

鳞状皮屑裸小鼠木糖葡萄球菌的分离鉴定

孔志豪¹, 魏晓锋¹, 于灵芝¹, 冯丽萍¹, 朱琦¹, 施国君², 王晨²

[1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 英威沃(上海)生物科技有限公司, 上海 201203]

[摘要] 目的 拟从鳞状皮屑裸小鼠的皮肤上分离病原菌, 并进行病原鉴定、溯源分析和致病性研究, 以期鳞状皮屑裸小鼠的病原体诊断提供新的思路。方法 对1只患鳞状皮屑皮肤病的裸小鼠的皮肤进行拭子采样, 通过核酸检测、细菌分离培养、生化鉴定、16S rDNA 基因扩增测序、全基因组测序构建系统进化树等方法鉴定菌株。然后取15只 BALB/c 裸小鼠, 随机分为涂擦生理盐水的对照组、涂擦 1.8×10^8 CFU/mL 分离病菌液的高浓度组和涂擦 1.8×10^7 CFU/mL 分离病菌液的低浓度组, 通过动物感染试验及 HE 染色观察皮肤组织病理学变化, 进行该菌株的致病性分析。结果 送检裸小鼠的皮肤拭子样本中牛棒状杆菌核酸阴性, 排除了牛棒状杆菌的感染。进一步分离培养的病原菌经高盐甘露醇琼脂平板和血琼脂平板培养以及革兰染色提示为革兰阳性葡萄球菌。16S rDNA 测序和全自动微生物鉴定系统鉴定结果显示, 该菌株为木糖葡萄球菌。全基因组测序后的系统进化树分析显示, 该菌株与韩国叶菜分离株 (GenBank GCA_00207825.1) 的亲缘关系最近。动物感染试验显示, 高浓度和低浓度分离菌液分别感染17 d 和20 d 时裸小鼠头颈部和背部开始出现鳞状皮屑, 之后逐渐扩散至其他部位; 而且两组的皮屑症状均表现为一过性, 分别持续7 d 和3 d 皮屑消失; 高浓度组和低浓度组的感染率均为33.33%。与对照组相比, 感染后的裸小鼠皮肤组织病理学观察未发现明显异常, 提示该菌株对裸小鼠的致病力存在明显的个体差异。结论 从患鳞状皮屑裸小鼠皮肤上分离鉴定出1株木糖葡萄球菌菌株。该菌株是一种机会性感染病原体, 临床表现为一过性的鳞状皮屑症状, 组织病理学并未发生明显改变, 并且裸小鼠对该菌株的敏感性存在个体差异。本研究结果为免疫缺陷小鼠或基因敲除小鼠的病原体诊断提供了数据支撑。

[关键词] 裸小鼠; 鳞状皮屑; 木糖葡萄球菌; 系统进化树

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2025)03-0368-08



Isolation and Identification of *Staphylococcus xylosus* in Nude Mice with Squamous Skin Scurfs

KONG Zhihao¹, WEI Xiaofeng¹, YU Lingzhi¹, FENG Liping¹, ZHU Qi¹, SHI Guojun², WANG Chen²

[1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. INVIVO (Shanghai) Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China]

Correspondence to: WEI Xiaofeng (ORCID: 0009-0009-5089-8342), E-mail: wei.xf@outlook.com;

YU Lingzhi (ORCID: 0009-0004-1835-3493), E-mail: yulingzhi@slarc.org.cn

[ABSTRACT] **Objective** To isolate pathogenic bacteria from the skin of a nude mouse exhibiting squamous skin scurfs, and perform bacterial identification, traceability analysis, and pathogenicity studies to provide a new approach for the diagnosis of pathogens in nude mice with squamous skin scurfs. **Methods** Skin swab samples were collected from a nude mouse exhibiting squamous skin scurfs for nucleic acid testing, bacterial isolation and culture, biochemical identification, 16S rDNA gene amplification and sequencing, and whole genome sequencing to construct a phylogenetic tree. Fifteen BALB/c nude mice were randomized into a saline-treated control group, a high-concentration group treated with 1.8×10^8 CFU/mL of the isolated bacterial suspension, and a low-concentration group treated with 1.8×10^7 CFU/mL

[基金项目] 上海实验动物研究中心科技创新计划新星项目“木糖葡萄球菌快速分子检测方法的建立及应用”(2024NS05)

[第一作者] 孔志豪(2001—),男,大专,主要从事实验动物质量控制研究。E-mail: kongzhihao@slarc.org.cn

[通信作者] 魏晓锋(1980—),男,硕士,副研究员,主要从事实验动物质量控制研究。E-mail: wei.xf@outlook.com。ORCID: 0009-0009-5089-8342;

