

# 稳定表达荧光素酶的产酸克雷伯菌在评估不同灭菌方法中的应用

滑明溪 袁临天 李昂

**【摘要】目的** 构建稳定表达荧光素酶基因 (*lux*) 的产酸克雷伯菌, 旨在更直观地观察产酸克雷伯菌 (*K. oxytoca*) 在宿主体内的分布以及评估不同杀菌方法的效果。**方法** 扩增pBAV1k-T5-*Lux*质粒的荧光素酶基因簇 (*Lux A/B/C/D/E*), 构建含有*Lux A/B/C/D/E*基因簇的pBBR1质粒 (pBBR1-*lux*), 并获得能够表达荧光素基因基因的大肠埃希菌 (*E. coli*-pBBR1-*lux*)。将pBBR1-*lux*质粒电转化至产酸克雷伯菌感受态细胞, 经荧光强度鉴定及菌株的3次传代, 筛选能够稳定表达*lux*基因的产酸克雷伯菌 (*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*)。**结果** 连接成功的环状质粒产物命名为pBBR1-*lux*。与大肠埃希菌对照株相比, 含*E. coli*-pBBR1-*lux*的Luminescence荧光信号值显著升高[15 345 (14 676, 18 654) vs. 63 (60, 82)], 差异具有统计学意义 ( $t = 21.14, P = 0.035$ )。*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*的Luminescence荧光信号值[399 303 (265 245, 617 192)]显著高于产酸克雷伯菌对照菌株[83 (63.5, 86.75)], 差异具有统计学意义 ( $t = 7.07, P = 0.014$ )。*E. coli*-pBBR1-*lux*和*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*均能够在Veritas微孔板光度计和小动物成像仪上检测到Luminescence荧光信号。将所得菌株按照1:10稀释6个梯度, 荧光值检测结果显示, Luminescence值随菌落浓度降低而下降。多次传代后pBBR1-*lux*能够在产酸克雷伯菌中稳定表达荧光素酶, 不同理化杀菌方法对产酸克雷伯菌杀菌效果不同, 紫外线和84消毒液 (10%) 是最有效的杀灭产酸克雷伯菌方法。**结论** 本研究获得了可被微孔板光度计和小动物成像仪检测到的稳定表达荧光素酶的*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*。

**【关键词】** 产酸克雷伯菌; 生物发光; 荧光素酶基因

**Application of *Klebsiella oxytoca* with stable expression of luciferase in evaluating different sterilization methods** Hua Mingxi, Yuan Liutian, Li Ang. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Li Ang, Email: liang@ccmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To construct a *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)-pBBR1-*lux* strain that stably express luciferase (*lux*) gene, and to investigate the distribution of *K. oxytoca* in vivo and to evaluate the effect of different methods of sterilization. **Methods** The luciferase gene cluster (*Lux A/B/C/D/E*) of pBAV1k-T5-*Lux* plasmid was amplified, and the pBBR1 plasmid (pBBR1-*lux*) containing *Lux A/B/C/D/E* gene cluster was constructed; while *Escherichia coli* which expressed fluorescein gene group (*E. coli*-pBBR1-*lux*) was obtained. The expression of luciferase in *E. coli*-pBBR1-*lux* and *K. oxytoca*-pBBR1-*lux* were tested using luminescence microplate spectrophotometer. The pBBR1-*lux* plasmid was electroconverted to the receptive cells of *K. oxytoca*; after fluorescence intensity identification and three passages of the strain, *K. oxytoca*-pBBR1-*lux* which stably express *lux* genes were screened. Conjugated circular plasmid product was named pBBR1-*lux*. The value of Luminescence fluorescence signal of *E. coli*-pBBR1-*lux* increased significantly compared with *E. coli* control strain [15 345 (14 676, 18 654) vs. 63 (60, 82)], with significant difference ( $t = 21.14, P = 0.035$ ). The value of Luminescence fluorescence signal of *K. oxytoca*-pBBR1-*lux* [399 303 (265 245, 617 192)] was significantly higher than that of the control strain *K. oxytoca* [83 (63.5, 86.75)], with

