

Şanlıurfa'da Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis Hastalarının Hücresel İmmun Cevabı

Nevin TURGAY¹, Songül BAYRAM DELİBAŞ², Derya DİRİM ERDOĞAN¹, Yusuf ÖZBEL¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova; ²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir

ÖZET: Leishmanial antijenler, kutanöz leishmaniasisli (KL) hastalarda, güçlü geç tip hipersensitivite reaksiyonunu uyarmak suretiyle kuvvetli *in vitro* proliferasyon cevabına neden olmaktadır. *L. tropica*'nın neden olduğu antroponotik KL olgularındaki T hücre cevabının tanımlanması enfeksiyonun immunopatolojisinin açıklanması için önem taşımaktadır. Çalışmamızda, akut ve tedavi olmuş KL hastalarının T hücre cevabı, IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-10 ölçümleri yapılarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda akut KL olgularında Th2 hücre cevabı saptanırken, iyileşmiş KL hastalarında Th1 cevabı belirlenmiştir. Enfeksiyonun farklı evrelerindeki T hücre cevabının tanımlanması, prognozun daha iyi anlaşılması ve değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Leishmania*, sitokin, Th

Cellular Immune Response of Patients with Antroponotic Cutaneous Leishmaniasis in Şanlıurfa

SUMMARY: Patients with cutaneous leishmaniasis (CL) have strong delayed-type hypersensitivity and *in vitro* proliferative responses to leishmanial antigens during active and cured diseases. To define the T cell response in patients with antroponotic CL infected with *L. tropica* is important to clarify the immunopathologic nature of the disease. T cell responses of acute and of already healed CL patients were defined using IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-10 cytokine measurement assays. In this study, while Th2 cell response was found to be dominant in active CL cases, Th1 cell response was more distinctive in the group of already healed CL cases. Differentiation of cellular response in the different stages of infection might be helpful in understanding the prognosis of leishmaniasis.

Key Words: *Leishmania*, cytokine, T cell response

GİRİŞ

Türkiye'de visseral leishmaniasis (VL) ve kutanöz leishmaniasis (KL) olguları bildirilmektedir. İnsan VL olgularına Akdeniz ve Ege bölgelerinde endemik veya sporadik olarak rastlanmaktadır (11). Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre 1991-2003 yılları arasında tüm Türkiye'den toplam 26,727 KL olgusu bildirilirken, bu olguların 16,036'sının Şanlıurfa'dan bildirildiği gözlenmiştir (20). Hiperendemisiteye özellikle şehrin etrafından geçen ırmağın etrafında rastlanmaktadır (2). Hasta sayısında 2000'li yılların başlarında görülen azalmanın olası sebepleri eğitim programları ve başarılı tedavi uygulamaları olarak sayılabilirken, özellikle geçirilmiş enfeksiyon sonrası kazanılmış immün cevabı elde eden kişilerin sayısının artması da olası nedenler arasında kabul edilebilmiştir. Ancak

daha sonraki yıllarda uygulanan programlardaki aksaklıklar hasta sayılarının tekrar artmasına neden olmuştur.

Genel immunolojik prensipler açısından incelendiğinde CD4+ T lenfositlerinin sentezledikleri farklı sitokine göre alt gruplara ayrılması enfeksiyon hastalıklarında öne çıkan bir özelliktir. Th1 (T helper) hücreleri IFN-gama sentezi yaparak özellikle hücresel immün cevapta rol oynarken, Th2 hücreleri IL-4 ve IL-5 sentezi ile sıvısal immün cevapta rol oynamaktadırlar. KL ve mukozal leishmaniasis (ML)'de rol oynayan Th1 hücreleri, IL-12 ve IFN-gama'nın özellikle deri lezyonlarının iyileşmesinde ve enfeksiyonun kontrol altına alınmasında rol oynadığı gösterilmiştir (3). Çeşitli çalışmalarda KL immunopatolojisinin anlaşılabilmesi için *L. major* enfeksiyonu ve antijenleri model olarak alınmıştır (19). Deneysel *L. major* enfeksiyonlarında Th1 cevabının baskın olması, lezyonların iyileşmesine neden olurken, Th2 cevabının, ilerleyen hastalık tablolarına neden olduğu gözlenmiştir (8, 16).

