

مقایسه تولید اینترفرون گاما و آزمون پوستی لیشمانیوز در موارد لیشمانیوز پوستی بهبود نیابنده با موارد بهبود یافته از بیماری

دکتر حسین مرتضوی^۱، دکتر علی خامسی پور^۲، دکتر زهرا حلاجی^۱، دکتر حسین بخشی^۳،
اکرم میرامین محمدی^۴

۱- استادیار، گروه پوست، بیمارستان رازی، ۲- استادیار، مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام، ۳- دستیار، گروه پوست، بیمارستان رازی، ۴- کارشناس آزمایشگاه، مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام؛ دانشگاه علوم پزشکی تهران

در دو گروه مقایسه گردید.

یافته‌ها: میانگین مقدار اینترفرون گاما در افراد مبتلا به لیشمانیوز بهبود نیابنده ۷۲۹ پیکو گرم در میلی لیتر و در گروهی که از بیماری بهبود یافته بودند ۴۲۲۹ پیکو گرم در میلی لیتر بود ($P < 0.01$ و t test). آزمون لیشمانیوز در ۴ نفر از گروه بهبود نیابنده منفی و در همه موارد گروه بهبود یافته مثبت بود.

نتیجه گیری: میزان پایین اینترفرون گاما در بیماران بهبود نیابنده نشانگر فقدان واکنش Th1 و میزان بالای اینترفرون گاما در افرادی که از لیشمانیوز پوستی حاد بهبود یافته اند نشانگر واکنش Th1 است که بطور معمول در موارد بهبود نیابنده دیده می‌شود. نتایج مربوط به آزمون پوستی لیشمانیوز در دو گروه قابل تفسیر نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لیشمانیوز پوستی، بهبودی، اینترفرون گاما

مقدمه: بیماری سالک یا لیشمانیوز پوستی یک بیماری خودبخود بهبود نیابنده است، اما در مواردی به علی‌که دقیقاً معلوم نیست سیر بهبودی خودبخود بهبود نیابنده دیده نمی‌شود. این موارد را نوع بهبود نیابنده (non-healing) می‌نامند و در دسته لیشمانیوز مزمن قرار می‌دهند.

هدف: مقایسه میزان تولید اینترفرون گاما و آزمون لیشمانیوز در بیماران بهبود نیابنده با موارد بهبود یافته از بیماری حاد لیشمانیوز پوستی.

روش اجرا: ۱۵ بیمار مبتلا به لیشمانیوز بهبود نیابنده با دوره بیماری بیشتر از دو سال و ۸ فرد سالم که از لیشمانیوز پوستی بهبود یافته بودند برای مطالعه انتخاب شدند. میزان اینترفرون گاما تولید شده توسط سلولهای خون محیطی در مجاورت آنتی‌ژن لیشمانیا به روش الیزا اندازه‌گیری شد و آزمون پوستی لیشمانیوز

مقدمه

ایران به آن سالک می‌گویند (۱، ۲). از آنجا که در این مقاله از موارد بهبود نیابنده بیماری بحث می‌شود که بهبودی آن سالیان دراز به طول می‌انجامد، بجای واژه سالک از لیشمانیوز پوستی استفاده می‌گردد. بخشی از مطالعات اولیه و مهم لیشمانیوز مزمن در ایران انجام شده است. Petite

لیشمانیوز پوستی معمولاً بدون درمان، در مدت کمتر از یک سال بهبود می‌یابد، به همین جهت در فرهنگ عامیانه

مؤلف مسئول: دکتر حسین مرتضوی - تهران، میدان وحدت اسلامی، بیمارستان رازی، بخش پوست