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2020.04.002

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81902025); 北京市医院管理局扬帆计划重点医学专业 (No. ZYLX2018-02-感染性疾病重症医学); 北京市博士后科研活动经费 (No. ZZ2019-019); 北京市自然科学基金 (No. 7184218)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所

通信作者: 李昂, Email: liang@ccmu.edu.cn

significant difference ( $t = 7.07, P = 0.014$ ). *E. coli*-pBBR1-*lux* and *K. oxytoca*-pBBR1-*lux* were both able to detect fluorescence signals on Veritas microplate photometer and small animal imager. According to 1 : 10 dilution of 6 gradients, the fluorescence detection results showed that the Luminescence value decreased with the decreasing of colony concentration. After repeated passage pBBR1-*lux* luciferase could be stably expressed in *K. oxytoca*. Different physicochemical methods had different bactericidal effect on *K. oxytoca*-producing bacteria. Ultraviolet ray and 84 disinfectant (10%) were the most effective methods to inactivate *K. oxytoca*-producing bacteria.

**【Key words】** *Klebsiella oxytoca*; Bioluminescence; Luciferase gene cassette

产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*, *K. oxytoca*) 是社区和医院感染常见的革兰阴性细菌, 其表面荚膜多糖是其主要的毒力因子<sup>[1-3]</sup>。产酸克雷伯菌能够表达广谱 $\beta$ -内酰胺酶 (extended spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs) 和碳青霉烯酶<sup>[4]</sup>, 因此能产生 $\beta$ -内酰胺和碳青霉烯类抗菌药物耐药, 已成为临床治疗中的难题<sup>[5-8]</sup>, 因此, 亟需有力工具评估现行抗菌药物使用的疗效、新的抗菌药物或其他杀菌方法效果<sup>[9]</sup>。

生物发光是生物体内在酶作用下发光的现象。生物发光现象广泛存在于细菌、昆虫等生物体中<sup>[10-11]</sup>。荧光素酶基因操纵子 (luciferase gene cassette, *lux*) 操纵子由一组编码荧光素酶及其同源底物的基因组成, 这些基因相互作用产生光, 此现象称为生物发光。利用*lux*基因标记细胞的生物发光技术具有操作简便、结果直观、不依赖底物、对机体损伤小等优点。该技术已广泛应用于肿瘤生长监测和转移示踪、基因治疗、目标基因表达的检测等多个领域<sup>[12]</sup>。

与传统增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 等荧光标记相比, 细菌的生物发光成像能够实时监测细菌在动物的感染进程, 了解宿主的发病机理, 对研究细菌与宿主间的相互作用和开发和评估疫苗和抗菌药物具有重要意义。本研究构建含有荧光素酶基因 (*lux*) 的pBBR1-*lux*质粒, 并将通过电转化至产酸克雷伯菌, 筛选可稳定表达荧光素酶的产酸克雷伯菌, 并初步探讨不同理化方式对产酸克雷伯菌的杀菌效果, 现报道如下。

## 材料与方 法

### 一、试验材料

产酸克雷伯菌菌株经全自动微生物分析仪 (美国BD公司) 鉴定, 确定为氯霉素敏感的产酸克雷伯菌 (药敏试验结果的判断参照美国临床实验室标准

化研究所的推荐标准)<sup>[13]</sup>。大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 $\alpha$ 感受态细胞、质粒小提试剂盒购于天根生化科技有限公司。胶回收试剂盒购于德国QIAGEN公司。高保真DNA聚合酶Q5、高保真DNA连接酶、*Kpn* I、*Hind* III限制性内切酶均购于美国NEB公司。pBAV1k-T5-*Lux*和PBBR1MCS-1购于淼灵质粒平台, 氯霉素购自美国Thermo。

