

鸚鵡熱嗜衣原體禽鳥株的分离鉴定及小鼠呼吸道感染模型的建立

唐國芳, 陳麗麗, 劉良專, 李忠玉, 王紹勝, 徐磊, 吳移謀*

(湖南省南華大學病原生物學研究所, 衡陽 421001)

摘要:【目的】優化鸚鵡熱嗜衣原體(*Chlamydophila psittaci*, *C. psittaci*, Cps)禽鳥株分离培养技术, 建立 Cps 呼吸道感染的小鼠模型。【方法】从禽鳥肝組織中抽提总 DNA, PCR 法体外扩增 Cps *ompA* 基因, 初步鉴定 Cps 阳性标本; 同时将阳性标本的肝組織匀浆液接种到 HeLa 和 Vero 細胞中培养, Giemsa 和免疫荧光染色法鉴定衣原體包涵體。将临床株扩大培养后, 用 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 IFU 三个剂量鼻内接种小鼠, 分别于感染后 5 d 和 10 d 处死小鼠, 显微镜观察受染小鼠各脏器病理变化。【结果】采用 PCR 扩增 Cps *ompA* 基因, 从 100 只禽鳥标本中检测到阳性 Cps 标本 6 例(6%), 并成功地在 HeLa 及 Vero 細胞中培养出 3 例, 且 Vero 細胞内的衣原體包涵體体积大, 结构致密, 对衣原體感染引起的宿主細胞溶解耐受性较 HeLa 細胞强, 更适用于 Cps 的分离培养及体外研究。成功建立 Cps 的鼠呼吸道感染模型, 10^5 IFU 是建立 Cps 呼吸道感染小鼠模型的适宜菌量。【结论】优化了 Cps 禽鳥株的分离培养技术, 成功建立了 Cps 呼吸道感染小鼠模型, 为 Cps 流行病学调查及研究衣原體的致病性和致病机制奠定基础。

关键词: 鸚鵡熱嗜衣原體; 禽鳥株; 分离鉴定; 动物模型

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1657-07

鸚鵡熱嗜衣原體为专性寄生在鸟类和哺乳动物体内的革兰阴性胞内寄生菌, 也可感染人类。依据 Cps 菌株和宿主类型的不同, 其临床疾病表现多种多样。禽类主要表现为心包炎、气囊炎、肺炎、腹膜炎、肝炎和脾炎。人类主要表现为呼吸系统感染及流感样症状, 也可累及身体其它多个脏器, 如心血管、神经系统、肝脏及胃肠道等, 表现为心肌炎、脑膜炎、黄疸、腹痛腹泻和 ARDS (成人呼吸窘迫综合征), 甚至可发生多脏器功能衰竭^[1]。孕妇感染表现为非典型肺炎, 肝炎, 肾衰, 败血症, 早产或死产^[2]。除此之外, Cps 可能还与眼附属器淋巴瘤有关^[3–7]。

当前临床上诊断 Cps 感染仍较为困难, 实验室检测主要依赖于血清学检测、分子生物技术、X 线检

查及衣原體培养等手段。血清学检测主要以抗 LPS (脂多糖) 和 HSP (热休克蛋白) 抗体为检测对象, 简便、快速, 但易与衣原體其它种属、牙龈卟啉单胞菌、大肠埃希菌 O119 和纽因顿沙门菌等发生交叉反应, 假阳性率高, 特异性较低^[8]; 另一方面, 受染动物或人使用抗生素治疗后会抑制抗体的产生, 容易产生假阴性, 且无早期诊断意义。分子生物学方法灵敏、特异, 但容易出现假阳性, 且对专业人员及试验设备要求较高, 试验程序无标准可言, 而且不同检测方案阳性结果相差较大。传统的衣原體分离培养法虽有耗时长、技术复杂等缺陷, 但该检测方法敏感性高、特异性强, 一度认为是诊断衣原體的“金标法”, 如能早期采集标本, 可在 48 h 内获得阳性结果。

本实验采用细胞培养法从 100 份禽鳥标本中分

基金项目: 国家科技重大专项 (2008ZX10004-001)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-734-8282907; E-mail: yimouwu@sina.com.cn

作者简介: 唐國芳 (1982–), 女, 湖南永州人, 硕士研究生, 主要从事衣原體致病机制研究, E-mail: tangguofang91@163.com

收稿日期: 2010-06-11; **修回日期:** 2010-07-06

离 Cps, 优化 Cps 临床株的培养条件, 活菌攻击小鼠, 确定小鼠是否可以作为 Cps 的动物模型, 并探索最佳感染浓度, 为今后进一步研究衣原体致病性和致病机制以及制备衣原体疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本: 花鸟市场收集 100 份新鲜禽鸟尸体, 包括鹦鹉 (Parrot) 65 只、相思鸟 (Leiothrix) 20 只、珍珠鸟 (Zebra Finch) 8 只等。