于灵芝(1980—),女,博士,助理研究员,主要从事实验动物病原体核酸检测方法研究。E-mail: yulingzhi@slarc.org.cn。ORCID: 0009-0004-1835-3493

of the isolated bacterial suspension. Pathogenicity was assessed by animal infection experiments and observation of histopathological changes in skin tissue using HE staining. **Results** The nucleic acid test for *Corynebacterium bovis* was negative, excluding infection by this organism. The pathogen isolated on mannitol salt agar and blood agar, combined with Gram staining, suggested a Gram-positive *Staphylococcus* species. The isolated strain was identified by 16S rDNA sequencing and a fully automated microbial identification system as *Staphylococcus xylosus*. Phylogenetic tree analysis based on whole genome sequencing showed that the strain was most closely related to an isolate from leafy vegetables in South Korea (GenBank GCA_00207825.1). In the high-concentration group, squamous skin scurfs appeared on the head, neck, and back of nude mice on the 17th day post-infection, while in the low concentration group, similar symptoms appeared on the 20th day post-infection and gradually spread to other areas. The scaling symptoms were transient, lasting for 7 days in the high-concentration group and 3 days in the low-concentration group, after which the skin returned to normal. The infection rate was 33.33% in both the high- and low-concentration groups. No significant pathological changes were observed in the skin tissues of infected mice compared to the control group, indicating marked individual differences in the pathogenicity of the strain in nude mice. **Conclusion** A strain of *Staphylococcus xylosus* was isolated from the skin of a nude mouse exhibiting squamous skin scurfs. The strain is an opportunistic pathogen that causes transient squamous skin scurfs without significant histopathological changes, and there are individual differences in the sensitivity of nude mice to this strain. These findings can provide valuable data for pathogen identification in immunodeficient or gene knockout mice.

[Key words] Nude mice; Squamous skin scurfs; *Staphylococcus xylosus*; Phylogenetic tree

无胸腺裸小鼠作为一种免疫缺陷动物，是目前生物医药领域常用的实验动物模型。裸小鼠鳞状皮肤病是一种全身性角化过度皮炎，典型的临床症状表现为全身皮肤出现白色鳞状皮屑^[1]。牛棒状杆菌通常被认为是引起该症状的病原体^[2-3]。但是，有临床诊断病例提示感染木糖葡萄球菌也可引起同样的临床症状^[4]。木糖葡萄球菌是一种寄居在哺乳动物皮肤的条件致病性共生菌，但其对免疫缺陷和基因敲除的小鼠表现出明显的致病性^[5]，症状为皮炎和脓肿等^[6-9]，在这些小鼠的皮肤样本中均可分离到该菌。因此，木糖葡萄球菌被认为是免疫缺陷和基因敲除小鼠的潜在机会性病原体^[10]。

笔者所在检测室于2023年8月接收到一只临床症状为鳞状皮屑的BALB/c裸小鼠，经核酸检测排除牛棒状杆菌感染后，对该裸小鼠病灶区皮肤样本进行病原分离鉴定、全基因组测序、动物感染试验和组织病理学检测等研究，判断其感染病原为木糖葡萄球菌，并进一步探讨该菌对裸小鼠的致病性，以期鳞状皮屑裸小鼠的病原体诊断提供更广阔的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1只患鳞状皮屑皮肤病的裸小鼠来自上海实验动物

研究中心质监站的日常检测，对其患病皮肤进行无菌棉拭子采样，用于病原体诊断。

用于动物感染试验的15只雄性BALB/c裸小鼠均8周龄，购自上海必凯科翼生物科技有限公司[SCXK(沪)2023-0009]，饲养在上海实验动物研究中心屏障设施[SYXK(沪)2019-0003]。环境温度为20~24℃，相对湿度为45%~55%，饲料、水、垫料和笼盒等均经高压蒸汽灭菌，动物自由采食，光照采取12 h/12 h昼夜交替。本实验方案通过上海实验动物研究中心实验动物福利伦理审查委员会审查批准(PA202303201)，全程严格遵循3R原则。

1.2 主要试剂和仪器

32通道全自动核酸纯化仪及配套的磁珠法核酸提取试剂均购自麦诺迪(上海)生物科技有限公司；全自动微生物鉴定系统(VITEK2 Compact)购自法国Biomerieux公司；荧光定量PCR仪(型号CFX Opus 96)购自美国Bio-Rad公司；荧光定量PCR反应液TaqMan™ Gene Expression Master Mix(批号2654759)购自美国ABI公司；高盐甘露醇琼脂平板(批号20230801)和血琼脂平板(批号20230808)均购自上海科玛嘉微生物技术有限公司；革兰染色试剂(批号230109)购自杭州滨和微生物试剂有限公司。生物荧光显微镜(型号Imager A1)购自德国Carl Zeiss公司。

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.3 DNA 提取及核酸检测

将鳞状皮肤患处采集的拭子样本置于 2 mL 离心管中，加入 1 mL 无菌生理盐水，浸泡 5~10 min 后振荡 30 s，取 200 μ L 菌悬液进行全基因组 DNA 提取。按照 32 通道全自动核酸纯化仪及配套的磁珠法核酸提取试剂说明书操作。

