شناسایی باکتری‌های غالب در خلط مصدومین شیمیایی با استفاده از تکنیک PCR-DGGE و روش های وابسته به کشت

پریسا محمدی[۱*]، آروین توکلی[۲]، عزت عسگرانی[۳]، طوبی غضنفری[۴]، محمد رضا سروش[۵]

۱- زیست شناس، استادیار دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهراء(س)
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی دانشگاه الزهراء(س)
۳- زیست شناس، دانشیار دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهراء(س)
۴- ایمنولوژیست، استاد گروه ایمنولوژی، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی، دانشگاه شاهد
۵- هیات علمی مرکز تحقیقات مهندسی و پزشکی جانبازان تهران

***نشانی برای مکاتبه:** تهران، دانشگاه الزهراء(س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن ۸۵۶۹۲۷۱۴، نمابر ۸۸۰۵۸۹۱۲، p.mohammadi@alzahra.ac.ir

دریافت مقاله: تیر نود و سه پذیرش برای چاپ: شهریور نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *بسیاری از مصدومین شیمیایی به دلیل مواجه شدن با گاز سمی خردل، به بیماری¬های مزمن ریوی دچار می باشند. عفونت دستگاه تنفسی از عوامل تشدید علائم بیماری های مزمن ریوی است. بنابراین حذف عفونت تنفسی این بیماران در کاهش علائم بیماری¬های مزمن ریوی موثر است. هدف از این مطالعه تعیین جمعیت میکروبی در خلط بیماران شیمیایی است که به دو روش وابسته به کشت و PCR-DGGE انجام می¬شود.*

روش کار: *پس از استخراج DNA و انجام PCR به کمک پرایمرهای یونیورسال، محصولات PCR که حاوی قطعات ۱۶S rDNA متعلق به باکتری¬های مختلف بودند در ژل حاوی ماده دناتوره کننده ی DGGE بارگذاری شد و سپس الکتروفورز انجام گرفت. پس از جدا شدن قطعات متفاوت DNA بر روی ژل، باندهای تکرارشونده در نمونه¬های مختلف جدا شد و مجددا با انجام PCR، تکثیر گردید. سپس بر اساس توالی های به دست آمده آنالیز فیلوژنتیک انجام شد. به منظور جداسازی عوامل میکروبی از محیط های کشت عمومی استفاده شد. از کلنی¬های جدا شده کشت مجدد تهیه و سپس، رنگ آمیزی گرم انجام شد. با توجه به نتیجه¬ رنگ¬آمیزی گرم، به منظور شناسایی میکروبی از تست¬های افتراقی استفاده گردید.*

یافته ها: *در تکنیک PCR-DGGE و تکنیک وابسته به کشت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان باکتری تکرار شونده در نمونه های مورد بررسی شناسایی شد.*

نتیجه گیری: *از آنجائی که روش¬های سنتی شناسایی میکروبی بسیار وقت گیر است، تکنیک PCR-DGGE می¬تواند به عنوان یک تکنیک سریع و کارآمد برای بسیاری اهداف از جمله شناسایی باکتری غالب در جمعیت¬های میکروبی مورد استفاده قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: مصدومین شیمیایی، عفونت تنفسی، PCR-DGGE

مقدمه

دستگاه تنفس مشتمل بر ریه و مجاری است که مناطق تبادل گاز با محیط خارج را به همدیگر وصل میکند. در واقع دستگاه تنفس شامل منطقه بسیار وسیعی است که در معرض خون و محیط خارجی است و در نتیجه نسبت به تهاجم عناصر عفونی و غیر عفونی بسیار مستعد است(۱).

پیشرفت یک عفونت به میان کنش های پیچیده ی مانند حساسیت میزبان به عفونت، پتانسیل بیماری زایی ارگانیسم، فرصت انجام میان کنش بین میزبان و ارگانیسم بستگی دارد. عفونت هایی که در نتیجه اختلالات در دفاع میزبان رخ می¬دهند، تحت عنوان عفونت¬های فرصت طلب شناخته می¬شوند. این عفونت ها ممکن است مربوط به بیماری¬زاهای واقعی و یا ارگانیسم هایی با قدرت بیماری¬زایی پایین از فلور طبیعی بدن و یا بخشی از فلور غیر بیماری¬زای گذرا باشد(۲). فلور نرمال دستگاه تنفسی معمولا مشابه فلور نرمال دهان است. طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها قادرند در بینی، گلو و دهان تثبیت شوند(۳).

