dx.doi.org/10.22093/wwj.2020.245134.3060

Original Paper

Journal of Water and Wastewater, Vol. 32, No. 3, pp: 55-68

Frequency Assay of *qnr* Genes in *Enterobacteriaceae* Isolated from Hospital and Urban Wastewaters in Karaj City

Sh. Rezakhani[1], A. Haddadi[2], M. Shavandi[3]

1. MSc. Graduate Student, Dept. of Microbiology,
Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Assist. Prof., Dept. of Microbiology, Karaj Branch,
Islamic Azad University, Karaj, Iran
(Corresponding Author) haddadia@kiau.ac.ir
3. Assist. Prof., Ecology and Environmental Pollution Control Research Group,
Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran

(Received Sep. 2, 2020 Accepted Nov. 15, 2020)

To cite this article:
Rezakhani, Sh., Haddadi, A., Shavandi, M. 2021. "Frequency assay of *qnr* genes in *Enterobacteriaceae* isolated from hospital and urban wastewaters in Karaj city" Journal of Water and Wastewater, 32(3), 55-68.
Doi: 10.22093/wwj.2020.245134.3060. (In Persian)

Abstract

In recent years, because of excessive and unregulated use of antibiotics, the threat of acquisition of antibiotic resistance by pathogens is growing. Hospitals are hotspots for antimicrobial-resistant bacteria (ARB) and will be ejected from hospitals via wastewater systems. The aim of this study was the frequency assay of *qnr* plasmid's genes in quinolone resistant Entrobacteriaceae strains isolated from urban and hospital wastewaters. A total of 99 Entrobacteriaceae strains were isolated from urban and hospital wastewater in Alborz province during the spring of 2019. Bacterial strains were identified by standard microbiological and biochemical tests. The antimicrobial susceptibility test to ciprofloxain, levofloxacin, ofloxacin, norfloxacine and nalidxic acid was determined by Kirby-Bauer method and the frequency of quinolone resistance genes (*qnr*A, *qnr*B, *qnr*S) was investigated by PCR. Among the organisms cultured, Escherichia coli was the most common organism followed by Escherichia coli (inactive) and Citrobacter freundii. The most antibiotic resistance was observed against nalidixic acid. Most of the isolates (61%) harboured the *qnr*A gene. *qnr*B and *qnr*S genes were found in 31% and 8% of isolates respectively. One isolate has both *qnr*A and *qnr*B genes. Most of the strains that contain *qnr*A and *qnr*B genes were isolated from hospital and urban wastewater respectively. Antimicrobial resistance should now be seen as an environmental pollutant and new wastewater treatment processes must be assessed for their capability in eliminating antimicrobial-resistant bacteria, especially from hospital effluents. Also, unregulated use of antibiotics should be stopped.

Keywords: Quinolones, *Qnr* Genes, Hospital Wastewater, Antibiotic Resistance.

مجله آب و فاضلاب، دوره ۳۲، شماره ۳، صفحه: ۶۸-۵۵

بررسی شیوع ژن‌های qnr در انتروباکتریاسه‌های جداسازی شده در فاضلاب شهری و بیمارستانی

شیرین رضاخانی[۱]، اعظم حدادی[۲]، محمود شوندی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
haddadia@kiau.ac.ir (نویسنده مسئول)
۳- استادیار، گروه حفاظت محیط‌زیست، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

(دریافت ۹۹/۶/۱۲ پذیرش ۹۹/۸/۲۵)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام بفرمایید:
رضاخانی، ش.، حدادی، ا.، شوندی، م.، ۱۴۰۰، "بررسی شیوع ژن‌های qnr در انتروباکتریاسه‌های جداسازی شده در فاضلاب شهری و بیمارستانی"
مجله آب و فاضلاب، ۳۲(۳)، ۶۸-۵۵. Doi: 10.22093/wwj.2020.245134.3060

چکیده

امروزه مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها به‌دلیل استفاده نادرست رو به افزایش است که این امر برای درمان بیماری‌ها یک تهدید به‌حساب می‌آید. فاضلاب‌های بیمارستانی، پتانسیل زیادی برای ورود باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم به محیط‌زیست دارند. همچنین سیستم‌های تصفیه کنونی نیز کارایی زیادی در حذف و یا کاهش آنتی‌بیوتیک‌ها ندارند که این امر باعث افزایش باکتری‌ها با ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی شیوع ژن‌های پلاسمیدی qnr در جدایه‌های انتروباکتریاسه مقاوم به کوئینولون از فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی شهر کرج بود. تعداد ۹۹ جدایه انتروباکتریاسه از پساب بیمارستانی و شهری استان البرز در بهار ۱۳۹۸ جداسازی شدند. آزمون‌های بیوشیمیایی به‌منظور شناسایی آنها انجام شد و جدایه‌ها از نظر الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید به روش کربی بایر بررسی و جدایه‌هایی که بیشترین مقاومت به کوئینولون‌ها را داشتند. برای حضور ژن‌های qnr A، qnr B و qnr S به روش PCR بررسی شدند. در میان ارگانیسم‌های کشت شده اشریشیاکلی شایع‌ترین ارگانیسم بود و بعد از آن اشریشیاکلی (غیر فعال) و سیتروباکتر فروندی قرار داشتند. بیشترین مقاومت در بین جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید مشاهده شد. بیشتر جدایه‌ها حاوی ژن qnr A (۶۱ درصد) بودند. ژن‌های qnr B و qnr S به‌ترتیب در ۳۱ درصد و ۸ درصد از جدایه‌ها یافت شد. یک جدایه حاوی هر دو ژن qnr B و qnr A بود. بیشترین جدایه‌های حاوی ژن qnr A از پساب بیمارستانی و بیشترین جدایه‌های حاوی ژن qnr B از پساب شهری جداسازی شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی امروزه باید به‌عنوان یک آلودگی زیست‌محیطی در نظر گرفته شود و کیفیت تصفیه فاضلاب در کاهش این عوامل باید ارزیابی شود. همچنین مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک نیز باید متوقف شوند.

واژه‌های کلیدی: کوئینولون‌ها، ژن‌های *qnr*، پساب بیمارستانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

dx.doi.org/10.22093/wwj.2020.245134.3060

۱- مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان و به‌عنوان محرک رشد در پرورش دام به کار می‌روند که همگی این موارد باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌ها می‌شود. افزایش باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، تهدیدی برای درمان مؤثر بیماری‌ها است (Ohlsen et al., 2003). یکی از عوامل مهم بر تداوم انتشار گونه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، دفع کنترل نشده فاضلاب‌های شهری و تا حدودی بیمارستانی به آب‌های پذیرنده که به‌عنوان منابع آب آشامیدنی و یا منابع آب کشاورزی استفاده می‌شوند، است (Hadi et al., 2011). کارایی پایین تصفیه‌خانه‌ها می‌تواند عامل و زمینه‌ای برای انتقال عوامل مقاومت از باکتری‌های مقاوم به باکتری‌های حساس باشد (Zhang et al., 2009). وجود ژن مقاومت و یا باکتری دارای این ژن‌ها در محیط ماندگاری بالایی دارند که حضور آنها در شبکه آب شرب نگرانی انتشار در بین جامعه را بیشتر می‌کند (Ramteke et al., 1990, Aali et al., 2016, Aali et al., 2017).

