

# 臺南藥理學院教師專題研究計劃成果報告

計劃名稱：應用聚合酶鏈反應（PCR）方法快速鑑定克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)

計劃編號：CNIS-89-15

執行期間：88年9月1日至89年6月30日

計劃類別：個別型

主持人：蘇哲弘

協同主持人：張淑玉、陳連輝

## 摘要：

為了解以聚合酶鏈反應(PCR)之快速方法，代替傳統生化型及血清型鑑定分離自臨床檢體之克雷伯氏肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* 之可行性，本研究以 *K. pneumoniae* 之溶血基因( *hly* )所發展出之 PCR 引子及由成大醫院提供臨床檢體分離出之 51 株 *K. pneumoniae* 菌株進行 PCR 檢測，其結果皆為正反應，而其他克雷伯氏菌屬及非克雷伯氏菌屬之菌株，則皆無 PCR 產物之產生。若直接進行一次聚合酶鏈反應，則其檢測之靈敏度達  $10^3$  CFU，然若進行二次聚合酶鏈反應，則其檢測靈敏度可提高至  $10^0$  CFU。上述實驗結果顯示 PCR 技術為一快速、可靠之方法，並可用於臨床分離之克雷伯氏肺炎桿菌之快速鑑定。

關鍵字：聚合酶鏈反應，克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)

## 前言：

有效的控制院內感染，常是降低致病率及死亡率的重要因素，在革蘭氏陰性菌中，*Klebsiella pneumoniae* 是最常見引起院內感染的重要病原菌，其常易引起菌血症、腦膜炎、肺炎及尿路系統之感染 [1, 2, 3]。而由 *K. pneumonia* 菌引起之化膿性肝膿瘍在外國早期之文獻中並不常見，然在 1960 年代開始發現 *K. pneumonia* 肝膿瘍之發生有逐年增加趨勢。據國外文獻報告，其發生率佔所有化膿性肝膿瘍之 27 % [4, 5]。相對於此，近年來在台灣地區高達 50~80% 的化膿性肝膿瘍為 *K. pneumoniae* 感染 [6, 7, 8]。更重要的，國內許多 *K. pneumonia* 肝膿瘍患者皆發生肝外轉移病症，而造成很嚴重的合併症 [9, 10, 11]。最麻煩之合併症是轉移至眼球，發生敗血性內眼炎導致失明 [12]，而國外則很少有此種病例報告，如此大的差異，頗受國內感染專家學者的重視。克雷伯氏桿菌屬之各菌種包括：*K. oxytoca*、*K. planticola*、*K. pneumoniae*、*K. terrigena*、及 *K. trevisanii* 等，不具運動性，在培養基上生長的菌落很大、高凸，因產生細胞外黏液而呈黏液樣，在 MacConkey 培養基上因發酵乳糖而呈粉紅色。多數菌株能產生尿素分解酶，而菌株間之生化反應變異很大。英

膜分型(capsular serotype)，依調查顯示克列伯氏桿菌屬已有 77 種，而其中只有 type I ~ type VI 之抗血清商品化 [13, 14]。

傳統用來鑑定 *K. pneumoniae* 的培養基包括 Triple sugar agar (TSI)、Simmons' citrate agar、Christensen's urea agar、Sulfide-indole-Motility medium(SIM)、Voges-Proskauer(VP) medium、Moller's ornithine decarboxylase medium、Lysine iron agar 及 Motility-indole-ornithine agar(MIO)，另需操作氧化酶試驗 (Oxidase test)，再依據這些生化特性反應結果，查閱鑑定表，或配合使用電腦密碼鑑定系統，協助鑑別(1)。由於 *K. pneumoniae* 菌株之分離鑑定過程相當繁複 (傳統之檢測法需要五至七天)，且菌株間之生化反應變異性又大，因此發展 *K. pneumoniae* 之快速檢測方法，在醫療及疫情防治工作上均有其必要性。

