

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.08.02

1 株鸚鵡热衣原体的冻干、鉴定和分子分型研究

陈玲,田野,杜鹏飞,蒋颖,杨承槐*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2023-03-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 08-0012-07 [中图分类号] S852.62

[摘要] 从国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心领取 1 支鸚鵡热衣原体 CVCC2410 进行冻干和鉴定。将衣原体经卵黄囊接种 SPF 鸡胚进行复壮和传代,收获卵黄囊膜研磨后分装、冻干,并对冻干衣原体进行了无菌检验、真空度测定、染色特性和形态观察、特异性检验、16S rRNA 鉴定、分子分型、衣原体含量测定。结果表明冻干衣原体 CVCC2410 2203 为 C 型鸚鵡热衣原体,含量为 $10^{5.50}$ ELD₅₀/0.2 mL。本研究完善了该株衣原体的信息,为制定鸚鵡热衣原体的入库标准奠定基础。

[关键词] 鸚鵡热衣原体;冻干;鉴定;分型

Lyophilization, Identification and Molecular Classification of a *Chlamydia psittaci*

CHEN Ling, TIAN Ye, DU Peng-fei, JIANG Ying, YANG Cheng-huai*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: Yang Cheng-huai, E-mail: ychenghuai@163.com

Abstract: A *Chlamydia psittaci* CVCC2410 was obtained from the National Center for Veterinary Culture Collection for lyophilization and identification. *Chlamydia psittaci* was inoculated into SPF chicken embryos through the yolk sac for recovery and passage, and the harvested yolk sac membrane was ground, bottled and then lyophilized. The freeze-dried *Chlamydia psittaci* was tested for sterility, vacuum measurement, staining characteristics and morphology observation, specificity test, 16S rRNA identification, molecular typing and content determination. The results showed that CVCC2410 2203 was C-type *Chlamydia psittaci* with a titer of $10^{5.50}$ ELD₅₀/0.2 mL. This study provided more information about this strain, and laid the foundation for the formulation of storage standards for *Chlamydia psittaci*.

Key words: *Chlamydia psittaci*; lyophilization; identification; classification

基金项目:国家重点研发计划“国家生物安全实物核心资源库支撑关键技术研究”(2022YFC2602202)

作者简介:陈玲,助理研究员,从事菌毒种鉴定和兽用生物制品检验工作。

通讯作者:杨承槐。E-mail: ychenghuai@163.com

衣原体是一类具有滤过性、严格细胞内寄生的革兰氏阴性菌^[1]。在一定情况下能在不同宿主间交叉感染,可引起多种动物和人的疾病,对公共卫生构成严重威胁^[2]。鸚鵡热衣原体(*C. psittaci*)属于衣原体科(*Chlamydiaceae*)衣原体属(*Chlamydia*),天然宿主为鸟类和哺乳动物,全世界范围内鸟类感染鸚鵡热衣原体的现象十分普遍^[1]。感染的家禽以及鸚鵡、孔雀等观赏动物,可以将病原传染给人,引起人发病。2018 年,美国多个州的家禽养殖场爆发了鸚鵡热疫情,并且有 13 例实验室确诊病例^[3]。根据香港卫生署卫生防护中心的传染病统计数据,近 3 年香港出现的鸚鵡热病例分别为 11 例、12 例和 10 例^[4]。2022 年,鸚鵡热首次列入《人畜共患传染病名录》和《全国畜间人兽共患病防治规划(2022-2030)》^[5-6]

