

Frequency of Pathogenic Genes *fimH* *irp2* *rmpA* *allS* and *wcaG* of *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Multiplex-PCR Method

Bahman Hormozi¹, Ahmad Rashki², Majid Alipour Eskandani³, Mohsen Najimi²

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

2. Department of Physiopathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/10/11

Accepted: 2018/01/11

Available online: 2018/02/19

Article Subject:

Molecular Microbiology

IJMM 2018; 11(6): 178-183

Corresponding author:

Ahmad Rashki
Department of
Physiopathology, Faculty of
Veterinary Medicine,
University of Zabol, Zabol,
Iran

Tel: 054-24282250

Email: ah_rashki@usal.es



Abstract

Background and Aims: *Klebsiella pneumoniae* that causes bloodstream and urinary tract infections has several virulence factors encoding genes. Factors like the ability of adherence to the host cell surface, presence of siderophore receptors and regulation of mucoid phenotype are the common virulence ones involved in the pathogenesis of *K. pneumoniae*. The aim of this study was to determine the frequency of virulence factor encoding genes in *K. pneumoniae* isolates, collected from hospitalized patients by Multiplex PCR.

Materials and Methods: In this descriptive study, the frequency of genes encoding virulence factor *irp2*, *wcaG*, *rmpA*, *rmpA*, *allS* and *fimH* were evaluated in 100 *K. pneumoniae* isolates, collected from patients referred to teaching hospitals of Zahedan city by Multiplex PCR.

Results: Among 100 clinical isolates of *K. pneumoniae*, *allS* gene had the highest frequency, 90%, and *rmpA* had the lowest frequency, 6%. The frequency of genes *fimH*, *irp2*, *wcaG* and *rmpA* were 88%, 87%, 33% and 6% respectively.

Conclusions: The results of this study showed that the *allS*, *irp2* and *fimH* genes were more frequent among *K. pneumoniae* isolated from studied patients in Zahedan city. These findings provide important information on the importance of these virulence factors on pathology of urogenital tract infection, management of *Klebsiella* infection and success of treatment strategies.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Virulence Factors, PCR

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Hormozi B, Rashki A, Alipoor M, Najimi M. Frequency of Pathogenic Genes *fimH* *irp2* , *rmpA* *allS* and *wcaG* of *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Multiplex-PCR Method. Iran J Med Microbiol. 2018; 11 (6) : 178-183



بررسی فراوانی ژن‌های بیماری‌زای *wcaG* و *allS*، *rmpA*، *irp2*، *fimH* در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به روش Multiplex-PCR

بهمن هرمزی^۱، احمد راشکی^۲، مجید علیپور^۳، محسن نجمی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: کلبسیلا پنومونیه که باعث عفونت‌های دستگاه گردش خون و ادرار می‌شود حاوی چندین ژن کدکننده عوامل بیماری‌زا است. عواملی مثل توانایی اتصال به سطوح، وجود گیرنده‌های سیدروفور، سیستم جذب آهن و تنظیم فنوتیپ مخاطی جزء اساسی‌ترین فاکتورهای دخیل در ایجاد بیماری از سوی کلبسیلا پنومونیه هستند. این مطالعه با هدف تعیین میزان حضور ژن‌های کدکننده این فاکتورهای بیماری‌زا در کلبسیلا پنومونیه جداشده از بیماران بستری‌شده با روش Multiplex-PCR انجام شد.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی، فراوانی ژن‌های بیماری‌زای *wcaG*، *irp2*، *rmpA*، *allS* و *fimH* در ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه جمع‌آوری شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی زاهدان با روش Multiplex-PCR در سال ۱۳۹۳ بررسی شد.