1.1.2 主要试剂和仪器: HeLa 和 Vero 细胞 (实验室保存); Cps 6BC 纯化基因组 DNA 模板、兔抗 Cps 抗体 (美国德州大学圣安东尼奥健康科学中心免疫和微生物学系钟光明教授惠赠); 蔗糖磷酸盐转运培养基 (SPG) 按照以下配方配制: 蔗糖 75.0 g, KH_2PO_4 0.52 g, Na_2HPO_4 1.22 g, L-谷氨酸 0.72 g, 去离子水定容至 1 L, 调 pH 值至 7.4–7.6, 高压灭菌 20 min, 待冷却后加入 10 mg/L 庆大霉素、100 mg/L 万古霉素、100 mg/L 链霉素、3.75 mg/L 两性霉素 B 或 25 U/mL 制霉菌素。衣原体生长培养基: 含 10% FBS 的 DMEM 培养基中添加 10 mg/L 庆大霉素、100 mg/L 万古霉素、100 mg/L 链霉素、3.75 mg/L 两性霉素 B 或 25 U/mL 制霉菌素、1.0–2.0 mg/L 放线菌酮; 生物安全柜 (Haier 公司); 倒置荧光显微镜 (Nikon 公司)。

1.1.3 实验用动物: 近交系 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 24 只 (购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司), 6–8 周龄, 重量 18–21 g, 随机分为 4 组, 分别鼻内接种 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 IFU 以及 PBS, 每组 6 只。

1.2 PCR 扩增初筛 Cps 阳性菌株

基因组 DNA 提取法提取禽鸟肝组织 DNA。按文献合成 Cps *ompA* 基因引物序列^[9]: CPF: 5'-GCAAGACACTCCTCAAAGCC-3', CPR: 5'-CCTTCC CACATAGTGCCATC-3'。反应体系: 总体积 50 μL , 其中 ddH_2O 32.75 μL 、10 \times PCR buffer (含 MgCl_2) 10 μL 、dNTPs (10 mmol/L each) 1 μL 、CPF (30 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL 、CPR (30 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL 、Taq 酶 0.25 μL 、DNA 模板 5 μL 。循环参数: 预变性 95 $^\circ\text{C}$ 2 min, 变性 95 $^\circ\text{C}$ 30 s, 退火 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 循环 35 次, 末次循环后补延伸 72 $^\circ\text{C}$ 5 min, 终止反应。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 Cps 禽鸟株培养

1.3.1 Cps 的原代培养 将 PCR 初筛阳性标本的肝组织迅速解冻、匀浆、冰浴超声, 低速离心, 弃沉

淀, 留取上清, 接种于单层 Vero 和 HeLa 细胞; 32 $^\circ\text{C}$ –25 $^\circ\text{C}$, 1000 \times g, 离心 1 h, 弃去衣原体接种液, 更换衣原体生长培养基, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 恒温细胞培养箱中培养 72 h。

1.3.2 Cps 的扩大培养 如第一代培养衣原体包涵体数目为 1–5 个或 >5 个, 则用少量的 SPG 收集, 继续第 2 代、第 3 代、第 4 代培养……并且在每继续一代培养后留取部分阳性样本 –80 $^\circ\text{C}$ 或 –120 $^\circ\text{C}$ 长期保存; 如第一代培养免疫荧光鉴定未观察到包涵体, 仍需继续培养第 2 代, 如同一样本反复两次或多次数第 2 代培养 72 h 仍无包涵体, 基本可以认定它为阴性或失去感染活性, 可终止培养。

1.4 Cps 菌株的鉴定

1.4.1 PCR 产物测序鉴定: 将 PCR 产物送往北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

1.4.2 Giemsa 染色: 按 1:9 比例取 Giemsa 母液和 Sorensen 缓冲液 (pH6.98) 混合配成工作液; 甲醇固定细胞后用 Giemsa 染液染色 15 min–30 min; 显微镜下计数包涵体形成单位 (inclusion forming units, IFU)。

1.4.3 间接免疫荧光 (indirect immunofluorescence, IF) 染色 甲醇: 丙酮 = 1:1 或 80% 甲醇固定细胞后加入稀释后的兔抗 Cps 特异性抗体, 37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育 1 h 或 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜; PBS 清洗 3 次, 加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 37 $^\circ\text{C}$, 避光孵育 1 h; PBS 洗板后 Hoechst 33258 染色液进行细胞核染色 3–5 min, PBS 洗涤后 Nikon 倒置荧光显微镜下观察结果, 计数 IFU。

1.5 小鼠感染模型的制备

1.5.1 Cps 菌株体外培养、制备感染液: 用临床上 Vero 细胞连续培养四代 PCR 鉴定无支原体污染的 sample 6 菌株作为实验菌株, 超声破碎细胞, 低速离心, 上清于 –70 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.5.2 Cps 接种小鼠: PBS 重悬 sample 6 菌株, 每只小鼠鼻内接种 50 μL 稀释菌液, 分别含 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 IFU 衣原体; 对照组鼻内接种无菌 PBS 50 μL 。每天监测小鼠食欲情况、活动状态、体重变化等。