近年來，由於聚合酶鏈反應技術之發展，已相繼用在許多食品及臨床檢體中病原菌之檢測，例如：病原性大腸桿菌[15]，李斯特菌[16]，沙門氏菌[17, 18]及創傷弧菌[19]等之檢測；其所具之高靈敏度及準確性，提供檢驗人員不需經任何培養過程，即可快速檢出樣品中少量病原菌之可行性，因而大大提高檢驗時效，並且日益受到重視。Gonnie 經由 *K. pneumoniae* 的 *pho* 基因(即可在外膜上形成孔洞蛋白之基因)發展出的寡核 酸引子(primer)，以聚合? 鏈反應之快速方法，取代傳統生化型及血清型鑑定克雷伯氏肺炎桿菌[20]，成效不錯，但卻仍有一菌株無法明確鑑別。本實驗室首次經由構築之 *K. pneumonia* 基因庫中，將 hemolysin 基因選殖出來，且利用雙去氧鏈終結法得到完整的 hemolysin 基因的核 酸序列[21]，將此序列與 Genbank database 中之所有基因之核苷酸序列一一比對，企圖了解此基因之同源性 (homology)，但是卻無法獲得任何與此 hemolysin 基因具有相當程度同源性之基因，此結果顯示此 hemolysin 基因乃 *K. pneumonia* 特異性之基因，可作為檢測 *K. pneumonia* 之 DNA 探針，或應用於聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction，PCR)技術之發展。我們將依 hemolysin 基因之核 酸序列，設計寡核 酸引子(Oligonucleotide primers)，針對臨床檢體分離之 *K. pneumoniae* 及其他類別的菌株進行聚合酶鏈反應檢測，確認其可行性。

## 本文：

### 材料與方法：

#### 一、菌株、菌種之保存與培養

本研究測試之 51 株 *K. pneumonia*、3 株 *K. oxytoca*、1 株 *Pseudomonas putida*、1 株 *Pseudomonas paucimobilis*、1 株 *Vibrio vulnificus*、及 5 株 *Aeromonas hydrophila* 係由成大醫院之患者檢體中分離而得。其他菌株 *Escherichia coli*、*K. oxytoca*、*K. planticola*、*K. terrigena*、及 *K. trevisanii* 等，購自國內食品工業發展研究所菌種保存及研究中心(Culture Collection and Research Center;

CCRC，新竹，台灣)。*Acinetobacter radioresistens* 由成大醫學院生化所提供。經單離確認之菌株分別以 50% 甘油保存於-70°C 冷凍庫中，另以 LB (Luria-Bertani broth) agar plate: 0.5 % yeast extract、1 % tryptone、0.1 % NaCl、1.5 % agar, 於 4-8°C 保存作為一般例行培養接種之用。菌種培養至 5ml LB，於 37°C 隔夜培養(12 小時)，部分菌液作系列稀釋，以計算菌數或作為染色體 DNA 之製備。

## 二、寡核苷酸引子、PCR 反應

本研究用來檢測 *K. pneumonia* 之 PCR 引子(primers)：Hly1 / Hly2，其序列如下：

Hly1 : 5'-AACGACCTGATTGCATTCGCCACTG - 3'

Hly2 : 5'-GGTCAGTCCAGTCGACCATCG - 3'

以上之寡核苷酸引子(Oligonucleotide primers)由快興科技有限公司(台北，台灣)合成。PCR 目標 DNA 之取得係根據 Gonne 等所發展出之煮沸法行之[12]，取 100μl 系列稀釋菌液至 0.5ml 微量離心管中，加熱煮沸 5 分鐘，離心 14000g，2 分鐘，取 10μl 上清液至 0.5ml 微量離心管中，作為反應模板，每管加入 10mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP 各 1μl, 10×PCR reaction buffer 4μl。及各 50pmol 的 Hly1 及 HLY2 引子，再加入 1unit 的 DNA polymerase，以無菌水加至終體積為 40μl。而後將微量離心管放入 PCR 反應器，反應溫控條件如下：先昇溫至 94°C，維持 30 秒，使 DNA 分開成雙股(denaturation)，再降溫至 51°C，維持 30 秒，進行黏合作用(annealing)，接著進行延長作用(extension)，於 72 °C 進行 1 分鐘，如此共 30 個循環。取 15μl 反應物，以 2% agarose 於 1× TBE buffer 中電泳，經 Ethidium bromide 染色後，於 UV box 觀察，拍照及記錄。