采用中国实验动物学会团体标准 T/CALAS 20—2017 推荐的实时荧光定量 PCR 法^[11]检测牛棒状杆菌。PCR 扩增上游引物序列为 5'-CGGCAGGGACGAA-GCTT-3'，下游引物序列为 5'-CACGTAGTTAGCCG-GTGCTTCT-3'，探针序列为 FAM-TGTGACGGTAC-CTGCAT-MGB。引物和探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR 扩增条件：50 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环。以牛棒状杆菌扩增片段的重组质粒作为阳性对照，以牛棒状杆菌阴性正常小鼠的皮肤组织 DNA 为阴性对照。

1.4 细菌培养及革兰染色镜检

按中国实验动物学会团体标准 T/CALAS 92—2020 推荐方法^[12]进行木糖葡萄糖球菌的常规分离培养。用无菌棉拭子蘸取生理盐水后，刮取鳞状皮屑，将拭子涂在高盐甘露醇琼脂平板，36 $^{\circ}$ C 培养 24 h，观察菌落生长结果。挑取直径为 (1.0 $\pm$ 0.5) mm，表面光滑，呈白色圆形凸起，周围有晕环的疑似菌落，在血琼脂平板上进行单菌落培养，36 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后，按革兰染色试剂说明书推荐步骤进行革兰细菌染色。用生物荧光显微镜（1 000 倍）观察视野内菌落形成情况。

1.5 菌落基因组提取及菌种鉴定

收集纯培养的菌落，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行菌种鉴定。用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行菌落基因组提取。以 16S rDNA 通用扩增引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR 反应体系：10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L，25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L，2 mmol/L dNTP 0.5 μ L，10 μ mol/L 的 27F 和 1492R 引物各 1 μ L，5 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L，基因组 DNA 1 μ L，加水至 25 μ L。普通 PCR 扩增条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 30 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经

1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后，进行 16S rDNA 测序分析，同时用全自动微生物鉴定系统进行菌种确认。

1.6 全基因组测序及系统进化树分析

收集纯培养的菌落，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行二代全基因组测序。全基因组测序的主要过程：用 MagPure 细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA，用 Illumina NovaSeq 6000 测序系统构建文库。整个基因组 DNA 被随机片段化，平均大小为 200~400 bp。所选片段经过末端修复、3' 腺苷酸化、接头连接和 PCR 扩增。用磁珠纯化后，用 Qubit 4.0 荧光计进行文库定量，并通过 2% 琼脂糖凝胶电泳评估文库的长度。在 Illumina NovaSeq 6000 平台上测序，然后用 Trimmomatic (v0.36) 工具对初始读取的片段进行过滤，去除低质量碱基，获得质量合格的片段。使用 SPAdes (v1.15) 工具完成基因组组装后，采用 Gapfiller (v1.11) 软件填补基因组空白。

以核心基因集的单拷贝基因集为多序列比对结果，以 Neighbour-joining 聚类方式，构建该分离菌株的系统进化树（核心基因树），以自展值百分比（bootstrap percentage, Bp）评估进化树分支可信度。

1.7 动物感染试验及组织病理学观察

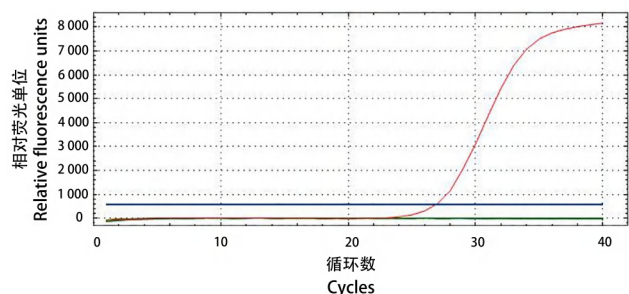
将 15 只 BALB/c 裸小鼠随机分为 3 组：对照组 3 只，高浓度组 6 只，低浓度组 6 只。适应性饲养 3 d 后，对照组用灭菌棉签蘸取生理盐水 100 μ L，沿裸小鼠颈背部脊柱滚动涂擦所在区域的皮肤；以 1.8×10^8 CFU/mL 为高浓度组， 1.8×10^7 CFU/mL 为低浓度组，用灭菌棉签分别蘸取不同浓度的纯培养的分离菌液均 100 μ L，对相同部位进行感染。每天早上 9:00 观察记录 3 组裸小鼠的临床症状，对首次发现皮损的时间记录为皮损第 1 天，感染 28 d 后，将所有裸小鼠行 CO₂ 窒息并脱颈椎法安乐死。

采集裸小鼠的背部脊柱位置皮肤，经 10% 甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片（由上海千崖康药生物科技有限公司完成）后，通过常规苏木精-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色观察组织病理学变化。

2 结果

2.1 核酸检测显示该鳞状皮肤病原菌并非牛棒状杆菌

针对牛棒状杆菌的核酸检测结果表明，这只患鳞状皮肤的裸小鼠的皮肤拭子样本用于实时荧光定量 PCR 未出现典型的扩增曲线（图 1），提示牛棒状杆菌核酸阴性。



注：红色曲线代表阳性对照，黑色曲线代表阴性对照，绿色曲线代表样本。蓝色直线代表阈值线。

Note: Red curve shows the positive control. Black curve shows the negative control. Green curve shows the sample. Blue line shows the threshold line.