مطالعات نشان داده است حتی در خروجی تصفیه‌خانه‌های فاضلاب میزان جنس‌های مقاوم اشرشیا و کلبسیلا به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش‌یافته است و ورود این باکتری‌های مقاوم به منابع آب خود یک خطر دیگر برای گسترش باکتری‌های مقاوم در محیط است (Silva et al., 2006, Vilanova et al., 2004). باکتری‌های بومی محیط آبی به‌راحتی می‌توانند پلاسمیدها و سایر عوامل ژنتیکی مسبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی را از باکتری‌های موجود در فاضلاب به‌صورت افقی کسب کنند و خود این باکتری‌ها عامل انتقال بین‌گونه‌ای عوامل مقاومت شوند (Afshari et al., 2020, Hadi et al., 2011).

فلوروکوئینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیفی هستند که به روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی مؤثر هستند. کوئینولون‌ها با مهار DNA ژیراز و توپوایزومراز IV باعث ایجاد اختلال در چرخه تکثیر باکتری و درنهایت موجب مرگ آن می‌شوند (Katzung, 2017).

وجود پلاسمید حاوی ژن‌های مقاومت به کوئینولون‌ها[1] در سال ۱۹۹۸ در باکتری کلبسیلا پنومونیه شناسایی شد. توالی‌های ژنی که باعث مقاومت به کوئینولون‌ها می‌شدند *qnr* نامیده شد. به مرور زمان انواع مختلفی از توالی‌های *qnr* شناسایی شد که شامل *qnr* A، *qnr* B، *qnr* C، *qnr* D و *qnr* S بود. تفاوت این ژن‌ها در توالی آلل‌های آنها بود (Wang et al., 2009, Xia et al., 2013, Strahilevitz et al., 2009).

شیوع این ژن‌ها در مناطق مختلف جهان متفاوت است، همچنین به نوع و الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک در هر منطقه نیز مربوط می‌شود (Robicsek et al., 2006). ژن‌های *qnr* A و *qnr* B بیشتر در سویه‌های انتروباکتریاسه در پساب‌های شهری و یا بیمارستانی و یا در نمونه‌های بالینی یافت می‌شوند. مقدار زیادی ژن *qnr* S در پساب‌های شهری و یا آب رودخانه‌ها دیده شد است که یکی از عوامل انتشار آن در بین باکتری‌ها، سویه‌های آئروموناس‌ها است که در محیط آبی زندگی می‌کنند (Strahilevitz et al., 2009, Robicsek et al., 2006).

فاضلاب شهری، فضولات حیوانات، رواناب و زهاب زمین‌های کشاورزی و پساب صنایع داروسازی، مهم‌ترین منابع ورود آنتی‌بیوتیک‌ها به محیط‌های آبی هستند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ۸۰ درصد نمونه‌های مدفوعی افراد سالم دارای باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است که بیش از ۹۸ درصد آنها اشرشیاکلی است (Farshchian et al., 2015). بروز مقاومت در محیط آبی مانند فاضلاب در گزارش‌ها آمده است. پساب به‌دلیل حضور انواعی از باکتری‌های مدفوعی بستری مناسب برای مقام شدن باکتری در مقابل انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها است. بار میکرب پساب تحت تأثیر بار غذایی آن بالا می‌رود، این امر افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم را نیز شامل می‌شود که نتیجه آن افزایش انتقال ژن‌های مقاوم بین باکتری‌های موجود در فاضلاب است (Hadi et al., 2011).

آنتی‌بیوتیک‌ها با متابولیسم ناکافی و به‌صورت فعال و تغییر نیافته از طریق مدفوع و ادرار از بدن دفع و وارد فاضلاب شهری می‌شوند. حضور این ترکیبات باعث می‌شود تا باکتری‌های موجود در پساب شهری تحت تأثیر انتخاب طبیعی ژن‌های مقاومت رابین خود به‌صورت انتقال افقی مبادله کنند (Katzung, 2017). Guardabassi et al., 2002) ۸۰ درصد نمونه‌های مدفوعی افراد سالم دارای باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است که بیش از

[1] Plasmid Mediated Quinolone Resistance

dx.doi.org/10.22093/wwj.2020.245134.3060

۱۸ درصد آنها اشرشیاکلی است، گزارش شده است (Reinthaler et al., 2003).

در ایران نیز شقاقی و همکاران در سال ۲۰۰۷ جدایه‌هایی با مقاومت بالا به سیپروفلوکساسین از تصفیه‌خانه اکباتان را شناسایی کردند (Shaghaghi et al., 2007).

همچنین بررسی به‌روی پساب بیمارستانی و شهری همدان انجام شد که میزان بالایی مقاومت به سیپروفلوکساسین و نالیدیکسیک اسید در سویه‌های سودوموناس و کلبسیلا مشاهده شد (Hadi et al., 2011).

یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که از بین ۳۰۹ نمونه بالینی بررسی‌شده ۱۳۹ نمونه مقاوم به سیپروفلوکساسین بودند که از بین آنها ۶۹/۱ درصد حامل ژن *qnr* S و ۷۴/۱ درصد حامل ژن *qnr* B و ۵/۸ درصد حامل ژن *qnr* A بودند (Yousefi et al., 2015).

در پژوهش فرشچیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ که به روی پساب تصفیه‌خانه شهر تبریز انجام شد، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سیپروفلوکساسین در پساب خروجی تصفیه‌خانه گزارش شد (Farshchian et al., 2015).

از آنجایی‌که کوئینولون‌ها به‌طور معمول از طریق کلیه به داخل ادرار دفع می‌شوند. سویه‌های در گردش در محیط‌های آبی به‌عنوان یک عامل مهم در گسترش مقاومت به کوئینولون‌ها در انتروباکتریاسه‌ها محسوب می‌شوند. ازاین‌رو بررسی و پژوهش به روی آنها امروزه حائز اهمیت است. در این پژوهش مقاومت به کوئینولون‌ها و شیوع ژن‌های *qnr* در انتروباکتریاسه‌های جداسازی شده از فاضلاب شهری و بیمارستانی در سطح شهر کرج بررسی شدند. همچنین میزان کارایی سیستم‌های تصفیه پساب شهری و بیمارستانی در حذف یا کاهش ژن‌های مقاومت که می‌تواند راهنمایی برای بهبود و ارتقای سیستم‌های تصفیه پساب شهری و بیمارستانی باشد بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

این پژوهش مقطعی- مشاهده‌ای به روی نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌صورت لحظه‌ای از فاضلاب شهری شامل تصفیه‌خانه نظرآباد، تصفیه‌خانه گوهردشت- عظیمیه و بیمارستانی شامل بیمارستان رجایی، بیمارستان البرز، بیمارستان مدنی طی یک دوره نمونه‌برداری ۴ ماهه سال ۱۳۹۸ انجام شد. برای جمع‌آوری نمونه‌ها بر اساس استاندارد ۴۲۰۸ و ۱۰۱۱ بطری شیشه‌ای با ظرفیت ۲۵۰ میلی‌لیتر در عمق حدوداً ۵۰ سانتی‌متری از جریان پساب فاضلاب قرار داده شد. سپس به روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند (ISIRI4208, ISIRI1011) رقیق‌سازی تا ۱×۱۰^{-۴} انجام شد. سپس به‌منظور غنی‌سازی به محیط کشت برین هارت اینفوشن آگار[1] انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، انجام شد (Shaghaghi et al., 2007, Salehi et al., 2015).

کلونی‌های رشد یافته به روی محیط BHI به‌منظور جداسازی باکتری‌های روده‌ای به محیط کشت ائوزین متیل آبی آگار[2] انتقال داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شد (Tavanania et al., 2014, Hadi et al., 2011, Chegene lorestani et al., 2017).

به‌منظور شناسایی و افتراق گونه‌ها از یکدیگر آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تخمیر قند، ایندول، سیترات، تولید اسید و گاز، تولید سولفید هیدروژن و حرکت بررسی شد (Salehi et al., 2013, Koneman et al., 2006).