L. tropica'nın sebep olduğu enfeksiyonun model olarak kullanıldığı çalışma sayısı kısıtlı olup, Türkiye'deki KL hastaları

Geliş tarihi/Submission date: 25 Ekim/25 October 2005

Düzeltilme tarihi/Revision date: 17 Şubat/17 February 2006

Kabul tarihi/Accepted date: 23 Şubat/23 February 2006

Yazışma /Corresponding Author: Nevin Turgay

Tel: (+90) (232) 390 47 16 Fax: (+90) (232) 388 13 47

E-mail: nevin.turgay@ege.edu.tr

Bu çalışma, Dünya Sağlık Teşkilatı (RCS/TDR Grant No: 990860)

ve E.Ü. EBİLTEM (Proje No: 2001/BİL/011) tarafından desteklenen projenin bir bölümünü oluşturmaktadır.

nın hücreselel immun cevapları daha önce incelenmemiştir. Çalışmamızda enfeksiyonun farklı evrelerinde bulunan hastaların bölgesel *L.tropica* suşundan hazırlanan *Leishmania* eriyik antijenine karşı verdikleri immun cevap, sitokin ölçümleri yapılarak değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta grupları: Çalışmamız, KL'nin hiperendemik olduğu Şanlıurfa'daki Harrankapı Sağlık Ocağı'nda Temmuz 2000-Eylül 2002 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada, (1) aktif KL'si olup hiç tedavi olmamış olgular (AKL); (2) İntralezyoner antimon (Glucantime®) tedavisi ile lezyonu tamamen iyileşmiş eski KL olguları (TKL) ve (3) non-endemik bir bölgeden gelen sağlıklı gönüllüler (kontrol grubu) (K) olmak üzere üç hasta grubu oluşturulmuştur. Aktif KL'li 118, tedavi olmuş KL'li 108 ve 85 sağlıklı gönüllüden olmak üzere toplam 311 örnek toplanmıştır. Örnek gruplarının sayıları α :%5, effect size index (d): %30, statistic power: %70'a göre belirlenmiştir (12).

Grup 1'e dahil edilen hastalar, Harrankapı Sağlık Ocağı'na gelen ve lezyon aspirasyon örneğinden yayma preparat hazırlanarak giemsa ile boyama sonrası amastigot tespit edilen hastalardır. Grup 2'ye dahil edilen hastalar ise eski kayıtlara bakarak tamamiyle tedavi olduğu saptanan hastalar Sağlık Ocağı'na tekrar kontrol için çağırılan ve çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardır. Kontrol grubu olarak alınan kişiler de EUTF öğrencisi olan ve endemik bölgeye hiç gitmemiş, sağlıklı erişkinlerdir.

Çalışmaya alınan kişilerin hepsinden 10 ml heparinli kan alınmıştır. Harrankapı Sağlık Ocağı'nda alınan kanlar soğuk zincir içerisinde aynı gün taşıma şirketine teslim edilmiş ve ertesi gün EUTF Parazitoloji Anabilim Dalı'na ulaştırılarak burada işleme tabi tutulması sağlanmıştır.

Örnek alınan tüm hastalar ve gönüllüler çalışma konusunda bilgilendirilmiş ve onayları alınarak "Bilgilendirilmiş Onam Formu" doldurulmuştur.

Antijen: Soluble *Leishmania* lizat antijeni (SLA); Şanlıurfa'dan izole edilmiş olup RPMI 1640 sıvı besiyerinde logaritmik fazda üremekte olan *L.tropica* MON-53 promastigotlarından dondurup çözündürme yöntemi ile daha önce tanımlandığı şekilde hazırlanmıştır (15).

