

Primera vacuna contra la leishmaniasis aplicada en seres humanos en Venezuela

José A. O'Daly Carbonell*, Rafael Bonfante**, María Beatriz Rodríguez*, Segundo Barroeta**, María A. Mejía de Alejos**, Humberto Spinetti**, Luis María Castillo**.

* Laboratorio de Inmunobiología, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

** Escuela de Medicina, Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA), Barquisimeto, Venezuela.

RESUMEN

En el área endémica de Duaca, Estado Lara, Venezuela, se vacunaron 739 personas con una vacuna creada y probada en animales experimentales y en un voluntario humano en el Laboratorio de Inmunobiología del IVIC. La vacuna está constituida por proteínas aisladas de amastigotes muertos pertenecientes a varias especies de leishmanias tratados con tosil-L-lisinaclorometil-cetona y extraídos con Nonidet-P40. Se tomaron como controles 470 personas sin vacunar, que así como los vacunados, eran todas negativas a la prueba de la intradermoreacción practicada previamente con los mismos antígenos usados en la preparación de la vacuna. La vacuna fue aplicada por personal de la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado en 3 dosis por vía intramuscular, estando constituida cada dosis por 200 µg de proteína en 0,2 ml. de una suspensión de alúmina en solución salina. Un mes después de la última dosis, 93,8% de los hombres y 84,4% de las mujeres vacunados mostraron intradermoreacción positiva. En el grupo control han aparecido 33 casos de leishmaniasis, mientras que en los individuos vacunados, sólo 3 casos de leishmaniasis se detectaron después de la primera dosis de vacuna y un solo caso de la enfermedad después de la vacunación completa. La vacuna desarrolla en los seres humanos, una respuesta de inmunidad celular muy pronunciada con ausencia de inmunidad humoral a los antígenos del parásito.

Palabras claves: Vacuna contra leishmaniasis. Prueba de campo en humanos. Intradermoreacción. "ELISA". Inmunidad celular. Inmunidad humoral. Amastigotes muertos. TLCK.

Apartado Postal 21827, Caracas 1020 A, Venezuela.

SUMMARY

A field trial on a vaccine against leishmaniasis was performed in the endemic area of Duaca, Lara State, Venezuela. The vaccine created and prepared at I.V.I.C. was constituted by proteins purified from killed amastigotes after treatment with Tosil-L-lysine-chloromethyl-ketone and Nonidet-P40 extraction. 739 individuals were vaccinated with 3 intramuscular doses of 200 µg proteins from several leishmania species in 0.2 ml. of phosphate buffered saline containing alumina; keeping 470 persons as non vaccinated controls. 93.8% of males and 84.4% of females vaccinees gave a positive intradermic reaction to the parasite antigens one month after vaccination. 33 cases of leishmaniasis appeared in the control group, while in the vaccinees 3 cases after the first dose of vaccine and only one case after 3 doses of vaccine. The vaccinees showed a strong cellular immune response but no humoral immune response to the parasite antigens as measured by ELISA and immunoblotting.

INTRODUCCION

Los intentos de vacunación contra la leishmaniasis en seres humanos, se remontan a varios siglos atrás, pues era una costumbre arraigada en los hebreos de Bagdad, el inocular a los niños en las partes cubiertas del cuerpo con material tomado del "absceso o furúnculo de Bagdad" a fin de prevenir la aparición de cicatrices o lesiones deformantes en las manos y en la cara (1). Una excelente revisión del estado actual de la vacunación contra esta enfermedad ha sido publicada por Modabber en 1989 (2). Desde 1910, se han inmunizado seres humanos contra la leishmaniasis; ya sea mediante la exposición

deliberada a la picada de mosquitos infectados, o inoculando personas sanas con material de una lesión activa o por la inyección subcutánea de parásitos de cultivo (3,4). Este último procedimiento también llamado "leishmanización" fue usado en voluntarios por Lawrow y Dubowskoj en 1937 (5) en Turquistán, y por Berberian en 1939 (6) en el Líbano. Estos sujetos sanos, inyectados con parásitos vivos después de la vacunación, desarrollaron una pequeña lesión que curó rápidamente. En este mismo trabajo, Berberian sugirió practicar la inyección de parásitos vivos como una prueba clínica para diagnosticar la enfermedad en seres humanos, lo cual ya había sido desarrollado 13 años antes por Montenegro, en 1926 en Brasil, pero usando promastigotes de cultivos de leishmanias muertos mediante el tratamiento con fenol (7,8). En Israel, se realizaron ensayos de vacunación con parásitos vivos en 1925 (4), 1952 (9) y 1968 (10), obteniendo resultados variables debido a una disminución progresiva en la capacidad de infección de los parásitos en los seres humanos, fenómeno que ocurre al mantenerlos por largo tiempo en medios de cultivo *in vitro*. Este hecho fue demostrado por Koufman y col. en 1978, al obtener 100% de infección en los pacientes inoculando una cepa recién aislada del hámster con escasos pasajes en cultivo, mientras que cepas de parásitos con gran número de pasajes en cultivo sólo infectaban entre 10 y 30% de los seres humanos inoculados (11).

Los primeros ensayos de vacunación contra la leishmaniasis en el continente americano fueron realizados en Brasil. Salles Gomes en 1939 (12), observó en pacientes con leishmaniasis la regresión de las lesiones activas después de la inyección intravenosa de promastigotes muertos. A partir de esta experiencia postuló que los parásitos muertos podrían ser usados para vacunar seres humanos. Esta idea fue puesta en práctica por Pessoa y Pestana en 1940 (13), por Pessoa en 1941 (14,15) y por Curban en 1941 (16), quienes usaron suspensiones de promastigotes de cultivo muertos mediante el tratamiento de solución salina adicionada de fenol. El Estado de Sao Paulo fue el sitio escogido para la prueba de campo de la vacuna, donde después de 20 meses de observación el 3,2% de 527 vacunados y el 18% de 600 controles desarrollaron lesiones leishmánicas. A pesar de resultados tan prometedores, estos trabajos se paralizaron por 35 años y es sólo en 1975, cuando Antunes y col. (17) aplican una vacuna polivalente preparada con promastigotes de cultivo muertos por sonicación. Los parásitos pertenecían a 5 cepas distintas de leishmanias, 4 de

