

Assessing Different Methods of DNA Extraction from *Giardia Lamblia* Cysts

Elham Kialashaki¹,
Mahdi Sharif²,
Mahdi Fakhar³,
Ahmad Daryani²,
Abdol Sattar Paghe⁴

¹ MSc Student in Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 11, 2012 ; Accepted Jan 23, 2012)

Abstract

Background and purpose: *Giardia lamblia* (G.lamblia) is one of flagellated protozoan pathogens. Giardiasis is the most common human parasite infection in the world, causing a lengthy course of diarrhea. The aim of the present study was to compare five different methods of DNA extraction from G.Lamblia cyst and determining the most efficient DNA extraction method.

Materials and methods: This study was carried out in 30 human fecal samples with Giardia infection. To diagnose giardiasis wet mount from feces and staining with Lougol's stain were performed. The cysts were purified and concentrated in a sucrose gradient. The isolated DNA from cysts was performed using different methods including freeze-thaw cycles, glass beads, and stool DNA extraction Kit (Accu prep); freeze-thaw cycles and Pheol-Cholorform-Isoamil alcohol (PCI); boiling and PCI; sonication and PCI; freeze-thaw and high salt. Then the gdh gene was amplified through single round PCR method.

Results: The highest and lowest mean of OD were found in FGK and High salts, respectively. The highest and lowest means of concentration were seen in the freeze-thaw cycles and PCI and the FGK methods, respectively. Moreover, after using the FGK bands of PCR no smears were observed. Also, the lowest time of extraction was detected in FGK method.

Conclusion: To remove problems of DNA extraction and decreasing the time of extraction, glass beads along with Accu prep stool DNA extraction Kit (Bioneer) could be suitable and the most efficient method.

Keywords: *Giardia lamblia*, fecal samples, DNA extraction, Accu prep stool DNA extraction Kit, PCR

ارزیابی روش های مختلف استخراج DNA از کیست ژیا ردیا لامبلیا

الهام کیا لاشکی^۱
 مهدی شریف^۲
 مهدی فخار^۳
 احمد دریانی^۲
 عبدالستار بقیه^۴

چکیده

سابقه و هدف: ژیا ردیا لامبلیا یکی از پاتوژن های تک یاخته ای مهم است که در طبقه بندی جزء تاژک داران روده ای قرار می گیرد ژیا ردیا یازیس معمول ترین عفونت انگلی انسان در جهان است که باعث اسهال طولانی مدت می شود. هدف از این مطالعه مقایسه و ارزیابی ۵ روش مختلف استخراج DNA از کیست ژیا ردیا لامبلیا به منظور تعیین روش مطلوب بود.

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۳۰ نمونه مدفوع آلوده به انگل ژیا ردیا صورت گرفت. تشخیص بیماری با تهیه گسترش مستقیم از نمونه مدفوع و رنگ آمیزی با لوگل بود. کیست های ژیا ردیا به روش گرادیان سوکروز تخلیص شدند و ۵ روش مختلف استخراج بر روی این نمونه ها صورت گرفت. که شامل: ذوب و انجماد + گلوله های شیشه ای + 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 و انجماد + نمک با غلظت بالا (High salt) بود. سپس واکنش یک مرحله ای PCR بر روی DNA استخراج شده در ناحیه ژنی gdh انجام گرفت.

یافته ها: بالاترین و کمترین میانگین نسبت جذب نوری DNA (OD) به ترتیب مربوط به روش استخراج FGK از مدفوع و روش ذوب و انجماد + 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 ژیا ردیا و کاهش زمان استخراج استفاده از گلوله های شیشه ای (Glass beads)، و سپس کیت استخراج (Accu prep (Bioneer) روشی مطلوب و دارای بیشترین کارایی می باشد.

واژه های کلیدی: ژیا ردیا لامبلیا، نمونه های مدفوع، استخراج DNA، کیت استخراج Accuprep، PCR

مقدمه

ژیا ردیا لامبلیا یکی از پاتوژن های تک یاخته ای مهم است که در طبقه بندی جزو تاژک داران روده ای قرار می گیرد (۱). این انگل انتشار جهانی داشته، شیوع آن حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا تخمین زده می شود (۲). در مرور ۳۰۰ بررسی انجام گرفته در زمینه انگل های روده ای انسان در ایران در ۵۰ سال گذشته، ژیا ردیا در کنار

E-mail: mahdif53@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدی فخار - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۴. مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۹/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۱/۴