1.5.3 镜检观察小鼠脏器病理变化: 分别于感染后第 5 天、第 10 天分批处死小鼠, 并解剖取心、肝、脾、肺、肾组织进行 HE 和免疫组化染色, 显微镜观察以上组织病变和 Cps 包涵体。

2 结果

2.1 禽鸟标本中 Cps *ompA* 基因的检测和序列分析 以纯化的禽肝组织基因组 DNA 为模板, 用特异

性 CPF、CPR 引物,通过 PCR 扩增 264 bp 目的片段, 73035.1) 进行 BLAST 比较, 同源性为 98.17% ± 1.6% (图 1)。

ompA 基因序列与 Cps 6BC *ompA* 基因 (Genebank:M

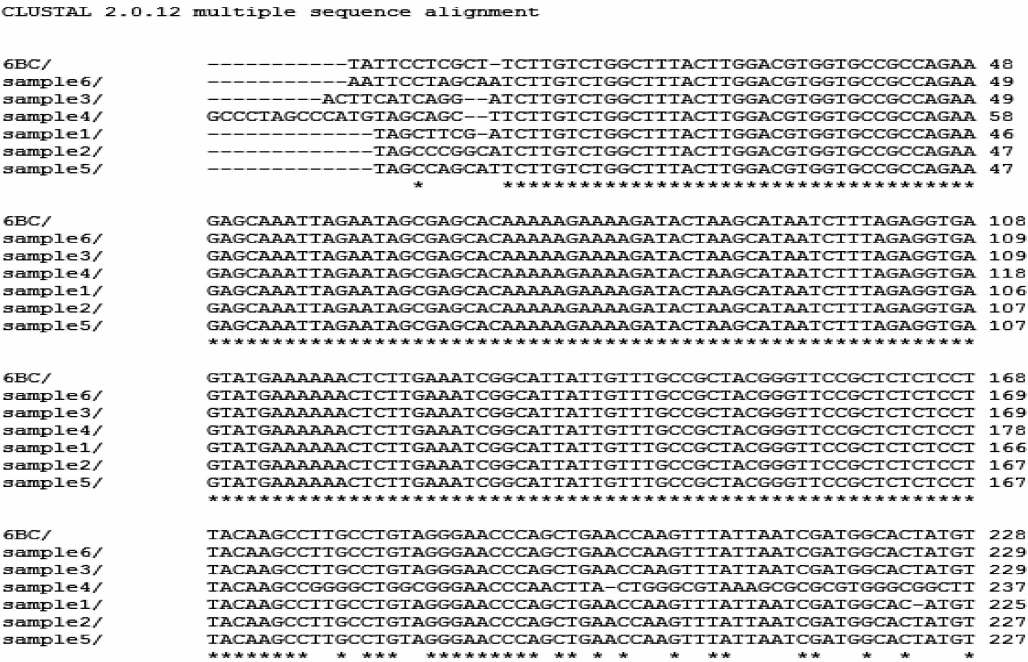


图 1 禽鸟株 *ompA* 基因测序结果 Blast 分析

Fig.1 Blast aligning of *C. psittaci* avian strain *ompA* gene.

2.2 禽鸟标本中 Cps 的分离与鉴定

取 PCR 阳性的 6 份肝组织匀浆液冰浴超声离心后,接种到 HeLa、Vero 细胞中连续培养四代后,进行 Giemsa 染色和免疫荧光法鉴定出 3 份 Cps 阳性标本。Giemsa 染色后,可见 HeLa 细胞核染成红色,核仁蓝色,胞浆灰色,衣原体可染成红紫色或蓝紫色

(图 2)。用 Cps 种特异性抗体进行免疫荧光鉴定,发现 Vero 细胞中的衣原体包涵体形态多样,有呈圆形、卵圆形、多房型、填塞型、帽状等,且体积大,几乎占满整个宿主细胞胞浆,将细胞核挤到一边,结构致密(图 3)。