主要外膜蛋白(MOMP)是鸚鵡热衣原体的主要免疫原性蛋白和型特异性抗原。根据编码 MOMP 的基因(*ompA*)序列不同,鸚鵡热衣原体有 9 种常见基因型,即 A-F、E/B、M56 和 WC^[7]。宿主的种类与鸚鵡热衣原体基因型之间存在一定程度的关联^[1],如基因 A 型主要在鸚鵡中流行,基因 B 型主要与鸽子有关^[8],C 型主要从水禽中分离,D 型主要与火鸡有关,F 型主要从鸚鵡和火鸡中分离,E 型宿主相对广泛,包括鸽子、鸵鸟、鸭和火鸡,E/B 主要与鸭有关^[9,10],WC 主要从牛中分离,M56 主要存在啮齿动物中。所有的基因型都被认为易于传播给人类^[11]。Liu S 等^[12]对 2014 年至 2017 年台湾地区的鸚鵡热衣原体流行性调查中发现,3.1% 的鸚鵡样品中检测出基因 A 型,10.1% 的赛鸽和其他鸠鸽科样品中分离出基因 B 型。Gedye 等^[13]从新西兰本地和引进鸟类样品中检测到基因 A 型和 C 型。Heddema ER 等^[10,14]对荷兰临床病人的鸚鵡热衣原体分离株进行 *ompA* 基因测序,发现其中 A 型和 B 型为主要基因型。

本研究对国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心保存的 1 株鸚鵡热衣原体进行繁殖、冻干和详细鉴定,有利于库存衣原体资源信息的更新和完善,也为制定鸚鵡热衣原体菌种入库标准奠定基础。

1 材料与方法

- 1.1 衣原体和细胞 CVCC2410(原始编号 CP12, 1992 年 4 月冻干)和 McCoy 细胞,由国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心保存。
- 1.2 6 日龄 SPF 鸡胚 购自北京勃林格殷格翰维通实验动物有限公司。
- 1.3 主要试剂 DNA 提取试剂盒、DNA Marker、Ex Taq Mix 购自 Takara 公司, Chlamydia antibody 购自 Fitzgerald, Anti - Mouse IgG(whole molecule) - FITC antibody produced in goat 购自 Sigma, DMEM 培养基购自 Hyclone, 胎牛血清购自 Thermofisher, 10% 蔗糖牛奶和生理盐水购自北京中海生物科技有限公司, 姬姆萨染色液购自常德比克曼生物科技有限公司, SPG 溶液(蔗糖 75 g, KH₂PO₄ 0.52 g, Na₂HPO₄ 1.22 g, 谷氨酸 0.72 g, 加水至 1 L, 调节 pH 为 7.4~7.6)为实验室配制。
- 1.4 引物设计与合成 参照 NY/T562-2015《动物衣原体病诊断技术》^[15], 合成一对引物 MP1/MP2 用于扩增 *ompA* 片段, 另外合成 16S rRNA 通用引物 27f 和 1492r, 具体引物序列见表 1, 引物由中美泰和生物技术有限公司合成。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences		
引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp
MP1	ATGAAAAAACTCTTGAATACGG	1170
MP2	TTAGAATCTGAATTGAGCATTCAT	
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
1492r	ACGCTTACCTTGTACGACTT	

1.5 衣原体繁殖、冻干 无菌开启冻干衣原体 CVCC2410(1992 年 4 月冻干),用 5 mL 生理盐水进行稀释,经卵黄囊接种 6 日龄 SPF 鸡胚 6 枚,0.3 mL/胚,弃去接种后 72 h 内死亡的鸡胚,收集 4 d~10 d 内死亡鸡胚卵黄囊膜,加入生理盐水(4 mL/胚)进行研磨破碎后,3000 r/min 离心 20 min,标记为 CVCC2410 E1。将 CVCC2410 E1 用生理盐水进行 100 倍稀释后再次接种 20 枚 6 日龄鸡胚,收集死亡鸡胚卵黄囊膜进行研磨,3000 r/min

离心 20 min, 标记为 CVCC2410 E2。取衣原体菌液 CVCC2410 E2 与等量的 10% 蔗糖脱脂奶混匀后, 分装到安瓿中, 1 mL/支, 经真空冷冻干燥后抽真空封口保存, 安瓿瓶标记为 CVCC2410 2203。

1.6 衣原体鉴定

1.6.1 无菌检验和真空度测定 按照现行《中国兽药典》附录进行检验。

1.6.2 染色特性和形态观察 取冻干衣原体 CVCC2410 2203 1 支, 用无菌生理盐水稀释 100 倍, 经卵黄囊接种 6 日龄 SPF 鸡胚 3 枚, 0.2 mL/胚, 同时设置正常对照 2 枚, 每日照胚, 弃去 72 h 内死亡鸡胚, 收集 72 h 后死亡鸡胚和正常鸡胚卵黄囊膜制备涂片, 自然晾干后, 用甲醇固定 2~3 min。将涂片放置在染色架上, 滴加姬姆萨染色液, 室温放置 15~30 min。用自来水从玻片一端缓慢冲洗, 晾干后在油镜下观察。