PCR 之靈敏度試驗，乃取 10μl 分別含  $10^2$  至  $10^8$  CFU/ml 之 *K. pneumoniae* 菌液，並依上述條件進行 PCR 反應，本研究另探討二次 PCR(double PCR)，以提高檢測靈敏度。其作法如下：取 10μl 第一次 PCR 反應液充當擴增模板，依前述條件進行另一次 PCR 反應，PCR 循環數為 30。

## 三、克雷伯氏肺炎桿菌(*K. pneumonia*)之莢膜多糖類(capsular polysaccharide)之鑑別

取 1ml 菌液至 1.5ml 微量離心管中，加熱煮沸 5 分鐘，莢膜多糖類即會產生凝集反應，由目測決定其量的多寡。

## 四、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)之血清學鑑定

購買 *Klebsiella capsular Typing sera*(日本生研)以普通常用之玻片凝集反應法檢查，決定其血清型。

## 結果與討論

本實驗用 *K. pneumoniae* 菌株。許多文獻報告指出大部份臨床分離之 *K. pneumoniae* 皆含有莢膜，實驗結果亦顯示莢膜多糖為重要的致病因子[22]。所以我們先檢測由成大醫院臨床檢體分離出之 51 株 *K. pneumoniae* 的莢膜分型與莢膜多糖類的含量，由於只有 Type I ~ Type VI 之抗血清商品化，故無法

完全鑑別出各菌株之血清型，但很明顯的是臨床分離到的 *K. pneumoniae* 多屬 Type I 及 Type II (表一)，此結果與國外文獻報告相符[23]，然各菌株所具有的多糖類含量，並不相同，而且即便是同血清型之 *K. pneumoniae*，其多糖類的含量也差異頗大(表一)，此結果顯示不可由多糖類之含量來評估 *K. pneumoniae* 之致病性。

以聚合酶鏈反應確認 *K. pneumoniae* 菌株。為了解以 PCR 之快速方法，代替傳統生化型及血清型檢測方法，確認分離自臨床檢體之 *K. pneumonia* 菌株的可行性，因此，我們以 PCR 方法來確認所收集菌株之可靠性。使用之 PCR 引子是由 *K. pneumonia* 之溶血基因(*hly*)序列所發展出來的。其中，*Hly1* 的序列是相對於核 酸序列 5 至 29；*Hly2* 的序列則是相對於核 酸序列 616 至 636，其 PCR 產物為 632 bp DNA 片段。本研究除了針對 *K. pneumoniae* 做檢測之外，亦選取如前面材料與方法所提到者 8 株非 *Klebsiella* 菌及 7 株非 *K. pneumoniae* 之 *Klebsiella* 菌，進行 PCR 引子特異性(specificity)之探討，其結果顯示，用來選殖溶血基因之 *K. pneumonia* 菌株及 51 株收集自成大醫院患者之 *K. pneumoniae* 菌株，皆為正反應(表一)，部分 PCR 反應之電泳結果，則如圖一所示；而其餘非 *Klebsiella* 菌與非 *K. pneumoniae* 之 *Klebsiella* 菌，其 PCR 反應則皆無專一性的 632 bp DNA 片段產生(圖二、圖三)，顯示本研究用之寡核 酸引子之特異性確實可靠。

PCR 之檢測靈敏度。由於應用 PCR 方法於臨床檢體中 *K. pneumoniae* 之檢測，除檢測的正確性外，檢測靈敏度亦相當重要，因此，本研究亦探討 *Hly1/Hly2* 引子對的 PCR 檢測靈敏度。各取  $10^2\sim10^8$  稀釋濃度的菌液煮沸之後離心取上清液，進行一次 PCR 反應之後，則其檢測所需最低菌數達到  $10^3$ CFU(圖四)。而若進行二次 PCR(double PCR)，即以第一次 PCR 產生的 DNA 片段為模板，再進行 PCR，則其靈敏度可提高至  $10^0$ CFU(圖五)。本研究中，雖然並未探討直接應用此 PCR 系統於血液或其他臨床樣品中之檢測，但本次研究顯示，以 *Hly1/Hly2* 引子對進行二次 PCR 反應，在檢測特異性及靈敏度上均符合要求，因此將可應用於臨床檢體中 *K. pneumoniae* 之快速，正確且具高靈敏度之檢測。

