

# 鸽源病毒多重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

安乐乐<sup>1,2</sup>, 宗保君<sup>2</sup>, 任晓婷<sup>1</sup>, 张业涛<sup>2</sup>, 赵永清<sup>1,2\*</sup>

1 西北民族大学 生物医学研究中心, 甘肃 兰州 730030

2 西北民族大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730100

安乐乐, 宗保君, 任晓婷, 张业涛, 赵永清. 鸽源病毒多重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 499-518.

AN Lele, ZONG Baojun, REN Xiaoting, ZHANG Yetao, ZHAO Yongqing. Establishment and preliminary application of a multiplex TaqMan real-time quantitative PCR assay for detection of PiAdV, PiCV, and PiHV[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 499-518.

**摘要:**【背景】鸽腺病毒(pigeon adenovirus, PiAdV)、鸽圆环病毒(pigeon circovirus, PiCV)与鸽疱疹病毒(pigeon herpesvirus, PiHV)是严重危害鸽群健康的主要病原体, 常导致混合感染, 给临床鉴别诊断带来困难。【目的】建立一种可用于同步检测 PiAdV、PiCV 和 PiHV 的三重 TaqMan 荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)方法。【方法】通过查找 GenBank 发布的 PiAdV、PiCV 和 PiHV 基因组并加以比对获取其基因保守区域, 在保守区域设计引物、探针和制备质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiAdV II、pMD19-T-PiCV 及 pMD19-T-PiHV; 经反应体系优化, 标准曲线绘制, 评价方法的特异性、敏感性和重复性, 建立可同步检测 PiAdV、PiCV 和 PiHV 的三重 TaqMan RT-qPCR 方法; 使用该方法进行临床样本检测以评估其临床适用性。【结果】该 PiAdV、PiCV 和 PiHV 的三重 TaqMan RT-qPCR 方法标准曲线为  $y=-3.396x+43.210$  ( $R^2=0.9983$ )、 $y=-3.540x+40.540$  ( $R^2=0.9994$ )和  $y=-3.280x+38.470$  ( $R^2=0.9984$ ), 线性关系良好; 与鸽痘病毒、鸽轮状病毒等鸽子其他常见病原及禽腺病毒 4 型无交叉反应, 特异性强; 在敏感性方面, 该方法的最低检出限分别为 10 copies/ $\mu$ L、10 copies/ $\mu$ L 和 1 copy/ $\mu$ L, 敏感度是常规 PCR 方法的 100-1 000 倍, 敏感性高; 批内、批间重复性试验的变异系数均小于 2.0%, 重复性和稳定性良好。使用建立的 PiAdV、PiCV 和 PiHV 的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法对 152 份鸽子临床样本进行检测, RT-qPCR 阳性检出率(PiAdV 55.92%、PiCV 51.32%、PiHV 40.13%)略高于常规 PCR 方法, 具有良好的临床适用性。【结论】本

资助项目: 甘肃省自然科学基金(21JR1RA221); 兰州市科技计划(2023-1-31); 中央高校基本科研业务费专项基金(31920220050)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (21JR1RA221), the Lanzhou Science and Technology Program (2023-1-31), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (31920220050).

\*Corresponding author. E-mail: 450883800@qq.com

Received: 2025-04-27; Accepted: 2025-05-26; Published online: 2025-06-19

研究建立的 PiAdV、PiCV 和 PiHV 的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法标准曲线的线性关系良好、特异性强、敏感性高、重复性良好,可快速、高效、特异检测临床样本中的 PiAdV、PiCV 和 PiHV,为 PiAdV、PiCV 和 PiHV 早期诊断、协同致病机制研究和流行病学调查提供一种高效的技术手段。  
关键词: 鸽腺病毒; 鸽圆环病毒; 鸽疱疹病毒; 多重 TaqMan RT-qPCR; 早期诊断; 流行病学调查

## Establishment and preliminary application of a multiplex TaqMan real-time quantitative PCR assay for detection of PiAdV, PiCV, and PiHV

AN Lele<sup>1,2</sup>, ZONG Baojun<sup>2</sup>, REN Xiaoting<sup>1</sup>, ZHANG Yetao<sup>2</sup>, ZHAO Yongqing<sup>1,2\*</sup>