T hücre proliferasyon yöntemi: Heparinli perifer kandan, Ficoll-Histopaque kullanılarak gradient santrifüj yöntemi ile perifer kan mononükleer hücreleri (PBMC) ayrılmıştır. Hücreler $2-3 \times 10^5$ PBMC/çukur olacak şekilde, 10 mg/ml "*Leishmania* eriyik antijeni" (SLA) ile %10 HuS içeren RPMI 1640 besiyeri içerisinde 3 gün inkübe edilip üst sıvılar alınmıştır. Bu işlem sırasında antijen içermeyen besiyeri negatif kontrol, PHA (phytohemaglutinin) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen üst sıvılarda "anti-sitokin monoklonal

antikorları" kullanılarak "double sandwich ELISA yöntemi" ile IFN-gama, IL-5, IL-4 ve IL-10 ölçümleri yapılmıştır (17).

Gruplar arasındaki farklar "student t test" ile karşılaştırılmış ve tüm değerler SPSS 8.0 analiz programına (SPSS 8.0. Professionelle Statistik unter Windows, 1998, MITP-VERLAG, Germany) göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaşayan ve çalışma için örnek alınan toplam aktif veya tedavi olmuş 226 KL hastasının temel özellikleri tablo 1'de belirtilmiştir.

KL hastalarının ve sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunun SLA'e karşı verdikleri spesifik IL-4, IL-5, IL-10 ve IFN sentez cevapları şekil 1'de gösterilmiştir. Aktif lezyonu olan AKL grubundaki olguların *Leishmania* eriyik antijenine spesifik IL-4 ve IL-5 sentez miktarları sırasıyla 98,4 pg/ml ve 54,8 pg/ml olarak ölçülürken, TKL grubundaki hastaların IL-4 miktarı azalarak 58,6 pg/ml ($p < 0,001$), IL-5 miktarı ise hafif bir artışla 73,8 pg/ml olarak saptanmıştır. IFN sentezleri ise AKL grubunda 42,8 pg/ml olarak tespit edilirken, TKL grubundaki IFN sentezi istatistiksel olarak anlamlı artış göstererek 280,6 pg/ml olarak ölçülmüştür ($p < 0,001$). IL-10 sentezlerinde ise AKL ve TKL grupları arasında belirgin bir farklılık tespit edilememiştir (sırasıyla 44,4 pg/ml ve 42,2 pg/ml) (Tablo 2).

Tablo 1. Hasta gruplarının temel özellikleri

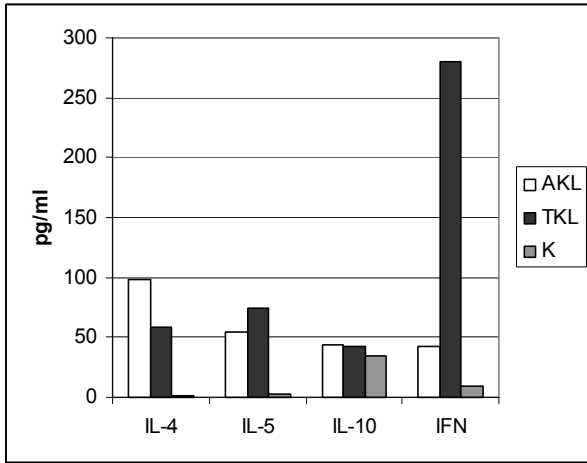
Özellik	AKL	TKL
No	118	108
Kadın/Erkek oranı	73 / 45	45 / 63
Ortalama yaş (en genç-en yaşlı)	24,6 (5-70)	21,4 (8-53)
Ortalama lezyon sayısı (max-min)	1,5 (1-8)	1,3 (1-11)

AKL: Akut kutanöz leishmaniasis grubu ; TKL: Tedavi olmuş kutanöz leishmaniasis grubu

Tablo 2. AKL, TKL hasta grupları ve kontrol grubunda sitokin sentez miktarları (pg/ml)

Sitokin	Antijen	AKL	TKL	K
IL4	negatif	1	1	1
	SLA	98,40	58,58	1
IL5	negatif	23,99	15,19	28,12
	SLA	54,83	73,82	2,33
IL-10	negatif	52,85	52,99	65,27
	SLA	44,40	42,23	35,11
IFN	negatif	59,41	23,62	57,13
	SLA	42,85	280,59	9,75

negatif: hücrelerin antijen içermeyen besiyerine olan cevabı (negatif kontrol) SLA: *Leishmania* eriyik antijene olan cevap



