

于灵芝,冯丽萍,孔志豪,等. 木糖葡萄球菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(1): 73-79.

YU L Z, FENG L P, KONG Z H, et al. Establishment of a qPCR method to detect *Staphylococcus xylosus* and its application [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(1): 73-79.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.01.010

木糖葡萄球菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用

于灵芝,冯丽萍,孔志豪,朱琦,魏晓锋*

(上海实验动物研究中心,上海 201203)

【摘要】 目的 本研究拟建立一种灵敏快速的实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 方法,用于检测大、小鼠木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*, *S. xylosus*)。 **方法** 本研究选择特异性 *gehM* 基因片段作为靶标合成了一套引物,建立了木糖葡萄球菌检测的 qPCR 方法。对木糖葡萄球菌标准菌株和其他非目标菌进行特异性分析。将木糖葡萄球菌的 DNA 进行 10 倍稀释测定其灵敏度。用送检的样本进行了临床应用并测序验证,同时与培养法进行比较。 **结果** 仅木糖葡萄球菌出现特异性扩增曲线,而其他非目标菌未出现,表明设计的引物对木糖葡萄球菌具有特异性,灵敏度为 100 fg/ μ L,组内和组间重复性均小于 3%。共检测 60 份临床样品,有 5 份样品扩增曲线为典型的 S 曲线,将该 qPCR 产物克隆测序并进行同源性比对,该序列与木糖葡萄球菌的同源性为 99.63%,表明该样本木糖葡萄球菌核酸阳性,所检测样本阳性率为 8.3%,而培养法的阳性率为 6.7%,qPCR 方法阳性检出率比培养法略高。 **结论** 建立的木糖葡萄球菌 qPCR 方法,具有快速、灵敏度高、特异性强和重复性好的优点,可用于实验动物木糖葡萄球菌的检测。

【关键词】 木糖葡萄球菌;检测方法;实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 01-0073-07

Establishment of a qPCR method to detect *Staphylococcus xylosus* and its application

YU Lingzhi, FENG Liping, KONG Zhihao, ZHU Qi, WEI Xiaofeng*

(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: WEI Xiaofeng. E-mail: wei.xf@outlook.com

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a method for rapid and sensitive *S. xylosus* detection using qPCR (real-time quantitative PCR). **Methods** A *gehM* gene fragment was selected as the target for *S. xylosus*. A set of specific primers was synthesized and a qPCR method was established to detect *S. xylosus*. A *S. xylosus* standard strain and other non-target strains were chosen for analysis. DNA of *S. xylosus* was diluted 10-fold to determine its sensitivity. Clinical samples were tested, and positive products were sequenced. The result were compared with those of bacterial culture. **Results** *S. xylosus* had a specific amplification curve, whereas other non-*S. xylosus* species did not, indicating that the primers were specific for *S. xylosus*. Sensitivity was 100 fg/ μ L DNA. Repeatability within and between groups was less than 3%. A total of 60 clinical samples were analyzed, of which five samples had a typical S curve. qPCR products were

【基金项目】上海市科技计划项目资助(20140900302,22DZ2291200)。

Funded by Science and Technology Plan Project of Shanghai Municipality(20140900302, 22DZ2291200).

【作者简介】于灵芝,女,助理研究员,博士,研究方向:病原体核酸检测方法研究。Email: yulingzhi@slarc.org.cn

【通信作者】魏晓锋,男,副研究员,硕士,研究方向:实验动物质量控制研究。Email: wei.xf@outlook.com

sequenced and BLAST searched. The similarity of the gene sequences was 99.63%, indicating that the sample was positive for the *S. xylosus* *gehM* gene with a positivity rate of 8.3%. However, the positivity rate of bacterial culture was 6.7%. The positivity rate of qPCR was slightly higher than that of the culture. **Conclusions** The established qPCR method is rapid with high sensitivity and specificity, and can be used to detect *S. xylosus*.

