مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۸. شماره ۲. تابستان ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

بررسی حضور ژن بتالاکتامازی *TEM* از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در زخم های سوختگی و اثر ایمی‌پنم 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 ائروژینوزای*، مقاوم نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج، مشکلاتی در درمان این عفونت ها ایجاد می کنند. ایمی‌پنم، انتی بیوتیک با پتانسیل بالا، برای از بین بردن سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، این باکتری می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر ایمی‌پنم، در بیان ژن بتالاکتامازی *TEM*، در سویه های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به انتی بیوتیک، از نمونه های زخم سوختگی، با روش Real-time PCR بود.

روش‌ها: در مطالعه توصیفی، ۱۰۰ نمونه، از زخم های سوختگی، در بیمارستان‌های تهران، جمع‌آوری 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 انها تعیین شد. سپس، بیان ژن بتالاکتامازی *TEM* ، در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده و سویه‌های بدون تیمار با ایمی‌پنم، 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 سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* تیمار شده با ایمی پنم در مقایسه با سویه های غیرتیمار شده، ، به میزان ۷۸/۶۸٪ کاهش داشت.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، می‌توان از ایمی‌پنم با فعالیت ضد بتالاکتامازی، که موثر بر کاهش بیان ژن *TEM* بود، در کنترل سویه های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آنتی بیوتیک، استفاده نمود.

کلید واژه‌ها:
سودوموناس آئروژینوزا، ژن *TEM*، ایمی‌پنم، Real-time PCR

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

باکتری *سودوموناس*، از باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل یا کمی خمیده هستند. این باکتری‌ها به وسیله یک یا چند تاژک قطبی متحرک بوده و هوازی اجباری هستند، گرچه در حضور نیترات می‌توانند رشد بی‌هوازی داشته باشند. در این باکتری مصرف قندها بصورت اکسیداسیون انجام می‌گیرد و از باکتری‌هایی است که بصورت فرصت طلب بیماری‌زا می‌باشد (۱). انتشار گسترده باکتری در محیط، به دلیل عوامل گوناگون از جمله، توانایی استقرار در زیستگاه‌های گوناگون محیطی و امکان استفاده از بسیاری از ترکیبات به عنوان منبع انرژی، می‌باشد. عفونت با *سودوموناس* می‌تواند در هر بخشی از بدن رخ دهد و این عفونت در سوختگی ها یا تروما، در بخش‌هایی از گوش میانی، قرنیه، دستگاه ادراری و دستگاه تنفسی شایع تر است (۱، ۲). همچنین این عفونت می‌تواند سبب اندوکاردیت، اسهال و استفراغ، آمپیم و حتی سپتی سمی، شود. *سودوموناس*

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی
آدرس پست الکترونیک: emi_biotech2006@yahoo.com

www.SID.ir

آئروژینوزا از عوامل شایع عفونت بیمارستانی و مقاوم به بسیاری از داروهای آنتی‌بیوتیکی 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 وخیم‌تر 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، ٤). بتالاکتامازهای *TEM*، که به زیرگروه‌های 2b، 2be، 2br و 2ber تقسیم شده اند و به تعداد ۱۷۲ نوع می‌باشند، امروزه معمول‌ترین مکانیسم مقاومت باسیل‌های گرم منفی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های 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، ٦). ریشه‌های جایگاه فعال به سوبسترای بتالاکتام، حساسیت به آنزیم‌های مهارکننده بتالاکتامازی، هم چون اسید کلاولانیک را افزایش می‌دهد. *سودوموناس آئروژینوزا* در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها 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 می شود که سبب ایجاد ارایه راهکارهای مناسب در جهت درمان با این باکتری شده است (۷، ۸).

یکی از خانواده آنتی‌بیوتیک های بتالاکتامی، کاربابپنم‌ها هستند که در ساختار شیمیایی آن‌ها همانند پنی‌سیلین، یک حلقه بتالاکتام چهار ضلعی و یک حلقه پنج ضلعی وجود دارد. کاربابپنم‌ها طیف فعالیت گسترده علیه میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی دارند. آنتی بیوتیک ایمی‌پنم یکی از کاربابپنم های موثر در درمان عفونت باکتری های مقاوم به دارو می باشد. اهمیت ویژه ایمی‌پنم در اثربخشی آن بر *سودوموناس آئروژینوزا* و گونه‌های *انتروکوکوس* است. این آنتی بیوتیک ها 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. ایمی‌پنم در مقابل هیدرولیز توسط اکثر آنزیم های بتالاکتاماز بسیار مقاوم است (۹، ۱۰).

