

بررسی حضور ژن بتالاکتامازی TEM از باکتری سودوموناس آئروژینوزا در

زخم های سوختگی و اثر ایمی پنم بر بیان این ژن با روش Real-time PCR

الهام سیاسی تربتی*^۱، یگانه عسایی^۲، جمیله نوروزی^۲

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سویه های سودوموناس آئروژینوزای، مقاوم نسبت به بیشتر آنتی بیوتیک های رایج، مشکلاتی در درمان این عفونت ها ایجاد می کنند. ایمی پنم، آنتی بیوتیک با پتانسیل بالا، برای از بین بردن سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، این باکتری می باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر ایمی پنم، در بیان ژن بتالاکتامازی TEM، در سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک، از نمونه های زخم سوختگی، با روش Real-time PCR بود.

روش ها: در مطالعه توصیفی، ۱۰۰ نمونه، از زخم های سوختگی، در بیمارستان های تهران، جمع آوری شد. ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا از نمونه ها شناسایی شد. پس از استخراج DNA، ژن TEM، با انجام واکنش PCR، از نمونه های دارای این باکتری، جداسازی شد و میزان MIC نسبت به ایمی پنم، برای آنها تعیین شد. سپس، بیان ژن بتالاکتامازی TEM، در سویه های سودوموناس آئروژینوزا تیمار شده و سویه های بدون تیمار با ایمی پنم، با روش Real-time PCR مقایسه شد.

نتایج: در ۱۰۰ نمونه زخم، ۶۰ ایزوله (۶۰٪) دارای عفونت با باکتری سودوموناس آئروژینوزا بودند و در ۳۴ نمونه (۵۶/۶٪) از سودوموناس آئروژینوزا های ایزوله شده، ژن بتالاکتاماز TEM حضور داشت. بیان ژن TEM، در سویه های سودوموناس آئروژینوزای تیمار شده با ایمی پنم در مقایسه با سویه های غیر تیمار شده، به میزان ۷۸/۶۸٪ کاهش داشت.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، می توان از ایمی پنم با فعالیت ضد بتالاکتامازی، که موثر بر کاهش بیان ژن TEM بود، در کنترل سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک، استفاده نمود.

مقدمه

از جمله، توانایی استقرار در زیستگاه های گوناگون محیطی و امکان استفاده از بسیاری از ترکیبات به عنوان منبع انرژی، می باشد. عفونت با سودوموناس می تواند در هر بخشی از بدن رخ دهد و این عفونت در سوختگی ها یا تروما، در بخش هایی از گوش میانی، قرنیه، دستگاه ادراری و دستگاه تنفسی شایع تر است (۱، ۲). همچنین این عفونت می تواند سبب اندوکاردیت، اسهال و استفراغ، آمپیم و حتی سپتی سمی، شود. سودوموناس

باکتری سودوموناس، از باکتری های گرم منفی میله ای شکل یا کمی خمیده هستند. این باکتری ها به وسیله یک یا چند تاژک قطبی متحرک بوده و هوای اجباری هستند، گرچه در حضور نیترات می توانند رشد بی هوای داشته باشند. در این باکتری مصرف قندها بصورت اکسیداسیون انجام می گیرد و از باکتری هایی است که بصورت فرصت طلب بیماری زا می باشد (۱). انتشار گسترده باکتری در محیط، به دلیل عوامل گوناگون

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی

آدرس پست الکترونیک: emi_biotech2006@yahoo.com

همانند سایر بتالاکتام‌ها اثر ضد باکتری خود را از طریق اتصال به پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین (PBPs= Penicillin-binding proteins) اعمال کرده و سنتز دیواره سلولی باکتری را مختل می‌کنند. ایمی پنم در مقابل هیدرولیز توسط اکثر آنزیم‌های بتالاکتاماز بسیار مقاوم است (۹، ۱۰).

در سال‌های اخیر مطالعات متعدد، در خصوص حضور ژن‌های TEM در باکتری سودوموناس آئروژینوزا، با الگوی مقاومت به داروهای بتالاکتامی و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (Minimum Inhibition Concentration) برای این دسته از آنتی بیوتیک‌ها، به خصوص ایمی پنم که در مقایسه با سایر داروها، حساسیت بیشتری نسبت به آن وجود دارد، انجام گرفته است (۱۱-۲۱).

با توجه به اهمیت موضوع این مطالعه با هدف بررسی اثر ایمی پنم، در بیان ژن بتالاکتامازی TEM، در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم جدا شده از منابع سوختگی، با روش Real-time PCR انجام شد.

روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی بود. در این مطالعه ۱۰۰ نمونه از زخم بیماران سوختگی در مراکز سوانح و سوختگی شهر تهران و با کسب رضایتنامه و در نظر گرفتن اصول اخلاقی معاهده هلسینکی - توکیو جمع آوری شد. همچنین این پروژه با کد ۱۵۷۳۰۵۴۴۸۹۶۲۰۳۱ مورد تصویب کمیته نظارت بر کارهای اخلاقی و آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی قرار گرفته است. نمونه‌های گرفته شده از بیماران بر روی محیط مک کانکی آگار و محیط نوترینت آگار به آزمایشگاه میکروپ شناسی انتقال و در آنجا سویه‌ها پس از خالص سازی و تست های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی شناسایی شدند.

شناسایی بیوشیمیایی سودوموناس آئروژینوزا: شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر اساس تست های افتراقی استاندارد آزمایشگاه های میکروبیولوژی شامل: رنگ آمیزی گرم، بررسی تست تخمیر لاکتوز و توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، همچنین ویژگی فلوروسانس زیر نور

آئروژینوزا از عوامل شایع عفونت بیمارستانی و مقاوم به بسیاری از داروهای آنتی بیوتیکی است و عامل عمده در بروز مرگ و میر در بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می‌شود. مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم تر شدن وضعیت درمان عفونت‌ها با آن باکتری می‌گردد (۱-۳).