[Keywords] *Staphylococcus xylosus*; detection method; qPCR

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

木糖葡萄球菌 (*Staphylococcus xylosus*, *S. xylosus*) 是一种凝固酶阴性革兰氏阳性葡萄球菌,由其引起实验动物尤其是免疫缺陷小鼠感染的报道逐年增多。木糖葡萄球菌在 SPF 级 C57BL/6 小鼠皮肤上被发现是一种共生细菌^[1],会导致沙鼠的鼻腔皮炎^[2],能促进肝纤维化小鼠模型的肝纤维化和细菌移位^[3]。无胸腺裸鼠自发性感染木糖葡萄球菌表现为弥漫性鳞屑性皮炎^[4],经木糖葡萄球菌诱导的烫伤性皮炎表现为显著的真皮炎症^[5-6]。NADPH 氧化酶缺陷的小鼠通常被用作慢性肉芽肿疾病的模型,对木糖葡萄球菌的易感性增加,表现为皮炎和脓肿^[7-10]。NOS2 在宿主防御多种微生物中起着重要作用,因此,NOS2 基因敲除小鼠通常对木糖葡萄球菌感染没有反应,表现出伴有表皮溃疡的肉芽肿性皮炎,在这些小鼠皮肤中分离并鉴定到了木糖葡萄球菌,因此,作者认为,木糖葡萄球菌是 NOS2 基因敲除小鼠的潜在机会性病原体^[11-14]。

木糖葡萄球菌感染免疫缺陷或基因工程小鼠出现皮屑、脱毛、脓肿和皮炎等,严重影响实验动物质量及实验结果。免疫缺陷或基因工程动物作为疾病研究的重要工具,研发和使用数量逐年增强,对其进行木糖葡萄球菌的监测尤为重要。木糖葡萄球菌尚未被列入我国实验动物国家标准检测体系中,而其他国家的一些实验动物生产和使用单位已将其列为检测项目^[15]。

目前团体标准对木糖葡萄球菌的检测采用细菌培养及生化鉴定的方法^[15],耗时长,操作复杂。因此,有必要开发一种灵敏特异快速的检测方法。qPCR 方法兼具快速、特异性强和灵敏度高的优势,在医学检测领域已被广泛推广和应用,但用该方法检测木糖葡萄球菌的方法未见报道。本研究采用 *gehM* 基因片段作为靶标,建立了检测木糖葡萄球菌的 qPCR 方法,并将其应用于临床样本的检测,旨在监测免疫缺陷小鼠木糖葡萄球菌的携带状态,并对其进行控制,对保障研究结果的准确性和科学性至关重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

标准菌株包括木糖葡萄球菌(ATCC29971)、表皮葡萄球菌(CMCC26069)、嗜肺巴斯德杆菌(ATCC35149)、支气管鲍特杆菌(ATCC14065)、沙门氏菌(CMCC50115)、绿脓杆菌(ATCC27853)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、腐生葡萄球菌(ATCC BAA-750)和肺炎克雷伯杆菌(CMCC46117),由本实验室购买保存。头状葡萄球菌(23041070-1)、松鼠葡萄球菌(23041070-b)、松鼠葡萄球菌(23041905-b)、松鼠葡萄球菌(23041070-5a)和科氏葡萄球菌(22101015-2-3)由本实验室分离并保存。

1.1.2 主要试剂与仪器

TB Green® Premix Ex Taq™ II (批号:AM43086A)(日本 TaKaRa 公司);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;磁珠法核酸提取试剂(批号:20221020)(麦诺迪生物科技有限公司);Nanodrop(型号:ND-1000)(美国 Nanodrop 公司)。荧光定量 PCR 仪(型号:CFX Opus 96)(美国 Bio-Rad 公司);全自动核酸纯化仪(型号:Purifier 32)(麦诺迪(上海)生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物合成

本文选用 GenBank(登录号:AF208229.1)中登录的特异性 *gehM* 基因片段的引物组序列^[16-17],并通过 NCBI 比对确认引物的特异性。上下游引物序列分别为 *gehM*-F: 5'-GTAGAAAAAGCGAATGAA CAAC-3', *gehM*-R: 5'-CCTGGTTGCCAATCTTTA TATAC-3'。

1.2.2 DNA 提取

按照核酸提取仪操作说明书及配套提取试剂进行 DNA 提取。对 DNA 浓度进行定量,并按梯度稀释至所需的浓度。

1.2.3 qPCR 检测体系建立

将提取的 DNA 作为反应模板进行 qPCR 扩增。阴阳性对照的设计方案同本实验室已发表的参考文献^[18]。

反应体系:TB Green Premix (2 ×) 12.5 μL (终浓度 1 ×)、gehM-F (10 μmol/L) 1 μL (终浓度 0.2 μmol/L)、gehM-R (10 μmol/L) 1 μL (终浓度 0.2 μmol/L)、模板 1 μL、加灭菌水 9.5 μL 至 25 μL。反应程序为:95 ℃, 1 min; (95 ℃, 10 s; 50 ℃, 30 s; 72 ℃, 30 s), 40 个循环; 72 ℃, 1 min; 熔解曲线。荧光信号收集在 50 ℃, 30 s 时进行。

