

Identification of mutation for drug resistance gene in cutaneous leishmaniasis

Talari SA^{1*}, Kazemi B², Hooshyar H³, Alizadeh R¹, Arbabi M¹, Mousavi GA⁴, Talari MR⁵, Nikyar HR⁶, Sobhani A⁶

1- Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Department of Parasitology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

3- Anatomical Science Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

4- Trauma Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

5- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Azad University of Qom, Qom, I. R. Iran.

6- Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Azad University of Najafabad, Najafabad, I. R. Iran.

Received May 23, 2011; Accepted April 18, 2012

Abstract:

Background: Cutaneous leishmaniasis is a common parasitic disease and one of the health problems world wide. The pentavalent antimonial drugs (e.g. pentostam and Glucantime) are the first line treatment for leishmaniasis, and resistance to these drugs is a serious problem. Using PCR method, this study was carried out to identify the mutation for sodium stibogluconate resistance gene in cutaneous leishmaniasis cases referred to different health centers during 2006-8.

Materials and Methods: This descriptive study was conducted on 150 isolates of leishmania major and leishmania tropica to identify the mutation in drug resistance gene. Promastigote clones were cultured in enriched RPMI 1640 medium and then the genomic DNA was isolated and using a pair of primers, a 400 bp of the gene was amplified. Finally, the PCR products were screened by conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) method and then the mutation was confirmed using RFLP with Sdu1 enzyme.

Results: Screening using CSGE and RFLP methods showed that 6.3% of the samples carried a mutation for drug resistance gene.

Conclusion: Results showed a resistance for cutaneous leishmania against sodium stibogluconate. Further studies are required to determine the biochemical mechanism of this resistance.

Keywords: Glucantime, Sodium stibogluconate, Drug resistance, Cutaneous leishmaniasis

* Corresponding Author.

Email: Talari SA@yahoo.com

Tel: 0098 361 555 0021

Fax: 0098 361 555 1112

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences July, 2012; Vol. 16, No 3, Pages 235-239

Please cite this article as: Talari SA, Kazemi A, Hooshyar H, Alizadeh R, Arbabi M, Mousavi GA, et al. Identification of mutation for drug resistance gene in cutaneous leishmaniasis. *Feyz* 2012; 16(3): 235-9.

بررسی وجود موتاسیون در ژن مقاومت دارویی لیثمانیازیس جلدی

صفرعلی طالاری^{۱*}، بهرام کاظمی^۲، حسین هوشیار^۳، رقیه علی‌زاده^۴، محسن اربابی^۵، سید غلامعباس موسوی^۶، محمدرضا طالاری^۷، حمیدرضا نیک‌یار^۸، احمد سبحانی^۸

خلاصه:

سابقه و هدف: لیثمانیازیس جلدی یکی از بیماری‌های انگلی و از معضلات مهم بهداشتی در بسیاری از نقاط جهان می‌باشد. در حال حاضر برای درمان بیماری از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان از جمله پنتاستوم و گلوکانتیم استفاده می‌شود که مقاومت به این داروها یک مشکل جدی می‌باشد. با توجه به اهمیت موضوع، مطالعه حاضر به منظور تعیین موتاسیون در ژن مقاومت در برابر داروی سدیم استیپو گلوکانات روی مبتلایان به لیثمانیازیس جلدی مراجعه‌کننده به مراکز بهداشتی نقاط مختلف کشور طی سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۶ به‌روش PCR صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی روی ۱۵۰ ایزوله از لیثمانیا تروپیکا و لیثمانیا ماژور برای بررسی وجود موتاسیون در ژن مقاومت دارویی صورت گرفت. ابتدا کلون‌های پروماستیگوت تهیه شده از لیثمانیا ماژور و تروپیکا در محیط RPMI1640 غنی شده کشت داده شده و سپس DNA ژنومیک استخراج شد. نمونه‌های استخراج شده با یک جفت پرایمر طراحی شده قطعه‌ای در حدود ۴۰۰ نوکلئوتید از ژن فوق تکثیر گردید. محصولات PCR به‌دست آمده طبق روش CSGE غربال‌گری شد و با روش RFLP با آنزیم SduI موتاسیون آنها تأیید گردید.

نتایج: غربال‌گری با روش Conformation Sensitive Gel Electrophoresis (CSGF) و هم‌چنین هضم آنزیمی نشان داد که در حدود ۶/۳ درصد از نمونه‌های مورد بررسی حامل موتاسیون در ژن مقاومت به سدیم استیپوگلوکونات می‌باشند.