1.6.3 特异性检验

1.6.3.1 细胞接种 取冻干衣原体 CVCC2410 2203 1 支, 用 5 mL SPG 溶液进行 10 倍稀释后, 接种 McCoy 单层细胞 (24 孔板), 每孔接种 0.2 mL, 置 37 °C 吸附 2 h, 每孔补加 0.8 mL DMEM 维持液 (含 2% 胎牛血清和 1 µg/mL 放线菌酮), 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h。

1.6.3.2 染色 弃去 24 孔板的细胞培养液, 每孔约加 1 mL PBS (pH 7.2) 轻洗细胞表面一次, 尽量弃尽 PBS, 然后每孔加入 0.3 mL 冷甲醇, 置室温固定 10~15 min, 弃去甲醇, 自然晾干。用 PBS 洗细胞面一次, 然后每孔加入 0.2 mL 适当稀释的一抗, 置 37 °C 作用 1 h。弃去一抗, 先用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗涤 3 次, 每次每孔加入 1 mL, 轻微振荡洗涤 1 min, 然后用 PBS 洗涤 2 次。弃尽洗液, 每孔加入 0.2 mL 适当稀释的二抗, 置 37 °C 作用 1 h。弃去二抗, 并洗涤。在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光观察。

1.6.4 16S rRNA 鉴定 取冻干衣原体 CVCC2410 2203 1 支, 用生理盐水做 10 倍稀释后, 取 200 µL 用试剂盒提取核酸, 取上清 2 µL 作为模板加到如下反应体系中 (50 µL): Premix Taq™ 25 µL, 引物

27f 和 1492r 各 1 µL, 加无菌 ddH₂O 至 50 µL。反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物测序由中美泰和生物技术 (北京) 有限公司完成。将 16S rDNA 序列提交到 NCBI 进行比对, 同时与衣原体模式株进行序列比对。

1.6.5 分子分型 取上清 4 µL 作为模板 (同 16S rRNA 鉴定) 加到如下反应体系中 (50 µL): Premix Taq™ 25 µL, 引物 MP1 和 MP2 各 1 µL, 加无菌 ddH₂O 至 50 µL。反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 53 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物测序由中美泰和生物技术 (北京) 有限公司完成。绘制基于鸚鵡热参考株 ompA 序列的进化图。

1.6.6 衣原体含量测定 分别取冻干前的湿菌和冻干衣原体 CVCC2410 2203, 用无菌生理盐水将其进行 10 倍系列稀释至 10⁻⁸ (0.5 mL 稀释样品加入 4.5 mL 生理盐水中), 取 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 和 10⁻⁸ 四个稀释度, 每个稀释度经卵黄囊途径各接种 5 枚 6 日龄 SPF 鸡胚, 每枚 0.2 mL, 置 37 °C 恒温培养箱中孵育 10 d, 每天照胚一次, 记录鸡胚死亡情况。