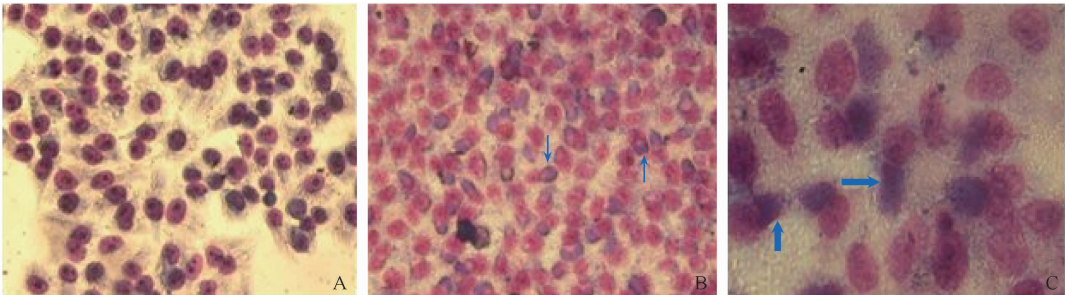


图 2 Cps 禽鸟株感染 HeLa 细胞 Giemsa 染色图

Fig.2 Giemsa staining of *C. psittaci* avian strain infected HeLa cells. A;Negative control (400 ×); B;Positive *C. psittaci* infected HeLa cells (400 ×); C; Positive *C. psittaci* infected HeLa cells (1000 ×). (The arrows shows the *C. psittaci* inclusion bodies).

2.3 Cps 呼吸道感染小鼠模型的建立

2.3.1 一般体征:6-8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠鼻内感染 Cps 后,各剂量组于感染后第 2 天均出现活动度差、进食少、毛松和竖毛、体重下降,症状的轻重程度与感染剂量成正相关,高剂量组部分小

鼠出现角膜模糊,双眼黄色粘性分泌物,拉稀便。于感染后第 2、第 5 天分别测定小鼠体重变化,发现感染组小鼠体重下降明显,各剂量组平均体重明显低于 PBS 对照组(图 4)。

