20 es capaz de transferir a ratones recipientes normales el efecto de empeoramiento de las lesiones después de la infección leishmánica (37).

Existen pocos estudios acerca de la vacunación contra la leishmaniasis visceral, enfermedad que causa gran morbilidad, caracterizada por un estado febril prolongado, gran hepato-esplenomegalia, adenopatías, un estado de inmunosupresión a los antígenos del parásito y a los mitógenos de células T y B (38), hipergammaglobulinemia y de no recibir tratamiento, la muerte. En estos pacientes rara vez se observan lesiones cutáneas (kala-azar dérmico) y los parásitos se encuentran abundantes en hígado, bazo y médula ósea. Los estudios en áreas endémicas reportan que alrededor del 15% de la población infectada desarrolla cuadros clínicos asintomáticos que curan espontáneamente.

Dos proteínas, la dp72 y la gp70-2 se han utilizado para el diagnóstico específico de la leishmaniasis visceral. Ambas proteínas muestran microheterogeneidad en distintos aislados de *L. donovani*. Los ratones inmunizados con gp70-2 no mostraron protección, mientras que los inmunizados con dp72 mostraron 81,1% de reducción en la carga parasitaria en el hígado comparado con los controles (39).

La glicoproteína GP46/M-2 de *L. amazonensis* induce una respuesta protectora contra la infección en ratones susceptibles (40). La infección por *L. major* en ratones puede seguir un curso fatal de diseminación del parásito y muerte del animal o puede evolucionar en forma autolimitada con una lesión única que eventualmente cura. El primer caso lo observamos en la cepa de ratones BALB/c, mientras que el segundo caso sucede en cualquiera de las otras cepas incluyendo la C3H/HeN.

El control de la infección leishmánica está directamente relacionado con la capacidad del ani-

mal para desarrollar una respuesta inmune celular. En modelos experimentales se ha demostrado que la resistencia contra la enfermedad está asociada con la estimulación de células T CD4+ del subgrupo Th1 definidas por su producción de IFN- γ y de IL-2, mientras que la susceptibilidad a la infección está asociada con células Th2, subgrupo que produce IL-4 e IL-5 (41).

La fracción 9 del extracto soluble de promastigotes de *L. major* protege a ratones BALB/c contra la infección por el mismo parásito. De dichos animales se aisló un clono de células T que transfiere inmunidad protectora contra la enfermedad. Este clono secreta IL-2 e IFN- γ pero no IL-4 o IL-5 después de su estimulación con antígeno o mitógenos y reconoce no sólo la fracción 9 de *L. major*, sino también antígenos solubles de *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, pero no de *T. cruzi* o *C. fasciculata*. Este antígeno 9 también es liberado por el parásito al medio de cultivo ya que los sobrenadantes de cultivo de promastigotes inducen la producción de IFN- γ por el clono de célula T al igual que el producido por la fracción 9 usada en su producción. Este clono, reconoce una proteína de 8 000-12 000 daltons de peso molecular (42).

La búsqueda de antígenos protectores contra la infección leishmánica ha progresado usando anticuerpos monoclonales específicos para componentes de la membrana del parásito. Esta técnica ha permitido identificar una proteína específica de la forma promastigote, de 46 kilodaltons, que al usarla como antígeno, protege a ratones contra una infección con 10^4 - 10^6 parásitos observando en el suero de los animales aumento de IgG1 y de IgG2. La protección también se observó en ensayos de transferencia pasiva de anticuerpos contra una infección de 10^3 o 10^4 promastigotes de fase logarítmica tardía de cultivo (43).

De la proteína de superficie gp63 se han aislado varios péptidos que son reconocidos por células T de ratones inmunes a la infección por *L. major*. Las células T inducidas por dos de los 24 péptidos son del grupo CD4+ y produjeron IL-2 e IFN- γ pero no IL-4 y también indujeron DTH en CBA y resistencia a la infección por *L. major*, en los animales CBA inmunizados con una mezcla de los dos péptidos (44).

En el caso de la leishmaniasis visceral murina la producción diferencial de citoquinas por células Th1 y Th2 no determina la cura del animal ya sea ésta dependiente de control genético por ser el ani-

mal resistente, o mediante procedimientos de vacunación. En las cepas de ratones que no se curan en la fase tardía de la infección se encontró una disminución general en la capacidad para producir citoquinas y no en la producción de IL-4 o de IL-5 en respuesta al antígeno o mitógeno por lo tanto no existe expansión de células Th2 en el curso crónico de la infección por *L. donovani* en ratones que no curan de la enfermedad (45).

La investigación del tiempo de aparición de las células Th1 y Th2 del grupo CD4 + en ratones infectados con *L. major* revela que después de 3 días de infección las células de los ganglios linfáticos que drenan la lesión en ratones BALB/c secretan IL-4 y IL-5, pero muy poco IFN- γ , mientras que los C3H/HeN secretan IFN- γ y nada de IL-4 o IL-5. En ambos casos las citoquinas fueron eliminadas privando al animal de células CD4+, pero no del grupo CD8+. Igual respuesta se observó después de inocular promastigotes muertos o antígeno soluble de parásitos. La resistencia a la infección en ratones pudo ser eliminada con anti-IFN- γ el cual aumenta la producción de IL-4 e IL-5 y disminuye la producción de IFN- γ . Por lo tanto, los niveles de IFN- γ al tiempo de la infección alteran el tipo de respuesta inmunológica, altos niveles favorecen la respuesta de Th1 mientras que niveles bajos favorecen la proliferación de Th2 (46).

Los ratones BALB/c susceptibles a la infección fueron inmunizados con el virus vaccinia atenuado mutante 48-7 que expresa la glicoproteína GP46/M-2 de la membrana de promastigotes de *L. amazonensis*. El 45-76% de los animales resultaron protegidos completamente (estériles) contra una infección con 10^3 promastigotes de cultivo, sin embargo se reporta poca diferencia entre los inmunizados y controles cuando la infección es con 10^4 parásitos. Los animales protegidos mostraron proliferación de células de bazo y ganglio linfático a la proteína GP46/M-2 y a promastigotes completos así, como aumento de IgM, IgG1 e IgG2 en el suero de los animales inmunizados. Las células de bazo de animales inmunizados, cultivadas en presencia de antígeno mostraron actividad de todas las citoquinas probadas (IL-2; IL-4; TNF; IFN- γ) (47).

Promastigotes de *L. major* irradiados con 150 krad pierden su virulencia a pesar de que persisten parásitos vivos en la almohadilla plantar y ganglios inguinales de los ratones BALB/c 28 días a 18 semanas después de la inoculación. Los parásitos así tratados son capaces de transformarse en

amastigotes in vitro. La inoculación subcutánea con parásitos irradiados confiere un alto grado de protección el cual depende de que los parásitos permanezcan viables, es decir, susceptibles de transformarse en amastigotes en el huésped vacunado (48).

Los mismos autores anteriores estudiaron el efecto de la adición de adyuvantes en la eficacia de la vacuna con parásitos muertos. Al mezclar los parásitos muertos con BCG vivo la preparación resultó menos activa. La inyección de la vacuna de promastigotes con BCG o con *C. parvum* en la almohadilla plantar no mostró ningún efecto. El BCG solo, cuando se inyectó en la cola del ratón indujo un cierto grado de resistencia al desarrollo de la úlcera. La adición de leishmanias muertas al BCG vivo resultó en una disminución de la resistencia de los ratones a la enfermedad. Así la reducción en el tamaño de la lesión fue de 45% con BCG solo y de 18% cuando se combinaron los parásitos muertos al BCG (48).

Otros autores han encontrado que la inyección IP de 10^7 unidades formadoras de colonias de BCG, 9 días antes de la infección con *L. major* produce lesiones menos severas con pocos parásitos que los controles sin BCG. Este efecto se observó con amastigotes y promastigotes, irrespectivamente de incluir o no incluir 10^6 BCG vivos en el inóculo parasitario (49).

Igualmente, inmunizando ratones con 5×10^4 unidades formadoras de colonias de BCG 14 días antes de la infección con *L. major*, las lesiones así obtenidas contenían menos parásitos que los controles sin BCG. Los ratones tratados con BCG e inoculados con *L. major* + BCG mostraron lesiones mayores con un mayor número de parásitos (49).

La infección de ratones vírgenes con una mezcla de *L. major* + BCG condujo al desarrollo de lesiones más severas que contenían mayor cantidad de parásitos que ratones vírgenes infectados con *L. major* solamente. No se encontró correlación entre el efecto del BCG en el desarrollo de las lesiones inducidas por *L. major* y las cantidades de IFN- γ , IL5 o TNF producidos in vitro después del reto antigénico con BCG vivo o *L. major* viva de células de ganglios linfáticos satélites a la lesión o de células del bazo (49).

El gen gp63, una proteína de superficie del parásito leishmania, ha sido clonado y expresado como una proteína en el citoplasma de una cepa de

vacuna de BCG. Los ratones BALB/c y CBA/J inmunizados con una dosis única de BCG recombinante y luego retados con promastigotes de *L. major* o *L. mexicana*, mostraron protección contra *L. mexicana* y en la cepa CBA/J contra *L. major*, mientras que sólo se observó un retardo en el tiempo de aparición de las lesiones en los BALB/c infectados con *L. major*. También se encontró protección contra el reto con amastigotes de *L. mexicana* (50).

MATERIAL Y METODOS

Parásitos

Se usaron las siguientes cepas de leishmanias: *L. amazonensis* (La: IFLA/BR/67/PH8); *L. venezuelensis* (Lv : MHOM/VE/80/H16); *L. brasiliensis* (Lb : MHOM/VE/75/H27); y *L. chagasi* (Lch: MHOM/BR/74/PP75). Los distintos parásitos fueron cultivados en Medio Sintético Enriquecido (MSE) suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Gibco) e incubados cada uno a la temperatura particular de transformación a la forma amastigote como hemos publicado con anterioridad (51,52).

Cada cepa no es usada para la vacuna cuando ha sido cultivada por más de 30 repiques sucesivos, ya que los parásitos pierden virulencia, así como también la capacidad para transformarse en amastigotes. Por lo tanto, una vez cumplidos los 30 pasajes en cultivo, las cepas son aisladas de nuevo de la almohadilla plantar de ratones BALB/c donde son mantenidas in vivo mediante repiques sucesivos cada 3-4 semanas. El nuevo aislamiento se realiza en MSE suplementado con 5% (v/v) de SFB como ya hemos publicado (51,52).

Preparación de la vacuna

Una vez que los parásitos en el cultivo llegaron a la fase estacionaria de crecimiento en la forma amastigote (51,52) se centrifugaron a 800 xg por 20 min a 4°C y se lavaron 2 veces con solución salina tamponada (SST: 0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,4) mediante centrifugaciones sucesivas. Posteriormente se suspendieron en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM, Gibco) suplementado con 150 µg/ml de tosil-L-lisina-clorometil-cetona (TLCK) a 30°C por 3 días, lo cual asegura la muerte de todos los parásitos como hemos publicado con anterioridad (53,54). A continuación los parásitos se centrifugaron a 12 100 x g por 10 min a 4°C en una centrífuga Sorvall y se lavaron dos veces con SST mediante centrifugaciones sucesivas. Seguidamente se incubaron en MEM suplementado con 0,12% de

NONIDET-P-40 (NP40 Sigma) por 30 min a 4°C, usando métodos ya publicados (55). Posteriormente se centrifugaron a 12 100 x g por 10 min a 4°C en una centrífuga Sorvall lavándose dos veces con SST. Luego se resuspendieron en SST para ser sometidos a ultrasonido por 3 min a 4°C determinándose el contenido proteico por el método de Lowry y col. (56). Seguidamente se les añadió alúmina a una concentración de 1 ml/mg de proteína de cada una de las cepas de leishmanias ya nombradas, las cuales fueron añadidas a partes iguales a fin de obtener una concentración final de 1000 µg/ml de antígeno leishmánico.

En cada una de las instancias de la preparación de la vacuna se tomaron muestras para el control de la esterilidad a fin de descartar cualquier contaminación. Las muestras se sembraron en MSE suplementado con 5% de SFB y luego se incubaron por 72 h a 37°C. También, una vez envasada en el frasco ampolla multidosis, ya lista para uso se tomaron alicuotas y se sembraron en placas de agar conteniendo 12,5% (p/v) de Bacto Peptona (Difco); 12,5% (p/v) de extracto de levadura (Becton Dickinson); 37,5% (p/v) D(+) glucosa monohidratada (Merck) y 37,5% (p/v) de BBL agar (Becton Dickinson). Las muestras se incubaron a 37°C por 48 horas para descartar bacterias de crecimiento rápido y por 3 semanas a 26°C para descartar bacterias de crecimiento lento y hongos. Toda vacuna contaminada con hongos o bacterias era desechada.

Proceso de vacunación

La comunidad de Valle Arriba fue dividida en dos grupos, uno perteneciente a las personas vacunadas y otro conformado por los controles no vacunados (Cuadro 1), con IDR tanto positiva como negativa. Ambos grupos fueron escogidos en función de la aparición de la persona a la convocatoria para la aplicación de la vacuna realizada con una semana de anticipación mediante volantes escritos repartidos en cada una de las comunidades nombradas. Los que no se vacunaron ese día quedaron como el grupo control. También se vacunaron las personas con IDR prevacunal positiva debido a la alta incidencia de leishmaniasis en este grupo a quienes ya les había dado la enfermedad, habiendo recibido diversos tratamientos con aparente remisión clínica de las lesiones.

En la comunidad de "El Ingenio", la estrategia fue distinta pues las personas habitan en una comunidad rural dispersa. De manera general se hicieron las mismas convocatorias para la vacu-

nación, reuniéndose todas las personas en una de las casas de la comunidad en el día de la vacunación. Como muchas personas no asistieron, se realizó visita casa por casa y se aplicaron dosis de vacuna en cada domicilio a las personas que estaban presentes, dejando a los ausentes como pertenecientes al grupo control.

Intradermoreacción

La reacción intradérmica se realizó inyectando por vía intradérmica 4 µg de antígeno polivalente en 0,1 ml de SST. El antígeno usado tiene la misma composición del empleado en la preparación de la vacuna con las cuatro cepas de leishmanias ya mencionadas, envasado en frasco-ampolla multidosis a la concentración de 40 µg/ml de proteína en SST, al cual se le practican las mismas pruebas de esterilidad ya descritas para el caso de la vacuna.

La cuantificación de la reacción intradérmica se realizó dibujando con un bolígrafo el área rojiza hasta el borde del nódulo que aparece a las 48 horas después de la inoculación del antígeno, en las personas con reacción positiva. Este dibujo sobre la piel es luego transferido a papel milimetrado frotando el reverso del papel con un algodón humedecido en alcohol. Luego se cuentan los cuadritos del papel milimetrado dentro del área dibujada por el nódulo del paciente para cuantificar el área de la reacción y se estima el diámetro ($d=2r$) de la misma usando la fórmula para el cálculo del área del círculo: $A= \pi r^2$. Toda reacción con un diámetro mayor de 5 mm a las 48 horas de la inoculación del antígeno es considerada positiva. Cada papel milimetrado es guardado en la historia clínica del paciente.

Diagnóstico de leishmaniasis

Todos los pacientes con sospecha clínica de la enfermedad fueron analizados mediante ELISA ("Enzyme linked immunosorbent assay") e intradermoreacción con antígenos específicos de 4 especies de leishmanias (ver más adelante), y también se les tomó biopsia y frotis por aposición a fin de demostrar los parásitos. Paralelamente se tomó biopsia por aspiración para el cultivo de las leishmanias en medios de cultivo desarrollados en nuestro laboratorio (51,52).

Prueba de ELISA

La preparación de los antígenos para la prueba de ELISA es como sigue: 1- Parásitos completos crecidos en la forma amastigote los cuales fueron recolectados en la fase estacionaria de crecimiento mediante centrifugación a 2500 rpm a 4°C en una

centrífuga National y lavados 2 veces en SST mediante centrifugaciones sucesivas. Los parásitos fueron resuspendidos en 0,05 M Tris-HCL pH 9,5 a la concentración de 1×10^6 parásitos /ml colocando 50 µl en cada uno de los pozos de las placas de plástico de 96 huecos (Immulon II, Dynatech Laboratories, USA). 2- Proteínas de la superficie de los parásitos vivos extraídas con 0,12% de Nonidet P-40 (NP40) en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM, Gibco) mediante la incubación de 1×10^9 parásitos/ml a 4°C por 30 min, como ya fue publicado (57). 3- Proteínas excretadas por promastigotes cultivados en MSE químicamente definido a 26°C. 4- Antígenos usados en la preparación de la vacuna provenientes de amastigotes tratados con TLCK y extraídos con NP40. 5- Proteínas de superficie de parásitos tratados con TLCK extraídas con NP40. 6- Sedimento de parásitos vivos después de su extracción con NP40. Una vez incubados con el detergente los parásitos se centrifugaron a 16 000 x g por 10 minutos en una centrífuga Sorvall y el sobrenadante fue dializado vs. H₂O destilada por 48 h a 4°C. determinándose luego el contenido proteico por el método de Lowry (56).

Las diversas proteínas extraídas de los parásitos fueron luego diluidas en 0,05 M Tris-HCl pH 9,5 a la concentración de 200 µg/ml y 50 µl de esta solución incubados en las placas de plástico Immulon II fondo plano (Dynatech), toda la noche a 37°C. Esto nos aseguró que una vez evaporada la solución todos los antígenos quedaran adheridos a las placas de plástico, como ya hemos publicado con anterioridad (58,59). Seguidamente se lavaron las placas de plástico con SST- 0,05% (v/v) de Tween-20 (Sigma) por 3 veces, para luego bloquearlas con SST suplementado con 1% (p/v) de albúmina sérica bovina (ASB, Fracción V de Cohn, Sigma) por una hora a temperatura ambiente. Luego se añadieron en cada pozo 100 µl de los sueros humanos diluidos 1:1000 en SST por duplicado. Las placas se incubaron por 1 hora a 37°C. A continuación se lavaron 3 veces con SST-0,05% (v/v) Tween 20 y se incubaron con 50 µl de una dilución 1:1000 de fragmento (Fab') 2-anti-inmunoglobulinas humanas marcado con peroxidasa de rábano (Amersham) por toda la noche a 4°C. Después de un lavado final con SST-0,05% Tween 20 se añadió el substrato ABTS incubando por 30 min a 37°C leyéndose luego los valores de densidad óptica (DO) a 405 nm en cada pozo con un lector automático de ELISA (Titertek Multiskan Plus).