1 Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, Gansu, China

2 School of Life Sciences and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730100, Gansu, China

**Abstract:** [Background] Pigeon adenovirus (PiAdV), pigeon circovirus (PiCV), and pigeon herpesvirus (PiHV) are major pathogens that seriously jeopardize the health of pigeon flocks and often lead to coinfections, posing challenges for clinical differential diagnosis. [Objective] To establish a triplex TaqMan fluorescent quantitative PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) method for the simultaneous detection of PiAdV, PiCV, and PiHV. [Methods] We obtained the conserved regions by searching and comparing the genomes of PiAdV, PiCV, and PiHV published in GenBank. Primers and probes were designed based on the conserved region, and plasmid standards pMD19-T-PiAdV I, pMD19-T-PiAdV II, pMD19-T-PiCV, and pMD19-T-PiHV were prepared. The reaction systems were optimized and the standard curves were drawn to evaluate the specificity, sensitivity, and repeatability of the established assay. A triplex TaqMan RT-qPCR assay for simultaneous detection of PiAdV, PiCV, and PiHV was thus established. It was then used to test the clinical samples, and its clinical applicability was established. [Results] The standard curves of the triple TaqMan RT-qPCR assay for PiAdV, PiCV, and PiHV were  $y = -3.396x + 43.210$  ( $R^2 = 0.9983$ ),  $y = -3.540x + 40.540$  ( $R^2 = 0.9994$ ), and  $y = -3.280x + 38.470$  ( $R^2 = 0.9984$ ), respectively, showing good linear relationships. The assay showed no cross-reaction with other common pigeon pathogens such as pigeon pox virus and pigeon rotavirus, as well as fowl adenovirus type 4, showcasing strong specificity. For PiAdV, PiCV, and PiHV, the assay showed the minimum detection limits of 10 copies/ $\mu\text{L}$ , 10 copies/ $\mu\text{L}$ , and 1 copy/ $\mu\text{L}$ , respectively, which are 100 to 1 000 times more sensitive than the conventional PCR method, indicating high sensitivity. The coefficient of variation was less than 2.0% in both intra-batch and inter-batch repeatability tests, demonstrating good repeatability and stability. The established triple TaqMan RT-qPCR assay for PiAdV, PiCV, and PiHV was used to detect 152 pigeon clinical samples and showed slightly higher positive rates (PiAdV 55.92%, PiCV 51.32%, and PiHV 40.13%) than the conventional PCR method, demonstrating good clinical applicability. [Conclusion] The established triple TaqMan RT-qPCR assay for the detection of PiAdV, PiCV, and PiHV has good linear relationships and high specificity, sensitivity, and

repeatability. It can be used for rapid, efficient, and specific detection of PiAdV, PiCV, and PiHV in clinical samples, serving as an efficient technical method for early diagnosis of the three viruses as well as for the study of synergistic pathogenic mechanism and epidemiological investigation.

**Keywords:** pigeon adenovirus; pigeon circovirus; pigeon herpesvirus; multiplex TaqMan RT-qPCR; early diagnosis; an epidemiological survey

近年来,肉鸽集约化养殖模式和赛鸽跨区域频繁流动需求,使得鸽病的防控面临了前所未有的挑战。尤其是鸽腺病毒、鸽圆环病毒和鸽疱疹病毒的混合感染问题,其广泛流行的严峻性日益凸显,给鸽业养殖造成了巨大的经济损失和疫病传播风险。此外,对于新出现或未知的病毒变种,现有检测方法也需要不断更新以应对新的挑战。因此,建立一种高通量、高敏感度和多重检测病原体的检测方法对于混合感染鸽是至关重要的。鸽腺病毒(pigeon adenovirus, PiAdV)为单股负链 DNA 病毒,属于腺病毒科(Adenoviridae)禽腺病毒属(Aviadenovirus)<sup>[1-2]</sup>。以临床症状为差异将 PiAdV 分为 PiAdV I型(经典腺病毒)和 PiAdV II型(坏死性肝炎)。PiAdV I型易对鸽子呼吸道和消化系统造成严重影响,引起鸽子出现呼吸困难、食欲减退、呕吐和下痢等临床症状<sup>[3]</sup>。PiAdV II的感染不限于特定的年龄阶段,对任何年龄阶段鸽子均具有感染能力,以急性死亡和广泛性肝损伤为特征。此外, PiAdV 快速传播特性致使短时间内感染整个鸽群<sup>[4]</sup>,增加疫情防控难度。鸽圆环病毒(pigeon circovirus, PiCV)为单股环状 DNA 病毒,无囊膜<sup>[5]</sup>,在电镜下可观察到一群规则的小多面体粒子,结构呈二十面体对称。该病毒属于圆环病毒科(Circoviridae)圆环病毒属(Circovirus)。PiCV 基因组大小约为 2 kb,含有 V1、C1、C2、5'IGR、3'IGR 5 个开放阅读框(open reading frame, ORF)<sup>[6]</sup>,这些 ORF 负责编码病毒复制和组装需要的多个蛋白质。其中, V1 和 C1 分别编码复制蛋白(Rep)、衣壳蛋白(Cap), Rep 负责病毒 DNA 的复制,而 Cap 则构成了病毒粒子的外层结构,有助于病毒进行组装和释

放<sup>[7]</sup>。PiCV 主要侵入鸽体破坏免疫系统引发免疫抑制,致使沙门氏菌(*Salmonella*)等多种条件致病病原体继发感染<sup>[8]</sup>,引起鸽子出现呼吸道问题、厌食、腹泻和生长迟缓等一系列与其他禽类疾病相似的临床症状。另外, PiCV 侵染鸽子时大多数呈现阴性感染,无任何临床症状<sup>[9]</sup>。此外,该病毒具有一定的宿主范围广泛性、垂直传播的可能性。鸽疱疹病毒(pigeon herpesvirus, PiHV)又称哥伦比亚疱疹病毒 I 型(Colombian herpesvirus type 1, CoHV-1),是一类线性双股 DNA 病毒,属于禽疱疹病毒科  $\alpha$ -疱疹病毒亚科马立克氏病毒属<sup>[10]</sup>。PiHV 与其他的疱疹病毒一样,具有高度的传染性和一定的潜伏性。该病毒侵染鸽子后可能不会立刻出现明显临床症状,但其将在鸽子体内潜伏,在一定条件下重新激活,导致疾病的再次发生<sup>[11]</sup>。