图1 实时荧光定量PCR检测显示牛棒状杆菌阴性
Figure 1 Detection of *Corynebacterium bovis* was negative by real-time fluorescence PCR

2.2 细菌培养显示该鳞状皮屑病原菌为革兰染色阳性葡萄球菌

将鳞状皮屑裸小鼠的皮肤拭子样本在高盐甘露醇琼脂平板上培养，生长出的菌落直径为 (1.0 ± 0.5) mm 时，表面光滑，呈白色圆形凸起，周围有晕环（图2A）。而在血琼脂平板上菌落直径长至为 (1.0 ± 0.5) mm 时，边缘整齐，表面光滑，且呈不溶血的灰白色圆形凸起，周围无晕环（图2B）。进一步的革兰染色结果显示阳性（图2C）。

2.3 菌种鉴定显示病原菌为木糖葡萄球菌

从这只鳞状皮屑裸小鼠的皮肤拭子中分离培养的

病原菌提取菌落基因组后，测得的16S rDNA序列经BLAST比对，发现与木糖葡萄球菌的16S rDNA序列同源性为99.86%。用全自动微生物鉴定系统鉴定该菌株的置信度达95%（表1）。综合两种鉴定方法，结果提示该分离菌为木糖葡萄球菌。

2.4 分离菌株的系统进化树构建

全基因组测序后系统进化树分析结果表明，本分离株与韩国叶菜分离株（GenBank GCA_002078255.1）的亲缘关系最近（Bp为100）（图3）。然后将本次的分离株命名为slarc01，提交GenBank，登录ID号为JBHOFF0000000000。

2.5 分离培养菌感染动物后的临床表现

动物感染试验显示，生理盐水对照组裸小鼠未出现皮屑（图4A），而分离菌高浓度组和低浓度组的裸小鼠分别在17 d和20 d时头颈部和背部开始出现鳞状皮屑，随后逐渐扩散至其他部位，鳞状皮屑增多。症状较轻的小鼠仅颈部和背部出现皮屑（图4B）；症状严重的则在面部、头部、大腿外侧、背部及腹部均有皮屑（图4C和4D）。皮屑症状表现为一过性：高浓度组较为严重，持续7 d后皮屑消失；低浓度组症状较轻，持续3 d后皮肤恢复至原来的状态。高浓度组和低浓度组均各有2只裸小鼠出现皮屑，感染率均为33.33%（2/6），其中高浓度组的鳞状皮屑症状较为严重，裸小鼠均抓咬背颈部等出现皮屑的位置。结果表明，木糖葡萄球菌感染后裸小鼠临床症状存在个体差异。

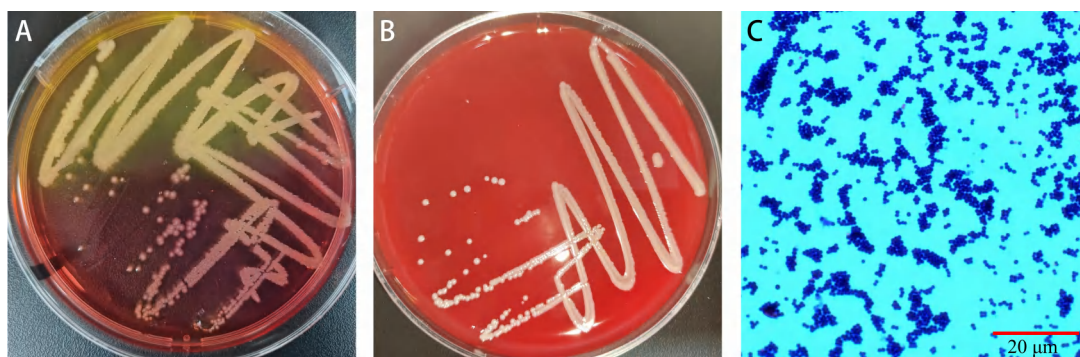


图2 分离菌株在高盐甘露醇琼脂平板(A)和血琼脂平板(B)上的菌落形态图以及革兰染色镜检图(C)

Figure 2 Colony morphology on mannitol salt agar plate (A) and blood agar plate (B) and Gram staining microscopic examination (C) of the isolated strain

2.6 分离培养菌感染后的皮肤组织病理学变化

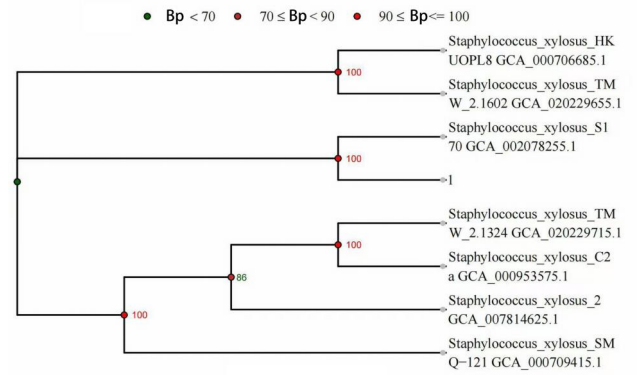
HE染色显示，与对照组（图5A）裸小鼠相比，低浓度组（图5B）和高浓度组（图5C）出现皮屑的裸