检测仪器: Veritas微孔板光度计 (Turner BioSystems)、NanoDrop™ One超微量紫外分光光度计 (Thermo)、IVIS Lumina LT小动物活体成像仪 (珀金埃尔默)。

### 二、细菌培养

产酸克雷伯菌固体培养基为哥伦比亚血平板基础培养基 (OXOID) 添加8%脱脂羊血 (北京冬歌博业生物科技有限公司), 液体培养基为脑心浸液培养基 (Brain Heart Infusion, BHI) (OXOID)。 *E. coli* DH5 $\alpha$ 的培养基为LB (Luria-Bertani) 培养基 (OXOID), 如需固体培养, 则在培养基中加入15%琼脂 (OXOID)。

### 三、产酸克雷伯菌点转化感受态制备

挑取产酸克雷伯菌单个菌落接种于液体BHI培养基, 37 °C静置培养过夜。取过夜培养的产酸克雷伯菌菌液以1 : 10的比例接种于新鲜的BHI培养基中, 37 °C静置培养至 $A_{600}$ 为0.3~0.4。取出对数期菌液, 冰浴 30 min后, 4 °C、4 000 r/min离心收集菌体, 菌体分别用预冷的无菌双蒸水和预冷的1%蔗糖溶液洗涤2遍后, 即为产酸克雷伯菌感受态细胞<sup>[14]</sup>。

### 四、pBBR1-*lux*质粒电转化

取5  $\mu$ l pBBR1-*lux*质粒加入到100  $\mu$ l产酸克雷伯菌感受态细胞中, 混匀后冰浴10 min。将上述混合物转移至预冷的0.1 cm电击杯 (美国Bio-Rad公司) 中, 于电场强度22.5 kV/mm, 电阻200  $\Omega$ , 电容25  $\mu$ F条件下进行电转化。电击结束后, 立即向电击杯中加入950  $\mu$ l、37 °C预热的BHI培养基, 于37 °C静置培养1 h后涂布于含25  $\mu$ g/ml氯霉素的哥

伦比亚血平板培养基。37 °C 培养24 h, 挑取阳性菌落进行鉴定。

五、*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*细菌传代培养及荧光强度的鉴定

*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*阳性菌落冻存于-70 °C。复苏得到单菌落为第3代菌株(P3), 将P3经1:1 000稀释后培养至对数期( $A_{600} = 0.5 \sim 0.8$ )所得菌株为第4代菌株(P4)。依此类推得到P5、P6、P7、P8、P9和P10菌株。将上述菌株稀释至 $10^6$ 菌落形成单位(colony-forming unit, c.f.u)/ml, 检测其荧光强度。

六、不同理化方法对于*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*杀菌效果的鉴定

本研究采用6种不同物理化学方法处理。物理方法: 用接种环(1  $\mu$ l)对*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*在BHI平板上3区划线, 37 °C 孵箱中培养2 h, 紫外灯照射上述平板表面30 min。化学方法: 使用酒精(75%)、84消毒液(10%)、 $H_2O_2$ (30%)、NaOH(0.4%、4%)分别浸泡细菌接种环(1  $\mu$ l)30 min, 分别挑取1  $\mu$ l *K. oxytoca*-pBBR1-*lux*进行3区划线。上述处理后的*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*平板37 °C 培养8 h后, 使用Lumina LT成像仪(珀金埃尔默)观察*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*荧光值。

七、统计学处理

应用GraphPad Prism 7.0软件进行统计分析, 采用Kolmogorov-Simrnov对荧光值数据进行正态性检验。*E. coli*-pBBR1-*lux*和*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*荧光信号检测数据为偏态分布, 荧光值用中位数表示, 两组间采用Wilcoxon秩和检验。不同浓度*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*荧光信号检测数据为偏态分布, 荧光值以均值表示, 采用one way ANOVA检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