یکی از مکانیسم‌های شایع که در ایجاد مقاومت این باکتری نقش دارد، تولید آنزیم بتالاکتاماز است که عامل مقاومت در برابر بتالاکتام‌ها می باشد (۳، ۴). بتالاکتام‌های TEM، که به زیرگروه‌های 2b، 2be، 2br و 2ber تقسیم شده اند و به تعداد ۱۷۲ نوع می‌باشند، امروزه معمول ترین مکانیسم مقاومت باسیل‌های گرم منفی در برابر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام را به خود اختصاص می‌دهند. آن‌ها مسئول ایجاد تغییرات فنوتیپی (Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)) در جایگاه فعال آنزیمی هستند که امکان دسترسی به اکسی ایمینوها را فراهم می‌کنند (۵، ۶). ریشه‌های جایگاه فعال به سوبسترای بتالاکتام، حساسیت به آنزیم‌های مهارکننده بتالاکتامازی، هم چون اسید کلولانیک را افزایش می‌دهد. سودوموناس آئروژینوزا در برابر آنتی بیوتیک‌ها و بسیاری از عوامل ضد باکتریایی مقاومت پیدا کرده‌اند. این مقاومت قابل توارث بوده و باعث ادامه بیماری‌های عفونی می‌شود و یکی از بزرگترین چالش‌های سلامتی در سراسر جهان محسوب می‌شود که سبب ایجاد ارایه راهکارهای مناسب در جهت درمان با این باکتری شده است (۷، ۸).

یکی از خانواده آنتی بیوتیک های بتالاکتامی، کارباپنم‌ها هستند که در ساختار شیمیایی آن‌ها همانند پنی‌سیلین، یک حلقه بتالاکتام چهار ضلعی و یک حلقه پنج ضلعی وجود دارد. کارباپنم‌ها طیف فعالیت گسترده علیه میکروارگانیزم‌های هوازی و بی‌هوازی دارند. آنتی بیوتیک ایمی پنم یکی از کارباپنم های موثر در درمان عفونت باکتری های مقاوم به دارو می باشد. اهمیت ویژه ایمی پنم در اثربخشی آن بر سودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های انتروکوکوس است. این آنتی بیوتیک ها

کنترل مثبت (محیط و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی تست (محیط + ایمی پنم) استفاده شد. سپس میکروپلیت ها در انکوباتور شیکر دار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت) نگهداری شدند.

بررسی حضور ژن TEM و مقایسه تغییرات بیان آن پس از

تیمار با ایمی پنم

استخراج DNA ژنومی از باکتری‌ها و واکنش PCR به

منظور جداسازی ژن TEM: استخراج ژنوم باکتری‌های

سودوموناس آئروژینوزای شناسایی شده توسط کیت شرکت

پیشگامان انتقال ژن و با روش استاندارد انجام گرفت (۲۴).

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش

اسپکتروفتومتری و الکتروفورز DNA روی ژل آگارز مورد

بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌های DNA در فریزر در دمای

۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. انجام واکنش PCR برای

بررسی حضور ژن TEM انجام شد. پرایمرها و مواد مورد

استفاده برای این واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، به

ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. در این پروژه پرایمرها

برای شناسایی ژن TEM توسط نرم افزار Oligo طراحی گردید

و طراحی به گونه‌ای صورت گرفت که پرایمرها مناسب آزمون

Real-time PCR نیز باشد. برنامه دستگاه PCR که در تعداد ۳۵

چرخه تکرار شد به قرار زیر بود:

- دناتوراسیون اولیه ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد

- دناتوراسیون ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد

- اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد

- طول‌سازی ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد

- طول‌سازی نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد

پس از انجام واکنش PCR برای مشاهده حضور ژن TEM، در

نمونه‌ها، محصولات واکنش PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

الکتروفورز شده و سپس رنگ آمیزی و عکسبرداری با دستگاه

ژل داگ انجام شد. در شکل ۱ باندهای حاصل از حضور ژن

TEM، در نمونه‌های باکتری سودوموناس آئروژینوزا نشان

فرابنفش و در مرحله بعد استفاده از کشت‌های انتخابی و تست‌های بیوشیمیایی (شامل تست‌های اکسیداز و کاتالاز، SIM، وژسپرسکوئر، سیمون سیترات، اوره و محیط سیتريمید اگر) انجام شد (محیط‌های کشت تهیه شده از شرکت مرک، کشور آلمان بودند) (۲۲).

تعیین MIC برای ایمی پنم: تعیین MIC ایمی پنم به روش برات

دایلوژن انجام شد. به این ترتیب که سویه‌های باکتریایی

سودوموناس آئروژینوزای جداسازی شده روی محیط کشت

آگار خون‌دار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرم

خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از طی

مدت نگهداری، از نمونه باکتریایی برای تهیه سوسپانسیون

باکتریایی استفاده شد. برای این منظور ابتدا سلول‌های

باکتریایی از سطح محیط کشت آگار خونی به کمک لوپ استریل

جمع‌آوری و در یک میلی‌لیتر بافر سالین فسفات استریل

مخلوط گردید و نمونه‌های با کدورت نیم مک فارلند ($10^6 \times 1/5$ -

۱ عدد باکتری در هر میلی‌لیتر (Colony-Forming Unit) CFU

تهیه شد. برای اطمینان از ایجاد کدورت مذکور، جذب آن به

وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش در محدوده طول موج

۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان جذب در محدوده $0/1 - 0/08$

تنظیم شد. با استفاده از روش استاندارد کمیته ملی

استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی، (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI))، حداقل غلظت ممانعت‌کننده

رشد برای هر یک از باکتری‌ها در مجاورت با ایمی پنم بدست

آورده شد (۲۳). در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۱۲

ردیف که هر کدام حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتون سوی

برات (Tryptone Soy Broth) استریل بود، استفاده گردید. سپس

۱۰۰ میکرولیتر از ایمی پنم با رقت بالا $30 \mu\text{g/ml}$ به ردیف اول

حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتون سوی برات اضافه شد و

رقیق‌سازی تا رقت $0/08 \mu\text{g/ml}$ انجام شد. سپس ۱۰۰

میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به

همه چاهک‌ها اضافه شد. همچنین از دو ردیف چاهک بعنوان

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

توالی 5' - 3'	پرایمر برای واکنش PCR
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	TEM-F
TGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC	TEM-R
توالی 5' - 3'	پرایمر برای واکنش Real Time PCR
ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	TEM-F
TGGATGGAGGCGGATAAAGTTGC	TEM-R
AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16s rRNA -F
AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	16s rRNA -R

*پرایمرها در این پژوهش به گونه ای طراحی شده اند که در هر دو واکنش PCR و Real Time PCR کاربرد داشته باشند.