綜合以上所述，由於 *K. pneumoniae* 的 PCR 檢測結果與傳統生化型及血清型鑑定結果十分相符，故本研究認為 *K. pneumoniae* 感染的患者，對其病原菌之檢測而言，PCR 方法不失為一快速，可靠的初步篩檢之方法。

## 參考文獻

1. Kreger, B. E., Craven, D. E., Carling, P. C. and W. R. McCabe. "Gram-negative bacteremia, III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients". Am. J. Med., 68, pp.332-343, 1980.
2. Darfeuille-michaud, A., Jallat, C., Aubel, D., Sirot, D., Sirot, J., and Joly, B. "R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains

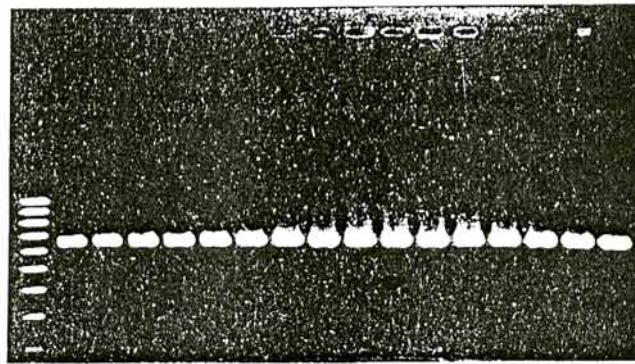
- responsible for human nosocomial infections". *Infect. Immun.* 60, pp.44-55, 1992.
3. Greenstein AJ, Lowenthal D, Hammer GS, Schaffner F, Aufses AH. Jr. "Continuing changing patterns of disease in pyogenic liver abscess: a study of 38 patients". *Am. J Gastroenterol.* 79, pp.217-226, 1984
  4. Goldman JM, Kowalec JK. "Hepatic abscess and osteomyelitis from *Klebsiella pneumoniae*". *JAMA*, 240, pp.2660, 1978.
  5. Seeto RK, Rockey DC. "Pyogenic liver abscess: changes in etiology, management, and outcome". *Medicine*, 75, pp.99-113, 1996.
  6. Lee TY, Wan YL, Tsai CC. "Gas-containing liver abscess: radiological findings and clinical significance". *Abdom Imaging*, 19, pp.47-52, 1994.
  7. Yang CC, Chen CY, Lin XZ, Chang TT, Shin JS, Lin CY. "Pyogenic liver abscess in Taiwan: emphasis on gas-forming liver abscess in diabetes". *Am. J. Gasterol.* 88, pp.1911-1915, 1993.
  8. Liu YC, Cheng DL, Chen YS, Yen MY, Wang JH, Wang YS, Wann SR, Lin HH, Huang WK. "A pilot study of oral fleroxacin once daily compared with conventional therapy in patients with bacterial liver abscess". [Abstract] In: Proceedings of the 7th International Congress for Infectious Diseases. Hong Kong ,296, 1996.
  9. Chiu CT, Lin DY, Liaw YF. "Metastatic septic endophthalmitis in pyogenic liver abscess". *J. Clin. Gastroenterol.* 10, pp.524-527, 1988.
  10. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Shi FW, Wang LS. "Pyogenic liver abscess: clinical manifestations and value of percutaneous catheter drainage treatment". *J. Formos. Med. Assoc.* 89, pp. 571-576, 1990.
  11. Chang FY, Chou MY, Fan RL, Shaio MF. "A clinical study of *Klebsiella* liver abscess". *J. Formos. Med. Assoc.* 87, pp.282-287, 1988.
  12. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. "Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess: their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteria in diabetic patients". *Arch. Intern. Med.* 151, pp. 1557-1559, 1991.
  13. Ørskov, F., and I. Ørskov. "Serotyping of Enterobacteriaceae with special emphasis on K antigen determination", pp.37-38, In J. R. Norris and T. Bergen (ed.), Methods in Microbiology. Academic Press Ltd., London. 1978.
  14. Chang, H. Y., Lee, J. H., Deng, W. L., Fu, T. F. and H.L. Peng. "Virulence and outer membrane properties of a galU mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43". *Microbial Pathogenesis*, 20, pp.255-261, 1996.
  15. Gannon, V. P., King, R. K., Kim, J. Y., and T. Golsteyn. "Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction". *Appl. Environ. Microbiol.* 58,