Electroforesis en poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS)

Los parásitos completos, se resuspendieron en solución de disociación (12,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, conteniendo 2,5% (w/v) de SDS, 25% de glicerol (v/v) y 2,5% v/v de mercaptoetanol) a la concentración de 1×10^9 parásitos/ml. y luego se calentaron inmediatamente en baño de maría a 100°C con agitación constante mediante pipeta Pasteur por 5 minutos. De igual manera, cada una de las proteínas de la vacuna se disolvieron en solución de disociación a la concentración de 5 mg/ml, calentándose a 100°C por 3 minutos. Todas las preparaciones se dializaron vs. 500 ml de solución de disociación a temperatura ambiente por 24 horas. Diez μ l de parásitos completos o 50 μ g de proteínas de cada una de las especies usadas en la preparación de la vacuna fueron sometidas a electroforesis según el método de Laemmli (60) usando marcadores de pesos moleculares preteñidos (Bio-Rad) en un aparato de electroforesis vertical "Mini Protean II" (Bio-rad). Los geles fueron luego coloreados con Coomassie brillante azul.

Electrotransferencia de antígenos a papel de nitrocelulosa ("Immunoblotting")

El análisis de los antígenos transferidos a papel de nitrocelulosa se realizó con extractos frescos de amastigotes de cada una de las especies ya nombradas, así como con estos mismos parásitos tratados con TLCK y extraídos con NP40 como ya detallamos en el aparte sobre preparación de la vacuna.

En el caso de los parásitos completos, una vez que estos llegaron a la fase estacionaria de crecimiento, se centrifugaron a $800 \times g$ por 20 min a 4°C y se lavaron dos veces con SST mediante centrifugaciones sucesivas. Seguidamente se resuspendieron en solución de disociación (12,5 mM tris -HCl, pH 6,8 conteniendo 2,5% w/v de dodecyl sulfato de sodio, 25% (v/v) de glicerol y 2,5% (v/v) de mercaptoetanol) a la concentración de 1×10^9 parásitos/ml colocándolos inmediatamente en baño de maría a 100°C bajo agitación constante con una pipeta Pasteur por 5 min. Por otra parte, los parásitos tratados con TLCK y extraídos con NP40 (vacuna) fueron liofilizados y luego resuspendidos en solución de disociación a la concentración de 5 mg/ml. Ambas preparaciones se dializaron vs. solución de disociación a temperatura ambiente por 24 horas.

A fin de optimizar la separación de las proteínas se realizaron pruebas preliminares en geles analíticos

de SDS encontrando que 10 μ l de suspensión de parásitos totales o 50 μ g de la preparación de la vacuna de cada una de las especies de leishmanias mostraron el número máximo de bandas en los geles. Estos valores se extrapolaron al canal de 73 mm de los geles preparativos de SDS el cual fue llenado con 300 μ l de amastigotes frescos a la concentración de 1×10^9 / ml o 1250 μ g de proteínas de cada una de las cepas usadas en la preparación de la vacuna. Después de la electroforesis, siguiendo el método de Laemmli (60) los geles de acrilamida se montaron en un aparato de transferencia "Mini-Trans-Blot" y los polipéptidos así separados se transfirieron a papel de nitrocelulosa.

Una vez finalizada la transferencia las hojas de nitrocelulosa se trataron con una solución de 0,1% (w/v) de ASB, 0,1% Tween 20, 0,01 M Tris pH 7,4 por 30 min y luego con una solución de 1% ASB, 0,01 M Tris pH 7,4 por 1 hora a temperatura ambiente bajo constante agitación. Luego se cortaron tiras de papel (30 x 120 mm) de las hojas de nitrocelulosa tratándolas en tubos separados con las muestras de suero de los distintos pacientes, diluidas 1:50 en SST conteniendo 0,1% ASB por toda la noche a 4°C bajo agitación constante.

Después de la incubación con el suero se lavaron 4 veces en SST conteniendo 0,1% (v/v) de Tween 20 por 20 minutos cada vez, para luego añadirles el conjugado de anti-inmunoglobulina humana marcado con peroxidasa (Amersham) diluido 1:1000 en SST por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se lavó con SST-Tween 20 y se le añadió una solución que contenía 0,05% (w/v) de diaminobenzidina-HCl, 0,03% (v/v) H_2O_2 y 0,03% (w/v) cloruro de cobalto. Una vez desarrollado el color se lavó con agua destilada y se fotografiaron las bandas así obtenidas.

RESULTADOS

La vacuna está siendo evaluada en los habitantes de la Urbanización Valle Arriba (Marco #1, Figura 1) y en la zona de "El Ingenio" (Marco #2, Figura 1), ambas situadas en las afueras de la población de Guatire, Estado Miranda, a una hora por carretera hacia el este de Caracas, la capital de Venezuela.

Desde la fundación de la Urbanización en 1988 hasta 1994 se han presentado 79 casos de leishmaniasis cutánea con una tasa de 24,76 por mil habitantes (Cuadro 1). La Urbanización consta

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS



Figura 1.

Mapa correspondiente a la población de Guatire y sus alrededores. El marco #1 circunscribe el área donde se encuentra la Urbanización Valle Arriba y el marco #2 corresponde a la zona de "El Ingenio" donde se encuentran las comunidades de "Villas del Ingenio", "La Planta" y "Los Galpones".



Figura 2.

Vista general de la Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda.

Cuadro 1
 Incidencia de leishmaniasis en vacunados y controles
 Valle Arriba , Guatire, Edo, Miranda, agosto 1991-septiembre1994

| Comunidad | NUMERO PERSONAS | TOTAL DE CASOS | TASA POR MIL | NUMERO PERSONAS | TOTAL DE CASOS | TASA POR MIL |
|-----------|----------------------|----------------|--------------|--------------------------|----------------|--------------|
| | NO VACUNADOS | | | VACUNADOS TOTALES | | |
| CAPRI | 158,00 | 6,00 | 37,97 | 304,00 | 4,00 | 13,16 |
| VIENA | 400,00 | 21,00 | 52,50 | 339,00 | 5,00 | 14,75 |
| ROMA | 126,00 | 11,00 | 87,30 | 205,00 | 2,00 | 9,76 |
| FLORENCIA | 108,00 | 7,00 | 64,81 | 254,00 | 2,00 | 7,87 |
| LONDRES | 246,00 | 6,00 | 24,39 | 399,00 | 1,00 | 2,51 |
| GINEBRA | 34,00 | 12,00 | 352,94 | 71,00 | 1,00 | 14,08 |
| BUCARES | 103,00 | 3,00 | 29,13 | 444,00 | 1,00 | 2,25 |
| TOTAL | 1175,00 | 66,00 | 56,17 | 2016,00 | 16,00 | 7,94 |
| | VACUNADOS UNA DOSIS | | | VACUNADOS DOS DOSIS | | |
| CAPRI | 107,00 | 1,00 | 9,35 | 101,00 | 1,00 | 9,90 |
| VIENA | 79,00 | 2,00 | 25,32 | 48,00 | 0,00 | 0,00 |
| ROMA | 64,00 | 1,00 | 15,63 | 54,00 | 1,00 | 18,52 |
| FLORENCIA | 79,00 | 2,00 | 25,32 | 88,00 | 0,00 | 0,00 |
| LONDRES | 112,00 | 0,00 | 0,00 | 72,00 | 0,00 | 0,00 |
| GINEBRA | 39,00 | 0,00 | 0,00 | 20,00 | 1,00 | 50,00 |
| BUCARES | 188,00 | 0,00 | 0,00 | 92,00 | 0,00 | 0,00 |
| TOTAL | 668,00 | 6,00 | 8,98 | 475,00 | 3,00 | 6,32 |
| | VACUNADOS TRES DOSIS | | | INCIDENCIA LEISHMANIASIS | | |
| CAPRI | 96,00 | 2,00 | 20,83 | 462,00 | 9,00 | 19,48 |
| VIENA | 212,00 | 3,00 | 14,15 | 739,00 | 24,00 | 32,48 |
| ROMA | 87,00 | 0,00 | 0,00 | 331,00 | 13,00 | 39,27 |
| FLORENCIA | 87,00 | 0,00 | 0,00 | 362,00 | 9,00 | 24,86 |
| LONDRES | 215,00 | 1,00 | 4,65 | 645,00 | 7,00 | 10,85 |
| GINEBRA | 12,00 | 0,00 | 0,00 | 105,00 | 13,00 | 123,81 |
| BUCARES | 164,00 | 1,00 | 6,10 | 547,00 | 4,00 | 7,31 |
| TOTAL | 873,00 | 7,00 | 8,02 | 3191,00 | 79,00 | 24,76 |

actualmente de una población de aproximadamente 10 000 personas de las cuales hemos estudiado 7 comunidades, algunas de las cuales se observan en la Figura 2 y que han sido denominadas: Capri, Viena, (Figura 3), Roma, Florencia, Londres, Ginebra y Los Bucares.

La estimación del tamaño de la muestra para que el estudio sea estadísticamente confiable se realizó a posteriori, pues no existen estadísticas sobre la incidencia de la enfermedad en la zona. A tal fin se comparó el porcentaje de éxito, es decir la incidencia de casos en la población vacunada (Cuadro 1), con la diferencia entre el porcentaje de fracaso (leishmaniasis en la población no vacunada, (Cuadro 1) y el porcentaje de éxito. Si escogemos $p = 0,01$ como la probabilidad de que una diferencia del azar sea denominada significativa (error tipo I, usualmente se toma 0,05) y un factor beta (error tipo II) de 0,05 (usualmente se toma 0,1) como la probabilidad aceptable de perder una diferencia real en nuestras observaciones, los resultados nos dicen que una muestra de 527 personas en cada grupo sería suficiente (Cuadro 2). Los grupos estudiados en vacunados (2 015) y en controles no vacunados

(1 175) están muy por encima de este valor lo cual asegura que nuestras observaciones son estadísticamente confiables (Cuadro 1).

Una muestra seleccionada de toda la comunidad de Valle Arriba mostró una IDR prevacunal en el grupo control con 24,90% de positividad a los antígenos de la vacuna (Figura 4 y Cuadro 3) semejante al grupo vacunado donde los pacientes se agruparon en 24,80% de positivos y 75,20% negativos (Figura 5 y Cuadro 3).

De todas las comunidades, Viena fue la que mostró junto con Roma, Florencia y Ginebra, las mayores tasas de morbilidad (Cuadro 1), quizás por su cercanía a la zona montañosa. En el grupo control encontramos 31,21% de las personas con IDR prevacunal positiva (Cuadro 4 y Figura 6) mientras que en el grupo vacunado este valor fue de 51,23% (Cuadro 4 y Figura 7).

Como puede verse en el Cuadro 4, correspondiente a Viena, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vacunado ($9,85 \pm 4,36$ mm) y control ($11,38 \pm 5,34$ mm) en cuanto al valor alcanzado por la IDR positiva prevacunal.



Figura 3.
Detalle del Conjunto Viena, perteneciente a la Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda

Cuadro 2.

Estimación del tamaño de la muestra en La Urbanización Valle Arriba Guatire, Edo. Miranda, para que ésta sea estadísticamente confiable

| Potencia | Beta | Alfa | | | |
|----------|------|-------|--------|--------|--------|
| | | p=0,1 | p=0,05 | p=0,02 | p=0,01 |
| 0,8 | 0,2 | 184 | 234 | 296 | 347 |
| 0,9 | 0,1 | 255 | 311 | 385 | 441 |
| 0,95 | 0,05 | 320 | 385 | 468 | 527 |

alfa = p: probabilidad de que una diferencia del azar sea denominada "significativa". Es el umbral (tradicionalmente 0,05) por debajo del cual un valor de p se considera significativo

Beta : probabilidad aceptable (usualmente 0,1) de perder una diferencia real

La potencia está relacionada al factor beta por la ecuación $\beta=1-\text{potencia}$

Los valores del tamaño de la muestra corresponden al número de sujetos que se necesitan en cada grupo asumiendo una prueba de dos colas

La comparación de la distribución por sexo en vacunados y controles dio una diferencia no significativa. No se encontró diferencia significativa al comparar prevacunales negativos y positivos en los grupos vacunados y control (Cuadro 5). Al comparar los prevacunales positivos en los grupos de edades de 0-25 años y > 26 años en vacunados y controles se encontró una diferencia significativa, pero no así al comparar los prevacunales negativos en los mismos grupos de edad en vacunados y controles (Cuadro 5).

La IDR postvacunal en las distintas comunidades de la Urbanización Valle Arriba, en personas con IDR previa negativa dio un 95,67% de positividad (Cuadro 6 y Figura 8) con valores de $13,21 \pm 7,22$ mm. La evolución de los valores de la IDR en prevacunales negativos (n=62) y positivos (n=54) del conjunto Viena, que han sido vacunados con nuestra vacuna polivalente, se ha incrementado con el tiempo sin nuevas dosis de vacuna en tres años de seguimiento (Figura 9).

La evaluación de la vacuna en la Urbanización Valle Arriba demuestra que las tasas de morbilidad

en las comunidades vacunadas son bastante similares excepto en el conjunto Ginebra, donde la asociación de vecinos se opuso a la vacunación, recibiendo la vacuna polivalente sólo 71 personas, lo cual explica la tasa mayor de morbilidad en esa comunidad. La tasa de morbilidad en el grupo vacunado para todas las comunidades fue de 7,94 por mil, mientras que en el grupo control no vacunado alcanzó 56,17 por mil, es decir, una incidencia de la enfermedad 7,07 veces mayor después de 3 años de seguimiento. Las tasas totales de morbilidad después de una, dos o tres dosis de vacuna son similares (Cuadro 1).

La distribución espacial de casos en el conjunto Viena se observa en las casas sombreadas definidas desde la letra A hasta la Q. La casa correspondiente a la letra L está situada en la ladera de la montaña y pertenece al Guardabosque el cual junto con su señora no se vacunaron y contrajeron la enfermedad (Figura 10).

En el Cuadro 7 observamos que todos los controles que viven en el mismo ambiente que las personas vacunadas se infectaron para un total de 16 casos con leishmaniasis. En el grupo de vacunados hasta

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 3

Intradermoreacción (IDR) prevacunal en grupos vacunado y control en la Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda.

| | GRUPO CONTROL | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------|-----|-----|--------|-------------------|--------|------|--------|------|--|
| | PERSONAS | | | | DIAMETRO IDR (mm) | | | | | |
| | T | F | M | T X | D.E. | F X | D.E. | M X | D.E. | |
| Intradermoreacción prevacunal | 510 | 283 | 227 | 2,75 | 5,42 | 2,58 | 5,54 | 2,86 | 5,18 | |
| Prevacunales positivos | 127 | 65 | 62 | 10,79 | 5,66 | 11,21 | 6,44 | 10,23 | 4,76 | |
| 0-5 años | 6 | 3 | 3 | 6,74 | 1,06 | 7,49 | 0,54 | 5,99 | 0,91 | |
| 6-12 años | 11 | 4 | 7 | 7,21 | 1,95 | 6,77 | 2,09 | 7,46 | 1,99 | |
| 13-18 años | 12 | 4 | 8 | 10,49 | 3,57 | 10,23 | 2,77 | 10,62 | 4,08 | |
| 19-25 años | 11 | 10 | 1 | 8,83 | 3,73 | 8,57 | 3,84 | 11,34 | - | |
| 26-40 años | 58 | 30 | 28 | 12,04 | 6,73 | 13,21 | 7,99 | 10,65 | 4,96 | |
| 41-65 años | 23 | 10 | 13 | 10,53 | 5,07 | 10,48 | 5,08 | 10,35 | 5,42 | |
| más de 65 años | 6 | 4 | 2 | 14,42 | 4,65 | 12,88 | 5,05 | 17,50 | 1,85 | |
| Prevacunales negativos | 383 | 218 | 165 | 0,13 | 0,77 | 0,13 | 0,77 | 0,14 | 0,78 | |
| 0-5 años | 56 | 27 | 29 | 0,08 | 0,60 | 0,00 | 0,00 | 0,16 | 0,84 | |
| 6-12 años | 70 | 39 | 31 | 0,19 | 0,90 | 0,09 | 0,54 | 0,31 | 1,21 | |
| 13-18 años | 44 | 23 | 21 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 19-25 años | 35 | 27 | 8 | 0,27 | 1,11 | 0,35 | 1,25 | 0,00 | 0,00 | |
| 26-40 años | 131 | 76 | 55 | 0,17 | 0,87 | 0,24 | 1,02 | 0,08 | 0,59 | |
| 41-65 años | 34 | 17 | 17 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| más de 65 años | 13 | 9 | 4 | 0,30 | 1,08 | 0,00 | 0,00 | 0,98 | 1,95 | |
| | GRUPO VACUNADO | | | | | | | | | |
| | PERSONAS | | | | DIAMETRO IDR (mm) | | | | | |
| | T | F | M | T X | D.E. | F X | D.E. | M X | D.E. | |
| Intradermoreacción prevacunal | 367 | 221 | 146 | 2,44 | 4,71 | 5,81 | 0,83 | 0,12 | 1,94 | |
| Prevacunales positivos | 91 | 49 | 42 | 6,55 | 1,63 | 5,81 | 0,83 | 7,17 | 1,94 | |
| 0-5 años | 11 | 5 | 6 | 6,55 | 1,63 | 5,81 | 0,83 | 7,17 | 1,94 | |
| 6-12 años | 17 | 11 | 6 | 9,12 | 2,93 | 9,18 | 2,75 | 9,00 | 3,52 | |
| 13-18 años | 12 | 6 | 6 | 8,00 | 3,93 | 8,67 | 4,80 | 7,33 | 3,14 | |
| 19-25 años | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | |
| 26-40 años | 36 | 22 | 14 | 10,19 | 4,45 | 10,08 | 4,65 | 10,36 | 4,27 | |
| 41-65 años | 15 | 5 | 10 | 12,85 | 5,01 | 15,35 | 4,26 | 11,60 | 5,08 | |
| más de 65 años | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | |
| Prevacunales negativos | 276 | 172 | 104 | 0,04 | 0,40 | 0,00 | 0,00 | 0,11 | 0,65 | |
| 0-5 años | 45 | 23 | 22 | 0,10 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,20 | 0,96 | |
| 6-12 años | 80 | 40 | 40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 13-18 años | 22 | 14 | 8 | 0,14 | 0,64 | 0,00 | 0,00 | 0,38 | 1,06 | |
| 19-25 años | 8 | 5 | 3 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 26-40 años | 79 | 58 | 21 | 0,05 | 0,45 | 0,00 | 0,00 | 0,19 | 0,87 | |
| 41-65 años | 37 | 28 | 9 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| más de 65 años | 5 | 4 | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | |

septiembre de 1994 han aparecido 7 casos, de los cuales 4 han ameritado tratamiento con Glucantime®, permaneciendo 44 sin síntomas de enfermedad.