2.3.2 生存率影响:小鼠生存率与感染剂量呈明显

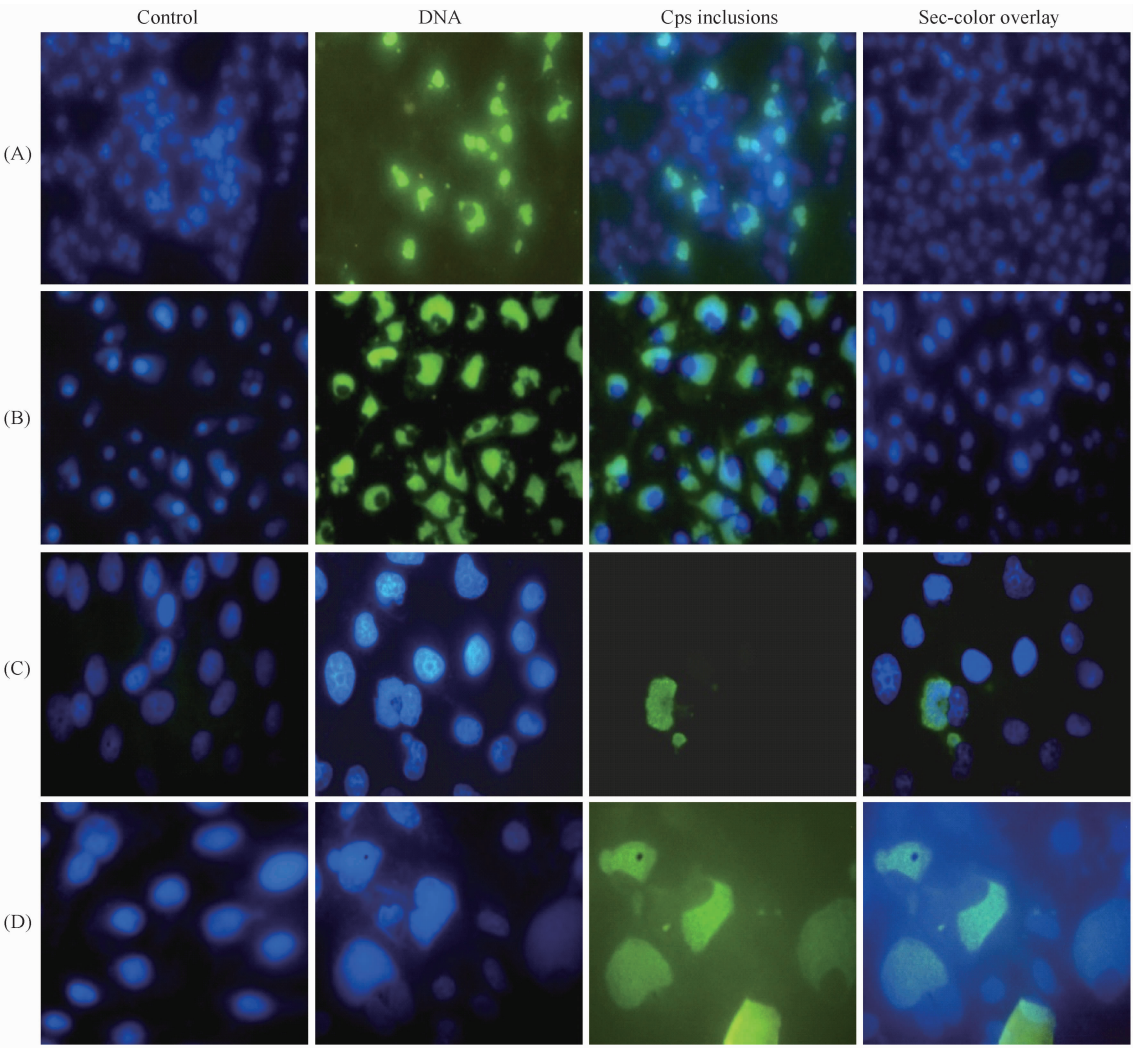


图3 Cps 禽鸟株感染 HeLa 和 Vero 细胞免疫荧光鉴定图

Fig.3 IFA assay of *C. psittaci* avian strain infected HeLa or Vero cells. A;The *C. psittaci*-infected HeLa cells (400 ×);B;The *C. psittaci*-infected Vero cells (400 ×);C. The *C. psittaci*-infected HeLa cells (1000 ×);D. The *C. psittaci*-infected Vero cells (1000 ×).

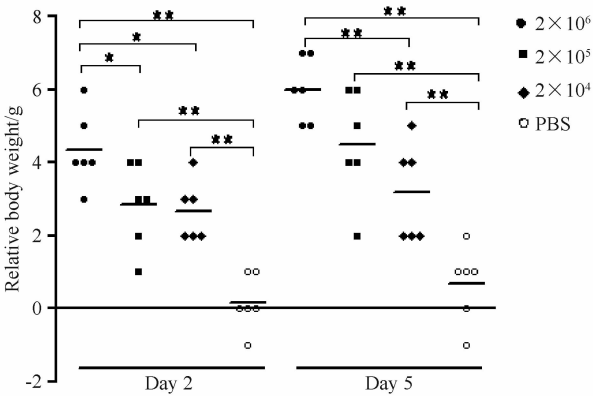


图4 Cps 呼吸道感染小鼠体重变化

Fig.4 The body weight of *C. psittaci*-infected C57BL/6 mice. C57BL/6 mice were infected with *C. psittaci* (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 IFU/mouse) intranasally. Body weights were measured on day2 and day5 after infection. The figure showed relative body weight compared with the body weight prior to infection. Statistical significance was determined by Student's *t* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

的相关性。感染后 5 d, 2×10^6 IFU 组小鼠生存率为 66.6%, 其它 3 组为 100%; 感染后 10 d, 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 IFU 及 PBS 组生存率分别为 0%、33.3%、100%、100%。经统计学分析, 2×10^6 IFU 组感染后 5 d 和 10 d 小鼠生存率均明显低于其它组 (图 5)。

2.3.3 脏器病理变化: 分别于感染后 5 d 和 10 d 处死小鼠, 取右下肺进行 HE 染色。感染后 5 d, 10^4 IFU 组示轻度间质性肺炎改变; 10^5 IFU 组肺泡腔内充血, 炎性细胞渗出, 肺泡间隔模糊不清; 10^6 IFU 组支气管炎性渗出液, 淋巴细胞增生, 肺泡间隔毛细血管充血伴浆液渗出, 示重度肺炎改变。感染后 5 d 的内脏组织器官病变程度比感染后 10 d 严重, 10^5 、 10^4 IFU 组感染后 10 天肺部炎症反应基本消失, 但 10^6 IFU 组仍可见较多的炎性细胞浸润 (图 6)。

免疫组化结果显示 Cps 毒性强, 感染 5 d 后就能

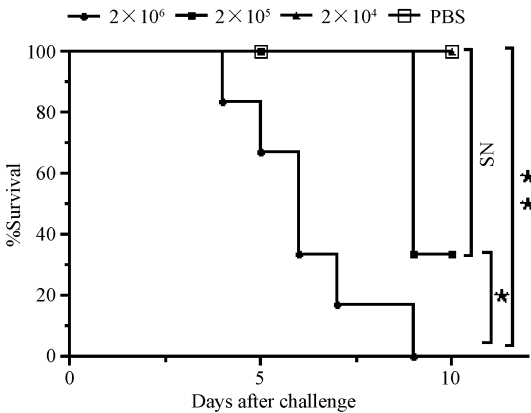


图 5 Cps 呼吸道感染小鼠生存率变化

Fig.5 Survival rate of *C. psittaci* intranasally infected mice. Statistical significance was determined by Log-rank Test(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

引起急性大面积肺部炎症及抗原表达,重要器官如心、肺、肝、脾、肾中均有不同程度的衣原体包涵体浸润,其中肺组织中最高(图 7)

3 讨论

鸚鵡热嗜衣原体为严格真核细胞内寄生,是严重危害人和动物健康的重要病原体。控制传染源、切断传播途径、保护易感人群是防止传染病暴发流行的三个重要环节。鉴于 Cps 传播途径多样,目前尚未研制出有效的衣原体疫苗,那么及时发现传染源起着举足轻重的作用,这就要求有可靠的诊断方法。衣原体培养技术虽然操作烦琐,但它敏感性高,特异性强,被誉为诊断衣原体感染的“金标法”。