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها بر اساس روش انتشار دیسک در محیط مولر هیلتون آگار[3] بر اساس روش مؤسسه استاندارد آزمایشگاهی و بالینی[4] نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، لووفلوکساسین (۵µg)، نورفلوکساسین (۱۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، افلاکساسین (۵µg) ارزیابی شد. کلیه محیط کشت‌ها از شرکت ایبرسکو (تهران- ایران) و دیسک‌ها از شرکت پادتن طب (تهران- ایران) تهیه شد (Wayne, 2012).

به‌منظور استخراج DNA حاوی ژن‌های مقاومت از روش جوشاندن استفاده شد (Norouzi et al., 2016). توالی آغازگرهای لازم برای تکثیر ژن‌های پلاسمیدی *qnr*A، *qnr* B، *qnr* S از مقالات استخراج شد (Tavanania et al., 2014, Moghbeli et al., 2014). اطلاعات مربوط به آغازگرها در جدول ۱ آمده است.

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵

[1] Brain Heart Infusion
[2] Eosin Methylene blue
[3] Mueller Hinton Agar
[4] Institute Clinical and Laboratory Standards

جدول ۱- توالی آغازگرها مربوط به ژن‌های مقاومت *qnr* A، *qnr* B، *qnr* S

Table 1. The primer sequence of resistance genes *qnr* A, *qnr* B, *qnr* S

Gene name	Primer sequence(5'to3')	Water/tube(µl)	Expected amplicon size(bp)
qnr A	F: ATTTCTCACGCCAGGATTTG	189.87	516
	R: GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	132.93	
qnr B	F:GTTGGCGAAAAAATTGACAGAA	120.60	469
	R:ACTCCGAATTGGTCAGATCG	161.84	
qnr S	F:ACGACATTCGTCAACTGCAA	108.73	417
	R:TTAATTGGCACCCTGTAGGC	189.10	

میکرولیتر مستر میکس (آمپلیکون- دانمارک)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۰/۴ میکرومولار (شرکت پیشگام ایران- تهران- ایران)، ۱ میکرولیتر از DNA الگو و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر انجام شد (Chegene Lorestani et al., 2017, Tavanania et al., 2014, Norouzi et al., 2016).

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکل (Applied Biosystem AB-آمریکا) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سلسیوس برای ژن *qnr* S و برای دو ژن دیگر ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد (Tavanania et al., 2014, Chegene lorestani et al., 2017). محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واجد رنگ سایبر گیرین منتقل و الکتروفورز (پایا پژوه پارس تهران- ایران) شدند. قطعات DNA به‌کمک دستگاه ژل داکیومنتیشن[1] (Syngene, UK) مشاهده و عکس‌برداری شدند (Chegene Lorestani et al., 2017, Moghbeli et al., 2014, Ghane et al., 2015, Tavanania et al., 2014).

۳- نتایج و بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یک بحران مهم جهانی بر سلامت مطرح است (Abbassi Ghozzi et al., 2012). ژن‌های مقاومت و باکتری‌های حامل آنها از طرق مختلف ازجمله فاضلاب شهری و بیمارستانی وارد محیط‌زیست می‌شوند و این امر یک نگرانی زیست‌محیطی را فراهم کرده است. این احتمال وجود دارد که حتی از طریق مصرف آب آشامیدنی ژن‌های مقاومت به انسان انتقال یابند (Aali et al., 2014, Aali et al., 2016, Aali et al., 2017). بروز مقاومت در محیط آبی مانند فاضلاب در گزارش‌ها آمده است. پساب به‌دلیل حضور انواعی از باکتری‌های مدفوعی بستری مناسب برای مقام شدن باکتری در مقابل انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها است. بار میکرب پساب تحت تأثیر بار غذایی آن بالا می‌رود، این امر افزایش تعداد باکتری‌های مقاوم را نیز شامل می‌شود که نتیجه آن افزایش انتقال ژن‌های مقاوم بین باکتری‌های حاصل در فاضلاب است. پساب در ابتدای ورود به تصفیه‌خانه آشغال‌گیری می‌شود، سپس ذرات آن بر اساس اندازه در حوضچه‌هایی ته‌نشین می‌شوند. سپس وارد مراحل بیولوژیک اعم از هوازی و بی‌هوازی می‌شود که به این مراحل تصفیه ثانویه می‌گویند. روش‌های متداول در تصفیه ثانویه پساب شامل لجن فعال[2]، هوادهی ممتد[3]، استخرهای هوادهی[4]، استخرهای متعادل‌سازی[5]، تصفیه بی‌هوازی[6] است. مرحله بعدی گندزدایی[7] است. در مرحله آخر لجن‌های حاصل از تصفیه پساب را یا با حرارت خشک کرده برای مصارف کشاورزی استفاده می‌کنند. پساب تصفیه شده نیز پس از انجام آزمون‌های کنترل کیفی وارد محیط‌زیست می‌شود (Badalians Gholikand, 2016, Monzavi, 2010, Papa et al., 2017).

لجن فعال سیستم تصفیه پساب یک مخزن برای ژن‌های مقاومت است. در سیستم تصفیه لجن فعال، باکتری‌ها در اثر فرایند

[1] Gel Documentation

[2] Active Sludge
[3] Continuous Aeration
[4] Aerated Lagoons
[5] Balancing Pools
[6] Anaerobic Treatment
[7] Disinfected

dx.doi.org/10.22093/wwj.2020.245134.3060

جدول ۲- نتایج شمارش کلی نمونه‌های پساب شهری و بیمارستانی

Table 2. Total count results of urban and hospital wastewater

Sample location / Dilution	Rajai hospital	Alborz hospital	Madani hospital	Nazarabad Water treatment	Azimieh-Gohardasht Water treatment
	The number of colonies counted based on CFU(g/ml)				
1:10	uncountable	$10^2 \times 1.2$	uncountable	uncountable	uncountable
1:100	uncountable	$10^2 \times 1.5$	$10^2 \times 1$	$10^2 \times 2$	$10^2 \times 2$
1:1000	$10^5 \times 2$	6	$10^2 \times 1.6$	10×5	10×4
1:10000	$10^5 \times 1.5$	0	4	7	2

تصفیه متلاشی می‌شوند؛ ژن‌های مقاومت در لجن ته‌نشین و ذخیره می‌شوند. سپس این ژن‌ها به باکتری‌هایی که در فرایند تصفیه زنده مانده‌اند انتقال می‌یابند، در این شرایط لجن به‌عنوان یک مخزن عمل می‌کند. یا اینکه در لجن فعال تحت تأثیر انتخاب طبیعی باکتری غیر مقاوم ژن‌های مقاومت را از باکتری‌های هم‌گونه یا غیر هم‌گونه دریافت کنند و پس از کلرزنی و زنده ماندن در محیط انتشار یابند که در این حالت لجن به‌عنوان یک بستر برای انتشار بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای عمل می‌کند (Ng et al., 2017).

همچنین با ورود پساب‌های حاوی ژن‌های مقاومت این ژن‌ها می‌توانند به جریان آب رودخانه به زمین‌های کشاورزی و خاک‌ها وارد شوند و یا حتی با نفوذ آب به سفره‌های زیرزمینی به آب چاه‌ها نیز نفوذ کنند و باعث ورود ژن‌های مقاومت به بدن افراد روستایی سالمی که از آن آب استفاده می‌کنند، شود (Rutgersson et al., 2014).