小鼠其背部脊柱位置的皮肤表皮结构、真皮毛囊（黑色箭头）和皮脂腺（红色箭头）结构均完整，无明显充血、出血、炎症及坏死等病理性改变。

表 1 分离菌株的生化鉴定结果显示为木糖葡萄球菌

Table 1 Biochemical identification results indicating that the isolated strain was *Staphylococcus xylosus*

生化项目 Biochemical items	鉴定结果 Results
D-苦杏仁甙 <i>D</i> -amygdalin	-
磷脂酰肌醇磷脂酶 C Phosphatidylinositol phospholipase C	-
D-木糖 <i>D</i> -xylose	+
精氨酸双水解酶 1 Arginine dihydrolase 1	+
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	+
α-葡糖苷酶 α-glucosidase	+
丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 Ala-Phe-Pro-arylamidase	-
环糊精 Cyclodextrin	-
L-天冬氨酸芳胺酶 <i>L</i> -aspartate arylamidase	-
β-半乳糖吡喃糖苷酶 β-galactopyranosidase	-
α-甘露糖苷酶 α-mannosidase	-
磷酸酶 Phosphatase	+
亮氨酸芳胺酶 Leucine arylamidase	-
L-脯氨酸芳胺酶 <i>L</i> -proline arylamidase	-
β-葡萄糖醛酸酶 β-glucuronidase	+
α-半乳糖苷酶 α-galactosidase	-
L-吡咯烷酮芳胺酶 <i>L</i> -pyrrolidonyl-arylamidase	+
β-葡萄糖醛酸酶 β-glucuronidase	+
丙氨酸芳胺酶 Alanine arylamidase	-
酪氨酸芳胺酶 Tyrosine arylamidase	-
D-山梨醇 <i>D</i> -sorbitol	-
尿素酶 Urease	+
多黏菌素 B Polymyxin B	-
D-半乳糖 <i>D</i> -galactose	-
D-核糖 <i>D</i> -ribose	+
L-乳酸盐碱化 <i>L</i> -lactate alkalinization	+
乳糖 Lactose	+
N-乙酰-D-氨基葡萄糖 N-acetyl- <i>D</i> -glucosamine	+
D-麦芽糖 <i>D</i> -maltose	+
杆菌肽耐药 Bacitracin resistance	+
新生霉素耐药 Novobiocin resistance	+
6.5%NaCl 中生长 Growth in 6.5% NaCl	+
D-甘露醇 <i>D</i> -mannitol	+
D-甘露糖 <i>D</i> -mannose	+
甲基-β-D-吡喃葡萄糖苷 Methyl-β- <i>D</i> -glucopyranoside	+
支链淀粉 Pullulan	-
D-棉子糖 <i>D</i> -raffinose	-
O/129 耐药 O/129 resistance	+
水杨素 Salicin	-
蔗糖 Saccharose/Sucrose	+
D-海藻糖 <i>D</i> -trehalose	+
精氨酸双水解酶 2 Arginine dihydrolase 2	-
奥普托欣耐药 Optochin resistance	+



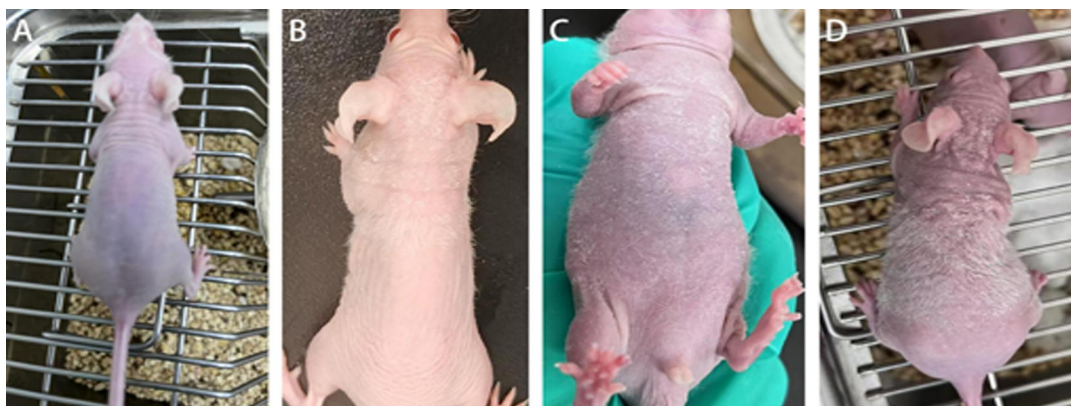
注：1代表分离菌株 slarc01。Bp 代表自展值百分比。
Note: “1” represents the isolated strain slarc01. “Bp” represents the bootstrap percentage.

