

研究报告

青海藏区 B 型沙眼衣原体的分离培养与鉴定

鲁辛辛^{1Δ} 冯乐^{2Δ} 于永慧² 罗声栋² 孙志会² 王涛² 端青² 王宁利^{1,3*} 宋立华^{2*}

(1. 首都医科大学附属北京同仁医院 北京 100005)

(2. 病原微生物生物安全国家重点实验室 军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

(3. 北京市眼科研究所 北京 100005)

摘要:【目的】对青海藏区沙眼患者标本进行沙眼衣原体分离培养与鉴定。【方法】分别采集患者的单眼结膜和结膜囊拭子标本至 1 mL 样本保护培养基中。取 50 μL 样本采用离心法感染 BGM 细胞, 37 °C 培养 72 h, 连续传代 3 次, 相差显微镜观察衣原体包涵体。对临床样本和分离株分别进行主要外膜蛋白基因 *ompA* 序列分析。【结果】共采集了 45 例活动性沙眼患者的 115 份临床样本, 其中 54 份样本为 *ompA* PCR 阳性, 15 份样本为沙眼衣原体培养阳性。*ompA* 分析发现, 青海藏区沙眼衣原体有 3 个不同的同源 *ompA* 变异株, 均为基因 B 型, 都包含有一个泌尿生殖道型沙眼衣原体特有密码子。分离株 QH111L 和 QH111R 分别来自编号 111 患者的左眼和右眼样本, 它们 *ompA* 基因的可变区有一个非同义碱基差异。该碱基变异仅存在于 111 号患者的左眼样本中, 说明 QH111L 可能是新出现的 *ompA* 突变体。【结论】青海藏区的眼型沙眼衣原体流行株为基因 B 型, 至少存在 3 个不同的 *ompA* 变异株。从青海藏区分离培养了 15 株眼型沙眼衣原体, 发现同一患者的左右眼样本中的沙眼衣原体有不同 *ompA*。本研究为研制沙眼疫苗和诊断试剂奠定了基础, 也将有助于理解沙眼的进化和传播。

关键词: 沙眼衣原体, 沙眼, 进化, *ompA*

Isolation and characterization of ocular *Chlamydia trachomatis* from Qinghai China

LU Xin-Xin^{1Δ} FENG Le^{2Δ} YU Yong-Hui² LUO Sheng-Dong² SUN Zhi-Hui²
WANG Tao² DUAN Qing² WANG Ning-Li^{1,3*} SONG Li-Hua^{2*}

(1. Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100005, China)

(2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology,
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

(3. Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing 100005, China)

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31570177); Foundation of State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity (No. SKLPBS1409)

*Corresponding authors: E-mail: WANG Ning-Li: wningli@vip.163.com; SONG Li-Hua: songlihua@gmail.com
ΔThese authors equally contributed to this work

Received: September 21, 2016; **Accepted:** January 13, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 17, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31570177); 病原微生物生物安全国家重点实验室自主课题(No. SKLPBS1409)

*通讯作者: E-mail: 王宁利: wningli@vip.163.com; 宋立华: songlihua@gmail.com

Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2016-09-21; 接受日期: 2017-01-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-01-17

Abstract: [Objective] To isolate and characterize ocular *Chlamydia trachomatis* from trachoma samples of Tibetan children from Qinghai province. **[Methods]** Swabs of left and right conjunctivas and conjunctival sacs were collected into one milliliter of transportation media. Fifty microliters of each sample were used to infect BGM cells by using centrifugation. Infected cells were cultured at 37 °C for 72 h, and were passaged for three successive times. Chlamydial inclusions were observed using phase microscopy. Chlamydial cultures and clinical samples were characterized by using *ompA* gene sequence analyses. **[Results]** A total of 115 samples from 45 trachoma patients were collected. 54 samples were *ompA*-PCR positive and 15 samples were culture positive. All *ompA* genes of these samples belong to genotype B, are grouped into 3 variants and have a UGT-type codon. Chlamydial isolates QH111L and QH111R were from left and right conjunctival samples of No. 111 patient, respectively, but their *ompA* genes have a nonsynonymous base difference. This single nucleotide change was only found in left conjunctiva of No. 111 patient, suggesting that QH111L may be a newly emerged *ompA* variant. **[Conclusion]** 15 ocular *Chlamydia trachomatis* strains were isolated from Tibetan children of Qinghai. All strains belong to genotype B and three different *ompA* variants. Isolates from a same patient's separate conjunctivas were found to have different *ompA* genes. Identification and characterization of these newly isolated strains will further our understanding of trachoma epidemiology and evolution.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, Trachoma, Evolution, *ompA*

