

شناسایی مولکولی ژن های حدت *agfA* و *mgtC* در سویه های سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از کودکان مبتلا به گاستروانتریت به روش Multiplex-PCR و تعیین الگو حساسیت آنتی بیوتیکی آن

ساره امیری (MSc)^۱، غلامعلی مرادلی (PhD)^{۲*}

۱-دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه

۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه

دریافت: ۹۵/۲/۲۶، اصلاح: ۹۵/۳/۱۲، پذیرش: ۹۵/۵/۶

خلاصه

سابقه و هدف: گاستروانتریت ناشی از سالمونلا در انسان ها شایع است و به عنوان یک معضل جهانی در بهداشت عمومی مطرح می باشد. هدف از این مطالعه شناسایی ژن های *agfA* و *mgtC* در سویه های سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از نمونه های مدفوعی به روش multiplex-PCR و تعیین الگوی مقاومتی این سویه ها می باشد. **مواد و روش ها:** این مطالعه مقطعی بر روی سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از نمونه مدفوع کودکان مبتلا به گاسترو انتریت بستری شده در بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران انجام گردید. با استفاده از روش Multiplex-PCR میزان فراوانی ژن های *agfA* و *mgtC* مورد بررسی قرار گرفت و همچنین با استفاده از روش انتشار از ژل و بر اساس دستورالعمل CLSI میزان حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه های فوق بررسی شد.

یافته ها: از مجموع ۲۰۰ نمونه مدفوع کشت داده شده تعداد ۶۰ جدایه سالمونلا تیفی موریوم بدست آمد که ۲۴ جدایه به طور همزمان واجد هر دو ژن *agfA* و *mgtC* بودند و ۵۲ جدایه واجد ژن *mgtC* و ۴۰ جدایه حامل ژن *agfA* بودند. تمامی سویه ها (۱۰۰٪) به سیپروفلوکساسین حساس و همچنین ۸۵٪ سویه ها به نیتروفوران توئین مقاوم بودند. **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که فراوانترین ژن حدت در سویه های سالمونلا تیفی، *mgtC* با میزان (۸۶/۶٪) و کمترین درصد فراوانی مربوط به ژن حدت، *agfA* به میزان (۶۶/۶٪) بوده است. همچنین نتیجه گرفته شد که جدایه های فوق نسبت به سیپروفلوکساسین ۱۰۰٪ حساس بوده اند و نسبت به نیتروفوران توئین ۸۵٪ مقاوم ترین بوده است. **واژه های کلیدی:** سالمونلا تیفی موریوم، ژن های *agfA* و *mgtC* حساسیت آنتی بیوتیکی.

مقدمه

رمزدهی شده و در برخی (نه در همه) سروواری های سالمونلا دیده می شوند. وجود ژن *agfA* در یک سروار متغیر است؛ برای مثال تنها ۵۰٪ سویه های سالمونلا تیفی موریوم از لحاظ آنتی ژن *AgfA* مثبت هستند. فیمبریه های کورلی (Curli) نوعی از فیمبریه هستند که با چرخه بیرون سلولی تجمع/رسوب گردهمایی می نمایند (۹-۷). جزء اصلی سازنده فیمبریه کورلی در اشریشیا کلی پروتئین CsgA است که با معادل آن در سالمونلا تیفی موریوم بنام *AgfA* دارای ۸۶٪ مشابهت است (۱۰). پس از اتصال و کلونیزاسیون، زنده ماندن و تکثیر سالمونلاها در درون ماکروفاژها کلید موفقیت این ارگانیسم ها در بیماریزایی می باشد. اکثر ژن های دخیل در پاتوژن این باکتری در نواحی به نام جزایر پاتوژنسیته سالمونلاها (SPI) کد می شوند (۸). در سالمونلا سه سیستم حمل و نقل جهت منیزیوم دو ظرفیتی (Mg^{2+}) بنام *CorA* و *MgtA* و *MgtB* وجود دارد. دو سیستم جذب منیزیوم دوظرفیتی بوسیله جایگاه *mgtA* و