PiAdV、PiCV 和 PiHV 是严重威胁鸽类健康的主要病原体,常常引发宿主混合感染并导致免疫抑制、肝炎及呼吸道等症状<sup>[12]</sup>,严重影响鸽子的健康和制约养殖业的发展。目前,现有检测技术存在一定的局限性。例如,采用传统病理学方法观察组织切片的特征性包涵体来进行 PiCV 感染诊断时,而 PiAdV 和 PiHV 感染也可能引起相似包涵体的特性<sup>[13]</sup>,导致检测结果不可靠。传统 PCR 方法虽提高了检测敏感度,但其存在检测周期长、操作烦琐和无法定量评估病毒载量等问题<sup>[14]</sup>。此外,对于鸽腺病毒、鸽圆环病毒和鸽疱疹病毒的混合感染而言,目前尚未建立起有效的多重 RT-qPCR 检测方法。因此,以临床快速诊断与精准防控需求为导向,聚焦于建立一种鸽源病毒三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法是十分必要的。

本研究以 PiAdV Hexon 基因、PiCV Cap 基因及 PiHV DNA 聚合酶基因保守区域为靶基因,设计特异性检测引物与多荧光标记探针(FAM、HEX、CY5),优化反应条件并绘制标准曲线,实现单管同步检测与定量分析目的,旨在建立一种高通量、高敏感性和快速检测的鸽源病毒多重 TaqMan RT-qPCR 检测方法,为快速诊断 PiAdV、PiCV、PiHV 提供有力支持,为后续疫苗研发和防治策略提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒株和临床样本

鸽腺病毒(PiAdV I IDA4, PiAdV CH/BJ/1/2022)、鸽圆环病毒(Fa3/Beijing/2021, zj2)、鸽疱疹病毒(PiHV, BJ)、鸽痘病毒(pigeon pox virus, PPV)、鸽轮状病毒(pigeon rotavirus, PiRV)、鸽细环病毒(pigeon torque teno virus, PTTV)和禽腺病毒 4 型(fowl adenovirus 4, FAdV-4)等病料样本,实验室保存。PiAdV II 基因片段(YPDS-Y-V1.A19.11-2013, 登录号: NC\_031503.1, 基因 19 848–20 228, 长度为 381 bp)、pUC57-PiAdV (CH/GS/1/2023, 登录号: PP495499.1, 目的基因 87–604, 长度为 518 bp), 生工生物工程(上海)股份有限公司合成。分别从河北、北京和天津 3 个地区采集鸽子脾脏、肝脏、肠道内容物等病料样本共 152 份,经冷链

方式运输至实验室,−80 °C 冻存。所有动物实验经西北民族大学生命科学与工程学院动物伦理委员会批准(xbmu-sm-2024104)。

### 1.2 主要试剂和仪器

*Pro Taq* HS 预混型探针法 RT-qPCR 试剂盒 II, 湖南艾科瑞生物工程有限公司; 90 mm 培养皿、DEPC 水、50×TAE 缓冲液, 北京索莱宝科技有限公司; 2×*Taq* Plus Master Mix II (Dye Plus)、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper), 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; pMD19-T 载体, 宝日医生物技术(北京)有限公司; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 化学感受态细胞, 生工生物工程(上海)股份有限公司; AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒, 上海百赛生物技术股份有限公司; DL5000 DNA marker 和 DL2000 DNA marker, 上海睿安生物科技有限公司。

PCR 扩增仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; 实时定量 PCR 检测系统, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 全波长酶标仪, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.3 引物、探针设计

在 NCBI 网站 GenBank 上下载已发布的 PiAdV I 型、PiAdV II 型、PiCV 和 PiHV 不同基因型基因序列(表 1), 利用 DNASTar 软件对基因

表 1 用于引物设计、TaqMan 探针的基因组毒株信息

Table 1 Genomic strain information for primer design and TaqMan probes

Virus	GenBank accession number	Strain	Country/Region	Host
PiAdV I	FN824512.2	IDA4	Netherlands	Pigeon
PiAdV I	MW286325.1	P18-05523-6	Australia	Pigeon
PiAdV I	NC_024474.1	IDA4	Netherlands	Pigeon
PiAdV I	OQ576013.1	CH/HB/1/2022	China	Pigeon
PiAdV I	OR822284.1	PiAdV-1	China	Pigeon
PiAdV I	PP495499.1	CH/GS/1/2023	China	Pigeon
PiAdV I	OQ576011.1	CH/XJ/1/2022	China	Pigeon
PiAdV I	PP488439.1	CHSD	China	Pigeon
PiAdV I	PP495496.1	CH/Shaanxi/1/2023	China	Pigeon
PiAdV I	PP495497.1	CH/SX/1/2023	China	Pigeon

(待续)

(续表 1)

