

بررسی وجود ژن‌های مقاوم به کلسیتین (mcr- pmr) در کلبسیلاپنومونیه

جداشده از شیر خام با روش Multiplex-PCR

نگین ملکی^۱، کیومرث امینی^{۲*}، غلامرضا جوادی^۱

چکیده

کلبسیلا پنومونیه باکتری گرم منفی روده‌ای است که سبب عفونت‌های بیمارستانی می‌شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی ژنوتیپی ژن‌های مقاوم به کلسیتین (mcr- pmr) در کلبسیلا پنومونیه جداشده از شیر خام با روش Multiplex-PCR است.

از ۲۲۰ تانک نگهداری شیر خام در مراکز نگهداری شیر در سال ۱۳۹۷ در تهران نمونه‌برداری صورت گرفت. سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از آزمون‌های روتین بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی استاندارد شناسایی شدند. استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت تجاری مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (MBK0041) انجام شد. بعد از انجام آزمون PCR در دستگاه ترموسایکلر جهت بررسی حضور ژن‌های mcr و pmr محصول نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ انتقال داده شده و با اتیدیوم پروماید رنگ‌آمیزی و سپس در دستگاه ژل داگ مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه به بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی دو ژن mcr و pmr در ۶۰ جدایه باکتری کلبسیلا پنومونیه پرداخته شد. در این میان ژن mcr با فراوانی ۱۱٪ (۱۱/۸۳٪) و ژن Pmr با فراوانی ۷٪ (۱۱/۶٪) گزارش شد. ردیابی دو ژن مورد مطالعه با روش مالتیکلس PCR انجام شد که به نظر می‌رسد این اولین مورد مطالعه بر روی شیر و بررسی دو ژن mcr و pmr باشد، که در ایران از نمونه‌های شیر جداسازی شده از تانک نگهداری شیر در دامداری‌های صنعتی از باکتری کلبسیلا پنومونیه صورت گرفته است، و دو ژن مذکور به عنوان مارکر اصلی شناسایی شدند.

واژگان کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کلسیتین، mcr- pmr شیر خام

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۸

مقدمه

شیر و فرآورده‌های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه‌ی انسان نقش بسزایی دارند (۱). شیری که از پستان گاو سالم دوشیده می‌شود فاقد باکتری می‌باشد، ولی غالباً با انواع میکروب‌ها و استرپتوکوکوس‌هایی که معمولاً در مجاری شیر و ابتدای پستان به سر می‌برند آلوده می‌شود (۲). همچنین کلبسیلاپنومونیه از عوامل مهم و مؤثر در ایجاد تورم

پستان و یک پاتوژن مهم بیمارستانی مطرح است. این باکتری در ایجاد انواع مختلفی از عفونت‌ها نقش دارد که موجب پنومونی، سپتی‌سمی، اسهال، ایجاد آبسه در کبد، مننژیت، عفونت‌های ارثاری و باکتری می‌شود. افزایش ظهور مقاومت چند دارویی در بین سویه‌های کلبسیلاپنومونیه و مقاومت دارویی به این آنتی‌بیوتیک‌ها رو به افزایش است. کلسیتین آنتی‌بیوتیکی از خانواده پلی میکسین‌هاست که با تأثیر بر روی غشای سلولی و تغییر در میزان نفوذپذیری آن، باعث مرگ سلول باکتری شده و نیز تا حدودی موجب خنثی‌سازی اندوتوکسین باکتری‌ها می‌شود (۴).

مکانیسم مقاومت به کلسیتین شامل تغییر در مسیر بیوسنتتیک لیپید A و تغییر در سطح لیپوپلی ساکارید باکتری است (۴ و ۵). ژن‌های پلاسمیدی و کروموزومی متنوعی در ایجاد مقاومت کلسیتین نقش دارند که از آن جمله می‌توان به ژن‌های mcr1 و mcr2 در اپران pmr نام برد (۶). ژن mcr-1 که به عنوان اولین ژن مقاومت به کلسیتین وابسته به پلاسمید در غذای حیوانات، غذا و بیماران در چین جدا شد و از آن زمان سوش‌های mcr-1 مثبت در سرتاسر جهان از انتروباکتریاسه‌ها گزارش شدند (۷). کلسیتین در اطراف لیپوپلی ساکارید در غشای خارجی شارژ منفی ایجاد می‌کند و توسط جانشین کردن یون‌های کلسیم و منیزیم باعث نفوذ می‌شود. محصولات ژن pmr (مقاومت به پلی میکسین) تغییرات جابجایی را در LPS افزایش می‌دهد که سبب کاهش اتصال گلیسین به سطح خارجی باکتری‌های گرم منفی شده و باعث مرگ سلول باکتری می‌شود (۸ و ۹).