اختلالات نقص ایمنی، بیماران را مستعد عفونت های راجعه توسط عوامل فرصت طلب می¬کند. از عوامل فرصت طلب در ایجاد عفونت دستگاه تنفسی می توان به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، هموفیلوس آنفلانزا، پسودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی، پروتئوس و مایکوباکتریوم های فرصت طلب اشاره کرد(۴).

در جنگ تحمیلی عراق علیه ایران (۱۹۸۰- ۱۹۸۸)، از گاز خردل علیه رزمندگان ایرانی استفاده شد که بسیاری از غیر نظامیان را نیز مصدوم کرد(۵). بر اساس برآوردهای اپیدمیولوژیکی، نزدیک به یک صد هزار نفر ایرانی در طی جنگ ایران وعراق در معرض این گاز قرار گرفتند. گاز خردل به صورت اولیه قادر است صدمات شیمیایی شدیدی را در برخی از اندام های اصلی بدن ایجاد کند. شایع¬ترین عارضه مزمن جسمی در افراد مواجه شده با این گاز، ضایعات مزمن ریوی است(۶). گاز خردل به عنوان عامل سرکوب گر ایمنی، باعث کاهش گلبول¬های سفید بخصوص لنفوسیت¬ها می¬شود. کاهش فاکتورهای سیستم ایمنی هومورال نیز در مصدومین شیمیایی قابل توجه است(۷). بنابراین سیستم ایمنی بدن متاثر شده و شخص ممکن است در معرض عفونت¬های مختلف قرار بگیرد.

بیماری¬های مزمن ریوی ناشی از سولفور موستارد طیف وسیعی از علایم را شامل برونشیت مزمن، برونشیولیت، برونشکتازی، تنگی تراشه و برونش های اصلی و تحریک پذیری راه های هوایی و فیبروز ریه در بر می¬گیرد. عفونت دستگاه تنفسی یکی از عوامل تشدید علائم بیماری¬های مزمن ریوی است(۸). شدت این عوارض که خود را به صورت سرفه مزمن، تنگی نفس و خلط نشان می¬دهد دارای درجات متفاوت خفیف، متوسط و شدید است. نکته بارز در این بیماری تشدید علائم به صورت متناوب است که ناشی از عفونت و افزایش ترشحات درخت تراکئوبرونشیال و نیز تشدید برونکواسپاسم می¬باشد(۱۲-۹). در مطالعه ی پناهی و هم کاران(۲۰۰۴) تنوعی از باکتری ها که غالباً جزء فلور نرمال دستگاه تنفسی بودند گزارش شده است(۱۳).

از آنجائی¬که رفع عفونت دستگاه تنفسی در کاهش علائم بیماری¬های مزمن ریوی موثر است، بررسی میکروبی خلط جانبازان شیمیایی به منظور شناسایی جمعیت میکروبی، لازم به نظر می¬رسد. لذا هدف از این مطالعه تعیین فلور میکروبی خلط این بیماران بود. در روش های مرسوم جهت شناسایی عوامل میکروبی موثر در ایجاد عفونت، از روش های مبتنی بر کشت استفاده می¬شود. اخیراً روش PCR-DGGE جهت شناسایی جمعیت¬های میکروبی به دنیای میکروبیولوژی معرفی شده است. PCR-DGGE ابزاری مناسب برای نشان دادن تفاوت¬های ژنتیکی میکروب¬ها فراهم می¬کند، این روش ارزیابی حداقلی از اعضای غالب جمعیت میکروبی به دست می¬دهد. علاوه¬ بر¬این، تکنیک DGGE امکان شناسایی جمعیت¬های خاص را به طریق آنالیز هیبریداسیون الگو¬ها با پروب¬های خاص و یا از طریق تعیین توالی باند¬های خاص، فراهم می¬کند(۱۴). در این روش پس از تکثیر قطعه ی مشخصی از باکتری¬های مختلف توسط واکنشPCR ، از ژل پلی آکریل آمید حاوی شیب غلظتی از مواد دناتوره کننده اوره و فرم آمید استفاده می¬شود تا توالی هایDNA متعلق به باکتری¬های مختلف جدا گردد. در این بررسی از تکنیکPCR-DGGE و روش مبتنی بر کشت باکتریایی برای شناسایی باکتری¬های غالب خلط مصدومین شیمیایی استفاده شد.