Virus	GenBank accession number	Strain	Country/Region	Host
PiAdV I	PP495498.1	CH/NMG/1/2023	China	Pigeon
PiAdV I	PP495491.1	CH/BJ/1/2022	China	Pigeon
PiAdV II	NC_031503.1	YPDS-Y-V1.A19.11-2013	Germany	Pigeon
PiAdV II	KX673408.1	M144	Hungary	Pigeon
PiAdV II	PP999622.1	PL_pigeon_63/2023	Poland	Pigeon
PiAdV II	PP999623.2	PL_pigeon_4a/2023	Poland	Pigeon
PiAdV II	MF576429.1	PAV/FJ2017	China	Pigeon
PiCV	NC_002361.1	CoCV	Germany	Pigeon
PiCV	OQ184742.1	WQ4/SN/2022	China	Pigeon
PiCV	OR801883.1	BI_2b_C3	Poland	Pigeon
PiCV	MF664481.1	POA-MA2/2016	Brazil	Pigeon
PiCV	OR999200.1	SI_1a_C5	Poland	Pigeon
PiCV	JX901125.1	98-324/1998	Belgium	Pigeon
PiCV	OQ715331.1	Hebei/TS-YZ2/2023	China	Pigeon
PiCV	OL901206.1	Hebei/TS/2021	China	Pigeon
PiCV	DQ915960.1	Fra A40042	Britain	Pigeon
PiCV	OR800318.1	PLK-2023	Thailand	Pigeon
PiCV	PP405066.1	GS-DN2023-1-3	China	Pigeon
PiCV	PP405068.1	HB-DN2023-4-1	China	Pigeon
PiCV	MF136691.1	P15/AUS	Australia	Pigeon
PiCV	PP405070.1	SX-DN2023-6-1	China	Pigeon
PiCV	PP405071.1	SX-DN2023-6-2	China	Pigeon
PiCV	PP556374.1	PiCV-LY8	China	Pigeon
PiCV	MZ447864.1	Senegal_Dove-CS19-1715	Australia	Pigeon
PiCV	PP663502.1	CDVUM-2022-28072747	Canada	Pigeon
PiCV	PQ346905.1	Hebei/TS-3/2024	China	Pigeon
PiCV	PQ902090.1	FVS_CV_060924_64	India	Pigeon
PiHV	AF141890.1	KP 21/23	Germany	Pigeon
PiHV	KC544263.1	BJ	China	Pigeon
PiHV	KJ995972.1	BJ	China	Pigeon
PiHV	KX589235.1	HLJ	China	Pigeon
TAdV 5	KF477314.1	D1648	Austria	Türkiye
FAdV D	PP471938.1	D2342/2/5/13/US	USA	Chicken
FAdV 2	KT862805.1	685	Britain	Chicken
FAdV 4	PP070411.1	PK-1-SBL2021	Pakistan	Chicken
FAdV E	PQ117788.1	LN/2021	China	Chicken
FAdV 8	PP537790.1	HD2402	China	Chicken
GAdV	PP331815.1	XZ11	China	Anser indicus
FAdV 7	KY364398.1	SD15-21	China	Chicken
OAdV	LC638697.1	Owl adenovirus	Japan	Eagle owl
FAdV A	OP985634.1	D4622/2/19/HU	Hungary	Chicken

序列进行对比分析并获取基因保守区域。遵循荧光定量 PCR 引物和 TaqMan 探针设计的一般原则及国际兼并碱基 IUB 标准,在 PiAdV Hexon 基因、PiCV Cap 基因及 PiHV DNA 聚合酶基因保守区域中设计高通量性、特异性的 RT-qPCR 检测引物及探针(表 2)。引物、探针交由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

#### 1.4 病料样本核酸的提取

PiAdV、PiCV、PiHV、PPV、PiRV、PTTV、FAdV-4 和 152 份临床样品进行核酸提取。取小部分病料组织于研钵中,加入液氮缓慢研磨,然后加入 500  $\mu$ L PBS 溶液收集于 1.5 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,取 200  $\mu$ L 上清液按照 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒说明书提取病毒基因组的 DNA 和 RNA,其中 PiRV 基因组 RNA 经 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒处理后获取反转录产物 cDNA。DNA 和 cDNA 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1.5 质粒标准品的制备与鉴定

以 PiAdV I 型、PiCV、PiHV 的基因组 DNA 和合成的 PiAdV II 型基因组 DNA 为模板,使用特异性引物(PiAdV I-F/PiAdV I-R、PiAdV II-F/PiAdV II-R、PiCV-F/PiCV-R、PiHV-F/PiHV-R)进行 PCR 扩增目的基因。反应体系:  $2\times$ Taq Plus Master Mix II (Dye Plus) 25  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ L, DNA (15 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  3 min;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $56^{\circ}\text{C}$  20 s,  $72^{\circ}\text{C}$  2 min 10 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  5 min。使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒对目的基因进行回收和纯化。将回收的目的基因片段连接至 pMD19-T 载体,将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  化学感受态细胞,  $37^{\circ}\text{C}$  平板培养<sup>[15-16]</sup>。挑取单克隆菌斑进行抗性(氨苄青霉素 100 mg/mL, 在摇菌时按照 1:1 000 加入培养基中)扩大培养,对阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定,将阳性菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。同时,使用 SanPrep 柱