اپران ژن pmr باعث کاهش اتصال کلسیتین به لیپید A شده و این ژن با فعال کردن کیناز هیستیدین نقش تنظیمی

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ساروه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساروه، ایران
 *dr_kumarss_aminii@yahoo.com

حائز اهمیت می‌باشد. *mcrAB* از جمله مهمترین پمپ‌های ترشحی هستند که باعث مقاومت کلبسیلا پنومونیه به پلی میکسین‌ها می‌شوند. ژن‌های *mcrA* و *mcrB* بر روی کروموزوم قرار دارند و یک پمپ ترشحی چنددارویی را که در اکثر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه وجود دارد، کد می‌کنند. پمپ ترشحی *mcrAB* پمپ‌های اصلی ایجادکننده مقاومت ذاتی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه علیه فلوروکینولون‌ها، به ویژه سپروفلوکسازین از طریق تغییر نفوذپذیری در غشای پروکاریوتی، دفع آنتی بیوتیک به محیط خارجی و کاهش غلظت داخلی آنتی بیوتیک می‌باشد. پمپ ترشحی *mcrAB* جزء افلاکس پمپ‌های خانواده RND طبقه بندی می‌شود که این خانواده از مهمترین پمپ‌های ترشحی MDR بوده و نقش اصلی در مقاومت چنددارویی در برابر باکتری‌ها ایفا می‌کنند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی وجود ژن‌های مقاوم به کلبسیلا پنومونیه (*mcr-pmr*) در کلبسیلا پنومونیه جدا شده از شیر خام با روش Multiplex-PCR می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و ایزولاسیون میکروبی

این یک مطالعه توصیفی در علوم پایه بوده و نمونه‌گیری به صورت تصادفی از ۲۲۰ تانک نگهداری شیر خام در مراکز نگهداری شیر در سال ۱۳۹۷ در تهران نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های شیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط استاندارد به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. سپس شیر مطابق روش رایج میکروبیولوژی بعد از تهیه رقت در محیط Violet Red Bile Agar (VRBA) مطابق استاندارد ایران کشت داده شد. سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از آزمون‌های رایج بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی شامل: سیمون سترات، اوره‌از، اندول، TSI، MRVP استفاده شد (۱۰).

در مقاومت به کلبسیلا ایجاد می‌کند. برای مقاومت به کلبسیلا، ۱۱ ژن با تغییر لیپید A در مسیر 4-L-Ara4N-(deoxy-L-arabinose) amino-4 توانایی ایجاد مقاومت در برابر کلبسیلا را دارند. این ژن‌ها شامل *ugd*, *arnA_dh*, *pmrD*, *pmrL*, *pmrJ*, *arnT*, *arnC*, *arnB*, *arnA_FT* و *pmrM* می‌باشد. ژن *pmr* می‌تواند از طریق دو سیستم باعث تغییر در LPS شود. این ژن می‌تواند از طریق شارژ مثبت در مولکول‌های ارابینوز و پنتا اریترول لیپید A باکتری مانع از تاثیر کلبسیلا بر روی باکتری شود. این تغییر باعث کاهش شارژ منفی لیپید a و همچنین LPS باکتری شود. ژن *pmr* کلاس‌های مختلفی دارد که مهمترین آن *pmrA*, *pmrB* می‌باشند. مقاومت به کلبسیلا (Colr) به طور فزاینده‌ای از محیط‌های بالینی گزارش شده است. مکانیزم‌های ژنتیکی که منجر به Colr در *K. Pneumoniae* به طور کامل مشخص نیست. مهمترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در کلبسیلا پنومونیه شامل بتالاکتامازها، جهش در پورین‌ها و نیز پمپ‌های ترشحی بوده که پمپ‌های ترشحی به عنوان یکی از موارد اصلی دفاع این باکتری در مقابل آنتی بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند، ژن *mcr* که به عنوان اولین ژن مقاومت به کلبسیلا وابسته به پلاسמיד جدا شد و از آن زمان سوش‌های *mcr* مثبت در سرتاسر جهان از انتروباکتریاسه‌ها گزارش شده است (۸ و ۹).