تعداد ۹۹ جدایه از پساب‌های مورد بررسی جداسازی شد که تعداد ۶۳ جدایه مربوط به نمونه‌های پساب بیمارستانی (بیمارستان‌های رجایی، البرز، مدنی) و ۳۶ جدایه مربوط به نمونه‌های پساب شهری (تصفیه‌خانه نظرآباد و عظیمیه-گوهردشت) بود.

نتایج بررسی شمارش کلی در جدول ۲ نشان داده است. نمونه پساب بیمارستان البرز کمترین تعداد واحد تشکیل کلنی شمارش شده[1] را داشت. در رقت ۱:۱۰۰۰۰ از بیمارستان البرز هیچ باکتری مشاهده نشد، در همین رقت بعد از بیمارستان البرز کمترین CFU مربوط به تصفیه‌خانه‌های شهری و بیمارستان مدنی بود.

طبق نتایج جدول ۳ بیشترین درصد جدایه‌ها مربوط به اشرشیاکلی (۵۲/۵۲ درصد) بود. بعد از آن، اشرشیاکلی (غیرفعال) و سیتروباکتر فروندی به‌ترتیب با ۱۴درصد و ۱۰درصد بیشترین درصد جدایه‌ها را تشکیل می‌دادند. در پژوهشی به روی نمونه‌های پساب شهری در پرتغال اشرشیاکلی بیشترین فراوانی را داشت (Firoozeh et al., 2014).

بیشترین درصد جدایه‌های این پژوهش نیز مربوط به اشرشیاکلی (۵۲/۵۳ درصد) بود که این نتایج با یافته‌های قانع و خان‌پور زرنجی در سال ۲۰۱۵ نیز هماهنگ بود (Ghane and Khanpour Zarenji, 2015).

در میان گونه‌های جدا شده، باکتری اشرشیاکلی (غیرفعال) نیز جداسازی شد. این باکتری نسبت به اشرشیاکلی معمولی تفاوت‌هایی دارد. از آن جمله حرکت، تولید گاز، متیل رد، لاکتوز منفی است، اما از نظر سیترات و اندول مانند اشرشیاکلی‌ها معمولی است. شناسایی این باکتری در پژوهش گاداج و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز گزارش‌شده بود(Gadage et al., 2014).

از بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد تولید بررسی در این پژوهش بیشترین درصد مقاومت به نالیدیکسیک اسید بود که با یافته‌های سلیمانی اصل و همکاران در سال ۲۰۱۳، فیروزه و همکاران در سال ۲۰۱۴ و فقری و همکاران در سال ۲۰۱۶ هماهنگ بود (Faghri et al., 2016, Firoozeh et al., 2014, Soleimani Asl et al., 2011).

این احتمال وجود دارد که چون این آنتی‌بیوتیک اولین آنتی‌بیوتیک معرفی شده از این گروه بود و بیشتر از دیگر اعضای گروه کوئینولون تجویز می‌شود، بنابراین بیشترین درصد مقاومت را

[1] Colony Forming Unit

جدول ۳- درصد هرکدام از جدایه‌ها از کل باکتری‌های شناسایی شده و تعداد جدایه‌های مقاوم به هر باکتری، NA : نالیدیکسیک اسید، NOR : نورفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، CP: سیپروفلوکساسین، LEV: لووفلوکساسین

Table 3. Percentage of each isolate from the total identified bacteria and the number of isolates resistant to each bacterium; NA: Nalidixic acid, NOR: Neurofloxacin, OFX: Ofloxacin, CP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin

Isolates name	Percentage of total isolates	Number of isolates resistant to each antibiotic				
		NA	NOR	OFX	CP	LEV
Escherichia coli	52.52%	31	12	11	11	8
Escherichia coli(Inactive)	14.14%	8	3	3	3	3
Klebsiella oxytoca	1.01%	_	_	_	_	_
Citrobacter freundii	10.10%	10	2	1	3	1
Klebsiella pneumoniae	5.05%	1	1	1	1	1
Citrobacter amalonaticus	2.02%	2	_	_	_	_
Citrobacter diversus	3.03%	2	_	_	_	_
Providencia rettgeri	1.01%	1	_	_	_	_
Enterobacter cloacae	4.04%	_	_	_	_	_
Serratia marcescens	1.01%	_	_	_	_	_
Morganella morganii	6.06%	5	4	4	4	4

در بین باکتری‌ها داشته باشد. باکتری‌های اشرشیاکلی، اشرشیاکلی (غیرفعال)، کلبسیلا پنومونیه، مورگانلا مورگانی، سیتروباکتر فروندی جدا شده از پساب به چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (جدول ۳).

قانع و همکاران در سال ۲۰۱۵ و المانما و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک حتی مقاومت به دو گروه متفاوت آنتی‌بیوتیکی را در بین جدایه‌های پژوهش‌های خود گزارش کردند (Ghane et al., 2015, Elmanama et al., 2006).

با توجه به نتایج جدول ۴، وجود باکتری کلبسیلا پنومونیه در بین جدایه‌های بیمارستان مدنی به‌دلیل وجود بخش چشم‌پزشکی در این بیمارستان می‌تواند باشد که با یافته‌های فلاح و همکاران در سال ۲۰۰۹ هماهنگ بود (Falah et al., 2009).

هادی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی بین پساب بیمارستانی و شهری باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی را از هر دو پساب جداسازی کردند. در این پژوهش نیز نتایج جداسازی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کوئینولون‌ها با آنچه از پژوهش‌های گذشته ذکر شد مطابقت داشت (Hadi et al., 2011) (جدول ۴).

بیمارستان رجایی دارای بخش‌های دیالیز و مراقبت ویژه بود. از این بیمارستان باکتری‌های اشرشیاکلی، اشرشیاکلی (غیرفعال)، کلبسیلا پنومونیه مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها جداسازی شد (شکل ۱) که همگی این باکتری‌ها در پژوهش‌های مربوط با بیماری‌های دستگاه ادراری- تناسلی گزارش‌شده‌اند. احتمالاً دلیل جداسازی باکتری‌های مقاوم به این گروه آنتی‌بیوتیکی وجود بخش مراقبت ویژه این بیمارستان است که تجویز آنتی‌بیوتیک برای بیماران این بخش به‌علت شرایط خاص آنها منجر به افزایش مقاومت قابل‌توجه در این باکتری‌ها شده بود. وجود مقاومت در کلبسیلا پنومونیه جداسازی از این بیمارستان با نتایج هادی و همکاران در سال ۲۰۱۱ هماهنگ بود (Hadi et al., 2011).

۵۰ درصد از اشرشیاکلی‌های و ۱۸/۷۵درصد از اشرشیاکلی (غیرفعال) جدا شده از مرکز مدنی به نالیدیکسیک اسید مقاوم بود و درمجموع ۶۸/۷۵ درصد از باکتری‌های جداشده از این مرکز به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (شکل ۲). بیمارستان البرز بخش‌های متنوع درمانی زیادتری نسبت به دو بیمارستان دیگر مورد بررسی در این پژوهش دارد و احتمالاً دلیل اینکه در این بیمارستان باکتری‌های متنوع‌تر و تعداد باکتری مقاوم بیشتری جداسازی شده بود همین امر است (شکل ۳). استفاده از آنتی‌بیوتیک برای افرادی که در بخش‌های جراحی داخلی و یا مراقبت ویژه این بیمارستان بستری هستند، احتمالاً باعث حضور و افزایش جدایه‌های مقاوم سیتروباکتر از پساب بیمارستان البرز شده بود. گزارش‌های بانجارا

جدول ۴- تنوع و درصد باکتری‌های جداشده به تفکیک مراکز مورد بررسی

Table 4. Variety and percentage of isolated bacteria separated by the centers under study