一、pBBR1-*lux*泛宿主质粒的构建

pBAV1k-T5-*Lux*质粒长度10 546 bp, 其*luxA*/B/C/D/E基因簇受T5启动子操纵, 共5 663 bp, 使用Q5高保真DNA聚合酶和含有*Lux*基因簇的引物对(*Lux* F: 5'→3': AGGGAACAAAAGCTGGGTAC GATTCAATTGTGAGCGGATAAC/*Lux*。R: 5'-3': GCTGCAGGAATTCGATATCAATTTGTCCTACTC AGGAGAG, 引物设计过程中加入与pBBR1相同

的序列)扩增PBAV1k-T5-*Lux*质粒的*Lux* A/B/C/D/E基团, 扩增片段为深红色标记(图1A)。

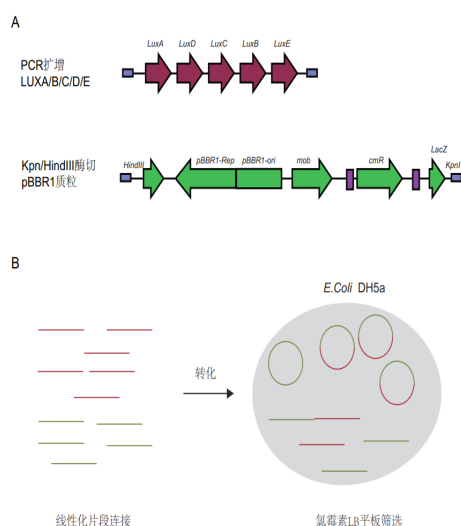
pBBR1是大小为4 707 bp的革兰阴性菌泛宿主质粒, 该质粒带有氯霉素耐药基因(Chloramphenicol resistance gene, cmR)、pBBR1复制起始位点(pBBR1ori)、pBBR1(pBBR1rep)调节因子。该质粒的3 321/3 281 bp处具有*Hind* III和*Kpn* I限制性内切酶的单一酶切位点, 采用*Hind* III/*Kpn* I酶切的方法获得线性化的pBBR1质粒, 见图1A。

将上述两个线性化片段经鉴定和凝胶回收后, 使用2 × NEBuilder HiFi DNA Assembly连接酶连接, 连接成功的环状质粒产物命名为pBBR1-*lux*, 转化至*E. coli* DH5 $\alpha$ , 使用含有氯霉素的LB平板进行筛选, 见图1B。

二、*E. coli*-pBBR1-*lux*表达荧光素酶功能验证

挑取转化pBBR1-*lux*质粒的大肠埃希菌阳性单菌落于含有氯霉素的LB液体培养基, 37 °C 培养4 h后鉴定荧光值。阳性菌株传至第3代后, 使用Veritas微孔板光度计检测其生物发光值(Luminescence), 选取第3代仍具有Luminescence的菌落命名为*E. coli*-pBBR1-*lux*。

与大肠埃希菌对照株相比, 含*E. coli*-pBBR1-*lux*



注: A上: PCR线性扩增*lux* A/B/C/D/E基因基团。下: *Hind* III/*Kpn* I 对pBBR1质粒进行双酶切; B: 两段带有同源序列的DNA片段组装后, 转化入大肠埃希菌感受态细胞, 在含有氯霉素的LB平板上筛选出的阳性菌落

图1 pBBR1-LUX A/B/C/D/E质粒构建过程示意图

的Luminescence荧光信号值显著升高[15 345 (14 676, 18 654) vs. 63 (60, 82)], 差异具有统计学意义 ( $t = 21.14$ 、 $P = 0.035$ )。IVIS Lumina LT小动物活体成像仪检测结果显示, *E. coli*-pBBR1-*lux*成像仪上可见荧光, 见图2。