- pp.3809-3815, 1992.
16. Besessin, M. T., Luo, Q., Rotbart, H. A., Blaser, M. J. and R. T. Ellison III. "Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction". Appl. Environ. Microbiol, 56, pp.2930-2932, 1990.
  17. Tsen, H. Y., Liou, J. W. and C. K. Lin. "Possible use of a polymerase chain reaction method for specific detection of *Salmonella* in beef". J. Ferment. Bioeng, 77, pp.137-143, 1994.
  18. Song, J. H., Cho, H., Park, M. Y., Na, D. S., Moon, H. B. and C. H. Pai, "Detection of *salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction". J. Clin. Microbiol, 31, pp.1439-1443, 1993.
  19. Hill, W. E., Stacey, S. P., Trucksess, M. W., Feng, P., Kaysner, C. A., and K. A. Lampel. "Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters". Appl. Environ. Microbiol, 57, pp.707-711, 1991.
  20. Spierings, G., Silfhout, A. V., Hofstra, H., and Jan, T. "Identification of *Klebsiella pneumoniae* by DNA hybridization and fatty acid analysis". Int. J. Syst. Bacteriol, 42(2), pp.252-256, 1992.
  21. 蘇哲弘, 張淑玉, 陳連輝, 張敏政. "*Klebsiella pneumoniae* hemolysin 基因的選殖." 第十三屆全國技術及職業教育研討會論文集醫護類, pp.83-90, 1998.
  22. Williams, P., and J. M. Tomas. "The Pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*". Rev. Med. Microbiol, 1, pp.196-204, 1990.
  23. Podschun, R. "Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources". Zentbl. Hyg. Umweltmed, 189, pp.527-535, 1990.

表一、由成大醫院之患者檢體中分離之 *K. pneumoniae* 菌株，分別測其莢膜分型，莢膜多醣及 PCR 的檢測結果。

Strain	Capsule serotype	Polysaccharide	PCR results	Strain	Capsule serotype	Polysaccharide	PCR results
<i>K. pneumoniae</i>	?	+	+	Kp26	I	+++++	+
Kp1	III	++	+	Kp27	I	+++	+
Kp2	?	+	+	Kp28	V	+	+
Kp3	?	++	+	Kp29	?	+	+
Kp4	III	+	+	Kp30	?	++++	+
Kp5	?	+++++	+	Kp31	?	+++	+
Kp6	I	+	+	Kp32	?	+	+
Kp7	?	++	+	Kp33	?	++++	+
Kp8	II	+++	+	Kp34	I	++++	+
Kp9	I	+++	+	Kp35	II	++++	+
Kp10	?	+	+	Kp36	I	+++++	+
Kp11	V	+	+	Kp37	V	++	+
Kp12	V	+	+	Kp38	?	+	+
Kp13	?	+	+	Kp39	II	++	+
Kp14	III	++	+	Kp40	I	++++	+
Kp15	V	+	+	Kp41	I	++	+
Kp16	?	+++	+	Kp42	I	++++	+
Kp17	V	+	+	Kp43	?	+	+
Kp18	?	+	+	Kp44	?	+	+
Kp19	?	+	+	Kp45	II	+	+
Kp20	I	+++	+	Kp46	II	++++	+
Kp21	II	++++	+	Kp47	I	++++++	+
Kp22	V	++	+	Kp48	I	+++	+
Kp23	?	+	+	Kp49	I	++	+
Kp24	V	+	+	Kp50	?	+	+
Kp25	II	+	+	Kp51	II	++	+