ellas aisladas de pacientes con diversos cuadros clínicos de la enfermedad, además de una quinta cepa de leishmania aislada de un mosquito hembra infectado en la naturaleza. La prueba cutánea fue positiva en 78,4% de los vacunados, sin embargo, la inmunofluorescencia indirecta practicada con parásitos leishmánicos en los sueros de los pacientes vacunados fue negativa. El 30,9% de los pacientes vacunados estaban aún positivos a la intradermoreacción de Montenegro, 3 años después de la vacunación. Sin embargo, desafortunadamente, no se detectaron casos de leishmaniasis ni en los individuos vacunados ni en las personas mantenidas como controles sanos, pues la enfermedad desapareció del área geográfica en estudio lo cual impidió la formulación de conclusiones sobre la eficacia de la vacunación. Nuevos ensayos de campo de esta vacuna polivalente fueron realizados por los mismos autores tanto en 1981 como en 1983 (18) empleando en estas oportunidades, reclutas del ejército brasileño. En estas pruebas se observó una disminución de 67,3% y 85,7% en la incidencia de la enfermedad en las personas vacunadas, aunque en el ensayo del año 1983, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vacunado y el grupo control. Un nuevo ensayo de campo es realizado en 1990 administrando la misma vacuna polivalente de promastigotes muertos unida a *Corynebacterium parvum* como adyuvante, en 475 reclutas del ejército brasileño. La respuesta inmune celular medida con la prueba cutánea osciló entre un 40% y un 58% de positividad en los vacunados, no encontrando diferencias significativas en presencia o en ausencia del adyuvante. Los individuos vacunados mostraron anticuerpos IgM e IgG antileishmania en el suero, con títulos de 1:1024 y 1:256 respectivamente, pero con valores bajos en la reacción de ELISA, los cuales oscilaron entre 0,12 y 0,25 unidades de densidad óptica. El suero de los individuos vacunados precipitó 8 proteínas radioiodinadas de la superficie del parásito con pesos moleculares de 13,5, 25, 40, 63, 73, 85, 97, y 160 KDa (19).

Los estudios experimentales sobre leishmaniasis realizados en ratones han revelado que existen cepas susceptibles como la BALB/c y cepas más resistentes a la enfermedad como la C57BL/6 (20,21) y que es posible inmunizar animales mediante la inyección intravenosa de promastigotes irradiados, pero no usando los mismos parásitos por la vía subcutánea, pues esta última suprime la respuesta inmune en el animal, al igual que al emplear como agente inmunizante promastigotes muertos por el calor o

mediante el tratamiento con formol o por intermedio de la sonicación (22). Esta inhibición de la inmunización al usar antígenos parasitarios por vía subcutánea es inducida por una célula T de fenotipo Lyt-1+2-, L3T4+T mediadora de la respuesta de sensibilidad retardada y cooperadora en la síntesis de anticuerpos, pero que inhibe la inducción y la proliferación de células T protectoras (23). La inmunización con extractos solubles de promastigotes, libres de membranas, unidos a Corynebacterium parvum por vía intraperitoneal induce en ratones 89% de protección contra la infección de L. major (24) y del extracto total de este parásito se han purificado 2 fracciones proteicas una de las cuales induce en los ratones supresión de la respuesta inmune y por ende proliferación de los parásitos en la lesión cutánea, mientras que la otra fracción genera protección contra la infección (25). También se ha encontrado protección contra la enfermedad, inmunizando ratones con la proteína gp63 unida al lipofosfoglican, ambas fracciones purificadas de promastigotes y reconstituidas en un liposoma, el cual es inyectado por vía subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Con este procedimiento no se observa el aumento de la lesión en los animales infectados por la vía subcutánea como se ha demostrado con otros antígenos de leishmanias, en especial con los extractos crudos de parásitos (26). También se ha reportado en ratones, protección contra la infección por L. major empleando como agente inmunizante antígenos entre 67-94 Kda de peso molecular, electroeluidos de geles de polyacrylamida (27). Inyectando estos antígenos obtenidos de promastigotes de L. infantum o de L. major en unión al muramyl-dipéptido como adyuvante, se encontró en ratones, protección contra la infección al inocularlos con L. mexicana o L. major. Los ratones así inmunizados desarrollaron anticuerpos capaces de neutralizar la infección de animales sanos inoculados con promastigotes de cultivos, generaron reacciones de sensibilidad retardada a los antígenos del parásito y tenían poblaciones de macrófagos peritoneales capaces de fagocitar y destruir amastigotes de leishmanias (28). También ha sido posible proteger ratones contra una infección mortal con L. major inmunizándolos con una fracción protéica de extractos solubles del parásito, la cual es capaz de inducir células T productoras de Interleukina-2 e Interferon- γ (29). Estos ratones también reaccionaron con antígenos solubles de L. donovani, L. amazonensis y L.

brasilensis, reconociendo una proteína de 8.000-12.000 daltons de peso molecular (30).

En el caso de la leishmaniasis visceral o Kala-azar se han purificado de extractos de parásitos, 2 proteínas, una de ellas, la gp70-2 que no protege contra la enfermedad, en cambio la proteína dp72, sí induce una reducción de 81% en la cantidad de parásitos presentes en el hígado de los animales inmunizados y luego infectados con L. donovani al compararlos con los controles no vacunados y posteriormente infectados con el parásito (31). Otros autores también han purificado una proteína de extractos de L. donovani de 80 Kda, la cual en unión al C. parvum como adyuvante disminuye la carga de parásitos detectables en el hígado de los animales infectados (32). Otros ensayos experimentales han tratado de inmunizar ratones por vía oral contra la leishmaniasis. Para este fin han transformado una bacteria, la cepa SL3261 de Salmonella typhimurium usada para la vacunación contra la salmonelosis con el gen del antígeno gp63 aislado de promastigotes de L. major. El producto genómico así formado, denominado SL3261-gp63, indujo por vía oral en ratones, protección significativa contra la infección por L. major, así como también la proliferación de células T del tipo CD4+ secretoras de Interleukina-2 y de Interferon- γ pero no de Interleukina-4 (33). También se ha ensayado una vacuna sintética contra la leishmaniasis en ratones, usando para ello péptidos de la proteína Gp63 sintetizados "in vitro", encontrando que una muestra de estos antígenos con C. parvum incorporados a un liposoma inducen células TH1, así como niveles de protección significativos contra la infección por L. major (34).