Paralelamente hemos estudiado desde agosto de 1993 una comunidad denominada "El Ingenio", geográficamente anexa a la Urbanización Valle

Arriba separada de ésta por una ladera montañosa (Marco #2, Figura 1) y compuesta a su vez por tres zonas: 1-"Villas del Ingenio", fundada en 1992, con casas de habitación similares en su estructura arquitectónica a la Urbanización Valle Arriba, 2-"Los Galpones" formada por casas de bloques y

Cuadro 4
 Intradermoreacción (IDR) prevacunal en grupos control y vacunado de Viena,
 Urbanización Valle Arriba, Guatire Edo. Miranda. Agosto 1991

| | GRUPO CONTROL | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------|----|--------|-------|-----------|-------|-----------|-------|------|
| | T | F | T M | X | F D.E. | X | M D.E. | X | D.E. |
| Intradermoreacción prevacunal | 141 | 73 | 68 | 3,49 | 5,98 | 3,65 | 6,50 | 3,32 | 5,40 |
| Prevacunales positivos | 44 | 22 | 22 | 11,38 | 5,34 | 12,74 | 5,80 | 10,09 | 4,62 |
| 0-5 años | 1 | 1 | 0 | 6,90 | - | 6,90 | - | - | - |
| 6-12 años | 3 | 1 | 2 | 5,43 | 0,51 | 5,00 | - | 5,65 | 0,49 |
| 13-18 años | 4 | 2 | 2 | 9,18 | 3,28 | 11,35 | 2,33 | 7,00 | 2,83 |
| 19-25 años | 2 | 1 | 1 | 10,22 | 1,58 | 9,10 | - | 11,34 | - |
| 26-40 años | 23 | 12 | 11 | 11,36 | 5,45 | 12,64 | 6,68 | 9,96 | 3,49 |
| 41-65 años | 9 | 3 | 6 | 14,25 | 6,00 | 17,40 | 1,51 | 12,67 | 6,91 |
| más de 65 años | 2 | 2 | 0 | 16,35 | 1,48 | 16,35 | 1,48 | - | - |
| Prevacunales negativos | 97 | 51 | 46 | 0,08 | 0,56 | 0,08 | 0,56 | 0,08 | 0,56 |
| 0-5 años | 18 | 9 | 9 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 6-12 años | 12 | 7 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 13-18 años | 11 | 6 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 19-25 años | 13 | 9 | 4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 26-40 años | 29 | 13 | 16 | 0,14 | 0,78 | 0,32 | 1,16 | 0,00 | 0,00 |
| 41-65 años | 10 | 5 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| más de 65 años | 4 | 2 | 2 | 0,98 | 1,95 | 0,00 | 0,00 | 1,95 | 2,76 |
| | GRUPO VACUNADO | | | | | | | | |
| | T | F | T M | X | F D.E. | X | M D.E. | X | D.E. |
| Intradermoreacción prevacunal | 162 | 90 | 72 | 5,08 | 5,84 | 4,80 | 5,90 | 5,43 | 5,79 |
| Prevacunales positivos | 83 | 43 | 40 | 9,85 | 4,36 | 9,93 | 4,57 | 9,78 | 4,18 |
| 0-5 años | 9 | 4 | 5 | 6,78 | 1,72 | 6,00 | 0,82 | 7,40 | 2,07 |
| 6-12 años | 16 | 10 | 6 | 9,31 | 2,91 | 9,50 | 2,68 | 9,00 | 3,52 |
| 13-18 años | 11 | 5 | 6 | 8,18 | 4,07 | 9,20 | 5,17 | 7,33 | 3,14 |
| 19-25 años | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| 26-40 años | 34 | 21 | 13 | 10,26 | 4,46 | 9,94 | 4,72 | 10,77 | 4,15 |
| 41-65 años | 13 | 3 | 10 | 13,00 | 5,24 | 17,67 | 2,52 | 11,60 | 5,08 |
| más de 65 años | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| Prevacunales negativos | 79 | 47 | 32 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0-5 años | 11 | 6 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 6-12 años | 26 | 11 | 15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 13-18 años | 6 | 4 | 2 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 19-25 años | 3 | 2 | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - |
| 26-40 años | 21 | 18 | 3 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 41-65 años | 10 | 5 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| más de 65 años | 2 | 1 | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 0,00 | - |

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 5
Comparación de la distribución de los sexos; de los prevacunales positivos y negativos.
Prueba exacta de Fisher para tablas de contingencia 2 x 2

| | Prevacunales positivos | | | Controles | Vacunados |
|--|------------------------|------------------------|--|------------------------|-----------|
| | Femenino | Masculino | | | |
| controles | 283 | 227 | 0-25 años | 40 | 40 |
| vacunados | 221 | 146 | >26 años | 87 | 51 |
| P para 2 colas: 0,16696 Riesgo relativo: 0,824 Asociación entre variables no significativa | | | P para dos colas: 0,06535 Riesgo relativo: 0,586 Asociación entre variables es significativa | | |
| | Prevacunales positivos | Prevacunales negativos | | Prevacunales negativos | |
| | | | | Controles | Vacunados |
| controles | 127 | 383 | 0-25 años | 155 | 205 |
| vacunados | 91 | 276 | >26 años | 121 | 178 |
| P para dos colas: 1,00009 Riesgo relativo: 1,006 Asociación entre variables no significativa | | | P para dos colas: 0,52617 Riesgo relativo: 1,112 Asociación entre variables no significativa | | |

Cuadro 6
Intradermoreacción (IDR) en prevacunales negativos
1 mes después de tres dosis de vacuna en la Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda.

| | NUMERO PERSONAS | | | IDR (mm) | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|------|------|----------|------|-------|------|-------|------|
| | T | F | M | T | F | M | T | F | M |
| Intradermoreacción prevacunal | 3191 | 1802 | 1389 | | | | | | |
| Primera dosis | 668 | 377 | 291 | | | | | | |
| Segunda dosis | 475 | 289 | 186 | X | D.E. | X | D.E. | X | D.E. |
| Tercera dosis | 873 | 485 | 388 | | | | | | |
| Intradermoreacción postvacunal | 439 | 266 | 173 | 13,21 | 7,22 | 13,51 | 7,30 | 8,53 | 7,12 |
| Postvacunales positivos | 420 | 252 | 168 | 13,84 | 6,99 | 14,15 | 6,95 | 13,38 | 7,05 |
| 0-5 años | 61 | 31 | 30 | 14,26 | 6,55 | 12,96 | 5,74 | 15,61 | 7,13 |
| 6-12 años | 109 | 56 | 53 | 13,20 | 6,92 | 13,02 | 5,53 | 13,40 | 8,18 |
| 13-18 años | 41 | 25 | 16 | 12,69 | 4,64 | 13,46 | 5,41 | 11,50 | 2,85 |
| 19-25 años | 9 | 6 | 3 | 10,28 | 5,78 | 10,75 | 6,93 | 9,33 | 3,41 |
| 26-40 años | 137 | 93 | 44 | 14,84 | 7,57 | 15,66 | 8,25 | 13,10 | 5,55 |
| 41-65 años | 57 | 36 | 21 | 14,18 | 7,61 | 14,84 | 6,84 | 13,05 | 8,84 |
| más de 65 años | 6 | 5 | 1 | 8,25 | 2,07 | 8,64 | 2,05 | 6,30 | 2,32 |
| Postvacunales negativos | 19 | 14 | 5 | 2,61 | 2,12 | 2,08 | 2,23 | 4,11 | 0,44 |
| 0-5 años | 4 | 1 | 3 | 2,99 | 2,05 | | - | 3,98 | 0,57 |
| 6-12 años | 4 | 3 | 1 | 1,84 | 2,20 | 1,00 | 1,73 | 4,37 | 0,64 |
| 13-18 años | 2 | 2 | | 2,45 | 3,46 | 2,45 | 3,46 | - | - |
| 19-25 años | 3 | 2 | 1 | 3,04 | 2,66 | 2,46 | 3,47 | 4,22 | - |
| 26-40 años | 3 | 3 | | 3,93 | 0,89 | 3,93 | 0,89 | - | - |
| 41-65 años | 3 | 3 | | 1,50 | 2,60 | 1,50 | 2,60 | - | - |
| más de 65 años | | | | - | - | - | - | - | - |

techo de zinc también existente desde 1992, y 3-“La Planta” la cual es una comunidad rural dispersa que existe desde principios de siglo, cuyas personas habitan en ranchos de paredes de bahareque y techos de zinc sin ningún tipo de servicios, algunos con pozos sépticos, pero la mayoría sin sistemas de disposición de excretas.

La estimación del tamaño de la muestra necesario para este estudio se realizó a posteriori de manera similar a las otras comunidades estudiadas, comparando las tasas de incidencia de la leishmaniasis en el grupo expuesto (no vacunado) y no expuesto (vacunado) al riesgo de contraer la enfermedad. Si consideramos una probabilidad $<0,01$ como significativa y un valor beta de 0,05 como ya detallamos en párrafos anteriores, el tamaño de la muestra debería ser de 161 personas por cada grupo (Cuadro 8). En nuestro caso, la muestra en los vacunados (291) y en los no vacunados (192) de las tres localidades de “El Ingenio”, está muy por encima de este valor por lo cual la muestra poblacional es confiable.

La población total de la zona de “El Ingenio” comprende unas 1 200 personas y de éstas entraron al protocolo de estudio 617 individuos (51,41%). La incidencia de la enfermedad es distinta en cada una de las tres localidades mencionadas, no obstante pertenecer a una misma área geográfica. Por ejemplo, en “Villas del Ingenio” donde habitan 845 personas hemos detectado desde 1992-1994, 5 individuos infectados con leishmaniasis (0,59%). En “Los Galpones” cuya población es de 90 personas desde 1992-1994 han aparecido 6 casos (6,66%) con la enfermedad y en “La Planta” donde viven unas 265 personas, desde 1972-1994 han aparecido 122 casos de leishmaniasis (46%), con una frecuencia de 1-2 casos por año hasta 1984, exacerbándose la enfermedad a partir de 1991 cuando aparecieron 14 casos, 15 en 1992, 28 en 1993 y 35 en 1994 (Figura 11). Estos datos han sido recogidos en la historia clínica de cada uno de los pacientes mediante visitas casa por casa, pues no existe registro oficial de la leishmaniasis en la zona.

Cuadro 7
Distribución espacial de casos de leishmaniasis según esquema de la Figura 10
en el Conjunto Viena, Urbanización Valle Arriba, Guatire Edo. Miranda. Agosto 1991-septiembre 1994

| Casa | # Personas en la casa | controles no infectados | controles infectados | Vacunados no infectados | Vacunados infectados | Dosis vacuna | Evolucion enfermedad |
|-------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|
| A | 3 | 0 | 1 | 2 | 0 | | |
| B | 4 | 0 | 1 | 3 | 0 | | |
| C | 7 | 0 | 2 | 4 | 1 | 1 | Remisión ST |
| D | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | | |
| E | 5 | 0 | 2 | 3 | 0 | | |
| F | 3 | 0 | 1 | 2 | 0 | | |
| G | 4 | 0 | 1 | 3 | 0 | | |
| H | 4 | 0 | 1 | 3 | 0 | | |
| I | 6 | 0 | 2 | 4 | 0 | | |
| J | 5 | 0 | 1 | 4 | 0 | | |
| K | 5 | 0 | 0 | 3 | 2 | 3 y 1 | Remisión G |
| L | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | | |
| M | 4 | 0 | 0 | 3 | 1 | 2 | Remisión ST |
| N | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 | Remisión G |
| O | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 | Remisión G |
| P | 4 | 0 | 1 | 3 | 0 | | |
| Q | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 | Remisión ST |
| Total | 67 | 0 | 16 | 44 | 7 | | |

ST: Sin tratamiento
G: Glucantime

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

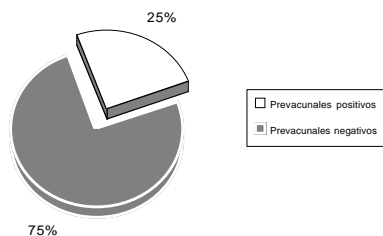


Figura 4. Intradermoreacción prevacunal del grupo control en Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda, agosto 1991

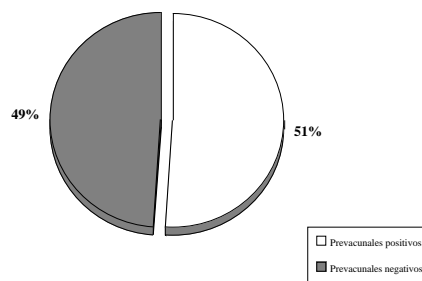


Figura 7. Intradermoreacción prevacunal en el grupo vacunado del conjunto Viena, Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda, agosto de 1991

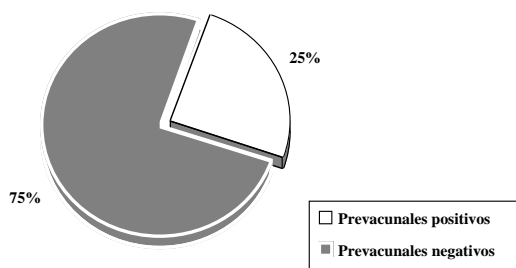


Figura 5. Intradermoreacción prevacunal del grupo vacunado en Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda, agosto 1991

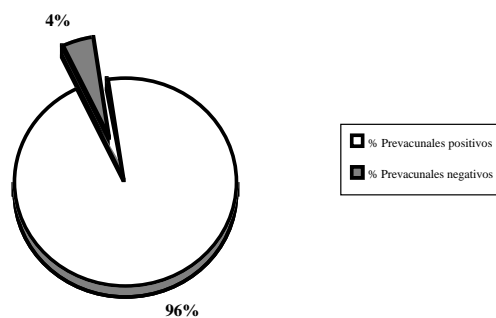


Figura 8. Intradermoreacción en prevacunales negativos 1 mes después de tres dosis de vacuna. Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo. Miranda

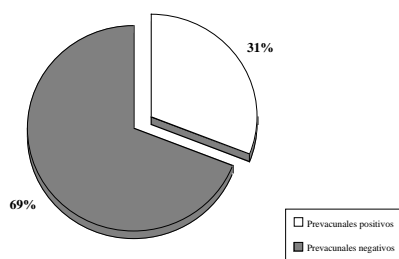


Figura 6: Intradermoreacción prevacunal en grupo control del conjunto Viena, Urbanización Valle Arriba, Guatire, Edo Miranda, agosto 1991

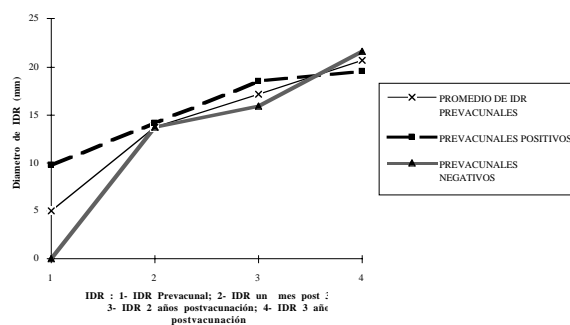


Fig 9. Evolución del diámetro de la intradermoreacción (IDR) post-vacunal en Viena, Urbanización Valle Arriba, Guatire Edo. Miranda. Agosto 1991-septiembre 1994

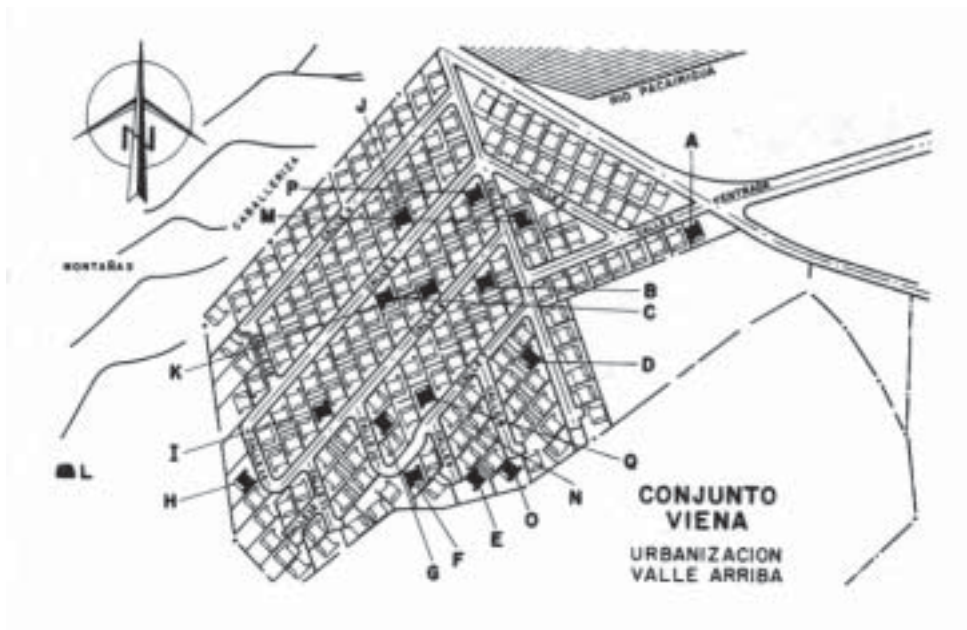


Figura 10. Diagrama del Conjunto Viena, Urbanización Valle Arriba. En las casas sombreadas han aparecido casos de leishmaniasis, y corresponden al listado que aparece en Cuadro 7.

