Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

Comparative diagnostic study of *Klebsiella* usingApi20E System and the device vitek2 and PCR

1 -Bnar Mohammed Abd AL-Majed 2- Dr .Salah Salman Zain AL- Abdeen AL- Talabany
mts.m1963@ gmail .com *bnar_altalabany@yahoo.com*

3-Dr.Ibrahim Salih AL-Jobory

Gns19677@ yahoo.com

[1,2,3]College of scince, University of Kikuk

Abstract

The current Study included 273 samples colected from models of different clinical Samples (urine , Stool, blood , sputum, and swabs from the vagina ,wounds, ear and throat) which have been get on 30 (10.98%) isolates of *Klebsiella* from total of various clinical samples. The rate of *Klebsiella* from urine samples was 26.6% of the while total 30 samples and The isolation rate from stool and blood sampls was 16.6%, Klebsiella isolated from vaginal swabs with .in wound infection the rat was (13.3%) (10%), and with respect to ear infections the percentage of isolation that have emerged in this study are (3.33%) and isolated rate from the throat and sputum was (6.6%).

After a Diagnosis results have shown the prevalence of *K.pneumoniae* with rate(23 *K.terrigena* isolates ٢with76.66%) followed by *K.oxytoca* rate (5with16.66%) and with(6.66%) of the total 30 isolates.

Twenty isolates were selected belonging to the species *K.pneumoniae* and *K.oxytoca* which diagnosed by Api20E for rediagnosing by(PCR and viteke2) , and the results of the diagnostic system Vitek2 showd that the *Klebsiella* which have been previously diagnosed byApi20E system (90%) *K.pneumoniae* and (10%) *K.oxytoca* while the genetic diagnosis results showed 80% of the isolates belonged to the type of the *K.pneumoniae* and 20% of isolates belonging to *K.oxytoca*

PCR، Vitek ،Key word: Klebsiella

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

دراسة تشخيصية مقارنة لجراثيم الكليبسيلا باستخدام نظام الـ Api20Eوجهاز الـ vitek2 وجهاز الـ PCR

بنار محمد عبد المجيد الطالباني[1]
bnar_altalabany@yahoo.com

صلاح سلمان زين الجراح [2]
mts.m1963@ gmail .com

ابراهيم صالح الجبوري [3]
Gns19677@ yahoo.com

جامعة كركوك كلية العلوم[1,2,3]

الخلاصة

ضمنت الدراسة الحالية جمع ٢٧٣ عينة من نماذج مرضية مختلفة شملت (الإدرار، البراز، الدم، القشع ، مسحات من المهبل ،الجروح، الأذن والحنجرة) ومن خلالها تم الحصول على 30عزلة لجراثيم الـ*Klebsiella* بنسبة (١٠,٩٨%) من مجموع النماذج المرضية المختلفة إذ تم عزل جرثومة الـ*Klebsiella* من عينات الإدرار بنسبة (٢٦,٦ %) من مجموع ٣٠ وكانت نسبة الجرثومة في البرازوالدم ١٦,٦ % اما بالنسبة لاخماج الجروح كانت نسبة العزل للجرثومة (١٣,٣%)وتم عزل جرثومة الـ*Klebsiella* من المسحات المهبلية بنسبة (١٠%) وفيما يخص أخماج الأذن فإن النسبة المئوية لعزل الجرثومة التي ظهرت في هذه الدراسة كانت (3.33%) وعزلت الجرثومة من الحنجرة و القشع بنسبة (٦,٦%) . بينت نتائج التشخيص شيوع النوع *K.pneumoniae* بنسبة أعلى من بقية الأنواع إذ بلغ عددها ٢٣ وبنسبة (٧٦,٦٦%) تليها عزلات الـ*K.oxytoca* التي كانت عددها ٥وبنسبة (١٦,٦٦%) من ثم عزلات الـ*K.terrigena*التي بلغ عددها ٢ وبنسبة (٦,٦٦%) من مجموع ٣٠عزلة . تم اختيار ٢٠ عزلة تابعة لنوعي الـ *K.pneumoniae* و *K.oxytoca* والمشخصة مسبقا بنظام الـ Api 20 E وتم تشخيصها بالطرائق التشخيصية (PCR،Vitek2) كانت نتائج التشخيص بنظام الـ٢Vitek لعزلات الـ*Klebsiella* التي تم تشخيصها مسبقا بنظام الـApi20E(٩٠%) *K.pneumoniae* و(١٠%) *K.oxytoca* اما في التشخيص الجيني فقد أبدت النتائج أن(٨٠%) من العزلات كانت تابعة لنوع الـ *K.pneumoniae* و(٢٠%) من العزلات تابعة لنوع الـ*K.oxytoca*. وتم الاستنتاج بان نتيجة التشخيص بنظام الـPCR كانت اقرب لنتائج نظام الـ APi20E وابعد من نتائج نظام الـVitek2