En este trabajo presentaremos los resultados de la prueba de campo de una vacuna contra la leishmaniasis aplicada a seres humanos en la región endémica de Duaca, Estado Lara, Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de leishmanias

El aislamiento de los parásitos del hamster infectado y el mantenimiento de las distintas cepas de leishmanias en cultivos seriados in vitro, han sido publicados con anterioridad (35,36). Para preparar la vacuna usamos las siguientes cepas:

L. amazonensis (La: IFLA/BR/67/PH8); L. venezuelensis (Lv: MHOM/VE/80/H16); L.

brasiliensis (Lb: MHOM/VE/75/H-2); *L. chagasi* (Idch: MHOM/BR/74/PP75); *L. mexicana* (Im: 1112); y *L. garnhami* (Lg: Scorza y col.; 37).

Las cepas de *L. mexicana* y *L. garnhami* fueron donadas por el Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, mientras que las otras cepas de leishmanias nos las suministró el Dr. Bonfante, de la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.

Los distintos parásitos mantenidos en el Laboratorio de Inmunobiología del I.V.I.C., fueron cultivados en Medio Sintético Rico (MSR) suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) e incubados a la temperatura de transformación de cada cepa en la forma amastigote como ya se ha publicado (35,36). Para asegurar que los parásitos en cultivo mantengan su virulencia, cada mes son inyectados en la almohadilla plantar del hamster, midiendo semanalmente con un vernier el crecimiento de la lesión en la pata inoculada. Al disminuir la infectividad, así como también la capacidad de transformación de los parásitos en amastigotes, las distintas cepas de leishmania son aisladas de la lesión de la pata del hamster, donde son mantenidas "in vivo" en el laboratorio de inmunobiología del I.V.I.C., mediante pasajes sucesivos cada 1-2 meses. Las cepas aisladas de nuevo, son cultivadas en MSR como ya hemos explicado.

Preparación de la vacuna

La vacuna fue creada y preparada en el Laboratorio de Inmunobiología del I.V.I.C., siguiendo los procedimientos ya publicados anteriormente en animales de experimentación. Los parásitos nombrados cultivados en la forma de amastigotes (35, 36), fueron centrifugados a 1.300 xg por 20 min. a 4°C y lavados 3 veces con solución salina tamponada (SST, 0,01 M PO₄, 0,15 M NaCl, pH 7,4), mediante centrifugaciones sucesivas. Posteriormente, se resuspendieron en Medio Mínimo esencial de Eagle (MEM, GIBCO), suplementado con 150 µg/ml de tosil-L-lisina-clorometil-cetona (TLCK) a 30°C por 72 horas, lo cual asegura la muerte de todos los parásitos como hemos publicado con anterioridad (38,39). Acto seguido, los parásitos son centrifugados a 1.300 xg por 20 min. a 4°C y lavados 3 veces con SST mediante centrifugaciones sucesivas similares e incubados en MEM suplementado con 0,12% (v/v) de NONIDET-P-40 (NP40, Sigma), por 30 min a 4°C, usando métodos ya publicados (40). Seguidamente, se centrifugaron a 16.000 xg por 10

min. en una centrífuga Sorvall, lavándose 3 veces con SST, mediante centrifugaciones sucesivas. Finalmente, se resuspendieron en SST para luego sonificarlos por 2 min. a 4°C, determinándose el contenido proteico por el método de Lowry y col. (41). Seguidamente, se resuspendieron en alúmina, utilizando partes iguales de cada una de las cepas de leishmanias ya nombradas, ajustando la concentración de los parásitos a fin de obtener 200 µg de proteína total en un volumen final de 0,2 ml, material que fue inyectado al grupo de las personas a vacunar, en cada una de las 3 dosis por vía intramuscular. La preparación de la vacuna fue realizada bajo estrictos controles de esterilidad, tomando muestras en cada uno de los pasos de su preparación, para descartar el crecimiento bacteriano, usando medio líquido sintético enriquecido suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino e incubado a 37°C por 72 horas. En caso de encontrar contaminación bacteriana o micótica, la preparación era desechada.

Aplicación de la vacuna

Para la prueba piloto se escogió a la población de Duaca (10° 18' Sur y 69° 10' Oeste) situada a 34 kilómetros de la ciudad de Barquisimeto. Esta región fue seleccionada debido a que en 1989, se presentó en ella un brote epidémico con 105 casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea.

Todos los antígenos tanto para la prueba cutánea (Leishmanina) como para la vacunación contra la enfermedad fueron preparados en el Laboratorio de Inmunobiología del I.V.I.C. y enviados por vía aérea a Barquisimeto, en una cava pequeña de anime con hielo seco.

La población de Duaca consta de unas 15.000 personas, de las cuales se seleccionaron 1.209 individuos negativos a la intradermoreacción realizadas con las mismas proteínas de los parásitos leishmánicos usadas en la preparación de la vacuna. Con este fin se inyectaron por vía intracutánea 4 µg de antígenos (todas las cepas de leishmania) en 0,1 ml de SST y se leyó la formación de la respectiva pápula a las 48 horas. Todas las personas con una respuesta inmunológica positiva (>5mm) fueron excluidas del experimento. Entre el lapso comprendido entre abril de 1990 y marzo de 1991, se han vacunado 739 personas, dejando como control 470 personas sin vacunar. Los controles, también residentes en la misma área endémica en estudio, fueron distribuidos en un número de 1-2 por casa, viviendo en el mismo

ambiente junto a las personas vacunadas. Es necesario resaltar el hecho de que la transmisión de la enfermedad en Duaca es intradomiciliaria, ya que la población ha construido sus casas de habitación adyacentes al bosque tropical húmedo, donde se encuentra el insecto vector.

De las personas a ser vacunadas con la prueba cutánea negativa, 179 recibieron una sola dosis de vacuna, 89 dos dosis y 471 tres dosis i.m. de 200 μ g cada una, en 0,2 ml de SST a intervalos de un mes. Un mes después de la última dosis se les practicó de nuevo la intradermoreacción, la cual fue leída a las 48 horas, tomando como positivos todos aquellos casos con una pápula mayor de 5 mm.

Electroforesis en SDS-poliacrilamida

Esta técnica fue realizada en el Laboratorio de Inmunobiología del I.V.I.C. Las proteínas de las distintas cepas de leishmaniasis, usadas en la preparación de la vacuna, así como los extractos completos de los parásitos a una concentración de 1×10^9 parásitos/ml en solución de disociación, se dializaron vs 500 ml de solución de disociación (62,5 mM Tris HCL, 2% (p/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS), 1% (v/v) β -mercaptoetanol pH 6,8) por 24 hr a temperatura ambiente, luego de lo cual fueron calentadas en baño de María por 3 min. a ebullición. La electroforesis se realizó según el método de Laemmli (42), usando marcadores de peso molecular (Sigma SDS64), en una cámara de electroforesis vertical "Mini Protean II" de Biorad, coloreando los geles con Coomassie brillante azul.