در سال‌های اخیر مطالعات متعدد، در خصوص حضور ژن‌های *TEM* درباکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، با الگوی مقاومت به داروهای بتالاکتامی و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (Minimum Inhibition Concentration) برای این دسته از آنتی بیوتیک ها، 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 ایمی‌پنم، در بیان ژن بتالاکتامازی *TEM*، در سویه های *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 ۱۵۷۳۰۵٤٤۸۹٦۲۰۳۱ مورد تصویت 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 میکروب 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 ٤۲ درجه سانتی‌گراد، همچنین ویژگی فلوئورسانس زیر نور

www.SID.ir

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

تعیین MIC برای ایمی‌پنم: تعیین MIC ایمی‌پنم به روش براث دایلوشن انجام شد. به این ترتیب که سویه‌های باکتریایی *سودوموناس ائروژینوزای* جداسازی شده روی محیط کشت آگار خون‌دار کشت داده شدند و به مدت ۲٤ ساعت در گرم خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از طی مدت نگهداری، از نمونه باکتریای برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد. برای این منظور ابتدا سلول‌های باکتریایی از سطح محیط کشت آگار خونی به کمک لوپ استریل جمع آوری و در یک میلی‌لیتر بافر سالین فسفات استریل مخلوط گردید و نمونه‌های با کدورت نیم مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ – ۱ عدد باکتری در هر میلی لیتر (Colony-Forming Unit) CFU تهیه شد. برای اطمینان از ایجاد کدورت مذکور، جذب آن به وسیله اسپکتروفتومتر مرئی– فرابنفش در محدوده طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان جذب در محدوده ۰/۱ – ۰/۰۸ تنظیم شد. با استفاده از روش استاندارد کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی، ((CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute)، حداقل غلظت ممانعت کننده رشد برای هر یک از باکتری‌ها در مجاورت با ایمی‌پنم بدست آورده شد (۲۳). در این روش از میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای با ۱۲ ردیف که هر کدام حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتون سوی براث (Tripton Soy Broth) استریل بود، استفاده گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از ایمی‌پنم با رقت بالا ۳۰ µg/ml به ردیف اول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتون سوی براث اضافه شد و رقیق سازی تا رقت ۰/۰۵۸ µg/ml انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به همه چاهک ها اضافه شد. همچین از دو ردیف چاهک بعنوان کنترل مثبت (محیط و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی تست (محیط + ایمی‌پنم) استفاده شد. سپس میکروپلیت ها در انکوباتور شیکر دار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حداکثر مدت زمان ۲٤ ساعت) نگهداری شدند.

بررسی حضور ژن *TEM* و مقایسه تغییرات بیان ان پس از تیمار با ایمی پنم

استخراج *DNA* ژنومی از باکتری‌ها و واکنش PCR به منظور جداسازی ژن *TEM: استخراج ژنوم باکتری های *سودوموناس آئروژینوزای* شناسایی شده توسط کیت شرکت پیشگامان انتقال ژن و با روش استاندارد انجام گرفت (۲٤). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز DNA روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه های 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 ۱و ۲ آورده شده است. در این پروژه پرایمرها برای شناسایی ژن *TEM* توسط نرم افزار Oligo طراحی گردید و طراحی به گونه ای 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
- طویل‌سازی ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد
- طویل‌سازی نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد

پس از انجام واکنش PCR برای مشاهده حضور ژن *TEM*، در نمونه ها، محصولات واکنش PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و سپس رنگ آمیزی و عکسبرداری با دستگاه ژل داک انجام شد. در شکل ۱ باندهای حاصل از حضور ژن *TEM*، در نمونه های باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* نشان

www.SID.ir

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 ایی 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