نتیجه‌گیری: لیثمانیازیس جلدی در برابر سدیم استیپوگلوکونات مقاوم می‌باشد و توصیه می‌شود مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیسم‌های مقاومت دارویی صورت پذیرد.

واژگان کلیدی: گلوکانتیم، سدیم استیپوگلوکونات، مقاومت دارویی، لیثمانیازیس جلدی

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۱، صفحات ۲۳۹-۲۳۵

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی لیثمانیازیس به‌طور اندمیک در ۸۸ کشور جهان وجود دارد و ۱۲ میلیون نفر به اشکال مختلف آن آلوده می‌باشند و سالیانه ۱/۵-۱ میلیون نفر مبتلا می‌شوند. بیش از ۹۰ درصد لیثمانیازیس جلدی در کشورهای ایران، افغانستان، عربستان سعودی، برزیل، و پرو اتفاق می‌افتد [۲]. تشخیص لیثمانیازیس جلدی با تهیه لام مستقیم از زخم و مشاهده جسم لیثمن در زیر میکروسکوپ و یا کشت ترشحات زخم در محیط‌های کشت انجام شده و برای تعیین گونه‌های انگل از روش‌های ایزوآنزیم و PCR استفاده می‌شود [۳-۷]. درمان لیثمانیازیس جلدی یا سالک از دیر باز مورد توجه بوده است. مدل‌های درمانی قدیمی و جدید بسیاری برای درمان لیثمانیازیس جلدی با سه خط مشی درمانی استفاده شده‌اند که شامل درمان موضعی، درمان فیزیکی و درمان سیستمیک می‌باشند. درمان موضعی شامل استفاده از عصاره گیاهان [۸] و مواد معدنی، تزریق داخل ضایعه با استفاده از مپاکرین، ام‌تین و گلوکانتیم و پمادهای پاراموایسین و ایمیدازول می‌باشد. درمان سیستمیک شامل استفاده از ترکیبات دارویی مثل گلوکانتیم، آمفوتریسین B، آلپورینول، پاراموایسین و غیره می‌-

لیثمانیازیس یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان است که با گونه‌های مختلف لیثمانیا مانند لیثمانیا ماژور (L. major) و لیثمانیا تروپیکا (L. tropica) و لیثمانیا دونوانی (L. donovani) بروز می‌کند [۱].

^۱استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۲استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۳دانشیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۴کارشناس ارشد گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۵مری، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۶مری، مرکز تحقیقات تروما، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

^۷کارشناس میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

^۸استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف آباد

* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی

تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۰۰۲۱

دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

پست الکترونیکی: Talariali@yahoo.com

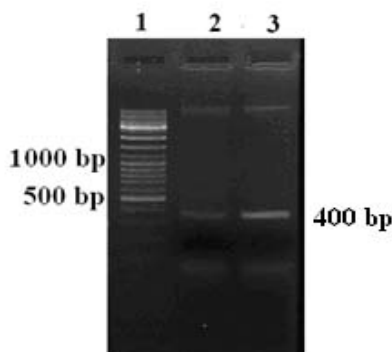
تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۱/۱/۳۰

این پرایمرها تعداد ۳۵۶ نوکلئوتید از ژن مقاومت به سدیم استیبیو گلوکونات (XM_001685026) را تکثیر می‌کند. محصولات PCR با روش CSGE اسکن شدند [۱۸] و آنهایی که نسبت به کنترل اختلاف داشتند، تعیین ترادف شدند. برای اطمینان بیشتر روی محصول PCR واکنش (RFLP) Restriction fragment length polymorphism انجام شد؛ بدین صورت که آنزیم SduI موقعیت ۳۲۳-۳۲۸ محصول PCR را برش می‌دهد، اما اگر نوکلئوتید T شماره ۳۲۹ از محصول PCR به C تبدیل شود، جایگاه شناسایی آنزیم SduI (GDGDCD) حذف می‌گردد.

نتایج

از تعداد ۳۴۳ بیمار مبتلا به لیشمائیوز جلدی که لام مستقیم آنها مثبت بود، نمونه برداری شده و در محیط NNN کشت انجام گردید. از تعداد ۱۵۰ نمونه کشت مثبت، واکنش PCR انجام گرفت (شکل شماره ۱). اما برای تعداد ۷ نمونه واکنش PCR ناموفق بود. از ۱۴۳ نمونه مورد بررسی ۹ نمونه (۶/۳ درصد) مربوط به مناطق مشهد، اردکان، بافق، لار و یزد وقتی با روش CSGE بررسی شدند، مشخص شد که موتاسیون دارند. تعیین ترادف‌های انجام شده با شماره‌های EU221237 و EU221236 در بانک ژن به ثبت رسیدند. برای اطمینان از وجود موتاسیون در ژن با استفاده از روش RFLP تمام نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های فاقد موتاسیون با آنزیم هضم شدند که دو باند ۳۳۰ و ۷۰ bp حاصل آن بود (شکل شماره ۲)، اما آنهایی که دارای موتاسیون بودند، توسط آنزیم هضم نمی‌شدند و باند حاصله ۴۰۰ bp بود (ستون ۱ شکل شماره ۲).