图 3 分离菌株基于单拷贝基因集的系统进化树分析
Figure 3 Phylogenetic tree analysis based on single-copy orthologue of the isolated strain

3 讨论

2023 年，本实验室接检一只鳞状皮屑裸小鼠，根据其临床症状首先怀疑是牛棒状杆菌感染。然而，取该裸小鼠皮肤样本经核酸检测，结果显示牛棒状杆菌核酸阴性。接着采用细菌分离培养的方法，从其皮肤中分离出大量革兰阳性球菌，16S rDNA 测序菌种鉴定和全自动微生物鉴定系统均显示该菌为木糖葡萄球菌。经回访，送检该患病裸小鼠的设施按国家标准规定的 SPF 级动物病原体项目每季度进行检测，结果均为阴性；且该设施温湿度符合国家标准要求，在同一设施饲养的其他裸小鼠未发现该病变，因此排除温湿度或其他药物因素等引起该病的可能。

木糖葡萄球菌通常被认为是一种非致病性共生细菌。但是，作为一种机会性致病病原菌，木糖葡萄球菌在免疫缺陷或基因敲除小鼠中可表现为不同的皮肤炎症^[4,10,13-14]。本研究结果提示，这只鳞状皮屑裸小鼠可能由木糖葡萄球菌感染导致。2012 年的另一例临床诊断报告也阐述了类似的研究结果假设^[4]。病原菌鉴定结果反馈后，送检单位对出现该临床症状裸小鼠的供应商提供的所有动物进行了进一步排查，即对新购动物在接收当日进行采样送检，结果发现其中两家动物供应商的多个批次均检测出木糖葡萄球菌阳性，提示该细菌可能由供应商动物本身携带，且在国内动物供应商种群中并非偶发。因此，笔者建议：虽然木糖葡萄球菌未列入国家标准 SPF 级动物病原体排除列表，但仍应引起实验动物使用单位的注意^[15]。

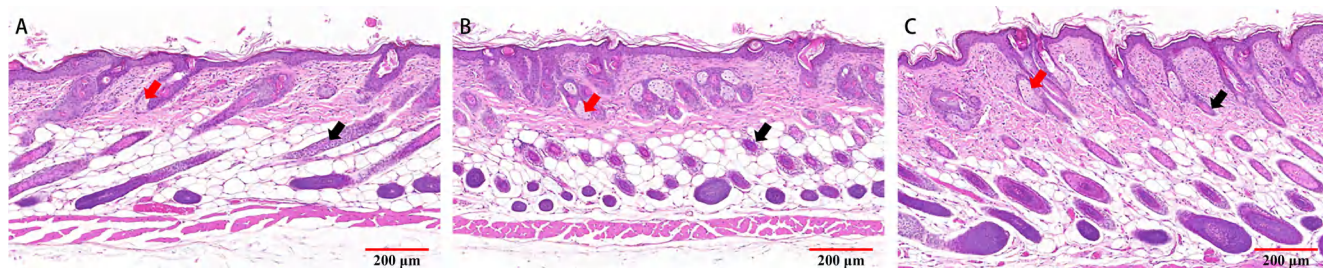


注：A，颈背部皮肤涂擦生理盐水的对照组；B，颈背部皮肤涂擦 1.8×10^7 CFU/mL 分离培养菌液的低浓度组；C，颈背部皮肤涂擦 1.8×10^8 CFU/mL 分离培养菌液的高浓度组腹部症状；D，颈背部皮肤涂擦 1.8×10^8 CFU/mL 分离培养菌液的高浓度组背部症状。

Note: A, Control group of applying physiological saline solution to the skin on the neck and back; B, Low concentration group of 1.8×10^7 CFU/mL isolated bacterial solution applied to the skin on the neck and back; C, Abdominal symptoms in the high concentration group of isolated bacterial solution with a concentration of 1.8×10^8 CFU/mL applied to the skin on the neck and back; D, Back symptoms in the high concentration group treated with 1.8×10^8 CFU/mL isolated bacterial solution applied to the skin on the neck and back.

图4 不同组别裸小鼠感染分离菌液后出现皮屑的临床表现

Figure 4 Clinical manifestations of scaling in different groups of nude mice infected with isolated bacterial suspension



注：A，对照组；B，低浓度组；C，高浓度组。黑色箭头指示真皮毛囊，红色箭头指示皮脂腺（比例尺大小为 $200 \mu\text{m}$ ）。

Note: A, Control group; B, Low concentration group; C, High concentration group. Black arrow indicates dermal hair follicle; red arrow indicates sebaceous gland (Scale bar: $200 \mu\text{m}$).