نقش تعیین کننده‌ای در روند بیماری دارند. بطوریکه در لیشمانیوز پژوهی در موشها، سایتوکاین‌های حاصل از سلولهای Th1 یعنی IL-2 و IFN- γ عفونت را کنترل می‌کنند و سایتوکاین‌های حاصل از سلولهای Th2 یعنی IL-4 و IL-5 و فاکتور تغییردهنده رشد بتا (Transforming Growth Factor Beta) (IFN- γ) گسترش عفونت در مدل حیوانی می‌شوند (۱۱-۱۳). سایتوکاین فعال کننده ماکروفاژ‌هاست و فرایند فعال شدن ماکروفاژ‌ها منجر به کشته شدن داخل سلولی آماتیگوت‌ها می‌گردد. کشته شدن انگل در داخل ماکروفاژ از طریق برانگیخته شدن نیتریک اکسید استاتاز انجام شده و در پی آن اکسید نیتریک تولید می‌شود که منجر به مرگ آماتیگوت‌ها می‌گردد (۱۲، ۱۳). از طرف دیگر IL-4 مانع از فعال شدن ماکروفاژ‌ها توسط اینترفرون گاما می‌گردد (۱۲). مطالعات متعددی نقش اینترفرون گاما را در بیماری‌ای لیشمانیوز پژوهی (۱۴) و احشائی (۱۵) بررسی کرده‌اند. در این مطالعه مابه بررسی میزان تولید اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به لیشمانیوز پژوهی بهبود نیابنده و مقایسه آن با بیماران بهبودیافته پرداختیم.

روش اجرا

۱۵ بیمار با سن بالای ۵ سال مبتلا به لیشمانیوز پژوهی که ضایعات ایشان بدون درمان یا علی‌رغم درمان‌های مختلف بیش از دو سال پایدار باقی مانده بود به عنوان موارد لیشمانیوز پژوهی بهبود نیابنده (۱۶) برای مطالعه انتخاب شدند. برای ورود به مطالعه داشتن حداقل یک اسمیر مثبت از نظر جسم لیشممن الزامی بود. ۸ بیمار دیگر نیز با سن بیش از ۵ سال، سابقه ابتلاء به لیشمانیوز پژوهی و بهبودی ضایعه پژوهی بطور خودبخودی یا با درمان در مدت کمتر از یک سال، بعنوان شاهد در این مطالعه وارد شدند.

زمان اقامت خود در شیراز گزارشی درباره لیشمانیوز مزمن نوشته (۳) و بعدها در کتاب خود آن را شرح داد (۴). البته اولین گزارش لیشمانیوز مزمن بوسیله کریستوفرسن در سال ۱۹۲۳ تحت عنوان لوپوس لیشمانیازیس منتشر شد (۵). لیشمانیوز پژوهی مزمن از موارد پیچیده لیشمانیوز است زیرا بیماری سیر خودبخود بهبود نیابنده (self-healing) ندارد. ما در این مقاله از این موارد به عنوان بیماران بهبود نیابنده (non-healing) نام می‌بریم. این پدیده مورد قبول محققین بالینی و علوم پایه می‌باشد و حتی ژنهای بهبود نیابنده (بهبود نیابنده گی) در عفونت لیشمانیایی ناشی از لیشمانیا مازور (L.major) در موش بررسی شده است (۶). چون از نظر بالینی تقسیم بندی انواع بهبود نیابنده لیشمانیوز پژوهی دنیای قدیم وجود ندارد، پیشنهاد می‌شود بعضی از اشکال بالینی زیر در گروه بهبود نیابنده قرار گیرند:

- ۱- لیشمانیوز پژوهی مزمن که در بعضی منابع تحت عنوان های مجرای لیشمانیوز راجعه یا رسیدیوانس (Recidivans) و لیشمانیوز مزمن از آن نام می‌برند (۷).
- در منابع دیگر عنوان لیشمانیایی راجعه یا رسیدیوانس را مترادف لیشمانیوز مزمن و لوپوئید بکار برده‌اند (۸).

۲- ضایعات لیشمانیایی ایجاد شده در اثر لیشمانیزاسیون گاهی شکل مزمن به خود می‌گیرند. این شکل از بیماری در ایران دیده می‌شود و در غالب موارد در اثر لیشمانیا مازور ایجاد می‌گردد.

یکی از نویسندهای این مقاله موردی از لفادنیت لیشمانیایی لوکالیزه را مشاهده کرده است که شکل مزمن و بهبود نیابنده بخود گرفته بود (۹).

