التشخيص الجزيئي للأنماط المصلية K1 وK2 للكليبسيلا الرئوية المعزولة من اخماج الجروح والحروق

عمر نعمه فليح*، ليث مصلح نجيب* ورنا كاظم محمد**
*قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الأنبار
**التقنيات الإحيائية/ كلية العلوم/ جامعة بغداد

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية التشخيص الجزيئي للنمط المصلي K1 والنمط K2 في العينات المعزولة من اخماج الجروح والحروق للكليبسيلا الرئوية والتي تم عزلها من مستشفى الرمادي التعليمي ومستشفى الحروق التخصصي في مدينة الطب في بغداد وللفترة ما بين 2014/12/1 إلى 2015 /4/1 وبمجموع 34 عزلة. العزلات السبعة التي تم انتخابها كانت اكثر مقاومة للمضادات الحيوية شخصت 7 عزلات بكتريا *K.pneumoniae* جزيئيا باستعمال تقنية تفاعل تضخيم السلسلة (PCR) إذ ضخمت جينات الكبسولة *magA* الخاصة بالنمط المصلي (K1) و*rcsA* الخاصة بالنمط (K2) وأظهرت النتائج إن 5 عزلات وبنسبة (71.4%) *K.pneumonia* لها علاقة بالنمط المصلي K2 لكونها أعطت حزمة واضحة بحجم 254 زوج قاعدي للجين *rcsA*، بينما لم يعطي *magA* نتيجة، لذا فأنه ليس هناك عزلة تعود إلى النمط المصلي K1. وان العزلات الباقية 2 (28.6%) *K.pneumoniae* لا تعود لأي من النمطين المصلين K1 وK2.

الكلمات المفتاحية: الكليبسيلا الرئوية، النمط المصلي K1 و K2، تفاعل البلمرة المتسلسل.

Molecular Detection of Serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumonia* Isolated Form Wound and Burn Infections

O. N. Flaih*, L. M. Najeb* and R. K. Mohammad**
***Biology Department/ College Of Science/ University of Al-Anbar**
****Biotechnology Department/ College Of Science/ University Of Baghdad**

Abstract

This study has included the molecular detection of *K. pneumonia* between serotype K1 and K2. A total of (34) sample were collected from different clinical specimens wounds and burn during the period from December 2014 to April 2015 isolated was general alramadi hospital education. 7 isolated was of the most multi drug resistance to antibiotic. seven isolates of *K. pneumonia* were identified by using PCR technique for amplification of *magA* a specific primer for serotype(K1), and *rcsA* a primer for capsule genes (K2). The results showed that five isolates (71.4%) of *K. pneumonia* belong to the K2 serotype due to a clear band with a molecular size 254bp for *rcsA.* whereas neither *magA* had not given a band, therefore no isolate was belonging to K1 serotype. Thus the rest isolates (28.6%) of *K.pneumonia* were neither K1 nor K2 and identified as serotype Non-K1/K2.

Key word: *Klebsiella pneumonia,* Serotypes K1 and K2, PCR

المقدمة

تعد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* من العصيات السالبة لصبغة غرام والتي يمكن عزلها من نماذج مرضية مختلفة منها اخماج الجروح والحروق حيث تكون من المسببات الشائعة لأخماج المستشفيات Nosocomial Infection إذ ترافق المرضى من كبار السن والأطفال حديثي الولادة وتعد من الممرضات الانتهازية Opportunistic وتسبب كثير من الإصابات منها التهاب المجاري البولية والتهاب القناة التنفسية والهضمية