Preparación de antígenos para la prueba de ELISA.

Para realizar esta prueba en el Laboratorio de Inmunobiología del I.V.I.C., se usaron como antígenos: 1. Parásitos completos en la forma amastigote a razón de 1×10^6 /ml resuspendidos en 50 μ l de 0,05 M Tris-HCl pH 9,5; 2. Proteínas de la superficie de los parásitos con y sin tratamiento con TLCK como se ha descrito, extraídas con 0,12% (p/v) de NP40 por 30 min a 4°C a razón de 1×10^9 parásitos/ml. Después de la incubación en el detergente, se centrifugaron a 16.000 x g por 10 min, en una centrífuga Sorvall y el sobrenadante fue dializado vs. H₂O destilada por 48 hrs a 4°C, determinándose el contenido proteico por el método de Lowry (41); 3. Proteínas excretadas al medio de cultivo: los parásitos de las distintas cepas de leishmania creciendo en MSR a 26°C, fueron centrifugados a 1.300 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante de cultivo fue

dializado vs H₂O destilada por 48 hrs a 4°C, liofilizado, resuspendido en H₂O destilada, determinando su contenido proteico por el método de Lowry (41); 4. Proteínas liberadas al sobrenadante de NP40 después de incubar los parásitos en TLCK, como se explicó en la preparación de la vacuna; 5. El sobrenadante del medio donde se incubaron los parásitos con TLCK.

Prueba serológica de ELISA

La técnica de este ensayo fue realizada en el Laboratorio de inmunobiología del I.V.I.C. y ha sido publicada con anterioridad (43). Los antígenos usados en este trabajo, fueron proteínas de las distintas cepas de leishmania como se detalló en el párrafo anterior. Los pozos de las placas de 96 huecos para ELISA (Immulon II, Dinotech Laboratories, Alexandria. VA), se incubaron toda la noche a 37°C con 50 μ l de una solución conteniendo 200 μ g de cada antígeno por ml de 0,05 M Tris-HCl pH 9,5. Esto nos aseguró que una vez evaporada la solución todos los antígenos quedaran adheridos a la placa de plástico. Seguidamente las placas se lavaron con SST conteniendo 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 5 de Cohn, Sigma) por una hora a temperatura ambiente. Luego se añadieron en cada pozo 100 μ l de los sueros humanos antes y después de la vacunación, diluidas 1:1000 en SST por duplicado. Las placas se incubaron por una hora a 37°C. A continuación, se lavaron con SST-0,05% Tween 20 y se incubaron con 50 μ l 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-Tween 20 se añadió el substrato ABTS, incubando por 30 minutos a 37°C, leyéndose luego los valores de densidad óptica (D.O.) en cada pozo, en un lector automático de ELISA (Titertek Multiskan Plus). Se consideró positivo todo resultado que estuviera 3 desviaciones estándar por encima del promedio de los controles negativos (n=50).

Prueba cutánea

Fue aplicada por el personal de la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado en dosis de 0,1 ml de SST que contenía 4 μ g de las proteínas usadas en la vacuna. El antígeno se inoculó por vía intradérmica antes de la vacunación y un mes después de la última dosis de vacuna, evaluándose el tamaño de la pápula 48 horas después de la inyección del

antígeno. El antígeno preparado en el Laboratorio de Inmunobiología del I.V.I.C. estaba constituido por proteínas de parásitos tratados con TLCK y extraídos con NP40, como ya se ha detallado en párrafos anteriores al describir la preparación de la vacuna. La prueba fue leída usando un bolígrafo de punta roma, corriéndolo en direcciones concéntricas por la superficie de la piel hasta encontrar la pápula. Una vez delimitada ésta, se colocó un papel milimetrado sobre la reacción dibujada con el bolígrafo, pasándole por la parte posterior un algodón humedecido en alcohol etílico, quedando así impreso en el papel el tamaño de la reacción.

RESULTADOS

En 1989-1990, se presentó un brote endémico de la enfermedad en la región de Duaca, reportándose 105 casos de leishmaniasis cutánea, con algunos pacientes que también desarrollaron diseminaciones mucosas. En una muestra de 1.134 personas residentes en el área, a las cuales se les practicó la intradermoreacción con el antígeno usado en la preparación de la vacuna, se encontró que el 7% de éstos resultaron positivos. Los grupos etarios estudiados abarcaron edades comprendidas entre 0 y mayores de 30 años, presentándose el mayor número de casos de leishmaniasis en este último grupo, predominando los hombres (8,9%) sobre las mujeres (5,4%), como se aprecia en el Cuadro 1.

En el Cuadro 2 se presentan las personas vacunadas con una dosis (179), 2 dosis (89) y 3 dosis (739) de antígenos, distribuidas por grupo etarios, siendo aproximadamente igual el número de hombres

y mujeres vacunados.

La intradermoreacción practicada en las personas vacunadas con 3 dosis, un mes después de la última dosis de vacuna (en individuos previamente negativos) se encontró positiva (mayor de 5mm) en el 93,8% de los hombres y el 84,4% de las mujeres, para un total general de 88,3% (Cuadro 3). El 60% de las personas positivas presentaron una reacción intradérmica entre 5-10 mm y el 28,1% entre 11-15 mm de tamaño, comprendiendo estos 2 grupos la mayoría de los casos vacunados. Reacciones intradérmicas con un tamaño entre 16-20 mm, 21-26 mm y aun mayores de 25 mm se presentaron en el 7,7%, 2,6% y 1,6% de los casos respectivamente (Cuadro 4).

Las personas que presentaron una reacción intradérmica menor de 5 mm consideradas negativas por las pautas internacionales, sin embargo, también mostraron evidencias de respuesta a los antígenos de la vacuna, pues el 34,1% tenía una reacción con un tamaño entre 4 y 4,99 mm, el 39% entre 2,26 y 2,99 mm y el 26,8% (11 personas) entre 0 y 2,25mm (Cuadro 5). El grupo control de pacientes no vacunados lo conformaron 470 personas, 224 del sexo masculino y 246 del sexo femenino (Cuadro 6), quienes presentaron 33 casos de leishmaniasis distribuidos en 17 hombres y 16 mujeres con una mayor incidencia en el grupo etario mayor de 30 años, así como en las personas con edades comprendidas entre los 11 y 20 años (Cuadro 7). La profesión de los individuos pertenecientes al grupo control se detalla en el Cuadro 8. Llama la atención que en su mayoría los pacientes del grupo control con leish-

Cuadro 1

Intradermoreacción en una muestra de personas residentes en el área endémica de Duaca, Estado Lara, Venezuela.

