Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۸ اسفند سال ۱۳۹۱ (۷۴-۶۷)

ارزیابی روش های مختلف استخراج DNA از کیست ژیاردیا لامبلیا

الهام کیا لاشکی[۱]
مهدی شریف[۲]
مهدی فخار[۳]
احمد دریانی[۲]
عبدالستارپقه[۴]

چکیده

سابقه و هدف: ژیاردیالامبلیا یکی از پاتوژن‌های تک یاخته‌ای مهم است که در طبقه‌بندی جزء تاژکداران روده‌ای قرار می‌گیرد ژیاردیازیس معمول‌ترین عفونت انگلی انسان در جهان است که باعث اسهال طولانی مدت می‌شود. هدف از این مطالعه مقایسه و ارزیابی ۵ روش مختلف استخراج DNA از کیست ژیاردیالامبلیا به منظور تعیین روش مطلوب بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۳۰ نمونه مدفوع آلوده به انگل ژیاردیا صورت گرفت. تشخیص بیماری با تهیه گسترش مستقیم از نمونه مدفوع و رنگ آمیزی با لوگل بود. کیست‌های ژیاردیا به روش گرادیان سوکروز تخلیص شدند و ۵ روش مختلف استخراج بر روی این نمونه‌ها صورت گرفت. که شامل: ذوب و انجماد + گلوله های شیشه‌ای+ کیت (FGK)، ذوب و انجماد +فنل کلروفرم ایزو امیل الکل (PCI)، جوشاندن + فنل کلروفرم ایزو امیل الکل، سونیکاسیون + فنل کلروفرم ایزو امیل الکل و ذوب وانجماد + نمک با غلظت بالا (High salt) بود. سپس واکنش یک مرحله‌ای PCR بر روی DNA استخراج شده در ناحیه ژنی gdh انجام گرفت.

یافته‌ها: بالاترین و کمترین میانگین نسبت جذب نوری (DNAOD) به ترتیب مربوط به روش استخراج FGK از مدفوع و روش ذوب وانجماد + غلظت بالا نمک (High salt) است. همچنین بالاترین و کمترین میانگین غلظت به ترتیب مربوط به روش ذوب و انجماد + PCI و روش FGK است همچنین پس از الکتروفورز محصول PCR با استفاده از روش استخراج FGK اسمیری در باندها مشاهده نشد. کم‌ترین زمان استخراج (<2h) مربوط به روش FGK بود.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد جهت رفع اشکالات استخراج DNA از کیست های ژیاردیا و کاهش زمان استخراج استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای (Glass beads) و سپس کیت استخراج Accu prep (Bioneer) روشی مطلوب و دارای بیشترین کارآیی می‌باشد.

واژه های کلیدی: ژیاردیالامبلیا، نمونه‌های مدفوع، استخراج DNA، کیت استخراج PCR, Accuprep

مقدمه

ژیاردیا لامبلیا یکی از پاتوژن‌های تک‌یاخته‌ای مهم است که در طبقه‌بندی جزو تاژک داران روده‌ای قرار می‌گیرد(۱). این انگل انتشار جهانی داشته، شیوع آن حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا تخمین زده می‌شود(۲). در مرور ۳۰۰ بررسی انجام گرفته در زمینه انگل‌های روده‌ای انسان در ایران در ۵۰ سال گذشته، ژیاردیا در کنار

مؤلف مسئول: مهدی فخار– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۸/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۹/۲۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۱۱/۴

www.SID.ir

Archive of SID

آنتامبا هیستولیتیکا، شایع‌ترین تک یاخته های بیماری‌زا بوده‌اند(۳) حساسیت پایین روش‌های معمول، تشخیص ژیاردیازیس را مشکل می کند(۴) اگر چه چندین روش مانند ایمونوفلور ستتمستقیمو EnzymeImmunoassaykit مانند Prospect و Giardiacelisa برای تشخیص انگل در مدفوع وجود دارد. هنوز آزمون میکروسکوپی مدفوع روش تشخیصی معمول است(۵). هر چند این روش ممکن است به اندازه کافی برای تشخیص سطوح پایین آلودگی یا تمایز بین تنوع گونه‌های ژنتیکی ژیاردیا لامبلیا حساس نباشد(۹-۶) بنابراین با وجود چنین محدودیت‌هایی این روش‌ها برای مشخص کردن اپیدمیولوژی مولکولی ژیاردیازیس رضایت بخش نیست(۱۱،۱۰) اخیراً روش هایی بر پایه PCR برای تشخیص و ژنوتایپینگ ژیاردیا بوسیله محققین انجام شده است(۱۲).