Isolates name	Centers studied in this study				
	Madani hospital	Rajai hospital	Alborz hospital	Nazarabad Water treatment	Azimieh-Gohardasht Water treatment
Escherichia coli	50%	57%	45%	58%	60%
Escherichia coli(Inactive)	39%	22%	10%	_	20%
Klebsiella oxytoca	_	7%	_	_	_
Citrobacter freundii	_	_	29%	3%	_
Klebsiella pneumoniae	5%	7%	_	10%	_
Citrobacter amalonaticus	_	_	7%	3%	_
Citrobacter diversus	_	_	6%	_	20%
Providencia rettgeri	_	_	3%	_	_
Enterobacter cloacae	6%	_	_	10%	_
Serratia marcescens	_	_	_	_	_
Morganella morganii	_	7%	_	16%	_

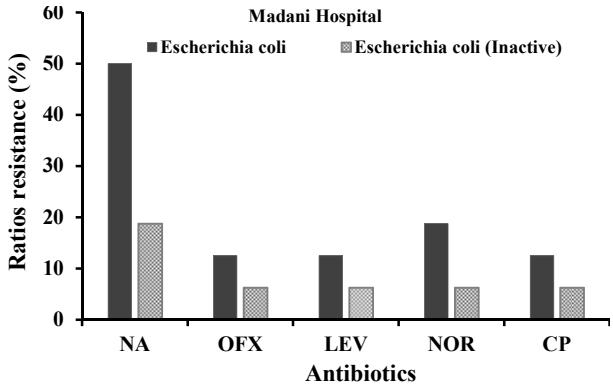

Fig. 2. Percentage of bacteria resistant to the total number of bacteria isolated from Madani Hospital, NA: Nalidixic acid, NOR: Neurofloxacin, OFX: Ofloxacin, CP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin

شکل ۲- درصد باکتری‌های مقاوم به مجموع باکتری‌های جداسازی شده از بیمارستان مدنی. NA: نالیدیکسیک اسید، NOR: نورفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، CP: سیپروفلوکساسین، LEV: لووفلوکساسین

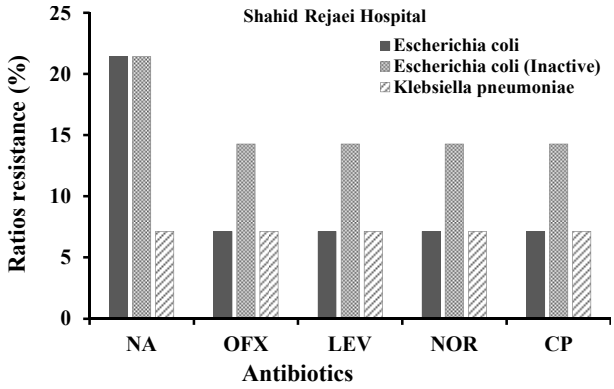

Fig. 1. Percentage of bacteria resistant to the total number of bacteria isolated from Rajai Hospital, NA: Nalidixic acid, NOR: Neurofloxacin, OFX: Ofloxacin, CP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin

شکل ۱- درصد باکتری‌های مقاوم به مجموع باکتری‌های جداسازی شده از بیمارستان رجایی. NA: نالیدیکسیک اسید، NOR: نورفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، CP: سیپروفلوکساسین، LEV: لووفلوکساسین

و همکاران در سال ۲۰۰۳، زها و همکاران در سال ۲۰۰۷، لاوین و همکاران در سال ۲۰۰۷ و میسرا و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مورد این باکتری هماهنگ بود (Lavigne et al., 2007, isra et al., 2012, Jha et al., 2007, Banjara et al., 2003).

با بررسی موقعیت شهری تصفیه‌خانه گوهردشت می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بیشتر باکتری‌های جداسازی شده مربوط به فعالیت‌های شهری در تولید فاضلاب بوده است (جدول ۴).

احتمالاً دلیل حضور باکتری‌های مقاوم به‌دلیل مصرف

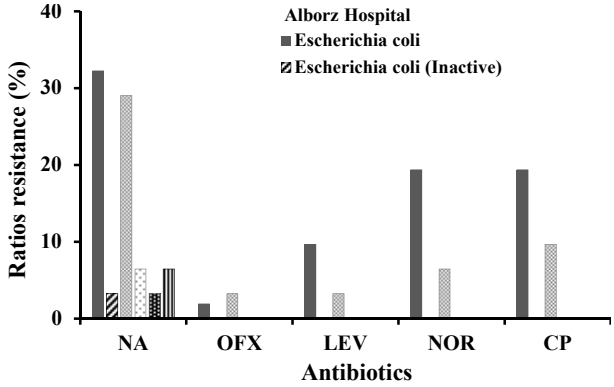

Fig. 3. Percentage of bacteria resistant to the total number of bacteria isolated from Alborz Hospital, NA: Nalidixic acid, NOR: Neurofloxacin, OFX: Ofloxacin, CP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin

شکل ۳- درصد باکتری‌های مقاوم به مجموع باکتری‌های جداسازی شده از بیمارستان البرز. NA: نالیدیکسیک اسید، NOR: نورفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، CP: سیپروفلوکساسین، LEV: لووفلوکساسین

خودسرانه آنتی‌بیوتیک و جاری شدن پساب بیمارستانی به پساب شهری و یا انتقال ژنی در بین باکتری‌ها در بستر پساب بوده است (شکل ۴). شباهت الگوی مقاومت در نمونه جداسازی از تصفیه‌خانه گوهردشت به نمونه‌های پساب بیمارستانی نیز تأییدی بر این مطلب است. باکتری‌های متنوعی از تصفیه‌خانه نظرآباد جداسازی شد که شامل اشرشیاکلی، سیتروباکترفروندی، کلبسیلا پنومونیه، سیتروباکتر آمالوناتیکوس، انتروباکتر کولاسه، مورگانلا مورگانی بود (جدول ۴). همچنین باکتری‌های اشرشیاکلی، مورگانلا مورگانی و سیتروباکتر فروندی جداسازی شده از تصفیه‌خانه نظرآباد همگی به نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند (شکل ۵). با بررسی موقعیت این تصفیه‌خانه مشخص شد که تصفیه‌خانه نظرآباد به مناطق کشاورزی و صنعتی نزدیک است و دلیل تنوع باکتری‌های جداسازی از آن احتمالاً اضافه شدن پساب‌های مناطق کشاورزی و صنعتی به این تصفیه‌خانه می‌تواند باشد.