مواد و روش ها

- جمع آوری و جداسازی کیست

در این مطالعه ۳۰ نمونه مدفوع آلوده به انگل ژiardia جمع آوری شدند و در این بررسی از نمونه های مدفوع حاوی کیست به میزان مناسب (در هر میدان میکروسکوپی با بزرگ نمایی $40\times$ 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 ژiardia به شرح زیر انجام شد:

۱- روش استخراج با کیت (FGK) Accuprep

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه حاوی کیست ۲ بار با آب مقطر شستشو داده شد و کیست ها با اضافه نمودن گلوله های شیشه ای (۵۲-۰/۴۵ MM قطر) و ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به میکروتیوپ ها 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 سانتی گراد به مدت ۲ تا ۳ دقیقه استفاده شد. در این مرحله هر یک از نمونه ها ۴۰ میکرولیتر پروتیناز k (۱۱۳۳۵) و ۴۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات ۱ درصد اضافه شد و نمونه ها به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سرانجام استخراج DNA انگل با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده: Accuprep stool Dna (Bioneer Corporation) Extraction Kit انجام شد.

۲- روش فنل کلروفرم ایزوامیل الکل (PCI)

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

آنتامبا هیستولیتیکا، شایع ترین تک یاخته های بیماری زا بوده اند (۳). حساسیت پایین روش های معمول، تشخیص ژiardiaزیس را مشکل می کند (۴). اگر چه چندین روش مانند ایمونوفلور سنتستیمو 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 نوع گونه های ژنتیکی ژiardia لامبلیا حساس نباشد (۶-۹) بنابراین با وجود چنین محدودیت هایی این روش ها برای مشخص کردن اپیدمیولوژی مولکولی ژiardiaزیس رضایت بخش نیست (۱۱،۱۰). اخیراً روش هایی بر پایه PCR برای تشخیص و ژنوتیپینگ ژiardia به وسیله محققین انجام شده است (۱۲).

بعضی از این روش ها محدودیت هایی دارد برای مثال ممکن است محصول DNA استخراج شده به دلیل مشکلاتی در شکستن دیواره کیست کم باشد یا حساسیت تکنیک PCR بر نمونه های مدفوع به دلیل وجود مهار کننده های PCR مثل لپیدها، هموگلوبین، نمک های صفراوی، پلی ساکاریدهای موکوس، باکتری و محصولات هضم غذایی کم شود (۷).

حساسیت بررسی های مولکولی از طریق روش های مؤثرتر استخراج DNA و سیستم های حساس تر تکثیر برای شناسایی ژن افزایش یافته است با بررسی های مولکولی انجام شده بر روی ژن های مختلفی از قبیل گلو تامات دایدروژناز، تریوز فسفات ایزومراز و بتاژاردین ایزوله های مختلف ژiardia لامبلیا قابل تمایز می باشند همچنین آنالیز توالی ژنی GDH و TPI ژiardia شناسایی ژنوتایپ های مختلط را ممکن می سازد (۱۱،۱۳،۱۴).

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

۳- جوشاندن (Boiling)

در این روش ابتدا در میکروتیوپ حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه حاوی کیست را با پارافیلیم محکم بسته درون بشر گذاشته شد. نمونه مذکور به مدت ۳۰ ثانیه در مایکروویو قرار داده پس از آن 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 (Sonication)

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

۵- نمک با غلظت بالا (High Salt)

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از هر 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 و نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ nm با دستگاه نانودراپ (WPA, England) اندازه‌گیری شد.

تکثیر ژن GDH به روش PCR

تکثیر ژن GDH با یک مرحله PCR با پرایمرهای: (FORWARD 5' TCAACG TCAACCGGC TTCCGT3') GDHF و (REVERSE 5' TCAACG TCAACCGGC TTCCGT3') GDHR 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، ۱۰۰ پیکومول از هر یک 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.