یافته‌ها: در مجموع از ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مطالعه‌شده، ژن *allS* با ۹۰٪، بیشترین فراوانی و ژن *rmpA* با ۶٪ کمترین فراوانی ژنی را داشتند. فراوانی ژنی برای ژن‌های *fimH*، *irp2* و *wcaG* به ترتیب ۸۸٪، ۸۷٪ و ۳۳٪ گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: *allS*، *irp2* و *fimH* و *wcaG* شایع‌ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران تحت مطالعه در زاهدان است. این مسئله می‌تواند اطلاعاتی در رابطه با اهمیت آن‌ها در آسیب‌شناسی عفونت‌ها که منجر به دستیابی به درمان‌های مؤثر می‌شود در اختیار محققین قرار دهد.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، فاکتورهای بیماری‌زایی، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

موضوع:

میکروبی شناسی مولکولی

IJMM1396;11(6): 178-183

نویسنده مسئول:

احمد راشکی

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تلفن: ۰۵۴-۲۴۲۸۲۲۵۰

پست الکترونیک:

ah_rashki@usal.es

مقدمه

دستگاه تنفسی (۴) و خون (۵) را دارند از عامل ذات‌الریه و شوک-های سپتیک تهدیدکننده زندگی هستند. این سویه‌ها ویژگی‌های ویروالانس مختلفی از خود نشان می‌دهند که در کلونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان و مهار دفاع میزبانی نقش دارند (۵، ۶). از مهمترین عوامل بیماری‌زایی این سویه، می‌توان به آنتی‌ژن O، آنتی‌ژن K، فاکتورهای مربوط به سیستم جمع‌کننده آهن، آدهسین‌ها و سنتز سیتوتوکسین‌ها اشاره کرد (۷). ژن‌های مختلفی فاکتورهای ویروالانس از جمله سیستم جذب آهن (*irp2*، *allS*)، آدهسین‌ها (*fimH*)، کپسول‌ها (*wcaG*) و *rmpA* به‌عنوان

عفونت باکتریایی از علل عمده بستری بیماران در بیمارستان‌ها و احتمالاً بزرگترین علت مرگ‌ومیر در جامعه است (۱). نوزادان و افراد کهنسال از مهمترین گروه‌های سنی مستعد به عفونت‌های باکتریایی هستند (۱). کلبسیلا پنومونیه از مهمترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های اکتسابی از بیمارستان‌ها است (۲). این باکتری اگرچه گاهی بی‌ضرر به نظر می‌رسد، اما چندین سویه از آن ژن‌های بیماری‌زا را به‌دست آورده‌اند که به آن‌ها خاصیت بیماری‌زایی می‌بخشد (۳). به‌نظر می‌رسد سویه‌های بیماری‌زای کلبسیلا پنومونیه که قابلیت بیماری‌زایی در دستگاه ادراری،

دمای 37°C کشت داده شدند. سپس نمونه به مدت ۱ دقیقه با دور 14000rpm سانتریفیوژ شد. بعد از خارج کردن مایع رویی، ۲ بار با 1mL محلول PBS (IX) (Phosphate Buffer Salin) شستشو داده شد. در این مرحله 100mcl آب مقطر استریل به تیوب اضافه و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 95°C داخل ترمومیکسر (اپندورف، آلمان) قرار گرفت. مجدداً به مدت ۵ دقیقه با دور 14000rpm سانتریفیوژ و سپس مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. DNA استخراج شده در دمای 20°C - نگهداری شد. وجود DNA در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر (اپندورف، آلمان) و با بررسی جذب در 260nm تحت بررسی قرار گرفت (۱۱).