1.2.4 特异性实验

将木糖葡萄球菌和 13 种非目的菌加入经培养法确认为阴性的样本中, 阴性样本包括大、小鼠粪便、皮肤拭子和 EAD 拭子样本, 与常规样本一样提取 DNA, 并进行扩增。以木糖葡萄球菌标准株的 DNA 为阳性对照, 来判断本方法是否与其他细菌存在交叉反应, 从而对特异性进行验证。

1.2.5 建立标准曲线及灵敏度实验

木糖葡萄球菌标准菌液的 DNA 浓度按 10 倍梯度进行稀释, 从 10⁷ fg/μL 至 1 fg/μL, 取模板 1 μL 进行 qPCR 扩增反应。标准曲线绘制方法和灵敏度分析方法同参考文献^[18]。

1.2.6 重复性实验

在 2 个浓度水平进行重复性实验, 高浓度为 10⁶ fg/μL, 低浓度为 10³ fg/μL。对组内和组间进行重复性评估, 每个组进行重复检测 6 次, 统计所测得的 Ct 值, 并计算变异系数。

1.2.7 临床样本的应用

委托检验的大、小鼠不同类型样本共 60 份, 包括排风管道粉尘拭子 (exhaust air dust, EAD) 20 份, 皮肤拭子 2 份, 小鼠粪便 20 份, 大鼠粪便 18 例。粪便样本取 40 ~ 50 mg, EAD 拭子和皮肤拭子折断, 然后按“1.2.2”和“1.2.3”操作。

1.2.8 qPCR 产物测序鉴定

测序鉴定方案同参考文献^[18]。

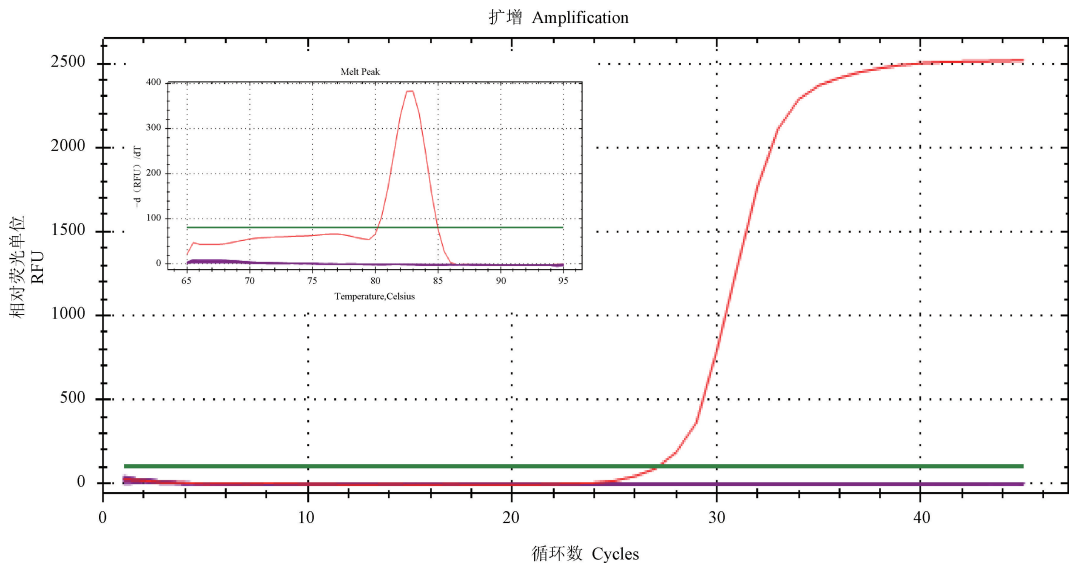
1.2.9 金标准对比实验

按团体标准 T/CALAS 92—2020《实验动物 木糖葡萄球菌检测方法》对临床样本分离培养及鉴定^[15]。

2 结果

2.1 特异性结果

特异性实验结果表明, 仅木糖葡萄球菌标准菌株出现典型 S 扩增曲线, 其他 13 种细菌和水均为平直线 (图 1)。即本方法仅能扩增出木糖葡萄球菌, 而不能扩增出其他 13 种菌。



注: 红色 S 型曲线: 木糖葡萄球菌标准菌株; 紫色平直线: 其他 13 种非木糖葡萄球菌菌种的扩增曲线。

图 1 木糖葡萄球菌 qPCR 特异性检测结果

Note. Red S curve, *S. xylosus* standard strain. Straight purple lines, Other 13 non-*S. xylosus* species.