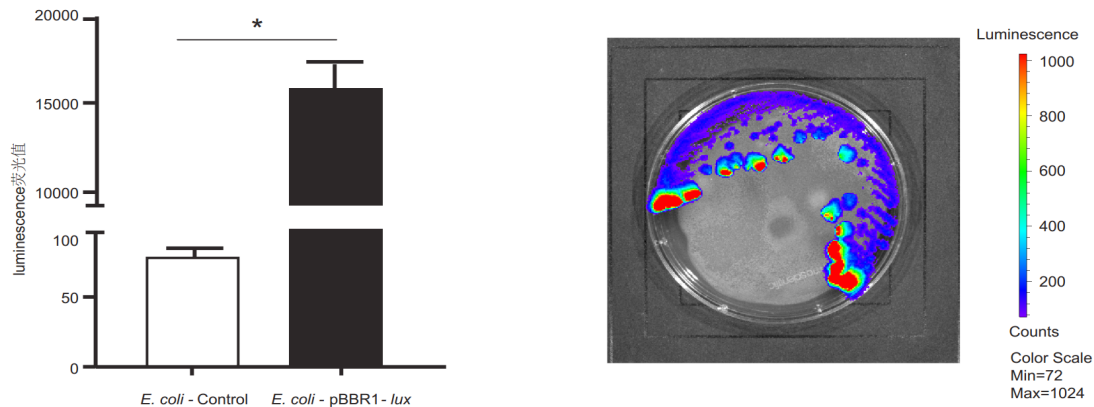
### 三、*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*表达荧光素酶功能验证

在液体LB培养基中大量扩增*E. coli*-pBBR1-*lux*, 并提取pBBR1-*lux*质粒。将质粒电转化至产酸克雷伯菌感受态细胞中。在含有氯霉素的哥伦比亚血平板培养基上筛选氯霉素耐药的阳性菌落。阳性菌落经过传代培养后, 使用Veritas微孔板光度计检测其Luminescence值, 选取第3代 (P3) 有Luminescence信号的菌落命名为*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*;

同时, *K. oxytoca*-pBBR1-*lux*的Luminescence荧光信号值[399 303 (265 245, 617 192)]显著高于产酸克雷伯菌对照菌株[83 (63.5, 86.75)], 差异具有统计学意义 ( $t = 7.07$ 、 $P = 0.014$ ), 使用IVIS Lumina LT小动物活体成像仪检测结果显示, *K. oxytoca*-pBBR1-*lux*成像仪上可见荧光 (图3)。重新复苏的*K. oxytoca*-pBBR1-*lux* (P3) 传至第10代 (P10) 后, 使用Veritas微孔板光度计检测其Luminescence值, P10细菌仍然具有稳定的荧光信号 (图4)。

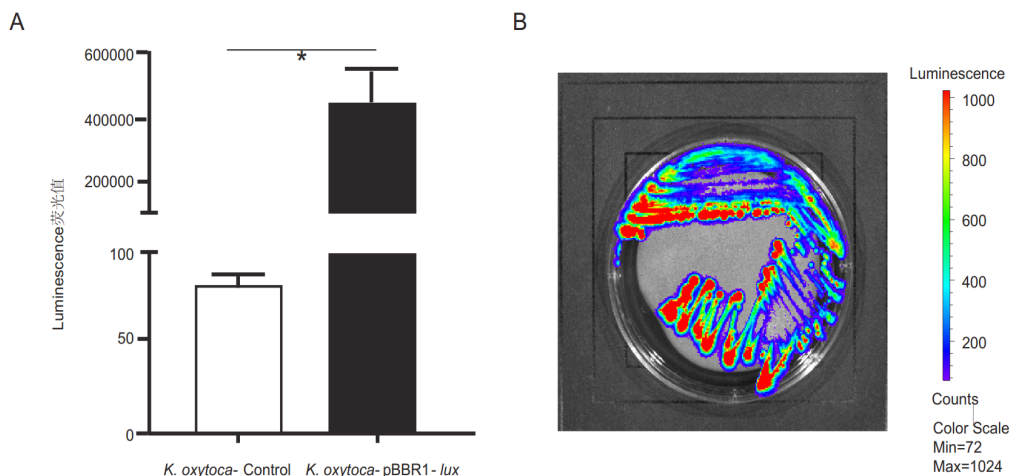
### 四、不同浓度*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*荧光素酶强度检测