در این مطالعه ژن *mcr1*, *mcr2* و اپران ژن *pmr* بررسی می‌شود.

اکثریت مطالعات در این زمینه بر روی تحقیقات اپیدمیولوژیکال متمرکز شده است به این سبب باعث شده اطلاعات ژنومیک کمی در اختیار باشد. با توجه به اهمیت استفاده از کلبسیلا در درمان عفونت‌های مقاوم به چند دارو و ذکر این مهم که کلبسیلا آخرین خط درمان است، لذا لزوم بررسی وضعیت حاملین ژن *mcr* از نمونه‌های کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر جدا شده از منابع غذایی بویژه شیر

استخراج DNA ژنومی

با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت پیشگامان انتقال ژن طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل الکتروفورز ۱٪ و دستگاه نانودرآپ (۲nm-۱/۸=۲۶۰/۲۸۰ OD) مورد ارزیابی قرار گرفت.

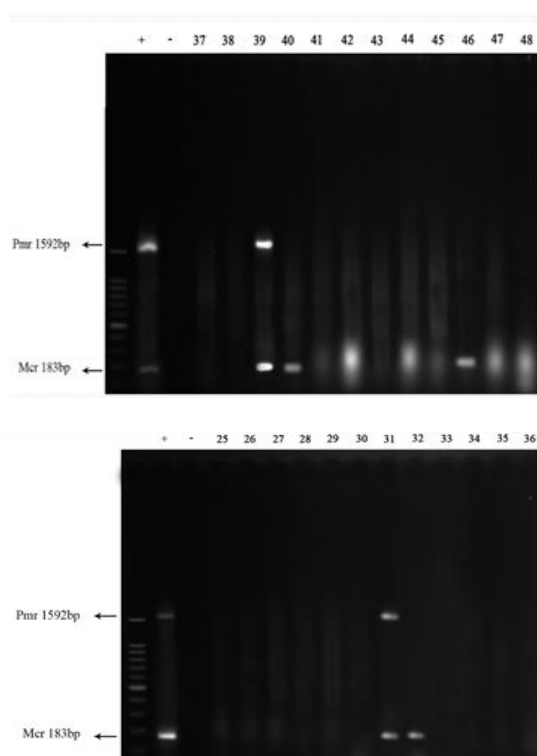
انجام واکنش Multiplex-PCR

توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. پس انتخاب پرایمرهای مناسب و BLAST نمودن آن‌ها در سایت NCBI، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۱/۵ میکرولیتر 5X PCR master mix (سینا کلون، ایران) حاوی (۰/۰۵U/μl) Taq DNA polymerase، (۳mM) MgCl₂ و (۰/۷mM) dNTPs، (۰/۸mM) غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و (۱۱/۱ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل با استفاده از گراداینت ترموسایکلر (MWG Biotech Primus, Germany) با استفاده از برنامه طراحی شده جهت واکنش به صورت زیر انجام گرفت: ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جهت دناتوراسیون و جداسازی کامل دو رشته DNA (Denaturation step)، سپس ۳۵ سیکل متشکل از ۴۵ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (Denaturation step)، ۴۵ ثانیه دمای ۵۶ درجه سانتیگراد جهت اتصال پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی به تک رشته DNA (Annealing step)، ۴۵ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت انجام واکنش همانندسازی و در انتهای ۳۵ سیکل، ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت همانند سازی کامل محصول PCR (Elongation step) انجام شد. تایید صحت انجام تست با وجود کنترل مثبت و منفی و بررسی آزمونهای میکروبی (بیوشیمیایی و کشت و تستهای حساسیت) صورت گرفت.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای انجام آزمون

Multiplex-PCR (۱۱) (۱۷)

پرایمر	توالی پرایمر (۳' به ۵')
<i>pmrB-F</i>	۵'-ATAAGCTGAAACGATGGC-۳'
<i>pmrB-R</i>	۵'-CATA ATAATCAGGGCGAAAAGT-۳'
<i>MCR-1-F</i>	۵'-CTCATGATGCAGCATACTTC-۳'
<i>MCR-1-R</i>	۵'-CGAATGGAGTGTGCGGTG-۳'



نگاره ۱- از سمت بالا به پایین؛ کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های شماره ۲۵ تا ۴۸ موارد جدا شده از نمونه‌ی شیر دارای ژن *Pmr* با طول باند 159 bp، ژن *Mcr* با طول باند 183bp است.