والتسمم الدموي (1). تمتلك بكتريا *Klebsiella pneumoniae* عدداً من عوامل الضراوة التي تشترك بامراضيتها وتتضمن مستضدات المحفظة وعوامل وإنتاج الذيفانات الداخلية مثل متعدد السكريد الشحمي فضلا عن مقاومة التأثير القاتل للمصل والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة التي تعد السبب الرئيسي في انتشار الإصابات المكتسبة في المستشفيات، إذ تنتشر هذه البكتيريا *K. pneumonia* بمديات واسعة في المستشفيات مما أدى هذا إلى التوجه للبحث حول إيجاد علاجات بديلة (2). في منتصف القرن الحالي ظهرت عينات تعود للجنس *K. pneumonia* لها القدرة على تكوين التهابات خطيرة قد تؤدي إلى الموت وهذه النماذج قد لوحظ أنها مرتبطة بالأنماط المصلية K1 وK2 وهي تعد من اخطر الأنواع المصلية لكونها أكثر انتشارا وتمتلك وسائل تستطيع من خلالها غزو أنسجة الجسم من خلال مجرى الدم (3). ومن الممكن تميز هذه الأنماط عن طريق التشخيص الجيني إذ يمتلك النمط المصلي K1 الجين *magA* (mucoviscosity–associated gene A) والذي هو محدد بهذا النمط فقط ويرتبط بالصفة فرط اللزوجة المخاطية. أما بالنسبة للنمط المصلي K2 فيرتبط ظهور صفة فرط اللزوجة المخاطية مع الجين *rcsA* والذي يقع على بلازميد اقتراني صغير الحجم (4). ونظراً لقابلية انتشارها وما ممكن إن تسببه هذه الأنماط من خطورة ولامتلاكها ضراوة عالية التي تسبب مشاكل في حالة عدم الكشف الدقيق والمبكر عنها أضرار قد تؤدي إلى موت المصاب بها لذا تهدف هذه الدراسة تهدف إلى التشخيص السريع والدقيق لأنماط الكلبسيلا الرئوية K1 و K2 بواسطة تقنية PCR وباستخدام بوادئ متخصصة لجينات محددة بهذه الأنماط.

المواد وطرائق العمل

1. **العزلات الميكروبية:** أخذت العزلات السبعة من المرضى الراقدين في مستشفى الرمادي التعليمي والمصابين باخماج الجروح والحروق ومن مجموع 34 عزلة تم انتخاب العزلات السبعة اعتمادا على مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية. تم إجراء عدة اختبارات لغرض التشخيص الأولي والتي تتضمن الصبغ بصبغة گرام وزراعتها على وسط الماكونكي واكار الدم إضافة إلى بعض الاختبارات الكيموحيوية كاختبار الاندول واختبار اختزال السترات بالإضافة إلى اختبار فوكاس بروسكاور (5) وقد تم استخدام عدة التشخيص API 20 E لغرض التشخيص وتم التأكد لعائديتها للجنس *Klebsiella pneumonia*. ولغرض التشخيص النهائي تم استخدام التشخيص بجهاز الvitek2. وقد تم التحري عن وجود المحفظة باستعمال التصبيغ السالبة.
2. **استخلاص الـ DNA:** استخلصت عينات دنا الجينومي للعزلات البكتيرية البالغ عددها 7عزلات بكتيرية باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتريا المنتج من شركة Geneaid والجدول (1) يوضح مكوناتها.

جدول (1) مكونات عدة استخلاص الدنا الجينومي

المكونات	الحجم
Gram+Buffer1	30ml
GT Buffer	30ml
GB Buffer	40ml
W1 Buffer	45ml
Wash Buffer2, (Add Ethanol)	25ml, (100ml)
Lysozyme	4mg/ml
Proteinase K3 (Add ddH2O)	11mg×2 (1,1ml)
Elution Buffer	30ml
GD Columns	100
2ml Collection Tubes	200

3. **تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR):** يبين الجدول (2) البادئات النوعية والتي تم تصميمها بشكل خاص لهذه الدراسة والتي تستهدف جينات الهدف (*magA*) الخاصة بالنمط المصلي K1 وجينات (*rcsA*) للنمط K2 وفقاً لما ذكر (6، 7) والتي جُهزت بشكل مسحوق مجفد (Lyophilized) من شركة (AlphDNA)، وقد تمت إعادة تذويبها بحجم من الماء المقطر والمعقم بحسب توصيات الشركة للحصول على محلول خزين لكل بادئ بتركيز (Pmol/µl100) ثم حفظ هذا المحلول الخزين بدرجة حرارة −20 مْ.