نتایج الکتروفورز محصول PCR برای ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش در شکل ۶ آمده است. در بررسی ژنی به روی جدایه‌های مقاوم به کوئینولون‌ها این پژوهش مشخص شد که ۶۱ درصد از کل نمونه‌ها و ۵۰ درصد از اشرشیاکلی‌های جداسازی شده حامل ژن *qnr* A بودند (جدول ۵). در کشورهای درحال توسعه میزان شیوع ژن *qnr* A در اشرشیاکلی‌های مورد بررسی قرار گرفته

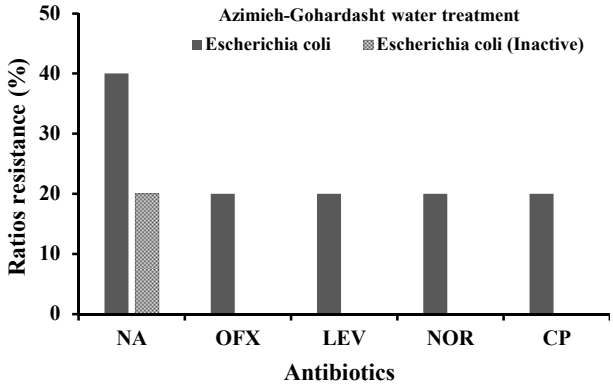

Fig. 4. Percentage of bacteria resistant to the total number of bacteria isolated from Water treatment Azimieh-Gohardasht, NA: Nalidixic acid, NOR: Neurofloxacin, OFX: Ofloxacin, CP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin

شکل ۴- درصد باکتری‌های مقاوم به مجموع باکتری‌های جداسازی شده از تصفیه‌خانه عظیمیه- گوهردشت. NA: نالیدیکسیک اسید، NOR: نورفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، CP: سیپروفلوکساسین، LEV: لووفلوکساسین

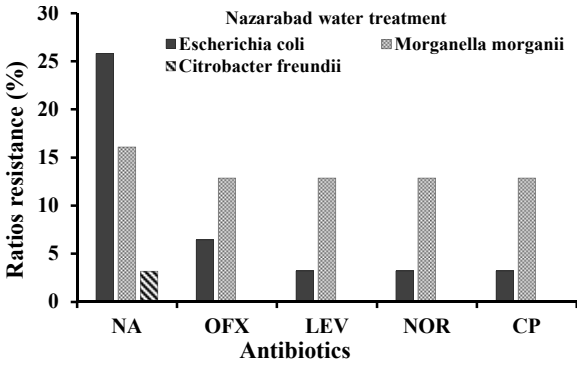

Fig. 5. Percentage of bacteria resistant to the total number of bacteria isolated from Water treatment Nazarabad; NA: Nalidixic acid, NOR: Neurofloxacin, OFX: Ofloxacin, CP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin

شکل ۵- درصد باکتری‌های مقاوم به مجموع باکتری‌های جداسازی شده از تصفیه‌خانه نظرآباد. NA: نالیدیکسیک اسید، NOR: نورفلوکساسین، OFX: افلوکساسین، CP: سیپروفلوکساسین، LEV: لووفلوکساسین

بالا گزارش شده است که دلیل آن مصرف نادرست و بی‌رویه فلوروکوئینولون‌ها است.

این میزان در کشورهایی مانند ژاپن، کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی بسیار کمتر است (Robicsek et al., 2006, Pallecchi et al., 2009, Mansory Jamshidi et al., 2013,Tavanania et al., 2014).

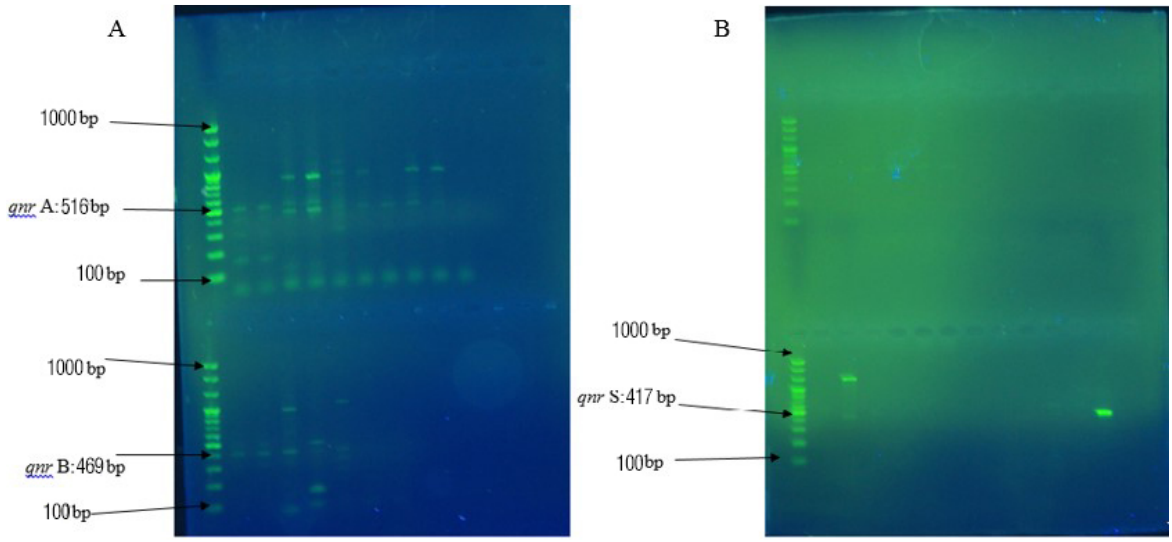

Fig. 6. Results for *qnr* A and *qnr* B resistance genes in Section A: From left to right in the upper half of the gel, the wells include: weight molecule index, positive control, code for resistant isolates isolated from antibiogram test, negative bacterial sample, and in the last well negative control (distilled water). In the lower half of the gel, the wells include: weight molecule index, positive control, resistant isolates isolated from antibiogram test and negative bacterial sample, and in the last well of negative control (distilled water). In the figure, the location of the desired band is determined and where the samples were in front of it, the result is positive. Results of *qnr* S resistance genes in Section B. From left to right in the lower half of the wells gel includes: weight molecule index, isolating sample and in the last well negative control (distilled water)

شکل ۶- نتایج مربوط به ژن‌های مقاومت *qnr* A و *qnr* B در بخش A: از چپ به راست در نیمه بالایی ژل چاهک‌ها شامل: شاخص مولکول وزن، کنترل مثبت، ایزوله‌های مقاوم جداسازی از آزمون آنتی‌بیوگرام، نمونه باکتری منفی و در چاهک آخر کنترل منفی (آب مقطر). در نیمه پایینی ژل چاهک‌ها شامل: شاخص مولکول وزن، کنترل مثبت، ایزوله‌های مقاوم جداسازی از آزمون آنتی‌بیوگرام و نمونه باکتری منفی و در چاهک آخر کنترل منفی (آب مقطر). در شکل محل باند موردنظر مشخص شده و در جایی که نمونه‌ها مقابل آن بود نتیجه مثبت. نتایج مربوط به ژن‌های مقاومت *qnr* S در بخش B؛ از چپ به راست در نیمه پایینی ژل چاهک‌ها شامل: شاخص مولکول وزن، نمونه جدایه و در چاهک آخر کنترل منفی

جدول ۵- درصد تنوع باکتری‌های حاوی ژن‌های *qnr*

Table 5. Percentage of bacterial diversity containing *qnr* genes

Gene name	Percentage diversity of identified isolates
qnr A	Escherichia coli (50%), Morganella morganii (37%), Escherichia coli (Inactive)(13%)
qnr B	Escherichia coli (Inactive) (50%), Klebsiella pneumonia (25%), Escherichia coli (25%)
qnr S	Citrobacter freundii(just one isolate)

نتایج این پژوهش با آنچه از پژوهش‌های گذشته ذکر شد و نیز یافته‌های ازکاموس و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه، هماهنگ بود (شکل ۷) (Ozgumus et al., 2007).

کیم و همکاران در سال ۲۰۱۰ کلبسیلا پنومونیه‌های مقاوم حاوی ژن‌های *qnr* جداسازی کردند که با جداسازی ژن مقاومت *qnr* B از کلبسیلاپنومونیه در این پژوهش هماهنگ بود (جدول ۵ و شکل ۷) (Kim et al., 2010).

جانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ به روی مقاومت انتروباکتریاسه بررسی انجام دادند و حضور ژن‌های *qnr* A و *qnr* B و *qnr* S در بین جدایه‌ها مثبت گزارش شد. همچنین کمترین فراوانی ژن مقاومت *qnr* گزارش شده در بین جدایه‌های این پژوهش مربوط به ژن *qnr* S بود (Jeong et al., 2011).