استقرار ارگانیسم ها در بافت و اتصال شان به بافت هدف، اولین مرحله در بیماریزایی می باشد (۱ و ۲). فیمبریه ها اندامک های سطحی فیلامنتی هستند که از هزاران نسخه از تحت واحد اصلی بنام fimbrillin و یک یا تعداد معدودی کپی از تحت واحد چسبنده که اغلب در نوک فیلامان قرار دارند، تشکیل شده است (۳ و ۴). یک سلول سالمونلا ممکن است ۲۰۰ تا ۳۰۰ کپی از فیمبریه را بیان نماید که تحت تغییر فاز قرار می گیرند (۵). فیمبریه های انتروباکتریاسه به دو گروه بطور کلی حساس به مانوز (MS=Mannose Sensitive) و مقاوم به مانوز (MR= Mannose Resistant) تقسیم می شوند (۶). بر همین اساس انواع مختلفی از فیمبریه وجود دارند که یکی از آنها فیمبریه تیپ IV یا همان GVVPQ است که اولین بار در اشریشیا کلی بعنوان فیمبریه دارای واکنش متقاطع با SEF17 (فیمبریه ۱۷ کیلودالتونی سالمونلا انترتییدیس) شناسایی شدند. تحت واحدهای SEF17 بوسیله ژن *agfA* (فیمبریه متمایل به تجمع)

این مقاله حاصل پایان نامه ساره امیری دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی و طرح تحقیقاتی به شماره ۶۲۳۳۰۵۰۷۹۴۱۰۰۳ دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر غلامعلی مرادلی

آدرس: ساوه، بلوار شهید بهشتی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی. تلفن: ۰۸۶-۴۲۳۳۳۳۴۲

E-mail: Moradli.mic@gmail.com

مول در لیتر $MgCl_2$ ۰/۵، واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می‌باشد. واکنش Multiplex-PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) به شرح زیر انجام شد. یک سیکل ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس (دناوراسیون اولیه) سپس ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۵۹ درجه سلسیوس و مرحله بسط ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و نهایتاً یک سیکل ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس. محصولات Multiplex-PCR از نظر حضور ژن های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در مقایسه با سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم ATCC 14028 به عنوان کنترل مثبت و سویه استاندارد اشرشیاکلی ATCC 25923 به عنوان کنترل کیفی آنالیز شدند (۱۴).

جدول ۱. توالی الیگونوکلیوتیدی توالی های آغازگر (پرایمر) استفاده شده

در مطالعه پیش رو

پرایمرها	توالی پرایمر (۳-۵)	طول محصولات (bp)
agfA	F=5'-TACAAGGGATTCCGGCATCG-3'	۲۶۱
	R=5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	
mgtC	F=5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3'	۶۵۵
	R=5'-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3'	

یافته ها

نتایج نشان داد که در مجموع تعداد ۶۰ (۳۰٪) جدایه سالمونلا تایفی موریوم از مجموع ۲۰۰ نمونه مدفوع تحت بررسی بدست آمد. در نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی بیشترین میزان مقاومت به نیتروفرانتوئین و نالیدیکسیک اسید به ترتیب (۸۵٪) و (۷۰٪) بود. همچنین تمامی ۶۰ ایزوله (۱۰۰٪) به ایمی پنم، سیپروفلوکساسین و سفالکسین حساس بودند (جدول ۲). آنالیز مولکولی ژن های تحت مطالعه نشان داد که ۵۲ نمونه (۸۶/۶٪) واجد ژن *mgtC* و ۴۰ نمونه (۶۶/۶٪) واجد ژن *agfA* بودند (شکل ۱). تکثیر همزمان ژن ها در واکنش Multiplex-PCR نشان داد که ۲۴ (۴۰٪) جدایه به طور همزمان حامل ژن های *mgtC* و *agfA* بودند.