جدول ۲. مقادیر مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR و Real Time PCR

مقدار (برحسب میکرولیتر)	مواد واکنش PCR
۴	آب مقطر
۱	پرایمر چپ (10 pmol/μl)
۱	پرایمر راست (10 pmol/μl)
۴	نمونه DNA (120ng)
۱۰	(2X) Master mix Amplicon
۲۰	حجم نهایی
مقدار (بر حسب میکرولیتر)	مقادیر مواد موجود در Master mix برای واکنش PCR
۰/۵	Taq پلیمرز (50 U)
۱	dNTP (10 mm)
۷/۵	بافر (10X)
مقدار (بر حسب میکرولیتر)	MgCl ₂ (50 mm)
مقدار بر حسب میکرولیتر	مواد واکنش Real Time PCR
۱۰	Master mix SYBER Green 2X
۱/۵	cDNA
۱	پرایمر چپ
۱	پرایمر راست
۶/۵	آب فاقد نوکلئاز
۲۰	حجم نهایی

نسخه‌های ژنی مهم نیست و فقط کاهش و یا افزایش بیان ژن مهم بود که این کاهش و افزایش با یک استاندارد مقایسه شد و واکنش دارای کنترل مثبت و کنترل منفی بود.

آنالیز آماری: نتایج و داده‌های حاصل، با نرم افزارهای SPSS از نظر آماری مورد بررسی قرار گرفت و برای محاسبه اختلاف بین بیان ژن نمونه و مرجع از روش محاسبه $\Delta\Delta Ct$ و بدست آوردن تفاوت Ct (cycle threshold) و همچنین محاسبه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد (روش محاسبات و اعداد بدست آمده در قسمت نتایج ذکر شده است).

نتایج

نتایج نمونه ها: نمونه گیری زخم سوختگی از ۵۷ مرد و ۴۳ زن بین سنین ۵-۵۵ سال و میانگین سنی $(30 \pm 0/5)$ سال صورت گرفت (در شکل ۱ نشان داده شده است).

نتایج شناسایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا: نتایج حاصل از کشت این نمونه ها نشان داد، ۶۰ درصد کل نمونه‌ها (۶۰ نمونه از بین ۱۰۰ نمونه) باکتری سودوموناس آئروژینوزا بودند. این نتایج با رنگ آمیزی گرم و ویژگی های بیوشیمیایی، حضور باکتری سودوموناس آئروژینوزا را تایید نمودند. به این ترتیب که در رنگ آمیزی گرم با سیل گرم منفی مشاهده شد و نتایج تست های بیوشیمیایی مطابق جدول ۳ مشاهده شد.

نتایج MIC: میزان MIC برای ایمی پنم در سویه های سودوموناس آئروژینوزای جداسازی شده برابر با $7/5 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد.

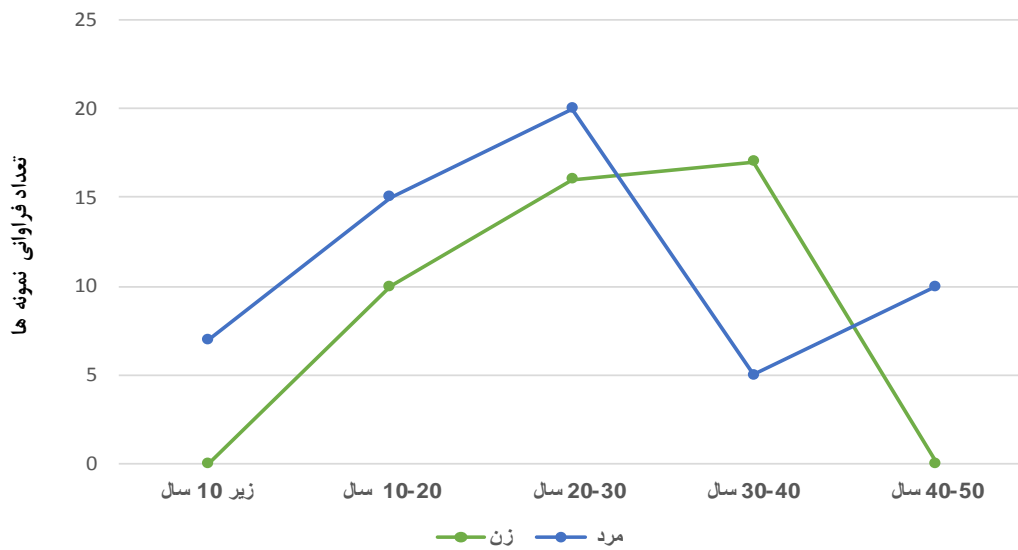
نتایج الکتروفورز محصولات واکنش PCR و فراوانی حضور ژن TEM: پس از انجام PCR به منظور جداسازی ژن بتالاکتامازی TEM، وجود یا عدم وجود ژن TEM در DNA های استخراج شده با الکتروفورز محصولات PCR بررسی شد (شکل ۲). نتایج نشان داد از تعداد ۶۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزای شناسایی شده، از بین ۱۰۰ نمونه زخم سوختگی، ۳۴ نمونه (۵۶/۶٪) واجد ژن TEM بودند.

داده شده است. در این مطالعه از، *Klebsiella pneumoniae* (که از انستیتو پاستور گرفته شد) به عنوان کنترل مثبت و از نمونه فاقد DNA (با جایگزینی آب مقطر) به عنوان کنترل منفی و مارکر مولکولی با سایز ۵۰ bp استفاده شد.