图5 分离菌感染后鳞状皮屑裸小鼠的皮肤组织病理学变化(HE染色, ×100)

Figure 5 Pathological changes in skin tissues of nude mice with squamous skin scurfs after infection with isolated bacteria (HE staining, ×100)

为了深入了解木糖葡萄球菌对裸小鼠的致病性，本研究将分离的菌株进行了动物感染试验，设置低浓度组、高浓度组与对照组共3组。细菌接种后，每天笼边观察记录临床症状，28 d后结束试验。结果发现，高浓度组和低浓度组分别有2只裸小鼠皮肤上出现白色不规则鳞状皮屑，其中1只症状轻微的仅出现在头颈部和背部，另1只严重者的皮屑几乎完全覆盖背部、肩部、头部和胸腹部皮肤，和文献[4]描述的临床症状基本一致。不同的是，本研究中的裸小鼠皮屑临床症状为一过性，3~7 d即消失，没有明显脱落，而文献[4]中的皮屑伴有部分不规则地脱落，这可能是因为文

献[4]中皮屑症状比较严重，已出现厚厚的成片的皮屑结块，因此容易脱落。本研究中，高低浓度两组各有4只裸小鼠未出现皮屑，表明裸小鼠感染木糖葡萄球菌存在个体差异。以往文献有报道，木糖葡萄球菌作为皮肤病原体的致病能力还存在物种特异性差异^[16-17]。

本研究中组织病理学HE染色结果表明，低浓度组和高浓度组出现皮屑的裸小鼠与对照组裸小鼠的表皮层结构以及真皮层毛囊和皮脂腺结构均完整，均无明显的充血、出血、炎症及坏死等病理性改变。这同以往文献的结论是一致的：在吞噬细胞超氧化物正常产生但有其他免疫缺陷的小鼠中，偶尔会出现浅表病变，

仅限于眼睑、眼结膜和皮肤；而在吞噬细胞超氧化物缺失的小鼠中，木糖葡萄球菌感染会导致严重的组织病理学变化，包括淋巴结、肺、肌肉和骨骼等^[6,18]。文献[19-20]中，木糖葡萄球菌感染的裸小鼠组织病理学表现均有严重的表皮角质化、真皮层水肿和炎性细胞浸润等，导致该差异的原因可能跟菌株有关。菌株不同，毒力可能不同，临床症状和组织病理学结果也可能不同。另外，还有一篇文献报道木糖葡萄球菌感染的裸小鼠出现了皮角质化、真皮层水肿和炎性细胞浸润等临床症状，但这仅是一篇临床病例报道，并没有进行动物致病性实验^[4]。

由于皮肤黏膜中共生微生物、免疫和环境因素之间的复杂相互作用，木糖葡萄球菌引起裸小鼠发生鳞状皮肤疾病的机制尚未阐明。金黄色葡萄球菌肠毒素 B 或其衍生的 α 毒素可诱导白细胞介素 17A (interleukin-17A, IL-17A) 分泌，导致角质形成细胞异常增殖和炎性细胞募集^[21-23]。木糖葡萄球菌是否通过诱导 IL-17A 分泌，导致角质形成细胞异常增殖和炎性细胞募集有待进一步研究。本研究中动物感染试验的给药方式是涂擦皮肤，结果表明木糖葡萄球菌可通过接触方式进行传播，是否存在其他传播方式尚有待研究。在后续研究中，还可进一步探讨木糖葡萄球菌的致病机制，包括感染剂量、宿主个体差异等对病变程度的影响。本研究基于全基因组序列建立了该分离菌株的系统进化树，溯源分析后发现该菌株与韩国叶菜分离株 (GenBank GCA_002078255.1) 的亲缘关系最为接近，提示两者之间可能存在着未知途径的传播。

需要指出，本研究存在一定局限性。例如：(1) 根据木糖葡萄球菌的动物感染试验中阴性对照未发生鳞状皮肤得出结论尚不够严谨，如果能排除引起鳞状皮肤的其他病原菌感染或合并真菌感染的可能性则更有说服力；(2) 使用的实验动物品种、品系、性别、年龄和数量，以及使用的分离菌株有限。排除上述局限性后得出木糖葡萄球菌对裸小鼠有鳞状皮肤致病性的结论才更为准确和可靠。

综上所述，动物感染试验表明，本研究中分离的木糖葡萄球菌菌株对裸小鼠鳞状皮肤病是一种机会性感染病原体，临床表现为过性的鳞状皮肤症状，组织病理学并未发生明显改变，并且裸小鼠对该菌株的敏感性存在个体差异。因此，不仅牛棒状杆菌，木糖葡萄球菌也可能使免疫缺陷裸小鼠出现鳞状皮肤病。为提高实验动物兽医医师对该菌的认识和关注程度，避

免木糖葡萄球菌感染导致免疫缺陷小鼠或基因敲除小鼠损失，迫切需要深入研究木糖葡萄球菌对免疫缺陷小鼠或基因敲除小鼠皮肤的致病性及其科学意义。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的动物实验方案均已通过上海实验动物研究中心实验动物福利伦理审查委员会批准 (批号: PA202303201)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All laboratory animal protocols in this study were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Shanghai Laboratory Animal Research Center (Approval No. PA202303201). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