الكلمات المفتاحية: *Klebsiella* ، Vitek ، PCR

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

Introduction المقدمة

ينتمي جنس الـ*Klebsiella* الى العائلة المعوية و سمي لأول مرة من قبل العالم Trevisan سنة ١٨٨٥ تكريما للمايكروبايولوجي الألماني أدوين كليبس Edwinklebs[١] وفي عام ١٩٨٣اكتشف العالم Friedlander اشكالاً عصوية ذات كبسولة من المرضى الذين ماتوا من مرض ذات الرئة والذي سمى بعد عدة تسميات بـ*Klebsiella pneumoniae*[٢]

تتواجد أجناس الـ*Klebsiella* بشكل حمولة طبيعية في القناة المعوية للإنسان والحيوان [٣] ولكنّها تتحول الى كائنات ممرضة وتسبب أمراضا متعددة مثل التهاب الشعب الهوائية Bronchitis ،تجرثم الدم Bacteremia،الإلتهاب الرئوي Pneumonia، التهاب المسالك البولية Urinary tract infection (UTI) ، التهاب السحايا.Meningitisخصوصا في الأشخاص المثبطين مناعيا والمترددين على المستشفيات[4]

تعد أجناس الـ *Klebsiella* الممرض الثاني في العائلة المعوية بعد الـ*Eschericha.coli*وتعد من الممرضات الخمسة من بين البكتريا السالبة لصبغة كرام الأكثر شيوعا في عدوى المستشفيات Hospital acquired infection ويعد جنس الـ*Klebsiella pneumoniae* من أكثر الاجناس تردداً في العينات السريرية اذ يتردد بنسبة ٧٥-٨٦% من بين اجناس ال *Klebsiella*الأخرى .[5] يليها جنس الـ *K.oxytoca*.إذ يأتي بالمرتبة الثانية من الناحية الأمراضية[6]

يضم جنس الكليبسيلا خمسة أنواع هي *K.pnemoniae* و *K.oxytoca*و*K.planticola*و *K.terrigena* و *K.ornithinolytica* [٧] ويضم نوع الـ*K.pneumoniae* ثلاثة تحت النوع Subspecies وهي *K.pneumoniae* subsp.*pneumoniae* و *K.pneumoniae* subsp *ozaeine* و K.*pneumoniae* subsp *rehinoscleromatis*[٨]

استهدفت الدراسة تحديد افضل التقنيات لتشخيص هذه الجراثيم اذ تم استخدام الـ (PCR،Vitek2،Api20E) لمعرفة ايهما افضل في التشخيص .

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

المواد وطرائق العمل Material and method

١-جمع العينات Specimen Collection

جمعت العينات السريرية من مستشفى آزادي التعليمي ومستشفى الأطفال والنسائية ومستشفى كركوك العام في مدينة كركوك للفترة من ٢٠١٣/١١/١٥ ولغاية ٢٠١٤/٣/١٥من المرضى المراجعين والراقدين في المستشفيات المذكوره بعد أن تم اخذ معلومات عن كل عينة وقد زرعت العينات على وسط ماكونكي أكار MacConkey Agar ووسط أكار الدم Blood Agar وحضنت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة ٣٧ مْ ولمدة ٢٤ ساعة بهدف الحصول على جراثيم الـ *Klebsiella*

٢- التشخيص الجرثومي Bacterial Identification

شخصت جراثيم الـ Klebsiella بالإعتماد على الصفات الشكلية للمستعمرات النامية على وسط ماكونكي أكار MacConkey agar ووسط أكار الدم Blood agar وتم عزل وتنقية المستعمرات النامية وذلك بأخذ مستعمرة مفردة وإعادة زرعها على وسط ماكونكي أكار مرة أخرى للتأكد من نقاوة المستعمرات المعزولة و حضرت شرائح زجاجية وثبتت عليها العينات وصبغت بصبغة كرام لملاحظة أشكال الخلايا وتفاعلها مع صبغة كرام واعقبها اجراء الفحوصات الكيموحيوية اللازمة حسب المصادر[٩-١٠-١١-١٢-١٣] وعدة الـ Api20 E وحسب ما ورد في [١٤] .