Cps最常见的宿主为禽类,尤以鸚鵡最为感染。

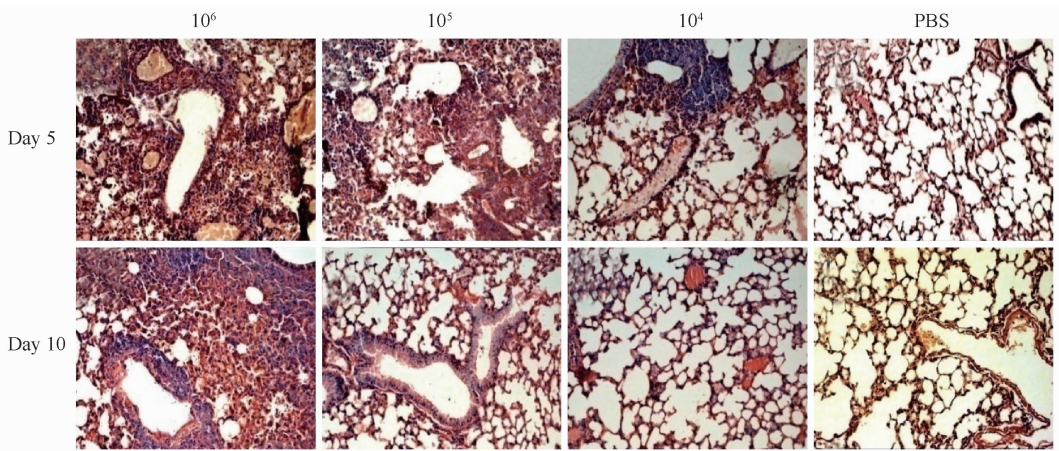


图 6 Cps 呼吸道感染小鼠肺组织病理变化(HE 染色)

Fig.6 Histopathological changes in the lungs of *C. psittaci* intranasally infected mice at day5 and day10 p. i. Lungs showed intense infiltration with PMNs of 10⁶, 10⁵, 10⁴ IFUs groups at day 5 (a,b,c,e), and clearance of inflammation by day 10 (d,f). (Magnification, ×200).

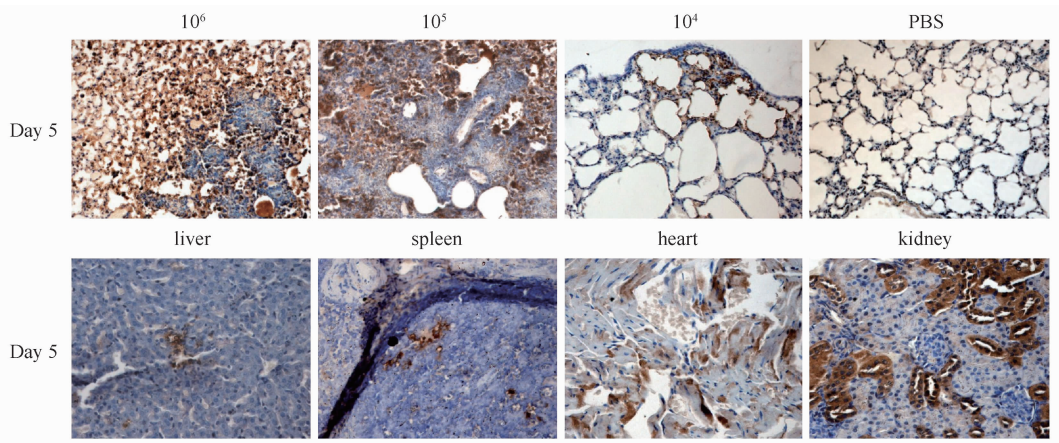


图 7 C57BL/6 小鼠感染 Cps 心、肝、脾、肺、肾免疫组化图

Fig.7 Representative immunohistochemical sections of the lung,liver,heart,spleen,kidney of *C. psittaci*-infected C57BL/6 mice at day 5 p. i. A: Strong immunoreaction in the inflammatory foci of lungs infected with 10⁶ or 10⁵ IFUs. Weak immunoreaction in the inflammatory foci of 10⁴ IFU. Normal appearance without inflammation in control group. (Magnification, ×200). B: Immunoreaction in the inflammatory foci of liver,spleen,heart,kidney infected with 10⁵ IFU. (Magnification, ×400).