Figure 1 Specificity for *S. xylosus* detected by qPCR

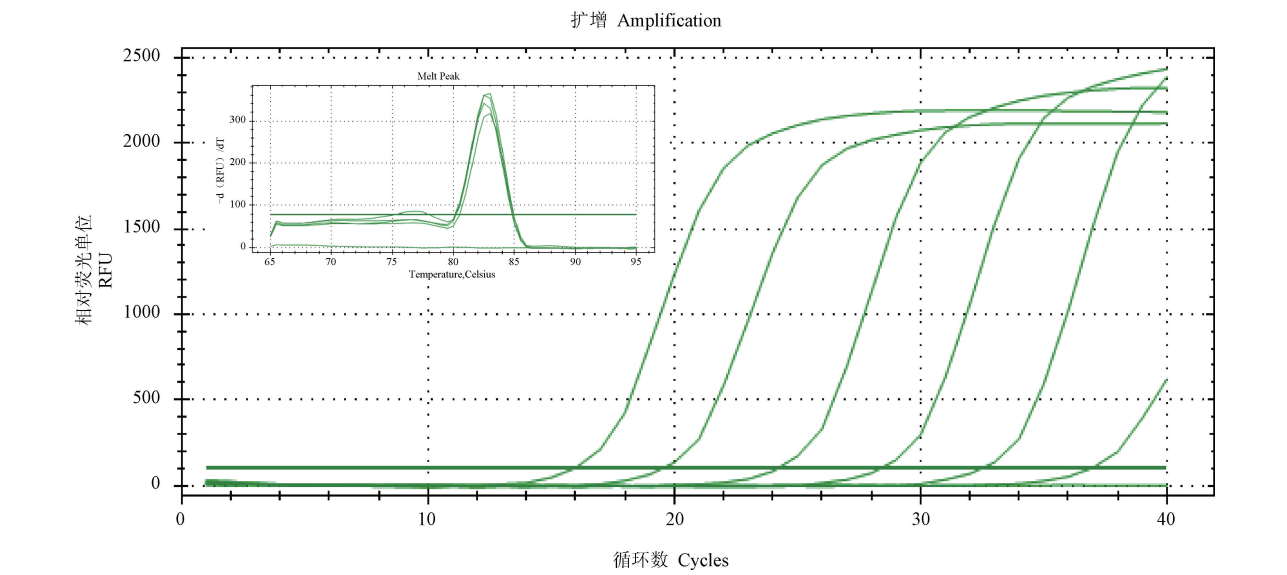
2.2 标准曲线的建立及灵敏度结果

10 倍梯度稀释后的木糖葡萄球菌标准菌株

DNA 样品进行 qPCR。由图 2 可见, 可检测到 100 fg/μL, 在 10⁷ ~ 100 fg/μL 各浓度梯度之间线性关

系良好,线性回归方程为 $Ct = -3.4159 \times \lg(\text{DNA 量}) + 39.281$, k 为回归方程的斜率,扩增效率计算公式为 $E = 10^{(-1/k)} - 1 = 0.9498$,即扩增效率为

95%,相关系数 $R^2 = 0.9892$,表明所建方法的扩增效率较高。本方法的灵敏度为 $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 的 DNA 量(图 2)。



注:从左向右的曲线代表的 DNA 量: $10^7 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 、 $10^6 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 、 $10^5 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 、 $10^4 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 、 $10^3 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 和 $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。

图 2 木糖葡萄球菌 qPCR 灵敏度检测结果

Note. Amounts of DNA represented by the curves from left to right, $10^7 \text{ fg}/\mu\text{L}$, $10^6 \text{ fg}/\mu\text{L}$, $10^5 \text{ fg}/\mu\text{L}$, $10^4 \text{ fg}/\mu\text{L}$, $10^3 \text{ fg}/\mu\text{L}$ and $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$.