Grupos Etarios	N°	Masculino		Femenino			Total		
		+	%	N°	+	%	N°	+	%
0-5	3	1	33,3	8	0	0,0	11	1	9,1
6-10	44	0	0,0	34	1	2,9	78	1	1,3
11-15	143	12	8,4	175	7	4,0	318	19	6,0
16-20	108	9	8,3	106	6	5,7	214	15	7,0
21-25	45	4	8,9	67	1	2,9	112	5	4,5
26-30	56	2	3,6	60	4	6,7	116	6	5,2
>30	210	26	12,4	275	20	7,3	485	46	9,5
Total	609	54	8,9	725	39	5,4	1 134	93	8,2

PRIMERA VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 2

Personas vacunadas con distintas dosis de antígeno residentes en el área endémica de Duaca

Grupos Etarios	N°	Primera		N°	Dosis Segunda		N°	Tercera		N°	Total	
		M	F		M	F		M	F		M	F
0-5	1	0	1	1	0	1	2	0	2	4	0	4
6-10	5	2	3	3	2	1	20	7	13	28	11	17
11-15	24	11	13	17	9	8	53	24	29	94	44	50
16-20	37	21	16	14	5	9	48	18	30	9	44	55
21-25	27	7	20	13	3	10	33	15	18	73	25	48
26-30	18	8	10	12	8	4	58	26	32	88	42	46
>30	67	29	38	29	12	17	257	116	141	353	157	196
Total	179	78	101	89	39	50	471	206	265	739	323	416

Cuadro 3

Intradermoreacción post-vacunal en pacientes del área endémica de Duaca

Grupos Etarios	Masculino			Femenino			Total		
	N°	+	%	N°	+	%	N°	+	%
0-5	0	0	0	2	2	100,0	2	2	100
6-10	6	6	100	9	6	66,6	16	12	75
11-15	17	17	100	22	17	72,3	39	34	87,2
16-20	14	14	100	25	19	76,0	39	33	84,6
21-25	86	8	100	11	9	81,8	19	17	89,5
26-30	17	15	88,2	20	16	80,0	37	31	83,8
>30	84	17	91,7	116	104	89,7	200	181	90,5
Total	146	137	93,8	205	173	84,4	351	310	88,3

Cuadro 4

Tamaño de la intradermoreacción post-vacunal en pacientes del área endémica de Duaca

Grupos Etarios	Diámetro de la I.D. en milímetros																			
	5-10				11-15				16-20				21-25				>25			
M	F	T	%	M	F	T	%	M	F	T	%	M	F	T	%	M	F	T	%	
0-5	0	1	1	0,3	0	1	1	0,3	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
6-10	4	3	7	2,3	1	1	2	0,6	0	1	1	0,3	1	0	1	0,3	0	1	1	0,3
11-15	13	11	24	7,7	4	4	8	2,6	0	1	1	0,3	0	1	1	0,3	0	0	0	0,0
16-20	6	9	15	4,8	7	5	12	3,9	1	3	4	1,3	0	0	0	0,0	0	2	2	0,6
21-25	4	6	10	3,2	4	2	6	1,9	0	1	1	0,3	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
26-30	12	5	17	5,5	3	7	10	3,2	0	2	2	0,6	0	1	1	0,3	0	1	1	0,3
>30	48	64	112	36,1	21	27	48	15,5	7	8	15	4,8	1	4	5	1,6	0	1	1	0,3
Total	87	99	186	60,0	40	47	87	28,1	8	16	24	7,7	2	6	8	2,6	0	5	5	1,6

M: masculino; F: femenino; T: totales; %: porcentajes; I.D.: intradermoreacción.

Cuadro 5

Tamaño de la intradermoreacción post-vacunal en pacientes que mostraron un diámetro < 5 mm.

Grupos Etarios	Diámetro de la I.D. en milímetros											
	0-2,25				2,26-3,99				4-4,99			
	M	F	T	%	M	F	T	%	M	F	T	%
0-5	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0
6-10	0	0	0	0,0	0	2	2	4,9	0	1	1	2,4
11-15	0	1	1	2,4	0	3	3	7,3	0	1	1	2,4
16-20	0	2	2	4,9	0	3	3	7,3	0	1	1	2,4
21-25	0	1	1	2,4	0	0	0	0,0	0	1	1	2,4
26-30	0	1	1	2,4	1	3	4	9,8	1	0	1	2,4
>30	3	3	6	14,6	0	4	4	9,8	4	5	9	22,0
Total	3	8	11	26,8	1	15	16	39,0	5	9	14	34,1

M: masculino; F: femenino; T: totales; %: porcentajes; I.D.: intradermoreacción.

Cuadro 6

Pacientes no vacunados pertenecientes al grupo control residentes en el área endémica de Duaca.

Grupos Etarios	M	F	T	%
0-5	1	3	4	0,8
6-10	29	17	46	9,8
11-15	86	112	198	42,1
16-20	56	44	100	21,3
21-25	13	11	24	5,1
26-30	10	8	18	3,8
>30	29	51	80	17,0
Total	224	246	470	100,0

Cuadro 7

Incidencia de leishmaniasis en el grupo control no vacunado residentes en el área endémica de Duaca.

Grupos Etarios	Masculino	Femenino	Total
0-5	0	0	0
6-10	2	0	2
11-15	5	2	7
16-20	4	2	6
21-25	2	2	4
26-30	2	3	5
>30	2	7	9
Total	17	16	33

Cuadro 8

Profesión de los pacientes con leishmaniasis pertenecientes al grupo control no vacunados, residentes en el área endémica de Duaca.

Ocupación	Masculino	Femenino	Total
Agricultor	4	0	4
Preescolar	1	0	1
Estudiante	4	1	5
Hogar	0	12	12
Obrero	4	1	5
Empleado	2	2	4
Comerciante	1	0	1
Ganadero	1	0	1
Total	17	16	33

Cuadro 9

Localización de las lesiones en los pacientes con leishmaniasis, pertenecientes al grupo control no vacunados, residentes en el área endémica de Duaca.

Localización	Masculino	Femenino	Total
Tronco	2	0	2
Extremidades sup.	4	5	9
Extremidades inf.	8	7	15
*Múltiples	3	4	7

*En tres casos de lesiones múltiples se encontraron úlceras en la cara.