表 2 引物、探针序列信息

Table 2 Primer and probe sequence information

Name	Sequence (5'→3')	Product/length (bp)	Target gene
PiAdV I-F	CCACCGGCAGCTACTTCGAG	2 066	Hexon
PiAdV I-R	GGGACTCCGCTTGATTTCGAACAC		
PiAdV II-F	GGCTGCAAATCAGATTCTACCCT	381	Hexon
PiAdV II-R	ATGTCGCAAAGTTAGCTTCGG		
PiAdV-qF	CCGCCRTARGGTTTGAAGGA	101	Hexon
PiAdV-qR	AGCATCAAYGTSGGMGACAG		
PiAdV-qP	CY5-CCGCGRTCYAGSACGCCCTTGAT-BHQ2		
PiCV-F	CACTCTGAACAACCCGACTGAGG	1 843	Cap+Rep
PiCV-R	TCACGCCACTTCGTAGGTCATGC		
PiCV-qF	GTCTCGCGTGATAATMGTGACC	123	Cap
PiCV-qR	AACTTGTCRTGRITTCAGACC		
PiCV-qP	FAM-CCGCCGGAARAGCGCCTGGAC-BHQ1		
PiHV-F	AACTTCTGCCAAACCGTCACCA	1 627	DNA polymerase
PiHV-R	TGACCACCCACAGAACCCGTA		
PiHV-qF	GATTACAAGCTGCTGTGTTTCGAT	119	DNA polymerase
PiHV-qR	GAGTACAGCAGACACGATATTTGG		
PiHV-qP	HEX-ACGCCAGCTCGTTGTGCCCGCTA-BHQ1		

式质粒 DNA 小量抽提试剂盒对阳性菌液进行质粒提取, 并将阳性质粒分别命名为 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiAdV II、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV。采用全波长酶标仪测定阳性重组质粒浓度, 每个重组质粒 4 次重复, 并将阳性重组质粒作为质粒标准品和后续实验的阳性模板, 于-20 °C 保存备用。按公式(1) 计算质粒拷贝数。

$$\text{拷贝数} = \text{质粒浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / \text{重组质粒总长度}(\text{bp}) \times 660 \quad (1)$$

### 1.6 引物、探针间的交叉反应试验

以质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 为反应模板。反应体系: 2×*Pro Taq* HS Probe Premix II 10 μL, qF/qR (10 μmol/L) 各 0.8 μL, qP (10 μmol/L) 0.4 μL, 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 次循环, 荧光通道设置为 FAM、HEX、CY5。在 PiAdV、PiCV、PiHV 三重 TaqMan RT-qPCR 扩增体系中分别单一加入 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV; 在扩增体系中分别加入 2 种质粒混合液, 混合液如下: pMD19-T-PiAdV I 和 pMD19-T-PiCV、pMD19-T-PiAdV I 和 pMD19-T-PiHV、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV; 在扩增体系中加入 3 种质粒混合液(pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV) 进行反应, 验证不同病毒的引物、探针与模板之间是否存在交叉反应及扩增干扰, 以此评估 PiAdV、PiCV、PiHV 三重 TaqMan RT-qPCR 反应体系中引物、探针的扩增反应适用性。

### 1.7 反应体系优化

以 1 μL 质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 为反应模板, 对引物终浓度、探针终浓度进行反应体系优化。首先以探针 200 nmol/L 为初始终浓度进行引物终浓度优化, 后采用较佳引物终浓度进行探针终浓度优化。引物添加浓度设置为 100–450 nmol/L, 探针添加浓度设置为 50–400 nmol/L, 总反应体

系为 20 μL。通过扩增反应综合考量各种参数( $C_t$  值、扩增曲线和荧光强度等)确定三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的引物、探针最佳终浓度。反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 次循环, 荧光通道设置为 FAM、HEX、CY5, 将此反应条件应用于后续所有实验。

### 1.8 标准曲线的绘制

将质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 进行稀释, 将其拷贝数浓度调整为  $1.0 \times 10^{10}$  copies/μL, 后进行 10 倍比稀释( $1.0 \times 10^{10}$ – $1.0 \times 10^0$  copies/μL)。分别以 1 μL 不同浓度( $10^8$ – $10^2$  copies/μL)的质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 为模板进行 RT-qPCR 扩增, 每个质粒拷贝数浓度 3 次重复试验并设置阴性对照, 通过三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的扩增反应  $C_t$  平均值与相对应质粒拷贝浓度对数值之间的关系, 绘制标准曲线。

### 1.9 特异性试验

以 PiAdV I、PiCV、PiHV、PPV、PiRV、PTTV 和 FAdV-4 基因组作为反应模板, 同时以去离子水作为模板设置阴性对照, 使用上述优化后的最佳反应条件进行三重 TaqMan RT-qPCR 扩增, 通过特异性扩增曲线及荧光信号评价三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的特异性。

### 1.10 敏感性试验

以 1 μL 质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 不同拷贝数浓度( $10^8$ – $10^0$  copies/μL)作为反应模板, 同时以去离子水作为模板设置阴性对照, 使用上述优化后的最佳反应条件进行三重 TaqMan RT-qPCR 扩增。同时, 使用常规 PCR 方法进行不同拷贝数质粒标准品扩增, 以去离子水设置阴性对照。常规 PCR 反应体系: 2×*Taq Plus* Master Mix II (Dye Plus) 10 μL, qF/qR (PiAdV、PiCV、PiHV, 10 μmol/L) 各 0.5 μL, 质粒 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。通

过比较三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法 with 常规 PCR 检测方法的最低检测下限, 评估所建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的敏感性。此外, 对建立的 RT-qPCR 检测方法进行 25 次最低浓度的重复检测, 将可稳定检出率  $\geq 95\%$  的最低浓度定为该检测方法的最低检测限。阴阳性判定标准: 当扩增曲线  $C_t$  值  $\leq 40$  时, 样本检测结果判定为阳性; 当扩增曲线无  $C_t$  值时, 样本检测结果判定为阴性; 当扩增曲线  $C_t$  值处于 40–45 时, 判定为疑似样本, 重测结果仍有  $C_t$  值时判定为阳性。