جدول (2) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

Sero type	Primers	Primer sequences	Size (bp)	Thermal cycler conditions
K1	*magA*-F	5'- GGTGCTCTTTACATCATTGC-3‘	1283	94oC for 5 min 94oC for 1 min 55oC for 1 min 35 cycles 72oC for 1 min 72oC for 10 min
	magA -R	5'-GCAATGGCCATTTGCGTTTGCGTTAG-3'		
K2	*rcsA*-F	5'-CCAGGGTTTTATTTCCAGCA-3'	254	94oC for 4 min 94oC for 30sec 58oC for 45sec 35 cycles 72oC for 45sec 72oC for 10 min
	rcsA- R	5-'TGCCATAAGCAATGAACCAA-3'		

ومن خلال استعمال عدة تفاعل السلسلة المتعددة وحسب تعليمات الشركة المصنعة promega وكما موضح بالجدول (2) أجري التفاعل بحجم 25 مايكرولتراً. أخذ 12.5 مايكرولتر كحجم ثابت من المزيج الرئيسي والذي يتكون من Tag polymerase, dNTPs, MgCl2 وأكملت باقي المواد حسب الظروف المثلى لكل بادئ وتم في التجارب تغيير الظروف لغرض الوصول إلى الظروف المثلى لكل بادئ إذ تم التلاعب بدرجة حرارة الالتحام (Temperature Annealing) وكذلك الوقت المناسب لهذه المرحلة.

جدول (3) محتويات عدة PCR

المواد	الحجم
$MgCl_2$	4 ملي مولر
Datp	400 مايكرو مول
dGTP	400 مايكرو مول
dCTP	400 مايكرو مول
dTTP	400 مايكرو مول
Taq polymerase	2.25 وحدة

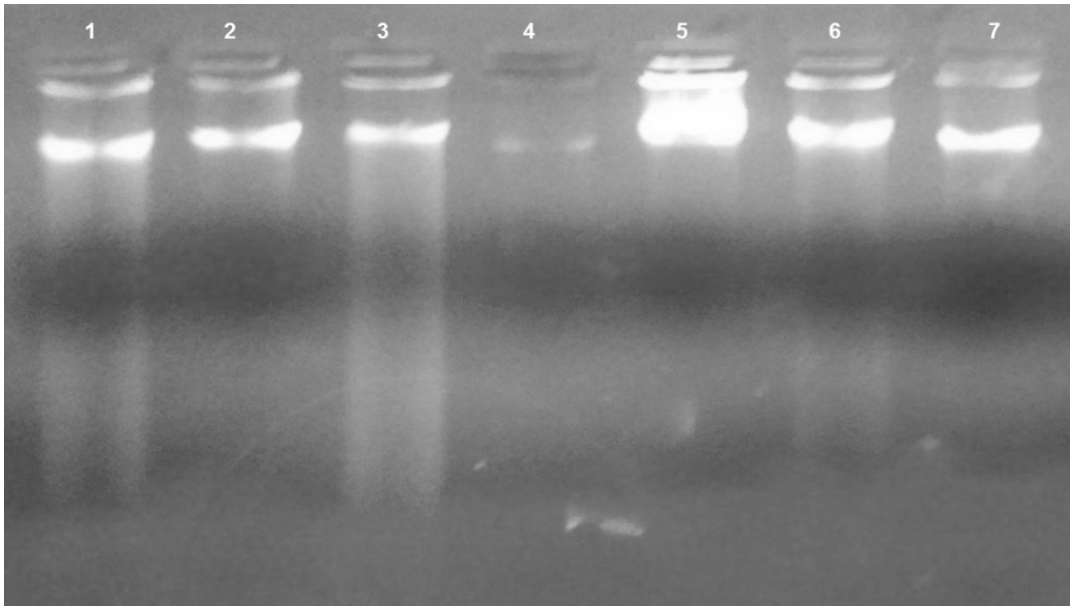
4. **الترحيل الكهربائي للدنا على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis of DNA**

حضرت المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي بحسب ما ورد في (8، 9) وتضمنت عملية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز ما يلي: حيث تم مزج 8 مايكروليتر من كل عينة من PCR products المراد ترحيله مع 2 مايكروليتر من محلول صبغة البروموفينول الزرقاء (دارئ التحميل) بشكل جيد وحمل مزيج كل عينة بهدوء بتحميله على حفر الهلام مع مراعاة عدم خروج العينة من على سطح الحفرة تم تشغيل مجهز القدرة Power supply وضبط عند 45 فولت لمدة 15 دقيقة ثم 60 فولت لمدة 90 دقيقة أو لغاية وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام أحيانا ثم إيقاف عملية الترحيل وبعد انتهاء مدة الترحيل تم رفع الهلام من على صفيحة الهلام الخاصة بجهاز الترحيل الكهربائي تم فحص الهلام في غرفة مظلمة وذلك بتعريضه لـ(UVtransilluminator)