挑取*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*单菌落菌株, 37 °C 培养4 h后, 使用Nano Drop™ One超微量紫外分光光



注: A: *E. coli*-pBBR1-*lux*的荧光值显著高于对照菌株; B: *E. coli*-pBBR1-*lux*在小动物活体成像仪上可见荧光。\*: 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )

图2 *E. coli*-pBBR1-*lux*能够稳定表达荧光素酶



注: A: *K. oxytoca*-pBBR1-*lux*的荧光值显著高于对照菌株*K. oxytoca*-Control; B: *K. oxytoca*-pBBR1-*lux*在小动物活体成像仪上可见荧光。\*: 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )

图3 *K. oxytoca*-pBBR1-*lux*稳定表达荧光素酶

度计检测细菌 $A_{600}$ 值。依据 $A_{600} = 10^9$  c.f.u计算细菌浓度<sup>[15-16]</sup>。将所得菌株按照1:10稀释6个梯度,在酶标仪上检测荧光值,结果显示Luminescence值随菌落浓度降低而下降,当菌株浓度为 $10^6$  c.f.u和 $10^5$  c.f.u时,其荧光强度分别为(5 869 ± 215.9)和(660.2 ± 215.9),见图5。

#### 六、不同处理方式对*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*杀菌效果的验证

紫外灯和84消毒液杀菌效果最强(完全杀菌:平板上未见*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*)。酒精、 $H_2O_2$ 和NaOH(0.4%, 4%)不能够完全杀灭*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*(不完全杀菌:平板上可见*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*),见图6。

## 讨 论

本研究结果显示,当细菌浓度为 $10^3$  c.f.u/ml时,其荧光强度与阴性对照差异无统计学意义,故该细菌如果用于动物实验时,其在动物体内富集浓度不能低于 $10^4$  c.f.u/ml。

产酸克雷伯菌属于革兰阴性肠杆菌,是院内感染和外科手术感染最常见的病原菌之一,产酸克雷伯菌感染与青霉素及其他抗菌药物使用相关<sup>[15-17]</sup>,研究发现,产酸克雷伯菌能够对碳青霉烯耐药,给临床治疗带来了极大的挑战<sup>[18-20]</sup>。故研发新的抗菌药物和寻找新的杀菌方法对于临床应对多耐药菌具有重要意义,而目前对于抗菌药物杀菌效果