استخراج RNA و واکنش Real-time PCR: در این مرحله از سودوموناس آئروژینوزا های بیمار شده با ایمی پنم بر طبق روش ذکر شده در تعیین MIC و سودوموناس های بیمار نشده، استخراج RNA انجام گرفت. برای استخراج RNA از کیت استخراج RNA (Bio Basic)، آب تیمار شده با DEPC (Bio Basic) و تیوب ها و سرسمپلرهای DNase and RNase Free استفاده شد. همچنین برای حذف DNA ژنومی و عدم آلودگی RNA استخراج شده با آن، از انزیم DNase استفاده شد (زیرا آلودگی RNA استخراج شده با DNA ژنومی سبب خطا در واکنش Real Time PCR و نتایج میزان بیان ژن می گردد). سپس برای اطمینان از درستی RNA استخراج شده از الکتروفورز روی ژل آگارز و ارزیابی با دستگاه فلورومتر مدل E6150 استفاده شد. اساس کار این دستگاه کدورت سنجی است و در آن از رنگ های فلورسنس استفاده شد. برای انجام واکنش Real-time PCR ابتدا سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل استاندارد کیت Vivantis انجام شد. سپس با استفاده از این cDNA سنتز شده و پرایمرها و سایر مواد مورد نیاز که در جداول ۱ و ۲ آورده شده است واکنش Real-time PCR برای مقایسه میزان بیان ژن TEM در نمونه های سودوموناس های بیمار شده با ایمی پنم و سودوموناس های بیمار نشده، انجام شد (۲۵). ژن مرجع این واکنش *16S rRNA* بود و برنامه دستگاه Bio Rad Real Time PCR دارای ۲۵ چرخه تکرار و شامل مراحل زیر بود:

- دناتوراسیون ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد
- اتصال ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد
- طولی سازی ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد

از روش Real-time PCR که یکی از دقیق ترین روش ها برای بررسی تغییرات بیان ژن است، استفاده شد. در این روش تعداد



شکل ۱. نمودار تفکیک نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش بر اساس سن و جنس

ایمی پنم کاهش بیان داشته اند (به میزان ۷۸/۶۸ درصد) که نشان‌دهنده نقش مثبت ایمی پنم، در کاهش بیان ژن TEM، در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا، بوده است (شکل ۳- B).
نتایج آنالیز واکنش Real time PCR نسبت ژن مورد نظر به ژن مرجع (*16s rRNA*) از طریق فرمول‌های زیر محاسبه گردید و اساس آن بر پایه Efficiency و اختلاف در Ct (cycle threshold) بود. با روش محاسبه $\Delta\Delta Ct$ ، تفاوت Ct (cycle threshold) هر دو ژن بعد از تیمار با ایمی پنم، محاسبه شد و از همین مقدار قبل از تیمار با ایمی پنم، کاسته شد.

$$\Delta Ct = \text{target} - \text{reference}$$

$$\Delta Ct_{\text{target}} = (TEM\text{-treat}) - (16s\ rRNA\ \text{-treat})$$

$$\Delta Ct_{\text{target}} = (31/98) - (17/75) = 14/23$$

$$\Delta Ct_{\text{reference}} = (TEM\text{-Non treat}) - (16s\ rRNA\ \text{-Non treat})$$

$$\Delta Ct_{\text{reference}} = (29/98) - (17/98) = 12/00$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\text{reference}}$$

$$\Delta\Delta Ct = 14/23 - 12/00 = 2/23$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ Variant} = 2^{-2/23} = 0/213$$

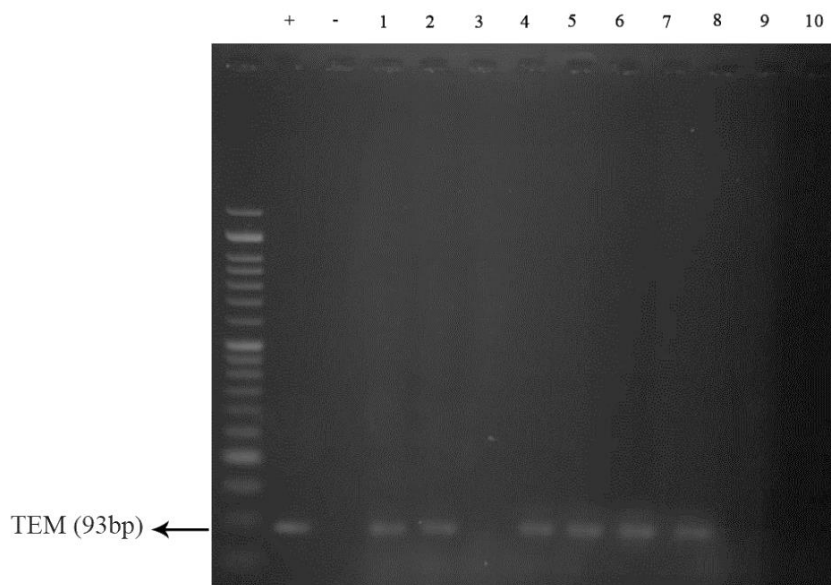
$$\text{Knockdown} = 78/68\%$$

نتایج نشان داد بیان ژن TEM در سلول‌های تیمار شده با ایمی پنم در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، به میزان ۷۸/۶۸

جدول ۳. ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا

نتیجه واکنش	تست بیوشیمیایی
+/-	VP/MR
k/k	TSI
+	سیمون سیترات
+	کاتالاز
+	اکسیداز
- - +	SIM
کلنی سبز - آبی	سیتریمید اگار
+	اوره
-	لاکتوز

نتایج بیان ژن TEM با روش Real time PCR در ایزوله سودوموناس آئروژینوزای تیمار شده با ایمی پنم: نتایج واکنش Real time PCR نشان داد که بهترین دمای منحنی ذوب (Melting curve) برای ژن TEM، ۸۶/۹۴ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۳- A). همچنین مشخص شد که ژن TEM در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای تیمار شده با ایمی پنم نسبت به ایزوله‌های ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای تیمار نشده با



شکل ۲. باندهای حضور ژن TEM در نمونه های سودوموناس آئروژینوزا

خانه M: مارکر با سایز مولکولی (۵۰ bp)، خانه دوم +: کنترل مثبت نمونه *Klebsiella pneumoniae* 1770 دارای ژن TEM، خانه سوم -: کنترل منفی: آب مقطر، خانه های ۱ و ۲ و ۴ و ۵ و ۶ و ۷: نمونه های سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن TEM (۹۳ bp) و خانه های ۳ و ۹ و ۱۰: نمونه های سودوموناس آئروژینوزا فاقد ژن TEM).