沙眼是由眼型沙眼衣原体感染眼上皮组织导致的一种极古老的人类特有疾病,历史上曾严重危害国人健康。在欠发达国家和地区,沙眼是首位的可预防型致盲病因^[1]。在我国,沙眼已不再是重要的致盲因素,但沙眼仍在很多地区流行,例如甘肃、湖南、湖北、辽宁、宁夏、河北、内蒙古等地区近年来都有沙眼流行病学报道^[2-6]。在沙眼病原学领域,汤飞凡和张晓楼等在 1956 年首次报道了沙眼病原的分离培养^[7],随后十年间有 46 株衣原体在北京、广东、济南等地被分离到^[8],由于各种原因这些菌株多数已经失传。

眼型沙眼衣原体包括 A、B、Ba、C 等血清型或 *ompA* 基因型。汤飞凡的早期分离株 TE55 被称为汤氏株,为 C 型^[2,8]。北京市眼科研究所在 1991 年和 2007 年的流行病学调查发现,我国华北地区的沙眼流行株为 B 型和 C 型,二者病例数的比例约为 4:1^[2,9]。我国台湾省的流行株也限于 B 型和 C 型,代表菌株有 B/TW5 和 C/TW3^[10]。由于培养困难等原因,近 30 年来我国还没有沙眼病原的分离培养报道。我国幅员辽阔,绝大多数地区的沙眼病原还有待调查研究。

沙眼是一种有望被彻底消灭的疾病。世界卫生组织

制定了 SAFE 策略,提出了 2020 年全球消灭致盲性沙眼的目标^[11]。SAFE 策略取得了显著成绩,但由于缺乏沙眼疫苗,很多科学家认为缺乏可持续性。本研究对青海藏区 45 份活动性沙眼患者的临床样本进行了衣原体分离培养,共获得 15 株基因 B 型沙眼衣原体。*ompA* 基因序列分析发现,该地区的眼型沙眼衣原体存在微进化,共有 3 个 *ompA* 流行株,但都有 UGT (Urogenital tract,泌尿生殖道)型密码子特征。本研究对我国的沙眼防治和理解沙眼进化有重要意义。

1 材料与方法

1.1 沙眼标本采集

北京同仁医院王宁利、鲁辛辛带领医生先后于 2015 年 5 月 25 日对青海省循化县尕楞乡建设堂小学和 2015 年 12 月 31 日对尕楞乡中心小学学生进行沙眼调查及眼部采样,标本采集方法参照文献^[12]。样本采集后保存在 1 mL Copan 样本保护培养基中,至冰盒中暂存,空运至北京同仁医院实验室,样本分装后转运至军事医学科学院微生物流行病学研究所立克次体室进行沙眼衣原体分离培养。

1.2 沙眼衣原体的分离培养

在每份拟用于培养的样本中加入等体积 SPG

(0.01 mol/L 磷酸钠, 0.25 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L L-谷氨酸)缓冲液, -80°C 冻存。取 100 μL 处理后样本(相当于总样本量的 1/20)加入至 96 孔 BGM 细胞板单孔中, $800\times g$ 离心 30 min, 弃接种物, 补加 100 μL DMEM (含 1 mg/L 放线菌酮、100 mg/L 万古霉素、5 mg/L 两性霉素 B、10 mg/L 庆大霉素)^[13], 置 37°C 5% CO_2 培养箱培养 3 d, 连续传代 3 次。每代培养 48 h 后均用相差显微镜观察培养结果。