عند طول موجي 260 نانوميتر وصور الهلام باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية Uv Light وتم تقدير الحجم الجزيئي لقطع الدنا بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل ألحجمي القياسي (100Pb DNA Ladder). قدرت الأوزان الجزيئية للدنا اعتمادا على المسافات التي قطعتها هذه الجزيئات في الهلام والتي تتناسب عكسيا مع أوزانها الجزيئية وباستعمال قطع من الدنا معروفة الوزن الجزيئي هي الدلائل الحجمية (Markers) إذ استعمل الدليل (100PbDNA).

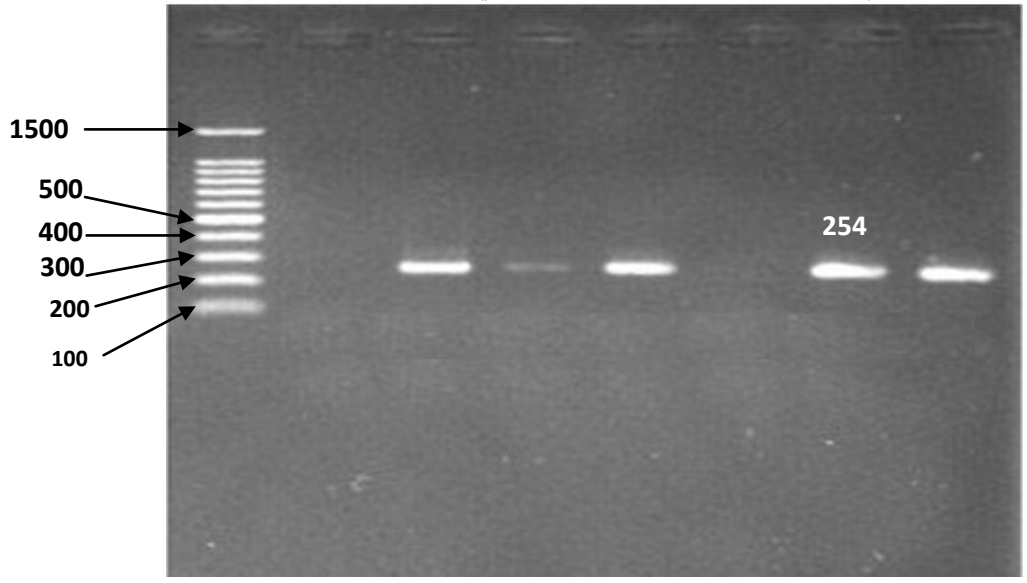
النتائج

- **العزل والتشخيص:** أظهرت نتائج الزرع الأولي للعزلات السبعة للجنس البكتيري *Kl.pneumoniae* والتي توزعت بين (3) عزلات للحروق و(4) عزلات من الجروح صفات مستعمرات بكتريا *Klebsiella spp.* حيث استطاعت النمو على وسط أكار الماكونكي وخمرت سكر اللاكتوز فيه، وأعطت مستعمرات وردية براقة ذات قوام مخاطي وهي صفة مميزة، تتميز الكلبسيلا بعدم قدرتها على تحليل الدم لذا تبدو مستعمراتها على وسط أكار الدم شفافة ولماعة (10) استغلت هذه الصفة لتفريق الكلبسيلا عن بعض أنواع البكتريا التي تتشابه معها بالنمو على وسط أكار الماكونكي إلا أنها تحلل الدم.
- **الفحص المجهري:** أعطت نتائج الفحص ألمجهري للشرائح المحضرة من المستعمرات والتي صُبغَت بصبغة كرام أنها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام مرتبة بشكل مفردة أو مزدوجة أو بشكل سلاسل قصيرة مطابقة لما جاء في (11). كذلك تم الكشف عن وجود المحفظة حول الخلية البكتيرية باستعمال طريقة التصبيغ السالبة إذ ظهرت المحفظة بشكل هالة شفافة حول البكتريا غير مصبوغة بالصبغة.
- **التحري عن الأنماط المصلية K1 وK2:** تم استخلاص الـDNA لعزلات البكتيريا التي تم انتخابها من العينات التي حصلنا عليها وبواقع 7 عزلات للنوع البكتيري *Kl.Pneumoniae* توزعت بين 3 عزلات للحروق و4 عزلات من الجروح، وبعد ترحيل الـDNA المستخلص على هلام الأكاروز أظهرت النتائج وجود الحزم وبشكل واضح في جميع العزلات السبعة المنتخبة وكما في الصورة رقم (1).