از نظر اینمنی‌شناسی و علوم سلولی، اینمنی سلولی در روند لیشمانیوز پژوهی نقش تعیین کننده‌ای دارد. سلول‌های T helper CD4+ با عنوان بازوی اصلی سیستم اینمنی سلولی، بخشی از این وظیفه را با واسطه سایتوکاین‌ها انجام می‌دهند (۱۰). مطالعات تجربی نشان داده‌اند که سایتوکاین‌ها

یافته‌ها

در این مطالعه ۲۳ بیمار شامل ۱۴ مرد و ۹ زن مورد بررسی قرار گرفتند.

توزیع سنی بیماران در گروه بهبودیافته بین ۱۰-۵۲ سال (میانگین ۲۳) و انحراف معیار ۱۰/۴ سال) و در گروه بهبودیافته بین ۹-۴۲ سال (میانگین ۱۶) و انحراف معیار ۱۲/۸ سال) بود.

گروه بهبودیابنده شامل ۷ مرد (٪۴۸) و ۸ زن (٪۵۲) و گروه بهبود یافته شامل ۷ مرد (٪۸۷) و یک زن (٪۱۳) بودند. مدت ابتلا به بیماری در گروه بهبودیابنده ۲۴ تا ۱۸۰ ماه (میانگین ۵۷/۲) و انحراف معیار ۵۱/۴ ماه) و در گروه بهبودیافته ۳ تا ۱۱ ماه (میانگین ۸/۲۵) و انحراف معیار ۲/۸ ماه) بود.

محل آناتومیک ضایعه در گروه بهبودیابنده در ۷ نفر روی صورت، ۶ نفر روی دست، ۱ نفر روی ساعد و ۱ نفر روی بازو بود. در بیماران بهبود یافته (طبق تاریخچه‌ای که گرفته شد)، محل ضایعه ۲ نفر روی صورت، ۳ نفر روی دست، ۲ نفر روی ساعد و یک نفر روی بازو بود.

توزیع میزان تولید اینترفرون گاما در دو گروه مورد مطالعه در جدول شماره ۱ آمده است. میانگین مقدار اینترفرون گاما در گروه بهبودیابنده ۷۲۹ پیکوگرم در میلی لیتر و در گروه بهبودیابنده ۴۲۲۹ پیکوگرم در میلی لیتر بود که یعنی میانگین مقدار اینترفرون گاما در دو گروه بهبودیابنده و بهبود یافته اختلاف قابل توجهی وجود دارد ($P < 0.01$ و t test).

آزمون پوستی لیشمانین در ۴ نفر از ۱۵ بیمار بهبود نیابنده (٪۲۶/۵) منفی و در تمام ۸ مورد بهبود یافته مثبت بود.

ابتدا هدفهای انجام این مطالعه برای بیماران توضیح داده شده و سپس محل آناتومیک ضایعه، نتایج آزمون پوستی لیشمانین، سن و جنس بیماران در پرسشنامه وارد شد. برای انجام آزمون پوستی لیشمانین، ۱۰ میلی لیتر از آنتی زن تهیه شده در انتیتو پاستور تهران سایر انداخته ساعد در داخل درم (Intradermal) تزریق گردید و پس از ۴۸-۷۲ ساعت نتایج آزمون خوانده شد.

برای اندازه گیری اینترفرون گاما ابتدا سلولهای تک هسته‌ای جدا و سپس کشت داده شد. سلولهای تک هسته‌ای Ficol Hypaque centrifugation gradient با روش جدا شدند. پس از شمارش سلولها و رنگ آمیزی آنها با تریپن بلو Trypan blue (جهت اطمینان از زنده بودن آنها) کشت سلولها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام گرفت. به هر خانه 10^5 سلول در حجم ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. سلولها با آنتی زن لیشمانیا (۴ میکرو گرم در هر چاهک) و یا فیتوهاما گلوتینین (۵ میکرو گرم در هر چاهک) تحریک شده و سلولهای بدون تحریک به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. محلول‌های رویی چاهک‌ها بعد از ۷۲ ساعت برداشته شده و تازمان اندازه گیری اینترفرون گاما در درجه حرارت 20°C -نگهداری شد.