شکل شماره ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن مقاومت به سدیم استیبیوگلوکونات در لیشمائیا ماژور و تروپیکا روی ژل آگارز ۲ درصد. ستون ۱: مارکر وزنی DNA، ستون‌های ۲ و ۳: محصول PCR ژن مقاومت به سدیم استیبیو گلوکونات در لیشمائیا ماژور و تروپیکا

باشد. درمان‌های فیزیکی نیز شامل کورتاژ زخم، اشعه‌درمانی، گرما درمانی و سرما درمانی می‌باشد [۹]. امروزه از روش شیمی‌درمانی، به‌خصوص استفاده از ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان مثل گلوکانتیم بیشتر از سایر روش‌ها استفاده می‌شود و مصرف گلوکانتیم موجب هزینه‌های درمانی سنگینی برای جامعه و عوارض مختلفی می‌باشد [۱۱،۱۰]. در حال حاضر اغلب بیماران با گلوکانتیم درمان می‌شوند. داروی گلوکانتیم پس از تزریق خیلی سریع از راه ادرار دفع می‌گردد و خطر عدم تحمل به آن با علائمی از قبیل تب، درد عضلانی، سرفه‌های شبیه خروسک، تظاهرات جلدی، آریتمی، ناراحتی کلیوی، قلبی و کبدی بروز می‌کند [۱۳،۱۲]. مطالعه Sundar و همکاران [۱۴] در سال ۲۰۰۰ در هند نشان داد که مقاومت دارویی در مبتلایان به لیشمائیوز احشایی نسبت به گلوکانتیم ۳۰-۶۰ درصد می‌باشد. تحقیقات حجاران و همکاران [۱۶،۱۵] در سال ۲۰۰۶ در مشهد نیز نشان‌دهنده مقاومت دارویی لیشمائیوز جلدی نسبت به گلوکانتیم به میزان ۱۲ درصد می‌باشد. مطالعه Croft [۱۷] نشان داد که مصرف غیرمعمول و افزایش طول مدت مصرف داروی گلوکانتیم موجب موتاسیون‌هایی در ژنوم لیشمائیا شده است که سبب کاهش پاسخ‌دهی انگل به دارو می‌شود؛ گرچه عواملی مثل کاهش توانایی سیستم ایمنی میزبان، نقص دارویی و عدم درمان مناسب می‌توانند سبب عدم پاسخ به درمان باشند. باتوجه به شیوع و عوارض مختلف ناشی از مصرف گلوکانتیم در مبتلایان به لیشمائیوز جلدی و گزارشات مقاومت دارویی نسبت به آن، این مطالعه به منظور تعیین و تشخیص موتاسیون در ژن مقاومت دارویی لیشمائیوز صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی بر روی ۳۴۳ نفر مبتلا به لیشمائیوز جلدی در مناطق مختلف مشهد، اردکان، بافق، قم، خوزستان، لار، یزد و کاشان انجام شد. از زخم بیماران نمونه برداری انجام شده و بعد از رنگ‌آمیزی با گیمسا وجود انگل در لام مستقیم توسط متخصص تشخیص داده شد. هم‌چنین، نمونه در محیط کشت NNN (ناوی، مک نیل و نیکول) کشت داده شد. از تعداد ۱۵۰ نمونه در محیط کشت RPMI1640 توده انگل تهیه شد. سپس، پروماستیگوت‌های انگل جمع‌آوری و شستشو شدند و تا هنگام کار در برودت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پروماستیگوت‌های انگل سه‌بار Freez taw شده و در بافر لیز حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنزیم پروتیناز K در دمای ۵۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. با استفاده از فنل کلروفرم DNA آنها استخراج شد و واکنش PCR با پرایمرهای زیر انجام گرفت.