صورة (1) الترحيل الكهربائي للـDNA الجينومي المستخلص من 7 عزلات تابعة لبكتيريا *K.pnumonia* باستعمال هلام 70 فولت/ لاكاروز 1.5% (55 دقيقة، 7 فولت\اسم^2)

تم قياس تركيز DNA ونقاوته إذ أظهرت النتائج أن نقاوة DNA تراوحت بين (1.56– 1.79)، تم تضخيم النمط المصلي K1 للعزلة *Kl.pneumoniae* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل بواسطة تضخيم الجين *mag A* وباستخدام زوج من البوادئ المتخصصة الخاصة بهذا النمط K1 (6)، أشار (12) إن الجين *mag A* يقع ضمن اوبرون واحد والذي يكون متخصص للعائلة الجينية K1cap على أساس الصفات المصلية بغض النظر عن المصدر، وهذا ما بينته الدراسة التي قام بها (13) حيث تم التحقق من 495 عزلة من بكتيريا *Klebsiella pneumonia* ومعزولة من أماكن مختلفة من العالم، والدراسة التي أجراها (14) حيث شخص 134 عزلة للنوع البكتيري *Klebsiella pneumonia* وجد كلا الباحثين إن الجين *mag A* مقيد من مجموعة من الجينات الخاصة بإنتاج الكبسولة والعائد للنمط المصلي K1 واعتبر إن جميع العزلات الخالية من النمط المصلي K1 هي عزلات تعتبر سالبة أو فاقدة للجين *magA*. العزلات السبعة التي تمت دراستها تم التضخيم لها باستخدام هذه البوادئ ولقد أظهرت جميع العزلات نتيجة سالبة بالنسبة *mag A* وبالتالي فان النتائج تشير بان العزلات قيد الدراسة السبعة غير تابعة للنمط المصلي K1. تم التحري عن إنتاج النمط المصلي K2 وتشخيص بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* على أساس إنتاجها لهذا النمط حيث تم استخدام زوج من البوادئ المتخصصة كما ورد في (7) (*rcs A*-F و *rcs A*-R). العزلات السبعة التي تم تضخيم الجين (*rcs A*) باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل فقد أظهرت النتائج وكما موضح بالصورة (2) بان خمس عزلات من أصل سبعة وبنسبة (71.4%) قد أعطت نتائج موجبة حيث تميزت هذه العزلات باحتوائها على حزم بالوزن الجزيئي 254bp وبالتالي فان هذه النتائج تشير بان هذه العزلات الخمسة تحوي على الجينات الخاصة بالنمط المصلي K2.



صورة (2) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد PCR لسلسلة الـDNA للجين *rcs A* الخاص بالنمط *K2* على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% M : الدليل ألحجمي 100bp , 1–7:أرقام العزلات لبكتريا *K. Pneumonia*.

المناقشة

أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل انتشار النمط المصلي K2 على النمط المصلي K1 في النماذج المعزولة من اخماج الحروق والحروق وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع ما أشار إلية (15) بان عزلات *Klebsiella pneumonia* ذات النمط المصلي K2 هي الأكثر انتشارا بين الإصابات البشرية من الأنواع المصلية الأخرى وهذا ما أكده أيضا (16) حيث وجد إن هذا النوع من الأنماط يعتبر من أكثر الأنواع انتشارا في الإصابات التي تصيب الإنسان سواء في الاخماج الحرقية او