میزان تولید اینترفرون گاما با روش ساندویچ الیزا (Sandwich ELISA) اندازه گیری شد. در این روش از آنتی بادی مونو کلونال ضد اینترفرون گاما واکسین بیوتین (Avidin-Biotin) نشان‌دار جهت ردیابی این سیتوکائین استفاده شد.

جدول شماره ۱: میزان ترشح اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به لیشمانیوز پوستی بهبودنیابنده و بهبود یافته از بیماری

انحراف معیار	میانگین	حداکثر	حداقل	میزان تولید اینترفرون گاما (پیکو گرم در میلی لیتر)	
				انواع بیماری	بهبودنیابنده
۷۰۰	۷۲۹	۲۸۸۶	۲۰۰		بهبودنیابنده
۷۰۷۹	۴۲۲۹	۱۲۵۰۰	۱۵۶۰		بهبود یافته

بیماران مزمن بهبودنیابنده سطح IL-4 بالا ولی میزان اینترفرون گاما بسیار پایین است (۹،۱۸).

در مطالعه ما که روی ۱۵ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی مزمن انجام شد کم شدن ترشح اینترفرون گاما در موارد بهبودنیابنده تأیید شد و این گروه از بیماران نسبت به بیماران بهبود یافته کاهش قابل توجهی در میزان ترشح اینترفرون گاما داشتند. در این بررسی در ۸۰٪ بیماران مزمن یا بهبودنیابنده سطح اینترفرون گاما زیر ۸۰۰ پیکو گرم در میلی لیتر بوده، در حالی که حداقل ترشح در بیماران بهبود یافته از بیماری از ۱۵۰۰ پیکو گرم در میلی لیتر بالاتر بود. اختلاف دو گروه از نظر ترشح اینترفرون گاما قابل ملاحظه بود.

در مطالعه‌ای که در مورد لیشمانیا برازیلینسیس انجام شد، Carvalho و همکاران مشخصات پاسخ ایمنی را در افراد بهبود یابنده بررسی کردند. در افرادی که لیشمانیوز پوستی به مدت سه ماه داشته و بهبود یافته بودند مقادیر اینترفرون گاما بین ۵۰۰ تا ۲۹۰۰ پیکو گرم در میلی لیتر متغیر بود (۱۹)، ولی نتایج ما در موارد بهبود یابنده بین ۱۵۶۰ تا ۲۹۰۰ متغیر بود.

اخیراً اینترفرون گاما بعنوان یکی از نشانگرهای ایمونولوژیکی سیر و پی آمد لیشمانیوز پوستی بررسی شده و نشان داده شده است که میزان اینترفرون گاما در لیشمانیوز پوستی حاد پس از درمان و بهبودی افزایش می‌یابد (۲۰).

بحث

علت اینکه برخی از موارد لیشمانیوز پوستی، مزمن می‌شود و به اصطلاح سیر بهبودنیابنده بخود می‌گیرند، هنوز کاملاً مشخص نشده است. همچنین به دلیل اینکه تعداد اندکی از بیماران سیر بهبودنیابنده بخود می‌گیرند مطالعات زیادی در این زمینه انجام نگرفته است.

۱-الگوی ترشح سایتوکاین: در این زمینه مطالعات انسانی کمی انجام شده است. در لیشمانیوز انسانی در سال ۱۹۹۴ اولین مطالعه در باره کلونهای Th1 یا Th2 در بیماران بهبود یافته از لیشمانیوز احتشایی گزارش شد (۱۵). نتایج این مطالعه نشان داد که کلونهایی از T cell بعد از تحریک با آنتی زن لیشمانیا ترجیحاً اینترفرون گاما ترشح می‌کنند (سلولهای Th1) (۱۵).

همچنین نشان داده شده است که در مراحل اولیه عفونت L.donovani، فقدان تولید اینترفرون گاما موجب پیدایش شکل برآسای لیشمانیوز احتشایی (fulminant) می‌شود در حالی که افرادی که مقادیر زیاد اینترفرون گاما تولید می‌کنند بدون علامت باقی می‌مانند (۱۷). در مورد لیشمانیوز پوستی نشان داده شده که افرادی که سابقه عفونت L.major چه بصورت لیشمانیوز پوستی با سیر عادی و بدون عارضه یا به شکل عفونت نهفته (subclinical) داشته‌اند، به آنتی زن‌های لیشمانیا پاسخ قوی نشان داده‌اند (۱۷). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که در Th1

د) نامناسب بودن آنتی زن مورد استفاده ه) خطاهای تکنیکی می‌تواند موجب تغییر جوابهای آزمونهای داخل پوستی بصورت منفی کاذب شود. آزمون منفی کاذب توبرکولین بر پایه خطای تکنیکی شرح داده شده است (۲۴) که در مورد آزمون پوستی لیشمائن نیز می‌توان آنرا تعمیم داد.