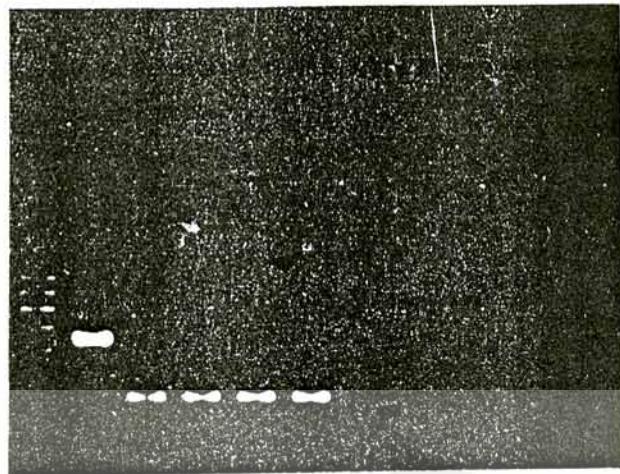
*K. pneumoniae* : 進行 hemolysin 基因選殖之 *K. pneumoniae*



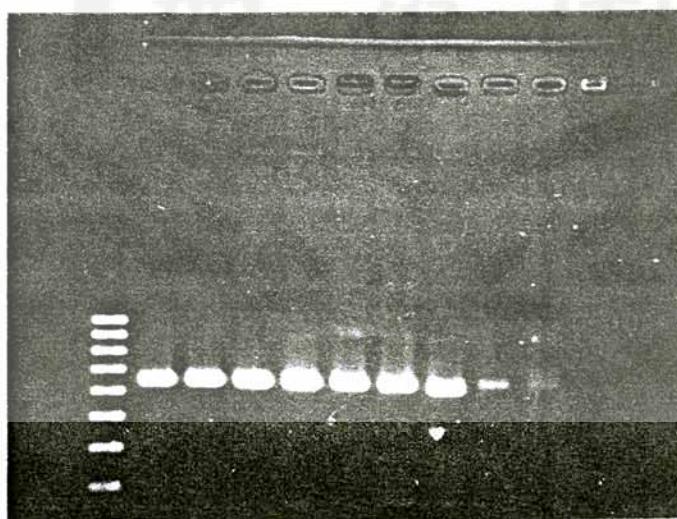
圖一、利用 PCR 引子對 Hly1/Hly2，針對臨床分離出之 *K. pneumoniae* 菌株進行 PCR 反應所得的特異性 DNA 產物。Lane1 : Marker ; Lane2: 進行 hemolysin 基因選殖之 *K. pneumoniae* ; Lane3 : Kp1; Lane4: Kp2; Lane5 : Kp3; Lane6 : Kp4; Lane7 : Kp5; Lane8 : Kp6; Lane9 : Kp7; Lane10 : Kp8; Lane11 : Kp9; Lane12 : Kp10; Lane13 : Kp11; Lane14 : Kp12; Lane15 : Kp13; Lane16 : Kp14; Lane17 : Kp15。進行 PCR 的條件為 94°C/30 秒，51°C/30 秒，72°C/1 分，PCR 流程為 30 循環。