روش کار

در این مطالعه، ۵۰ نمونه خلط متعلق به مصدومین شیمیایی جنگ تحمیلی مورد مطالعه میکروسکوپی و بیوشیمیایی و مولکولی قرار گرفت. آنالیز مولکولی شامل مراحل زیر بود:

۱: استخراج DNA از نمونه های خلط با استفاده از کیت استخراج DNA(QIAGEN QIA amp,) و تغلیظ DNA استخراج شده، ۲: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای srRNA۱۶ یونیورسال f۲۷ و r۱۴۹۲ (جداول۱ تا ۳)، ۳: الکتروفورز محصولPCR بر روی ژل آگارز و رنگ آمیزی باندهای به دست آمده و مشاهده توسط دستگاه ژل داک (SYNGENE)، 4: تهیه ژل پلی آکریل آمید حاوی مواد دناتوره کننده مطابق دستورالعمل دستگاه DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio Rad) (در ابتدا دو محلول ۲۰٪ و ۸۰٪ ماده دناتوره کننده برای تشکیل شیب غلظت استفاده شد. به منظور مشاهده شیب غلظت مواد، دو قطره محلول رنگی بروموفنول بلو و زایلن سیانول به غلظت بالای ماده دناتوره کننده (۸۰٪) اضافه شد.TEMED و APS با غلظت نهایی ۰/۰۹٪ به محلول های ۲۰٪ و ۸۰¬٪ اضافه گردید. در قسمت بالای ژل محلول ۰٪ دناتوره کننده همراه با APS و TEMED با غلظت نهایی ۱۰٪ قرار گرفت. این منطقه محل قرارگیری شانهی ایجاد چاهک می¬باشد. در مراحلی نیز از دو غلظت ۳۰٪ و ۷۰٪ برای جداسازی بهتر باند ها استفاده شد)، ۵: بعد از قرار دادن ژل درتانک دستگاه Dcode حاوی ۷ لیتر بافر TAE 1%، در هر چاهک معادل ng 300-500 از محصول PCR بارگذاری گردید. دمای دستگاه بر روی oC 60 تنظیم گردید و دستگاه به مدت ۱۹ ساعت در ولتاژ ۱۰۰ ولت قرار داده شد، ۶: پس از پایان الکتروفوز، ژل پلی آکریل آمید به مدت ۳۰ دقیقه در محلول رنگی Gel red قرار گرفت. سپس با قرار دادن ژل در آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه، رنگ زدایی از ژل انجام و باندهای به دست آمده با استفاده از دستگاه ژل داک بررسی و عکس برداری از آن انجام شد. هر دو مرحله رنگ آمیزی و رنگ زدایی ژل با شیک کردن آرام همراه بود، ۷: باند های مورد نظر از ژل پلی آکریل آمید با قرار دادن ژل بر روی دستگاه ((Optima UV Transilluminator بریده و در 50 µl آب مقطر قرار گرفت، ۸: میکروتیوپ حاوی ژل بریده شده و 50 µl آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه در ۷۳ ^{o}C گرماگذاری شد. این امر منجر به آزاد شدن DNA از درون ژل به آب مقطر می¬شود. از این DNA، در مراحل بعدی به عنوان الگو استفاده شد و تکثیر مجدد توسط PCR انجام شد (جدول۴ و۵)، ۹: پس از ارزیابی باندها، محصولات مناسب PCR، جهت توالی یابی به شرکتMacro کره جنوبی فرستاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمر های مورد استفاده در تکثیرDNA

Reverse primer	1492r	5'TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T3'
Forward primer	27f	5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3'

جدول ۲: ترکیب مخلوط واکنش PCR در تکثیر DNA

ترکیب	حجم مورد نیاز(میکرولیتر)
dNTP mix(10mM)	۱
$MgCl_2$(50mM)	۲/۵
PCR buffer 10X	۵
27f(20pM)	۰/۵
1492r(20pM)	۰/۵
Taq DNA polymerase	۰/۵
DNA template	1
Distilled water	39
حجم نهایی	۵۰