مواد واکنش PCR	مقدار (برحسب میکرولیتر)
آب مقطر	٤
پرایمر چپ (10 pmol/µl)	۱
پرایمر راست (10 pmol/µl)	۱
نمونه DNA (120ng)	٤
Master mix Amplicon (2X)	۱۰
حجم نهایی	۲۰
مقادیر مواد موجود در Master mix برای واکنش PCR	مقدار (بر حسب میکرولیتر)
پلیمراز Taq (50 U)	۰/۵
dNTP (10 mm)	۱
بافر (10X)	۷/۵
$MgCl_2$ (50 mm)	مقدار (بر حسب میکرولیتر)
مواد واکنش Real Time PCR	مقدار بر حسب میکرولیتر
Master mix SYBER Green 2X	۱۰
cDNA	۱/۵
پرایمر چپ	۱
پرایمر راست	۱
آب فاقد نوکلئاز	٦/۵
حجم نهایی	۲۰

www.SID.ir

داده شده است. در این مطالعه از، *Klebsiella pneumonia* 1770 (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 تیمار شده با ایمی‌پنم بر طبق روش ذکر شده در تعیین MIC و *سودوموناس‌های* تیمار 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 ان، 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 *سودوموناس‌های* تیمار شده با ایمی‌پنم و *سودوموناس‌های* تیمار نشده، انجام شد (۲۵). ژن مرجع این واکنش *16S rRNA* بود و برنامه دستگاه Bio Rad Real Time PCR دارای ۳۵ چرخه تکرار و شامل مراحل زیر بود:

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

از روش Real-time PCR که یکی از دقیق‌ترین روش ها برای بررسی تغییرات بیان ژن است، استفاده شد. در این روش تعداد 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 ΔΔCt و بدست اوردن 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

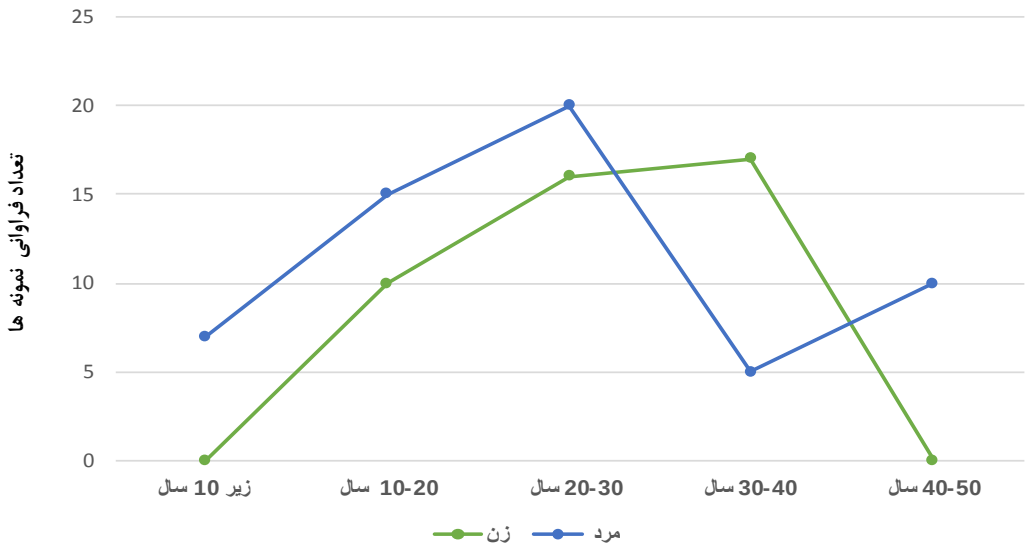
نتایج نمونه ها: نمونه گیری زخم سوختگی از ۵۷ مرد و ۴۳ زن بین سنین ۵۵-۵ سال و میانگین سنی (۰/۵ ± ۳۰) سال صورت گرفت (در شکل ۱ نشان داده شده است).

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 باسیل 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 ۷/۵ µg/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 DNAهای 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.

www.SID.ir



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

جدول ۳. ویژگی های بیوشیمیایی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

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

نتایج بیان ژن TEM با روش Real time PCR در ایزوله سودوموناس آئروژینوزای تیمار شده با ایمی‌پنم: 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 ایمی‌پنم نسبت به ایزوله‌های ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزای* تیمار نشده با ایمی‌پنم کاهش بیان داشته اند (به میزان ۷۸/۶۸ درصد) که نشان‌دهنده نقش مثبت ایمی‌پنم، 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 ΔΔCt، تفاوت Ct (cycle threshold) هر دو ژن بعد از تیمار با ایمی‌پنم، محاسبه شد و از همین مقدار قبل از تیمار با ایمی‌پنم، کاسته شد.