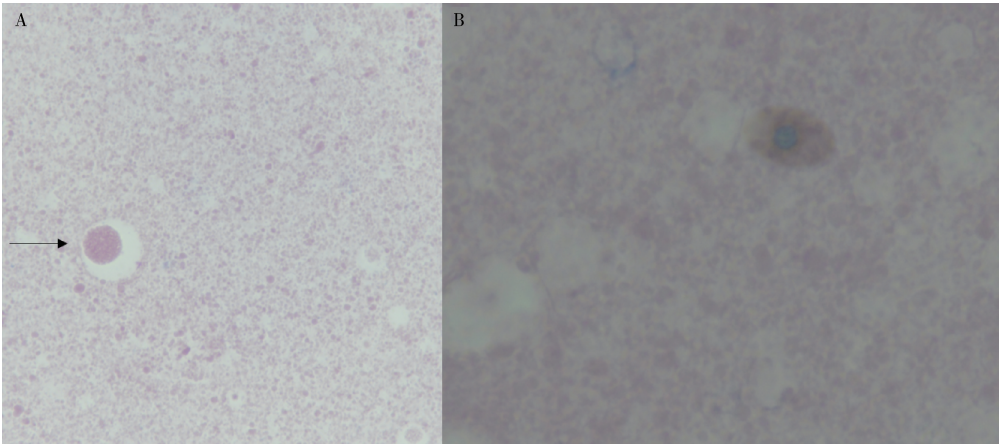
2 结果与分析

2.1 无菌检验和真空度测定 按照现行《中国兽药典》附录进行无菌检验和真空度测定, 均无菌生长, 安瓿内出现辉光, 结果为合格。

2.2 染色特性和形态观察 经姬姆萨染色后, 接种 CVCC2410 2203 的鸡胚卵黄囊膜涂片中可见充满红色鱼眼状颗粒的包涵体, 未接种鸡胚卵黄囊膜涂片中未见红色包涵体。

2.3 特异性检验 阴性对照孔细胞不着色, 视野发暗; 4 个阳性接种孔中均可见亮绿色荧光包涵体, 包涵体呈圆形和不规则形, 部分荧光团呈散开状, 视野中可见散在的绿色荧光点, 为释放到细胞外的衣原体。

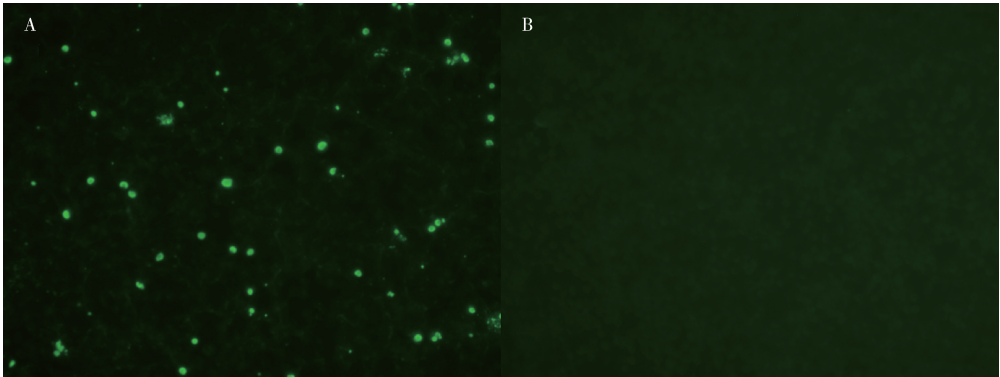
2.4 16S rRNA 鉴定 CVCC2410 2203 的 16S rRNA 序列与鸚鵡热衣原体模式菌株 6BC (T) 的同源性为 99.78% (图 3)。



A: CVCC2410 2203 接种鸡胚涂片;B:正常鸡胚涂片
A: smear of CVCC2410 2203; B: smear of normal chicken embryo yolk sac

图 1 鸡胚卵黄囊涂片姬姆萨染色 (100 ×)

Fig 1 Giemsa stain of chicken embryo yolk sac smear (100 ×)



A: CVCC2410 2203 接种孔;B 正常细胞对照
A: McCoy infected with CVCC2410 2203; B McCoy as negative control

图 2 CVCC2410 2203 感染 McCoy 细胞 36 h 后单克隆抗体染色结果 (200 ×)

Fig 2 Stain of McCoy infected with CVCC2410 2203 for 36 hours (200 ×)

Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Variation ratio	Hit taxonomy	Completeness (%)
Chlamydia psittaci	6BC(T)	CP002549	99.78	3/1394	Bacteria;Chlamydiae;Chlamydia;Chlamydiales;Chlamydiaceae;Chlamydia	100.0

图 3 16S rRNA 序列比对结果

Fig 3 16S rRNA sequence alignment

基于 16S rRNA 序列的进化图中, CVCC2410 2203 与鹦鹉热衣原体模式菌株 6BC(T) 处于同一分支, 结果见图 4。

2.5 分子分型 基于鹦鹉热衣原体 ompA 序列的进化图(图 5), CVCC2410 2203 与 C 型鹦鹉热衣原

体参考菌株 GD 处于同一分支。
2.6 衣原体含量测定 结果见表 2。冻干后, 衣原体含量下降明显。冻干前测定的衣原体含量为 $10^{7.16}$ ELD₅₀/0.2mL, 冻干后含量为 $10^{5.50}$ ELD₅₀/0.2mL。