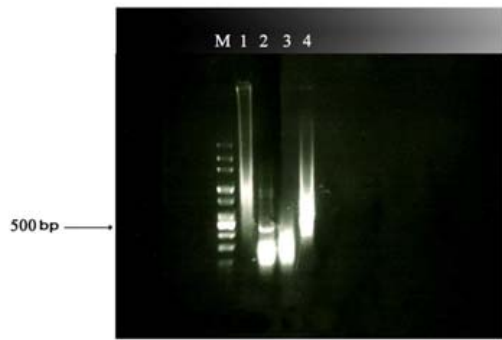
یافته‌ها

در این مطالعه ۵ روش استخراج DNA از کیست ژیا ردیا بر روی ۳۰ نمونه مدفوع بیماران آلوده به انگل ژیا ردیا 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 نسبت OD به ترتیب مربوط به روش FGK و روش Highsalt 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 انگل ژیا ردیا لامبلیا

روش	متغیر
High salt + ذوب و انجماد	نسبت جذب نوری (260/280nm)
PCI + سونیکاسیون	۰/۸
PCI + جوشاندن	۱/۰۸
ذوب و انجماد + PCI	۰/۹۸
FGK	۱/۱۲
روش	۱/۶۴۵
میانگین غلظت	۲/۱۹
مدت زمان استخراج	۵۷/۶
	>۴h
	>۴h
	>۴h
	>۴h
	<۲h

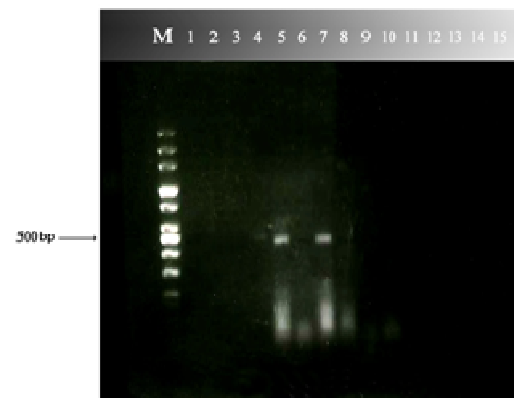


تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصولات DNA استخراج شده با روش PCI با استفاده از روش الکتروفورز ۱ درصد ستون ۴-۱: فنل کلروفرم

بحث

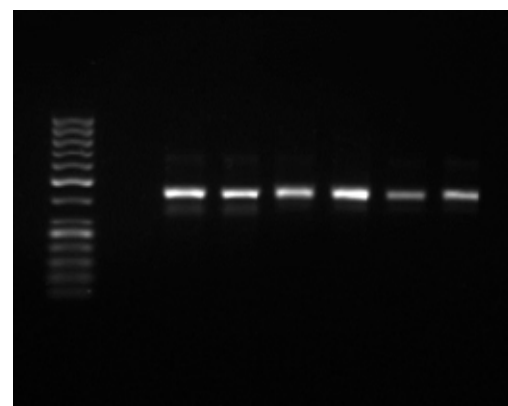
مطالعه حاضر با هدف مقایسه ۵ روش مختلف استخراج DNA از کیست ژیا ردیا و تعیین روش مطلوب طراحی شد. در این مطالعه ۳ متغیر جذب نوری، غلظت DNA و مدت زمان استخراج مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۵ روش مورد بررسی روش استخراج با FGK نتایج مطلوبی به دست آورد و از استخراج با روش های جوشاندن، سونیکاسیون و نمک با غلظت بالا نتایجی حاصل نشد. با استفاده از روش PCR-RFLP و PCR می توان بین ژنوتیپ های ژیا ردیا لامبلیا تمایز قائل شد. هر چند تکنیک های PCR برای نمونه های مدفوع ممکن است به دلیل وجود مهار کننده های PCR و مشکل بودن تخریب کیست حساس نباشد. برای افزایش حساسیت PCR یک روش استخراج DNA مؤثر لازم است (۱۶). در مطالعه حاضر بعد از بررسی جدول این گونه به نظر می رسد که جذب نوری و غلظت DNA استخراج شده از هر ۵ روش تقریباً قابل قبول است ولی نتایج PCR مؤید مطلب دیگری است. اگر چه OD (نسبت $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$) در اغلب نمونه ها قابل قبول بود ولی PCR آن ها موفقیت آمیز نبود که می تواند به علت حضور ناخالصی هایی باشد که تکثیر DNA را مهار می کند. بنابراین روش تخلیص DNA از نمونه های مدفوع باید این ناخالصی ها را خارج کند. استفاده از نمونه مدفوع جهت تکثیر

در روش FGK ژن GDH با موفقیت تکثیر شد و در الکتروفورز محصول PCR باند بدون اسمیر مشاهده شد (تصاویر شماره ۱ و ۲). در حالی که با روش ذوب و انجماد + PCI در الکتروفورز PCR یک باند مشاهده شد ولی اسمیر نیز مشاهده شد (تصویر شماره ۳). در سایر روش ها با وجود این که غلظت DNA تا حدی قابل قبول بود ولی در الکتروفورز محصول PCR بانندی مشاهده نشد. همان طور که در جدول شماره ۱ آمده است استخراج با FGK در مقایسه با روش های دیگر نیز کمترین زمان را به خود اختصاص داد (بدون در نظر گرفتن مرحله مقدماتی).