٣-التشخيص بجهاز الـVitek 2 compact system

استخدم هذا الجهاز المصنع من قبل شركة (France) BioMerieux وتم اجراء الاختبار في مختبر اعالي الفرات في بغداد وذلك لتأكيد تشخيص20عزلة مختارة من خلال عدد تشخيصية خاصة بالجهاز اذ تحتاج كل عينة عدتان أحدهما خاصة بالتشخيص والأخرى خاصة بفحص الحساسية, تحتوي عدة التشخيص على ٦٤ حفرة .يوجد فيها

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

وسط مجفف ودليل لوني تجرى فيه الاختبارات الكيموحيوية ويسجل الجهاز التغيرات اللونية الحاصلة نتيجة لنمو الجراثيم

3 - التشخيص الجزيئي باستخدام جهاز الـPCR

تم اجراء الاختبار في مختبر كلية العلوم جامعة كركوك والجهاز المستخدم مجهز من شركة LTD(England)

٣-١ عزل الدنا الجينومي Genomic DNA isolation

أستخدمت عدة استخلاص وتنقية الدنا الجينومي المجهزة من شركة Promega (USA) في عزل الدنا الجينومي من العزلات الجرثومية المشخصة التي ضمت المحاليل الآتية :

المحاليل المستخدمة في عزل الدنا الجينومي

Solution used in Genomic DNA Isolation

١- محلول تحلل الخلايا Cell lysis solution .

٢- محلول ترسيب البروتين Protein precipitation solution .

٣- محلول إعادة تميّؤ الحامض النووي DNA Rehydration solution.

٤- محلول الأنزيم الحال للحامض النووي الرايبوزي RNA RNase solution .

٥- محلول تحلل النواة Nuclei lysis solution .

٦- ايثانول ٧٠%. حضر باستخدام ٧٠ مل من الايثانول المطلق ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل باستخدام الماء المقطر.

٧-كحول الأيزوبروبانول.

٣-٢ الترحيل الكهربائي للدنا على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis of DNA

٣-٢-١المحاليل والدوارئ المستخدمة في الترحيل الكهربائي

Solutions and buffer used in Electrophoresis

حضرت هذه المحاليل حسب ما ورد في[١٦،١٥ ،١٧] ويشمل:

1-دارئ TBE بقوة X10 (Tris-Borate-EDTA buffer)

2-خزين محلول بروميد الاثيديوم :

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

٣-دارئ التحميل (Loading buffer)X١٠

٤-هلام الأكاروز ٠,٨% : Agarose gel

3-٢-3 البادئات النوعية المستخدمة في تفاعلات الـ PCR

استخدم في الدراسة زوجين من البادئات النوعية Specific primer وفقا لما ذكر في[١٨] والموضحة في الجدول(2) تم تجهيز البادئات من شركة بايونير (Bioneer Company) بشكل مجفف وبتراكيز مختلفة من البيكومول Picomoles ، أذيب كل بادئ من البادئات في كمية مناسبة من الماء المقطر الخالي من الأيونات للحصول على محلول خزين لكل بادئ وبتركيز ٥٠ بيكومول\مايكوليتر ، مزجت جيدا قبل الإستخدام لضمان توزيعها بشكل متجانس في محلول التفاعل

جدول (2) تسلسلات القواعد النتروجينية للبادئات النوعية

ت	اسم البادئ	تسلسل البادئ	حجم الجين المتوقع	الجين الهدف
١	KP	F: GAACGGTGTGGTTACTGACG R: TCTACGAAGTGGCCGTTTTC	108bp	*rpo B*
٢	KO	F:GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG R:TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG	343bp	*peh X*

٣-٢-٤ طريقة تحضير مكونات تفاعل الـ PCR

1.تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي mix Pre 20 مايكرولیتر وذلك بمزج المكونات المذكورة في الجدول(3) في أنبوبة واحدة Eppenorf tube