بعضی از این روش‌ها محدودیت‌هایی دارد برای مثال ممکن است محصول DNA استخراج شده به دلیل مشکلاتی در شکستن دیواره کیست کم باشد یا حساسیت تکنیک PCR بر نمونه‌های مدفوع به دلیل وجود مهار کننده‌های PCR مثل لیپیدها، هموگلوبین، نمک‌های صفراوی، پلی ساکاریدهای موکوس، باکتری و محصولات هضم غذایی کم شود(۷).

حساسیت بررسی‌های مولکولی از طریق روش‌های مؤثرتر استخراج DNA و سیستم های حساس‌تر تکثیر برای شناسایی ژن افزایش یافته است با بررسی‌های مولکولی انجام شده بر روی ژن‌های مختلفی از قبیل گلوتامات دهیدروژناز، تریوز فسفات ایزومرازو بتاژیاردین ایزوله‌های مختلف ژیاردیا لامبلیا قابل تمایز می‌باشند همچنین آنالیز توالی ژنی GDH و TPI ژیاردیا شناسایی ژنوتایپ‌های مختلط را ممکن می‌سازد(۱۴،۱۳،۱۱).

با توجه به این‌که تاکنون روش استاندارد و مورد قبول یکسان برای استخراج DNA از کیست ژیاردیا معرفی نشده است لذا این مطالعه با هدف مقایسه چند روش استخراج DNA جهت یافتن روش مطلوب استخراج و بهبود روش PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

- جمع آوری و جداسازی کیست

در این مطالعه ۳۰ نمونه مدفوع آلوده به انگل ژیاردیا جمع آوری شدند و در این بررسی از نمونه‌های مدفوع حاوی کیست به میزان مناسب (در هر میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی ۴۰x حدود ۵ الی ۱۰ عدد کیست) استفاده شده و کیست ها به روش گرادیان سوکروز تخلیص شدند(۱۵).

آماده سازی کیست های تخلیص شده و استخراج DNA

در این بررسی ۵ روش استخراج DNA بر روی هر ۳۰ نمونه حاوی کیست ژیاردیابه شرح زیر انجام شد:

۱- روش استخراج با کیت Accuprep(FGK)

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه حاوی کیست ۲ بار با آب مقطر شستشو داده شد و کیست‌ها با اضافه نمودن گلوله‌های شیشه‌ای (۰/۴۵-۰/۵۲MM قطر) و ۴۰۰ میکرولیتر بافرلیز کننده به میکروتیوپ‌ها و با کمک ورتکس نمودن به مدت ۱۰ دقیقه دیواره کیست ها خرد گردیده سپس ۸ الی ۱۰ بار ذوب و انجماد تکرار شد. جهت انجماد از نیتروژن مایع و جهت ذوب از دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ دقیقه استفاده شد. در این مرحله هر یک از نمونه‌ها ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز k ($\frac{25gr}{1250\ ml}$) و ۴۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات ۱ درصد اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سرانجام استخراج DNA انگل با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده: Accuprepstool Dna (Bioneer Corporahon) Extraction Kit انجام شد.

۲- روش فنل کلروفرم ایزوامیل الکل (PCI)

در این روش ۲۰۰ میکرولیتر ازهر نمونه حاوی کیست ۱۰ بار ذوب و انجماد شد. سپس استخراج DNA با روش فنل کلروفرم ایزوامیل الکل انجام گرفت(۱۶).

www.SID.ir

Archive of SID

۳- *جوشاندن (Boiling)*

در این روش ابتدا در میکروتیوپ حاوی ۲۰۰ میکرولیتراز هر نمونه حاوی کیست را با پارافیلم محکم بسته درون بشر گذاشته شد. نمونه مذکور به مدت ۳۰ ثانیه در مایکروویو قرار داده پس از ان نمونه‌ها جهت مشاهده وضعیت کیست‌ها زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ مورد بررسی قرار گرفت. سپس استخراج DNA با روش PCI انجام گرفت.