PRIMERA VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

maniasis son amas de casa, lo cual atestigua que la transmisión es intradomiciliaria. De los 33 pacientes con leishmaniasis, 9 presentaron lesiones en las extremidades superiores y 15 en las extremidades inferiores, 7 personas mostraron lesiones múltiples (Cuadro 9). En los individuos vacunados se presentaron después de una sola dosis de vacuna 3 casos de leishmaniasis, todas amas de casa. El primero con una úlcera en el muslo izquierdo de 1,5 cm de diámetro que curó espontáneamente en el lapso de un mes, sin tratamiento. El segundo, una úlcera en la mano derecha de 2 x 2,5 cm, que al momento de presentar este trabajo aún no ha curado después de recibir, en la División de Dermatología del M.S.A.S. 10 dosis de inmunoterapia (44). El tercero, una úlcera en la región epigástrica de 4 x 3,5 cm, recibió en el M.S.A.S., 6 dosis de inmunoterapia (44), sin curar y actualmente recibe tratamiento con Glucantime. Un solo caso de leishmaniasis ha aparecido en los vacunados con 3 dosis de vacuna en una paciente ama de casa, con un cuadro varicoso en ambas piernas, muy pronunciado, que presentó una úlcera de 2 cm de diámetro en el dorso del pie derecho. Después de 2 meses de observación recibió una serie de Glucantime y curó totalmente (Cuadro

10).

La comparación de las proteínas totales del parásito con las proteínas usadas en la vacunación se presenta en la Figura 1 donde se observa que después del tratamiento con TLCK y la extracción con NP-40, el número de bandas disminuye a 10-15 proteínas, en cambio en los parásitos no tratados es posible distinguir alrededor de 30 bandas de distintos pesos moleculares.

La reacción de ELISA en personas vacunadas antes y después de la vacunación, usando como antígenos: 1. Sedimentos de parásitos tratados con TLCK y extraídos con NP-40, es decir, la preparación antigénica usada en la vacuna; 2. Sobrenadante de parásitos extraídos con NP-40 previamente tratados con TLCK; 3. Proteínas excretadas al MEM durante la incubación con TLCK; 4. Proteínas excretadas por promastigotes en MSE a 26°C; 5. Parásitos completos (promastigotes) crecidos en MSE a 26°C; 6. Sobrenadante de NP-40 de parásitos crecidos entre 30 y 34°C (amastigotes), se presenta en el Cuadro 11. Todos los antígenos empleados prove-

Cuadro 10

Localización y evolución de los casos de leishmaniasis encontrados en los pacientes vacunados (739) con distintas dosis de antígeno, residentes en el área endémica de Duaca

Nombres	Edad	Sexo	Profesión	Dosis de vacuna recibida	Lesión	Evolución
1. S.S.	23	F	Hogar	1	Úlcera en muslo izquierdo de 1,5 cm de diámetro	Curó espontáneamente en un mes, sin tratamiento
2. M.S.	18	F	Hogar	1	Úlcera en dorso de la mano derecha de 2 x 2,5 cms	No ha curado. Recibió 10 dosis de inmunoterapia (44) desde Agosto de 1990
3. M. de M.	50	F	Hogar	1	Úlcera en epigastrio de 4 x 3,5 cm	No ha curado. Recibió 6 dosis de inmunoterapia. Actualmente recibe glucantime
4. E. de F.	45	F	Hogar	3	Úlcera en pie derecho. Varices muy pronunciadas	Después de dos meses de observación recibió una serie de glucantime y curó totalmente.

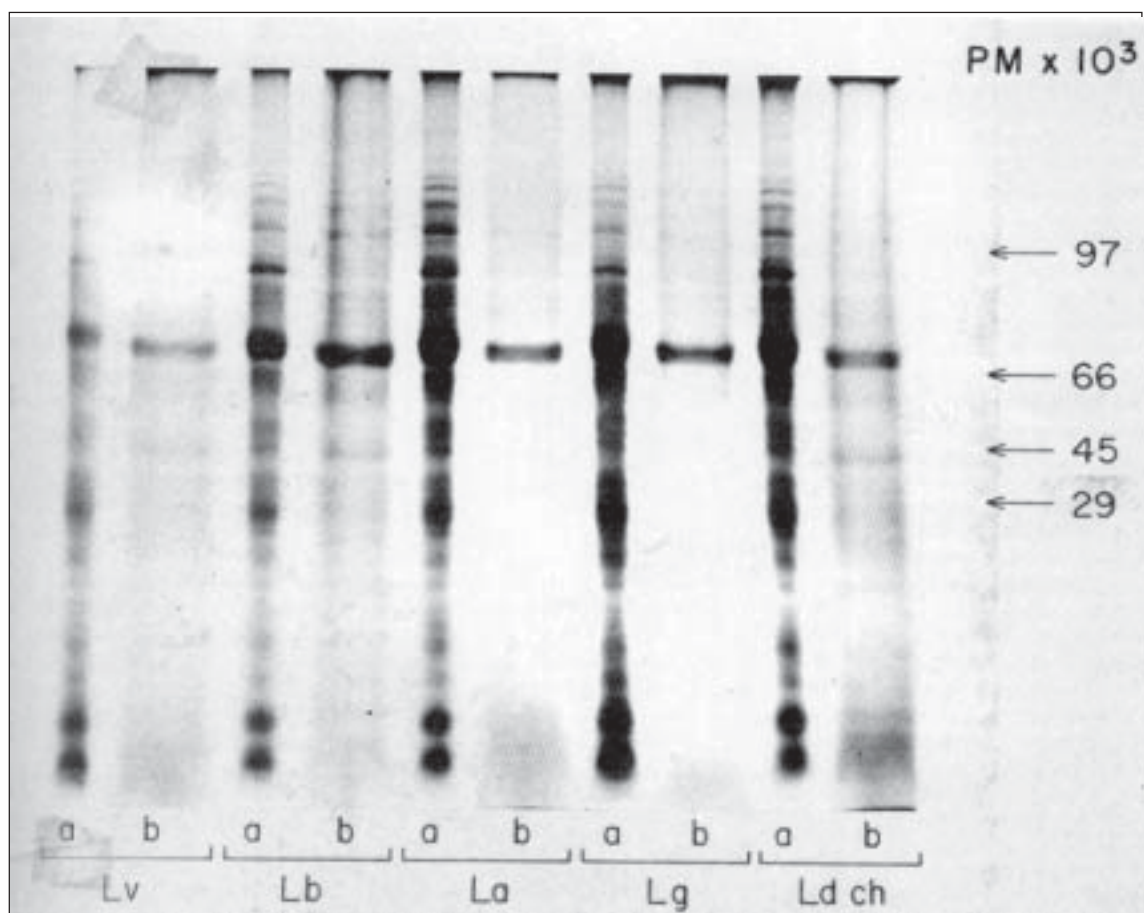


Figura 1. Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio de varias especies de leishmanias. a: extracto total del parásito; b: parásitos tratados con TLCK y extraídos con Nonidet-P40. La: *L. amazonensis*; Lv: *L. venezuelensis*; Lb: *L. brasiliensis*; Lch: *L. donovani* chagasi; Lg: *L. garnhami*.