Şekil 1: Her üç grupta saptanan sitokin sentezleri. AKL: Akut kutanöz leishmaniasis grubu ; TKL: Tedavi olmuş kutanöz leishmaniasis grubu; K: kontrol grubu

TARTIŞMA

Leishmania cinsi protozoonlar memeli konakta hücre içinde yaşayan parazitler olup, insanlarda iç organları ve/veya deriyi tutabilen çok farklı klinik semptomlarla seyreden farklı hastalıklara (VL, KL) neden olabilmektedirler. Leishmaniasis, Afrika'dan Orta ve Güney Amerika'ya, Doğu ve Güney Avrupa'dan Asya'ya kadar yayılan geniş bir coğrafyayı etkilemektedir. Dünya Sağlık Teşkilatının en önemli altı enfeksiyon hastalığından birisi olarak kabul edilmektedir (10).

Hüresel immün cevabın leishmaniasis patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Koruyucu cevabı uyaran hücrelerin Th1 kökenli olup IFN ve IL-2 sentezini gerçekleştirdikleri, buna karşılık hastalığa duyarlılığı arttıran hücrelerin Th2 kökenli olup bunların da en başta IL-4 ve IL-5 sentezi yaptıkları daha önce bildirilmiştir. Bu sitokinler arasında denge görevini de IL-10 yapmaktadır (4).

Her ne kadar hüresel immün cevap çalışmalarının başlangıcında, KL hastalarının PBMC'lerinden IL-10 sentezi tespit edilememiş olsa da bizim çalışmamızda IL-10 sentezi ve özellikle akut KL hastalarında IL-5 sentezleri tespit edilmiştir. Son dönemlerde Reiner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da KL hastalarında IL-10 mRNA'nın hasta örneklerinde yüksek oranlarda gösterildiği bildirilmekte olup (14) bu durum bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. IL-10'un Amerikan KL hastalarında immün cevabın önemli bir düzenleyicisi olduğu, IL-10'a bağlı oluşan TNF inhibisyonunun hastaların tedaviye olan cevabını belirleyen en önemli faktörlerden birisi olduğu gösterilmiştir (9). Ancak bu konu ile ilgili *L.tropica* modellerinin kullanıldığı çalışma sayısının yetersizliği gözönüne alındığında, konu hakkındaki çalışmaların devamının gerekliliği bir kez daha ortaya çıkmaktadır.

Farklı çalışmalarda Th1 / Th2 cevaplarının öne çıkması farklı tespit edilmiş olup, bir çalışmada hem aktif lezyonlu hemde iyileşmiş KL olgularında Th1 benzeri cevap tespit edilirken

(1), Amerikan KL olgularının incelendiği bir çalışmada ise Th1 ve Th2 cevaplarından oluşan karma bir sitokin sentezi tablosu tespit etmişlerdir (7). Bizim çalışmamızda, aktif lezyonlu AKL grubunda IFN sentezi IL-4 ve IL-5 sentezlerinden daha az tespit edilirken, geçirilmiş enfeksiyonlu TKL grubunda ise IFN sentezi IL-4 ve IL-5 sentezlerinden anlamlı olarak fazla meydana geldiği saptanmıştır ($p<0,001$). AKL grubundaki IFN sentezinin enfeksiyonun iyileşmesini takiben oluşturulan TKL grubunda belirgin olarak arttığı da belirlenmiştir ($p<0,001$). Aktif enfeksiyon sırasında immün sistemi enfeksiyona karşı hassaslaştıran Th2 cevabı öne çıkarken, geçirilmiş enfeksiyonlu grupta immün sistemin en önemli savunma güçlendiricisi sitokinlerinden olan, Th1 hücre kökenli IFN'nın sentezinin daha belirgin olduğu saptanmıştır ($p<0,001$).