پس از آن که آنتی بیوتیک ایمی پنم بر ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای اثر داده شد بیان این ژن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که ژن TEM در سلول های تیمار شده با ایمی پنم در مقایسه با سویه های تیمار نشده به میزان ۷۸/۶۸٪ کاهش بیان داشت. در نتیجه استفاده از ایمی پنم را می توان در جهت مهار بیان این ژن توصیه نمود. برای آگاهی بیشتر در این زمینه، می توان به مقایسه ایی که با نتایج تحقیقات گذشته در این خصوص انجام گرفته است، پرداخت.

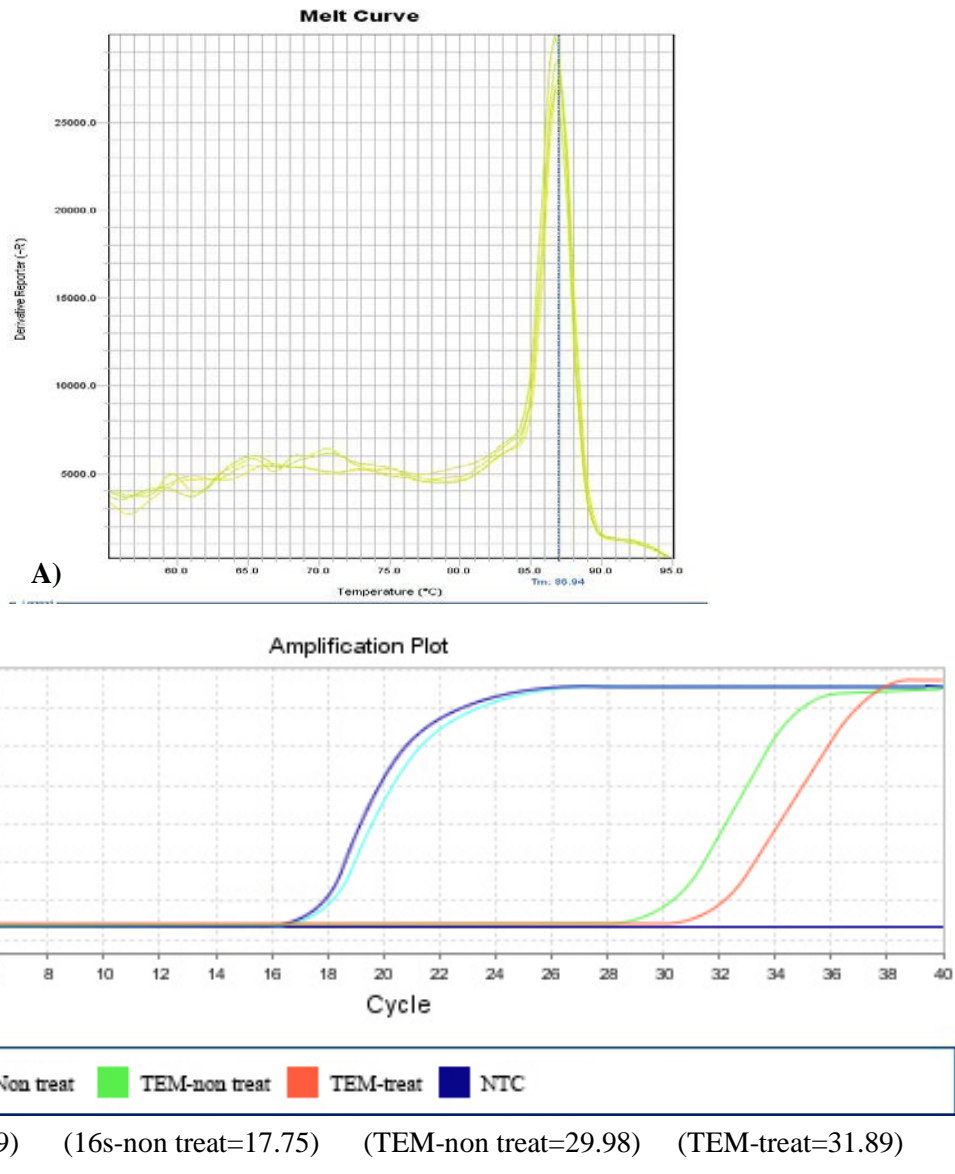
شجاع پور و همکارانش، در سال ۲۰۰۸، با روش PCR، مطالعه ایی را برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور ژن بتالاکتاماز TEM در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت های سوختگی، انجام داده اند (۱۱). همچنین شاهچراغی و همکارانش، در سال ۲۰۰۹، به بررسی مولکولی ژن های بتالاکتامازی در ۱۰۰ سویه باکتری سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه های زخم در دو بیمارستان تهران پرداختند. آنان حساسیت آنتی بیوتیکی و MIC

درصد کاهش داشته است و استفاده از ایمی پنم در جهت مهار بیان ژن TEM، می تواند موثر باشد (شکل ۵).

بحث

سودوموناس آئروژینوزا از عوامل شایع عفونت بیمارستانی و مقاوم به بسیاری از آنتی بیوتیک هاست (۱). یکی از مکانیسم های شایع که در ایجاد مقاومت این باکتری به بتالاکتام نقش دارد تولید آنزیم بتالاکتاماز است که عامل مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتامی می باشد. سودوموناس آئروژینوزا، باکتری بیماری زای فرصت طلب است که عاملی عمده در بروز مرگ و میر در بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می شود و مقاومت ذاتی به مواد ضد میکروبی در این باکتری سبب وخیم تر شدن وضعیت درمان عفونت های آن می گردد (۱، ۲، ۵).