nientes de las 4 cepas de leishmanias usadas en la vacunación dieron resultados negativos con los sueros de pacientes antes y después de la tercera dosis i.m. de vacuna. La comparación entre la reacción de ELISA y la prueba intradérmica en pacientes vacunados, usando los mismos antígenos de la vacuna (Cuadro 12), muestra la negatividad de los sueros de 124 personas antes y después de ser vacunadas, mientras que la prueba intradérmica negativa antes de la vacunación se transformó en fuertemente positiva un mes después de la última dosis de vacuna.

DISCUSION

La vacunación contra la leishmaniasis es posible

y necesaria, debido a que: 1. La infección experimental o natural induce en seres humanos un estado inmune a la reinfección con el parásito; 2. A que la enfermedad aparece en grupos restringidos de población; 3. A que la quimioterapia con antimoniales pentavalentes puede producir numerosos efectos secundarios y; 4. A que los transmisores de la enfermedad viven en nichos ecológicos inaccesibles a los insecticidas comunmente usados para controlar la población de mosquitos vectores. La leishmanización o inducción adrede de la enfermedad (3-5,9-11) por infección voluntaria del ser humano con parásitos vivos del cultivo, no es aconsejable y no es recomendada por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) ya que se produce una lesión entre 5-10 mm de tamaño que dura de 4-6 meses. A pesar

PRIMERA VACUNA CONTRA LA LEISHMANIASIS

Cuadro 11

Reacción de ELISA de 20 sueros de personas antes y después de 3 dosis de vacuna con diversos antígenos de varias cepas de leishmanias

Ag	Densidad óptica 405 nm			
	Sedimentos parásitos tratados con TLCK y NP40		Sobrenadante NP40 parásitos tratados con TLCK	
	Pre-vac	Post-vac	Pre-vac	Post-vac
La	0,37 ± 0,11	0,43 ± 0,13	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,06
Lv	0,19 ± 0,19	0,41 ± 0,33	0,16 ± 0,04	0,30 ± 0,16
Lb	0,33 ± 0,13	0,34 ± 0,30	0,14 ± 0,14	0,19 ± 0,13
Lch	0,20 ± 0,10	0,28 ± 0,26	0,30 ± 0,07	0,28 ± 0,04
Ag	Proteínas excretadas MEM, TLCK		Proteínas excretadas MSR 26°	
	Pre-vac	Post-vac	Pre-vac	Post-vac
	La	0,16 ± 0,05	0,27 ± 0,15	0,17 ± 0,07
Lv	0	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,13 ± 0,16
Lb	0	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,10 ± 0,09
Lch	0,02 ± 0,01	0	0,18 ± 0,05	0,22 ± 0,03
Ag	Parásitos completos MSR 26°		Sobrenadante NP40 parásitos completos NP40 30-34°	
	Pre-vac	Post-vac	Pre-vac	Post-vac
	La	0,36 ± 0,11	0,41 ± 0,12	0,25 ± 0,05
Lv	0,19 ± 0,19	0,41 ± 0,30	0,24 ± 0,11	0,24 ± 0,08
Lb	0,37 ± 0,07	0,34 ± 0,30	0,37 ± 0,06	0,30 ± 0,19
Lch	0,20 ± 0,10	0,28 ± 0,27	0,24 ± 0,07	0,22 ± 0,14

Ag : antígenos; TLCK: Tosyl-l-lisina-clorometil-cetona; NP40: Nonidet-P40; Pre-vac: prevacunal; post-vac: post-vacunal; MEM: medio mínimo esencial de Eagle; MSE: medio sintético enriquecido; La: Leishmania amazonensis; Lv: L. venezuelensis; Lb: L. brasiliensis; Lch: L. donovani chagasi.

Cuadro 12

Comparación entre la reacción de ELISA en el suero y la intradermoreacción (IDR) en el brazo, usando los mismos antígenos en 124 personas antes y después de la vacunación.

Ag	D.O. 405 nm		Ag	IDR (mm)	
	Pre-vac \bar{x} σ	Post-vac \bar{x} σ		Pre-vac	Post-vac
La	0,36 ± 0,14	0,36 ± 0,15	La+Lb+ Lb+Lch	0	10,73 ± 4,2
Lv	0,26 ± 0,13	0,28 ± 0,14			
Lb	0,27 ± 0,14	0,28 ± 0,14			
Lch	0,29 ± 0,15	0,30 ± 0,14			

Ag: antígenos; La: L. amazonensis; Lv: L. venezuelensis; Lb: L. brasiliensis; Lch: L. donovani chagasi.