جدول ۳: برنامه PCR مورد استفاده در تکثیر DNA

برنامه	دما (درجه سانتیگراد)	زمان(دقیقه)	تعداد تکرار مرحله
Initial denaturation	۹۴	۵	۱
Open loop(x30)	-	-	-
Denaturation	۹۴	۱	۳۰
Annealing	۵۷	۱	۳۰
Extension	۷۲	۱	۳۰
Close loop	-	-	-
Final extension	۷۲	۵	۱
Hold	۴	۱۰	۱

جدول۴: ترکیب واکنش PCR در تکثیر مجدد باند های جدا شده از ژل DGGE

ترکیب	حجم مورد نیاز(میکرولیتر)
dNTP mix (10mM)	۱
$MgCl_2$ (50mM)	۲
PCR buffer 10X	۵
27f (20pM)	۰/۵
1492r (20pM)	۰/۵
Taq DNA polymerase	۰/۵
PCR product	۱۰
Distilled water	30/5
حجم نهایی	۵۰

جدول ۵: برنامه PCR در تکثیر مجدد باندهای جدا شده از ژل DGGE

برنامه	دما (درجه سانتیگراد)	زمان(دقیقه)	تعداد تکرار مرحله
Initial denaturation	۹۴	۵	۱
Open loop(x25)	-	-	-
Denaturation	۹۴	۱	۲۵
Annealing	۶۰	۰/۵	۲۵
Extension	۷۲	۱	۲۵
Close loop	-	-	-
Final extension	۷۲	۵	۱
Hold	۴	۱۰	۱

در تکنیک وابسته به کشت، از محیط های کشت عمومی، انتخابی و افتراقی جهت جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم ها استفاده شد. پس از جداسازی باکتری ها و تهیه کشت خالص از آن‌ها، رنگ آمیزی گرم انجام شد. با توجه به نتیجه رنگ‌آمیزی گرم، به منظور شناسایی باکتری ها جهت شناسایی آنها آزمون‌های لازم استفاده شد. محیط های کشت مورد استفاده محصول شرکت Merck آلمان شامل: Urea Agar, Mac Conkey Agar, Blood Agar Base, MR-VP Broth, Triple Suger Iron Agar, Mueller Hinton Agar, Mannitol Salt Agar, Eosin Methylene Blue Agar, Phenol Red Broth Base, Saboraud Dextrose Agar, SIM Medium, Tryptic Soy Broth, Simmons Citrate Agar, Starch Agar, Bile Esculin Agar, Nutrient Gelatin Agar, DNase Agar. بود.