الجرحية والتنفسية وأيضا هذه النتائج كانت مطابقة لنتائــج (4) إذ كان النمط المصلـي K2 سائد على النمط المصلي K1 إثناء الدراسة، إلا أنها جاءت مخالفة مع نتائج العديد من الدراسات التي أشارت إلى إن النمط المصلي K1 هو الأكثر انتشارا من الأنماط المصلية الأخرى في الإصابات المختلفة (3، 17، 18). العزلتان المتبقية والتي كانت بنسبة 28.6% صنفت حسب هذه الدراسة بأنها غير عائدة للنمط المصلي K1 وK2 وان هذه العزلات ربما قد تتعلق بالأنواع المصلية الأخرى. ومما تجدر الإشارة إليه بان الجين *mag A* مهم جدا للنوع البكتيري *Klebsiella pneumonia* حيث يتوافق وجودة مع وجود الطبقة اللزجة للبكتيريا ولكنة اقل انتشارا بين العزلات المحلية الأخرى وهذا يعني بان هناك جينات أخرى لها دور في اللزوجة العالية للبكتيريا مثل الجين *rmp A* والذي تعتبر جين تنظيمي أو مظهري والذي يكون محمول على DNA الكروموسومي (19)، وهذا ما أشار إليه (20) حيث وجد إن الجين (*rcs A*) يعتبر مسؤول عن صفات اللزوجة المظهرية والعائدة للنوع البكتيري *K.pneumoniae*. إن الجينات المحمولة على DNA الكرموسومي تكون مسؤولة عن بناء الـ polysaccharide والمكونـة للكبسـولة فـي الـنمط المصـلي K2(21). إن DNA الكروموسـومي المكـون للكبسـولة فـي بكتيريـا *Klebsiella pneumonia* للنمط المصلي K2 تكون لها القدرة على التعبير وتكوين colonic acid capsular polysaccharide وبالتالي فان التحري عن هذا ألجين يعد مؤشرا مهما للقدرة الامراضية للعزلات، وان ظهور النمط المصلي K2 في اخماج الجروح والحروق يؤكد خطورة هذا النمط والتي قد تؤدي إلى تفاقم الإصابات إلى أبعد من ذلك من حيث إصابات التسمم الدموي والتهابات السحايا وتقيحات أعضاء الجسم المختلفة هذا في حالة عدم الكشف المبكر والعلاج السريع للحالة نظراً لشدة ضراوة هذا النمط وامتلاكه قدرة عالية على اختراق دفاعات المضيف(22). إن الكشف السريع للأنماط المصلية K1 وK2 يساعد في التشخيص وعلاج أو الحد من الخطر في تفشي وانتشار المرض أو الممرض كدراسة لهذا النوع البكتيري (13). ومن هذه الدراسة فان استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل في الكشف الجيني باستخدام الجينات (*mag A* and *rcs A*) لكونها من الطرق السريعة والتي تعطي نتائج دقيقة للتعرف على الأنماط المصلية العائدة للنوع البكتيري*K. Pneumonia* وكذلك للأنواع الأخرى التي ليست من النوعين K2 وK1.

المصادر

1. Brisse, S.; Milatovic, D.; Fluit, Ad. C.; Verhoef, J.; Martin, N.; Scheuring, S.; Köhrer, K. & Schmitz Franz-Josef. (1999). Comparative *In vitro* activities of Ciprofloxacin, Clinafloxacin, Gatifloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin, and Trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. Antimicrobial agents and chemotherapy. 43(8):2051-2055.
2. Damian, M.; Usein, C.; Palade, A.; Ceciu, S. & Cosman, M. (2009). Molecular epidemiology and virulence characteristics of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospital-associated infections .The Open Epidemiol. J., 2: 69-78.
3. Fang, C. T.; Lai, S. Y.; Yi, W. C.; Hsueh, P. R.; Liu, K. L. & Chang, S. C. (2007). *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. Clin. Infect .Dis., 45(3):284-293.
4. Lin, Y. C.; Min, C. L.; Hui, L. T.; Hsu, C. L.; Ching, H. C.; Keh, S. L.; Chingju, L.; Chien, S. C.; Ming, K. C.; Chuan, M. C. & Yi, C. L. (2011). Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain. BMC. Microbio., 11(50):1-8.
5. العاني، يوسف رافع؛ نجيب، ليث مصلح؛ حسين، عبد الوهاب بديوي؛ فياض، هديل محمد؛ عبد الرزاق، عاصف حسن وعلي، أيوب، إبراهيم.(2011). دراسة بعض التغيرات المناعية الناتجة عن تلقيح الأرانب المحلية ببكتريا *Klebsiella*المضعفة. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، 4 (2): 90- 95.
6. Fang, C. T.; Chuang, Y. P.; Shun, C. T.; Chang, S. C. & Wang, J. T. (2004). A novel virulence gene *in Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. J. Exp. Med., 199(5):697-705.