جدول(3) مكونات التفاعل النهائي

مكونات التفاعل النهائي	الحجم بµl
Master Mix	Lyophilized
Forward primer (for each gene)	lµ2
Reverse primer (for each gene)	lµ2.
Template DNA	lµ5
Sterile deionized water	Completing the volume to (20 µl)

2.بعد إتمام جميع الإضافات مزجت المواد في الأنابيب جيدا باستخدام المازج Vortex لعدة ثواني

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

لجمع محتويات التفاعل الملتصقة بالجدران

3 .نقلت الأنابيب الى جهاز التضخيم الحراري الحلقي Thermocycler المجهز من شركة LTD(England) لبدء التفاعل التضاعفي حسب ماورد في[18] وذلك وفق البرنامج الموضح في الجدول(4) وعلى النحو الآتي:

الخطوات	عدد الدورات	Characters	Temperature	Time
Step 1	1 cycle	Initial denaturation	95°C	15min.
Step 2	35cycles	Denaturation steps	95°C	1min
		Annealing steps	55°C	1min
		Extension steps	72°C	2min
Step 3	1 cycle	Final Extension	72°C	10min
Step 4	Hold	----	4°C	----

4-النتائج والمناقشة Result and discussion

أظهرت النتائج بعد التشخيص ,وحسب الجدول(5) ان أكبر تردد لجراثيم الكليبسيلا كان في عينات الإدرار، فقد وضحت الدراسات في كون هذه الجرثومة تاتي في المرتبة الثانية بعد *E.coli* في إحداث التهابات المسالك البولية تليها عينات البراز [19] إذ أشارت بعض الدراسات الى دور هذه الجرثومة في إحداث الإسهال الوبائي إذ يمتلك عددٌ من سلالات هذه الجرثومة القدرة على إكتساب البلازميدات من جرثومة *E. coli* [20] و[21] وتبين من خلال دراستنا ان أقل تردد للجراتيم كان في عينات الأذن وهذه النسبة مقاربة لما وجدت في بعض الدراسات [22] إذ كان أكبر تردد لجراثيم الـ *Klebsiella*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

spp في عينات الإدرار وتليها عينات البراز ولكنها سجلت نسبة أعلى بالنسبة لعينات القشع والتي لم تتفق مع هذه الدراسة .

جدول(5) أعداد ونسب العزلات الجرثومية المشخصة قيد الدراسة والماخوذة من مصادر مختلفة

العزلات / المصادر	*K.pneumoniae*	*K.oxytoca*	*K.terrigena*	
الإدرار	6	0	2	8
البراز	5	0	0	5
الدم	5	0	0	5
المهبل	2	1	0	3
الجروح	1	3	0	4
الاذن	1	0	0	1
الحنجرة	1	1	0	2
القشع	2	0	0	2
المجموع	23	5	2	30

تم اختيار 20 عزلة تعود لجراثيم الـ Klebsiella spp التي تضمنت النوعين الأكثر انتشارا وهما K.pneumoniae و K.oxytoca لإجراء المقارنة التشخيصية حيث تم تأكيد التشخيص لـ 20 عينة باستخدام جهاز الـVitek2 كما في الجدول رقم (6) وظهر اختلاف واضح في التشخيص بين الأنواع فقط ولم يتعدى الإختلاف الى الأجناس .

جدول (6) النسب المئوية للعزلات قيد المقارنة باستخدام نظام الـ Vitek2

ت	النوع	العدد	النسبة المئوية%
1	*K.pneumoniae*	18	%90
2	*K.oxytoca*	2	%10

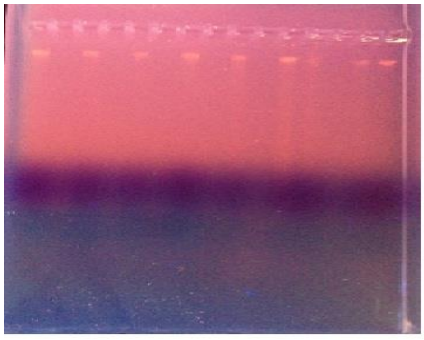
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