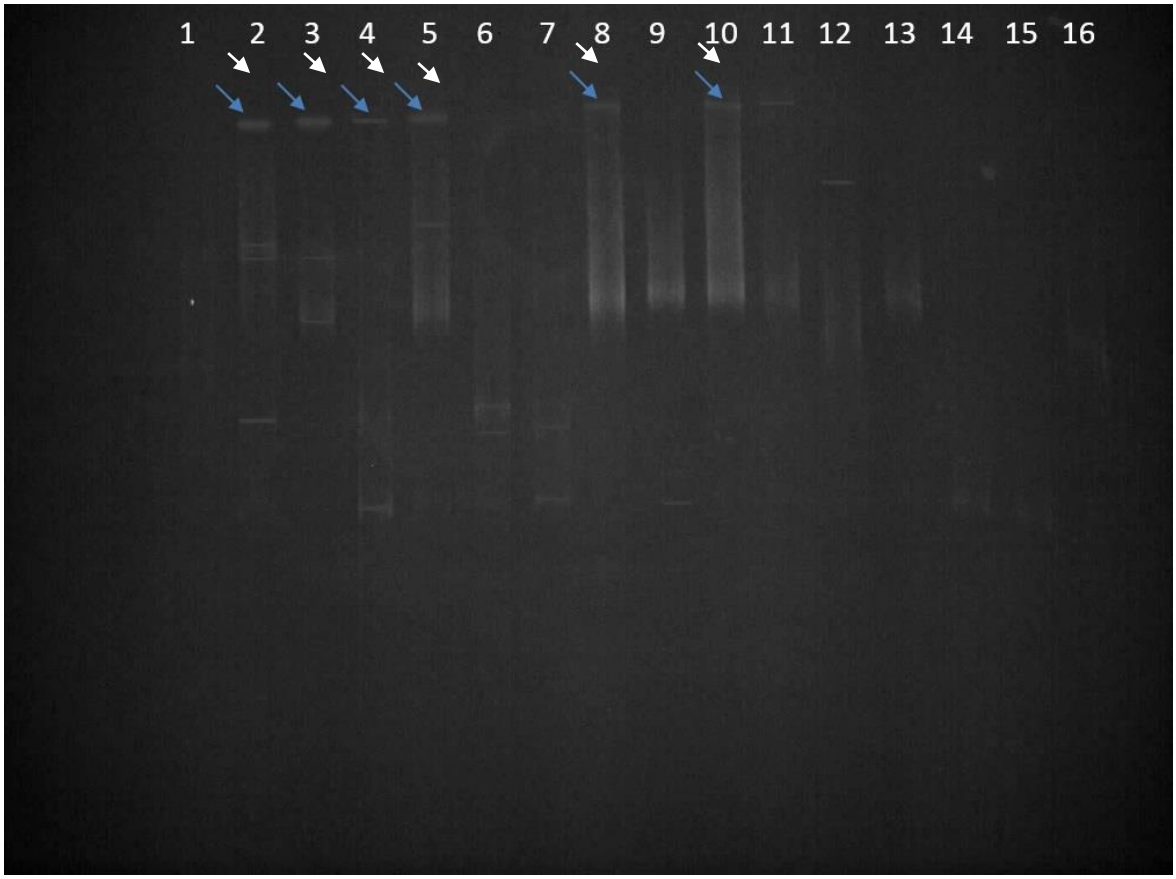
به منظور شناسایی جدایه‌ها از آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز، KOH، تحرک، حساسیت آنتی بیوتیکی، رشد بر روی محیط MSA و TSI، آزمون IMViC، تحمل نمکی، تولید اسید از کربوهیدرات ها، هیدرولیز بایل اسکولین و اسکولین، هیدرولیز هیپورات، هیدولیز نشاسته، آزمون‌های مربوط به آنزیم های اوره آز، ژلاتیناز، DNase و آزمون احیای نیترات استفاده شد.

یافته ها

نتایج توالی‌یابی توسط نرم افزار Chromas bio 2.4.1 ویرایش شد. سپس توالی‌های به دست آمده با توالی‌های DNA ریبوزومی سایر باکتری‌ها در بانک ژنتیکی NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)، BLAST و مقایسه شد(جدول ۶). باکتری مورد تظر با ۱۰۰٪ شباهت استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شد. بنابراین در بررسی انجام شده توسط تکنیک PCR-DGGE باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان باکتری تکرار شونده در نمونه های خلط شناسایی شد (شکل۱).

جدول ۶: نتایج بدست آمده از Blast توالی بر اساس توالی 16S rRNA

درصد میزان تشابه	شماره دسترسی	نزدیک ترین سویه‌ی شناسایی شده با بیشترین تشابه نوکلئوتیدی	باکتری مورد نظر
٪۱۰۰	FJ899095	*Staphylococcus aureus* Strain SC01	شماره ۱



شکل ۱: تصویر ژلPCR-DGGE حاوی ژل آکریل آمید ۶٪ و دارای شیب غلظت ۸۰٪-۲۰٪ مواد دناتوره کننده، باندهای مشخص شده، باکتری مورد نظر را نشان می دهد.

با استفاده از روش های مبتنی بر کشت انواعی از باکتری ها مورد شناسایی قرار گرفت. اما هیچ مورد قارچ و مخمری جدا نشد. ۰/۴٪ از باکتری های جدا شده، پاتوژن اولیه(استرپتوکوکوس پنومونیه)، ۱۵/۵٪ پاتوژن ثانویه(استافیلوکوکوس اورئوس) و ۸۴٪ باکتری های ساپروفیت (انواع استرپتوکوکوس ویریدانس) شناسایی گردید. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس فراوان‌ترین سویه باکتریایی جدا و شناسایی شده از خلط مصدومین شیمیایی در روش مبتنی بر کشت بود (جدول ۷).