İyileşmiş hastalarda tespit edilen 280 pg/ml IFN üretimi multipl lezyonu olan ve özellikle Amerikan KL olgularında olduğu gibi uzun süreli lezyon hikayesi taşıyan hastalardaki IFN sentez miktarından düşük olduğu gözlenmektedir. Ancak çalışmaya dahil edilen tedavi edilmiş grubun büyük bir kısmı (%81,5) kendiliğinden iyileşmiş tek bir lezyon taşımakta olup, bu lezyonların da %64'ünün yüzde olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalarda birden fazla lezyonu olan ve uzun dönem tedavi almış hastalara göre daha düşük oranda IFN sentezi tespit edilmiş olması şaşırtıcı olmamalıdır. Yine immün stimulatör olarak bilinen, IFN sentezini uyaran ve makrofajlar tarafından sentezlenen bir sitokin olan IL-12 ölçümleri yapılması da çalışmanın başında planlanmakla birlikte perifer kan mononükleer hücreleri içerisinde bulunan makrofaj sayısının yetersiz olması, IL-12 miktarının tespit edilebilir seviyenin altında çıkmasına neden olmuştur. Bu çalışmanın devamında makrofaj kültürü yapılarak IL-12 seviyelerinin ölçülmesi de planlanmaktadır.

Günümüzde leishmaniasis tedavisinde beş değerlikli antimon bileşikleri, liposomal amfoterisin B ve pentamidine kullanılmaktadır. Bu ilaçlarla uygulanan tedavi yaklaşımları pahalı olması, toksisitelerinin yüksek olması ve ilaca zaman içerisinde direnç gelişme olasılıkları bulunmasına rağmen şu an itibarıyla bulunan tedavi alternatiflerini oluşturmaktadırlar. 2001 yılında antimon bileşiklerinin ithali ile ilgili yaşanan problemleri takiben, sadece Şanlıurfa ilinde kayıtlı olan KL hasta sayısı 2000 yılında saptanan 200 sayısından 2004 yılında 4187'ye ulaşmıştır. Aslında leishmaniasis, güvenli, etkili tanı ve tedavi ile aşı adaylarının geliştirilmesi için mükemmel bir enfeksiyon hastalığı örneğidir. Ancak farklı türlerde görülen geniş antijenik çeşitlilik sorunlar yaratmaktadır. Özellikle Güney Amerika'da görülen türlere karşı aşı denemeleri devam ederken, bunların eski dünya türleri üzerindeki etkileri de çeşitli çalışmalarda denenmektedir. Bu çalışma ile Türkiye'deki *L.tropica* hastalarının aktif enfeksiyon sırasında immün cevabı zayıflatan Th2 hücre etkinliğine sahipken, enfeksiyonun geçirilmesi sonrası Th1 cevabının ve IFN sentezinin belirgin olarak arttığını gösterilmiştir. Bellek hücrelerinin geçirilmiş en-

feksiyona karşı silahları saklaması risk altındaki grupların aşılınması halinde korunmanın yüksek oranda olabileceği tezini desteklemektedir. Yörede geleneksel olarak uygulanan lezyonlu bir kişinin yarısının kenarından alınan sürüntünün sağlam kişinin görünmeyen bir yerine inoküle edilerek lezyonun gizli bir yerde oluşturulup, iyileşme sonrası hastanın korunmasının sağlanması (leishmanizasyon) her zaman lezyonun tekrar aktive olması riskini taşımaktadır.