واکنش Multiplex-PCR

برای شناسایی وجود ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت *irp2*، *als*، *wcaG*، *rmpA*، در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه از تکنیک Multiplex-PCR استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در مطالعه در جدول (۱) آمده است. همچنین از ژن *16S-23S rRNA* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام گردید. برای انجام فرایند PCR آنزیم Master Mix RED $2\times$ (پیشگام، ایران) خریداری شد. در این واکنش 50 ng از DNA الگو، 2mM MgCl_2 ، 0.11% Tween 20 ، 0.11% از هر نوکلئوتید (dNTP)، 0.11 واحد در میکرولیتر Ampliqon Taq DNA polymerase 10pM از پرایمرهای Forward و Reverse را با یکدیگر مخلوط و حجم نهایی با آب مقطر ۲ بار تقطیر به $25\mu\text{l}$ رسانده شد. برنامه اجرایی سیکل‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشت‌سازی (denaturation) اولیه در 94°C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل تکثیر شامل واسرشت‌سازی در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه و اتصال پرایمرها (annealing) به DNA الگو در 59°C به مدت ۵۰ ثانیه و طولیل شدن رشته الگو (extension) در 72°C به مدت ۷۰ ثانیه و طولیل شدن نهایی (final extension) به مدت ۷ دقیقه در دمای 72°C انجام شد. پس از انجام واکنش $50\mu\text{L}$ از محصولات واکنش در ژل آگارز ۲٪ به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد و قطعات تکثیرشده با استفاده از نشانگر Ladder100 ارزیابی شد. در پایان، نتایج با استفاده از آزمون فیشر تجزیه و تحلیل شدند.

عامل فنوتیپ مخاطی را کد می‌کنند (۸). پروتئین ادهسین فیمبریا (fim)، یک نقش مرکزی را در بیماری‌زایی کلبسیلا پنومونیه از طریق حمله به سلول‌های مخاطی دستگاه تنفسی، دستگاه ادراری - روده‌ای بازی می‌کند، که باعث کلونیزاسیون و تکثیر باکتری در لایه مخاطی سلول‌های میزبان می‌شود. برخی از ژن‌ها همچون *irp2*، *als*، *wcaG* و *rmpA* که به عنوان فاکتور بیماری‌زا - نقش مهمی را در پاتوژنز سویه‌های کلبسیلا پنومونیه و ایجاد بیماری به عهده دارند (۸). داشتن اطلاعات در خصوص فراوانی فاکتورهای ویروالانس و نحوه توزیع آنها در مناطق جغرافیایی مختلف می‌تواند اطلاعات جامع درباره میزان توزیع سویه‌های واجد فاکتورهای بیماری‌زا در اختیار اپیدمیولوژیست‌ها قرار دهد. همچنین این داده‌ها، کمک شایانی به مراکز درمانی و بیمارستانی برای اقدام سریع و به موقع در اتخاذ تصمیمات صحیح می‌نماید (۹، ۱۰). بنابراین مطالعه حاضر به منظور تعیین میزان فراوانی ژن‌های کدکننده فاکتورهای ویروالانس سیستم جذب آهن (*irp2*، *als*)، ادهسین‌ها (*fimH*)، کپسول (*wcaG*) و *rmpA* به عنوان عامل فنوتیپ مخاطی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و شناسایی نمونه‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی - توصیفی بوده و جامعه بررسی شده ۱۵۸۰ نمونه کلینیکی (خون، چرک، ادرار و ترشحات دستگاه تنفسی) بیماران بستری شده در بیمارستان‌های آموزشی زاهدان در سال ۱۳۹۳ بود. در این بررسی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جدا شده با روش های استاندارد میکروب شناسی و آزمایش های بیوشیمیایی رایج از جمله رنگ آمیزی گرم، رشد بر روی محیط مکانکی و EMB، اکسیداز، سیترات، اوره، لیزین، اورنیتین دی کربوکسیلاز، SIM، TSI، MR، VP و مولکولی (استفاده از پرایمرهای اختصاصی) در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی زابل مورد شناسایی قرار گرفته و تایید شدند. نمونه های خون در محیط TSB حاوی ماده ضد انعقاد سیترات کشت و به مدت یک هفته در درجه حرارت 37°C نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی

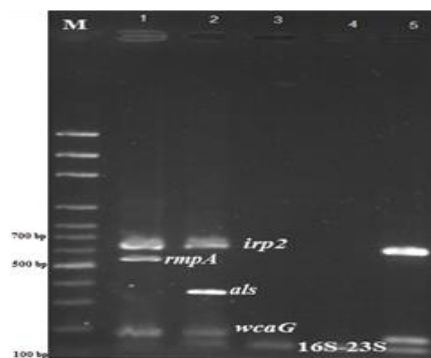
ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه در لوله حاوی 5mL محیط کشت LB (Luria-Bertani broth) به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن	توالی پرایمرها (5'-3')	دما	اندازه
<i>als</i>	F TGC GCATGGCTCAAATGGGGAA	59	(357 bp)
	R TGACTGCCTTGCTCATGCACAG	59	
<i>rmpA</i>	F ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	59	(535pb)
	R CTTGCATGAGCCATCTTTCA	59	
<i>wcaG</i>	F GGTTGGGTCAGCAATCGTA	59	(169bp)
	R ACTATCCGCCAACTTTTGC	59	
<i>irp2</i>	F AGCATCGCTGCTAAAACCTGAA	59	(623bp)
	R CAGACGATGCAGGGCGTTATTA	59	
<i>fimH</i>	F ATTCTCACAAATCAGCGCACTT	59	(170bp)
	R ATCAGCAGTACAGCAAACAGGG	59	
16S-23S rRNA	F ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT	59	(133bp)
	R TTCACCTAAGTTTTCTTGTGTTC	59	

یافته‌ها

در تجزیه و تحلیل واکنش زنجیره پلیمرز طیف ژن‌های ویروالانس از ۰.۶٪ برای ژن *rmpA* تا ۹۰٪ برای ژن *als* متغیر بود (نمودار ۱). تمامی ایزوله‌های جدا شده حاوی ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) نشانگر مولکولی 16S-23S rRNA بودند که نشان دهنده صحت انجام تست‌های تشخیصی کلبسیلا پنومونیه بود (شکل ۱).

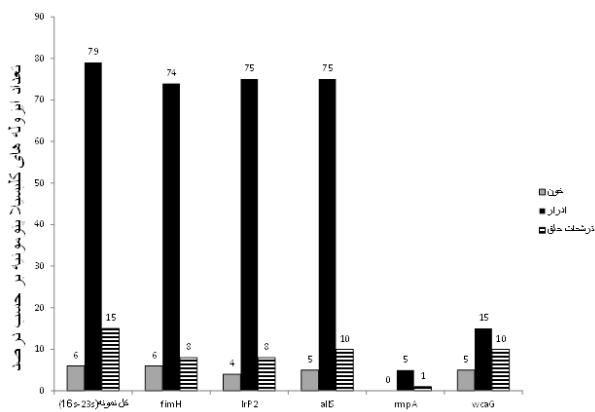


شکل ۱. نمونه‌ای از Multiplex-PCR بارگذاری شده روی ژل آگارز ۲٪

ژن‌های *wcaG* (169bp)، *irp2* (623bp)، *16S-23S rRNA* (133bp) و *als* (357bp) در دمای ۵۹°C

از ۲ ژن کدکننده سیستم جذب آهن مطالعه شده، *als* در مقایسه با *irp2* در تعداد بیشتری از ایزوله‌ها شناسایی شد (۹۰٪ در مقایسه با ۸۷٪) ولی تفاوت قابل ملاحظه‌ای دیده نشد. از میان ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مطالعه شده، ژن *wcaG* در ۳۰٪ و ژن *rmpA* در ۶٪ مشاهده شد (نمودار ۱). در این مطالعه مشخص

شد که در بین ایزوله‌های بررسی شده، فراوانی ژن *als* بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است و فراوانی ژن‌های آدهسین (*fimH*)، سیستم جذب آهن (*irp2*)، کپسول پلی ساکاریدی (*wcaG*)، فنوتیپ مخاطی A (*rmpA*) به ترتیب در رده‌های بعدی قرار داشتند. علاوه بر آن نمودار ۱ نشان داد که ۶۶٪ (۱۰ ایزوله از ۱۵ ایزوله) ایزوله‌های جدا شده از ترشحات تنفس، ۱۹٪ (۱۵ ایزوله از ۷۹ ایزوله) ایزوله‌های جدا شده از ادرار و ۸۶٪ (۵ ایزوله از ۶ ایزوله) ایزوله‌های جدا شده از خون، ژن *wcaG* را داشتند. ژن *rmpA* به ترتیب در ۶٪ و ۷٪ ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های ادرار و خون دیده شد. ژن *als* در ۹۵٪ ایزوله‌های ادراری، در ۸۳٪ و ۶۷٪ ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های خون و ترشحات تنفسی یافت شد. تمامی ایزوله‌های جدا شده از خون حاوی ژن *fimH* بودند.