Forward: 5'- AACTTCGACCGCGAGTGTCT -3'
Reverse: 5'- CTGCCCCGGGCAGGTGAAGC -3'

نشان داده است ۳۰ تا ۶۰ درصد مقاومت دارویی لیشمانیوز احشایی نسبت به گلوکانتیم بوده است [۱۴] که میزان بالاتری را نسبت به مطالعه ما نشان می‌دهد. مقاومت دارویی در لیشمانیوز ممکن است طبیعی بوده و یا مربوط به افزایش مصرف گلوکانتیم در بیماران باشد [۲۶]. وجود تجمع مقدار زیاد داخل سلولی دارو در لیشمانیا و عدم بازدهی پمپ بیرون‌ده دارو با مقاومت دارویی ارتباط دارد [۲۷]. در مقاومت به دارو افزایش تولید پروتئین GP (گلیکوپروتئین) تشخیص داده شده است که ژن انتقال دهنده ABC در آن دخالت دارد. ژن مرتبط به گلیکوپروتئین لیشمانیا از نوع MDR1 (Multi Drug Resistant) می‌باشد که ۳۷ درصد شبیه ژن MDR انسانی است [۲۸]. ژنوم لیشمانیا ماژور از ۳۶ عدد کروموزوم تشکیل شده است که موقعیت ژن MDR بر روی کروموزوم ۳۴ قرار دارد. گلیکو پروتئین غشایی مربوط به این ژن یکی از انتقال دهنده‌های ABC است [۲۹]. پروتئین‌های ABC مولکول‌های مختلفی را به صورت داخل و خارج غشایی انتقال می‌دهند. این پروتئین می‌تواند موجب مقاومت دارویی (MDR) شود. پروتئینی که به وسیله این ژن کد می‌شود، یک پمپ ورود و خروج دارویی وابسته به ATP است که می‌تواند سبب کاهش انباشتگی دارو در سلول‌های مقاوم شده و اغلب سبب گسترش مقاومت به دارو شود [۳۰]. باتوجه به اهمیت مقاومت دارویی در بیماران مطالعات بیشتری در این زمینه لازم می‌باشد.

نتیجه‌گیری

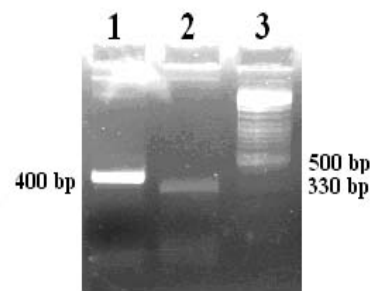
لیشمانیاریس جلدی در برابر سدیم استیوبوگلوکانات مقاوم می‌باشد و توصیه می‌شود مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیسم‌های مقاومت دارویی صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد که هزینه آن از طرح شماره ۸۵۲۷ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تامین شده و کارهای آزمایشگاهی آن در دانشگاه علوم پزشکی کاشان و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفته است.

References:

- [1] Klaus SN, Frankenburg S, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1999; 17(3): 257-60.
- [2] World Health Organization Expert committee. Epidemiological aspects. In: Control of the leishma-



شکل شماره ۲- الکتروفورز محصول PCR (ژن مقاومت به سدیم استیوبوگلوکانات در لیشمانیا ماژور) بعد از هضم آنزیمی. ستون شماره ۱: محصول PCR (عامل لیشمانیوز جلدی روستایی) آنزیم تاثیر نکرده است. ستون شماره ۲: محصول PCR (عامل لیشمانیوز جلدی روستایی) هضم شده با آنزیم. ستون شماره ۳: مارکر وزنی DNA

بحث

درمان لیشمانیوز جلدی از سال ۱۹۱۱ مورد توجه بوده است و سه روش مختلف درمان موضعی، درمان سیستمیک و درمان فیزیکی را شامل می‌شده است [۱۹،۱۰]. درمان موضعی لیشمانیوز جلدی روش مناسبی است، زیرا دریافت آن برای بیماران راحت‌تر، جذب آن در محل بهتر و مناسب‌تر انجام می‌شود. عوارض داروهای سیستمیک را هم نداشته و درمان فیزیکی شامل کورتاژ، برداشت ضایعه به وسیله جراحی، اشعه درمانی، گرما درمانی و سرما درمانی می‌باشد [۱۱]. درمان سیستمیک لیشمانیوز از سال ۱۹۳۷ توسط Schmidt و Kikuth با ارائه سدیم استیوبوگلوکانات (Pentostom) به عنوان داروی ضد لیشمانیوز مطرح شد و در سال ۱۹۶۶ گلوکانتیم یا eglomin antimonate در انسان علیه لیشمانیوز مصرف گردید [۲۰]. مطالعات نشان داده است که مصرف گلوکانتیم در بیماران لیشمانیوز جلدی موجب عوارض کلیوی، کبدی، قلبی و خونی می‌شود [۲۲،۲۱،۱۳،۱۲]. نتایج این بررسی نشان‌دهنده ۶/۳ درصد مقاومت دارویی در بیماران مورد مطالعه می‌باشد. بررسی‌های انجام شده در نقاط مختلف دنیا نشان‌دهنده عدم پاسخ‌گویی در برخی از مبتلایان به لیشمانیوز نسبت به گلوکانتیم می‌باشد [۲۳-۲۵]. مطالعه حدیقی و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مشهد نشان داد که مقاومت دارویی نسبت به گلوکانتیم ۱۲ درصد می‌باشد [۲۵]. تحقیق Sundar و همکاران در سال ۲۰۰۰ در هند

niasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1990; 793: 41-6.