در پژوهش منصوری جمشیدی و همکاران در سال ۲۰۱۳ کمترین درصد ژن جداسازی مربوط به ژن *qnr* S بود (Mansory Jamshidi et al., 2013). در این پژوهش نیز تنها جدایه سیتروباکتر فروندی دارای این ژن بود (جدول ۵ و شکل ۷).

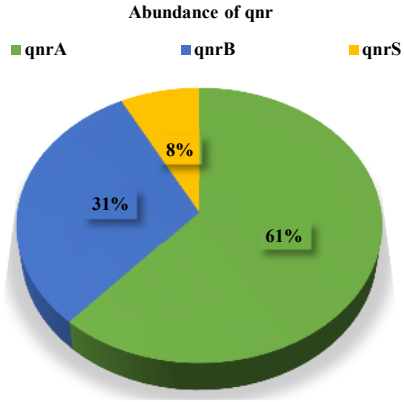

Fig. 7. Abundance of isolated *qnr* genes
شکل ۷- فراوانی ژن‌های *qnr* جداسازی شده

در پژوهش یوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵ یک سویه حاوی هر دو ژن *qnr* A و *qnr* B بود. در این پژوهش نیز جدایه‌های حامل دو ژن مقاومت مشاهده شد (Yousefi et al., 2015).

۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش انواع مختلفی از باکتری‌های مقاوم به فلوروکوئینولون‌ها هم در پساب شهری و هم بیمارستانی مشاهده شد. البته نکته قابل‌توجه در نتایج پساب تصفیه‌خانه شهری موقعیت جغرافیایی بود که این امر تنوع و مقاومت را تحت تأثیر قرار داده بود. همچنین تنوع بخش‌های بستری و یا حتی نوع آنها در ایجاد مقاومت به هر آنتی‌بیوتیک و یا جداسازی باکتری خاص از آن پساب تأثیر داشت. تنوع ژنتیکی در ایجاد مقاومت بین باکتری‌ها در هر نقطه و یا فصل از سال متفاوت است. در این پژوهش تمامی ژن‌های *qnr* مورد بررسی حضور داشتند و گزارش شد. وجود ژن *qnr* S در پساب بیمارستانی نیز این گمان را ایجاد می‌کند که احتمالاً حضور این ژن در بستر پساب و در حین تصفیه پساب بین باکتری‌ها انتقال‌یافته است. حضور ژن *qnr* B و *qnr* A هم در پساب شهری و هم در پساب بیمارستانی گزارش شده بود که با آنچه در این پژوهش مشاهده شد هماهنگ بود، اما سویه‌های جداسازی شده از پساب بیمارستانی با فراوانی بیشتر حاوی این ژن‌ها بودند.

به‌منظور تکمیل نتایج PCR پیشنهاد می‌شود روش‌های مانند بلاست کردن و تعیین توالی ژن‌های مقاومت شناسایی شده در این پژوهش انجام شود تا با مقایسه این توالی‌ها با داده‌های بانک‌های ژن بتوانیم به تفاوت‌ها و یا شباهت توالی‌های یافت شده در این پژوهش با گزارشات از دیگر مناطق پی ببریم. بر اساس نتایج این پژوهش بهبود سیستم‌های تصفیه‌خانه شهری و نیز حضور تصفیه‌خانه در بیمارستان به‌منظور کاهش حضور باکتری‌های مقاوم و غیرمقاوم پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به اینکه قسمتی از مقاومت‌ها به‌دلیل مصرف خودسرانه است کاهش این امر از طریق برنامه‌های آموزشی به جامعه پیشنهاد می‌شود.

۵- قدردانی

نویسندگان مقاله از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کارکنان بیمارستان‌ها و تصفیه‌خانه‌های شهری مورد بررسی در این پژوهش که صمیمانه همکاری و همراهی داشتند، سپاسگزاری می‌کنند.

References

Aali, R., Hosseinpoor, S., Shahryari, A. & Mirhosseini, S. H. 2017. Diversity of genes coding of antibiotic resistance in municipal westewaters. *Rahavard Salamat Journal*, 2(3), 1-14. (In Persian)

Aali, R., Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Moazeni, M., Khanahmad, H. & Shahryari, A. 2016. The role of hospital wastewaters in dissemination of antibiotic resistant bacteria & resistance genes to the environment. *Journal of Environmental Health Enginering*, 3(3), 239-248.

Aali, R., Nikaeen, M., Khanahmad, H., Hejazi, Z., Kazemi, M. & Hassanzadeh, A. 2014. Occurrence of tetracycline resistant bacteria and resistance gene (fetW) in hospital and municipal wastewaters. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(10A), 2560-2566. (In Persian)

Abbassi Ghozzi, I., Jaouani, A., Hammami, S., Martinez Urtaza, J., Boudabous, A. & Gtari, M. 2012. Molecular analysis and antimicrobial resistance of Salmonella isolates recovered from raw meat marketed in the area of Grand Tunis,Tunisia. *Pathologie Biologie*, 60, 49-54.

Afshari, M., Haddadi, A. & Shavandi, M. 2020. Prevalence assay of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* isolated from hospital and urban wastewaters in Karaj city. *Journal of Water and Wastewater*, 31(3)**,** 68-76. (In Persian)

Badalians Gholikand, G. 2016. *Comprehensive microbiology of water and wastewater*. *AIJ Publications*, Tehran, 345-367. (In Persian)

Banjara, M. R., Sharma, A. P., Joshi, A. B., Tuladhar, N. R., Ghimire, P. & Bhatta, D. R. 2003. Surgical wound infections in patients of Tribhuvan university teaching hospital. *Nepal Health Research Council*, 3**,** 5-41.

Chegene Lorestani, R., Akya, A., Elahi, A. & Hamzavi, Y. 2017. Frequency of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectum β-lactamase-producing escherichia coli. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 27(151)**,** 41-51. (In Persian)

Elmanama, A. A. and ElKichaoui, A. Y. & Mohsin M. 2006. Contribution of hospital wastewater to the spread of antibiotic resistance in comparison to non-health. *Journal of Al-Aqsa University*, 10(1)**,** 108-121.

Faghri, J., Dehbanipour, R., Mobasherizadeh, S. & Maleki, N. 2016. Study of antibiotic resistance pattern and mutation in genes gyrA and parC of escherichia coli causing urinary tract infection. *Avicenna Journal of Clinical Medicine (Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Services)*, 23(2)**,** 118-125. (In Persian)

Falah, F., Mirdehghan, S. A., Faramarzi, N., Eslami, G., Taheri, S., Navidinia, M., et al. 2009. Bacterial agents in patients with conjunctivitis in labbafinejad hospital in 2006. *Research in Medicine*, 23(2)**,** 112-116. (In Persian)

Farshchian, M., Roshani, M. & Dehghanzadeh Reihani, R. 2015. Determination of antibiotic resistance pattern in bacteria isolated from municipal wastewater treatment plant. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 25(126)**,** 11-21. (In Persian)

Firoozeh, F., Zibaei, M. & Soleimani Asl, Y. 2014. Detection of plasmid-mediated *qnr* genes among the quinolone-resistant Escherichia coli isolates in Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 80(07)**,** 818-822.

Gadage, D., Wankhade, A., Muley, V. V., Paralikar, A. V. & Bhore, A. V. 2014. Are inactive E.coli always commensals. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 2**,** 426-427.

Ghane, M. & Khanpour Zarenji, R. 2015. Detection of antibiotic resistant gram negative bacteria and plasmid profiling of multi-drug resistantes in hospital effluents. *Medical Sciences*, 24(4)**,** 235-241. (In Persian)

Guardabassi, L., Wong, D. M. L. F. & Dalsgaard, A. 2002. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Research*, 36(8)**,** 1955-1964.