جدول ۲. فراوانی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی

سویه های تحت مطالعه

عامل ضد میکروبی (میکرو گرم)	S (حساس) تعداد(درصد)	I (نیمه حساس) تعداد(درصد)	R (مقاوم) تعداد(درصد)
آموکسی سیلین ۲۵ µg	۵۵(۹۱/۶)	۵(۸/۴)	۰(۰)
نیتروفرانتوئین ۳۰۰ µg	۶(۱۰)	۳(۵)	۵۱(۸۵)
ایمی پنم ۱۰ µg	۶۰(۱۰۰)	۰(۰/۰)	۰(۰/۰)
نالیدیکسیک اسید ۳۰ µg	۱۳(۲۱/۶)	۵(۸/۴)	۴۲(۷۰)
سیپروفلوکساسین ۵ µg	۶۰(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)
سفالکسین ۳۰ µg	۶۰(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)
مروپنم ۱۰ µg	۵۹(۹۸/۴)	۱(۱/۶)	۰(۰)
تری متوپریم/سولفومتاکسازول ۱۵ µg	۴۷(۷۸/۳)	۰(۰)	۱۳(۲۱/۷)

mgtCB موجود در SPI-3 رمزدهی می شوند (۱۱). جایگاه *mgtCB* دو پروتئین *MgtC* و *MgtB* را کد می‌کند. *Nikbakht* و همکاران اظهار کردند که *MgtC* ممکن است در تنظیم هموستازی یونی سلول نقش داشته باشد (۱۲). بر اساس مطالعات *Nikbakht* و همکاران *MgtC* بعنوان تحت واحدی پمپ سدیم/از پتاسیم (Na^+/K^+ ATPase) فعالیت می‌کند و بدین سان در تنظیم پتانسیل غشا دخالت دارد (۱۲). افزودن آنتی بیوتیک به جیره غذایی دامها، استفاده نادرست، بیش از حد و خودسرانه آنتی بیوتیک ها و عدم نظارت دقیق در تجویز دارو سبب بروز سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک شده است (۶).

با توجه به شباهت *mgtC* موجود در سامونلاتیفی با پمپ سدیم/پتاسیم *agfA* با *csgA* موجود در فیمبریه کورلی و این مطالعه به منظور شناسایی ژنهای *agfA* و *mgtC* در سویه های سالمونلا تیفی موریوم جدا شده از نمونه های مدفوعی کودکان به روش multiplex-PCR و تعیین الگوی مقاومتی این سویه ها می باشد (۷و۸).

مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی طی یک بازه زمانی ۷ ماهه (از ابتدای خرداد لغایت انتهای آذر) ۱۳۹۴ انجام شد تعداد ۲۰۰ نمونه مدفوع از بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا در بیمارستان مرکز طبی اطفال تهران در ظروف پلاستیکی و درب دار استریل جمع آوری شد. تمامی نمونه ها به محیط آزمایشگاه منتقل گردید و به منظور غنی سازی به محیط کشت سلیت F (مرک، آلمان) منتقل شدند و به مدت ۱۲-۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری انجام گردید. نمونه های مدفوع کشت داده شده در محیط SF را در مرحله بعد بر روی محیط گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار (XLD) و سالمونلا-شیگلا (SS) آگار (مرک، آلمان) کشت داده و در ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت انکوبه شد. کلتی های رشد کرده و مشکوک با استفاده از تست های روزمره و استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی مانند: تریپل شوگر آیرون آگار (TSI)، Sulfide Indol Motility=SIM، متیل رد-وگس پرسکوئر (MR-VP)، سیمون سیترا و تولید H_2S مورد شناسایی قرار گرفتند. آزمون سروتایپینگ برای مشخص نمودن آنتی ژن های سوماتیک (O)، فلاژله (H) و کپسولی (Vi) با استفاده از آنتی سرم های مونو والان (MAST) و پلی والان تهیه شده از شرکت بهار افشان به روش Slide agglutination انجام گردید. در تمامی مراحل آزمون از سویه استاندارد سالمونلا تیفی موریوم ATCC 14028 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