[3] Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, et al. Rapid identification of Leishmania complex by a Real-

- Time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(6): 999-1004
- [4] Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* 1999; 85(2): 181-7.
- [5] Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, et al. Rapid identification of Leishmania by PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73(6): 999-1004.
- [6] de Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CB, Correa T, Freitas LA, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of Leishmania in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2003; 37(11): e149-53.
- [7] Farid Moayer H, Talari SA, Haghghi B, Samadi A. Taxonomic determination of various types of Leishmania isolated from Isfahan area using isoenzyme. *J Isfahan Med Sch* 1997; 44: 1-5. [in Persian]
- [8] Almeida OL, Santos JB. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *An Bras Dermatol* 2011; 86(3): 497-506.
- [9] Tiunan TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis* 2011; 15(8): e525-32.
- [10] Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19(11): 502-8.
- [11] Demicheli C, Ochoa R, da Silva JB, Falcão CA, Rossi-Bergmann B, de Melo AL, Sinisterra RD, Frézard F. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 100-3.
- [12] Sadr F, Talari SA. Effect of glucantime on electrocardiogram of patients suffering from cutaneous leishmaniasis. *Feyz* 1998; 5: 13-20. [in Persian]
- [13] Talari SA, Vakili Z, Emami AH. Effect of glucantime on blood parameters in patients with cutaneous leishmaniasis. *Feyz* 1999; 10: 17-22. [in Persian]
- [14] Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 2000; 31(4): 1104-7.
- [15] Hajjaran H, Mohebbali M, Razavi MR, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian Gh.H, et al. Identification of Leishmania Species Isolated Cutaneous Leishmaniasis, using Random Amplified from Human Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Iran J Publ Health* 2004; 33(4): 8-15.
- [16] Hajjaran H, Mohebbali M, Assareh A, Heidari M, Hadighi R. Protein profiling on meglumine antimonite (glucantime) sensitive and resistant L. tropica isolates by 2-Dimensional gel electrophoresis: A preliminary study. *Iran J Parasitol* 2009; 4(1): 8-14.
- [17] Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001; 6(7): 899-905.
- [18] Kazemi B, Seyed N, Moslemi E, Bandehpour M, Bikhof Torbati M, Saadat N, et al. Insulin Receptor Gene Mutation in Iranian patients with type II diabetes mellitus. *Iran Bio Med J* 2009; 13(3): 161-8.
- [19] Talari SA, Sadr F. Treatment of cutaneous leishmaniasis: Effectiveness, and adverse effects of the drugs. *Feyz* 2005; 9(1): 85-94. [in Persian]
- [20] Kikuth W, Schmidt H. Contribution to the progress of antimony therapy of kala azar. *Chinese Med J* 1973; 52: 425-32.
- [21] Vakili Z, Talari SA, Moniri R, Ghazanfari K. Effect of glucantime on hepatic enzymes and renal function test among patients suffering from leishmaniasis. *Feyz* 1997; 2(9): 69-73. [in Persian]
- [22] Sadeghian G, Ziaei H, Sadeghi M. Electrocardiographic changes in patients with cutaneous leishmaniasis treated with systemic glucantime. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37(11): 916-8.
- [23] Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 111-26.
- [24] Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res* 2004; 120(3): 166-72.
- [25] Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjaran H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime Treatment in Iranian Cutaneous Leishmaniasis due to Drug-Resistant Leishmania tropica Parasites. *PLoS Med* 2006; 3(5): 154-62.
- [26] Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of leishmania donovani. *Indian J Med Res* 2006; 123(3): 411-22.
- [27] Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M. Antimony uptake systems in the protozoan Parasite leishmania and accumulation differences in antimony Resistant parasites. *Antimicrobial Agents Chemother* 2003; 47(10): 303-9.
- [28] Coelho AC, Tosi LR, Cotrim PC. Mapping of a Leishmania major gene/locus that confers pentamidine resistance by deletion and insertion of transposable element. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46(2): 109-12.
- [29] Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major. *Mol Biochem Parasit* 2003; 130(2): 83-90.
- [30] Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, et al. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* 2001; 276(28): 26301-7.