$\Delta Ct = target - reference$

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

$\Delta Ct_{target} = (۳۱/۹۸) - (۱۷/۷۵) = ۱۴/۲۳$

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

$\Delta C_{reference} = (۲۹/۹۸) - (۱۷/۹۸) = ۱۲/۰۰$

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

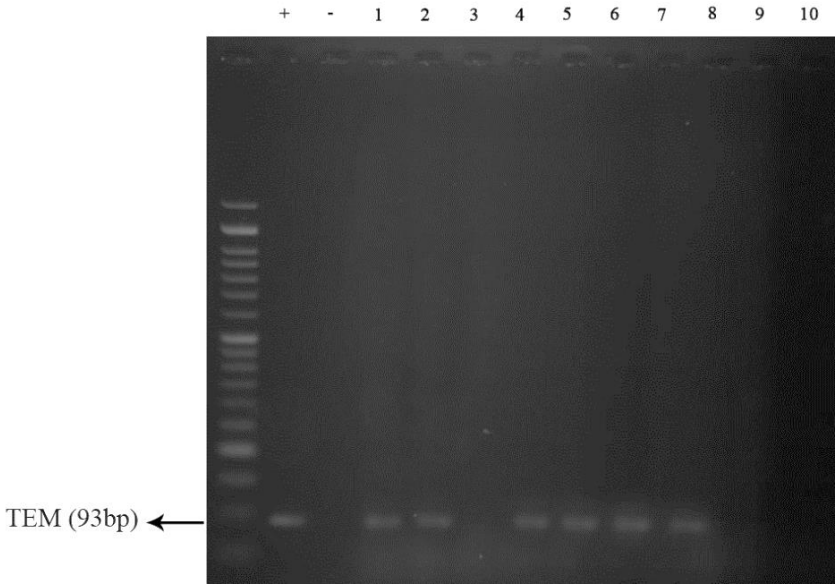
$\Delta\Delta Ct = ۱۴/۲۳ - ۱۲/۰۰ = ۲/۲۳$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Variant $= ۲^{-۲/۲۳} = ۰/۲۱۳$

Knockdown = ٪۷۸/۶۸

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

www.SID.ir



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

(خانه M: مارکر با سایز مولکولی (۵۰ bp)، خانه دوم + : کنترل مثبت ا نمونه *Klebsiella pneumonia* 1770 دارای ژن *TEM*، خانه سوم - : کنترل منفی: آب مقطر، خانه های ۱ و ۲ و ۴ و ۵ و۶ 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*).