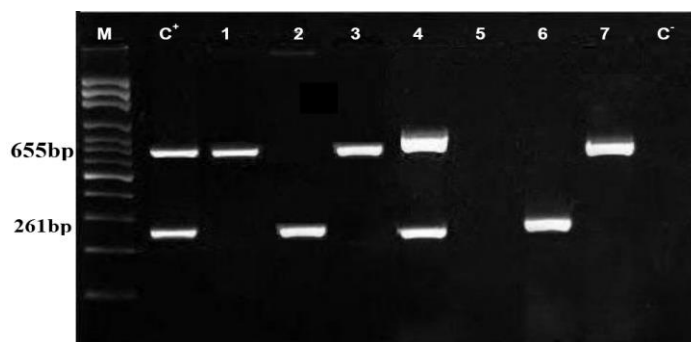
حساسیت آنتی بیوتیکی سویه ها از روش انتشار از دیسک و بر روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) (ساخت شرکت مرک، کشور آلمان) و بر اساس دستورالعمل موسسه استاندارد آزمایشگاه و بالینی (CLSI) صورت گرفته است (۱۳). به منظور آنالیز مولکولی ژنهای تحت مطالعه DNA ژنومی با استفاده از کیت DNA سیناژن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استخراج گردید. تست Multiplex-PCR برای شناسایی ژن های *agfA* و *mgtC* (۱۴) با استفاده از پرایمر های اختصاصی انجام شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی

ژن های *agfA* و *mgtC* بودند. این یافته ها با مطالعه Amini و همکاران متفاوت است که این اختلاف می تواند در نتیجه نوع نمونه (دامی در مقایسه با انسانی) باشد (۱۶). Gritli و همکاران (۱۷) دریافتند که تمامی سویه های (۱۰۰٪) سالمونلا انتریتیدیس جدا شده از جوجه حامل ژن *mgtC* بودند. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت به نیتروفورانتوئین (۸۵٪) و نالیدیکسیک اسید (۷۰٪) بود که مشابه نتایج بدست آمده از مطالعه Banisaeed و همکاران بوده است (۱۸). همچنین تمامی ۶۰ ایزوله (۱۰۰٪) بدست آمده در پژوهش حاضر به ایمی پنم، سیپروفلوکساسین و سفالکسین حساس بودند. لذا پیشنهاد می گردد آنتی بیوتیک های مذکور به عنوان گزینه درمانی (First choice) برای درمان عفونت ناشی از این سویه ها استفاده گردد. این نتایج با مطالعات انجام گرفته در آمریکا (۱۹) و انگلستان (۲۰) همخوانی دارد.

Spiliopoulou و همکاران (۲۱) نشان دادند که تمام ایزوله ها با سفتریاکسون و سیپروفلوکساسین حساس بودند که با مطالعه حاضر تطابق دارد. نتایج مقاومت به ایمی پنم در مطالعه پیش رو با مطالعه Ranjbar و همکاران (۲۲)، Soltan Dallal و همکاران (۲۳)، Diniz-Santos و همکاران (۲۴) همخوانی دارد. Ranjbar و همکاران (۲۲) تایید نمودند که استفاده بیش از حد و یا انتقال عناصر مقاومت مانند پلاسمید در بین گونه ها انسانی سالمونلا می تواند دلیل بروز مقاومت باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد ساوه و آزمایشگاه میکروب شناسی پاسارگاد و کلیه همکارانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.