de ello, tal procedimiento no es totalmente efectivo, pues el 2,6% de los leishmanizados contrajo de nuevo la enfermedad y solo el 93% convirtió a una intradermoreacción positiva, a pesar de haber desarrollado la lesión leishmánica. En estos individuos existe el riesgo de diseminación de la enfermedad a la mucosa orofaríngea y de que la persona leishmanizada se convierta en reservorio natural de la enfermedad. Los ensayos de vacunación con parásitos muertos (12-19) han dado resultados variables con una conversión a la intradermoreacción positiva entre un 50-78% de los casos humanos vacunados, sin embargo, la efectividad ha sido difícil de evaluar pues la enfermedad desapareció del área en estudio (17). En voluntarios del ejército del Brasil, vacunados con promastigotes muertos, se ha visto reducciones del 67% y 85% en la incidencia de la enfermedad. En los últimos ensayos de 1981 y 1983, la conversión de las personas vacunadas a la intradermoreacción positiva fue de 35% y 68%, respectivamente. En nuestro trabajo, la gran mayoría de las personas vacunadas (84-94%) desarrolló positividad a la reacción intradérmica, lo cual evidencia una excelente respuesta de sensibilidad retardada y por ende el desarrollo de inmunidad celular clave para la ausencia de inmunosupresión y la defensa contra la enfermedad. Es de extremo interés el que los pacientes vacunados no desarrollaron inmunidad humoral, como se desprende de los datos obtenidos con los sueros en la reacción de ELISA, pues ello quizás es la base para explicar la alta protección obtenida en el grupo humano vacunado, donde sólo aparecieron 4 casos de leishmaniasis, 3 con una sola dosis de vacuna y una con 3 dosis de vacuna, es decir, el 99,5% de las personas vacunadas han permanecido libres de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- Manson P. "Tropical Diseases". 5a. Ed. Londres, Cassell Col. 1914:217.
- Modabber F. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis of men and mice. *Parasitology* 1989; 98:549:560.
- Nicolle C, Manceaux L. Recherches sur le bouton d'Orient. Cultures. Reproduction experimentale. Immunization. *Ann Inst Pasteur Lille* 1910;24:673-683.
- Adler S, Theodor O. The experimental transmission of cutaneous leishmaniasis to man from *Phlebotomus papatasi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1925;19:365-369.
- Lawrow AP, Dubowskoj PA. Uber Schutzimpfungen gegen hautleishmaniose. *Arch Schiffs- u Tropenhyg* 1937; 41:374-384.
- Berberian D A. Vaccination and immunity against Oriental sore. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1939;33:87-94.
- Montenegro J. A cutis reagao na leishmaniose. *An Fsc Med S Paulo* 1926; 1:323-330.
- Montenegro J. Cutaneous reactions to leishmaniasis. *Arch Dermatol Syph* 1926;13:187-193.
- 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.
- Katzennellenbogen I, Levy I. Prevention of leishmaniasis in a Kibbutz by inoculation. *Harefuah* 1968;75:177-180.
- Koufman A, Egoz N, Greenblatt C L, Handman E, Montillo B, Evenpaz Z. Observations on immunization against cutaneous leishmaniasis in Israel. *Israel J Med Sci* 1978; 14:218-222.
- Salles Gomes L. A intra-dermo-reacao de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas affins. *Brasil-Médico* 1939;57:1079-1087.
- Pessoa SB, Pestana BR. Ensaio sobre a vacinacao preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germens mortos. *Rev Biología e Higiene* 1940;10:112-118.
- Pessoa SB. Profilaxia de leishmaniose tegumentar no Estado de Sao Paulo. *Folha Medica* 1941;22:157-161.
- Pessoa SB. Segunda nota sobre a vacinacao preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomonas mortas. *Rev Paulista Med* 1941;19:1-9.
- Curban GB. Contribuicao clinica ao estudo da vacinacao preventiva na leishmaniose. *Rev paulista Med* 1941; 10:334-335.
- Antunes CMF, Mayrink W, 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 Hy* 1979;73:385-387.
- Antunes CMF, Mayrink W, Magalhaes P, Da Costa CA, Melo M, Dias M, Michalick MS, Williams P, Oliveira Lima A, Vieira JB, Schettini PM. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol* 1986;15:572-580.
- Nascimento E, Mayrink W, Da Costa CA, Michalick MS, Melo MN, Barros GC, Dias M, Antunes CMF, Lima MS, Taboada DC, Liu TYPM. Vaccination of humans against cutaneous leishmaniasis cellular and humoral immune responses. *Infect Immun* 1990;58:2198-2203.

20. Pérez H, Labrador F, Torrealba JW. Variations in the response of five strains of mice to leishmania mexicana. *Int J Parasitol* 1979;9:27-31.
21. Mitchell GF, Hadman E. Leishmania tropica major in mice: vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice of high genetic susceptibility. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1983; 61:11-25.
22. 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.
23. Liew FY, Singleton A, Cillari E, Howard JG. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. V. Mechanism of the anti-protective blocking effect induced by subcutaneous immunization against leishmania major infection. *J Immunol* 1985;135:2102-2107.
24. Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promas-tigotes. *J Immunol* 1987;139:221-227.
25. Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfrac-tions of a soluble promastigote extract. *J Immunol* 1987; 139:3118-3125.
26. Russell DG, Alexander J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J Immunol* 1988; 140:1274-1279.
27. Manjour O, Vouldoukis I, Osunkolade 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.
28. Frommel D, Ogunkolade BW, Vouldoukis I, Monjour L. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in Balb/c mice. *Infect Immun* 1988;56:843-848.
29. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1988;168:1675-1684.
30. 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.
31. Jaffe CL, Rachamin N, Sarfstein R. Characterization of two proteins from Leishmania donovani and their use for vaccinations against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1990;144:699-706.
32. White AC, McMahon-Pratt D. Prophylactic immunization against experimental Leishmania donovani infection by use of a purified protein vaccine. *J Infect Dis* 1990; 161:1313.
33. Yang DM, Fairweather N, button LL, MacMaster WR, Kalh 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.
34. Yang DM, Rogers MV, Liew FY. Identification and characterization of host-protective T-cell epitopes of a major surface glycoprotein (gp63) from leishmania major. *Immunology* 1991;72:3-9.
35. O'Daly JA, Rodríguez MB. Differential growth requirement of several Leishmania ssp in chemically defined culture media. *Acta Tropica (Basel)* 1988;45:109-126.
36. O'Daly JA, Rodríguez M, 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.
37. Scorza JV, Valera M, De Scorza C, Carnevali M, Moreno E, Lugo-Hernández A. A new species of leishmania parasites from the Venezuelan Andes region. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1979;73:293-298.
38. O'Daly JA, Cabrera Z. Una vacuna contra la leishmaniasis mucocutánea y la leishmaniasis visceral. *Gac Méd Caracas* 1985;93:17-61.
39. O'Daly JA, Cabrera Z. Immunization of hamster with TLCK-killed parasites induces protection against Leishmania infection. *Acta Tropica (Basel)* 1986;43:225-236.
40. 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.
41. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall. Protein measurement with folin phenol reagents. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
42. Laemmli UK. Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 1970; 227:680- 685.
43. O'Daly JA, Fernández V, Rodríguez MB, Yanes A, Ovalles T, Goa I. Proteínas de la superficie y proteínas excretadas por Trypanosoma cruzi y Tripanosoma rangeli, su importancia en el diagnóstico y la patogenia de la enfermedad de Chagas. *Gac Méd Caracas* 1990;98:237-255.
44. Convit J, Castellanos PL, Rondón AJ, Pinardi ME, Ulrich M, Castes M, Bloom B, García L. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1987;i:401-404.