1.3 免疫荧光染色

接种 BGM 细胞至盖玻片, 感染沙眼衣原体, 感染 36 h 后用甲醇固定, PBS 洗 3 次, 加入衣原体属特异性 LPS 单抗(美国 Santa Cruz 公司), 37°C 反应 1 h, PBS 洗 3 次, 加入 Alexa488 标记的抗鼠二抗(美国 Invitrogen 公司), PBS 洗 3 次, 用 DAPI 染色 DNA, 共聚焦荧光显微镜观察成像。

1.4 基因序列分析

用蛋白酶 K 消化, 酚氯仿异戊醇抽提法纯化衣原体 DNA^[14]。用引物 5'-CGCGGATCCatgaaaaactctt gaaatcgggtattagtattt-3'和 5'-TTTTCTTTTTCGGCCG Cttagaagcgggaattgtgcatttacg-3'及 Phusion 高保真酶(NEB 公司)扩增 *ompA* 基因。*Bam*H 和 *Not* 双酶切后连接至载体 pGEX-4T-1, 转化 *Escherichia coli* DH5 α , 挑取单菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 至少测 3 个克隆。用 MEGA 7.0 软件进行序列比对和系统进化分析^[15]。进化树(Bootstrap consensus tree)的构建采用邻接法和 1 000 次 Bootstrap 检验^[16-17]。使用最大组成似然模型(Maximum composite likelihood)估算遗传距离^[18]。

1.5 统计分析

采用 Excel 2013 软件对数据进行 χ^2 检验统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 标本采集与处理

青海省循化县尕楞乡建设堂小学和尕楞乡中心小学共有 45 名学生被诊断为疑似沙眼患者(至少有一只眼有一个以上沙眼滤泡), 共采集了 115 份拭子标本(分别采集左、右眼结膜标本, 个别患者

只采单眼或将双眼采至一个样本管, 部分患者同时采集结膜囊样本, 或将左右眼结膜囊样本分别采集)。对全部样本进行 qPCR 检测质粒基因、*ompA* 序列分析和病原分离培养, 其中 qPCR 与样本的 *ompA* 测序由北京同仁医院完成, 部分结果参见文献[12]。

2.2 沙眼衣原体分离培养结果

在 BGM 细胞上, 青海沙眼衣原体菌株可以形成典型、致密的包涵体, 经衣原体属特异性单克隆免疫荧光染色后可观察到形状不规则的包涵体(图 1)。共有 15 份标本培养阳性, 将 15 株新分离沙眼衣原体分别编号为: QH111R、QH111L、QH113R、QH118L、QH118S、QH120S、QH123R、QH123S1、QH123S2、QH155R、QH155L、QH155S、QH159R、QH159L 和 QH159S。这里 QH 代表青海(Qing Hai), QH 后数字为患者编号, L 代表来自左眼上睑结膜标本, R 代表来自右眼上睑结膜标本, S 代表来自结膜囊标本。

将分离培养结果与 qPCR 检测结果进行比较。从表 1 可以看出, 115 份临床诊断为滤泡性沙眼的样本中有 54 份样本为 qPCR 阳性, 15 份样本为分离培养阳性且这些样本均为 qPCR 阳性, 分离培养

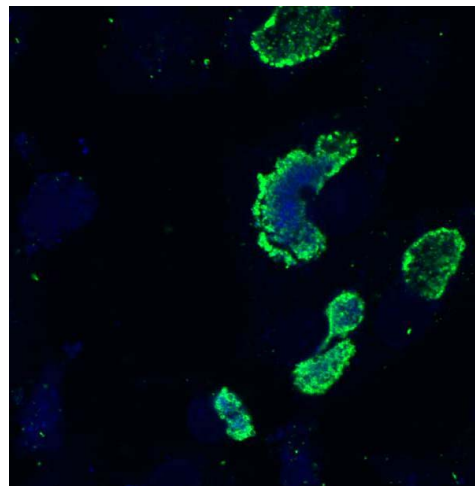


图 1 沙眼衣原体 QH111R 感染 BGM 细胞 36 h 后的免疫荧光染色结果

Figure 1 Immunofluorescence of BGM cells infected with *Chlamydia trachomatis* QH111R at 36 h post-infection