و) علت ناشناخته

ارتباطی بین مقدار اینترفرون گاما و آزمون پوستی لیشمائن منفی وجود نداشت که تعداد کم بیماران مورد مطالعه می‌تواند توجیه کننده این امر باشد.

۳- محل تشریحی ضایعه: احتمالاً محل تشریحی ضایعه می‌تواند نقشی در بهبودنیابندگی و ازمان بیماری داشته باشد. وجود ضایعات در مکانهایی که خونگیری آنها ضعیف است می‌تواند مزمن شدن را تا حدی توجیه کند اما در این مطالعه و با مقایسه نتایج بین دو گروه نتوانستم اختلاف معنی‌داری بین محل ضایعه و ازمان بیماری بدست آوریم. اکثر ضایعات (۸۷٪) در نواحی انتهایی (acral) بودند که این امر می‌تواند ناشی از آن باشد که پشه آلوده بیشتر نواحی انتهایی و باز بدن را مورد گزش قرار می‌دهد و لذا مطالعات وسیعتری برای تأیید این ادعا مورد نیاز می‌باشد. نتایج این بررسی نشان داد که میانگین سطح خونی اینترفرون گاما در بیماران مزمن یا بهبودنیابنده با بیمارانی که از بیماری بهبود یافته بودند، اختلاف قابل توجهی دارد. این نتایج می‌تواند دال بر فقدان واکنش Th1 در موارد لیشمائیوز پوستی بهبودنیابنده یا مزمن باشد. نتایج مربوط به آزمون پوستی لیشمائن در دو گروه قابل تفسیر نمی‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استاد محترم جناب آقای دکتر فرج مدبر در مورد قبول رحمت مطالعه متن و همچنین استاد محترم جناب آقای دکتر دولتی رئیس مرکز آموزش و پژوهش بیماریهای پوست و جذام که امکان انجام مطالعه را فراهم نمودند نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

در مطالعه دیگری که بر روی بیماران مبتلا به لیشمائیوز پوستی صورت گرفته، نشان داده شده است که در سیر بیماری و پس از بهبودی از عفونت L.major میزان تولید اینترفرون گاما با تکثیر لنفوцит‌ها همخوانی داشته و نشانگر اینمی سلولی می‌باشد (۱۴).

دکتر جعفر و همکاران نشان دادند که بین تولید اینترفرون گاما و شدت بیماری ارتباط وجود دارد، یعنی تولید زیاد این سایتوکاین با شکل خفیف بیماری و تولید کم آن با بیماری شدید مرتبط است (۲۱). در مطالعه مانیز میانگین مقدار اینترفرون گاما در افراد بهبودنیابنده پایین و در افراد بهبود یافته بالا بود.

۲- آزمون پوستی لیشمائن: بر اساس منابع موجود، به استثنای شکل پوستی منتشر (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis) که در آن آزمون پوستی لیشمائن منفی است، در کلیه موارد لیشمائیوز پوستی آزمون لیشمائن مثبت است (۸). در این مطالعه ۴ مورد (۰.۲۶٪) از بیماران مزمن یا بهبودنیابنده آزمون پوستی لیشمائن منفی داشتند که می‌توان علل احتمالی زیر را برای آن مطرح کرد:

الف) اختلال در اینمی موضعی
ب) اختلال در سیستم اینمی بدن و بخصوص ضعف اینمی سلولی می‌تواند مزمن شدن یا بهبودنیابندگی بیماری را توجیه کند. در یک گزارش از ایران در بیماری با لیشمائیوز پوستی مزمن مقاوم، منفی شدن آزمون پوستی لیشمائن با کمبود T cell همراه بوده است (۱). یکی از نویسنده‌گان این مقاله موردي را گزارش کرده است که منفی بودن آزمون پوستی لیشمائن با اختلالات اینمی سلولی و کمبود T cell همراه بوده است (۲۲).