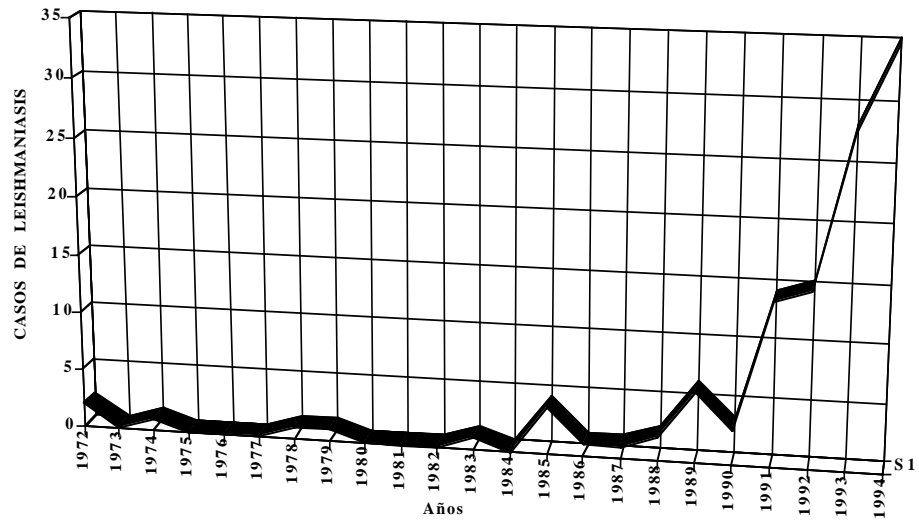


Figura 11. Casos de leishmaniasis en "Villas del Ingenio", "Los Galpones" y "La Planta" 1972-1994

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS



Figura 12: Casos de leishmaniasis mensuales en "La Planta", Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993-agosto 1994

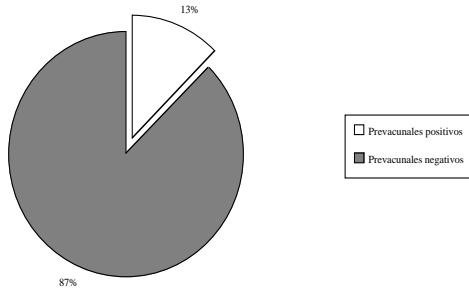


Figura 13. Intradermoreacción prevacunal en "Villas del Ingenio", Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993

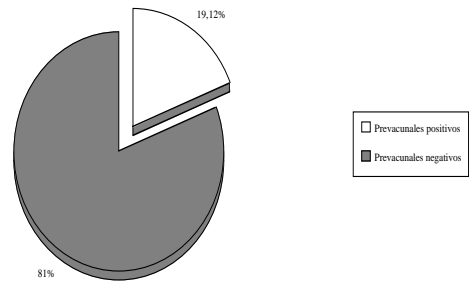


Figura 15. Intradermoreacción prevacunal en "Los Galpones", Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993

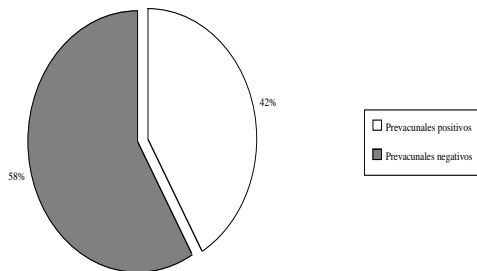


Figura 14. Intradermoreacción prevacunal en "La Planta" Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993

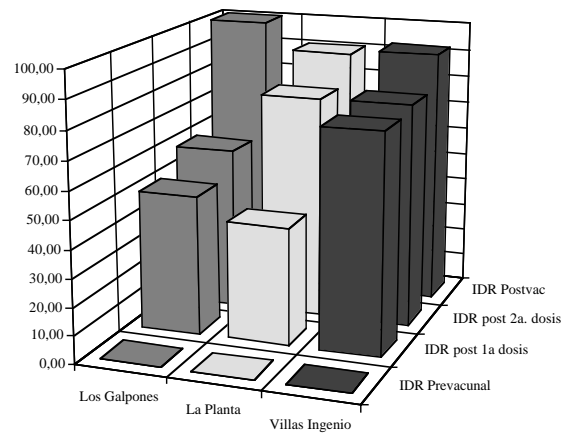


Figura 16. Porcentaje de conversión a IDR positiva en prevacuales negativos en cada una de las localidades de "El Ingenio" después de cada dosis de vacuna

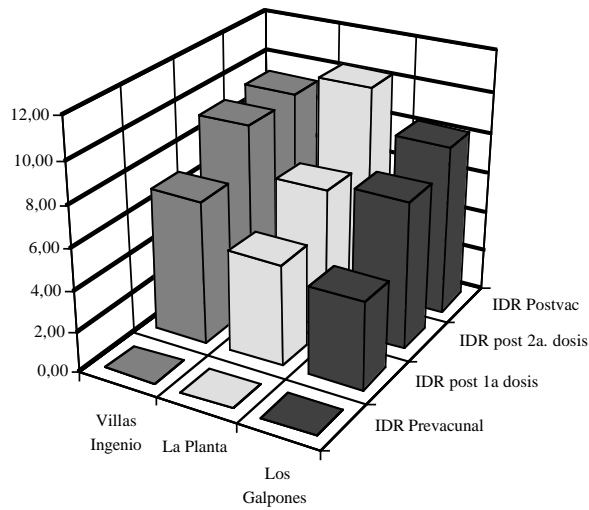


Figura 17: Diámetro (mm) de la IDR en prevacunales negativos después de cada dosis de vacuna en las tres localidades de El Ingenio, Guatire, Edo. Miranda.

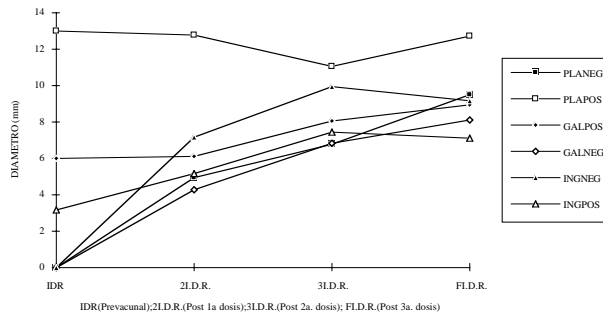


Figura 18. Diámetro de la IDR (mm) en prevacunales negativos y positivos después de cada dosis de vacuna en las tres localidades de “El Ingenio”, Guatire, Edo. Miranda.

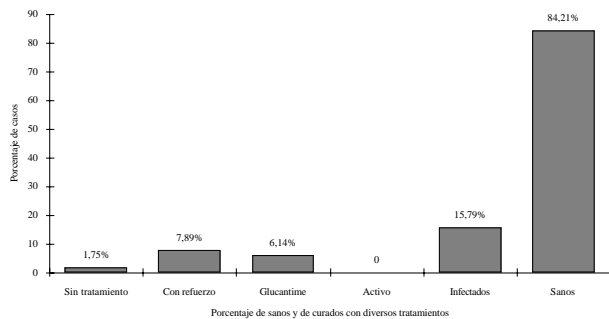


Figura 19. Evolución de los casos de leishmaniasis en 114 vacunados con IDR prevacunal positiva o negativa en “La Planta”, Guatire, Edo. Miranda. Agosto 1993-Septiembre 1994.

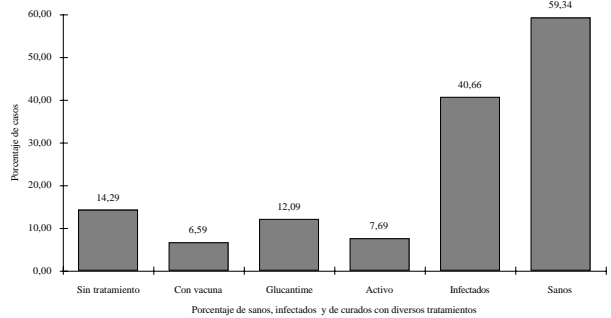


Figura 20. Evolución de los casos de leishmaniasis en 91 no vacunados con IDR negativa o positiva prevacunal de “La Planta”, Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993-septiembre 1994

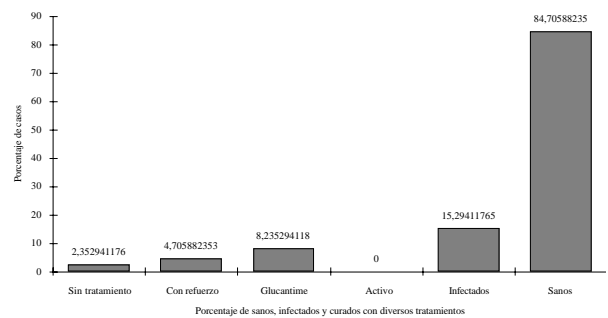


Figura 21. Evolución de los casos de leishmaniasis en 85 vacunados con IDR negativa prevacunal en “La Planta”, Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993-septiembre 1994

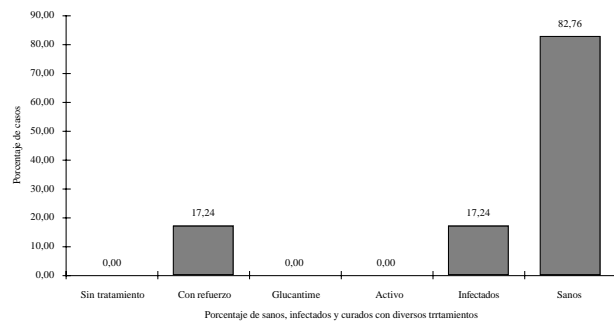


Figura 22. Evolución de los casos de leishmaniasis en 29 vacunados con IDR positiva previa en “La Planta”, Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993-septiembre 1994

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

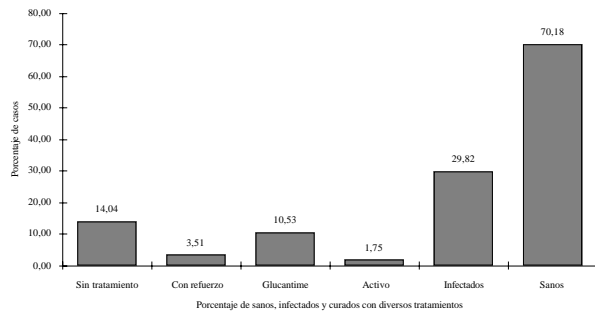


Figura 23. Evolución de los casos de leishmaniasis en 57 no vacunados con IDR positiva prevacunal en "La Planta", Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993-septiembre 1994.

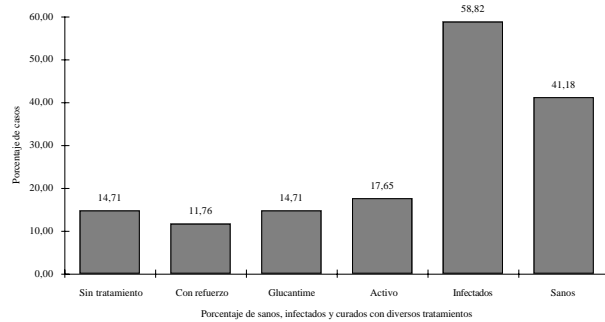


Figura 24. Evolución de los casos de leishmaniasis en 34 no vacunados con IDR negativa prevacunal en "La Planta", Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993-septiembre 1994.

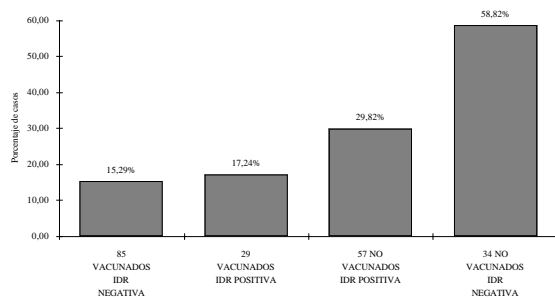


Figura 25. Porcentaje de casos de leishmaniasis en personas vacunadas y no vacunadas con intradermoreacción (IDR) positiva o negativa prevacunal en "La Planta"

LA PLANTA SECTOR EL INGENIO DTO. ZAMORA
CASOS DE LEISHMANIASIS (AGOSTO 93 - NOV 94)

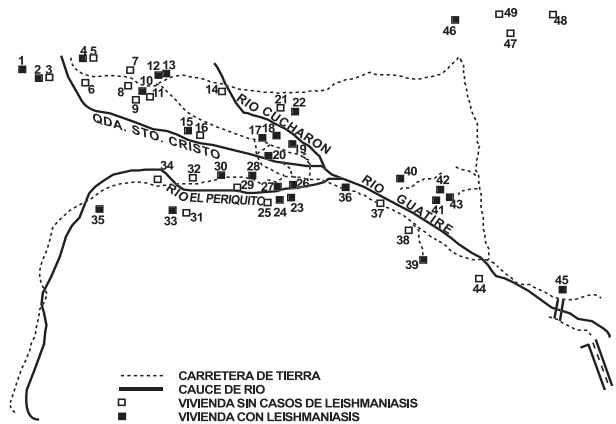


Figura 26. Diagrama de "La Planta", zona de "El Ingenio". En las casas sombreadas han aparecido casos de leishmaniasis, y corresponden al listado que aparece en el Cuadro 19.

En esta misma localidad de "La Planta" desde que realizamos la detección activa de casos se presentaron personas con leishmaniasis en todos los meses del año con un mayor número de enfermos en los meses de agosto y diciembre de 1993; así como también en abril, junio y agosto de 1994 (Figura 12).

En la Cuadro 9 se observa el comportamiento de la intradermoreacción (IDR) con los antígenos de la vacuna aplicados en los distintos grupos de edades en las localidades de "Villas del Ingenio", "La Planta" y los "Galpones" respectivamente. La muestra poblacional fue de 39,05% en el caso de "Villas del Ingenio", 82,64% en el caso de "La Planta" y de 78,88% en el caso de "Los Galpones".

La aplicación de la IDR a individuos de las distintas localidades previo a la vacunación dio el siguiente resultado: al inyectar 270 personas en el caso de "Villas del Ingenio" (Cuadro 9) encontramos que 236 individuos (87,41%) dieron una respuesta negativa cuyo promedio fue $0,27 \pm 0,97$ mm mientras que sólo 34 (12,59%) resultaron con una reacción mayor de 5 mm (Figura 13); arrojando un promedio de $11,04 \pm 9,21$ mm sin diferencia significativa por sexo y grupo de edad.

En el caso de "La Planta" (Cuadro 9) 124 personas (58,22%) resultaron negativas a la IDR con una reacción promedio de $0,21 \pm 0,89$ mm, mientras que 89 personas (41,79%) presentaron una IDR mayor de 5mm (Figura 14) con un promedio de $13,66 \pm$

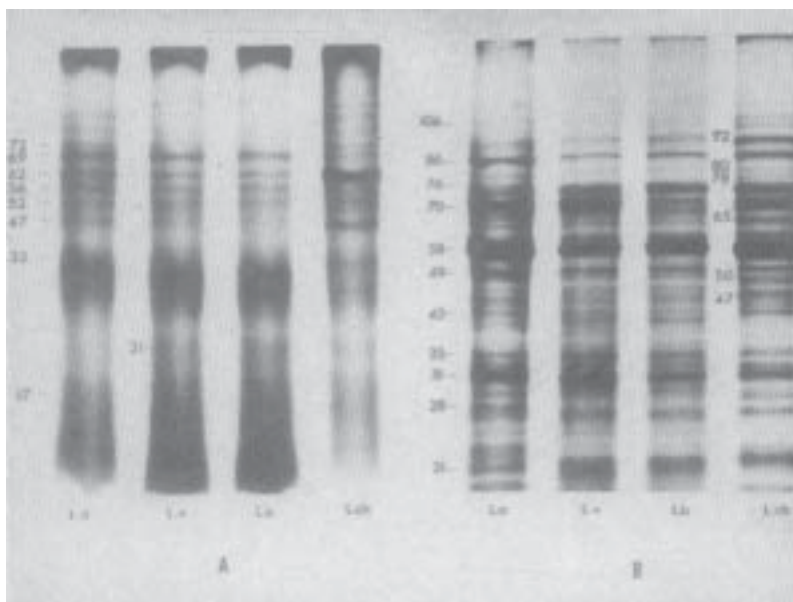


Figura 27. Electroforesis en SDS-Acrilamida de las especies de leishmanias usadas en la preparación de la vacuna (A) y de los amastigotes completos (B). La: *Leishmania amazonensis*; Lv: *L. venezuelensis*; Lb: *L. brasiliensis*; Lch: *L. chagasi*. En las columnas de la izquierda se especifican los pesos moleculares en kilodalton.

5,56 mm. En “Los Galpones” (Cuadro 9) se encontraron 55 personas con IDR negativa (80,88%) con un promedio de $0,66 \pm 1,49$ mm y 13 positivas (19,12%) y un promedio de $11,73 \pm 7,89$ mm (Figura 15).

Se observa claramente que la comunidad de “La Planta” es la que tiene una mayor incidencia de leishmaniasis en la zona (41,39%), lo cual se corroboró con el estudio de los pacientes portadores de la enfermedad (ver más adelante) pudiendo considerarse esta localidad como una zona hiperendémica, pues sus habitantes viven en un ambiente selvático, rodeado de numerosos cursos de agua y con una amplia gama de vectores a una densidad muy alta. Por otra parte, los habitantes migran poco del sitio donde viven pues la carretera existente está en muy mal estado y es necesario realizar al menos 3 pasos de ríos sin que existan puentes para cruzarlos.

La tasa de transmisión que indica la exposición del ser humano al parásito, a juzgar por la IDR muestra una tendencia creciente con la edad desde 230/1000 en menores de 5 años hasta 666/1000 en > 65 años en La Planta. En esta misma localidad la

tasa de morbilidad es mayor en los menores de 5 años (205/1000) siendo éste el grupo más afectado lo cual sugiere que la transmisión es intradomiciliaria. El mismo fenómeno se observa en Villas del Ingenio, pero no así en Los Galpones debido a que la población en los grupos de edades de 41 años en adelante es muy exigua. La tasa general de morbilidad por leishmaniasis es: La Planta: 162,04/1000; Villas del Ingenio: 18,63/1000 y en Los Galpones: 86,96/1000 (Cuadro 10).

En la Cuadro 11 vemos que al comparar el número de individuos prevacunales positivos y negativos en “La Planta” vs. “Villas del Ingenio” y en “La Planta” vs. “Los Galpones” usando tablas de contingencia 2 x 2 y la prueba exacta de Fisher se encuentra una asociación entre las variables significativas, no así al comparar los mismos grupos entre “Los Galpones” y “Villas del Ingenio”. Observando el riesgo relativo de infección medido por IDR, existe un riesgo 4,98 veces mayor de contraer la enfermedad en “La Planta” en comparación con “Villas del Ingenio” y de 3 veces mayor en comparación con “Los Galpones”, por lo cual la transmisión de la

Cuadro 8

Estimación del tamaño de la muestra en “El Ingenio” para que ésta sea estadísticamente confiable

| | Alfa | | | |
|------|----------------------|--------|--------|--------|
| | p=0,1 | p=0,05 | p=0,02 | p=0,01 |
| Beta | Tamaño de la muestra | | | |
| 0,2 | 57 | 72 | 91 | 106 |
| 0,1 | 78 | 95 | 118 | 135 |
| 0,05 | 98 | 118 | 143 | 161 |

alfa = p: probabilidad de que una diferencia del azar sea denominada “significativa”.

Es el umbral (tradicionalmente 0,05) por debajo del cual un valor de p se considera significativo.

Beta: probabilidad aceptable (usualmente 0,1) de perder una diferencia real

La potencia está relacionada al factor beta por la ecuación $\beta=1$ -potencia

Los valores del tamaño de la muestra corresponden al número de sujetos que se necesitan en cada grupo asumiendo una prueba dos-colas

enfermedad en la comunidad de “La Planta” es mucho más intensa. La comparación del número de personas con IDR prevacunado negativa o positiva en los distintos sexos usando la tabla de contingencia 2 x 2 revela una asociación significativa de las variables con una mayor positividad en hombres que en mujeres, en “La Planta” y “Villas del Ingenio”, no así en “Los Galpones” (Cuadro 12).