图 4 CVCC2410 2203 与衣原体模式菌株 16S rRNA 序列进化图

Fig 4 16S rRNA sequence phylogenetic tree of CVCC2410 2203 and *Chlamydia* type strain



图 5 CVCC2410 2203 与鹦鹉热衣原体参考菌株 ompA 序列进化图

Fig 5 ompA sequence phylogenetic tree of CVCC2410 2203 and *Chlamydia psittaci* type strain

表 2 接种后鸡胚死亡情况记录表

Tab 2 Chicken embryo death record

稀释度	冻干前			冻干后		
	死亡数	存活数	含量	死亡数	存活数	含量
10 ⁻⁵	5	0	10 ^{7.16} ELD ₅₀ /0.2mL	5	0	10 ^{5.50} ELD ₅₀ /0.2mL
10 ⁻⁶	4	1		0	5	
10 ⁻⁷	3	2		0	5	
10 ⁻⁸	1	4		0	5	

3 讨论与结论

衣原体不能在无细胞的培养基中生长,需要依靠实验动物、鸡卵卵黄和细胞等宿主提供低分子量的生物合成中间体用于合成 DNA、RNA、蛋白和脂质^[1]。McCoy 和 HeLa 229 细胞是衣原体分离最常用的细胞系^[16-17],其他的细胞系可用于特定衣原体的分离,L-929(小鼠成纤维细胞)或者 BGMK

可用于鹦鹉热衣原体的分离和培养。鸡卵卵黄囊接种也可以用于衣原体的分离培养,但是对于人源的衣原体,卵黄接种途径不如细胞敏感^[16]。大多数衣原体还可以通过鼻内滴注的方式感染小鼠,BALB/c 或者 A/J 品系的小鼠更适合衣原体的分离。本研究采用鸡卵卵黄囊接种途径培养鹦鹉热衣原体,接种后鸡卵出现规律死亡,取卵黄囊涂片

经姬姆萨染色可见包涵体,敏感性好且便于进行初步鉴定,也是农业行业标准中衣原体分离培养推荐的方法。

本研究中,将收获的鸚鵡热衣原体与等量的 10% 蔗糖脱脂奶混合后采用真空冷冻干燥法进行冻干,冻干后的衣原体含量出现明显下降,从冻干前的 $10^{7.16}$ ELD₅₀/0.2 mL 下降为 $10^{5.50}$ ELD₅₀/0.2 mL。蔗糖脱脂奶是常用的配方冻干保护剂之一^[18],用于本实验室菌毒种的冻干。鸚鵡热衣原体采用蔗糖脱脂奶作为保护剂,冻干保护效果不好,可能是由于衣原体的结构和理化性质不同,对冷冻和干燥的耐受性不同^[19]。不同类型的冻干保护剂在微生物冷冻干燥过程中的保护机理和效果是不一样的,因此需要筛选、优化冻干保护剂的种类和配比来提升鸚鵡热衣原体的冻干保护效果,提高库存资源的质量。

鸚鵡热衣原体冻干入库还需要从生物学、活性和稳定性等方面进行鉴定,确保病原微生物(毒)种资源质量。本研究中鸚鵡热衣原体的鉴定项目参考了《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇年版)中猪源衣原体 CJ4 株菌种标准,包括:染色特性和形态观察、特异性检验、16S rRNA 鉴定、分子分型、含量测定、无菌检验和真空度测定。其中特异性检验采用的是间接免疫荧光的方法,替代了操作更为复杂的补体结合试验;由于衣原体不能在无细胞的培养基上生长,无菌检验代替了纯粹检验;同时新增了 16S rRNA 鉴定和分子分型,从分子水平进一步鉴定为 C 型鸚鵡热衣原体。该菌种可以作为阳性对照,用于衣原体病原的分离和鉴定。同时也为建立鸚鵡热衣原体的入库、鉴定和保藏关键技术研究奠定基础。

参考文献:

[1] Goodfellow M, Kampfer P, Chun J, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Second edition. Georgia Athens: Springer Science & Business Media, 2011: 843-861.