المجموع	20

التشخيص الجزيئى

المحتوى الوراثي للعزلات الجرثومية

أجريت تجارب عزل الدنا الكلي ل 20 عزلة من جراثيم الـ *Klebsiella spp* مع مراعاة شمولها على جميع مواقع الاصابة، باستخدام عدة استخلاص وتنقية الدنا الجينومي المجهزة من شركة (Promega) ، تم التأكد من وجود الدنا, بترحيل دنا العزلات على هلام الأكاروز قبل استخدامه كقالب في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، توافقت الكفاءة والسهولة في عزل الدنا وتمثلت في الإجراءات والمواد الكيميائية المكونة لعدة العزل إذ إن كل مادة منها تعمل على إزالة إحدى مكونات الخلية غير المرغوب بها وبنفس الوقت تحافظ على الدنا كونه الهدف في الاستخلاص .تم الكشف عن الدنا المعزول بترحيل العينات كهربائيا على هلام الأكاروز بتركيز 0.8% وبفرق جهد 75 فولت لمدة 35 دقيقة ثم اعقبها فحص الهلام بعد عملية التصبيغ بصبغة بروميد الأثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية بجهاز UVtransilluminator والشكل (1) توضح نتيجة الترحيل الكهربائى



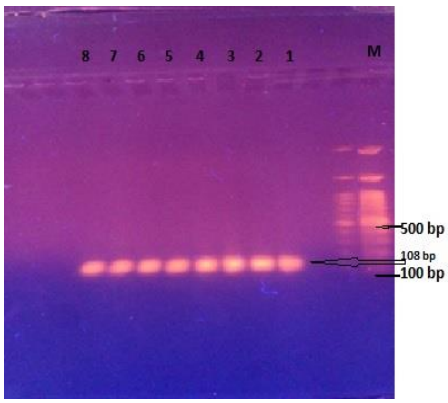
شكل (1) نتائج الترحيل الكهربائي للدنا الكلي لعزلات جرثومةالـ *Klebsiella*على هلام الأكاروز بتركيز (0.8%) وفرق جهد (75) فولت .

اظهرت النتائج تمثيل حجوم الحزم المتضاعفة للجينات المتخصصة بتشخيص جرثومة الـK.pnemoniaeلكل عزلة مستخدمة للحجم المتوقع bp 108 كما موضح في

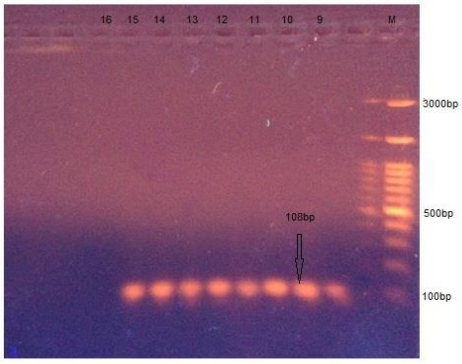
Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

الشكل(2) و(3) أماعند التحري عن جينات جرثومة الـK.oxytoca أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز للكشف عن نواتج التضخيم وجود حزم ناتجة عن

ارتباط البادئات المتخصصة مع التسلسل المكمل لها في جينوم جميع عزلات K.oxytocaولوحظ تماثل حجوم الحزم المتضاعفة للجين التشخيصي مع الحجم المتوقع343 bp كما موضح في الشكل(4)



المسار Mالدليل الحجمي (100bp DNA Ladder)
المسار 2-1 دنا جرثومة*K. pneumoniae*المعزولة من عينات الدم
المسار 4-3 دنا جرثومة*K. pneumoniae*المعزولة من عينات الإدرار
المسار 6-5 دنا جرثومة*K. pneumoniae*المعزولة من عينات البراز
المسار 7دنا جرثومة*K. pneumoniae* المعزولة من مسحات الحنجرة
المسار 8 دنا جرثومة*K. pneumoniae* المعزولة من المسحات المهبلية



شكل (2) الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي المتسلسل لدناعزلات جرثومة الـ*K.pnemoniae* باستخدام بادئات متخصصة على هلام الأكاروز بتركيز 0.80%
المسار Mالدليل الحجمي (100bp DNA Ladder)

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

المسار 9 دنا جرثومة *K. pneumoniae* المعزولة من مسحات الجروح

المسار 10دنا جرثومة *K. pneumoniae* المعزولة من عينات الإدرار

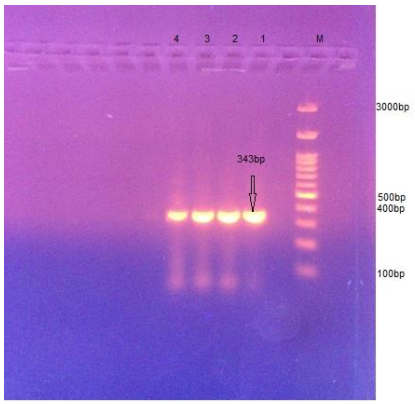
المسار 11 دنا جرثومة *K. pneumoniae* المعزولة من عينات الدم