表 1 分离培养法与 qPCR 法检测沙眼衣原体的比较
Table 1 Sensitivity comparison of culture and qPCR detection of *Chlamydia trachomatis*

分离培养法检测结果 Culture results	标本数 Sample counts			合计 Total
	qPCR 检测结果: qPCR results			
	+	-		
+	15	0		15
-	39	61		100
合计 Total	54	61		115

法的检测灵敏度显著低于 qPCR ($\chi^2=19.5, P<0.01$), 这可能与实验中使用了少量样本进行分离培养有关。qPCR 结果更好地反映了样本中的菌体载量与沙眼的病程发展有关。120 份当地小学生的正常结膜拭子均为 qPCR 阴性, 说明滤泡的存在与衣原体感染直接相关($\chi^2=73.2, P<0.01$) (表 2)。但 45 份滤泡个数 ≥ 5 的标本中仅有 21 份 qPCR 阳性 (46.7%), 则说明滤泡个数与菌体载量没有必然关联($\chi^2=0.002, P=0.96$) (表 3)。以上结果也说明两种沙眼病原检测方法在临床应用中均存在较高的假阴性。

2.3 ompA 基因分析发现青海菌株分为 3 种同祖先 ompA 变异体, 均为基因 B 型

主要外膜蛋白 MOMP 与其基因 *ompA* 分别是衣原体血清型和基因型分型标志^[19]。Li 等报道了 37 份样本 *ompA* 分析的部分结果^[12]。这里, 我们对 37 份样本的 *ompA* 进行深度再分析, 发现共有 3 种

表 2 qPCR 检测结果与样本中是否有滤泡的相关性分析
Table 2 Relation analysis of qPCR results and follicle existence

眼部有无滤泡 With (+) or without (-) follicles	标本数 Sample counts			合计 Total
	qPCR 检测结果: qPCR results			
	+	-		
+	54	61		115
-	0	120		120
合计 Total	54	181		235

表 3 qPCR 检测结果与样本中滤泡个数多少的相关性分析
Table 3 Relation analysis of qPCR results and follicle count per sample

眼部滤泡个数 Follicle counts	标本数 Sample counts			合计 Total
	qPCR 检测结果: qPCR results			
	+	-		
≥ 5	21	24		45
1-4	33	37		70
合计 Total	54	61		115

ompA 序列, 其中 30 份样本的 *ompA* 序列完全相同 (选择 111R 为代表样本), 另有 6 份样本 (选 118L 为代表样本) 和 1 份样本 (111L) 的 *ompA* 与 111R 相比分别在可变区 887 位和 511 位各有一个不同的非同义碱基差异。115 份沙眼样本的背景信息、检测结果和 *ompA* 分析结果见表 4。编号 111 患者的左右眼样本 111L 和 111R 有不同的 *ompA*, 它们有一个碱基差异。与 111R 的 *ompA* 序列 (GenBank 登录号: KU737520) 相比, 111L 的 *ompA* 在 511 位发生了非同义碱基改变 (G>A)。重要的是, QH111L 和 QH111R 分离株的 *ompA* 测序结果与样本分析结果相一致, 说明 QH111L 可能是新出现的 *ompA* 突变体。