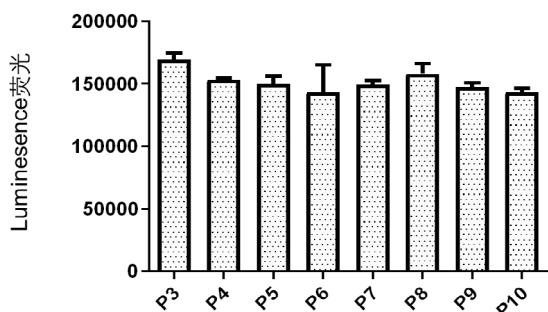


图4 传代至第十代后*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*稳定表达荧光素酶

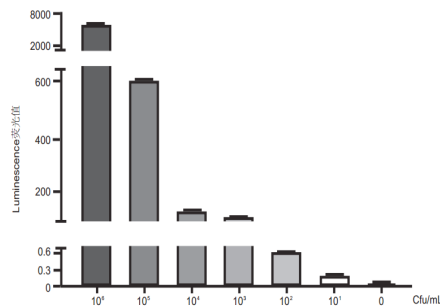


图5 不同浓度*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*的Luminescence 荧光强度

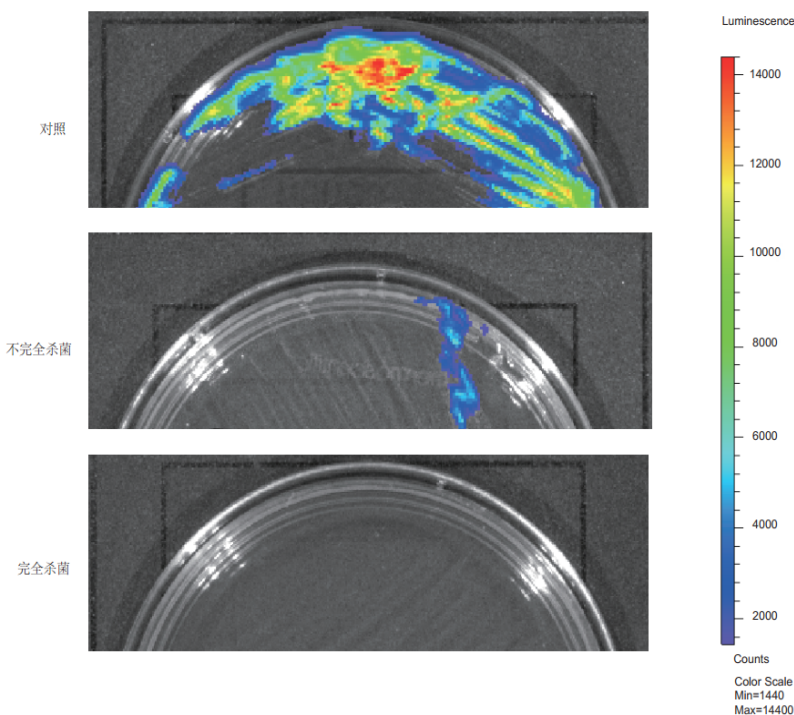


图6 不同理化杀菌方法对*K. oxytoca*-pBBR1-*lux*的杀菌效果

方法的检测主要为抗菌药物疗效的体外检测,而体内理化环境较为复杂,目前并无有效的方法观察抗菌药物在体内是否能发挥功能,本研究提供的能够在动物体内显色的产酸克雷伯菌能够更直观地评估杀菌效果。

生物素发光的信号不依赖于激光和底物,能够直接在动物成像仪上观察动物实验中肿瘤进展性转移或细菌感染进展等,因此是最理想的生物标记物<sup>[21-22]</sup>。本研究构建含有自发荧光的产酸克雷伯菌,不需要任何诱导剂便能够在较低浓度(10<sup>4</sup> c.f.u/ml)下观察到 Luminescence 荧光值,对于今后研究产酸克雷伯相关疾病进展,抗菌药物抗菌疗效以及新型抗菌药物研发中具有重要意义<sup>[23]</sup>。院感防控方面,本研究发发现紫外照射和84消毒液(10%)能够有效地杀灭产酸克雷伯菌;而酒精(75%)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%)和NaOH(0.4%, 4%)对产酸克雷伯菌灭菌效果不佳。重症医学科住院患者免疫力低下,侵入性操作多,导致患者接触耐药菌的机会增多<sup>[24-25]</sup>,本研究结果对于重症医学科环境消毒和侵入性操作之前对医疗器械的消毒处理有重要的指导作用。另外,本研究发发现 *K. oxytoca* -pBBR1-*lux* 荧光信号呈现显著的浓度依赖特点。因此,本研究可能提供一种新的细菌定量方法。