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات DNA استخراج شده از ۵ روش مختلف با استفاده از روش الکتروفورز ۱ درصد

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



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصولات DNA استخراج شده با روش FGK با استفاده از روش الکتروفورز ۱ درصد

ستون ۲-۷: FGK

PCR استفاده کردند (۲۶). Nantavisai و همکاران (۲۰۰۷) جهت استخراج DNA از کیست ژیا ردیا ۳ روش فنل کلروفورم، کیت و فیلتر کاغذی (FTA) را مقایسه کردند و استفاده از فیلتر کاغذی FTA را به دلیل داشتن حساسیت بالا و کاربرد آسان به عنوان روش مؤثر معرفی کردند (۲۷). در مطالعه حاضر استخراج با کیت BIONEERACCUPREP به عنوان بهترین روش معرفی می‌شود چون حساس تر است و زمان کم‌تری صرف می‌کند و مانند سایر کیت‌های استخراج (QIAamp) به طور مؤثری مهارکننده‌های PCR را حذف می‌کند (۲۸). استخراج DNA از مقادیر کم مواد بیولوژیکی مانند اسمیرهای خونی یا کرم‌های کوچک و... با استفاده از روش فنل کلروفورم همیشه عملی نیست و این روش غالباً در کشورهای در حال توسعه استفاده می‌شود در حالی که 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 ژیا ردیا به غلظت کیست، وجود مهارکننده‌ها، دقت در جداسازی کیست، حذف ساکارز و... بستگی دارد (۳۰). در مجموع باید متذکر شد که استفاده از گلوله‌های 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 گلوله‌های مغناطیسی برای استخراج DNA از سلول‌های روده و گلوله‌های شیشه‌ای برای تخریب تخم تنیا استفاده می‌کنند مطابقت دارد (۳۱، ۳۲).

در مطالعه سرکاری و همکاران (۲۰۱۲) جهت تعیین ژنوتایپ‌های مختلف ژیا ردیا، DNA انگل به روش دستی وبا استفاده از روش رایج فنل و کلروفورم به همراه بافر لیزکننده حاوی Triton X100 استخراج شد (۳۳).

از جمله مطالعات انجام شده اخیر در ایران می‌توان به مطالعات زیر اشاره نمود. منوچهری و همکاران

DNA باعث مشکلاتی می‌شود این مشکلات به علت وجود انواع مختلف باکتری و مواد 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 کلروفورم کاملاً حذف نمی‌شوند و به عنوان آلودگی در رسوب نهایی DNA باقی می‌ماند خلوص DNA را کاهش می‌دهند و به عنوان مهارکننده‌های PCR عمل می‌کنند. به این دلیل بعضی از روش‌های استخراج جهت آنالیز حساس تر بهبود یافتند (۲۰) همچنین جهت حذف ناخالصی‌های DNA و مهارکننده‌های موجود در مدفوع از موادی مانند فنل کلروفورم، PVP (پلی وینیل پلی پیرولیدون) و CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید) و روش جوشاندن استفاده شده است (۲۱). این مواد ذکر شده هم مهارکننده‌ها 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 ناخالصی‌های DNA کاملاً حذف نمی‌شود و در PCR اختلال ایجاد می‌کند در حالی که غلظت DNA در استخراج با کیت کم اما خالص است. همچنین استخراج با فنل کلروفورم علاوه بر این که وقت گیر و پر زحمت است معایبی مانند استفاده از فنل دارد که توکسیک و سمی است (۲۳) سرعت، ایمنی و خلوص بیش‌تر از مزایای کیت می‌باشد، تنها عیب این روش هزینه بالاست (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 کلروفورم بود که بین این روش‌ها عملکرد روش آخر ضعیف بود (۲۵). بابایی و همکاران (۲۰۱۱) برای استخراج DNA از گلوله‌های شیشه‌ای و تکرار ذوب و انجماد جهت شکستن دیواره کیست و کیت QIAamp به منظور حذف مهارکننده‌های

می شود جهت استانداردسازی روش یکسان جهت استخراج مطلوب DNA از نمونه های مختلف بالینی و محیطی (از جمله منابع آبی) مطالعات بیشتر 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 می شود. این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه (کد ۹۰-۱۸۷) کارشناسی ارشد انگل شناسی خانم الهام کیالاشکی می باشد.