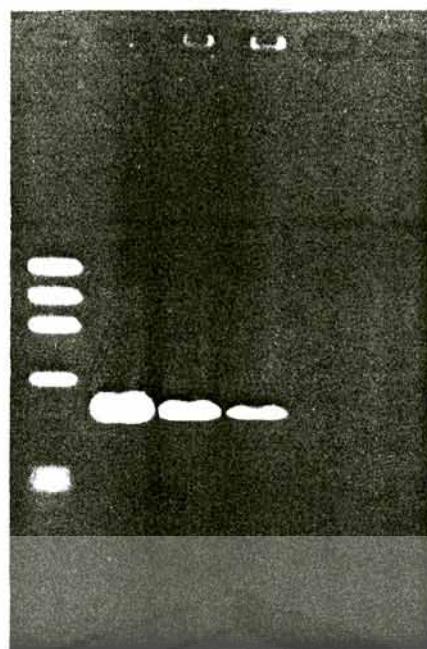
圖二、利用 PCR 引子對 Hly1/Hly2，針對非 *K. pneumoniae* 菌株進行 PCR 反應。Lane1:Marker; Lane2:*K. pneumoniae*; Lane3~Lane7:*Aeromonas hydrophila*; Lane8~Lane13 : *Escherichia coli* ; Lane14: *Pseudomonas putida* ; Lane15: *Pseudomonas paucimobilis* ; Lane16: *Acinetobacter radioresistens* ; Lane17: *Vibrio vulnificus*。進行 PCR 的條件為 94°C/30 秒，51°C/30 秒，72°C/1 分，PCR 流程為 30 循環。



圖三、利用 PCR 引子對 Hly1/Hly2，針對 *Klebsiella* 菌屬之菌株進行 PCR 反應。Lane1：Marker, Lane2：*K. pneumoniae*。Lane3~Lane6：*K. oxytoca*；Lane7：*K. planticola*；Lane8：*K. terrigena*；Lane9：*K. trevisanii*。進行 PCR 的條件為 94 °C/30 秒，51°C/30 秒，72°C/1 分，PCR 流程為 30 循環。



圖四、PCR 睿敏度試驗。利用 PCR 引子對 Hly1/Hly2，針對 *K. pneumoniae* 菌株進行一次 PCR 反應。Lane1：Marker; Lane2：進行 hemolysin 基因選殖之 *K. pneumoniae*；Lane3~Lane9：菌數分別為  $5 \times 10^8$  (Lane3)； $10^8$  (Lane4)； $10^7$  (Lane5)； $10^6$  (Lane6)； $10^5$  (Lane7)； $10^4$  (Lane8)； $10^3$  (Lane9)； $10^2$  (Lane10)。進行 PCR 的條件為 94°C/30 秒，51°C/30 秒，72°C/1 分，PCR 流程為 30 循環。



圖五、PCR 睿敏度試驗。利用 PCR 引子對 Hly1/Hly2，針對 *K. pneumoniae* 進行二次 PCR 反應。Lane1：Marker; Lane2~Lane4：菌數分別為  $10^2$  (Lane2)； $10^1$  (Lane3)； $10^0$  (Lane4)。進行 PCR 的條件為  $94^\circ\text{C}/30$  秒， $51^\circ\text{C}/30$  秒， $72^\circ\text{C}/1$  分，PCR 流程為 30 循環。

# **Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) Method for the Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae***

<sup>1</sup>Jer-Horng Su, <sup>2</sup>Shwu-Yuh Chang, <sup>1</sup>Lien-Huei Chen

<sup>1</sup> Department of Industrial safety and hygiene, Chia-Nan college of pharmacy and science,  
Tainan, Taiwan, R. O. C.

<sup>2</sup> Department of Food Health, Chia-Nan college of pharmacy and science,  
Tainan, Taiwan, R. O. C.

## **ABSTRACT**

In order to evaluate the applicability for using the polymerase chain reaction (PCR) method to replace the conventional biotyping and serotyping method for identification of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical patients. PCR primers derived from the *hly* gene coding for *K. pneumoniae* hemolysin were used for the identification of *Klebsiella pneumoniae* strains obtained from the National Cheng Kung University Hospital. All 51 *K. pneumoniae* isolates were capable of generating positive reactions. In addition, *Klebsiella* isolates other than *K. pneumoniae* and non-*Klebsiella* isolates did not yield positive reaction. Study on the detection sensitivity for this PCR system shows that when single PCR running was performed, the minimal cell number required to give a positive reaction was  $10^3$ . However, when double PCR running was performed, the detection sensitivity increased to  $10^0$  CFU. Therefore, these preliminary data indicates that PCR is a rapid and reliable method that can be used for the identification of *K. pneumoniae*.

**Key words:** Polymerase chain reaction, *Klebsiella pneumoniae*