Son dönemlerde leishmaniasisde aşı çalışmalarında, DNA veya rekombinant kökenli aşı modelleri öne çıkmaktadır (5, 6, 13, 18). Bu çalışma kapsamında Şanlıurfa'daki KL hastalarının Leishmania eriyik antijeni yanında, *L.brasiliensis*, *L.mexicana* ve *L.major*'dan elde edilen rekombinant antijenlere karşı spesifik immun cevapları araştırılıp, özellikle tedavi olmuş grupta uzun dönemde koruyucu immun cevabı bellek hücrelerinde en çok kalan antijenlerin koruyuculuğu araştırılmıştır. Ancak bu çalışmada Şanlıurfa'daki KL hastalarının hücrelerinin sözü geçen parazitlerden elde edilen antijenleri tanımadığı saptanmıştır. Özellikle leishmaniasis için genel bir aşı adayı olarak sunulan "rekombinant protein kokteyli"nin *L.tropica*'nın sebep olduğu KL olguları tarafından tanınmaması, *L.tropica*'da türe özgü antijenler kullanılmayınca beklenen korunmanın elde edilemeyeceği sonucuna varılmasına neden olmuştur (N. Turgay-yayınlanmamış sonuçlar). Bu nedenle tedavinin maliyeti de gözönüne alınarak *L.tropica*'a "özgü" antijenlerin kullanıldığı aşılama modellerinin Türkiye'deki kutanöz leishmaniasis problemine alternatif bir çözüm olabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bilimsel destekleri için Seattle İnfeksiyon Hastalıkları Araştırma Enstitüsü'nden (IDRI) Dr. Steven G. Reed'e, EÜTF Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Seray Özensoy ve Doç. Dr. Metin Korkmaz'a, Şanlıurfa Harrankapı Sağlık Ocağı Şark Çıbanı Merkezi çalışanlarından Teknisyen Kadri Bulut'a ve sonuçların istatistik analizlerinde yardımcı olan EÜTF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Cumhur Gündüz'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A**, 2000. Comparison of the immune profile of non-healing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun*, 68(4):1760-4.
2. **Aksoy S, Ariturk S, Armstrong MYK, Chang KP, Dortbudak Z, Gottlieb M, Ozcel MA, Richards FF, Western K**, 1995. The GAP project in Southeastern Turkey: the potential for emergence of disease. *Emerg Infect Dis*, 1(2): 62-63
3. **Awasthi A, Mathur RK, Saha B**, 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, 119(6):238-58.
4. **Beyrodt CG, Pinto AR, Freymuller E, Barbieri CL**, 1997. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. *Infect Immun*, 65(6): 2052-2059.
5. **Brodskyn C, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M**, 2003. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines*, 2(5): 705-717.
6. **Coler RN, Reed SG**, 2005. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 21(5): 244-249.
7. **Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonca SC, Bertho AL, Soong L, McMahon-Pratt D**, 1996. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*, 84(2): 144-155.
8. **Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM**, 1989. Reciprocal expression of IFN-gamma or IL-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*, 169: 59.
9. **Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM**, 2001. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*, 65(2) :87-89.
10. **Markell EK, John DT, Krotoski WA**, 1999. *Markell and Voge's Medical Parasitology*. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders.
11. **Ozbel Y, Turgay N, Ozensoy S, Ozbilgin A, Alkan MZ, Ozcel MA, Jaffe CL, Schnur L, Oskam L, Abranches P**, 1995. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol*, 89 Suppl 1:89-93
12. **Portney LG, Watkins MP**, 1993. "Foundations of Clinical Research, Application to practice". Appleton & Lange.P: 651-667.
13. **Reed SG, Campos-Neto A**, 2003. Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Curr Opin Immunol*, 15(4): 456-460.
14. **Reiner SL**, 1994. Parasites and T helper cell development: some insights. *Parasitol Today*, 10(12): 485-488.
15. **Russo DM, Chakrabarti P, Burn JM**, 1998. Naïve human T cells develop into Th1 or Th0 effectors and exhibit cytotoxicity early after stimulation with *Leishmania* infected macrophages. *J Infect Dis*, 177(5): 1345-1351.
16. **Scott P, Natovitz P, Coffman R, Pearce E, Sher A**, 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and responds to distinct parasite antigens. *J Exp Med*, 168: 1675.
17. **Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacellar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro R, Trinchieri G, Reed SG**, 1995. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human PBMC to express Th1-type cytokine profile and to produce IL-12. *J Exp Med*, 181, 4: 1527-1537.
18. **Vanloubbeek Y, Jones DE**, 2004 The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann N Y Acad Sci*, 1026: 267-272.
19. **Webb JR, Campos-Neto A, Skeiky YAW, Reed SG**, 1997. Molecular characterization of the heat-inducible LmSTII protein of *L. major*. *Mol Biochem Parasitol*, 89: 179-193.
20. www.saglik.gov.tr, (Erişim tarihi: 25.10.2005).