در پژوهش حاضر ژن TEM که یک ژن بتالاکتامازی است در سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از عفونت های سوختگی با فراوانی حضور ۵۶/۶٪ مشخص شد و میزان MIC نسبت به ایمی پنم برابر با ۷/۵ μg/ml به دست آمد.



شکل ۳. نتایج Real time PCR برای ژن TEM در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

(A) منحنی ذوب بدست آمده از تکثیر ژن TEM در ایزوله سودوموناس آئروژینوزا و (B) نتایج مقایسه میزان برای ژن TEM در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای تیمار شده با ایمی پنم و تیمار نشده).

مؤثرترین دارو برای درمان سودوموناس آئروژینوزا است (۱۴). باقری و همکارانش در سال ۲۰۱۷، در مطالعه‌ای ۶۰۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا از بیماران جمع‌آوری کردند. بررسی اولیه مقاومت باکتریایی با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف مختلف، انجام گردید. سپس با انجام تست MIC، بالاترین حساسیت باکتری را به ایمی پنم، گزارش نمودند و در سویه‌هایی که مقاوم به ایمی پنم بودند MIC را برابر با ۴ μg/ml بدست آوردند (۱۵). بهرامی و همکارانش در سال

را نیز مورد بررسی قرار داده اند (۱۲). فولادی و همکارانش، در سال ۲۰۱۰، به بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی بتالاکتامازها در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی به خصوص ژن TEM، پرداختند (۱۳). رجب‌پور و همکارانش، نیز در سال ۲۰۱۳، طی مطالعه‌ای ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا را جدا کردند و پس از انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی میزان MIC را برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج، بدست آوردند و گزارش نمودند که ایمی پنم،

دارای ژن بتالاکتاماز *TEM*، بودند و میزان MIC برای سویه های شناسایی شده برابر با $7/5 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد. بنابراین چنین نتیجه می شود که نتایج این مطالعه، در راستای تحقیقات دانشمندان گذشته بوده و تشابهاتی در جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و میزان حضور ژن *TEM* و همچنین میزان MIC محاسبه شده نسبت به ایمی پنم، بین این مطالعات وجود دارد.

در خصوص بخش دیگر پژوهش که مقایسه تغییر بیان ژن *TEM* در سویه های سودوموناس آئروژینوزا تیمار شده و تیمار نشده با ایمی پنم بود، نیز پیشینه تحقیقاتی مشابه ولی با سایر ترکیبات ضد میکروبی، توسط سایر دانشمندان وجود دارد از جمله، رودبارکی و همکاران در سال ۲۰۱۷، تغییر بیان ژن *mexB* را با روش Real Time PCR در جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسیلین، تحت تیمار با سیلیبیین انکپسوله در نانو ذرات، بررسی نمودند. نتایج آن ها نشان داد در سلول های تحت تیمار با سیلیبیین انکپسوله در نانو ذرات و سیپروفلوکساسیلین، بیان ژن *mexB* در مقایسه با سلول های تحت تیمار با سیپروفلوکساسیلین، به تنهایی کاهش می یابد (۲۶). همچنین عظیمی و همکاران در سال ۲۰۱۵، مطالعه ایی بر روی بیان ژن *oprD* در سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به کاربامپنم ها، از نمونه های عفونت سوختگی انجام دادند. تحقیق آنان مشخص نمود بیان ژن *oprD* در سویه های مقاوم به کابامپنم ها، نسبت به سویه حساس استاندارد بطور معنی داری کاهش می یابد (۲۷). محمدی پور و همکاران نیز در سال، ۲۰۱۷ با روش Real Time PCR نشان دادند بیان ژن *oprM* در سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسیلین تحت تیمار با سیلیبیین انکپسوله در نانو ذرات، در مقایسه با سلول های بدون تیمار، کاهش معنی دار داشته است (۲۸). پیر سرابی و همکاران در سال ۲۰۱۸، با تحقیقی که برای بررسی اثر نانو ذرات میسلی حاوی کورکومین بر جدایه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به سیپروفلوکساسیلین و بیان ژن های *mexC* و *mexD* انجام دادند،

۲۰۱۸، در تحقیقی حضور ژن های بتالاکتامازی در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا در بندرعباس، را گزارش نمودند (۱۶). شمس و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ مطالعه ای در خصوص جداسازی ژن *TEM* در نمونه های کلینیکی مقاوم به آنتی بیوتیک از سویه های سودوموناس آئروژینوزا، با روش مولکولی PCR انجام دادند. آنان حضور ژن *TEM* را در سودوموناس آئروژینوزای ایزوله شده که مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک ها داشتند، مثبت گزارش نمودند (۱۷).

در تحقیق Zafer و همکارانش در سال ۲۰۱۴، که بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی ژن های کد کننده بتالاکتامازی در سویه های سودوموناس آئروژینوزا صورت گرفت، مشخص شد که سویه هایی مقاوم نسبت به ایمی پنم از نظر حضور بسیاری از ژن های بتالاکتامازی دیگر، نیز مثبت می باشند (۱۸). همچنین طبسی و همکاران در سال ۲۰۱۷، گزارش نمودند که اکثر سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان، مقاوم به ایمی پنم بوده و میزان MIC در اکثر این سویه ها، $4 \mu\text{g/ml}$ بود (۱۹). Laudy و همکاران در سال ۲۰۱۷، فراوانی ژن های بتالاکتامازی را در سویه های مقاوم سودوموناس آئروژینوزا با روش های متفاوت فنوتیپی و ژنوتیپی، ارزیابی نمودند. نتایج آن ها مقاومت سویه ها را نسبت به ایمی پنم و حضور ژن بتالاکتامازی *TEM* را در نمونه ها، گزارش نمود (۲۰). Ghaima و همکاران در سال ۲۰۱۸، مطالعه مولکولی برای جداسازی ژن های بتالاکتامازی از سویه های سودوموناس آئروژینوزای نمونه های سوختگی انجام دادند. تحقیق آن ها مشخص نمود با مثبت بودن حضور ژن *TEM* در برخی ایزوله ها میزان مقاومت همزمان به چندین آنتی بیوتیک در آن سویه ها و مشکل شدن درمان در آن نمونه ها، افزایش می یابد (۲۱).