شکل ۱. نتایج آزمون M-PCR از چپ به راست: (شرکت سینازن، ایران) Ladder، 100bp، کنترل مثبت (سالمونلا تیفی موریوم ATCC ۱۴۰۲۸)، کنترل منفی (اشریشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۳)، *agfA* (۲۶۱bp) و *mgtC* (۶۵۵bp)، ۱-۷؛ سویه های بالینی سالمونلا.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه ژن ها مورد مطالعه پروتئین هایی را کد می نمایند که در واکنش بین میزبان و باکتری دخالت می کنند و این پروتئین های تاثیرگذار (افکتور) نقش مهمی در بقا و تکثیر سالمونلا دارند. نتایج این مطالعه مشابه با مطالعه Alphons و همکاران (۱۵) نقش ژن های ویروالانس را در برهم کنش انگل-میزبان نشان می دهد. محصول ژن *agfA* با ایفای نقش در حرکت لغزشی (Gliding motility) سبب اتصال باکتری به سلول های اپی تلیال و در نهایت باعث تجمع باکتری شده است. در ناحیه SPI3 کروموزوم اصلی باکتری ژن دیگری وجود دارد که پروتئینی به نام *mgtC* را کد می کند. این پروتئین در غلظت کم mg^{2+} و شرایط رشد در درون ماکروفاژ تولید می شود و در انتقال یون منیزیم به درون باکتری نقش دارد. در این مطالعه ۲۴ (۴۰٪) جدایه به طور همزمان حامل

Molecular Identification of Virulence Genes (*agfA* and *mgtC*) in *Salmonella Typhimurium* Strains Isolated from Children with Gastroenteritis Using Multiplex PCR Method and Determination of Their Antibiotic Susceptibility Pattern

S. Amiri (MSc)¹, Gh. Moradli (PhD)^{*2}

1. Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran.

2. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University of Saveh, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(10); Oct 2016; PP: 40-5

Received: May 15th 2015, Revised: Jun 1st 2016, Accepted: Jul 6th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Gastroenteritis caused by *salmonella* is common in humans and is regarded as a global public health issue. The aim of this study is to identify *agfA* and *mgtC* genes in *salmonella typhimurium* strains isolated from stool samples using multiplex PCR method and to determine the resistance patterns of these strains.

METHODS: This cross-sectional study was conducted on *salmonella typhimurium* isolated from children with gastroenteritis admitted to Children's Hospital Medical Center in Tehran. Frequency of *agfA* and *mgtC* genes was evaluated using multiplex PCR method. In addition, antibiotic susceptibility of these isolates was studied using gel diffusion method and according to CLSI guidelines.

FINDINGS: Of total 200 stool samples, 60 *salmonella typhimurium* isolates were obtained. Molecular analysis showed that 24 isolates contained both *agfA* and *mgtC* genes at the same time, while 52 isolates contained *mgtC* gene and 40 isolates carried *agfA* gene. All strains (100%) were susceptible to ciprofloxacin and 85% of strains were resistant to nitrofurantoin.

CONCLUSION: Results of the study demonstrated that most frequent virulence gene in these strains was *mgtC* (86.6%) and the least frequent virulence gene was *agfA* (66.6%). Moreover, it was concluded that these isolates were 100% susceptible to ciprofloxacin and were the most resistant to nitrofurantoin (85%).

KEY WORDS: *Salmonella typhimurium*, *mgtC* and *agfA* genes, Antibiotic susceptibility.

Please cite this article as follows:

Amiri S, Moradli Gh. Molecular Identification of Virulence Genes (*agfA* and *mgtC*) in *Salmonella Typhimurium* Strains Isolated from Children with Gastroenteritis Using Multiplex PCR Method and Determination of Their Antibiotic Susceptibility Pattern. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(10):40-5.

*Corresponding author: Gh. Moradli (PhD)