本实验采集 100 例禽鸟尸体标本,包括鸮形目、雁形目、佛法僧目 3 种鸟目。PCR 初筛扩增 Cps 特异性 *ompA* 基因鉴定出 6 例阳性标本,基因测序结果分析显示均属 Cps A 血清型菌株,宿主均为鸮形目鸮鹑科中的虎皮鸮鹑,临床症状主要表现为腹泻、食欲减退、呼吸困难、羽毛裂缝、肝脾肿大等,对于禽鸟尸体鉴定是否感染 Cps,衣原体细胞培养法可取肝、脾、肺、心脏、小肠等多种组织,但优先择取肝或脾组织标本^[10-11],同样我们的预实验中也发现肝组织标本具有易取材,易匀浆,不易受其它杂菌污染等多种优势,这不同于肺组织标本。另外 3 例 PCR 阳性标本连续培养四代经 IF 鉴定均未发现包涵体,可能是因为禽鸟在患病期间使用过大环内酯类抗生素治疗,导致衣原体原体数量减少,活性下降,从而引起假阴性结果。

Cps 对多种细胞敏感,如 BGM、Vero、McCoy、HeLa 或 L-929 细胞。本实验选用 Vero 和 HeLa 细胞培养 Cps,发现培养临床 Cps A 血清型菌株,前者培养的包涵体体积明显大于后者,形状多样,结构致密,这可能与 Vero 细胞细胞浆丰富的自身结构有关。另外 Vero 细胞对衣原体耐受性好,同份衣原体标本在 Vero 细胞中培养 72 h 或 80 h 不会引起明显的宿主细胞溶解破裂,而在 HeLa 细胞中仅培养 48-54 h 即可见大量宿主细胞发生较为明显的病变效应,细胞溶解,大量原体释放,重新感染新的宿主。这说明 HeLa 细胞对衣原体诱导的宿主细胞溶解的灵敏性高于 Vero 细胞。这一现象可能提示人类比灵长类动物如猴更易感染 Cps;但另一方面可能暗示胞浆丰富的细胞环境更适合衣原体发育成熟或造成慢性持续感染^[12]。

我们的研究发现不论是用 HeLa 细胞或 Vero 细胞培养 Cps,32℃-25℃,1000-3000 × g 离心 1 h 这一步骤是必不可少的,尤其对于分离临床菌株至关重要,它能明显促进衣原体粘附到宿主细胞,增强衣原体感染活性;另外在衣原体生长培养中加入抑制宿主细胞蛋白质生物合成药物放线菌酮(1-5 mg/L)亦能增加衣原体感染率。

国外报道经生殖道、肌肉注射感染 Ct,鼻内吸入或静脉注射感染 Cpn 及腹膜、静脉注射感染 *C. abortus* 的鼠动物模型相关文献较多^[13-17],但未见有报道 Cps 鸟型菌株感染小鼠的动物模型。本实验成功建立经呼吸道 Cps A 血清型菌株感染 C57BL/6 小鼠的动物模型,研究发现 C57BL/6 小鼠对 Cps A 血清型菌株敏感,病情的缓急与感染剂量相关,各剂量组感染小鼠均出现活动度差、进食少、毛松和竖毛、体重下降等一般症状,仅高剂量组部分小鼠出现角膜模糊、拉稀便等较严重症状。病理切片显示 10⁶ IFU 能引起重度肺炎改变且感染后 10 d 死亡率

为 100%;10⁴ IFU 不能使小鼠出现明显病变,衣原体抗原表达弱阳性;而 10⁵ IFU 既能引起较明显的临床症状和组织病理变化,且衣原体抗原表达强阳性。综合以上结果分析得知 10⁵ IFU 是建立 Cps 呼吸道感染小鼠模型的适宜菌量。成功建立 Cps 呼吸道感染小鼠的动物感染模型为我们今后进一步研究衣原体致病机理、筛选有效药物及研制疫苗奠定了扎实的基础。

致谢 感谢上海交通大学医学院附属瑞金医院陆志稼教授对本实验设计和论文撰写提出的宝贵意见。

参考文献

- [1] Heddema ER, van Hannen EJ, Duim B, de Jongh BM, Kaan JA, van Kessel R, Lumeij JT, Visser CE, Vandenbroucke-Grauls CM. An outbreak of psittacosis due to *Chlamydia psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. *Journal of medical microbiology*, 2006, 55(Pt 11):1571-1575.
- [2] Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, 2003, 128(4):217-244.
- [3] Rosado MF, Byrne GE Jr, Ding F, Fields KA, Ruiz P, Dubovy SR, Walker GR, Markoe A, Lossos IS. Ocular adnexal lymphoma: a clinicopathologic study of a large cohort of patients with no evidence for an association with *Chlamydia psittaci*. *Blood*, 2006, 107(2):467-472.
- [4] Chanudet E, Zhou Y, Bacon CM, Wotherspoon AC, Müller-Hermelink HK, Adam P, Dong HY, de Jong D, Li Y, Wei R, Gong X, Wu Q, Ranaldi R, Goteri G, Pileri SA, Ye H, Hamoudi RA, Liu H, Radford J, Du MQ. *Chlamydia psittaci* is variably associated with ocular adnexal MALT lymphoma in different geographical regions. *The Journal of Pathology*, 2006, 209(3):344-351.
- [5] Ferreri AJ, Guidoboni M, Ponzoni M, De Conciliis C, Dell'Oro S, Fleischhauer K, Caggiari L, Lettini AA, Dal Cin E, Ieri R, Freschi M, Villa E, Boiocchi M, Dolcetti R. Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas. *Journal of the National Cancer Institute and Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 2004, 96(8):586-594.
- [6] Zhang GS, Winter JN, Variakojis D, Reich S, Lissner GS, Bryar P, Regner M, Mangold K, Kaul K. Lack of an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2007, 48(3):577-583.
- [7] Stefanovic A, Lossos IS. Extranodal marginal zone lymphoma of the ocular adnexa. *Blood*, 2009, 114(3):501-510.
- [8] Haralambieva I, Iankov I, Petrov D, Ivanova R, Kamarinchev B, Mitov I. Cross-reaction between the genus-specific lipopolysaccharide antigen of *Chlamydia* spp. and the lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli* O119 and *Salmonella newington*; implications for diagnosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2001, 41(3):99-106.