Hadi, M., Shokoohi, R., Ebrahimzadeh Namvar, A., Karimi, M. & Solaimany Aminabad, M. 2011. Antibiotic resistance of isolated bacteria from urban and hospital wastewaters in Hamadan city. *Iranian Journal of Health and Environment*, 4(1)**,** 105-114. (In Persian)

ISIRI 1011, *Drinking water – Microbiological specifications*, 1985. (In Persian)

ISIRI 4208, *Water quality - Sampling for microbiological examination of water* – Code of practice, 2016. (In Persian)

Jeong, H. S., Bae, I. K., Shin, J. H., Jung, H. J., Kim, S. H., Lee, J. Y., et al. 2011. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* . *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(4), 257-264.

Jha, A. K., Singh, J. B. & Dutta, D. 2007. Microorganisms present in discharging otitis media in a group of patients in Kathmandu. *Nepal Medical College Journal*, 9(3)**,** 196-198.

Katzung, B. G. 2017. *Basic and clinical pharmacology*. 14th Ed., McGraw-Hill Education.

Kim, M. H., Lee, H. J., Park, K. S. & Suh, J. T. 2010. Molecular characteristics of extended spectrum β-lactamases in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae and the prevalence of *qnr* in extended spectrum β-lactamase isolates in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Medical Journal*, 51(5)**,** 768-774.

Koneman, E. W. 2006. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* .6th Ed. Washington C:LWW.

Lavigne, J. P., Defez, C., Bouziges, N., Mahamat, A. & Sotto, A. 2007. Clinical and molecular epidemiology of multidrug-resistant Citrobacter spp. infections in a French university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(6)**,** 439-441.

Mansory Jamshidi, N., Pakzad, E., Tabaraee, B. & Hadadi, A. 2013. Frequency of *qnr* genes in escherichia coli strains resistant to quinolones isolated from Ilam Imam Khomani hospital and Tehran Milad hospital. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 21(6)**,** 16-22. (In Persian)

Misra, B., Gandham, N., Sardar, M., Ujagare, M., Angadi, K. & Vyawahare, C. H. 2012. High prevalence of multi-drug resistant Citrobacter spp. From tertiary car hospital, Pimpri, Pune. India. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 25(25)**,** 158-163.

Moghbeli, M., Behnood, V. & Ranjbar, R. A. 2014. Study to determine antibiotic resistance and recognition *qnr* genes in shigella strains isolated from patients admitted to mofid's children medical center, Tehran. *Journal of Microbial World*, 7(1)**,** 49-57. (In Persian)

Monzavi, M. T. 2010. *Urban wastewater, wastewater treatment*. Vol 2. University of Tehran Publishing Institute, Tehran, Iran. (In Persian)

Ng, C., Tay, M., Tan, B., Le, T. H., Haller, L., Chen, H., et al. 2017. Characterization of metagenomes in urban aquatic compartments reveals high prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in wastewaters. *Frontiers in Microbiology*, 8**,** 2200.

Norouzi, A., Hossieni Nave, H., Mohebi, S., Kandekar Ghareman, M. & taati moghadam, M. 2016. Frequency of plasmid-mediated *qnr* A, *qnr* B, and *qnr* S genes and determination of antibiotic susceptibility among quinolones and fluoroquinolones resistance Escherichia coli isolated from Kerman hospitals. *Razi Journal of Medical Sciences*, 148**,** 98-105. (In Persian)

Ohlsen, K., Ternes, T., Werner, G., Wallner, U., Loffler, D., Ziebuhr, W., Witte, W., et al. 2003. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in Staphylococcus aureus in sewage. *Environmental Microbiology*, 5(8)**,** 711-716.

Ozgumus, O. B., Celik-Sevim, E., Alpay-Karaoglu, S., Sandalli, C. & Sevim, A. 2007. Molecular characterization of antibiotic resistant Escherichia coli strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *The Journal of Microbiology*, 45(5)**,** 379-387.

Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Bartalesi, F., Sennati, S., Gamboa, H., et al. 2009. High prevalence of *qnr* genes in commensal Enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6)**,** 2632-2635.

Papa, M., Foladori, P., Guglielmi, L. & Bertanza, G. 2017. How far are we from closing the loop of sewage resource recovery? A real picture of municipal wastewater treatment plants in Italy. *Journal of Environmental Management*, 198**,** 9-15

Ramteke, P. W., Gaur, A., Pathak, S. P. & Bhattacharjee, J. W. 1990. Antibiotic resistance of coliforms in drinking water in rural areas. *The Indian Journal of Medical Research*, 91**,** 185-188.

Reinthaler, F. F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., et al. 2003. Antibiotic resistance of E.coli in sewage and sludge. *Water Research*, 37(8)**,** 1685-1690.

Robicsek, A., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10)**,** 629-640.

Rutgersson, C., Fick, J., Marathe, N., Kristiansson, E., Janzon, A., Angelin, M., et al. 2014. Fluoroquinolones and *qnr* genes in sediment, water, soil, and human fecal flora in an environment polluted by manufacturing discharges. *Environmental Science and Technology*, 48(14)**,** 7825-7832.

Salehi, M., Hekmatdoost, M. & Hosseini, F. 2013. Quinolone resistance associated with mexAB-oprM secretory pump from Pseudomonas aeruginosa isolates. *Journal of Microbial World*, 4(17)**,** 290-298.

Salehi, M., Tabibzadeh, M. & Fallahian, M. R. 2015. Prevalence of *qnr* gene in clinical Acinetobacter isolates. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 5(18)**,** 83-88. (In Persian)

Shaghaghi, B., Nakhost Lotfi, M., Mahmmodi, N. S. & Pourshafiei, M. R. 2007. Different strains of enterococci in sewage treatment plants in Tehran. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, 12(37)**,** 61-66. (In Persian)

Silva, J., Castillo, G., Callejas, L., Lopez, H. & Olmos, J. 2006. Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5)**,** 533-540.

Soleimani Asl, Y., Zibaei, M. & Firoozeh, F. 2013. Detection of *qnr*A gene among quinolone-resistant Escherichia coli isolated from urinary tract infections in Khorram Abad during 2011-2012. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*, 17(5)**,** 488-494.

Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. & Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4)**,** 664-689.

Tavanania, S., Ranjbar, R. & Sabokbar, A., 2014. Genetic study of antibiotic resistance associated with quinolon antibiotics in Escherichia coli isolates isolated from water resources of Alborz province. *Islamic Azad University, Karaj Branch*, 35**,** 36-48. (In Persian)

Vilanova, X., Manero, A., Cerda-Cuellar, M. & Blanch, A. R. 2004. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2)**,** 279-288.

Wang, M., Guo, Q., Xu X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., et al. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnr* C, found in a clinical isolate of Proteus mirabilis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5)**,** 1892-1897.

Wayne, p. A. 2012. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22th Informational Supplement M100-S22*, Institute Clinical and Laboratory Standards, Philadephia, USA.

Xia, R., Ren, Y. & Xu, H. 2013. Identification of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria from hospital wastewaters and receiving waters in the Jinan area, China. *Microbial Drug Resistance*, 19(6)**,** 446-456.

Yousefi, S., Mojtahedi, A., Shenagari, M. & Atrkar Roushan, Z. 2015. The relation of *qnr* genes of the induction of resistance to ciprofloxacin in Escherichia coli. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, 20(5)**,** 52-60. (In Persian)

Zhang, X. X., Zhang, T. & Fang H. H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82**,** 397-414.