۴- *روش سونیکاسیون (Sonica Tion)*

ابتدا میکروتیوپ حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه حاوی کیست را داخل بشرحاوی یخ گذاشته و از طریق دستگاه سونیکاتوربه مدت ۸ دقیقه در معرض امواج ماوراء صوت قرار داده و ادامه استخراج به روش PCI انجام شد.

۵-*نمک با غلظت بال (High Salt)*

ابتدا ۲۰۰میکرولیتر ازهر نمونه حاوی کیست را ۱۰ بار ذوب و انجماد نموده سپس استخراج DNA با روش High Salt انجام شد(۱۷). بعد از استخراج DNA با ۵ روش مذکور غلظت DNA ونسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰nm با دستگاه نانودراپ (WPA, England) اندازه‌گیری شد.

تکثیر ژن GDH به روش PCR

تکثیر ژن GDH با یک مرحله PCR با پرایمرهای:
GDHF (FORWARD 5' TCAACG TCAACCGGC TTCCGT3')
و GDHR (REVERSE 5' TCAACG TCAACCGGC TTCCGT3')
با کمی تغییرات بر اساس روش READ در سال (۲۰۰۴) انجام شد(۱۸). مخلوط واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۷ میکرولیتر محصول استخراج DNA، ۱۰۰پیکومول ازهریک از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۶ میکرولیتر آب مقطر و Mastermix تهیه شد سپس با دستگاه ترموسیکلر (BioRad, USA) تحت شرایط ذیل انجام گرفت. برنامه PCR به ترتیب زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۸ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. در این مطالعه از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. نهایتاً محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. برای نشان دادن اندازه باند از مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. همچنین در این مطالعه مدت زمان استخراج در هر ۵ روش با یکدیگر مقایسه شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۵ روش استخراج DNA از کیست ژیاردیا بر روی ۳۰ نمونه مدفوع بیماران آلوده به انگل ژیاردیا انجام و با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج استخراج DNA با روش‌های مختلف در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود بالاترین و کمترین نسبتOD به ترتیب مربوط به روش FGK و روش High salt است.همچنین بالاترین و کم‌ترین میانگین غلظت به ترتیب مربوط به روش ذوب و انجماد + PCI و روش FGK است. بر روی DNA استخراج شده از هر ۵ روش PCR صورت گرفت و تنها

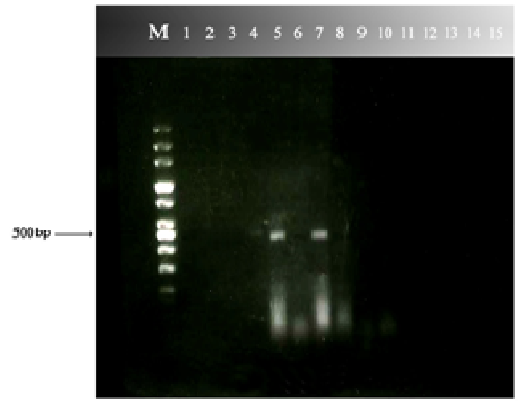
جدول شماره ۱: مقایسه ۵ روش استخراج DNA از کیست انگلژیاردیالامبلیا

روش / متغیر	FGK	ذوب و انجماد + PCI	جوشاندن +PCI	سونیکاسیون + PCI	ذوب و انجماد + High salt
(نسبت جذب نوری $\frac{A260nm}{200nm}$)	۱/۶۴۵	۱/۱۲	۰/۹۸	۱/۰۸	۰/۸
میانگین غلظت	۲/۱۹	۵۷/۶	۴۶/۱	۲۹/۷	۳۳/۲
مدت زمان استخراج	<۲h	>۴h	>۴h	>۴h	>۴h