7. Rand, M. & Abd Al-Rhman, M. A. A. (2015). Determination the Relationship between Some genetic Aspects with the Capsule Formation for Pathogenic *Klebsiella pneumoniae* Serotypes K1 & K2. Iraqi J. Sci., 56 (2B):1385-1393.
8. Dillon, J. A.; Nasim, A. & Nestmann, E. (1985). Recombinant DNA Methodology. John Wiley & Sons Inc., Mississauga, Ontario, Canada.
9. Ausubel, F. M.; Brent, R. & Kingston, R. E. (1995). Short Protocols in Molecular Biology, 3rd edn., John Wiley & Sons, New York.
10. Jawetz, E.; Melnick, J. L. & Adelberg, E. A. (2006). Medical Microbiology. 23th ed. The McGraw-Hill Companies, Los Altos California. USA.
11. Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sneath, P. H. A.; Stanley, J. T. & Williams, S. T. (1994). Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins, USA. PP. 532-553.
12. Chuang, Y. P.; Fang, C. T.; Lai, S. Y.; Chang, S. C. & Wang, J. T. (2006). Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. J. Infect. Dis., 193:645-654.
13. Struve, C.; Bojer, M.; Nielsen, E. M.; Hansen, D. S. & Krogfelt, K. A. (2005). Investigation of the putative virulence gene *magA* in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: *magA* is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. J. Med. Microbiol., 54: 1111–1113.
14. Yeh, K.; Chang, F.; Fung, C.; Lin, J. & Siu, L. (2006). *magA* is not a specific virulence gene for *Klebsiella pneumoniae* strains causing liver abscess but is part of the capsule polysaccharide gene cluster of *K. pneumoniae* capsule serotype K1. J. Med. Microbiol., 55:803-804.
15. Yu, W. L.; Ko, W. C.; Cheng, K. C.; Lee, C. C.; Lai, C. C. & Chuang, Y. C. (2008). Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 62: 1-6.
16. Fung, C. P.; Hu, B. S.; Chang, F. Y.; Lee, S. C.; Kuo, B. I.; Ho, M.; Siu, L. K. & Liu, C. Y. (2000). A 5year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: High prevalenceof capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. J. Infect. Dis., 181(6):2075-2079.
17. Victor, L. Y.; Dennis, S. H.; Wen, C. K.; Asia, S.; Keith, P. K.; Anne, V. G.; Herman, G.; Marilyn, M. W. & Vicente, J. B. (2007). Virulence Characteristics of *Klebsiella* and Clinical Manifestations of *K. pneumoniae* Bloodstream Infections. Emer. Infect. Dis., 13(7):986-993.
18. Fung, C. P.; Chang, F. Y.; Lee, S. C.; Hu, B. S.; Kuo, B. I.; Liu, C. Y.; Ho, M. & Siu, L. K. (2002). A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? Gut. 50(3): 420-424.
19. Rahn, A. & Whitfield, C. (2003).Transcriptional organization and regulation of the *Klebsiella pneumoniae* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. Mol. Microbiol., 47: 1045-1060.
20. McCallum, K. L. & Whitfield, C. (1991). The *rcsA* gene of *Klebsiella pneumoniae* O1:K20 is involved in expression of the serotype-specific K (capsular) antigen. Infect. Immun., 59:494-502.
21. Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Nagatsuka, T.; Ito, H.; Kato, N. & Ohta, M. (1995). Genomic organization of the *Klebsiella pneumoniae* cps region responsible for serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in the virulent strain Chedid. J. Bacteriol., 177:1788-1796.
22. Sahly, H.; Aucken, H.; Benedí, V. J.; Forestier, C.; Fussing, V.; Hansen, D. S.; Ofek, I.; Podschun, R.; Sirot, D.; Tomás, J. M.; Sandvang, D. & Ullmann, U. (2004). Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum β-lactamases. Antimicrob. agents chemother., 48(9): 3477-3482.