La población vacunada con IDR previa negativa, alcanzó a 247 personas (29,23%) en la población de “Villas del Ingenio” los cuales recibieron una (40,08%), dos (16,59%) o tres dosis (43,31%) de vacuna. La IDR, practicada en cada una de las localidades, a una fracción del grupo vacunado (169 personas) dio el siguiente resultado: en “Villas del Ingenio” después de la primera dosis de vacuna alcanzó una positividad de 78,33% de la población vacunada; con una IDR promedio de $7,85 \pm 2,90$, mostrando los negativos $3,87 \pm 1,24$ mm (Cuadro 13). Después de la segunda dosis la positividad de la reacción aumentó a 80,43% con un promedio de $10,39 \pm 3,97$ mm permaneciendo los negativos en $3,83 \pm 1,49$ mm (Cuadro 13). En los casos que recibieron tres dosis el porcentaje de conversión de

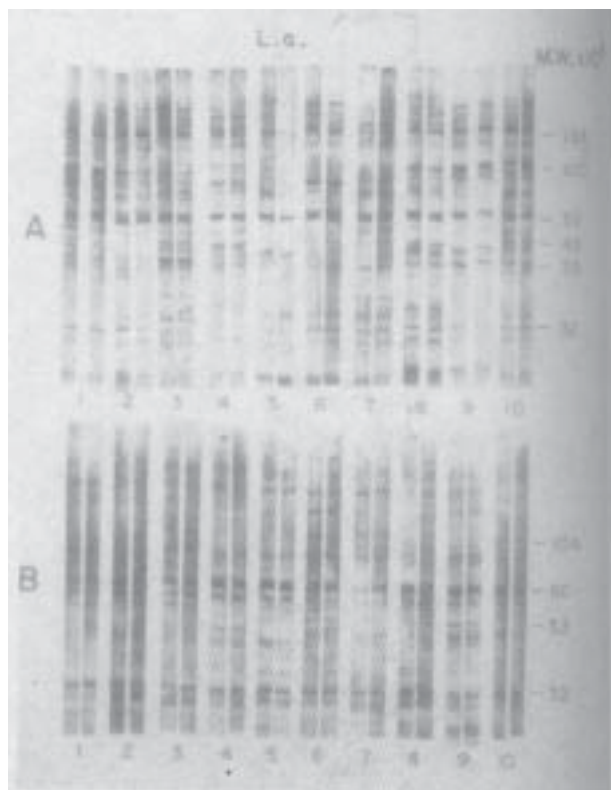


Figura 28. Electrotransferencia de antígenos de *L. amazonensis* a papel de nitrocelulosa usando los parásitos completos (A) o los amastigotes tratados con TLCK y NP40 (B). Los números debajo de las tiras de papel de nitrocelulosa representan los sueros de los pacientes antes y un mes después de la vacunación. Los antígenos fueron transferidos al mismo papel y la reacción de los sueros realizada al mismo tiempo. A la derecha se especifican los valores de los pesos moleculares.

IDR negativa a positiva fue de 89,74% con un promedio de $9,92 \pm 4,11$ mm quedando sólo 5 personas postvacunales negativas con un promedio de $1,89 \pm 2,58$ mm, las cuales todas convirtieron a positivas al colocarles uno o dos refuerzos de vacuna. (Cuadro 13 y Figuras 16 y 17).

En el caso de “La Planta” se vacunaron 120 personas lo cual representa el 45,28% de la población recibiendo una dosis (34,16%), dos dosis (9,16%) o tres dosis (56,66%) de vacuna. La IDR practicada a una muestra del grupo vacunado (112 personas), después de la primera dosis de vacuna reveló un 41,93% de personas positivas con un promedio de

O'DALY CARBONELL JA, ET AL

Cuadro 9
Intradermoreacción (IDR) prevacunal en "El Ingenio"

| | T | F | M | T | F | M | T | F | M |
|------------------------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Villas del Ingenio | T | F | M | T | F | M | T | F | M |
| Número de historias | 330 | 193 | 137 | X | D.E. | X | D.E. | X | D.E. |
| Leishmanina prevacunal | 270 | 150 | 120 | | | 1,44 | 5,41 | 1,37 | 3,99 |
| Prevacunales positivos | 33 | 14 | 19 | 11,04 | 9,21 | 13,52 | 13,01 | 9,31 | 4,87 |
| 0-5 años | 2 | 1 | 1 | 6,70 | 1,34 | 5,75 | - | 7,65 | - |
| 6-12 años | 2 | 0 | 2 | 5,74 | 1,05 | - | - | 5,74 | 1,05 |
| 13-18 años | 1 | 1 | 0 | 17,14 | - | 17,14 | - | - | - |
| 19-25 años | 5 | 1 | 4 | 11,43 | 8,31 | 5,17 | - | 12,99 | 8,70 |
| 26-40 años | 15 | 8 | 7 | 12,91 | 12,59 | 15,86 | 16,72 | 9,53 | 4,33 |
| 41-65 años | 4 | 2 | 2 | 11,18 | 4,18 | 13,58 | 3,98 | 8,79 | 3,68 |
| más de 65 años | 4 | 1 | 3 | 7,38 | 0,92 | 7,13 | - | 7,46 | 1,11 |
| Prevacunales negativos | 236 | 136 | 101 | 0,27 | 0,97 | 0,26 | 0,96 | 0,28 | 0,99 |
| 0-5 años | 46 | 23 | 23 | 0,17 | 0,82 | 0,00 | 0,00 | 0,35 | 1,15 |
| 6-12 años | 43 | 24 | 19 | 0,15 | 0,68 | 0,11 | 0,51 | 0,20 | 0,86 |
| 13-18 años | 33 | 20 | 13 | 0,34 | 1,14 | 0,56 | 1,44 | 0,00 | 0,00 |
| 19-25 años | 25 | 15 | 10 | 0,80 | 1,56 | 0,60 | 1,37 | 1,11 | 1,85 |
| 26-40 años | 55 | 31 | 24 | 0,08 | 0,40 | 0,06 | 0,35 | 0,09 | 0,46 |
| 41-65 años | 33 | 22 | 11 | 0,25 | 1,00 | 0,22 | 1,02 | 0,31 | 1,02 |
| más de 65 años | 1 | 1 | 0 | 3,19 | - | 3,19 | - | - | - |
| LA PLANTA | T | F | M | T | F | M | T | F | M |
| Número de historias | 219 | 102 | 117 | X | D.E. | X | D.E. | X | D.E. |
| Leishmanina prevacunal | 215 | 103 | 112 | | | 5,06 | 7,75 | 6,49 | 7,39 |
| Prevacunales positivos | 89 | 36 | 53 | 13,66 | 5,56 | 14,05 | 6,63 | 13,40 | 4,78 |
| 0-5 años | 9 | 3 | 6 | 11,46 | 3,29 | 12,98 | 4,21 | 10,69 | 2,85 |
| 6-12 años | 18 | 11 | 7 | 13,13 | 3,51 | 12,85 | 2,48 | 13,56 | 4,93 |
| 13-18 años | 17 | 5 | 12 | 12,86 | 5,27 | 12,25 | 6,64 | 13,11 | 4,91 |
| 19-25 años | 11 | 3 | 8 | 12,44 | 4,12 | 12,83 | 6,66 | 12,29 | 3,38 |
| 26-40 años | 12 | 6 | 6 | 12,74 | 6,16 | 12,25 | 6,16 | 13,23 | 6,71 |
| 41-65 años | 20 | 8 | 12 | 16,88 | 7,42 | 19,02 | 10,20 | 15,45 | 4,84 |
| más de 65 años | 2 | 0 | 2 | 12,13 | 6,94 | - | - | 12,13 | 6,94 |
| Prevacunales negativos | 126 | 67 | 59 | 0,21 | 0,89 | 0,15 | 0,72 | 0,28 | 1,05 |
| 0-5 años | 30 | 16 | 14 | 0,49 | 1,29 | 0,44 | 1,22 | 0,56 | 1,42 |
| 6-12 años | 22 | 12 | 10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 13-18 años | 18 | 10 | 8 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 19-25 años | 17 | 12 | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 26-40 años | 20 | 8 | 12 | 0,24 | 1,07 | 0,00 | 0,00 | 0,40 | 1,38 |
| 41-65 años | 18 | 9 | 9 | 0,45 | 1,25 | 0,45 | 1,35 | 0,45 | 1,35 |
| más de 65 años | 1 | 0 | 1 | 0,00 | - | - | - | 0,00 | - |
| LOS GALPONES | T | F | M | T | F | M | T | F | M |
| Número de historias | 71 | 39 | 32 | X | D.E. | X | D.E. | X | D.E. |
| Leishmanina prevacunal | 68 | 40 | 28 | | | 2,13 | 5,05 | 2,24 | 5,72 |
| Prevacunales positivos | 13 | 7 | 6 | 11,73 | 7,89 | 11,68 | 9,25 | 11,76 | 7,49 |
| 0-5 años | 1 | 0 | 1 | 9,90 | - | - | - | 9,90 | - |
| 6-12 años | 3 | 1 | 3 | 8,92 | 4,30 | - | - | 8,92 | 4,30 |
| 13-18 años | 3 | 3 | 0 | 15,79 | 10,37 | 15,79 | 10,37 | - | - |
| 19-25 años | 4 | 2 | 1 | 6,63 | 1,90 | 5,29 | - | 7,97 | - |
| 26-40 años | 2 | 1 | 1 | 15,85 | 14,28 | 5,75 | - | - | 25,95- |
| 41-65 años | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| más de 65 años | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| Prevacunales negativos | 55 | 33 | 22 | 0,66 | 1,49 | 0,68 | 1,54 | 0,63 | 1,44 |
| 0-5 años | 15 | 7 | 8 | 0,76 | 1,57 | 1,07 | 1,82 | 0,49 | 1,38 |
| 6-12 años | 14 | 5 | 9 | 0,67 | 1,71 | 0,98 | 2,20 | 0,50 | 1,50 |
| 13-18 años | 9 | 8 | 1 | 0,79 | 1,62 | 0,55 | 1,55 | 2,76 | - |
| 19-25 años | 7 | 6 | 1 | 0,23 | 0,60 | 0,27 | 0,65 | 0,00 | - |
| 26-40 años | 7 | 5 | 2 | 1,09 | 1,87 | 0,84 | 1,89 | 1,69 | 2,39 |
| 41-65 años | 2 | 1 | 1 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 0,00 | - |
| más de 65 años | 1 | 1 | 0 | 0,00 | - | 0,00 | - | - | - |

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 10
Tasas de IDR+ y de morbilidad por leishmaniasis/1000 habitantes
en las distintas localidades de "El Ingenio" según grupos de edad desde agosto 1993 - septiembre 1994

| Grupos de edad | IDR+/ Poblacion | Tasas IDR+/1000 | Casos/ Población | Tasas Morbilidad/1000 |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| La Planta | | | | |
| [0-5] | [9/39] | 230,77 | [8/39] | 205,13 |
| [6-12] | [18/43] | 418,60 | [8/43] | 186,05 |
| [13-18] | [17/35] | 485,71 | [4/35] | 114,29 |
| [19-25] | [11/28] | 392,86 | [5/28] | 178,57 |
| [26-40] | [12/32] | 375,00 | [5/32] | 156,25 |
| [41-65] | [20/36] | 555,56 | [5/36] | 138,89 |
| >65 | [2/3] | 666,67 | [0/3] | 0,00 |
| TOTAL | [89/216] | 412,04 | [35/216] | 162,04 |
| Villas del Ingenio | | | | |
| [0-5] | [2/51] | 39,22 | [2/51] | 39,22 |
| [6-12] | [2/54] | 37,04 | [1/54] | 18,52 |
| [13-18] | [1/39] | 25,64 | [1/39] | 0,00 |
| [19-25] | [5/44] | 113,64 | [0/44] | 0,00 |
| [26-40] | [15/84] | 178,57 | [2/84] | 23,81 |
| [41-65] | [4/43] | 93,02 | [1/43] | 23,26 |
| >65 | [4/7] | 571,43 | [0/7] | 0,00 |
| TOTAL | [33/322] | 102,48 | [6/322] | 18,63 |
| Los Galpones | | | | |
| [0-5] | [1/17] | 58,82 | [1/17] | 58,82 |
| [6-12] | [3/17] | 176,47 | [3/17] | 58,82 |
| [13-18] | [3/13] | 230,77 | [3/13] | 76,92 |
| [19-25] | [4/90] | 444,44 | [4/9] | 0,00 |
| [26-40] | [2/10] | 200,00 | [2/10] | 300,00 |
| [41-65] | [0/12] | 0,00 | [0/12] | 0,00 |
| >65 | [0/1] | 0,00 | [0/1] | 0,00 |
| TOTAL | [13/69] | 188,41 | [6/69] | 86,96 |

8,8 ± 2,85 mm; estando los negativos en 2,18 ± 2,08 mm (Cuadro 14). La IDR practicada después de la segunda dosis reveló 80% de positividad con un promedio de 7,93 ± 2,35 mm estando los negativos en 2,39 ± 2,02 mm (Cuadro 14). En los casos de tres dosis el 90,19% de los vacunados convirtió a una IDR positiva con una reacción promedio de 11,20 ± 4,53 mm, mientras que el 9,8% fue negativa con un promedio de 2,43 ± 2,24mm (Cuadro 14 y Figuras 16 y 17).

En el caso de "Los Galpones" se vacunaron 47 personas (52,22%): con una dosis (25,53%); con dos dosis (17,02%) y con tres dosis (57,44%). Después de la primera dosis el 50% de las personas mostraron positividad a la IDR con un promedio de 6,38 ± 1,39,

permaneciendo los negativos en 2,13 ± 2,06 (Cuadro 15). La misma IDR practicada después de la segunda dosis dio 58,33% de positividad con un promedio de 9,41 ± 3,41, permaneciendo los negativos en 4,16 ± 0,57 mm (Cuadro 15). Los casos con tres vacunas mostraron 100% de conversión a la IDR con un promedio de 8,29 ± 2,25 mm (Cuadro 15 y Figuras 16 y 17).

En todas las localidades nombradas las personas vacunadas fueron distribuidas en dos grupos al azar, uno de los cuales recibió 0,2 ml IM y el otro 0,4 ml IM en cada una de las tres dosis de vacuna.

Los prevacunales negativos de las tres localidades así como también los prevacunales positivos de "Los Galpones" y "El Ingenio" incrementaron los

Cuadro 11
Comparación entre prevacunales positivos y negativos en la distintas localidades de "El Ingenio" mediante la prueba exacta de Fisher para tablas 2 x 2.

| | IDR + | IDR - | | IDR + | IDR - |
|---|-------|--------|---|-------|--------|
| La Planta | 89,00 | 124,00 | La Planta | 89,00 | 124,00 |
| Villas del Ingenio | 34,00 | 236,00 | Los Galpones | 13,00 | 55,00 |
| P para 2 colas : <0,00001 Riesgo relativo: 5,126 | | | P para 2 colas :0,00085 Riesgo relativo: 3,077 | | |
| Asociación entre variables: significativa | | | | | |
| | | | | IDR + | IDR - |
| | | | Los Galpones | 13 | 55 |
| | | | Villas del Ingenio | 34 | 236 |
| P para 2 colas: 0,16907 Riesgo relativo: 1,666 Asociación entre variables: no significativa | | | | | |

Cuadro 12
Comparación de la distribución por sexo en prevacunales IDR positivos y negativos en las distintas localidades de "El Ingenio" Prueba exacta de Fisher para tablas 2 x 2

| | LA PLANTA | | VILLAS DEL INGENIO | | |
|---|--------------|----|---|-----|-----|
| | M | F | M | F | |
| IDR+ | 53 | 36 | IDR+ | 20 | 14 |
| IDR- | 59 | 67 | IDR- | 100 | 136 |
| P: 0,09693(dos colas) Riesgo relativo: 1,65 | | | P: 0,06531(dos colas) Riesgo relativo: 2,023 | | |
| Asociación entre variables: significativa | | | | | |
| | LOS GALPONES | | | | |
| | Maculino | | Femenino | | |
| IDR+ | 6 | | 7 | | |
| IDR- | 22 | | 33 | | |
| P: 0,76370(dos colas) Riesgo relativo: 1,230 Asociación entre variables: no significativa | | | | | |

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

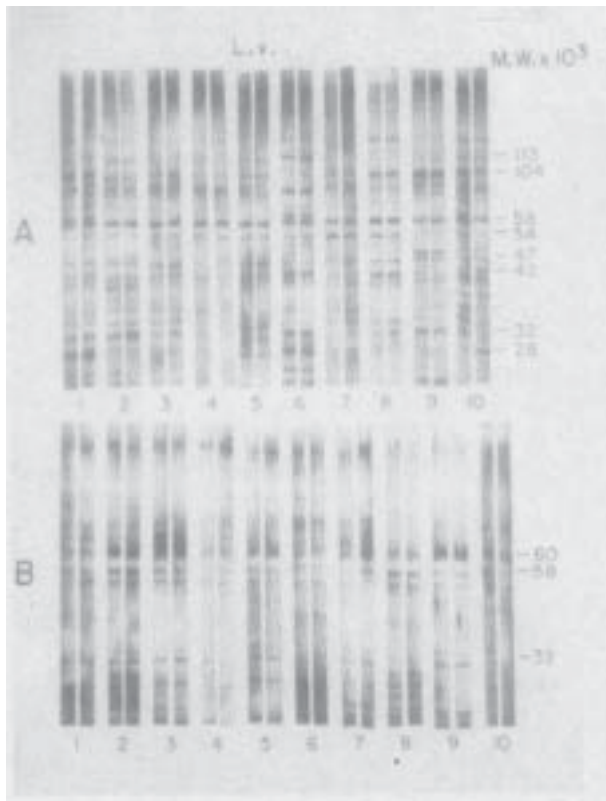


Figura 29. Similar a la figura 23, pero usando como antígenos *L. venezuelensis*, siendo iguales los sueros de los distintos pacientes.

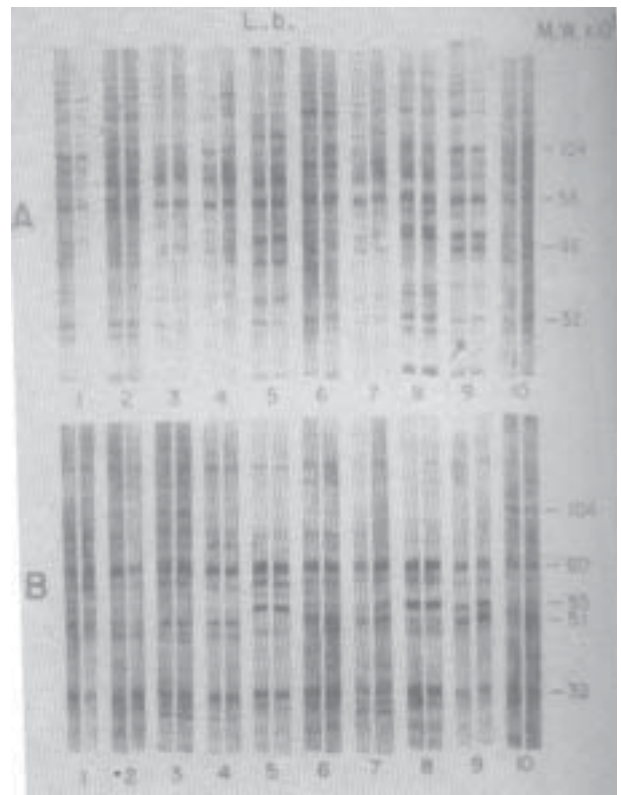


Figura 30. Similar a la figura 23, pero usando como antígenos *L. brasiliensis*, siendo iguales los sueros de los distintos pacientes.

valores de IDR después de cada dosis de vacuna, no encontrando diferencias significativas entre los distintos grupos después de la última dosis de vacuna (Figura 18 y Cuadro 16). Al comparar los valores de la IDR de los prevacunales negativos y positivos de “La Planta” sí se encuentran diferencias estadísticamente significativas después de la última vacunación (Figura 18 y Cuadro 16).