از مقایسه نتایج تحقیقات ذکر شده با مطالعه حاضر مشخص می گردد که در این پژوهش نیز از ۱۰۰ نمونه زخم سوختگی، ۶۰ ایزوله دارای عفونت با باکتری سودوموناس آئروژینوزا بودند و ۳۴ نمونه از ایزوله های سودوموناس آئروژینوزاها

لذا شناخت ژن‌های ایجاد کننده مقاومت و مکانیسم ایجاد مقاومت، در این باکتری حائز اهمیت است. ژن‌های مقاومت در این باکتری می‌تواند کروموزومی، پلاسمیدی و یا ترانسپوزونی باشند و با تغییر ژنومی، در آن باکتری می‌توانند منجر به مقاومت دارویی شوند. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، ژن TEM، که ژن بتالاکتامازی مهمی با میزان فراوانی بالا، در سویه‌های مقاوم به دارو، در این باکتری است، در اثر تیمار باکتری با آنتی بیوتیک ایمی پنم، کاهش بیان، می‌یابد. بنابراین می‌توان برای مهار بیان ژن TEM و کاهش میزان مقاومت دارویی، در جهت کنترل و پیشگیری از عفونت‌های حاصل از این باکتری، استفاده از ایمی پنم را، توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولان و بیماران بیمارستان که در جمع‌آوری نمونه‌های تحقیق همکاری نمودند و مسئولین محترم دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و آزمایشگاه پاسارگارد که در انجام کارهای تحقیقاتی و آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری و تشکر می‌گردد.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه یا جمع‌آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: یگانه عسایی، الهام سیاسی، جمیله نوری.

(۲) تهیه پیش نویس مقاله: الهام سیاسی

(۳) تایید دست نوشته پیش از ارسال به مجله: جمیله نوری

گزارش نمودند در اثر تیمار با کورکومین انکپسوله در نانو ذرات میسلی و سیپرو فلوکساسیلین، بیان ژن های *mexC* و *mexD* در مقایسه با سلول های بدون تیمار، بطور معنی داری کاهش می یابد (۲۹). همچنین در مطالعه Bagge و همکاران در سال ۲۰۰۴ که برای بررسی اثر مهار کنندگی ایمی پنم بر بیان ژن های بتالاکتامازی و ژن های تشکیل دهنده بیوفیلیم انجام شده بود، مشخص گردید که بیان بسیاری از این ژن ها در مجاورت با ایمی پنم، مهار شده یا بطور معنی داری کاهش یافته است (۳۰).

بنابراین با مقایسه نتایج تحقیقات ذکر شده فوق، با نتایج تحقیق حاضر مشخص می شود که در این پژوهش بیان ژن TEM که در سلول های تیمار شده با ایمی پنم، در مقایسه با سلول های تیمار نشده، به میزان معنی دار کاهش یافته است و در راستای کاهش بیان ژن های مقاوم، در سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به کاربایپنم ها تیمار شده با داروهای متفاوت، این کاهش بیان ایجاد شده و همچون نتایج آن تحقیقات سبب کاهش بیان ژن بتالاکتامازی در این باکتری شده است. همچنین، می توان استفاده از ایمی پنم را در جهت مهار بیان ژن TEM، در سویه های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به بتالاکتامازها، با توجه به نتایج تحقیق حاضر، پیشنهاد نمود.

در پایان ذکر این نکته قابل اهمیت است که تفاوت هایی هم در مقایسه نتایج این تحقیق، با مطالعات گذشته وجود دارد و می تواند در اثر تفاوت سویه های باکتری های مورد استفاده و یا انواع آنتی بیوتیک های بررسی شده، باشد و یا بدلیل تفاوت در موادی که برای کاهش بیان ژن های بتالاکتامازی مورد استفاده قرار گرفته اند، باشد. تفاوت جغرافیایی و نژادی جمعیت ها و تعداد نمونه ها و همچنین بازه زمانی در پژوهش های انجام شده، نیز می تواند دلایلی بر تفاوت یافته های مطالعات باشد.

نتیجه گیری

سودوموناس آئروژینوزا، پاتوژنی فرصت طلب، با تعداد وسیعی از شاخص های بیماری زا است و دارای ظرفیت ژنتیکی بالایی، در ایجاد مقاومت به بسیاری از آنتی بیوتیک ها، می باشد.

References

- Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7(39): 1-29.
- Klockgether J, Tümmler B. Recent advances in understanding Pseudomonas aeruginosa as a pathogen. *F1000Res.* 2017; 6(1261): 1-10.
- Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K. Antibiotic Resistance of Pseudomonas aeruginosa in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. *PLOS ONE.* 2015; 10(10): 1-20.
- Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. *DIC.* 2018; 7(212527): 1-18.
- Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa. *Drug Discov Today.* 2019; 24(1): 350-359.
- Shaikh S, Fatima J, Shakil Sh, Danish Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 2015; 22(1): 90-101.
- Liapis E, Bour M, Triponney P, Jové T, Zahar JR, Valot B, Jeannot K, Plésiat P.. Identification of Diverse Integron and Plasmid Structures Carrying a Novel Carbapenemase Among Pseudomonas Species. *Front Microbiol.* 2019; 10(404): 1-12.
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019; 37(1): 177-192.
- Shaaban MI, Shaker MA, Mady FM. Imipenem/cilastatin encapsulated polymeric nanoparticles for destroying carbapenem-resistant bacterial isolates. *J Nanobiotechnol.* 2017; 15(29): 1-12.
- Kabbara WK, Nawas GT, Ramadan WH. Evaluation of the appropriateness of imipenem/cilastatin prescription and dosing in a tertiary care hospital', *Infect Drug resist.* 2015; 8(78633): 31-38.
- Shojapour M., Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. 2011. Prevalence Of Tem-1 Type Beta-Lactmase Genes In Pseudomonas Aeruginosa Strains Isolated From Burn Infections Using Duplex Pcr In Shahrekord, 2008. *J Arak Uni Med Sci.* 2011; 14(1): 55-61. [Persian]
- Shahcheraghi F, Nikbin VS, shorej F. PCR detection of PER , VEB , SHV and TEM β -lactamases in multidrug resistant P. aeruginosa isolated from wound infections in two hospitals of Tehran. *Iran J Med Microbiol.* 2008, 1(4): 21-27.
- Imani Fooladi AA., Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods. *J Ardabil Uni Med Sci.* 2010; 3(37): 189-98. [Persian]
- Rajabpour M, Arabestani MR, Yousefi mashof R, Alikhani MY. MIC determination of Pseudomonas aeruginosa strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). *Iran J Med Microbiol.* 2013; 7(3): 18-25.
- Bageri O, Olad GR, Shahcheraghi F, Sorori zanjani R. Isolation and identification of strains of Imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated in clinical samples from 4 major hospitals of tehran, using MIC method. *J Ilam Uni Med Sci.* 2017; 24(6): 159-168. [Persian]
- Bahrami, Mmohammadi-Sichani M, Karbasizadeh V. Prevalence of SHV, TEM, CTX-M and OXA-48 β -Lactamase Genes in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa in Bandar-Abbas, Iran. *Avicenna J Clin Microbiol Infect.* 2018; 5(4): 86-90.