ompA 是甄别眼型与 UGT 型沙眼衣原体的标志基因。对青海菌的 *ompA* 进行系统进化分析发现, 3 种 *ompA* 与已知的 B 和 Ba 型位于同一分支 (图 2)。目前已知的 B 或 Ba 型 *ompA* 序列高度保守, 不同 B 型分离株 *ompA* 基因序列之间只有有限的 SNP 差异。将 3 种 *ompA* 序列与已有的 B 和 Ba 型 *ompA* 进行比对分析, 发现在 760 位碱基与 B 型相同。760 位是 B 和 Ba 型的甄别位点, 说明 3 种 *ompA* 均属 B 型, 而不是 Ba 型。37 份样本的 *ompA* 在可变区 271 位均为 G, 而已有 B 和 Ba 型 *ompA* 为 A。将 3 种 *ompA* 与其它型沙眼衣原体 *ompA* 进行比较, 发现 271 位的密码子 GCT 此前只存在于 LGV、F 和 G 等 UGT 型 *ompA* 中。

表4 沙眼标本的分离培养和基因检测结果
Table 4 Summary of chlamydial culture and qPCR detection

患者编号 Patient ID	性别 Gender (F/M)	年龄 Age (Y)	滤泡数目 Follicle counts		qPCR 检测结果 qPCR results			分离培养结果 Culture results		
			OD	OS	OD	OS	CS	OD	OS	CS
101	F	9	1	2	+	+	ND	-	-	ND
102	F	11	>5	>5	+	+	ND	-	-	ND
103	M	10	1	3	+	+	ND	-	-	ND
104	M	10	2	>5	+	+	ND	-	-	ND
105	F	9	4	>5	-	-	ND	-	-	ND
106	F	9	2	>5	-	+	ND	-	-	ND
107	F	8	3	4	-	-	ND	-	-	ND
108	M	8	2	4	-	-	ND	-	-	ND
109	F	8	3	2	-	-	ND	-	-	ND
110	M	12	0	2	ND	-	ND	ND	-	ND
111	M	11	>5	>5	+	+	ND	QH111R	QH111L	ND
112	M	13	5	5	+	+	ND	-	-	ND
113	M	10	5	5	+	+	ND	QH113R	-	ND
114	F	11	5	>5	-	-	ND	-	-	ND
118	F	7	3	4	+	+	+	-	QH118L	QH118S
119	F	10	5	3	+	+	+	-	-	-
120	M	8	>5	5	+	+	+	-	-	QH120S
121	M	8	1	1	-	-	+	-	-	-
122	F	7	5	5	-	-	+	-	-	-
123	M	7	5	5	+	-	+	QH123R	-	QH123S1, -S2
124	M	9	1	3	-	+	+	-	-	-
125	M	8	>5	>5	-	-	-	-	-	-
126	F	8	4	4	+	-	+	-	-	-
127	F	7	1	3	-	-	+	-	-	-
128	M	9	5	>5	-	-	-	-	-	-
129	F	10	3	1	-	-	-	-	-	-
130	M	11	1	2	-	-	-	-	-	-
131	F	9	5	>5	-	-	-	-	-	-
132	F	9	>5	4	-	-	-	-	-	-
133	M	8	>5	>5	-	-	-	-	-	-
134	M	8	2	>5	-	-	-	-	-	-
151	M	9	5	5	-	-	-	-	-	-
152	M	7	5	5	+	-	+	-	-	-
153	F	12	5	3	-	-	-	-	-	-
154	F	12	>5	>5	-	-	-	-	-	-
155	F	11	2	3	+	+	+	QH155R	QH155L	QH155S
157	F	10	1	2	-	-	-	-	-	-
158	F	8	1	1	-	-	-	-	-	-
159	M	12	5	5	+	+	+	QH159R	QH159L	QH159S
160	F	7	2	2	+	+	+	-	-	-
161	F	8	5	5	+	+	+	-	-	-
162	M	9	5	5	-	+	+	-	-	-
163	F	6	2	3	-	+	+	-	-	-
164	F	9	>5	>5	-	+	+	-	-	-
165	M	10	1	2	-	+	-	-	-	-

Note: OD: Right eye; OS: Left eye; CS: Conjunctiva sac; ND: No data; Red, blue, yellow colors, three different *ompA* variants.