En la comunidad de “La Planta” en 114 personas vacunadas con IDR negativa o positiva previa han aparecido hasta el momento de escribir este trabajo (septiembre de 1994) 18 casos de leishmaniasis distribuidos así: a)- 5 de ellos con una dosis de vacuna, de los cuales en 2 la lesión desapareció con refuerzo de vacuna y 3 ameritaron tratamiento con Glucantime®. b)- 4 en pacientes con dos dosis de vacuna, en los cuales la lesión remitió con refuerzo de vacuna. c)- 9 casos con tres dosis de vacuna de los cuales en 2 la lesión desapareció sin tratamiento

alguno, en 3 desapareció con refuerzo de la vacuna, y sólo 4 necesitaron tratamiento con Glucantime®. En síntesis, de 18 casos aparecidos en vacunados sólo 7 ameritaron tratamiento con Glucantime®, lo cual alcanza a un 6,14% de la población total de personas vacunadas (Cuadro 17 y Figura 19).

En 91 personas que no recibieron vacunas y que tenían IDR prevacunal positiva o negativa han aparecido 37 casos de leishmaniasis (40,66%), 2,57 veces mayor que el grupo de personas vacunadas (Cuadro 17 y Figura 20). Al desglosar en esta misma comunidad, los grupos vacunados y no vacunados de acuerdo a la IDR negativa o positiva prevacunal, encontramos 85 personas vacunadas que presentaron 15,29% de infectados de los cuales en un 2,35% la lesión remitió sin tratamiento, el 4,71% mostró curación clínica con refuerzos de vacuna, y el 8,24% ameritó tratamiento con Glucantime®, permaneciendo el 84,71% sanos sin observar casos

Cuadro 13
Intradermoreacción después de cada dosis de vacuna
distribuida por sexo y grupos de edad

VILLAS DEL INGENIO

| DE EDAD | GRUPOS# PERSONAS | | | IDR POST 1a DOSIS | | | # PERSONAS | | | IDR POST 2a DOSIS | | | # PERSONAS | | | IDR POST 3a DOSIS | | | | | |
|-----------|------------------|-----|-----------|-------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-------------------|------------|-------------------|------------|-----------|------------|-------------------|------------|-----------|---|------|---|
| | T | FM | M | T | F | X±DE | M | T | FM | M | T | F | X±DE | M | T | FM | M | T | F | X±DE | M |
| [0-5] | 9 | 3 | 6 | 6,52±0,74 | 6,93±0,83 | 6,31±0,67 | 4 | 3 | 1 | 7,93±2,78 | 8,62±2,95 | 5,86 | 10 | 5 | 5 | 10,0±4,70 | 10,49±6,55 | 9,52±2,51 | | | |
| [6-12] | 5 | 3 | 2 | 7,58±1,88 | 7,17±1,38 | 8,21±3,02 | 9 | 7 | 2 | 11,12±4,69 | 11,53±5,33 | 9,70±0,56 | 13 | 8 | 5 | 8,41±2,75 | 8,39±2,52 | 8,45±3,39 | | | |
| [13-18] | 8 | 6 | 2 | 8,12±3,13 | 8,24±3,35 | 7,76±3,49 | 4 | 2 | 2 | 11,55±4,18 | 11,40±5,41 | 11,70±4,82 | 7 | 3 | 4 | 10,09±1,89 | 10,45±1,51 | 9,82±2,31 | | | |
| [19-25] | 3 | 3 | 0 | 5,83±0,73 | 5,83±0,73 | - | 4 | 3 | 1 | 8,27±1,87 | 8,42±2,26 | 7,81 | 5 | 5 | 0 | 11,95±7,36 | 11,95±7,36 | - | | | |
| [26-40] | 12 | 5 | 7 | 9,90±3,80 | 11,09±4,46 | 9,05±3,36 | 10 | 4 | 6 | 10,54±4,25 | 12,71±4,24 | 9,10±3,93 | 16 | 8 | 8 | 10,19±4,10 | 10,55±2,12 | 9,83±5,49 | | | |
| [41-65] | 10 | 6 | 4 | 7,11±2,44 | 5,94±1,17 | 8,85±2,97 | 6 | 6 | 0 | 11,32±4,11 | 11,32±4,11 | - | 6 | 5 | 1 | 11,20±4,48 | 10,02±3,83 | 17,11 | | | |
| >65 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0 | 5,17 | 5,17 | - | | |
| TOTAL | 472 | 262 | 190 | 7,85±2,90 | 7,70±3,09 | 7,66±3,14 | 372 | 212 | 10,39±3,97 | 10,93±4,17 | 9,25±3,40 | 583 | 523 | 9,92±4,11 | 10,01±4,18 | 9,78±4,1 | | | | | |
| [0-5] | 1 | 1 | 0 | 4,78 | 4,78 | - | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| [6-12] | 4 | 3 | 1 | 3,15±2,14 | 4,19±0,55 | - | 3 | 2 | 1 | 4,12±0,70 | 4,41±0,71 | 3,56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| [13-18] | 1 | 1 | 0 | 4,06 | 4,06 | - | 1 | 1 | 0 | 4,65 | 4,65 | - | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| [19-25] | 2 | 2 | 0 | 3,88±0,7 | 3,88±0,7 | - | 2 | 2 | 0 | 4,37±0,21 | 4,37±0,21 | - | 2 | 2 | 0 | 2,33±3,29 | 2,33±3,29 | 0 | | | |
| [26-40] | 4 | 4 | 0 | 4,14±0,3 | 4,14±0,3 | - | 1 | 0 | 1 | 4,51 | 4,51 | 4,51 | 1 | 1 | 0 | 4,78 | 4,78 | 0 | | | |
| [41-65] | 1 | 0 | 0 | - | - | - | 1 | 1 | 0 | 4,22 | 4,22 | - | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | |
| >65 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | 0 | 0 | 0 | - | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | |
| TOTAL | 13 | 12 | 1 | 3,87±1,24 | 4,20±0,44 | - | 9 | 7 | 2 | 3,83±1,49 | 3,83±1,49 | 3,77±1,74,04±0,67 | 5 | 4 | 1 | 1,89±2,58 | 1,89±2,58 | 0 | | | |
| POBLACION | 603 | 822 | 6,99±3,10 | 6,60±3,04 | 7,66±3,14 | 463 | 214 | 9,11±4,46 | 9,37±4,80 | 8,51±3,66 | 633 | 924 | 9,28±4,56 | 9,22±4,67 | 9,37±4,48 | | | | | | |

Cuadro 14
Intradermoreacción (IDR) después de cada dosis de vacuna distribuida por sexo y grupos de edad

| GRUPOS DE EDAD | IDR POST 1a DOSIS (mm) | | | | | | IDR POST 2a DOSIS (mm) | | | | | | IDR POST 3a DOSIS (mm) | | | | | |
|----------------|------------------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------------------|------------|---|----|---|---|
| | T | FM | T | F | M | T | FM | T | F | M | T | FM | T | F | M | FM | T | F |
| [0-5] | 1 1 0 | 7,13 | 7,13 | 7,93±3,41 | 5,84±0,60 | 10,01±3,97 | 6 3 3 | 7,93±3,41 | 5,84±0,60 | 10,01±3,97 | 8 4 4 | 8,51±2,13 | 8,20±2,39 | 8,81±2,15 | | | | |
| [6-12] | 6 2 4 | 9,71±2,70 | 11,74±3,64 | 8,70±1,92 | 7,89±1,62 | 7,53±1,24 | 9 5 4 | 7,89±1,62 | 8,19±1,96 | 7,53±1,24 | 13 6 7 | 10,79±4,79 | 12,68±6,40 | 9,18±2,26 | | | | |
| [13-18] | 2 1 1 | 10,21±5,42 | 6,38 | 14,04 | 6,18±0 | 7,15 | 2 1 1 | 6,18±0 | 5,17 | 7,15 | 4 3 1 | 9,19±3,00 | 7,96±2,11 | 12,86 | | | | |
| [19-25] | 2 2 0 | 6,71±1,20 | 6,71±1,20 | [-] | 6,76±0,84 | 6,38 | 3 2 1 | 6,76±0,84 | 6,96±1,10 | 6,38 | 4 2 2 | 9,21±3,88 | 6,21±0,65 | 12,20±2,98 | | | | |
| [26-40] | 1 1 0 | 9,37 | 9,37 | [-] | 11,32±2,18 | [-] | 2 2 0 | 11,32±2,18 | 11,32±2,18 | [-] | 5 4 1 | 13,44±4,29 | 11,78±2,49 | 20,07 | | | | |
| [41-65] | 1 1 0 | 5,75 | 5,75 | [-] | 8,17±2,81 | 10,15 | 2 1 1 | 8,17±2,81 | 6,18 | 10,15 | 10 5 5 | 12,81±4,12 | 12,27±4,53 | 13,34±4,13 | | | | |
| >65 | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 1 0 1 | 24,2 | [-] | 24,2 | | | | |
| TOTAL | 13 8 5 | 8,80±2,85 | 8,19±2,83 | 9,77±2,91 | 7,93±2,35 | 7,67±2,24 | 241410 | 7,93±2,35 | 7,67±2,24 | 8,29±2,56 | 452421 | 11,20±4,53 | 10,57±4,47 | 11,88±4,60 | | | | |
| [0-5] | 9 6 3 | 2,06±2,03 | 2,39±1,96 | 1,41±2,44 | 2,39±3,38 | 4,78 | 2 1 1 | 2,39±3,38 | 4,78 | 0 | 2 1 1 | 4,04±0,67 | 4,51 | 3,56 | | | | |
| [6-12] | 2 2 0 | 2,33±3,29 | 2,33±3,29 | [-] | 2,25 | [-] | 1 0 1 | 2,25 | [-] | 2,25 | 1 1 0 | 0 | 0 | [-] | | | | |
| [13-18] | 2 2 0 | 2,26±3,19 | 2,26±3,19 | [-] | 1,87±2,64 | 1,87±2,64 | 2 2 0 | 1,87±2,64 | 1,87±2,64 | [-] | 1 1 0 | 0 | 0 | [-] | | | | |
| [19-25] | 2 2 0 | 0 | 0 | [-] | 3,56 | 3,56 | 1 1 0 | 3,56 | 3,56 | [-] | 1 1 0 | 4,06 | 4,06 | [-] | | | | |
| [26-40] | 2 2 0 | 3,36±0,54 | 3,36±0,54 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | | | | |
| [41-65] | 1 1 0 | 4,78 | [-] | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | | | | |
| >65 | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | | | | |
| TOTAL | 1815 3 | 2,18±2,08 | 2,33±2,06 | 1,41±2,44 | 2,39±2,02 | 3,02±2,08 | 6 4 2 | 2,39±2,02 | 3,02±2,08 | 1,13±1,59 | 5 4 1 | 2,43±2,24 | 2,14±2,48 | 3,56 | | | | |
| POBLACION | 3123 8 | 4,95±4,09 | 4,37±3,66 | 6,63±5,03 | 6,82±3,18 | 6,64±2,93 | 301812 | 6,82±3,18 | 6,64±2,93 | 7,09±3,65 | 502822 | 10,34±5,08 | 9,36±5,17 | 11,52±4,82 | | | | |

Cuadro 15
Intradermoreacción (IDR) después de cada dosis de vacuna distribuida por sexo y grupos de edad

LOS GALPONES

O'DALY CARBONELL JA, ET AL

| GRUPOS DE EDAD | IDR POST 1a DOSIS (mm) | | | IDR POST 2a DOSIS (mm) | | | IDR POST 3a DOSIS(mm) | | | | |
|----------------|------------------------|-----------|-----------|------------------------|------------|-----------|-----------------------|--------|-----------|------------|-----------|
| | T | F | M | T | F | M | T | F | M | | |
| [0-5] | 2 1 1 | 5,11±0,09 | 5,17 | 4 1 3 | 10,55±3,00 | 12,31 | 9,96±3,38 | 5 3 2 | 8,27±2,72 | 9,72±2,58 | 6,10±0,81 |
| [6-12] | 2 1 1 | 7,61±0,62 | 8,05 | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 5 2 3 | 7,67±1,20 | 7,73±0,11 | 7,63±1,70 |
| [13-18] | 0 0 0 | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 3 3 0 | 8,23±0,16 | 8,23±0,16 | [-] |
| [19-25] | 1 1 0 | 8,13 | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 3 2 1 | 8,33±2,98 | 10,00±1,08 | 5,01 |
| [26-40] | 2 2 0 | 5,56±0,73 | 5,56±0,73 | 3 2 1 | 7,89±3,92 | 8,70±5,18 | 6,28 | 3 2 1 | 7,01±1,62 | 6,07 | 8,88 |
| [41-65] | 0 0 0 | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| >65 | 0 0 0 | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 1 1 0 | 9,64 | 9,64 | [-] |
| TOTALES + | 7 5 2 | 6,38±1,39 | 6,61±2,04 | 7 3 4 | 9,41±3,41 | 9,90±4,21 | 9,04±3,32 | 2013 7 | 8,29±2,25 | 8,54±1,78 | 7,89±2,95 |
| [0-5] | 2 0 2 | 4,37±0,21 | 4,37±0,21 | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| [6-12] | 4 1 3 | 1,54±1,78 | 1,06±1,84 | 4 1 3 | 4,14±0,66 | 4,51 | 4,02±0,75 | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| [13-18] | 0 0 0 | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| [19-25] | 0 0 0 | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| [26-40] | 0 0 0 | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| [41-65] | 0 0 0 | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| >65 | 1 1 0 | [-] | [-] | 1 1 0 | [-] | [-] | [-] | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| TOTALES - | 7 2 5 | 2,13±2,06 | 2,38±2,23 | 5 2 3 | 4,16±0,57 | 4,37±0,21 | 4,02±0,75 | 0 0 0 | [-] | [-] | [-] |
| POBLACION | | | | | | | | | | | |
| TOTAL | 14 7 7 | 4,26±2,78 | 4,92±2,73 | 12 5 7 | 7,22±3,71 | 7,69±4,25 | 6,89±3,59 | 2013 7 | 8,29±2,25 | 8,54±1,78 | 7,89±2,95 |

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 16
Comparación de la intradermoreacción (IDR) postvacunal entre prevacunales positivos y negativos en las tres localidades de "El Ingenio"

| PREVACUNALES | | | | |
|------------------|----------------------|----------|----------------|----------|
| IDR post vacunal | "Villas del Ingenio" | | "Los Galpones" | |
| | NEG | POS | NEG | POS |
| Promedio | 9,242909 | 7,118333 | 8,089375 | 8,946 |
| # observaciones | 55 | 16 | 16 | 4 |
| Desv. estándar | 4,578993 | 4,339278 | 2,396004 | 1,738054 |
| Error estándar | 0,617431 | 1,08482 | 0,599001 | 0,869027 |

| PRUEBA t NO PAREADA | | |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| diferencia promedio: | -2,124577 | 0,8566256 - 2,124577 |
| intervalo de confianza 95% : | -4,69 a 0,441 | -1,84 a 3,55 |
| P para dos colas : | 0,1031 no significativo | 0,5136 no significativo |

| 'LA PLANTA' | | | |
|------------------|--|----------|----------|
| IDR post vacunal | | NEG | POS |
| Promedio | | 9,250286 | 12,71138 |
| # observaciones | | 35 | 16 |
| Desv. estándar | | 4,826977 | 4,94591 |
| Error estándar | | 0,815908 | 1,236478 |

| PRUEBA t NO PAREADA | | |
|------------------------------|--|-----------------------|
| diferencia promedio: | | 3,461089 |
| intervalo de confianza 95% : | | 0,51-6,41 |
| P para dos colas : | | 0,0224, significativo |

activos hasta septiembre de 1994 (Cuadro 18 y Figura 21).

En las 29 personas con IDR positiva prevacunal el 17,24% mostró desaparición de las lesiones con refuerzos de la vacuna no encontrando casos de remisión espontánea de las lesiones, ni tampoco enfermos no curados que ameritaran tratamiento con Glucantime®, permaneciendo hasta ahora el 82,76% del grupo sanos (Cuadro 18 y Figura 22).

En el grupo de 57 personas con IDR positiva prevacunal, que no recibieron vacuna alguna

encontramos 17 casos de leishmaniasis (29,82%), en 8 de los cuales la lesión remitió espontáneamente (14,04%), en dos con la vacuna usada como terapia (3,51%) y 6 que necesitaron tratamiento con Glucantime® (10,53%). Sólo el 70,18% del grupo en cuestión no presentó la enfermedad (Cuadro 18 y Figura 23).

En las 34 personas no vacunadas con IDR negativa prevacunal, encontramos 20 casos de leishmaniasis (58,82%) de los cuales en 5 la lesión desapareció sin tratamiento (14,71%), en 4 con la vacuna usada

Cuadro 17
Evolucion de los casos de leishmaniasis en "La Planta" en vacunados y no vacunados con IDR negativa o positiva prevacunales, agosto 1993-septiembre 1994.

| 114 VACUNADOS con IDR neg. o pos. previa | | | | | | |
|--|-----------------|--------------|------------|--------|------------|-------|
| Dosis de vacuna | Curados | | No curados | | Total | |
| | Sin tratamiento | Con refuerzo | Glucantime | Activo | Infectados | Sanos |
| Una (n=38) | 0 | 2 | 3 | 0 | 5 | 33 |
| Dos(n=14) | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 10 |
| Tres(n=62) | 2 | 3 | 4 | 0 | 9 | 53 |
| TOTAL(n=114) | 2 | 9 | 7 | 0 | 18 | 96 |
| % | 1,75 | 7,89 | 6,14 | 0 | 15,79 | 84,21 |

| 91 NO VACUNADOS CON IDR neg. o pos. previa | | | | | | |
|--|---------|-----------------|-------|------------|------------|-------|
| Dosis de vacuna | Curados | | | No curados | | |
| | Total | Sin tratamiento | Sanos | Con vacuna | Glucantime | |
| ninguna (n=91) | 13 | 6 | 11 | 7 | 37 | 54 |
| % | 14,29 | 6,59 | 12,09 | 7,69 | 40,66 | 59,34 |

como tratamiento (11,76%), 5 pacientes ameritaron tratamiento con glucantime (14,71%) y 6 personas infectadas permanecen activas (17,65%) pues acaban de ser diagnosticadas hace 2 semanas. Es de hacer notar que en este grupo encontramos el menor número (41,18%) de personas sanas (Cuadro 18 y Figura 24).

Al comparar los casos de leishmaniasis en cada uno de los grupos vacunados y no vacunados, encontramos 13 casos (15,29%) en 85 vacunados con IDR prevacunales negativa, 5 casos (17,24%) en 29 vacunados con IDR positiva prevacunales, 17 casos (29,82%) en 57 personas no vacunadas con IDR prevacunales positiva y 20 casos (58,82%) en 34 personas con IDR negativa previa, es decir 3,84 veces más que su homólogo vacunado con IDR negativa prevacunales (Cuadro 18 y Figura 25).