17. Shams E, Nateghi B, Eshaghiyan A, Behshood P. TEM Gene Detection in Clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Samples. *Res Mol Med (RMM)*. 2019; 7(1): 43–51.
18. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, El-Din Ashour MS. Antimicrobial Resistance Pattern and Their Beta-Lactamase Encoding Genes among *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cancer Patients. *Bio Med Res Int*. 2014; 2014(101635): 1-9.
19. Tabasi M, Azizian R, Eskandarion MR, Habibi M, Asadi Karam MR. Detection of Metallo- β -Lactamases (MBLs) Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Tehran Hospitals, Iran. *J Med Microbiol Infect Dis*. 2017; 5 (3-4): 47-50.
20. Laudy AE, Rog P, Smolińska-Kro K, Cmiel M, Stoczyńska A, Patzer J, Danuta Dzierżanowska D, Wolinowska R, Starościak B, Tyski S. Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. *PLOS ONE*. 2017; 12(6): 1-15.
21. Ghaima KK, Abdulhassan AA, Mahdi ZH. Molecular study of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns. *Biochem Cell Arch*. 2018; 18(1): 721-727.
22. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9 th. London: Springer. 2009; pp: 123-191.
23. Turbett SE, Pierce VM. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 29 th. Pennsylvania: Wayne. 2019; pp: 175-189.
24. Phillips K, McCallum N, Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the Qiagen DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Sci Int*. 2012; 6(2): 282-285.
25. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill F3, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(1): 165-256.
26. Roudbaraki Z, Ranji N, Soltani Tehrani B. Deregulation of Mexb Gene in Ciprofloxacin Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* Treated with Silibinin-Encapsulated in Nanoparticles. *J Babol Univ Med Sci*. 2017; 19(11): 42-49. [Persian]
27. Azimi A, Naserpour T, Bazmi F, Peymani A, Aslanimehr M, Saadat S. Evaluation of oprD Gene Expression in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Severe Burn Patients with Secondary Infection. *Biotech Health Sci*. 2015; 2(3): e30748.
28. Mohammadipour A, Ranji N, Asadpour L. The Effect of Silybin Encapsulated in Nanoparticles on oprM Gene Expression in Drug Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Arak Med Uni J (AMUJ)*. 2017; 20(122): 79-88. [Persian]
29. Imani Pirsaraei B, Ranji N, Asadpour L. Investigation the Effect of Micelle Nanoparticles Containing Curcumin on Ciprofloxacin Resistant Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa* and on mexC and mexD Genes Expression. *Arak Med Uni J (AMUJ)*. 2018; 21(131): 10-20. [Persian]
30. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Michael Givskov M, Greenberg EP, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and beta-Lactamase and Alginate Production. *Antimicrob Agen a Chemo*. 2004; 48(4): 1175–1187.

Isolation of *TEM* beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* and Imipenem Effect on Expression of *TEM* Gene by Real-Time PCR from Burn Wound Samples

Elham Siasi Torbati*¹, Yeganeh Asaei², Jamileh Nowroozi²

1. Department of Genetics, Faculty of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding author: emi_biotech2006@yahoo.com

Abstract

Background & Aim: *Pseudomonas aeruginosa* strains that were resistance to majority of commonly used antibiotics were caused problem in treatment of these infections. Imipenem is the excessive potential antibiotic for elimination of antibiotic resistance isolates of these bacteria. Aim of this study was, identification of imipenem effect on *TEM* beta-lactamase gene expression in resistant to antibiotic, *Pseudomonas aeruginosa* strains, from burn wound samples, by Real-time PCR.

Methods: In descriptive cross-sectional study, 100 burn wound samples were collected from Tehran hospitals. *Pseudomonas aeruginosa* isolates, were found from samples. After DNA extraction by PCR reaction, were isolated *TEM* gene from samples contained this bacteria, and were defined imipenem MIC measure, for them. Then, were compared, *TEM* beta-lactamase gene expression, among imipenem-treated and untreated *Pseudomonas aeruginosa* strains, by Real-time PCR

Results: From 100 wound samples, 60 isolates (60%) were infected by *Pseudomonas aeruginosa* and in 34 samples (56.6%) of *Pseudomonas aeruginosa* isolated, were presence *TEM* beta-lactamase gene. Expression of *TEM* gene, 78.68% decreased in imipenem-treated *Pseudomonas aeruginosa* strains, compare by untreated strains.

Conclusion: According of this study finding, from imipenem by anti-beta-lactamase action that was interested on reduction of *TEM* gene expression, could be used in control of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa,
TEM gene,
Imipenem,
Real-time PCR

How to Cite this Article: Siasi Torbati E, Asaei Y, Jamileh Nowroozi J. Isolation of *TEM* beta-lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* and Imipenem Effect on Expression of *TEM* Gene by Real-Time PCR from Burn Wound Samples. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2020;8(2):1-13.