- [9] Hewinson RG, Griffiths PC, Bevan BJ, Kirwan SE, Field ME, Woodward MJ, Dawson M. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 1997, 54 (2) : 155-166.
- [10] Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2000. Centers for Disease Control and Prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2000, 49 (RR-8) : 3-17.
- [11] Harkinezhad T, Geens T, Vanrompay D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary Microbiology*, 2009, 135 (1-2) : 68-77.
- [12] Croy TR, Kuo CC, Wang SP. Comparative susceptibility of eleven mammalian cell lines to infection with trachoma organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 1975, 1 (5) : 434-439.
- [13] He Q, Tsang LL, Ajonuma LC, Chan HC. Abnormally up-regulated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and uterine fluid accumulation contribute to *Chlamydia trachomatis*-induced female infertility. *Fertility and Sterility* 2010, 93 (8) : 2608-2614.
- [14] Molina DM, Pal S, Kayala MA, Teng A, Kim PJ, Baldi P, Felgner PL, Liang X, de la Maza LM. Identification of immunodominant antigens of *Chlamydia trachomatis* using proteome microarrays. *Vaccine*, 2010, 28 (17) : 3014-3024.
- [15] Joyee AG, Uzonna J, Yang X. Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 alpha + dendritic cell subset in inducing type 1 immunity against infection. *Journal of Immunol*, 2010, 184 (4) : 2095-2106.
- [16] Kerr K, Wheelhouse N, Livingstone M, Anderson IE, Entrican G, McKeever D, Longbottom D. Inflammatory cytokine responses in a pregnant mouse model of *Chlamydophila abortus* infection. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144 (3-4) : 392-398.
- [17] Buendía AJ, Ortega N, Caro MR, Del Río L, Gallego MC, Sánchez J, Navarro JA, Cuello F, Salinas J. B Cells are essential for moderating the inflammatory response and controlling bacterial multiplication in a mouse model of vaccination against *Chlamydophila abortus* infection. *Infection and immunity*, 2009, 77 (11) : 4868-4876.

Isolation of *Chlamydophila psittaci* from avian samples and establishment of a respiratory infection murine model

Guofang Tang, Lili Chen, Liangzhuan Liu, Zhongyu Li, Shaosheng Wang, Lei Xu, Yimou Wu*

(Pathogenic Biology Institute School of medicine, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: [**Objective**] To optimize the isolation and culture technique of *Chlamydophila psittaci* avian strains and to establish an animal model infected with *C. psittaci*. [**Methods**] *C. psittaci ompA* gene was amplified from DNA extracted from bird livers by polymerase chain reactions (PCR). For the PCR positive avian samples, the liver tissues were homogenized and used to incubated with HeLa or Vero cell monolayers for 72 h in different dilutions, and chlamydia inclusion bodies were detected by immunofluorescence or Giemsa staining. Different dose of the avian strains (2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 IFUs) were used to attack C57BL/6 mice by intranasal injection, mice were sacrificed on day 5 or day 10 after infection, and the histopathology changes were analyzed by H&E and immunohistochemistry staining in different organs. [**Results**] Six of one hundred avian samples were positive by *C. psittaci ompA* gene amplification, and three were positive by cell culture. The *C. psittaci* avian strains were cultured in Vero or HeLa cells. Vero cells showed stronger tolerance of cytolysis after chlamydia infection and chlamydia inclusion bodies were larger and more dense. Successfully establish a murine model of intranasal infection with *C. psittaci*, and 2×10^5 IFU is the suitable amount of organisms to induce respiratory chlamydia infection. [**Conclusion**] The isolation and culture condition was optimized for *C. psittaci* avian strains, and a murine model of respiratory tract infection by *C. psittaci* was successfully established, which can be applied to the clinical diagnosis of *C. psittaci* and epidemiological or pathogenetic study.

Keywords: *Chlamydophila psittaci*; avian strain; isolation and culture; animal model

(本文责编: 张晓丽)