www.SID.ir

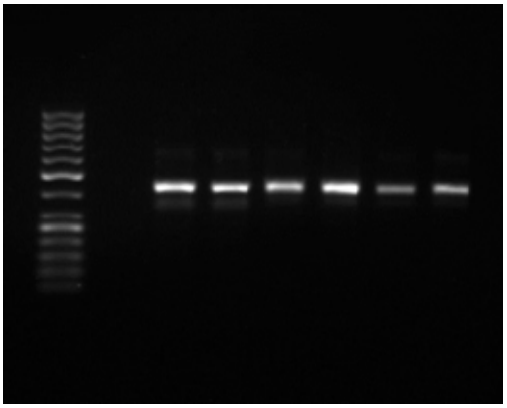
Archive of SID

در روش FGK ژن GDH بـا موفقیـت تکثیـر شـد و در الکتروفورز محصول PCR باند بدون اسمیر مشاهده شـد (تصـاویر شـماره ۱ و ۲). در حـالی‌کـه بـا روش ذوب و انجماد + PCI در الکتروفورز PCR یک باند مشـاهده شـد ولی اسمیر نیز مشاهده شـد (تصـویر شـماره ۳). در سـایر روش‌ها با وجود این‌که غلظت DNA تا حدی قابل قبول بود ولی در الکتروفورز محصول PCR باندی مشاهده نشد. همان‌طور که در جدول شماره ۱ آمـده اسـت اسـتخراج بـا FGK در مقایسه با روش‌های دیگر نیز کمترین زمـان را بـه خود اختصاص داد (بدون در نظر گرفتن مرحله مقدماتی).



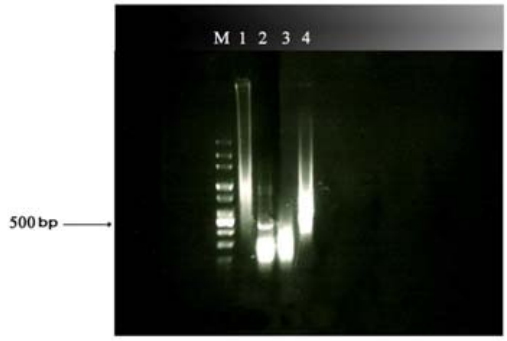
تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصـولات DNA اسـتخراج شـده از ۵ روش مختلف با استفاده از روش الکتروفورز ۱ درصد

M : مارکر (100-3kbp)
ستون های ۳-۱ : روش جوشاندن
ستون ۷-۴: کیت
ستون ۱۱-۸ : سونیکاسیون
ستون ۱۵-۱۱ : نمک با غلظت بالا



تصویر شـماره ۲: الکتروفـورز محصـولات DNA اسـتخراج شـده بـا روش FGK با استفاده از روش الکتروفورز ۱ درصد

ستون ۲-۷: FGK



تصویر شـماره ۳: الکتروفـورز محصـولات DNA اسـتخراج شـده بـا روش PCI با استفاده از روش الکتروفورز ۱ درصد

ستون ۴- ۱: فنل کلروفرم

بحث

مطالعـه حاضـر بـا هـدف مقایسـه ۵ روش مختلـف استخراج DNA از کیست ژیاردیا و تعیین روش مطلوب طراحی شد. در این مطالعه ۳ متغیر جذب نوری، غلظـت DNA ومدت زمان استخراج مورد بررسی قـرار گرفـت. از میان ۵ روش مـورد بررسـی روش اسـتخراج بـا FGK نتایج مطلوبی به دست آورد و از استخراج بـا روش‌هـای جوشاندن، سونیکاسیون و نمـک بـا غلظـت بـالا نتـایجی حاصـل نشـد. بـا اسـتفاده از روش PCR و PCR-RFLP می‌توان بین ژنوتایپ‌های ژیاردیا لامبلیا تمایز قائـل شـد. هر چند تکنیک‌های PCR برای نمونه‌های مدفوع ممکن است به دلیل وجود مهار کننده‌های PCR و مشکل بودن تخریب کیست حساس نباشـد. بـرای افـزایش حساسـیت PCR یک روش استخراج DNA مؤثر لازم است(۱۶) در مطالعه حاضر بعـد از بررسـی جـدول ایـن گونـه بـه نظـر می‌رسد که جذب نوری و غلظت DNA استخراج شـده از هر ۵ روش تقریباً قابل قبـول اسـت ولـی نتـایج PCR مؤید مطلب دیگری است. اگر چه OD (نسبت $\frac{260\,nm}{280\,nm}$) در اغلب نمونه‌ها قابل قبول بودولی PCR آن‌ها موفقیـت آمیز نبود که می‌توانـد بـه علـت حضـور ناخالصـی‌هـایی باشد کـه تکثیـر DNA را مهـار مـی‌کنـد. بنـابراین روش تخلیص DNA از نمونه‌های مدفوع باید این ناخالصی‌هـا را خـارج کنـد. اسـتفاده از نمونـه مـدفوع جهـت تکثیـر