### 1.11 包容性试验

采用建立的三重 TaqMan RT-qPCR 方法分别对 PiAdV I、PiAdV II、PiCV 和 PiHV 不同来源毒株核酸进行检测, 同时设置阴性对照。通过对这 7 种不同来源毒株核酸进行 RT-qPCR 检测来验证该建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的包容性。

### 1.12 抗干扰性试验

选取质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 高浓度拷贝数 ( $1.0 \times 10^8$  copies/ $\mu$ L) 和低浓度拷贝数 ( $1.0 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L) 作为反应模板, 设置不同浓度组别(表 3)进行三重 TaqMan RT-qPCR 扩增, 以此验证高拷贝数浓度样本和低拷贝数浓度样本之间的相互影响关系, 排除不同病毒模板浓度差异带来的相互干扰可能性。

表 3 三重 TaqMan RT-qPCR 方法的抗干扰性试验组别

Table 3 Anti-interference test groups of the triple TaqMan RT-qPCR method

Group	pMD19-T-PiAdV I (copies/ $\mu$ L)	pMD19-T-PiCV (copies/ $\mu$ L)	pMD19-T-PiHV (copies/ $\mu$ L)
1	$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$
2	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^2$
3	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^8$
4	$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^2$
5	$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^8$
6	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8$

### 1.13 重复性试验

以 3 种质粒标准品(pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV)作为反应模板, 每个模板均设置 3 个拷贝数浓度梯度 ( $1.0 \times 10^8$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L), 同时以去离子水作为模板设置阴性对照, 使用上述优化后的最佳反应条件进行三重 TaqMan RT-qPCR 扩增, 对建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法进行重复性验证, 设置每个质粒拷贝数进行批内重复试验(同一时间), 批间重复试验(不同时间和不同批次 RT-qPCR 酶预混体系)各 3 次。计算批内重复试验和批间重复试验  $C_t$  值变异系数, 评价三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的重复性和稳定性。

### 1.14 临床样本检测

使用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒提取 152 份病鸽临床样本的基因组 DNA 作为反应模板, 同时以去离子水作为阴性对照, 使用上述优化后的最佳反应条件进行三重 TaqMan RT-qPCR 扩增, 同时用 1.10 中常规 PCR 方法对 152 份病鸽临床样本的基因组 DNA 进行检测, 以此说明建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的临床适用性。参照中华人民共和国行业标准《定性测定性能评价指南》(WS/T505—2017) ([https://www.nhc.gov.cn/wjw/s9492/201710/057f0376b9ed473fb3bd39c70318ad3a/files/1739781587787\\_51482.pdf](https://www.nhc.gov.cn/wjw/s9492/201710/057f0376b9ed473fb3bd39c70318ad3a/files/1739781587787_51482.pdf)) 中的方法分析临床样本检测结果数据, 参考文献[17]计算 RT-qPCR 方法与常规 PCR 方法的阳性符合率、阴性符合率及总符合率。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒标准品制备结果

以 PiAdV I、PiAdV II、PiCV 和 PiHV 基因组 DNA 为模板, 用设计合成的引物 PiAdV I-F/R、PiAdV II-F/R、PiCV-F/R 和 PiHV-F/R 进行常规 PCR 扩增, 获得目的基因。将 PCR 扩增产物目的基因进行胶回收、纯化, 连接至 pMD19-T 克隆载体转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  化学感受态细胞中, 挑取单克隆菌斑于 37 °C 过夜进行氨苄青霉

素抗性扩大培养。菌液 PCR 鉴定结果(图 1)与目的基因一致,结果证明重组质粒 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiAdV II、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 构建成功。使用全波长酶标仪测定重组质粒浓度,利用公式(1)计算重组质粒 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiAdV II、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 理论拷贝数分别为  $5.7 \times 10^{10}$ 、 $4.2 \times 10^{10}$ 、 $5.6 \times 10^{10}$ 、 $5.8 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

## 2.2 交叉反应试验结果

将不同病毒引物、探针混入同一反应体系中,以单一质粒标准品、2个质粒标准品及3个质粒标准品分别加入反应体系中,验证引物、探针间的相互影响。结果显示,在三重 TaqMan RT-qPCR 反应体系中,单一质粒标准品各自出现特异性荧光信号 FAM (pMD19-T-PiCV)、HEX (pMD19-T-PiHV)、CY5 (pMD19-T-PiAdV I) (图 2A-2C); 2个质粒标准品(图 2D-2F)和3个质粒标准品(图 2G)时荧光信号之间无相互影响现象。由此可见,本研究在建立 PiAdV、PiCV、PiHV 三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法中设计的不同病毒引物、探针序列相互之间无交叉反应情况,在不同病毒基因组模板存在的体系扩增反应时,均可特异性呈现不同的荧光信号,引物、探针序列具有较强特异性识别目的基因的特性。