La distribución espacial de casos en "La Planta" puede observarse en el Cuadro 19, donde el 55,61% fue vacunado y el 44,39% no recibió vacuna alguna, conviviendo ambos grupos en el mismo ambiente familiar. De las 114 personas vacunadas sólo 18 han presentado leishmaniasis hasta ahora (15,79%) permaneciendo el 84,21% sanos. En cambio en el grupo no vacunado aproximadamente la mitad

(40,66%) ha presentado la enfermedad. En la Figura 26 se presenta la localización de las casas en la comunidad de "La Planta" descritas en el Cuadro 19. En las casas sombreadas han aparecido casos de leishmaniasis tanto en vacunados como en controles como se detalla en el Cuadro 19 correspondiendo el mayor porcentaje de infección al grupo control no vacunado (40,66%).

En "Los Galpones" hemos encontrado 4 casos de leishmaniasis (25%) en controles no vacunados con IDR negativa previa, en contraste a 2 casos (5%) en vacunados con IDR negativa prevacunales, no apareciendo casos en el grupo de vacunados con IDR positiva previa a la vacunación. El mismo análisis en "Villas del Ingenio" arrojó sólo 2 casos (0,94%) en vacunados con IDR negativa previa y ningún caso en personas vacunadas con IDR positiva previa o en no vacunados con IDR negativa prevacunales (no se muestran los datos).

Los pacientes vacunados sin tratamiento tardan $4,2 \pm 2,17$ semanas para la desaparición de las lesiones, similar a los vacunados que ameritaron Glucantime® ($5,44 \pm 2,70$ semanas). En cambio los pacientes no vacunados que ameritaron Glucantime® tardaron $14,0 \pm 8,21$ semanas para la desaparición

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 18

Evolución de los casos de leishmaniasis en vacunados y no vacunados en "La Planta", Guatire, Edo. Miranda, agosto 1993-septiembre 1994.

85 VACUNADOS IDR negativa.

| Dosis de vacuna | Curados | | No curados | | Total | |
|-----------------|-----------------|--------------|------------|--------|------------|-------|
| | Sin tratamiento | Con refuerzo | Glucantime | Activo | Infectados | Sanos |
| Una (n=28) | 0 | 1 | 3 | 0 | 4 | 24 |
| Dos(n=9) | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 8 |
| Tres(n=48) | 2 | 2 | 4 | 0 | 8 | 40 |
| TOTAL(n=85) | 2 | 4 | 7 | 0 | 13 | 72 |
| % | 2,35 | 4,71 | 8,24 | 0 | 15,29 | 84,71 |

29 VACUNADOS CON IDR positiva.

| Dosis de vacuna | Curados | | No curados | | Total | |
|-----------------|-----------------|--------------|------------|--------|------------|-------|
| | Sin tratamiento | Con refuerzo | Glucantime | Activo | Infectados | Sanos |
| Una (n=10) | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 9 |
| Dos(n=5) | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| Tres(n=14) | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 13 |
| TOTAL(n=29) | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 24 |
| % | 0,00 | 17,24 | 0,00 | 0,00 | 17,24 | 82,76 |

57 NO VACUNADOS CON IDR positiva.

| Dosis de vacuna | Curados | | No curados | | Total | |
|-----------------|-----------------|--------------|------------|--------|------------|-------|
| | Sin tratamiento | Con refuerzo | Glucantime | Activo | Infectados | Sanos |
| ninguna (n=57) | 8 | 2 | 6 | 1 | 17 | 40 |
| | 14,04 | 3,51 | 10,53 | 1,75 | 29,82 | 70,18 |

34 NO VACUNADOS IDR negativa.

| Casos | Curados | | No curados | | Total | |
|-------|-----------------|--------------|------------|--------|------------|-------|
| | Sin tratamiento | Con refuerzo | Glucantime | Activo | Infectados | Sanos |
| | 5 | 4 | 5 | 6 | 20 | 14 |
| % | 14,71 | 11,76 | 14,71 | 17,65 | 58,82 | 41,18 |

de las lesiones. Los tiempos más largos de curación correspondieron a los pacientes no vacunados con nuestra vacuna polivalente que adquirieron la enfermedad y que posteriormente recibieron una mezcla de promastigotes completos muertos por calor, unidos al BCG (61). Estos pacientes tardaron $39,33 \pm 19,7$ semanas para que la lesión desapareciera después del tratamiento con Glucantime® (Cuadro 20).

La lesión ulcerosa, producto de la leishmaniasis cutánea, después de 1 mes de observación, fue mayor en las personas no vacunadas que en las personas

vacunadas, como se desprende del estudio estadístico presentado en el Cuadro 21 donde la diferencia entre los diámetros de ambos grupos tiene un valor de p de 0,002 el cual es estadísticamente significativo.

La comparación de la incidencia de la enfermedad en "La Planta" entre vacunados y no vacunados sin tomar en cuenta la IDR negativa o positiva prevacunacional, reveló una diferencia significativa con un riesgo relativo de 3,6 veces de contraer la enfermedad en no vacunados por encima de los vacunados, cifra que alcanza sólo a 0,274 en el grupo de personas que han recibido la vacuna, y que

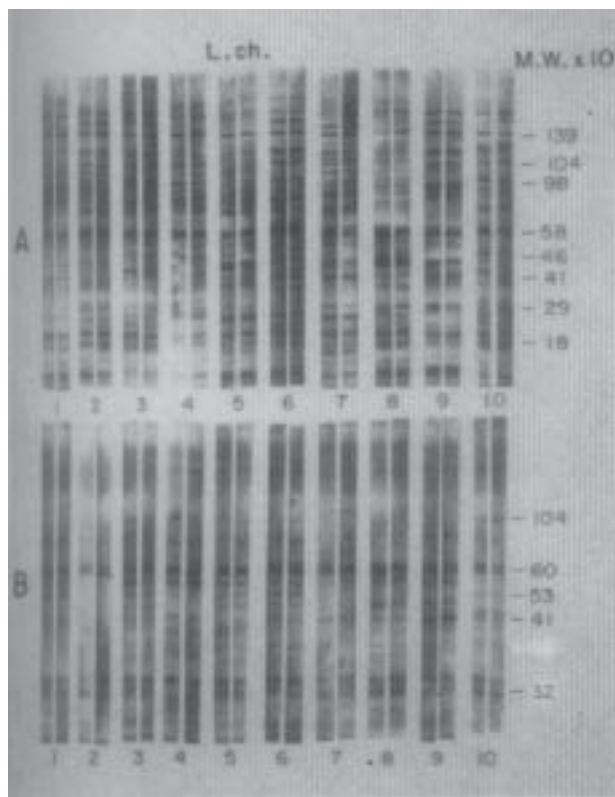


Figura 31. Similar a la figura 23, pero usando como antígenos *L. chagasi*, siendo iguales los sueros de los distintos pacientes.

difiere significativamente de 1, con límites de confianza del 95% de 0,143 y 0,529 lo cual supone una eficiencia muy alta en el procedimiento de vacunación (Cuadro 22).

La prueba de ELISA practicada en 20 sueros de pacientes vacunados no dio diferencias en los valores de densidad óptica antes y un mes después de la vacunación, usando distintos antígenos de cada una de las especies de leishmanias que se encuentran en la vacuna así como también al emplear otros antígenos aislados de los parásitos leishmánicos en cultivo, los cuales resultaron positivos al utilizar sueros de pacientes con leishmaniasis (Cuadro 23).

Los resultados de la ELISA con distintos antígenos se corroboran con una prueba de ELISA más extensa practicada en 142 personas, usando en las placas los antígenos de la vacuna. Tanto los sueros de pacientes prevacunales negativos, como los pertenecientes a personas prevacunales positivas,

no mostraron variación en los valores obtenidos antes y 1 mes después de la vacunación (Cuadro 24), lo cual contrasta con el aumento en los valores de la IDR, indicativos del desarrollo de inmunidad celular en los dos grupos prevacunales negativos y positivos, después de ser vacunados con tres dosis de vacuna como hemos detallado en los párrafos precedentes. Los pacientes con IDR prevacunal positiva, indicativo de haber contraído la enfermedad mostraron valores de ELISA positivos, mayores de 0,5 unidades, lo cual supone la existencia de una respuesta humoral una vez que la persona ha tenido leishmaniasis.

En la Figura 27 se observa el patrón de bandas proteicas tanto en las muestras de los parásitos de las distintas especies de leishmanias, tratados con TLCK y extraídos con NP40, usadas en la preparación de la vacuna (A), como en los amastigotes completos sin ningún tratamiento (B). En estos últimos se observan de 28 a 30 bandas entre 106 y 21 kDa, número que disminuye a 6-8 entre 72 y 17 kDa, en la preparación correspondiente a la vacuna. Es de hacer notar las bandas anchas y difusas en las áreas de 32, 21 y 17 kDa en La, Lv y Lb correspondientes a material de bajo peso molecular en las muestras correspondientes a la vacuna (Figura 27 A).

En los parásitos completos existe una banda densa y ancha en todas las especies de 58 kDa y de menos anchura de 70, 76, y 86 kDa. También se observan bandas de menor peso molecular bien definidas de 28, 31 y 35 kDa (Figura 27 B).

Los datos de la ELISA se corroboran con el estudio de la electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa y su posterior reacción con el suero de las personas antes y un mes después de la vacunación, donde los patrones de bandas son similares, variando sólo la distribución de las bandas reveladas con el mismo suero en las distintas especies (Figuras 28-31).

En el caso de los parásitos completos (A en cada figura) se observan de 20-25 bandas de distinta intensidad y anchura. En todas las especies es constante una banda ancha de 58 kDa presente tanto en los parásitos completos que aumenta a 60 kDa en las preparaciones de la vacuna. El resto de las bandas muestra una distribución irregular, pues algunas se observan en el suero de un paciente pero no en otro, persistiendo sólo el mismo patrón en un mismo paciente antes y después de la vacunación (Figura 28).

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 19.
Distribución espacial de casos en "La Planta", según esquema de la Fig. 26,
Guatire, Edo. Miranda, Agosto 1993 - noviembre 1994

| Número de la casa | Personas | Vacunados | No Vacunados | Infectados Vacunados | No Infectados Vacunados | Infectados No vacunados | No infectados No vacunados |
|-------------------|----------|-----------|--------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1 | 9 | 5 | 4 | 1 | 4 | 3 | 1 |
| 2 | 6 | 1 | 5 | 0 | 1 | 4 | 1 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 7 | 5 | 2 | 0 | 5 | 0 | 2 |
| 7 | 13 | 11 | 2 | 0 | 11 | 0 | 2 |
| 8 | 9 | 6 | 3 | 0 | 6 | 0 | 3 |
| 9 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 10 | 5 | 3 | 2 | 0 | 3 | 1 | 1 |
| 11 | 6 | 4 | 2 | 0 | 4 | 0 | 2 |
| 12 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 13 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 14 | 3 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| 15 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 16 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 17 | 5 | 1 | 4 | 1 | 0 | 4 | 0 |
| 18 | 15 | 10 | 5 | 0 | 10 | 3 | 2 |
| 19 | 11 | 11 | 0 | 1 | 10 | 0 | 0 |
| 20 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 21 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 22 | 3 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 23 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 24 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | 7 | 6 | 1 | 1 | 5 | 1 | 0 |
| 27 | 6 | 0 | 6 | 0 | 0 | 5 | 1 |
| 28 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 29 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 30 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 4 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 |
| 33 | 5 | 3 | 2 | 0 | 3 | 1 | 1 |
| 34 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 35 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 36 | 4 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| 37 | 6 | 5 | 1 | 0 | 5 | 0 | 1 |
| 38 | 5 | 4 | 1 | 0 | 4 | 0 | 1 |
| 39 | 3 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 40 | 6 | 6 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| 41 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 42 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 43 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 44 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 45 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 46 | 10 | 3 | 7 | 1 | 2 | 2 | 5 |
| 47 | 5 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 48 | 4 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| 49 | 6 | 2 | 4 | 0 | 2 | 0 | 4 |
| TOTAL | 205 | 114 | 91 | 18 | 96 | 37 | 54 |
| % | 100 | 55,61 | 44,39 | 15,79 | 84,21 | 40,66 | 59,34 |

El porcentaje de infectados y no infectados se calculó en base al número de personas en vacunados y controles, respectivamente

Cuadro 20
Comparación de los tiempos de desaparición de las lesiones
en pacientes vacunados y no vacunados sometidos a distintos tratamientos

| Número de Pacientes | | Tiempo en semanas | | |
|---------------------|--------------------------------------|-------------------|--------|------------------|
| | | X±DE | X ± DE | p |
| 9 | Vacunados sin tratamiento | 4,2 ± 2,17 | | |
| 5 | “ vs. Vacunados + Glucantime | 5,44 ± 2,70 | 0,6533 | No significativo |
| 11 | “ vs. No vacunados + IT + Glucantime | 39,33 ± 19,77 | 0,029 | Significativo |
| 8 | “ vs. No vacunados + glucantime | 14,0 ± 8,21 | 0,038 | Significativo |

Cuadro 21
Comparación del tamaño de las lesiones en vacunados
y no vacunados en “La Planta” después de 1 mes de observación

| Vacunados | No vacunados |
|--|------------------------|
| Promedio tamaño de las lesiones | 1,36 |
| Pacientes | 2,5 |
| Desviación estándar | 16 |
| Error estándar | 29 |
| Valor mínimo | 0,865 |
| Valor máximo | 12,21 |
| | 0,216 |
| | 0,226 |
| | 0,3 |
| | 0,5 |
| | 3,75 |
| Prueba t no pareada | |
| Diferencia entre promedios | 1,14 |
| Intervalo de 95% de confianza de la diferencia | 0,4436412 - 1,838255 |
| Valor de p dos colas | 0,0020 , significativo |

En la muestra estudiada fue imposible encontrar dos sueros de pacientes distintos con idéntica distribución de bandas antigénicas a pesar de que son el resultado de una reacción realizada con el mismo papel electrotransferido usando el mismo antígeno para todo el conjunto de 10 sueros en cada corrida (Figuras 28-31).

Por ejemplo al comparar el suero #2 con el # 3 usando como antígenos *L. amazonensis* (Figura 28 A) observamos una estructura bastante similar, pero

la banda en el área de 45 kDa presente en el suero # 3 está ausente del suero # 2. Al comparar el # 3 con el #4 y el #6, la banda de 100 kDa presente en los sueros # 8, 9 y 10 está ausente de los sueros 4, 5 y 6, y así sucesivamente con otras bandas, pues la banda de 38 kDa de los sueros 3, 8, 9 y 10, está ausente de los sueros 4, 5, 6 y 7 (Figura 28 A).

Al realizar la reacción del suero del paciente con los antígenos de la vacuna, el número se reduce a 8 - 10 bandas antigénicas al usar como antígenos *L.*

VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 22

Comparación de la incidencia de la enfermedad entre vacunados y no vacunados (IDR + o -) en "La Planta" independiente del N° de dosis de vacuna aplicada
Prueba exacta de Fisher para tablas 2 x 2.

| | Enfermos | Sanos |
|--------------|----------|-------|
| Vacunados | 18 | 96 |
| No vacunados | 37 | 54 |

P para dos colas 0,00007

Riesgo relativo en vacunados: 0,274. Intervalo de confianza 95% 0,143 - 0,529

Riesgo relativo en no vacunados: 3,6. Intervalo de confianza 95% 1,87 - 6,926

La asociación entre las variables es significativa

ch, L. v y L. b, y de 10-14 con la L. a, manteniéndose una banda común de 60 kDa y apareciendo una banda estrecha por debajo de ésta, de 58 kDa presente en todas las muestras, así como también un duplete en el área de 32 kDa. Este último duplete se encuentra en casi todas las muestras de suero en el caso de usar como antígenos tanto los parásitos completos como la preparación de la vacuna (Figuras 28 - 31 A y B).

Al usar como antígeno la L.v se repite el fenómeno observado con la L.a ya que no es posible encontrar dos sueros de pacientes distintos con el mismo patrón de bandas, a pesar de que el suero de la misma persona antes y después de la vacunación no muestra diferencia alguna. En el caso de la L.v (Figura 29 A) el número de bandas con parásitos completos es de aproximadamente 20, mientras que cuando se usa la preparación de antígeno correspondiente a la vacuna

Cuadro 23

Prueba de ELISA con antígenos de las especies de leishmanias usadas en la vacuna antes y después de la vacunación (n = 20)

Densidad óptica 405 nm

| Cepas de leishmaniasis | Sueros de pacientes Leishmaniasis cutánea | | Sueros de pacientes Leishmaniasis cutánea | | Leishmaniasis cutánea |
|------------------------|---|----------------|---|----------------|-----------------------|
| | Pre vacunales | Post vacunales | Pre vacunales | Post vacunales | |
| | PROT SUP PAR VIVOS | | PROT SUP TLCK | | |
| La | 0,12±0,00 | 0,22±0,07 | 0,52±0,16 | 0,01±0,00 | 0 |
| Lv | 0,25±0,00 | 0 | 0,24±0,03 | 0,05±0,00 | 0 |
| Lb | 0,19±0,04 | 0 | 0,29±0,04 | 0,08±0,00 | 0,14±0,01 |
| Lch | 0,41±0,07 | 0,1±0,00 | 0,42±0,08 | 0 | 0,09±0,01 |
| | SED PAR VIVOS | | SED PAR TLCK (VACUNA) | | |
| La | 0,25±0,02 | 0,15±0,01 | 0,85±0,14 | 0,34±0,01 | 0,92±0,14 |
| Lv | 0,37±0,00 | 0,26±0,16 | 0,69±0,05 | 0,39±0,08 | 0,82±0,03 |
| Lb | 0,26±0,00 | 0,34±0,05 | 0,82±0,21 | 0,15±0,01 | 0,59±0,01 |
| Lch | 0,11±0,00 | 0,23±0,03 | 0,95±0,09 | 0,37±0,04 | 0,82±0,04 |
| | PAR SIN FIJAR | | PROT EXCR | | |
| La | 0,28±0,00 | 0,42±0,14 | 0,76±0,12 | 0,44±0,15 | 0,74±0,01 |
| Lv | 0,24±0,01 | 0,28±0,06 | 0,58±0,03 | 0,34±0,00 | 0,69±0,03 |
| Lb | 0,24±0,04 | 0,17±0,04 | 0,51±0,04 | 0,37±0,03 | 0,47±0,03 |
| Lch | 0,28±0,03 | 0,21±0,08 | 0,55±0,04 | 0,47±0,02 | 0,32±0,00 |

PROT SUP PAR VIVOS: Proteínas de superficie de parásitos vivos

PROT SUP TLCK: Proteínas de superficie de parásitos tratados con TLCK

SED PAR VIVOS: Sedimento de parásitos vivos post - NP40

SED PAR TLCK (VACUNA): Sedimento de parásitos post - TLCK y NP40

PAR SIN FIJAR: Parásitos vivos sin fijar

PROT EXCR: Proteínas excretadas al medio cultivo

Cuadro 24
Reacción de ELISA con los antígenos de la vacuna en sueros de 142 personas
antes y un mes después de la vacunación en grupos prevacunales negativos y positivos

| | L. amazonensis | L. venezuelensis | L. brasiliensis | L. chagasi |
|-----------------|--|------------------|-----------------|---------------|
| Suero | Pacientes con intradermoreacción negativa prevacunal | | | |
| Pre-vacunación | 0,2900±0,1309 | 0,3506±0,2192 | 0,1263±0,3463 | 0,3464±0,1367 |
| Post-vacunación | 0,2905±0,1387 | 0,3879±0,1845 | 0,4103±0,1857 | 0,4042±0,1705 |
| | Pacientes con intradermoreacción positiva prevacunal | | | |
| Pre-vacunación | 0,7445±0,3152 | 0,5035±0,2665 | 0,5983±0,2793 | 0,6614±0,2072 |
| Post-vacunación | 0,7374±0,3154 | 0,5312±0,2319 | 0,6842±0,2875 | 0,6400±0,1708 |

el número desciende a 6-8, predominando las bandas de bajo peso molecular siendo muy evidente las bandas de 58 y 60 kDa y el duplete de 32 kDa en todas las muestras (Figuras 29 A y B).