www.SID.ir

Archive of SID

DNA باعث مشکلاتی می‌شود این مشکلات به علت وجود انواع مختلف باکتری ومواد غذایی هضم شده در مدفوع است(۱۹) اغلب این مواد (پلی ساکاریدها، هموگلوبین و ....) حلالیت مشابه DNA دارند. در نتیجه با روش‌های معمولی و سنتی استخراج مثل استفاده از دترجنت، پروتئاز و فنل کلروفرم کاملاً حذف نمی‌شوند و به عنوان آلودگی در رسوب نهایی DNA باقی می‌مانند خلوص DNA را کاهش می‌دهند و به عنوان مهار کننده‌های PCR عمل می‌کنند. به این دلیل بعضی از روش‌های استخراج جهت آنالیز حساس تر بهبود یافتند(۲۰) همچنین جهت حذف ناخالصی‌های DNA و مهار کننده‌های موجود در مدفوع از موادی مانند فنل کلروفرم، PVP (پلی وینیل پلی پیرولیدون) و CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید) و روش جوشاندن استفاده شده است(۲۱) این مواد ذکر شده هم مهار کننده‌ها و هم محصول استخراج را کاهش می‌دهند(۲۲). در مطالعه ما اگر چه در روش استخراج با ذوب و انجماد +PCI غلظت DNA نسبت به سایر روش‌ها بالاتر بود ولی بایستی به این نکته توجه کرد که با این روش ناخالص‌های DNA کاملاً حذف نمی‌شود و در PCR اختلال ایجاد می‌کند در حالی‌که غلظت DNA در استخراج با کیت کم اما خالص است. همچنین استخراج با فنل کلروفرم علاوه بر این‌که وقت‌گیر و پر زحمت است معایبی مانند استفاده از فنل دارد که توکسیک و سمی است(۲۳) سرعت، ایمنی وخلوص بیشتراز مزایای کیت می‌باشد، تنها عیب این روش هزینه بالااست(۲۴) بر اساس مطالعه Jiang و همکاران (۲۰۰۵) استخراج DNA از اووسیت کریپتوسپوریدیوم در نمونه‌های مدفوع با ۶ روش انجام شد ۵ روش اول بر پایه استفاده از کیت و روش آخر روش معمول فنل کلروفرم بودکه بین این روش ها عملکرد روش آخر ضعیف بود(۲۴).بابایی و همکاران (۲۰۱۱) برای استخراج DNA از گلوله های شیشه‌ای و تکرار ذوب و انجماد جهت شکستن دیواره کیست و کیت QIAamp به منظور حذف مهارکننده‌های PCRاستفاده کردند(۲۵).Nantavisai و همکاران (۲۰۰۷) جهت استخراج DNAاز کیست ژیاردیا ۳ روش فنل کلروفرم، کیت و فیلتر کاغذی (FTA) را مقایسه کردند و استفاده از فیلتر کاغذی FTA را به دلیل داشتن حساسیت بالا وکاربرد اسان به عنوان روش مؤثر معرفی کردند(۲۶).