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

بحث

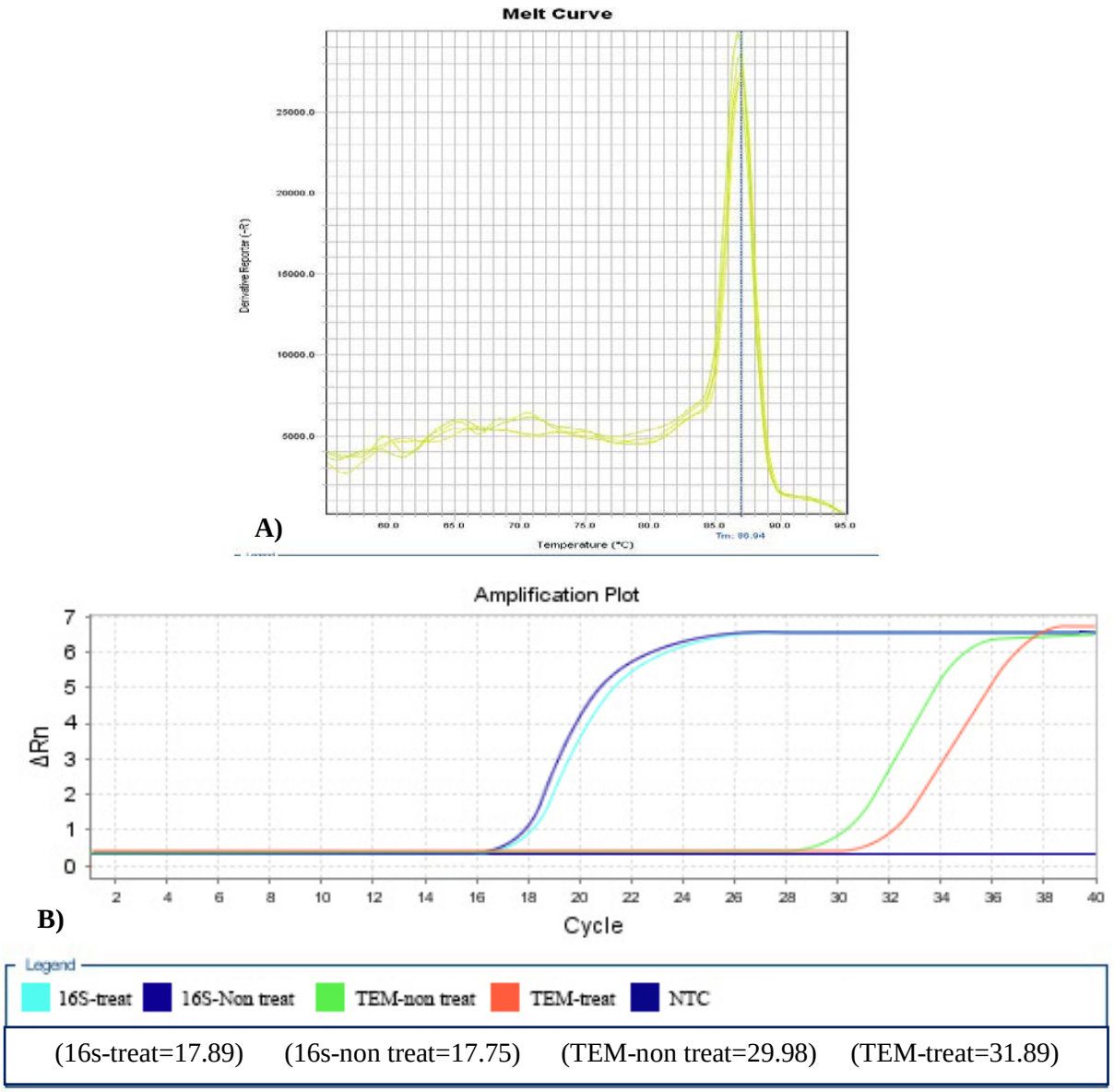
سودوموناس آئروژینوزا از عوامل شایع عفونت بیمارستانی و مقاوم به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌هاست (۱). یکی از مکانیسم‌های شایع که در ایجاد مقاومت این باکتری به بتالاکتام نقش دارد تولید آنزیم بتالاکتاماز است که عامل مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتامی می باشد. *سودوموناس آئروژینوزا*، باکتری بیماری‌زای 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 عفونت‌های آن می گردد (۱، ۲، ۵).

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

پس از آن که آنتی بیوتیک ایمی‌پنم بر ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزای* اثر داده شد بیان این ژن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن بود که ژن *TEM* در سلول‌های تیمار شده با ایمی پنم در مقایسه با سویه های تیمار نشده به میزان ۷۸/۶۸٪ کاهش بیان داشت. در نتیجه استفاده از ایمی‌پنم 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 سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزای* جدا شده از عفونت‌های 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 نمونه‌های زخم در دو بیمارستان تهران پرداختند. آنان حساسیت آنتی‌بیوتیکی و MIC

www.SID.ir



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 ایمی‌پنم و تیمار نشده).**

را نیز مورد بررسی قرار داده اند (۱۲). فولادی و همکارانش، در سال ۲۰۱۰، به بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی 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 مطالعه ای ۱۰۰ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا* را جدا کردند و پس از انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی میزان MIC را برای آنتی‌بیوتیک های رایج، بدست آوردند و گزارش نمودند که ایمی‌پنم، مؤثرترین دارو برای درمان *سودوموناس آئروژینوزا* است (۱٤). باقری و همکارانش در سال ۲۰۱۷، در مطالعه‌ای ٦۰۰ 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 ایمی‌پنم، گزارش نمودند و در سویه‌هایی که مقاوم به ایمی پنم بودند MIC را برابر با ٤ µg/ml، بدست آوردند (۱۵). بهرامی و همکارانش در سال

www.SID.ir

۲۰۱۸، در تحقیقی حضور ژن‌های بتالاکتامازی در ایزوله‌های 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 ائروژینوزا*، با روش مولکولی PCR انجام دادند. آنان حضور ژن *TEM* را در *سودوموناس ائروژینوزای* ایزوله شده که مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک ها داشتند، مثبت گزارش نمودند (۱۷).