Figure 2 Sensitivity for *S. xylosus* detected by qPCR

2.3 重复性结果

组内和组间 Ct 值的变异系数均小于 3%(表 1),证明本方法重复性良好,且稳定可靠。

2.4 临床样品检测结果

阴阳性对照均符合结果判定要求,因此,60 份临床样本检测结果均有效。其中,有 5 份样品扩增曲线呈典型的 S 型,可判定木糖葡萄球菌核酸阳性(图 3)。根据标准曲线,计算出其浓度分别为 1798.99 、 1010.70 、 428.48 、 695.89 和 $590.14 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 。

2.5 qPCR 产物测序分析

所测阳性样本的序列经 BLAST 进行序列同源

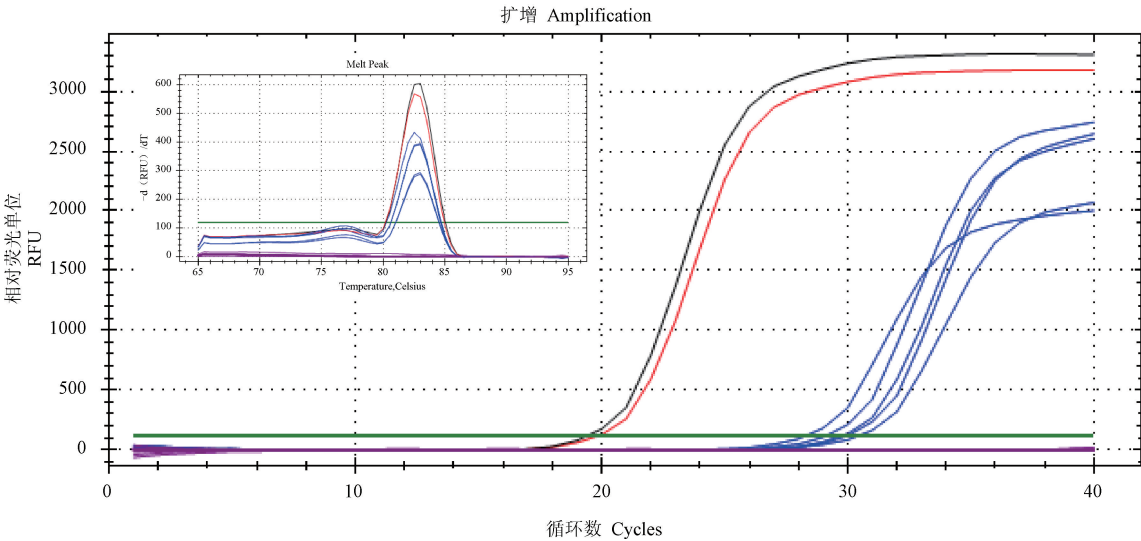
性比对,结果显示,该序列与木糖葡萄球菌的序列同源性为 99.63%,表明该样本木糖葡萄球菌核酸阳性(图 4)。

2.6 与金标准的对比实验

38 例大、小鼠粪便样本中,qPCR 法与培养法的木糖葡萄球菌阳性检出例数相同,均为 1 例。20 例 EAD 样本中,qPCR 法的阳性检出例数为 2 例,培养法为 1 例。2 例皮肤拭子样本的 qPCR 法和培养法检出阳性样本均为 2 例。qPCR 方法所检样本的阳性率为 8.3%,培养法得到的阳性率 6.7%,qPCR 方法的灵敏度略高于培养法。

表 1 组内和组间重复性结果(Ct 值和 CV(%))(n = 6)

Table 1 Repeatability results (Ct and CV(%)) for intragroups and intergroups(n = 6)								
重复性 Repeatability	DNA 量 DNA quantities	Ct 值 Ct values						CV (%)
		1	2	3	4	5	6	
组内 Intra group	$10^3 \text{ fg}/\mu\text{L}$	32.55	30.63	31.56	31.05	30.72	31.43	2.26
	$10^6 \text{ fg}/\mu\text{L}$	19.83	19.68	19.65	19.71	19.76	19.79	0.34
		31.08	30.31	30.88	31.24	30.05	31.28	1.66
组间 Inter group	$10^3 \text{ fg}/\mu\text{L}$	31.54	30.83	31.05	30.63	31.19	30.62	1.16
		33.05	31.42	31.30	31.07	31.10	30.71	2.62
		19.57	19.76	19.69	19.55	19.49	19.62	0.51
	$10^6 \text{ fg}/\mu\text{L}$	19.75	19.54	19.73	19.71	19.65	19.36	0.75
		19.43	19.59	19.62	19.52	19.35	19.66	0.61