در مطالعه حاضر استخراج با کیت BIONEERACCUPREP به عنوان بهترین روش معرفی می‌شود چون حساس‌تر است و زمان کمتری صرف می‌کند و مانند سایر کیت‌های استخراج (QIAamp) (۲۸) به طور مؤثری مهار کننده‌های PCR را حذف می‌کند. استخراج DNA از مقادیر کم مواد بیولوژیکی مانند اسمیرهای خونی یا کرم های کوچک و... با استفاده از روش فنل کلروفرم همیشه عملی نیست و این روش غالباً در کشورهای در حال توسعه استفاده می‌شود در حالی‌که مرسوم‌ترین روش استخراج در کشورهای صنعتی استفاده از کیت است. محققین بر این باورند کیت‌های مختلف با نام‌های تجاری مختلف می‌تواند در استخراج مؤثر باشند(۲۹). استخراج DNA ژیاردیا به غلظت کیست، وجود مهار کننده‌ها، دقت در جداسازی کیست، حذف ساکارز و ... بستگی دارد(۳۰) از جمله مطالعات انجام شده اخیر در ایران می توان به مطالعات زیر اشاره نمود. منوچهری و همکاران (۲۰۱۲) جهت استخراج DNA برای ژنوتایپینگ ژیاردیا از گلوله‌های شیشه‌ای، بافر لیز کننده وکیت کیاژن استفاده کردند(۳۳). در مطالعه سرکاری و همکاران (۲۰۱۲) جهت تعیین ژنوتایپ‌های مختلف ژیاردیا، DNA انگل به روش دستی وبا استفاده ازروش رایج فنل و کلروفرم به همراه بافر لیز کننده حاوی Triton X100 استخراج شد(۳۲).در مجموع باید گفت محققین مختلف روش‌های متنوع بهینه‌سازی روش اسخراج را تجربه نمودند که می‌توان بر اساس نوع امکانات موجود هر آزمایشگاه آن‌ها راانتخاب و عملیاتی نمود.

در مجموع باید متذکر شد که استفاده از گلوله‌های

www.SID.ir

Archive of SID

شیشه‌ای و تکرار ذوب و انجماد قبل از شروع استخراج تأثیر به‌سزایی در شکستن دیواره کیست‌ها دارد و نتایج ما با مطالعاتی که در آن‌ها از گلوله های مغناطیسی برای استخراج DNA از سلول‌های روده(۳۱) و گلوله های شیشه‌ای برای تخریب تخم تنیا(۳۲) استفاده می‌کنند مطابقت دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد جهت رفع اشکالات استخراج DNA از انگل ژیاردیا قبل از شروع استخراج استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای(Glass Beads) + تکرار ذوب و انجماد وسپس استفاده از کیت استخراج Accuprep Bioneer موفقیت امیز می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌شود جهت استانداردسازی روش یکسان جهت استخراج مطلوب DNA از نمونه‌های مختلف بالینی و محیطی (از جمله منابع آبی) مطالعات بیشتری با محوریت حذف مواد مهار کننده انجام گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به خاطر حمایت های مالی قدردانی می‌شود. این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه (کد ۱۸۷-۹۰) کارشناسی ارشد خانم الهام کیالاشکی می‌باشد.