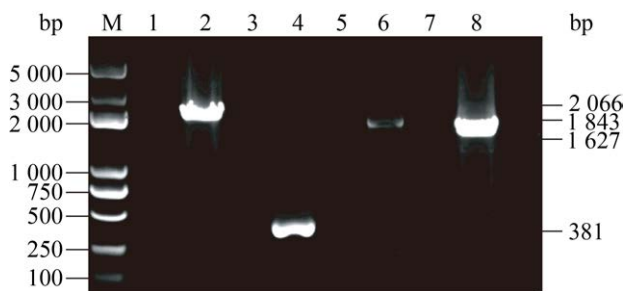


图 1 重组质粒的菌液 PCR 鉴定

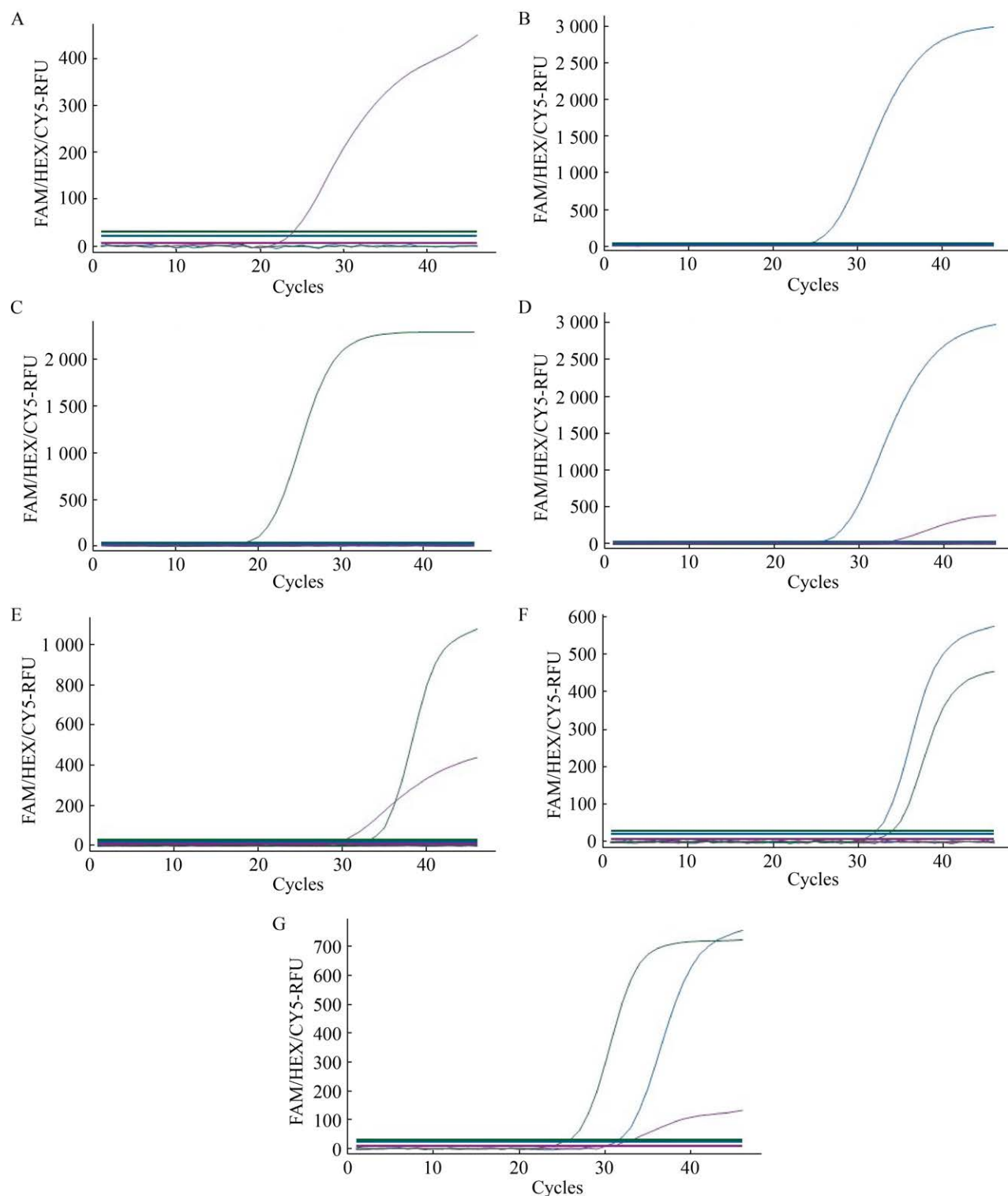
Figure 1 PCR identification of the bacterial liquid of the recombinant plasmid. M: DL5000 DNA marker; 2: pMD19-T-PiAdV I; 4: pMD19-T-PiAdV II; 6: pMD19-T-PiCV; 8: pMD19-T-PiHV; 1, 3, 5, 7: Negative control.