ج) در یک منبع گزارش شده است که تا ۱۵٪ بیماران مبتلا به لیشمائیوز پوستی ممکن است آزمون پوستی لیشمائن منفی داشته باشند (۲۳).

منابع

- ۱- آخوندزاده ح. مطالعه اینمنی شناسی در باره لیشمایوز مقاوم و مزمن. مجله نظام پزشکی: ۴۳: ۷۶-۷۳.
- 2-Schelimer LG. Terminologie medico-Pharamceutique, Francaises-Persane. Universite de Tehran Publication: 1970; 84.
- 3-Pettit JHS. Chronic lupoid leishmaniasis. Br J Dermatol 1962; 127-31.
- 4-Pettit JHS, Parish LC. Manual of tropical dermatology. New York: Springer-Verlag, 1984: 165-67.
- 5-Christopherson JB. Lupus leishmaniasis. Br J Dermatol 1923; 35:123.
- 6-Blackwell JM. Genetic susceptibility to leishmania infections; Studies in mice and man. Parasitology 1996; 112 s 67-74.
- 7-Kurban AK. Leishmaniasis. In: Demis DJ (ed). Clinical dermatoloty . Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: Vol 3, Section 18-2, P 18-21.
- 8-Bryceson ADM, Hay RJ. Parasitic worms and porotozoa. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, et al (eds). Rook / Wilkinson / Ebling textbook of dermatology. London: Blackwell Science, 1998: 1415-16.
- 9-Mortazavi H, Khamesipour A, Ajdari S. Clinico-immunological features of chronic non-healing cases of cutaneous leishmaniasis (CL) and their responses to therapy: Report of 12 cases. Abstract book of 2nd world congress of leishmaniasis 2001: 106.
- 10-Kemp M, Theander TG, Kharazmi A. The contrasting roles of CD4+ T cells in intracellular infections in humans: Leishmaniasis as an example. Immunol Today 1996, 17: 13-16.
- 11-Paul WE. Fundamental Immunology. Philadelphia: Lippincottee-Raven, 1999: 1271-88.
- 12-Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, et al. Principles and parctice of infectious diseases. Philadelhia: Churchill Livingstone, 2000: 2833-35.
- 13-Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, et al. Dermatology in general medicine. New York: McGraw-Hill, 1999: 2611-12.
- 14-Frankenburg S, Klaus S. Production of interferon gamma in cultures of whole blood obtained in the course of and after healing of cutaneous leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol 1991; 85(4): 401-05.
- 15-Tapia FJ, Caceres Dittmar G, Sanchez MA. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. London: Champan & Hall, 1996: 205-06.
- 16-Kubba R, Al-Gindan Y. Leishmaniasis. Dermatol Clin 1989; 7: 331-51.
- 17-Romagnani S. The TH1/TH2 paradigm in

- disease. New York: Springer, 1997: 63-67.
- 18-Ajdary S, Alimohammadian M, Eslami M, et al. 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* 2000; 68(4): 1760-64.
- 19-Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, et al. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; Vol 53(3): 273-77.
- 20-D'Oliveira A Jr, Machado P, Bacellar O, et al. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Med Trop* 2002; 35(1): 7-10.
- 21-Gaafar A, Kharazmi A, Ismail A, et al. Dichotomy of T cell response to leishmania antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis, absence or scarcity of Th 1 activity is associated with severe infection. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 239-45.
- 22-Mortazavi H. Immunological findings in a chronic case of leishmaniasis. *JEADV* 2000; 14: 181.
- 23-Glaser DA, Penneys NS. Tests for viral, HIV-related and tropical skin infections. In: Cerio R, Archer CB (eds). *Clinical investigations of skin disorders*. London: Chapman and Hall, 1998: 91-92.
- 24-Gantz NM, Brown RB, Berk SL, et al. *Manual of clinical problems in infectious disease*. Boston: Little Brown and Company, 1994: 353-57.