المسار 12 دنا جرثومة *K. pneumoniae* المعزولة من مسحات الأذن

المسار 13دنا جرثومة *K. pneumoniae*المعزولة من المسحات المهبلية

المسار14-دنا جرثومة *K. pneumoniae*المعزولة من عينات الأدرار

المسار15 -16 دنا جرثومة *K.. pneumoniae*المعزولة من عينات القشع



شكل (3)الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي المتسلسل لدناعزلات جرثومةالـ*K.pnemoniae*باستخدام بادئات متخصصة على هلام الأكاروز بتركيز 0.8%

المسار Mالدليل الحجمي (100bp DNA Ladder)

المسار 1-3-4 دنا جرثومة*K. oxytoca*المعزولة من مسحات الجروح

المسار 2 دنا جرثومة*K. oxytoca*المعزولة من مسحات الحنجرة

شكل (4) الترحيل الكهربائي لنواتج التفاعل التضاعفي المتسلسل لدناعزلات جرثومة الـ*K.oxytoca*باستخدام بادئات متخصصة على هلام الأكاروزبتركيز0.8%

تم تشخيص 20 عزلة من عزلات الـ *Klebsiella* باستخدام الطرائق التشخيصية المذكورة أعلاه أظهرت نتائج التشخيص باستخدام نظام الـ Vitek2 الذي اختلف مع نظام الـ APi20E بالنسبة للعينات (١٣،١١،٤) حيث أظهرت نتائج النظام بأنها تابعة لجنس الـ*K.pneumoniae*وليس لجنس الـ*K.oxytoca*.أماالتشخيص بطريقة الـPCR فقد حسمت النتائج بالأعتماد على البادئات المستخدمة في التشخيص الجيني فقد أظهرت النتائج أن العينات (١٨،١١،١٠،٤) تابعة لجنس

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

الـ*K.oxytoca*أما بقية العينات تابعة لجنس الـ*K.pneumoniae* ويمكن الاستنتاج بان هذه النتيجة كانت اقرب لنتائج نظام الـ APi20E وابعد من نتائج نظام الـ Vitek2كما مبين في الجدول رقم (7) . وأثبتت نتائج الدراسة بحدوث خروقات في التشخيص أحيانا بنظام الـVitek2حيث اتفقت مع نتائج بعض البحوث حيث تم تشخيص مجموعة من الجراثيم المعزولة من الدم من بينهم جراثيم الكليبسيلا حيث من مجموع١١٨عينة مشخصة مسبقا تم تشخيص 97 عينة فقط و من مجموع 23جرثومة كليبسيلا مشخصة مسبقا تم تشخيص 22عينه بنظام الـ Vitek2 [23]

جدول (7) المقارنة التشخيصية للعينات

العزلات	التشخيص باستخدام الـAPi20E	التشخيص باستخدام الـVitek2	التشخيص باستخدام الـ PCR
1	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*
2	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*
3	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*
4	*K.oxytoca*	*K.pneumonia*	*K.oxytoca*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 12, Issue 1, January 2017
ISSN 1992 – 0849

K.pneumonia			*K.pneumonia*	*K.pneumonia*	5
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.oxytoca	*K.oxytoca*	*K.oxytoca*			
K.oxytoca	*K.pneumonia*	*K.oxytoca*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.oxytoca*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.oxytoca	*K.oxytoca*	*K.oxytoca*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.pneumonia	*K.pneumonia*	*K.pneumonia*			
K.pneuumonia			*K.pneumonia*	*K.pneumonia*	6
K.pneumonia			*K.pneumonia*	*K.pneumonia*	7

References المصادر

[1] V. Trevisan. Sul micrococco della rabia e sulla possibility di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se hacontratta l'infezione rabbica. R. C. Ist. Lombardo (Ser. II) (1887) 20:88–105.

[2] S . Brisse, F, Grimont, P.A.D Grimont. The Genus Klebsiella. Prokaryotes.(2006) 6:159–196.