[2] Swayne D E, Boulianne M, Logue C M, *et al.* Diseases of Poultry[M]. 14th edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons,

2020:1086-1101.

[3] McGovern OL, Kobayashi M, Shaw K A, *et al.* Use of real-time PCR for *Chlamydia psittaci* detection in human specimens during an outbreak of psittacosis — Georgia and Virginia, 2018 [J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2021;70(14): 505-509.

[4] <https://www.chp.gov.hk/sc/statistics/data/10/26/43/6896.html>.

[5] 中华人民共和国农业农村部. 人兽共患传染病名录(2022年版)[EB/OL]. 2022-06-23.

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the Peoples' Republic of China, List of Zoonotic Infectious Diseases (2022 Edition) [EB/OL]. 2022-06-23.

[6] 中华人民共和国农业农村部. 全国畜间人兽共患病防治规划(2022-2030年)[EB/OL]. 2022-09-14.

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the Peoples' Republic of China, National Zoonotic Disease Prevention and Control Plan (2022-2030) in Livestock[EB/OL]. 2022-09-14.

[7] Sachse K, Laroucau K, Hotzel H, *et al.* Genotyping of *Chlamydomytila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of ompA genes [J]. BMC Microbiology, 2008, 8(1): 1-12.

[8] Dickx V, Beeckman D S A, Dossche L, *et al.* *Chlamydomytila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission [J]. Journal of Medical Microbiology, 2010, 59(11): 1348-1353.

[9] Hulin V, Bernard P, Vorimore F, *et al.* Assessment of *Chlamydia psittaci* shedding and environmental contamination as potential sources of worker exposure throughout the mule duck breeding process[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(5): 1504-1518.

[10] Gaede W, Reckling K F, Dresenkamp B, *et al.* *Chlamydomytila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany[J]. Zoonoses and Public Health, 2008, 55(4): 184-188.

[11] Heddema E R, Van Hannen E J, Duim B, *et al.* Genotyping of *Chlamydomytila psittaci* in human samples [J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(12): 1989.

[12] Liu S Y, Li K P, Hsieh M K, *et al.* Prevalence and genotyping of *Chlamydia psittaci* from domestic waterfowl, companion birds, and wild birds in Taiwan [J]. Vector-Borne and Zoonotic

Diseases, 2019, 19(9): 666 – 673.

[13] Gedye K R, Fremaux M, Garcia – Ramirez J C, *et al.* A preliminary survey of *Chlamydia psittaci* genotypes from native and introduced birds in New Zealand [J]. New Zealand Veterinary Journal, 2018, 66(3): 162 – 165.

[14] Heddema E R, van Hannen E J, Bongaerts M, *et al.* Typing of *Chlamydia psittaci* to monitor epidemiology of psittacosis and aid disease control in the Netherlands, 2008 to 2013 [J]. Eurosurveillance, 2015, 20(5): 21026.

[15] 动物衣原体病诊断技术[S]. 北京:农业农村部农业信息化标准化技术委员会,2015。

Diagnostic techniques for animal chlamydiosis [S]. Beijing: Agricultural Information Standardization Technical Committee of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, 2015.

[16] Gordon F B, Harper I A, Quan A L, *et al.* Detection of *Chlamydia* (Bedsonia) in certain infections of man. I. Laboratory procedures: comparison of yolk sac and cell culture for detection and isolation[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1969: 451 – 462.

[17] Kuo C C, Wang S P, Grayston J T. Growth of trachoma organisms in HeLa 229 cell culture[J]. Nongonococcal urethritis and related infections. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1977: 328 – 336.

[18] Bellali S, Khalil J B, Fontanini A, *et al.* A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying [J]. Microbiological Research, 2020, 236: 126454.

[19] Chen H, Chen S, Li C, *et al.* Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze – drying[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2015, 45(5): 463 – 475.

(编 辑:李文平)