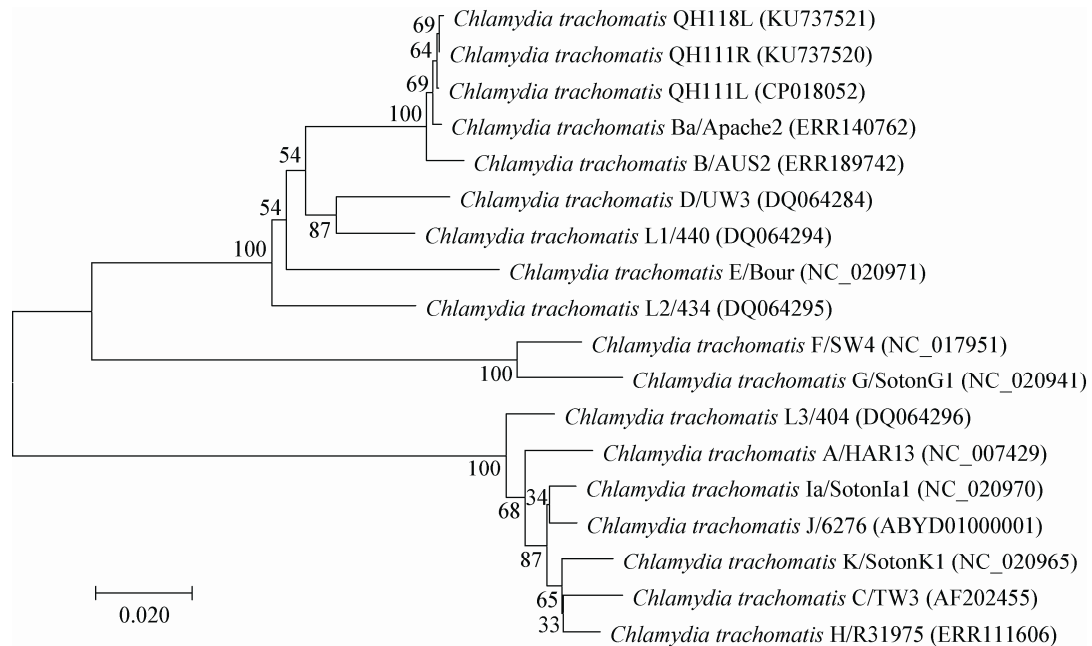


图 2 新分离青海沙眼衣原体与不同基因型沙眼衣原体 *ompA* 的系统进化关系

Figure 2 Evolutionary relationships of *ompA* genes of *Chlamydia trachomatis* strains from Qinghai and other *ompA* genovars

注: 括号内的数字为 GenBank 序列号; 节点处数字为 Bootstrap 值。

Note: Numbers in parenthesis represented GenBank accession No.; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values.

3 结论与讨论

随着生活卫生条件的不断提高, 我国的沙眼发病率已大幅下降, “十人九沙”已成为历史。人是沙眼衣原体的唯一自然宿主, 继天花、脊髓灰质炎之后, 人类有望彻底消灭沙眼甚至沙眼衣原体, 沙眼疫苗被认为是消灭沙眼最有效的工具。由于培养困难等原因, 老一辈科学家在 20 世纪培养的沙眼病原体多数没有得到有效保存。本文首次报道从青海藏区分离培养 15 株眼型沙眼衣原体, 为研究沙眼发病机制和研制沙眼疫苗奠定了基础。

当前的沙眼诊断依据是 WHO 制定的沙眼简化分级标准。衣原体分离培养是诊断沙眼的金标准方法, 但操作难度大、灵敏度低。qPCR 等分子诊断方法提高了检测的灵敏度, 但在实际应用中也存在较高的假阴性率, 这是因为病原体载量与炎症反应间的相关性差。在食蟹猴沙眼模型或人志愿者感染实验中, 当病原体检测阴性时, 滤泡等沙眼症状仍将持续数周至数月的时间^[20-21]。在个别沙眼流行