جدول ۷: باکتری های شناسایی شده توسط تکنیک وابسته به کشت

باکتری	تعداد موارد
استافیلوکوکوس اورئوس[1]	۳۶
استافیلوکوک همولیتیکوس[2]	۱
میکروکوکوس[3]	۴
استرپتوکوک ویریدانس[4]	۸۴
استرپتوکوک پنومونیه[5]	۱
آئروکوکوس[6]	۱
لاکتوکوکوس[7]	۴
آلیوکوکوس[8]	۸
باسیلوس[9]	۲
کورشیا[10]	۱
اشرشیا کولی[11]	۱
رالستونیا پیکتی[12]	۱
روشیا دنتوکاریزوئا[13]	۱
استرپتومایسس[14]	۳
غیر قابل شناسایی از طریق روش های بیوشیمیایی و آنزیمی	۸۴

1) Staphylococcus aureus, 2)Staphylococcus hemoliticus, 3) Micrococcus, 4)streptococcus viridans, 5) streptococcus pneumoiae, 6)Aerococcus, 8) Alloiococcus, 7)Lactococcus, 9) Bacillus, 10)Kurthia, 11) Escherichia coli, 12)Ralstonia piketti, 13)Rhothia dentocariosa, 14)Streptomyces

بحث

بیماری های مزمن تنفسی در مصدومین شیمیایی به کرات مشاهده شده است. طبق مطالعات گلشن و هم کاران در سال ۲۰۰۲ عفونت‌های ریوی در برخی موارد در این افراد دیده شده است(۱۵). همچنین بررسی ۵۴۷۰۷۶ نظامی آمریکایی شرکت کننده در جنگ خلیج فارس در سال ۱۹۹۱، یکی از مهم‌ترین علل شایع بستری این جمعیت نظامی را بیماری-های عفونی گزارش نموده است(۱۶). از آثار گاز خردل تضعیف سلول های مغز استخوان و در نتیجه اختلال سیستم ایمنی بدن گزارش شده است که در نتیجه آن شخص در معرض عفونت‌های مختلف و به خصوص عفونت-های فرصت طلب قرار می‌گیرد(۱۷).

فلور نرمال دستگاه تنفسی، از رشد باکتری های بیماری‌زا جلوگیری می-کند. این در حالی است که در هنگام ضعف سیستم ایمنی، فلور نرمال نیز قادر به ایجاد عفونت در دستگاه تنفسی هستند(۱۸). با توجه به تضعیف سیستم ایمنی در چنین بیمارانی، عفونت دستگاه تنفسی در آن‌ها توسط فلور نرمال بوجود می‌آید که در تشدید علایم بیماری‌های مزمن ریوی در این بیماران موثر است. در مطالعه پناهی و هم کاران (۲۰۰۴) طیف

میکروبی مشابهی با این تحقیق گزارش شد. در مطالعه مربوط به عفونت های چشمی مصدومین شیمیایی نیز نتایج مشابهی به دست آمد(۱۹).
تایید نتیجه PCR-DGGE توسط روش کشت، قابل قبول بودن این تکنیک را در شناسایی میکروبی خلط نشان می‌دهد. این تکنیک قابلیت بررسی هم زمان تعداد زیادی از نمونه های بیمار را با سرعت بالا فراهم می‌کند. با توجه به تعداد بالای مصدومین شیمیایی با گاز خردل در کشور و ابتلای تعداد قابل توجهی از آنان به ضایعات و بیماری‌های مزمن ریوی(۲۰)، شناسایی عوامل میکروبی و حذف عفونت تنفسی در این بیماران در کاهش علائم بیماری‌های مزمن تنفسی و بهبود وضعیت سلامتی آنها کمک می‌کند. به علت ضعف روش های سنتی نظیر وقت گیر بودن و دقت پایین در شناسایی عوامل میکروبی، حضور تکنیک های مولکولی مکمل برای شناسایی دقیق میکروارگانیسم های موثر در ایجاد عفونت دستگاه تنفسی در مصدومین شیمیایی بسیار مفید می‌باشد. لذا بررسی کامل جمعیت میکروبی با استفاده از روش های مولکولی نظیر PCR-DGGE در کنار بررسی علایم بالینی می تواند کارآمد باشد که این موضوع نیازمند مطالعات بیش تری می‌باشد .