References

1. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Cacciò SM. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of Giardia duodenalis and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Internation J Parasitol 2005; 35(2): 207-213.
2. Heyworth MF. Giardia Infections. Plenum Press 1996; 227-238.
3. Kia E, Hooshyar H, Mobedi I. Study onhuman intestinal parasitic reports in Iran during past century. Proceeding in Second Iranian National Parasitic Diseases.2007.PP: 137 (Persian).
4. Flanagan PA. Giardia – Diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. Epidemiol Infect 1992; 109: 1-22.
5. Guy RA, CXiao, PAHorgen. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of Giardia lamblia in stool specimens. J Clin Microbiol 2004; 42: 3317-3320.
6. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causer L, Wilkins PP. Evaluation of three commercial assays for detection of Giardia and Cryptosporidium organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol 2003; 41: 623-626.
7. NantavisaiK, MungthinM, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of Giardia duodenalis in stool specimens. J Clin Microbiol 2007; 45: 581–583.
8. Amar CF, Dear PH, Pedraza-Diaz S, Looker N. Blinded application of microscopy, boctriological, culture Immuno assays and PCR to detect gastrointestinal phatogens from faecal samples of patiens with community– acquired diarrhoea. Europan J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 529-534.
9. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbord J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of Giardia lamblia in human feces by PCR and PCR-RFLP. J Clin Microbiol 2005; 43: 5940-5944.
10. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of Giardia duodenalis. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1444-1452.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Amar CF, Dear PH, Pedraza-Diaz S, Looker N, Linnane E, McLauchlin J. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of Giardia duodenalis in human feces. J Clin Microbiol 2002; 40: 446–452.
12. Caccio SM, DeGiacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype Giardia duodenalis cysts from human faecal samples. Int J Parasitol; 2002; 32: 1023-1030.
13. Abbaszadegan MR, TavasoliA, Velayati A, et al. Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran. World J Gastroenterol, 2007; 14, 1528-33.
14. Machiels BM, Ruers T, Lindhout M, Hardy K, Hlavaty T, Bang DD, et al. New protocol for DNA extraction of stool. Biotechniques 2000; 28: 286-290.
15. Rezaian m،Ghalhari sm. axenic culture and cryopreservation of giardia lamblia isolated in Iran.J IR Iran 1995;8(4):255-258.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatist T. Molecular cloning. A laboratory manual (2 nd ed), cold spring Harbor laboratory, New York, 1989.
17. Aljanabi SM، Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Res. 1997;25(22): 4692-4693.
18. Read CM، Monis PT ،Thompson RC Discrimination of all genotypes of Giardia duodenalis at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP .Infect Genetic Evol 2004; 125-130.
19. Greenfield L, White TJ. Sample preparation methods. In: Diagnostic Molecular Microbiology. American society for microbiol Washington D.C 1993; 122-137.
20. Monteiro L, Gras N, Megraud F. MagneticImmuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of Helicobacter pylori in human feces. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3778-3780.
21. Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EAT, et al. Simultaneous detection of Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, and Cryptosporidium parvum in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J Clin Microbiol 2004; 1220–1223.
22. Abbaszadegan MR, Velayati A, Tavasoli A, Dadkhah E; Rapid DNA extraction protocol from stool, suitable for molecular genetic diagnosis of coloncancer. Iranian Biomed J 2007; 203–208.
23. Planells D, Lipose F, Puing N, Montoro JA. A new, Fast and simple DNA extraction method for HLA and VNTR genoty ping by PCR amplification. J Clin Lab Anal 1996; 10:125-28.
24. Borji CH, Eslami A، Zakeri S. Isolation of DNA from a single Helminth using new developed Kit in Iran and its PCR analysis. Iranian J Parasitol. 2007; 2: 34-39.
25. Jiang KJ, Alderisio KA, Singh A, Xiao L. Development of procedures for direct extraction of Cryptosporidium DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. App Environ Microbiol 2005; 71: 1135– 1141.
26. Babaei Z ,Oormazi H ,Rezaei S, Rezaeian M ,Razmjou E .Giardia intestinalis: DNA extraction approaches to improve PCR results .ExperimentParasitol2011;128:159-162.
27. Nantavisai K, Mungthin M, Rangsin R. Evaluation of the sensitivities of DNA

www.SID.ir

Archive of SID

extraction and PCR methods for detection of Giardia duodenalis in stool Specimens. J Clin Microbiol 2007; 2: 581-583.

28. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol 2006; 31: 136(3-4): 167-85.
29. Blagg W, Schlogel EL, Mansour NS. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am J Trop Med Hyg 1955; 4(1): 23-28.
30. Afshin Barazesh1, Jafar Majidi, Esmaeel Fallah3 and Reza Gholikhani. Introducing a simple and economical method to purify *Giardia lamblia* cysts. African J Biotech 2011; 10(42); 8498-8501.
31. Wehausen JD, Ramey RR 2nd, Epps CW. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from bighorn sheep feces: the importance of DNA extraction method. J Heredit 2004; 95: 503-509.
32. Nunes CM, Lima LG, Manoel CS, Pereira RN, Nakano MM, Garcia JF. Ecal specimens preparation methods for PCR diagnosis of human taeniosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006; 48(1): 45-47.
33. Sarkari, B., Ashrafmansori, A., Hatam, G.R., Motazedian, M.H., Asgari, Q. and Mohammadpour, I. Genotyping of Giardia lamblia isolates from human in southern Iran. Tropical Biomed 2012; 29(3): 366–371
34. Manouchehri Naeini K, Seyed Abdollah Hosseini, et al. Genotyping of Giardia duodenalis isolates in individualswith and without chronic diarrhea using Polymerase Chain Reaction.J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(95): 39-46 (Persian).
35. Babaei Z., Oormazdi H, Akhlaghi L, Rezaie S, Razmjou E, Soltani-Arabshahi SK, et al. Molecular characterization of the Iranian isolates of Giardia lamblia_application of the glutamate dehydrogenase gene. Iranian J Publ Health 2008; 37(2): 75-82.

www.SID.ir