در تحقیق Zafer و همکارانش در سال ۲۰۱٤، که بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی ژن های کد کننده بتالاکتامازی در سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* 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 ائروژینوزای* جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان، مقاوم به ایمی پنم بوده و میزان MIC در اکثر این سویه ها، µg/ml ٤ بود (۱۹). Laudy و همکاران در سال ۲۰۱۷، فراوانی ژن های بتالاکتامازی را در سویه های مقاوم *سودوموناس ائروژینوزا* 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 ائروژینوزای* 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 نمونه‌ها، 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، ٦۰ ایزوله دارای عفونت با باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بودند و ۳٤ نمونه از ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزاها* دارای ژن بتالاکتاماز *TEM*، بودند و میزان MIC برای سویه های شناسایی شده برابر با µg/ml ۷/٥ به دست آمد. بنابراین چنین نتیجه می شود که نتایج این مطالعه، در راستای تحقیقات دانشمندان گذشته بوده و تشابهاتی در جداسازی باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* 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 ائروژینوزای* مقاوم به سیپروفلوکساسیلین، تحت تیمار با سیلیبینین انکپسوله در نانو ذرات، بررسی نمودند. نتایج آن ها نشان داد در سلول های تحت تیمار با سیلیبینین انکپسوله در نانو ذرات و سیپروفلوکساسیلین، بیان ژن *mexB* در مقایسه با سلول های تحت تیمار با سیپروفلوکساسیلین، به تنهایی کاهش می یابد (۲٦). همچنین عظیمی و همکاران در سال ۲۰۱٥، مطالعه ایی بر روی بیان ژن *oprD* در *سودوموناس ائروژینوزای* مقاوم به کارباپنم ها، از نمونه های عفونت سوختگی انجام دادند. تحقیق آنان مشخص نمود بیان ژن *oprD* در سویه های مقاوم به کاباپنم 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 ائروژینوزای* مقاوم به سیپروفلوکساسیلین تحت تیمار با سیلیبینین 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 سیپروفلوکساسین و بیان ژن های *mexC* و *mexD* انجام دادند،

www.SID.ir

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 ۲۰۰٤ که برای بررسی اثر مهار کنندگی ایمی پنم بر بیان ژن های بتالاکتامازی و ژن های تشکیل دهنده بیوفیلم 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 سلول‌های 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 ائروژینوزای* مقاوم به کارباپنم 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 ایمی‌پنم را در جهت مهار بیان ژن *TEM*، در سویه های *سودوموناس ائروژینوزای* 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.

نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروژینوزا، پاتوژنی فرصت طلب، با تعداد وسیعی از شاخص‌های بیماری‌زا است و دارای ظرفیت ژنتیکی بالایی، در ایجاد مقاومت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، می باشد. 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 سویه های 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 عفونت های حاصل از این باکتری، استفاده از ایمی‌پنم را، توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولان و بیماران بیمارستان که در جمع‌آوری نمونه های 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 فرموده اند، سپاسگزاری و تشکر می گردد.

تضاد منافع

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

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه یا جمع آوری داده ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها: یگانه عسایی، الهام سیاسی، جمیله نوروزی.

(۲) تهیه پیش نویس مقاله: الهام سیاسی

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

www.SID.ir

References

1. 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.

2. Klockgether J, Tümmler B. Recent advances in understanding Pseudomonas aeruginosa as a pathogen. F1000Res. 2017; 6(1261): 1-10.

3. 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.

4. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, Righi E, Guery B. How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. DIC. 2018; 7(212527): 1-18.

5. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa. Drug Discov Today. 2019; 24(1): 350-359.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. Shaaban MI, Shaker MA, Mady FM. Imipenem/cilastatin encapsulated polymeric nanoparticles for destroying carbapenem-resistant bacterial isolates. J Nanobiotechnol. 2017; 15(29): 1-12.

10. 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.

11. 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]

12. Shahcheraghi F, Nikbin VS, shorej F. PCR detection of PER , VEB , SHV and TEM β-lactamases in multidrug resistant P. aeruginoasa isolated from wound infections in two hospitals of Tehran. Iran J Med Microbiol. 2008, 1(4): 21-27.

13. 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]

14. 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.

15. 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]

16. 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.

www.SID.ir

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2020, Volume 8, No. 2: 1-13.

Original article

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 Asaei[2], Jamileh Nowroozi[2]

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

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa,

TEM gene,

Imipenem,

Real-time PCR

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.

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.

Copyright © 2020 Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.

www.SID.ir