注：黑色 S 型曲线；阳性核酸提取对照；红色 S 型曲线；阳性扩增对照；紫色平直线；阴性对照和阴性样本；蓝色 S 型曲线；阳性样本。

图 3 木糖葡萄球菌 qPCR 的临床检测结果

Note. Black S curve. Positive control for nucleic acid extraction. Red S curve. Positive control for amplification. Straight purple lines. Negative controls and negative samples. Blue S curves. Positive samples.

Figure 3 Clinical detection results for *S. xylosus* by qPCR detection

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 21 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Staphylococcus xylosus isolate Staphylococcus xylosus ATCC 29971 genome assembly, chrom...	Staphylococcus xylosus	979	979	99%	0.0	99.63%	2781432	LT963439.1
☒	Staphylococcus xylosus strain S170 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	979	979	99%	0.0	99.63%	2910005	CP013922.1
☒	Staphylococcus xylosus strain TCD16 chromosome	Staphylococcus xylosus	979	979	98%	0.0	99.81%	2756938	CP098674.1
☒	Staphylococcus xylosus strain DMSX03 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	979	979	98%	0.0	99.81%	2825246	CP060271.1
☒	Staphylococcus xylosus strain HKUOPL8, complete genome	Staphylococcus xylosus	974	974	99%	0.0	99.44%	2836901	CP007208.1
☒	Staphylococcus xylosus strain TMW 2.1602 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	972	972	98%	0.0	99.62%	2788162	CP066719.1
☒	Staphylococcus xylosus strain CIT S01-001 specific genomic sequence	Staphylococcus xylosus	963	963	100%	0.0	98.89%	539	AY157732.1
☒	Staphylococcus xylosus strain SMQ-121, complete genome	Staphylococcus xylosus	941	941	98%	0.0	98.50%	2757557	CP008724.1
☒	Staphylococcus xylosus strain 2 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	935	935	98%	0.0	98.31%	2797465	CP031275.1
☒	Staphylococcus xylosus strain TMW 2.1521 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	935	935	98%	0.0	98.31%	2890169	CP015542.1
☒	Staphylococcus xylosus strain TMW 2.1324 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	935	935	99%	0.0	98.14%	2897817	CP015539.1
☒	Staphylococcus xylosus strain TMW 2.1023 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	935	935	99%	0.0	98.14%	2800497	CP015538.1
☒	Staphylococcus xylosus strain TMW 2.1324 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	935	935	98%	0.0	98.31%	2900259	CP066726.1
☒	Staphylococcus xylosus strain S2a genome assembly, chromosome, Chr1	Staphylococcus xylosus	929	929	98%	0.0	98.13%	2786686	LN554884.1
☒	Staphylococcus xylosus strain TMW 2.1523 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	857	857	99%	0.0	95.53%	2851252	CP015546.1
☒	Staphylococcus xylosus strain 2.1523 chromosome, complete genome	Staphylococcus xylosus	857	857	98%	0.0	95.69%	2851268	CP066721.1

图 4 qPCR 产物序列 BLAST 比对结果

Figure 4 Results of the sequence of qPCR product by BLAST

3 讨论

木糖葡萄球菌被认为是非致病菌,因此,其鉴定方法的研究文献较少,且主要集中在食品领域。16S rRNA 基因^[17]和 16S ~ 23S rRNA 区间序列可以进行木糖葡萄球菌鉴定^[19-20]。RANTSIOU 等^[17]利用 16S rRNA 基因的 V1 ~ V3 区可扩增出葡萄球菌属,再经变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 可鉴定到种。实验动物的木糖葡萄球菌可以用 16S rRNA 基因进行检测,但文献中是送到第三方实验室进行

检测,并未对其性能等进行阐述^[21-22]。

MOROT-BIZOT 等^[23]报道了基于 PCR-RAPD 方法进行木糖葡萄球菌的鉴定,该方法特异性良好,缺点是需进行随机扩增多态性 DNA 标记分析,操作繁琐,需要较长时间出结果。木糖葡萄球菌编码酯酶的 *gehM* 基因片段,经 RNA 点杂交实验^[16]和 PCR-DGGE 方法^[17]验证,该片段可特异性地识别木糖葡萄球菌,因此,该 *gehM* 基因片段可作为木糖葡萄球菌种属特异的序列。经查阅文献,未检索到该基因片段检测木糖葡萄球菌的 qPCR 方法。