孔志豪参与动物实验，负责查阅资料、数据处理和图片制作；魏晓锋负责确定研究方案、拟定文章提纲、修订文章；于灵芝负责动物试验、数据分析、文章撰写并投稿；冯丽萍指导细菌分离培养和鉴定；朱琦参与完成细菌分离培养鉴定；施国君提供兽医观察等指导；王晨负责动物饲养指导。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] SCANZIANI E, GOBBI A, CRIPPA L, et al. Hyperkeratosis-associated coryneform infection in severe combined immunodeficient mice[J]. Lab Anim, 1998, 32(3):330-336. DOI: 10.1258/002367798780559239.
- [2] KIM T H, KIM D S, HAN J H, et al. Detection of *Corynebacterium bovis* infection in athymic nude mice from a research animal facility in Korea[J]. J Vet Sci, 2014, 15(4):583-586. DOI:10.4142/jvs.2014.15.4.583.
- [3] MANUEL C A, PUGAZHENTHI U, LESZCZYNSKI J K. Surveillance of a ventilated rack system for *Corynebacterium bovis* by sampling exhaust-air manifolds[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(1):58-65.
- [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. DOI:10.1177/0300985812463408.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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. DOI:10.1084/jem.182.3.751.
- [8] 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. DOI: 10.4049/jimmunol.1103430.
- [9] 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 USA, 1995, 92(23):10688-10692. DOI:10.1073/pnas.92.23.10688.
- [10] 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. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02744.x.
- [11] 中国实验动物学会. 实验动物 牛棒状杆菌检测方法: T/CALAS 20—2017[S]. 北京: 科学出版社, 2017.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal – Method for examination of *Corynebacterium bovis*: T/CALAS 20—2017[S]. Beijing: Science Press, 2017.
- [12] 中国实验动物学会. 实验动物 木糖葡萄球菌检测方法: T/CALAS 92—2020[S/OL]. [2024-12-30]. <https://www.ttbz.org.cn/Pdfs/Index/?ftype=st&pms=74557>.
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences. Laboratory animal – Method for the detection of *Staphylococcus xylosus*: T/CALAS 92—2020[S/OL]. [2024-12-30]. <https://www.ttbz.org.cn/Pdfs/Index/?ftype=st&pms=74557>.
- [13] NATSIS N E, COHEN P R. Coagulase-negative *Staphylococcus* skin and soft tissue infections[J]. Am J Clin Dermatol, 2018, 19(5):671-677. DOI:10.1007/s40257-018-0362-9.
- [14] 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.
- [15] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2024.01.010.
YU L Z, FENG L P, KONG Z H, et al. Establishment of 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.
- [16] BATTAGLIA M, GARRETT-SINHA L A. *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* as commensals and pathogens on murine skin[J]. Lab Anim Res, 2023, 39(1):18. DOI: 10.1186/s42826-023-00169-0.
- [17] RESHAMWALA K, CHEUNG G Y C, HSIEH R C, et al. Identification and characterization of the pathogenic potential of phenol-soluble modulin toxins in the mouse commensal *Staphylococcus xylosus*[J]. Front Immunol, 2022, 13:999201. DOI:10.3389/fimmu.2022.999201.
- [18] ACUFF N V, LAGATTA M, NAGY T, et al. Severe dermatitis associated with spontaneous *Staphylococcus xylosus* infection in *Rag^{-/-} Tpl2^{-/-}* mice[J]. Comp Med, 2017, 67(4): 344-349.
- [19] LI Z Q, DONG J X, 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. DOI:10.1186/s10020-022-00463-y.
- [20] QU Q W, CUI W Q, XING X X, et al. Rutin, a natural inhibitor of IGPD protein, partially inhibits biofilm formation in *Staphylococcus xylosus* ATCC700404 *in vitro* and *in vivo*[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 728354. DOI: 10.3389/fphar. 2021. 728354.
- [21] EYERICH K, PENNINO D, SCARPONI C, et al. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(1):59-66.e4. DOI:10.1016/j.jaci.2008.10.031.
- [22] NIEBUHR M, GATHMANN M, SCHARONOW H, et al. *Staphylococcal* alpha-toxin is a strong inducer of interleukin-17 in humans[J]. Infect Immun, 2011, 79(4): 1615-1622. DOI: 10.1128/IAI.00958-10.
- [23] KIM Y, LEE Y S, YANG J Y, et al. The resident pathobiont *Staphylococcus xylosus* in Nfkbiz-deficient skin accelerates spontaneous skin inflammation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6348. DOI:10.1038/s41598-017-05740-z.
- (收稿日期: 2024-11-12 修回日期: 2025-02-05)
(本文责任编辑: 张俊彦)
- [引用本文]**
孔志豪, 魏晓锋, 于灵芝, 等. 鳞状皮屑裸小鼠木糖葡萄球菌的分离鉴定[J]. 实验动物与比较医学, 2025, 45(3): 368-375. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.166.
KONG Z H, WEI X F, YU L Z, et al. Isolation and identification of *Staphylococcus xylosus* in nude mice with squamous skin scurfs [J]. Lab Anim Comp Med, 2025, 45(3): 368-375. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.166.