نمودار ۱. درصد فراوانی ژن‌های بررسی شده در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به تفکیک محل جداسازی

بحث

در تحقیقی که از سوی El Fertas-Aissani و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، ژن‌های *fimH* و *irp2* به ترتیب ۱۰۰٪ و ۸۸٪ گزارش شد که با تحقیق حاضر تقریباً مطابقت دارد (۱۹). در مطالعه حاضر ژن *allS* به ترتیب در ۹۵٪، ۸۳٪ و ۶۷٪ ایزوله‌های جدا شده از ادرار، ترشحات حلق و خون یافت شد. همچنین در مطالعه‌ای که بر روی ۱۲ ایزوله جدا شده از آبسه‌های کبدی انجام گرفت، میزان فراوانی ژن *allS* در تمام نمونه‌ها مشاهده شد که با تحقیق حاضر تقریباً مطابقت دارد (۲۰). در حالی که ژن *allS* در هیچ‌کدام از ۲۶ ایزوله‌های جدا شده از سوی Lin و همکاران مشاهده نشد (۲۱). Chou و همکاران در سال ۲۰۰۴ عنوان کردند که ژن *allS* بیشتر در ایزوله‌های جدا شده از آبسه‌های کبدی دیده می‌شود (۲۲)، در حالی که در مطالعه حاضر در ۹۵٪ ایزوله‌های جدا شده از ادرار مشاهده شد. وجود ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت مطالعه شده در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیة جدا شده از منابع مختلف، می‌تواند نشان‌دهنده وجود پتانسیل خطر بالای این پاتوژن در بیماران مبتلا به عفونت‌های بیمارستانی باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه بهمن هرمزی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه زابل با کد اخلاق IR- UOZ-93008 است. بدین‌وسیله از حمایت بخش میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل و دوستانی که ما را در اجرای این تحقیق صمیمانه یاری داده‌اند تقدیر و تشکر می‌کنیم.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

این مطالعه برای اولین بار بر روی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیة جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان‌های آموزشی زاهدان براساس شایع‌ترین فاکتورهای ویروالانس انجام گرفت. در این پژوهش مشخص شد که ژن *allS* با ۹۰٪ بیشترین فراوانی و ژن *rmpA* با ۶٪ کمترین فراوانی ژنی را در بین ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیة در شهرستان زاهدان داشت. فراوانی ژنی برای ژن‌های *irp2*، *fimH* و *wcaG* به ترتیب ۸۸٪، ۸۷٪ و ۳۰٪ مشاهده شد. نتایج این پژوهش با آنچه در سایر کشورها انجام شده به‌جز ژن *rmpA* مطابقت دارد، که ممکن است این ژن‌ها نقش مهمی را در ایجاد بیماری در سویه‌های دربرگیرنده این ژن‌ها ایفا کنند (۱۲-۱۴).

در تحقیقی که در تایوان صورت گرفت، فراوانی ژن *rmpA* به میزان ۴۸٪ گزارش شد (۱۲). در گزارشی دیگر در تایوان، میزان فراوانی ژن *rmpA* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیة تولیدکننده ESBL ۷۱٪ و در سویه‌های غیر ESBL فراوانی آن ۴۳٪ بود (۱۳). در مطالعه‌ای که از Kuo-Ming Yeh و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد، میزان فراوانی ژن‌های *rmpA* و *magA* به ترتیب ۶۵٪ و ۳۴٪ گزارش شد (۱۵). نتایج مطالعه حاضر فراوانی کمتری را برای ژن *rmpA* نسبت به ۳ مطالعه فوق نشان می‌دهد که مهم‌ترین دلیل آن ممکن است تفاوت سروتیپ‌های ایزوله‌های غالب این منطقه باشد. ژن *rmpA* در خوشه ژنی *capsular cps* (polysaccharide synthesis) سروتیپ k1 کلبسیلا پنومونیة قرار دارد (۱۶-۱۸).