### 参 考 文 献

- [1] Högenauer C, Langner C, Beubler E, et al. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis[J]. N Engl J Med Overseas Ed, 2006, 355(23): 2418-2426.
- [2] Park EA, Kim YT, Cho JH, et al. Characterization and genome analysis of novel bacteriophages infecting the opportunistic human pathogens *Klebsiella oxytoca* and *K. pneumoniae*[J]. Arch Virol, 2017, 162(4): 1129-1139.
- [3] Jackson KJA. Prevalence of *Klebsiella oxytoca* in *Anolis carolinensis* of Louisiana[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2016, 16(12): 800-801.
- [4] Ochoa M, Salazar A, Gomez D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) TEM and SHV in intensive care unit patients with health-care associated infections, silenced genes?[J]. Int J Infect Dis, 2018, 73: 14.
- [5] Kumar Trivedi M. Phenotypic and biotypic characterization of *Klebsiella oxytoca*: An impact of biofield treatment[J]. J Microb Biochem Technol, 2015, 7(4): 202-205.
- [6] Leitner E, Zarfel G, Luxner J, et al. Contaminated handwashing sinks as the source of a clonal outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* on a hematology ward[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(1): 714-716.
- [7] 张文婧, 褚月娇, 王佳贺. 神经外科住院患者医院感染现状的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(20): 38-41.
- [8] 冯思语, 胡露露, 毕言伟, 等. 2013-2015年肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 南京医科大学学报, 2017(37): 328-331.
- [9] Tominaga T. Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Raoultella ornithinolytica* and other related bacteria in food by lateral-flow test strip immunoassays[J]. J Microbiol Methods, 2018, 147: 43-49.
- [10] Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review[J]. Gene, 1996, 173(1): 5-11.
- [11] Hastings JW, Greenberg EP. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria[J]. J Bacteriol, 1999, 181(9): 2667-2668.
- [12] Wang X, Chi H, Zhou B, et al. Bacterial luciferase gene cassette as a real-time bioreporter for infection model and drug evaluation[J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(8): 952-958.
- [13] Johnson JK, Robinson GL, Pineles LL, et al. Carbapenem MICs in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in critical care patients from 2001 to 2009[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(4): AAC.01718-16.
- [14] Li M, Shen X, Yan J, et al. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Mol Microbiol, 2011, 79(6): 1670-1683.
- [15] 林静, 何佳茜, 尚翠玲, 等. 5种常见致病细菌菌液OD值与其活菌数相关性研究[J]. 天津农学院学报, 2017, 24(4): 42-45.
- [16] 朱艳蕾. 细菌生长曲线测定实验方法的研究[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 108-112.
- [17] Beaugerie L, Metz M, Barbut F, et al. *Klebsiella oxytoca* as an agent of antibiotic-associated hemorrhagic colitis[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2003, 1(5): 370-376.
- [18] Dima Y, Babak H, Riederer KM, et al. *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* Bacteremia: differences in host, source, and antibiotic susceptibility[J]. Open Forum Infect Dis, 2019, 6(Supplement\_2): S112-S112.
- [19] 俞云松. 细菌耐药的流行现状及防控对策[J]. 中华临床感染病杂志, 2010, 3(3): 129-133.
- [20] 罗讯, 徐紫慧, 张文劲, 等. 欧盟和北美抗生素耐药性监测调查现状比较[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(4): 393-400.
- [21] 徐艳, 杨怀, 陈黎媛, 等. 中国临床微生物室参与医院感染及抗菌药物使用管理的现状[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(2): 33-39.
- [22] Bacconi M, Haag AF, Torre A, et al. A stable luciferase reporter plasmid for in vivo imaging in murine models of *Staphylococcus aureus* infections[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, 100(7): 3197-3206.
- [23] Leschner S, Weiss S. Noninvasive in vivo imaging to follow bacteria engaged in cancer therapy[M]. Bacterial Therapy of Cancer. Humana Press, New York, NY, 2016: 61-68.
- [24] 欧佳美, 胡秋蓉. 微生物检验中细菌耐药性监测的临床应用[J]. 深圳中西医结合杂志, 2018, 28(16): 88-89.
- [25] 张昭勇, 高波, 李显东, 等. VAP患者CRE医院感染分子流行病学特征及影响因素[J]. 山东医药, 2019, 63(25): 31-35.

(收稿日期: 2019-10-28)

(本文编辑: 孙荣华)

滑明溪, 袁临天, 李昂. 稳定表达荧光素酶的产酸克雷伯菌在评估不同灭菌方法中的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020, 14(4): 272-277.