تقدیر و تشکر
نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری و مساعدت کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی دانشگاه الزهراء(س) و ایمونولوژی دانشگاه شاهد به خصوص خانم‌ها فلاحی ،یوسفی و آقای جمالی به خاطر کمک هایشان در انجام آزمایش های تشخیصی و ایجاد فضای مناسب کاری تشکر و قدردانی نمایند. تمامی آزمایش‌های انجام شده با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهراء(س) و در آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه انجام گرفت.

REFERENCES

1. Junqueira LC.The Respiratory system. In: Anthony LM, editor. basic histology, text and atlas.10th ed. New York. Amazon; 2009. p. 343-346.

2. Murray PR .Respiratory tract infections. In: Rosenthal KS,editor . Medical Microbiology.9th ed . Elsevier. Philadelphia; 2008.p. 267-272.

3. http://www.wikispote.info/2009/04/normalflora-of-respiratory-tract-nose-html

4. http://sunzi.lib.hku.hk/hkjo/view/20/2000057/pdf

5. http://www.geocities.com

6. Khateri.S,Ghanei.M,Keshavarz.S,Soroush.M,Hanie.D. Incidence of long,eye and skin lesions as late complications in 34000 iranian with wartime exposure to mustard agent. Journal of Occupational and Environmental Medicine 2003;45(11):1136-43.

7. Sohrabpour. H &et al, Evaluation of humoral immune factors in 179 gas exposed patients over the last three years of their injury compared with controls. Complete text of seminar papers on the effects of biological, chemical warfare, Tehran University, 1992: 40 - 70.[Persian]

8. Ghaneii. M, Aslani J, Panahi.Y,Aghaaii Meybodi. Seyed Mohsen, Hosseini.M, Effect of azithromycin and prednisone combination therapy on pulmonary complications of chemical victims, Military Medicine,2004; 10 (2) :81-88.[persian]

9. Marrs.T.C,Maynard.R.L, Sidell.F.R,Chemical warfare agents toxicology and treatment, Wiley Rub,1996: 221-229.

10. Ludlum. D. B, Aastin. P. Detection of sulfur mustard induced DNA modifications, Chemico-Biological Interactions, 1998. 91:39-49.

11. Iwaszk. l. Burns of the upper respiratory tract due to mustard gas. Otolaryngol pol. 1998. 20: 237-241.

12. Emad. A,Rezaian. G. R,The diversity of the sulfur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single, heary exposure: on analysis of 197 cases. Chest, 1998 .112: 734-738

13. Panahi.Y,Ghaneii. M., Aslani J., Mojtahedzade M., Sarhangnejad.R, Barkhordari.A, Evaluation of antibiotic resistance in patients with chronic pulmonary lesions induced by chemical agents (sulfur mustard) and non-chemical, military medicine. 2004; 6(3):181-186.[Persian]

14. Schafer**.** H and Muyzer**.**G. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in marine microbial ecology, Methods in microbiology.2001; 30: 425-430.

15. Golshan.M, Mohhamad-Zade-Z, Khanla-Pour.A,Iran-Pour.R, Prevalence of asthma and related symptoms in junior high school children in isfahan, Iran. *Monaldi* archives for *chest* disease. 2002; 57: 19-24.

16. Iraqi zadeh H, Karimi Zarchi .A, Farahani.M, Khodami Vyshth H. Chemical Injured Patients with risk factors for readmission due to exacerbation of chronic pulmonary disease, military medicine, 2007: 9 (3) :197-206.[perian]

17. http://www.bmsu.ac.ir/services/departmens/?objl=205&pageId=534

18. http://bacteriology.persianblog.ir/1382/12/2

19. Ghasemi. H et al, Conjunctival microbial florae in patients with seriously sulfur mustard induced eye injuries, Cutaneous and Ocular Toxicology, 2013; 32(1):13-17.

20. Khateri S, Ghanei M, Keshavarz S, Soroush M, Haines D .Incidence of lung, eye, and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. Journal of *Occupational* and *Environmental Medicine*. 2003. 45; 1136-43.