References

- Abate G, Koh T-H, Gardner M, Siu LK. Clinical and bacteriological characteristics of Klebsiella pneumoniae causing liver abscess with less frequently observed multi-locus sequences type, ST163, from Singapore and Missouri, US. J Microbiol Immunol Infect. 2012;45(1):31-6.
- Maki DG, Tambyah PA. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. Emerg Infect Diseases. 2001;7(2):342-7.
- Runcharoen C, Moradigaravand D, Blane B, Paksanont S, Thammachote J, Anun S, et al. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental Klebsiella pneumoniae. Genome medicine. 2017;9(1):6.
- Yan Q, Zhou M, Zou M, Liu W-e. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae induced ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated patients in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35(3):387-96.
- Victor LY, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, Von Gottberg A, et al. Virulence characteristics of Klebsiella and clinical manifestations of K. pneumoniae bloodstream infections. Emerging infectious diseases. 2007;13(7):986.
- Candan ED, Aksöz N. Klebsiella pneumoniae: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. Acta Biochim Pol. 2015;62(4):867-74.
- Fang C-T, Chuang Y-P, Shun C-T, Chang S-C, Wang J-T. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess

- and septic metastatic complications. *J Exp Med*. 2004;199(5):697-705.
8. Melo RdCA, de Barros EMR, Loureiro NG, de Melo HRL, Maciel MAV, Lopes ACS. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Curr Microbiol*. 2014;69(6):824-31.
 9. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS one*. 2009;4(3):e4982.
 10. Seibert G, Hörner R, Meneghetti BH, Righi RA, Forno NLF, Salla A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. Einstein (São Paulo). 2014;12(3):282-6.
 11. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Int J Infect Dis*. 2013;17(6):e450-e3.
 12. Yu W-L, Ko W-C, Cheng K-C, Lee H-C, Ke D-S, Lee C-C, et al. Association between rmpA and magA genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1351-8.
 13. Afrough P, Pourmand MR, Zeinalinia N, Yousefi M, Abdossamadi Z, Bagherzadeh Yazdchi S. Molecular typing of clinical and nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* by spa gene patterns. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2012;22(94):28-34.
 14. Yu W-L, Lee M-F, Tang H-J, Chang M-C, Chuang Y-C. Low prevalence of rmpA and high tendency of rmpA mutation correspond to low virulence of extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Virulence*. 2015;6(2):162-72.
 15. Yeh K-M, Kurup A, Siu L, Koh Y, Fung C-P, Lin J-C, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):466-71.
 16. Chuang Y-P, Fang C-T, Lai S-Y, Chang S-C, Wang J-T. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *Int J Infect Dis*. 2006;193(5):645-54.
 17. Struve C, Bojer M, Nielsen EM, Hansen DS, Krogfelt KA. 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*. 2005;54(11):1111-3.
 18. Yeh K-M, Chang F-Y, Fung C-P, Lin J-C, Siu L. magA is not a specific virulence gene for *Klebsiella pneumoniae* strains causing liver abscess but is part of the capsular polysaccharide gene cluster of *K. pneumoniae* serotype K1. *J Med Microbiol*. 2006;55(6):803-4.
 19. El Fertat-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*. 2013;61(5):209-16.
 20. Decre D, Verdet C, Emirian A, et al. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3012-3014.
 21. Lin J-C, Koh TH, Lee N, Fung C-P, Chang F-Y, Tsai Y-K, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut Pathogens*. 2014;6(1):21.
 22. Chou H-C, Lee C-Z, Ma L-C, Fang C-T, Chang S-C, Wang J-T. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infection and Immunity*. 2004;72(7):3783-92.