(۲۰۱۲) جهت استخراج DNA برای ژنوتایپینگ ژiardیا از گلوله های شیشه ای، بافر لیز کننده و کیت کیاژن استفاده کردند (۳۴).

در مجموع باید گفت محققین مختلف روش های متنوع بهینه سازی روش استخراج را تجربه نمودند که می توان بر اساس نوع امکانات موجود هر آزمایشگاه آن ها را انتخاب و عملیاتی نمود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد جهت رفع اشکالات استخراج DNA از انگل ژiardیا قبل از شروع استخراج استفاده از گلوله های شیشه ای (Glass Beads) + تکرار ذوب و انجماد و سپس استفاده از کیت استخراج Accuprep Bioneer موفقیت آمیز می باشد. لذا پیشنهاد

References

- 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 *Giardiaduodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005; 35(2): 207-213.
- Heyworth MF. *Giardia Infections*. In Paradise LJ, Bendinelli M, Friedman H, editors. *Enteric infections and immunity*. New York: Plenum Press; 1996. p. 227-238.
- Kia E, Hooshyar H, Mobedi I. Study on human intestinal parasitic reports in Iran during past century. *Proceeding in Second Iranian National Parasitic Diseases*. 2007. p. 137 (Persian).
- Flanagan PA. *Giardia-Diagnosis, clinical course and epidemiology*. A review. *Epidemiol Infect* 1992; 109(1): 1-22.
- Guy RA, CXiao, PA Horgen. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 3317-3320.
- Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causser L, Wilkins PP. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2): 623-626.
- Nantavisai K, Mungthin M, 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(2): 581-583.
- Amar CF, East C, Maclure E, McLauchlin J, Jenkins C, Duncanson P, et al. Blinded application of microscopy, bacteriological, culture Immunoassays and PCR to detect gastrointestinal pathogens from faecal samples of patients with community-acquired diarrhoea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23(7): 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-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12): 5940-5944.
10. Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, et al. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(11): 1444-1452.
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(2): 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(8): 1023-1030.
13. Abbaszadegan MR, Tavasoli A, Velayati A, Sima HR, Vosooghinia H, Farzadnia M, et al. Stool-based DNA testing, a new noninvasive method for colorectal cancer screening, the first report from Iran. *World J Gastroenterol* 2007; 13(10): 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(2): 286-290.
15. Rezaian M, Ghalhari S. Axenic culture and cryopreservation of *giardia lamblia* isolated in Iran. *MJIR* 1995; 8(4): 255-258.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 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 Genet Evol* 2004; 4(2): 125-130.
19. Greenfield L, White TJ. Sample preparation methods. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications*. Washington DC: American society for microbiology; 1993. p. 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 EA, 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; 42(3): 1220-1223.
22. Abbaszadegan MR, Velayati A, Tavasoli A, Dadkhah E. Rapid DNA extraction protocol from stool, suitable for molecular genetic diagnosis of coloncancer. *Iran Biomed J* 2007; 11(3): 203-208.
23. Planells D, Llopis F, Puig N, Montoro JA. A new, Fast and simple DNA extraction method for HLA and VNTR genotyping by PCR amplification. *J Clin Lab Anal* 1996; 10(3): 125-28.

24. Shayan P, Borji H, 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(2): 34-39.
25. Jiang J, 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(3): 1135-1141.
26. Babaei Z, Oormazi H, Rezaei S, Rezaeian M, Razmjou E. Giardia intestinalis: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp Parasitol* 2011; 128(2): 159-162.
27. Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsri 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(2): 581-583.
28. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 2006; 136(3-4): 167-85.
29. Blagg W, Schloegel EL, Mansour NS, KHALAF GI. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg* 1955; 4(1): 23-28.
30. Barazesh A, Majidi J, Fallah E, Gholikhani R. 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 Hered* 2004; 95(6): 503-509.
32. Nunes CM, Lima LG, Manoel CS, Pereira RN, Nakano MM, Garcia JF. Fecal 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 GR, Motazedian MH, Asgari Q, Mohammadpour I. Genotyping of Giardia lamblia isolates from human in southern Iran. *Trop Biomed* 2012; 29(3): 366-371.
34. Manouchehri Naeini K, Hosseini SA, Gholipour A, Babaei Z, Taghipour S. Genotyping of Giardia duodenalis isolates in individuals with 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.