[3] R. Podschun. S.Pietsch. C. Holler, U. Ullmann.. Incidence of Klebsiella species in surface waters and their expression of virulence factors.J. Applied and Environmental Microbiology, 67(7) 3325-3327.:(2001) ,

[4] J.J. Perry , J.T. Staley , S. Lory .. Microbial Life , 1st ed . Sinauer Associates , (2002) Inc . U.S.A .

[5] D.S. Hansen, A.M. Hazel, A. Titi , Podschum, R. Recomended test panel for differentiation of *Klebsiella species* on the basis of a trilateral interlaboratory

evaluation of 18 biochemical tests. Journal of clinical microbiology. 42(8) (2004) : 3665-3669

[6] I.S. Hamad,. Detection of Ampicillin Transposon in *Klebsiellapneumonia*.M.sc. Thesis, (2006) College of Science, University of Babylon

[7] R.Podschun, Ullmann, U.. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews, 11*(4) 589-603:(1998),

[8] J.G.Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams,.. Bergey^{s} manual of 88–((1994) 20: . determinable bacteriology 9th ed. William and Wilkins, Baltimore. (II) .)105

[9] J. G.Collee, A. G.Fraser, B. P. Marmian, A. Simmons,. Mackie and McCarteny. Paractical 97 – 123. :Medical Microbiology. 14th ed., Churchill Livingston, Inc., New York. (1996)

[10] S **.Todar**.Microorganisms Body sits and Infection courtesy of pharmacy and helth in formation,.(2002) .WWW.Tostepharmd .net /pharm.

[11] K. Steve, S.Dennis, J. Mary,. Laboratory exercises in organismal and molecular microbiology. (2004). ASM. Washington. USA.

[12] W.C. Jr. Winn, S.Allen, W. Janda , E.Koneman, G. Procop, P.Schreckenberger, G.Woods ,. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. (2006) 6th Ed. Lippincott, Williams & Wilkins.

[13] B.A. Forbes, D.F. Sahm, A.S.Weissfeld, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology . 12th ed. Mosby. Inc. St. Louis. USA ., (2007):166-167 .

[14] A. E. Brown,. Benson`s Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. (2007)10thed., P. 102-263. McGraw-Hill comp. Inc., USA.

[15] J. R. Dillon , A. Nasim , E.R. Nestmann ,. Recombinant DNA Methodology (1985). John Wiley and Sons , USA.

[16] F. M.R. Ausuble , R.E.T. Brent , D.D.Kingston, J. A. Moore, J. D. Smith , Seidman , K.Struk , Current protocols in Molecular Biology.John Wiley and Sons , inc**(**1987)., New York

[17]J. Sambrook, E.F. Fritsch, T.Maniatis. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. Cold spring Harbor laboratory Press. New York (1989), : 172-173 .

[18] Y. Chander, M.A. Ramakrishnan, N. Jindal, K.Hanson, S.M. Goyal.
Differentiation of K. pnuemoniae and K.oxytoca by multiplex polymerase chain reaction.Intern J Appl Res Vet Med , 9(2) ,(2011): 138

[19] A. Sonavane , M .Mathur, D. Turbadkar , V. Baradkar . Antimicrobial Susceptibility pattern in Urinary bacterial isolates .Bombay hospital Journal.50(2) **(2008)**:240-244.

[20] A. J. Sagnimeni, D. L.Paterson, D. S. Hansen, A. V. Gottbery, S.Mohapatra, J. M.Casellas, H.Goossens, L.Mulazimoglu, G.Trenholm, K. P. Klugman, J. G. Mccormack, V. L. Yu. Community acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia global differences in clinical patterns, Emer. Infect. Dis, 8 .**(2002)** : 160 – 167.
[21] S.A. Rassol, A. Ahmed, S. Khan, A. Wahab.. Plasmid borne antibiotics resistance factors among indigenous Klebsiella. Pak J. Bot. 35.**(2003)**:243-248.

[22] J.H. Darrell, D.F. Hurdli Identification and clinical significance of Klebsiella species in chest infections .J. clin. Path. **. 17 .(**1946):617-621.
[23] K. W.Thomas, Z. K. Liu Ling. Augustine ,F. B. Cheng Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Direct Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures.J Clin Microbiol. 41(10) **.(2003)**: 4705–4707.