نتایج

در مجموع از ۲۲۰ نمونه شیر جمع آوری شده از تانک‌های نگهداری شیر خام در دامداری‌های استان تهران تعداد ۶۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا سازی شد. فراوانی دو ژن *mcr* و

نمونه‌های چرک، خون، ادرار، خلط انجام شد، آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش E.test انجام و تعداد ۲۱ ایزوله (۱۰/۵٪) مقاوم به کلیستین بودند. غربالگری با PCR و تعیین توالی، ۴ ایزوله حاوی ژن *mcr-1* را آشکار ساخت. آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی براث میکرودايلوشن انجام و مشاهده شد همه ایزوله‌های *mcr-1* مثبت مقاوم به کارباپنماز، نسل سوم سفالوسپورین، آمینوگلیکوزیدها و سیپروفلوکساسین بودند ولی حساس به تیگسیکلین بودند (۱۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Yang و همکارانش در چین انجام شد، تعداد ۲۳۵۳ ایزوله انتروباکتریاسه بین سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۴ از نمونه افراد تحت درمان و ۱۶۸ ایزوله مرغی از یک کشتارگاه جهت بررسی حضور ژن *mcr-1* انجام شد. انتقال‌پذیری و خصوصیات ژنتیکی ژن‌های مقاوم به کلیستین توسط کونزوگاسیون و سکانسینگ کل ژنوم انجام شد. میزان MIC برای کلبسیلا پنومونیه mg/L Col-R-KP، ۱۲۸ که بالاتر از اشريشیاکلی Col-R-۸ mg/L EC، بود. نرخ حمل ژن *mcr-1* در Col-R-EC برابر ۱۰۰٪ بود و در مورد Col-R-KP برابر ۲۳/۵٪ بود. دوسوم کلبسیلا پنومونیه مقاوم به کلیستین Col-R-KP از نظر ژن *mcr-1* منفی بودند (۱۵).

در مطالعه Jousset در سال ۲۰۱۹ بیان کردند که از ۵۰ مورد بررسی باکتری اشريشیاکلی و ۴۴ مورد کلبسیلا پنومونیه و ۱۲ مورد جدایه سالمونلا انتريتیکا از منابع حیوانی و ۴۵۰ جدایه مقاوم به کارباپنم که به تایید مرکز ملی مرجع فرانسه رسید. تعداد ژن‌های مقاوم در برابر کولیستین که قابل انتقال به سایرین بوده از ۱ *mcr-* به ۵ *mcr-* متغیر بوده که بسیار مهم است. پنج جفت آغازگر برای تقویت ژن‌های *mcr-1*، *mcr-2*، *mcr-3*، *mcr-4* و *mcr-5* در یک PCR چند منظوره طراحی شدند (۱۶) در تحقیق حاضر به بررسی مطالعه‌ای و تعیین توالی ژنوم چند سویه از باکتری کلبسیلا پنومونیه مورد

pmr در ۶۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه نشان داد که ژن *mcr* در ۱۱ (۱۸/۳٪) جدایه و ژن *pmr* در ۷ (۱۱/۶٪) ایزوله حضور داشت (نگاره ۱)

بحث

یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌هایی که امروزه در درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند، آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام می‌باشند، اما متأسفانه بنا به دلایلی منجمله؛ افزودن آنتی‌بیوتیک به جیره غذایی دام‌ها، استفاده نادرست، بیش‌ازحد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم نظارت دقیق در تجویز دارو سبب بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است (۹). مشکل اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم‌ها ظهور سویه‌هایی با مقاومت چندگانه (Multidrug resistance-MDR) می‌باشد که اغلب منجر به طولانی شدن زمان بستری بیمار، افزایش مرگ و میر و درگیری و ابتلا، بالا رفتن هزینه درمانی در مقایسه با میکروب‌های حساس به آنتی‌بیوتیک و سرانجام شکست درمانی (Drug Therapeutic Failure-DTF) می‌گردد (۵).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Wright و همکارانش در ایتالیا انجام شد از ۷۴ سوش مقاوم به کلیستین در انتروباکتریاسه