本研究以木糖葡萄球菌特异性 *gehM* 基因片段为靶序列,建立了大、小鼠木糖葡萄球菌 qPCR 的检测方法,并进行了性能评估、临床应用、测序验证及与培养法比对等研究。所建方法只能扩增出木糖葡萄球菌,特异性强;其最低检测限为 100 fg/ μL 的 DNA 量,灵敏度高;重复性好,均小于 3%。阳性样本荧光 PCR 产物序列与木糖葡萄球菌的基因序列同源性为 99.6%,表明该样本木糖葡萄球菌核酸阳性。

大、小鼠粪便样本为常规送检样本(经与送检客户沟通,无皮屑等临床症状,共 38 例),其 qPCR 法与培养法的木糖葡萄球菌阳性检出例数相同,均为 1 例。EAD-PCR 法(共 20 例)的阳性检出例数为 2 例,培养法检出阳性 1 例。皮肤拭子样本(严重皮屑裸鼠 1 例,轻微皮屑裸鼠 1 例,共 2 例)的 qPCR 法和培养法检出阳性样本均为 2 例。qPCR 方法所检样本的阳性率为 8.3%,培养法得到的阳性率为 6.7%,qPCR 方法的灵敏度高于培养法。分析 EAD-PCR 培养法阳性检出率低的可能原因:一是按团体标准^[15]进行细菌分离培养时,采用的是划线法接种的方式,阳性 EAD 样本分离培养的平皿仅出现约 2~6 个疑似单菌落,该接种方式可能会导致目标菌漏检;二是样本分离培养时,对木糖葡萄球菌的菌落和菌体的符合性判断经验不足,可能导致假阴性结果;三是 EAD 为排风管道粉尘,细菌在粉尘环境中的存活力与粪便和皮肤环境相比可能较弱,导致 EAD 中可培养的活菌相对较少;四是不同的方法学决定了不同的灵敏度,qPCR 的灵敏度优于培养法是有大量文献支撑的^[25-26]。

本研究的局限性之一是非目标菌种和目标菌种的数量都有限,应采用更多的非目标菌种,以更好地验证检测结果的特异性,以及采用更多的目标菌种以提高检测方法的准确性;局限性之二是按团体标准^[15]进行细菌分离培养时,采用的是划线法接种的方式,阳性 EAD 样本分离培养的平皿疑似单菌落个数较少,该方式可能会导致目标菌漏检,应结合涂布法或倾倒法,以防止假阴性结果。

综上所述,本研究建立的木糖葡萄球菌 qPCR 检测方法,特异性强、灵敏度高、重复性好,结合全自动核酸纯化仪提取核酸,可高效快速地得出检测结果,经临床样本测序及方法学比对验证,可用于实验动物尤其是免疫缺陷动物木糖葡萄球菌的监测,以保障科研结果的准确性和科学性。

参 考 文 献(References)