Address: Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R.Iran

Tel: +98 86 42433342

E-mail: Moradli.mic@gmail.com

References

1. Ranjbar R, Salimkhani E, Sadeghifard N, Yazdi JZ, Morovvati S, Jonaidi N, et al. An outbreak of gastroenteritis of unknown origin in Tehran, July 2003. *Pak J Biol Sci*. 2007; 10(7):1138-40.
2. Su LH, Wu TL, Chia JH, Chu C, Kuo AJ, Chiu CH. Increasing ceftriaxone resistance in *Salmonella* isolates from a university hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(6):846-52.
3. Halawani E, Shohayeb M. Molecular characterization of multiple antibiotic resistance in *salmonella enterica* serovar typhimurium and eenteritidis isolated in saudi arabia. *World J Med Sci*. 2008; 3(2):65-70.
4. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(9):2977-81.
5. Ebner PD, Mathew AG. Three molecular methods to identify *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104: PCR fingerprinting Multiplex PCR and rapid PFGE. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 205(1):25-9.
6. Sang Y, Ren J, Ni J, Tao J, Lu J, Yao YF. Protein acetylation is involved in *salmonella enterica* serovar typhimurium virulence. *J Infect Dis*. 2016; 213(11): 1836-45.
7. Oueslati W, Rjeibi MR, Mhadhbi M, Jbeli M, Zrelli S, Ettriqui A. Prevalence, virulence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. strains, isolated from beef in Greater Tunis (Tunisia). *Meat Sci*. 119; 2016:154-9.
8. Afshari-Nic S, Zahraei-Salehi T, Jamshidi A. Detection of *salmonella* spp contamination of carcasses salaughtered in poultry abattoir in Mashhad, Iran. *Arch Razi Ins*. 2007; 62(4):229-33.
9. Ranjbar R, Mirzaee A. Determining of the variety of genotypes in *Salmonella* Typhimurium by ERIC-PCR. *J Babol Univ Med Sci*. 2013; 15(1):51-7.[In Persian]
10. Jeníková G, Pazlarová J, Demnerová K. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Int Microbiol*. 2010;3(4):225-9.
11. Karami A, Ranjbar RE, Ahmadi Z, Safiri Z. Rapid detection of different serovares of *Salmonella* entrica by multiplex PCR. *Iran J Pub Health*. 2007;36(2):38-42.
12. Nikbakht Gh, Tajbakhsh H. Study of *salmonella* plasmid virulence genes (spv) in *Salmonella enterica* serovars isolated in Iran. *J Vet Res*. 2004; 59(2):137-40.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. M100-S25. 2015; 35(3): 44-50. Available from: http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf
14. Namimatsu T, Asai T, Osumi T, Imai y, Sato S. Prevalence of the virulence plasmid in *Salmonella* Typhimvrium isolates from pigs. *J Vet Med Sci*. 2006;68(2).187-8.
15. van Asten AJ, van Dijk JE. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 44(3):251-9.
16. Amini K, Zahraei Salehi T, Nikbakht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. *Afr J Microbiol Res*. 2010; 4(21): 2202-10.
17. Gritli A, Daboussi T, Ben Moussa M, Abassi MS. Prevalence and characterizaton of *Salmonella* in chicken consumed in military cantines. *J New Sci*. 2015; 12: 908-14.
18. Banisaeed SR, Aslani MM, Nikbin VS, Faezi M, Shahcheraghi F. Antibiotic resistant pattern in *salmonella* spp. isolated from clinical samples in Tehran. *Iran J Infect Dis Tropic Med*. 2011;16(55):39-45. [In Persian]
19. Travers K, Michael B. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clin Infect Dis*. 2002;34(Suppl 3):S131-4.

20. Meakins S, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschäpe H, Cormican M, et al. Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microb Drug Resist*. 2008; 14(1):31-5.
21. Spiliopoulou I, Zografou S, Goula A, Dimitracopoulos G, Christofidou M. Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of *Salmonella enterica* from southwestern Greece. *Chemotherapy*. 2007; 53(6):392-6.
22. Ranjbar R, Naghoni A, Izadi M, Jonadi Jafari N, Panahi Y. Isolation and antibiotic resistance pattern determination of *Salmonella typhimurium*. *J Mil Med*. 2009; 11(2): 115-8. [In Persian]
23. Soltan Dallal MM, Rastegar Lari A, Sharifi Yazdi MK. Pattern of serotyping and antibiotic resistance of *Salmonella* in children with diarrhea. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2014;16(1):100-5. [In Persian]
24. Diniz-Santos DR, Santanal JS, Barretto JR, Andrade MGM, Silva LR. Epidemiological and Microbiological Aspects of Acute Bacterial Diarrhea in Children from Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005; 9(1):77-83.