(۶۴ اشريشیاکلی و ۹ گونه دیگر) تعداد ۶۱ (۸۲/۵٪) سوش ژن شبه *mcr-1* را حمل می‌کردند (۱۲). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ توسط Kieffer و همکارانش در پرتغال جهت بررسی ژن *mcr-1* تولیدشده در اشريشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه بر روی خوک‌ها انجام گرفت. در این تحقیق ۱۰۰ خوک را در ۲ مزرعه از نظر وجود مقاومت به کلیستین غربالگری کرده و مشاهده شد ۹۸ ایزوله دارای *mcr-1* وابسته به پلاسمید بودند. بیشتر ایزوله‌ها مربوط به اشريشیاکلی بود و حمل ژن توسط پلاسمید *inc* انجام می‌شد (۱۳).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ توسط Roy و همکارانش در هند بر روی ۱۲۰۰ ایزوله جمع‌آوری شده کلبسیلا پنومونیه از

- Escherichia coli as the result of two distinct evolutionary pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;74(6):1521-30.
6. Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JD, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(12):4971-7.
7. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(7):1607-15.
8. Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders J, de Jong MD, et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16(2):147-9.
9. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16(2):161-8.
10. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. *Textbook of diagnostic microbiology-e-book*: Elsevier Health Sciences; 2018;426-39.
11. Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, De Angelis LH, et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an mgrB deletion mutant. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(10):3341-4.
12. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):536-43.
- پرداخته شد. از ۲۲۰ نمونه شیر خام در سطح شهر تهران ۱۱ باکتری کلبسیلا پنومونیه (۱۸/۳٪) دارای ژن *mcr* و ۷ سویه (۱۱/۶٪) واجد ژن *pmr* جداسازی شده که با سایر تحقیقات هم سویی دارد. با استفاده از ردیابی دو ژن مورد مطالعه با روش مالتیپلکس PCR که به نظر می‌رسد این اولین مورد مطالعه و بررسی دو ژن *mcr* و *pmr* باشد که در ایران از نمونه‌های شیر جداسازی شده از تانک نگهداری شیردر دامداری‌های صنعتی از باکتری کلبسیلا پنومونیه صورت گرفته است و دو ژن مذکور به عنوان مارکر اصلی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.
- کلسیتین یا پلی میکسین E نوعی پلی پپتید کاتیونی ست کلسیتین آخرین خط دفاعی در مقابل باکتری های گرم منفی می‌باشد. ژن های پلاسمیدی و کروموزومی متنوعی در ایجاد مقاومت کلسیتین نقش دارند.

فهرست منابع

1. Åkerstedt M, Waller KP, Larsen LB, Forsbäck L, Sternesjö Å. Relationship between haptoglobin and serum amyloid A in milk and milk quality. *International dairy journal*. 2008;18(6):669-74.
2. Argaw A. Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. *Food Sci Qual Manag*. 2016;52:56-65.
3. Saltijeral J, Cordova A, Ruiz G, Alonso U, editors. Comparative study of electrical conductivity and CMT of quarter milk samples in dairy farm in Mexico. *International Congress of the Society for Animal Hygiène*; 2004.
4. Kim T, Jung D, Jayarao BM. Fuzzy reasoning for assessing bulk tank milk quality. *Journal of Intelligence and Information Systems*. 2004;10(3):39-57.
5. Bourrel AS, Poirel L, Royer G, Darty M, Vuillemin X, Kieffer N, et al. Colistin resistance in Parisian inpatient faecal

13. Kieffer N, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. High rate of MCR-1-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among pigs, Portugal. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(12):2023.
14. Roy S, Viswanathan R, Singh AK, Das P, Basu S. Sepsis in neonates due to imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in India. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(6):1411-3.
15. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean journal of internal medicine*. 2012;27(2):128.
16. Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA, Creton E, Cotillon G, Sauvadet A, et al. Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection of the five families of plasmid-encoded colistin resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2019;53(3):302-9.
17. Quesada, A., Porrero, M.C., Tellez, S., Palomo, G., Garcia, M., Dominguez, L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J. Antimicrob. Chemother.* (2014). 70,71-74.