区, 沙眼病原的检测阳性率很低, 特别是那些经过大规模抗生素治疗的区域^[22]。其它病原体如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌等可能与持续的滤泡等炎症反应有关^[23]。

依据传统的 *ompA* 基因分型方法, 青海藏区的眼型沙眼衣原体均为基因 B 型。青海地区是否存在其它基因型有待调查, 很可能还有 C 型菌流行。这是因为早期的流行病学调查均表明我国的北京、河南、河北、宁夏、台湾等不同地区均同时存在 B 型和 C 型, 且均以 B 型为主^[2,9]。沙眼在亚洲广泛流行, 流行的基因型是 B 型和 C 型, B 型为优势型。最近 Sharifi-Rad 等报道了伊朗边境农村地区存在沙眼流行^[24], 但沙眼衣原体的型别不清楚。

本研究对理解沙眼衣原体的 *ompA* 微进化有特殊意义。首先, 青海沙眼流行株 *ompA* 的 UGT 型密码子提示青海菌可能有独特的进化地位。另外, 我们首次发现同一患者左右眼样本中的沙眼衣原体 *ompA* 有一个碱基差异。此前 Li 等报道了 2 种 *ompA*

突变体^[12], 在他们进行样本测序分析时, 来自同一患者的样本 111L 和 111R 的 *ompA* 有一个 SNP 差异, 由于该 SNP 仅存在于样本 111L, 被误认为是测序错误。沙眼衣原体分离株 QH111L 的 *ompA* 序列分析证实了第 3 种 *ompA* 突变体的存在。3 种青海菌 *ompA* 突变体间的差异均位于可变区, 这些变异可能与逃逸保护性体液免疫或细胞免疫有关。这与 Nunes 等报道的“MOMP 进化趋势是在特定结构域产生点突变”相一致^[25]。青海藏区相对封闭, 该地区沙眼病原的分离培养为下一步全基因组序列分析等奠定了基础, 将有助于了解我国沙眼的发生、演变和传播。