- [1] TAVAKKOL Z, SAMUELSON D, DELANCEY PULCINI E, et al. Resident bacterial flora in the skin of C57BL/6 mice housed under SPF conditions [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(5): 588-591.
- [2] SOLOMON H F, DIXON D M, POUCH W. A survey of staphylococci isolated from the laboratory gerbil [J]. Lab Anim Sci, 1990, 40(3): 316-318.
- [3] LI Z, DONG J, WANG M, et al. Resveratrol ameliorates liver fibrosis induced by nonpathogenic *Staphylococcus* in BALB/c mice through inhibiting its growth [J]. Mol Med, 2022, 28(1): 52.
- [4] RUSSO M, INVERNIZZI A, GOBBI A, et al. Diffuse scaling dermatitis in an athymic nude mouse [J]. Vet Pathol, 2013, 50(4): 722-726.
- [5] BRADFIELD J F, WAGNER J E, BOIVIN G P, et al. Epizootic fatal dermatitis in athymic nude mice due to *Staphylococcus xylosus* [J]. Lab Anim Sci, 1993, 43(1): 111-113.
- [6] NAIK S, BOULADOUX N, LINEHAN J L, et al. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature [J]. Nature, 2015, 520(7545): 104-108.
- [7] GOZALO A S, HOFFMANN V J, BRINSTER L R, et al. Spontaneous *Staphylococcus xylosus* infection in mice deficient in NADPH oxidase and comparison with other laboratory mouse strains [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(4): 480-486.
- [8] JACKSON S H, GALLIN J I, HOLLAND S M. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease [J]. J Exp Med, 1995, 182(3): 751-758.
- [9] KRUGNER-HIGBY L, BROWN R, RASSETTE M, et al. Ulcerative dermatitis in C57BL/6 mice lacking stearyl CoA desaturase 1 [J]. Comp Med, 2012, 62(4): 257-263.
- [10] PIZZOLLA A, HULTQVIST M, NILSON B, et al. Reactive oxygen species produced by the NADPH oxidase 2 complex in monocytes protect mice from bacterial infections [J]. J Immunol, 2012, 188(10): 5003-5011.
- [11] LAUBACH V E, SHESELY E G, SMITHIES O, et al. Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(23): 10688-10692.
- [12] FANG F C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity [J]. J Clin Invest, 1997, 99(12): 2818-2825.
- [13] NATHAN C, SHILOH M U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16): 8841-8848.
- [14] WON Y S, KWON H J, OH G T, et al. Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-Nos2 (tm1Lau) mice with dermatitis [J]. Microbiol Immunol, 2002, 46(9): 629-632.

[15] 中国实验动物学会. T/CALAS 92—2020.《实验动物 木糖葡萄球菌检测方法》[S]. 中国实验动物学会发布; 2020.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. T/CALAS 92—2020. Laboratory animal-method for the detection of *Staphylococcus xylosus* [S]. Published by Chinese Association for Laboratory Animal Sciences; 2020.

[16] IACUMIN L, COCOLIN L, CANTONI C, et al. Preliminary analysis of the lipase gene (gehM) expression of *Staphylococcus xylosus* in vitro and during fermentation of naturally fermented sausages in situ [J]. J Food Prot, 2007, 70(11): 2665–2669.

[17] RANTSIOU K, IACUMIN L, CANTONI C, et al. Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages [J]. Int J Food Microbiol, 2005, 97(3): 277–284.

[18] 于灵芝, 谢建芸, 冯丽萍, 等. 金黄色葡萄球菌荧光定量 PCR 检测方法的建立及其在大鼠、小鼠粪便检测中的应用 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(5): 566–573.
YU L Z, XIE J Y, FENG L P, et al. Establishment of fluorescence qPCR method for detection of *Staphylococcus aureus* and its application in feces detection of rats and mice [J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(5): 566–573.

[19] VILLARD L, KODJO A, BORGES E, et al. Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosus* by 16-23S spacer amplification [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 185(1): 83–87.

[20] ROSSI F, TOFALO R, TORRIANI S, et al. Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages [J]. J Appl Microbiol, 2001, 90(3): 365–371.

[21] RAGLAND N H, MIEDEL E L, GOMEZ J M, et al. *Staphylococcus xylosus* PCR-validated decontamination of murine individually ventilated cage racks and air handling units by using “active-closed” exposure to vaporized hydrogen peroxide [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2017, 56(6): 742–751.

[22] RAGLAND N H, MIEDEL E L, ENGELMAN R W. PCR prevalence of murine opportunistic microbes and their mitigation by using vaporized hydrogen peroxide [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2019, 58(2): 208–215.

[23] MOROT-BIZOT S, TALON R, LEROY-SETRIN S. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation [J]. J Microbiol Methods, 2003, 55(1): 279–286.

[24] 张树玲, 王军威, 左鲁玉, 等. 基于 16S rRNA 测序技术研究口服益生菌对结肠癌皮下瘤小鼠肠道菌群结构的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1564–1572.
ZHANG S L, WANG J W, ZUO L Y, et al. Effects of oral probiotics on gut microbiota structure in subcutaneous tumors in mice with colon cancer based on 16S rRNA sequencing technology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1564–1572.

[25] 胡雅谦, 王珊珊, 张童, 等. 无菌动物在肠道微生物组研究中的应用与发展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 946–954.
HU Y Q, WANG S S, ZHANG T, et al. Application and development of germ-free animals for gut microbiome research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 946–954.

[收稿日期] 2023-06-12

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。