El mismo fenómeno de distribución de las bandas con unas comunes y otras no comunes se observa con la L.b y la L.ch (Figuras 30 y 31). Esta última especie es la que muestra un mayor número de bandas (30-40) con los parásitos completos, revelados con los distintos sueros de los pacientes antes y después de la vacunación, siendo imposible encontrar dos pacientes iguales (Figura 31).

DISCUSION

En este trabajo hemos demostrado que una preparación antigénica de 8-10 proteínas de 4 especies distintas de leishmanias, es capaz de proteger al ser humano contra la enfermedad, con una tasa de morbilidad en tres años de seguimiento en la urbanización Valle Arriba de Guatire de 7,94 por mil en vacunados y de 56,17 por mil en no vacunados, es decir una incidencia de la enfermedad 7,97 veces mayor en el grupo de personas que no recibieron la vacuna (Cuadro 1).

En la comunidad de "La Planta", donde existe una hiperendemia, el 58,82% de los no vacunados con IDR negativa previa muestran la enfermedad, en cambio ésta apareció sólo en el 15,29% del grupo de personas vacunadas, es decir una incidencia 3,84 veces menor (Cuadro 18) con unos factores de riesgo para contraer la enfermedad de 0,274 para el grupo vacunado y de 3,6 (Cuadro 22) para el grupo no

vacunado, lo que habla a favor de la eficiencia de nuestra vacuna, la cual es la primera preparación con el menor número definido de componentes antigénicos en la literatura publicada sobre el tema (Figura 27). Hasta ahora todas la vacunas han usado parásitos completos (14-21) y algunas se les ha añadido BCG (61) con resultados controversiales.

Numerosos ensayos de vacunación se han realizado en seres humanos, usando desde parásitos vivos (leishmanización) hasta parásitos muertos por varios procedimientos. Hasta ahora todos los trabajos de campo han sido realizados con promastigotes completos, los cuales tanto en el caso de parásitos vivos como con los parásitos muertos por calor u otros procedimientos no han llevado a resultados satisfactorios. En el caso de los parásitos vivos de cultivo las infecciones en los seres humanos han declinado en el tiempo a medida que aumentan los pasajes de cultivo debido a la pérdida de virulencia (7-11) de los parásitos y por ende la disminución en la protección contra la enfermedad.

En Venezuela se realizó un ensayo de leishmanización con parásitos vivos de cultivo en 1965 con una cepa avirulenta, respondiendo sólo la mitad de los vacunados con una IDR positiva 7 meses después de la inoculación. El estudio epidemiológico mostró escasos datos, y el seguimiento sólo duró 7 meses después de la inoculación parasitaria, no continuándose el trabajo en los seres humanos vacunados (13).

Los estudios de vacunación contra la leishmaniasis en Brasil, comenzaron en 1941, usando promastigotes muertos por fenol, dando diferencias

significativas entre vacunados y controles pero sólo en 1 año y 8 meses de seguimiento después de lo cual se suspendió el trabajo de campo (15-17).

Estos estudios en Brasil continuaron 35 años después, empleando una vacuna polivalente con varias especies de leishmanias, parte de los parásitos tratados con ultrasonido y parte muertos por una solución de timerosal incorporada a la vacuna. En este trabajo la intradermoreacción no fue cuantificada y sólo se reportó de manera visual la aparición o no de una pápula infiltrada en el punto de la inoculación. Con este procedimiento inadecuado, sin embargo los autores reportan un descenso progresivo de la positividad de la IDR de 73,2% el primer año a 30,9% el tercer año de seguimiento después de la vacunación. Por otra parte, no se encontraron casos de la enfermedad ni en vacunados ni en controles lo cual impide llegar a conclusión alguna (18).

Estos ensayos de campo se repitieron en 1981 y 1983 usando conscriptos del ejército brasileño de servicio en la selva amazónica, pero no se reportan diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad en vacunados y controles (19). El único ensayo de campo donde los valores de la enfermedad después de la vacunación son estadísticamente significativos entre vacunados y controles después de dos años de seguimiento, es el realizado en el Estado de Espiritu Santo en 1985 en Brasil (20).

Tratando de mejorar la antigenicidad de la vacuna en Brasil incorporaron a la misma como adyuvante el *Corynebacterium parvum*, sin embargo la conversión de IDR negativa a positiva sólo alcanzó a la mitad de los vacunados no encontraron diferencia alguna con la adición del adyuvante, y no reportaron la incidencia de la enfermedad en vacunados y controles lo cual impide la interpretación de los datos (21).

Un aspecto importante a ser tomado en cuenta al aplicar una vacuna en seres humanos es la necesidad insoslayable de probar su eficiencia en animales experimentales, en especial la ausencia de inmunosupresión en el animal vacunado e infectado como hemos demostrado en nuestros trabajos anteriores (53,54). Las vacunas empleadas en seres humanos, tanto en Brasil (15-21) como en Venezuela (13,61) no han cumplido con este requisito, experimentando directamente en seres humanos, lo cual no es aconsejable pues se inocula un producto a un ser humano sin haber probado primero su eficacia en animales experimentales.

Todas la vacunas empleadas en seres humanos hasta ahora, usan promastigotes completos muertos por calor, fenol o timerosal (15-21,61). De los estudios en ratones se ha concluido que existen en estos parásitos unas fracciones proteicas que protegen contra la enfermedad mientras que otras inducen exacerbación de la leishmaniasis con aumento del tamaño de la lesión después de la infección leishmánica, lo cual sucede tanto con la forma cutánea (37), como con la forma visceral (39). Por lo tanto es necesario purificar los extractos totales de parásitos y demostrar que no existen factores que induzcan inmunosupresión y exacerben la enfermedad como hemos hecho en nuestro laboratorio (38).

En trabajos recientes se ha encontrado que el BCG usado aisladamente, induce un cierto grado de resistencia al desarrollo de la úlcera leishmánica, mientras que al añadir leishmanias muertas al BCG vivo se encontró una disminución de la resistencia de los animales a la enfermedad (48), desarrollando el animal lesiones más severas con un mayor número de parásitos en los macrófagos (49), por lo cual este modelo de vacunación de promastigotes muertos por calor unidos al BCG vivo no debe usarse en seres humanos como hasta ahora se ha venido haciendo en nuestro país (61).

La vacuna que aquí presentamos es la primera preparada en base a la forma amastigote, conseguida en un medio de cultivo creado en nuestro laboratorio (51,52). Probada primero en animales experimentales antes de ser usada en voluntarios humanos y luego en comunidades enteras muestra una composición de 6-8 bandas definidas más dos bandas difusas de bajo peso molecular, patrón que se repite en cada lote, y que es constante desde que empezamos a usarla en nuestro laboratorio en 1991, definiendo así en geles de acrilamida su composición en forma exacta y precisa, hecho que no es presentado por otros investigadores.

Esta vacuna es constantemente renovada, pues los parásitos sólo se dejan en el cultivo por 30 repiques, después de lo cual son aislados de nuevo de ratones BalB/c, ya que por encima de ese número de pasajes los parásitos pierden su virulencia y su capacidad de transformarse en amastigotes. Este control necesario para inducir protección tampoco es realizado por otros autores que aplican vacunas contra la leishmaniasis a seres humanos, tanto dentro como fuera de nuestro país.

Creemos que con las proteínas aisladas de los

amastigotes en nuestro laboratorio, y dado los mínimos efectos secundarios que resultan de su aplicación, resumidos en dolor y un pequeño nódulo en el brazo que desaparece a los 2-3 días de su inoculación, unido esto a la alta conversión de las personas vacunadas de una IDR negativa a IDR positiva (>95%) la cual aumenta en su diámetro cada año después de tres años de seguimiento, es una vacunación que está muy por encima de todas las preparaciones usadas hasta ahora por otros grupos que trabajan en esta área de la prevención de la leishmaniasis, enfermedad que cada año produce 600 000 casos nuevos, en una población de 350 millones de personas sometida a riesgo de infectarse con el parásito leishmánico y contraer la enfermedad (1).

REFERENCIAS

1. Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* 1992;4:267-275.
2. Manson P. *Tropical diseases*, 5th. edition Londres: Cassell Co., 1914:217.
3. Berberian M. Successful transmission of cutaneous leishmaniasis by the bites of *Stomoxys calcitrans*. *Proc Soc Exp Biol* 1938;28:254-264.
4. Adler S, Theodor O. The experimental transmission of cutaneous leishmaniasis to man from *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1925;19:365-369.
5. Adler S, Berberian M. The transmission of *L. tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. *J Med Res* 1941; 29:803-808
6. Adler S, Katzennellenbogen I. The problem of association between particular strains of *L. tropica* and the clinical manifestations produced by them. *Ann Trop Med Parasitol* 1952;46:25-35.
7. Berberian DA. Vaccination and immunity against oriental sore. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1939;33:87-94.
8. Nicolle C, Manceaux L. Recherches sur le bouton d'orient. Cultures. Reproduction experimentale. Immunisation. *Ann Inst Pasteur (Lille)* 1910;24:673-683.
9. Gunders AE, Naggan L, Michaeli D. Follow-up study of a vaccination program against cutaneous leishmaniasis. I. Vaccination with 5-year-old human strain of *L. tropica* from the Negev. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972;66:235-238.
10. Lawrow AP, Dubowskoj PA. Uber Schutzimpfungen gegen hautleishmaniose. *Arch Schiffs- u Tropenhyg* 1937;41:374-384.
11. Koufman Z, Egoz N, Greenblatt CL, Handman E, Montilio B, Even-Paz Z. Observations on immunization against cutaneous leishmaniasis in Israel. *Israel J Med Sci* 1978;14:218-222.
12. Green MS, Kark JD, Greenblatt CL, Londner MV, Frankenburg S, Jacobson RL. The cellular and humoral immune response in subjects vaccinated against cutaneous leishmaniasis using *Leishmania tropica* major promastigotes. *Parasite Immunol* 1983;5:337-344.
13. Salazar J. Aspectos inmunológicos de la leishmaniasis tegumentaria americana. Ensayos profilácticos mediante vacunaciones con formas leptomonas vivas de cultivos de *Leishmania brasiliensis* Vianna, 1911. *Arch Venez Med Trop Parasitol Méd* 1965;5:365-384
14. Salles Gomes L. A intra-dermo-reacao de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas affins. *Brasil-Médico* 1939;53:1079-1087.
15. Pessoa SB, Pestana BR. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germens mortos. *Rev Biol e Hig* 1940;10:112-118
16. Pessoa SB. Segunda nota sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomonas mortas. *Rev Paulista Med* 1941;19:1-9.
17. Curban GB. Contribuicao clinica ao estudo da vacinação preventiva na leishmaniose. *Rev Paulista Med* 1941;10:334-335.
18. Mayrink W, Da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, Oliveira Lima A, Michalick MS, Williams P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1979; 73:385-387
19. Antunes CMF, Mayrink W, Magalhaes PA, Da Costa CA, Melo MN, Dias M, Michalick MS, Williams P, Oliveira Lima A, Vieira JBF, Schettini PM. Controlled field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol* 1986;15:572-580.
20. Mayrink W, Williams P, Da Costa CA, Magalhaes PA, Melo MN, Dias M, Oliveira Lima A, Michalick MSM, Ferreira Carvalho E, Barros GC, Sessa PA, Alencar JTA. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espirito Santo, Brasil. *Ann Trop Med Parasit* 1985;79:259-269
21. Nascimento E, Mayrink W, Da Costa CA, Michalick MS, Melo MN, Barros GC, Dias M, Antunes CMF, Lima MS, Taboada DC, Liu TY. Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis: cellular and humoral immune responses. *Infect Immun* 1990;58:2198-2203
22. Howard JG, Nicklin S, Hale C, Liew FY. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis: I Protection induced in mice genetically vulnerable to fatal *Leishmania tropica* infection. *J Immunol*

- 1982;129:2206-2212.
23. Mitchell GF, Handman E. *Leishmania trópica major* in mice: Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice of high genetic susceptibility. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1983;61:11-25.
 24. Liew FY, Hale C, Howard JG. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis IV. Subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. *J Immunol* 1985;135:2095-2101.
 25. Liew FY, Singleton A, Cillari E, Howard JG. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis V. Mechanism of the anti-protective effect induced by subcutaneous immunization against *Leishmania major* infection. *J Immunol* 1985;135:2102-2107.
 26. Passwell JH, Shor R, Trau H, Shoham J, Jaffé CL. Antigen-stimulated lymphokines from patients with cutaneous leishmaniasis induce monocyte killing of *Leishmania major* intracellular amastigotes. *J Immunol* 1987;139:4208-4212.
 27. Howard JG. Immunological regulation and control of experimental leishmaniasis. *Int Rev Exp Pathol* 1986;28:79-95.
 28. Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination against leishmaniasis in a murine model I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *J Immunol* 1987;139:221-227.
 29. Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination against leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of a soluble promastigote extract. *J Immunol* 1987;139:3118-3125.
 30. Gorczynski R. M. Immunization with *Leishmania*-specific T cell not B cell lines or hybridomas can modulate the response of susceptible mice infected with viable parasites. *J Immunol* 1987;139:3070-3075.
 31. Barral-Netto M, Reed SG, Sadigursky M, Sonnenfeld G. Specific immunization of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* using solubilized promastigotes. *Clin Exp Immunol* 1987;67:11-19.
 32. Russell DG, Alexander J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J Immunol* 1988;140:1274-1279.
 33. Monjour L, Vouldoukis I, Ogunkolade BW, Hetzel C, Ichen M, Frommel D. Vaccination and treatment trials against murine leishmaniasis with semi-purified *Leishmania* antigens. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988; 82:412-415.
 34. Frommel D, Ogunkolade BW, Vouldoukis I, Monjour L. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect Immun* 1988;56:843-848.
 35. Handman E, Button LL, McMaster RW. *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Exp Parasitol* 1990; 70:427-435.
 36. Yang DM, Fairweather N, Button LL, McMaster WR, Kahl LP, Liew FY. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol* 1990;145:2281-2285.
 37. Rodrigues MM, Previato LM, Charlab R, Barcinski MA. The cellular immune response to a purified antigen from *Leishmania mexicana* subsp. *amazonensis* enhances the size of the leishmanial lesion on susceptible mice. *Infect Immun* 1987;55:3142-3145.
 38. O'Daly JA, Cabrera Z. Serum proteins from *Leishmania brasiliensis* infected hamster that suppress lymphocyte response of normal hamster lymphocytes. *Z. Parasitenkd* 1986;72:293-298.
 39. Jaffe CL, Rachamim N, Sarfstein R. Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1990;144:699-706.
 40. Lohman KL, Langer PJ, McMahan-Pratt D. Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8393-8397.
 41. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
 42. Scott P, Caspar P, Sher A. Protection against *Leishmania major* in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. *J Immunol* 1990;144:1075-1079.
 43. Champi J, McMahan-Pratt D. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* 1988;52:3272-3279.
 44. Yang DM, Rogers MV, Liew FY. Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major*. *Immunol* 1991;72:3-9.
 45. Kaye PM, Curry AJ, Blackwell JM. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1990;146:2763-2770 .

46. Scott P. IFN-g modulates the early development of TH1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991;147:3149-3155.
47. McMahon-Pratt D, Rodriguez D, Rodriguez JM, Zhang Y, Manson K, Bergman C, Rivas L, Rodriguez JF, Lohman KL, Ruddle NH, Esteban M. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against Leishmania infection. *Infect Immun* 1993;61:3351-3359.
48. Rivier D, Shah R, Bovay P, Mauel J. Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent Leishmania major challenge. *Parasite Immunol* 1993;15:75-84.
49. Stefani MM, Muller Y, Louis J. Leishmania major infection in Balb/c mice: protection or exacerbation by treatment with different doses of BCG. *Res Immunol* 1993;144:233-243.
50. Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Bloom BR, Russell DG. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11473-11477.
51. O'Daly JA, Rodríguez MB, Goa I, Ovalles T. Factores de crecimiento y diferenciación de varias cepas de Leishmanias. Desarrollo de medios de cultivo químicamente definidos. *Gac Méd Caracas* 1989;96:15-30.
52. O'Daly JA, Rodríguez MB. Differential growth requirements of several Leishmania spp. in chemically defined culture media. *Acta Tropica (Basilea)* 1988; 45:109-126.
53. O'Daly JA, Cabrera Z. Immunization of hamsters with TLCK-killed parasites induces protection against Leishmania infection. *Acta Tropica (Basilea)* 1986;43:225-236.
54. O'Daly JA, Cabrera Z. Una vacuna contra la leishmaniasis cutánea y visceral. *Gac Méd Caracas* 1985;93:17-61.
55. O'Daly JA, Polanco N. Antígenos supresores y protectores de epimastigotes de Trypanosoma cruzi expresados a temperaturas diferentes. *Gac Méd Caracas* 1990;98:256-269.
56. Lowry O, Rosebrough V, Farr L, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
57. O'Daly JA, Polanco N. Variability of Trypanosoma cruzi epimastigote surface antigens with changes in the temperature of the cultures. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:44-51.
58. O'Daly JA, Fernández V, Rodríguez MB, Yanes A. Proteínas de la superficie y proteínas excretadas por Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli, su importancia en el diagnóstico y patogenia de la enfermedad de Chagas. *Gac Méd Caracas* 1990;98:237-255.
59. O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez, Rodríguez MB. A study of chagasic and non-chagasic miocardiopathies by ELISA and Immunoblotting with Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli antigens. *Acta Tropica (Basilea)* 1994;56:265-287.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
61. Convit J, Rondon A, Ulrich M, Bloom B, Castellanos PL, Pinaridi ME, Castes M, García L. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1987;400-404.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. José Miguel Avilán Rovira por la revisión del manuscrito, así como por sus acertadas sugerencias. Este trabajo ha sido financiado por el CONICIT, proyecto RPIV-1200030, y donaciones privadas al "Fondo para una vacuna contra la Leishmaniasis". También quisieramos agradecer a las Asociaciones de Vecinos de la Urbanización Valle Arriba por la ayuda prestada en la organización de la vacunación.

Dr. José O'Daly Carbonell
Apartado 21827
Caracas, 1020 A, Venezuela