参 考 文 献

- [1] Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective[J]. Bulletin of the World Health Organization, 2001, 79(3): 214-221
- [2] Zhou YM, Wang ZQ, Sun XG. Detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in the primary school children of two districts of north China[J]. Chinese Ophthalmic Research, 2007, 25(6): 465-468 (in Chinese)
周玉梅, 王智群, 孙旭光. 我国北方两地区小学生沙眼衣原体检测及基因分型研究[J]. 眼科研究, 2007, 25(6): 465-468
- [3] Dong YS, Liu XD. Trachoma survey in Tibetan boarding middle schools in Gannanzhou, Gansu province[J]. Gansu Medical Journal, 2013, 32(4): 304-305 (in Chinese)
董永生, 刘晓东. 甘南州寄宿制藏族中学生沙眼患病率调查[J]. 甘肃医药, 2013, 32(4): 304-305
- [4] Wang XH. Trachoma survey in primary school students of Yueyang city, Hunan province[J]. Practical Preventive Medicine, 2012, 19(2): 210-211 (in Chinese)
王霞辉. 岳阳市某小学学生沙眼患病及沙眼卫生常识知晓情况调查[J]. 实用预防医学, 2012, 19(2): 210-211
- [5] Zhao Q. Investigation and analysis of prevalence of trachoma in 1654 children[J]. Journal of Baotou Medical College, 2015, 31(2): 19-20 (in Chinese)
赵婧. 1654 例儿童沙眼患病情况调查分析[J]. 包头医学院学报, 2015, 31(2): 19-20
- [6] Yu CH, Gong CR, Shen H, et al. The situation survey analysis and thinking of trachoma of boarding senior middle schools students of Shiyan[J]. Chinese Primary Health Care, 2014, 28(3): 87-88 (in Chinese)
喻成华, 龚晨睿, 沈红, 等. 十堰市某寄宿制高级中学学生沙眼发生情况调查分析及思考[J]. 中国初级卫生保健, 2014, 28(3): 87-88
- [7] Tang FF, Zhang XL, Huang YT, et al. Studies on the etiology of trachoma IV. Attempt to isolate the virus in the embryonated hens eggs[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1956, 4(2): 189-210 (in Chinese)
汤飞凡, 张晓楼, 黄元桐, 等. 沙眼病原研究 IV. 接种鸡胚, 分离病毒[J]. 微生物学报, 1956, 4(2): 189-210
- [8] Zhang XL. Research advances of trachoma[J]. Guowai Yixue Cankao Ziliao Yanhexue Fence, 1997(1): 1-6 (in Chinese)
张晓楼. 沙眼研究进展[J]. 国外医学参考资料·眼科学分册, 1977(1): 1-6
- [9] Zhang L, Zhang XL, Jin XY. *Chlamydia trachomatis* immunotypes in trachoma epidemic areas of north China[J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 1991, 27(2): 67-70 (in Chinese)
张力, 张晓楼, 金秀英. 我国华北沙眼流行区患者抗沙眼衣原体抗体的检测及其分型[J]. 中华眼科杂志, 1991, 27(2): 67-70
- [10] Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, et al. Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(9): 3879-3885
- [11] Cook JA. Eliminating blinding trachoma[J]. New England Journal of Medicine, 2008, 358(17): 1777-1779
- [12] Li X, Zhang SY, Liang QF, et al. Molecular characteristics of the *ompA* gene of serotype B *Chlamydia trachomatis* in Qinghai Tibetan primary school students[J]. Science China Life Sciences, 2016, 59(6): 561-570
- [13] Caldwell HD, Kuo CC, Kenny GE. Antigenic analysis of *Chlamydiae* by two-dimensional immunoelectrophoresis. I. Antigenic heterogeneity between *C. trachomatis* and *C. psittaci*[J]. The Journal of Immunology, 1975, 115(4): 963-968
- [14] Carlson JH, Porcella SF, McClarty G, et al. Comparative genomic analysis of *Chlamydia trachomatis* oculotropic and genitotropic strains[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(10): 6407-6418
- [15] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [17] Sanderson MJ, Wojciechowski MF. Improved bootstrap confidence limits in large-scale phylogenies, with an example from Neo-Astragalus (Leguminosae)[J]. Systematic Biology, 2000, 49(4): 671-685
- [18] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(30): 11030-11035
- [19] Li P, Duan Q, Song LH. Recent advances on chlamydial taxonomy and identification[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2014, 30(12): 1262-1266 (in Chinese)
李鹏, 端青, 宋立华. 衣原体最新分类体系与分类鉴定方法研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(12): 1262-1266
- [20] Kari L, Whitmire WM, Carlson JH, et al. Pathogenic diversity among *Chlamydia trachomatis* ocular strains in nonhuman primates is affected by subtle genomic variations[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2008, 197(3): 449-456
- [21] Ramadhani AM, Derrick T, Macleod D, et al. The relationship between active trachoma and ocular *Chlamydia trachomatis* infection before and after mass antibiotic treatment[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2016, 10(10): e0005080
- [22] Burr SE, Hart JD, Edwards T, et al. Association between ocular bacterial carriage and follicular trachoma following mass azithromycin distribution in the Gambia[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2013, 7(7): e2347
- [23] Butcher RMR, Sokana O, Jack K, et al. Low prevalence of conjunctival infection with *Chlamydia trachomatis* in a treatment-naïve trachoma-endemic region of the Solomon Islands[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2016, 10(9): e0004863
- [24] Sharifi-Rad J, Fallah F. Trachoma prevalence in rural areas of eastern Iran[J]. New Microbes and New Infections, 2016, 11: 82-83
- [25] Nunes A, Borrego MJ, Nunes B, et al. Evolutionary dynamics of *ompA*, the gene encoding the *Chlamydia trachomatis* key antigen[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(23): 7182-7192