## 2.3 反应体系优化结果

通过方阵法对引物、探针终浓度进行条件优化(引物、探针浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ ),综合考量各实验数据参数最终确定三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法反应条件。首先以探针终浓度为  $200 \text{ nmol/L}$  进行引物终浓度优化,引物在 PiAdV ( $250 \text{ nmol/L}$ ) (图 3A)、PiCV ( $250 \text{ nmol/L}$ ) (图 3B)、PiHV ( $350 \text{ nmol/L}$ ) (图 3C)时  $C_t$  值低,荧光强度高,引物浓度为最佳(图 3D)。其次以最佳引物浓度为基础进行探针终浓度优化,如图 4 所示,探针在 PiAdV ( $250 \text{ nmol/L}$ ) (图 4A)、PiCV ( $200 \text{ nmol/L}$ ) (图 4B)、PiHV ( $250 \text{ nmol/L}$ ) (图 4C)时  $C_t$  值低,荧光强度高,探针浓度为最佳(图 4D)。因此,最佳反应体系为:  $2 \times \text{Pro Taq HS Probe Premix II } 10 \mu\text{L}$ , PiAdV-qF/qR ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 各  $0.5 \mu\text{L}$  和 PiAdV-qP ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , PiCV-qF/qR ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 各  $0.5 \mu\text{L}$  和 PiCV-qP ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.4 \mu\text{L}$ , PiHV-qF/qR ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 各  $0.7 \mu\text{L}$  和 PiHV-qP ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , 模板  $1 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足  $20 \mu\text{L}$ 。反应程序:  $95 \text{ }^\circ\text{C } 2 \text{ min}$ ;  $95 \text{ }^\circ\text{C } 5 \text{ s}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C } 30 \text{ s}$ , 45 次循环(图 3、图 4)。荧光信号设置为 FAM (PiCV)、HEX (PiHV)、CY5 (PiAdV)。

## 2.4 标准曲线的建立结果

将经过 10 倍倍比稀释的质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 采用建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法反应,由此确立重组质粒拷贝数的对数值与  $C_t$  平均值的相关线性关系。采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制 PiAdV、PiCV、PiHV 的标准曲线, PiAdV 标准曲线为  $y = -3.396x + 43.210$ , 相关系数  $R^2$  为 0.998 3, 扩增效率  $E$  为 97.00%; PiCV 标准曲线为  $y = -3.540x + 40.540$ , 相关系数  $R^2$  为 0.999 4, 扩增效率  $E$  为 91.64%; PiHV 标准曲线为  $y = -3.280x + 38.470$ , 相关系数  $R^2$  为 0.998 4, 扩增效率  $E$  为 101.78% (图 5)。表明该三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的标准曲线



**图 2** 引物、探针间的交叉反应试验 A-C: 单一质粒标准品; D-F: 2个质粒标准品; G: 3个质粒标准品。FAM: 蓝色; HEX: 绿色; CY5: 紫色。

Figure 2 Cross-reaction test between primers and probes. A-C: Single plasmid standard; D-F: Double plasmid standards; G: Three plasmid standards. FAM: Blue; HEX: Green; CY5: Purple.

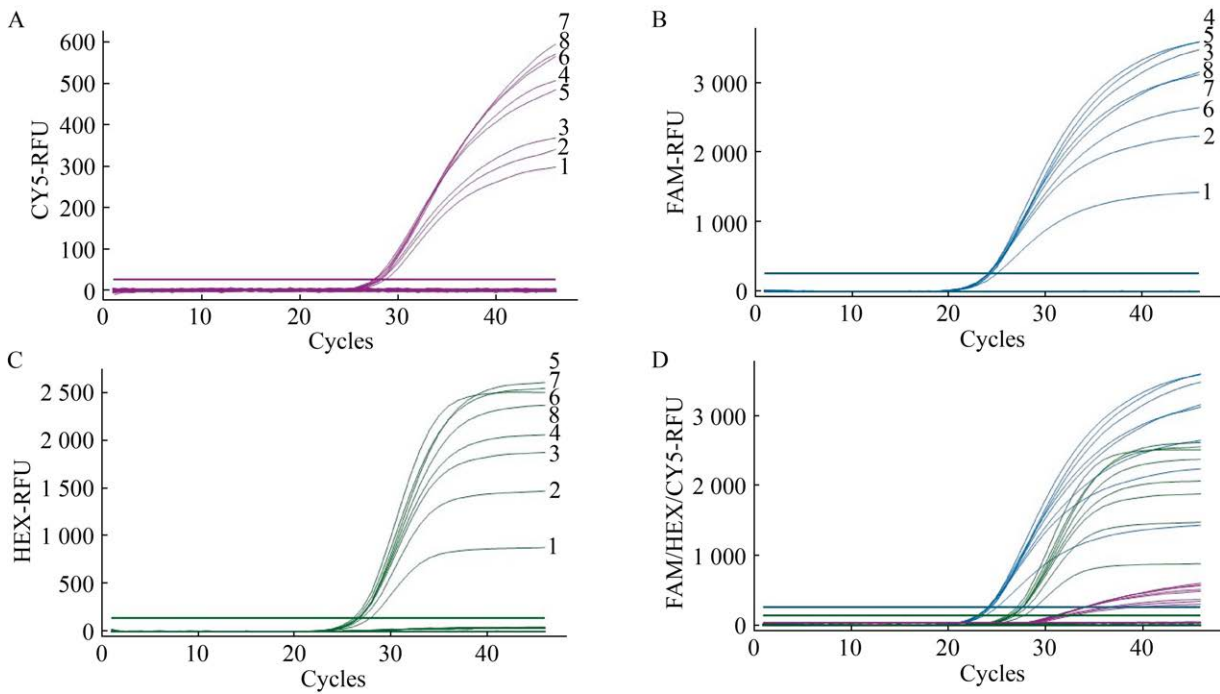


图 3 引物终浓度条件优化试验

Figure 3 Primer final concentration condition optimization assay. A: CY5; B: FAM; C: HEX; D: FAM/HEX/CY5. 1–8: 100–450 nmol/L; FAM: Blue; HEX: Green; CY5: Purple.

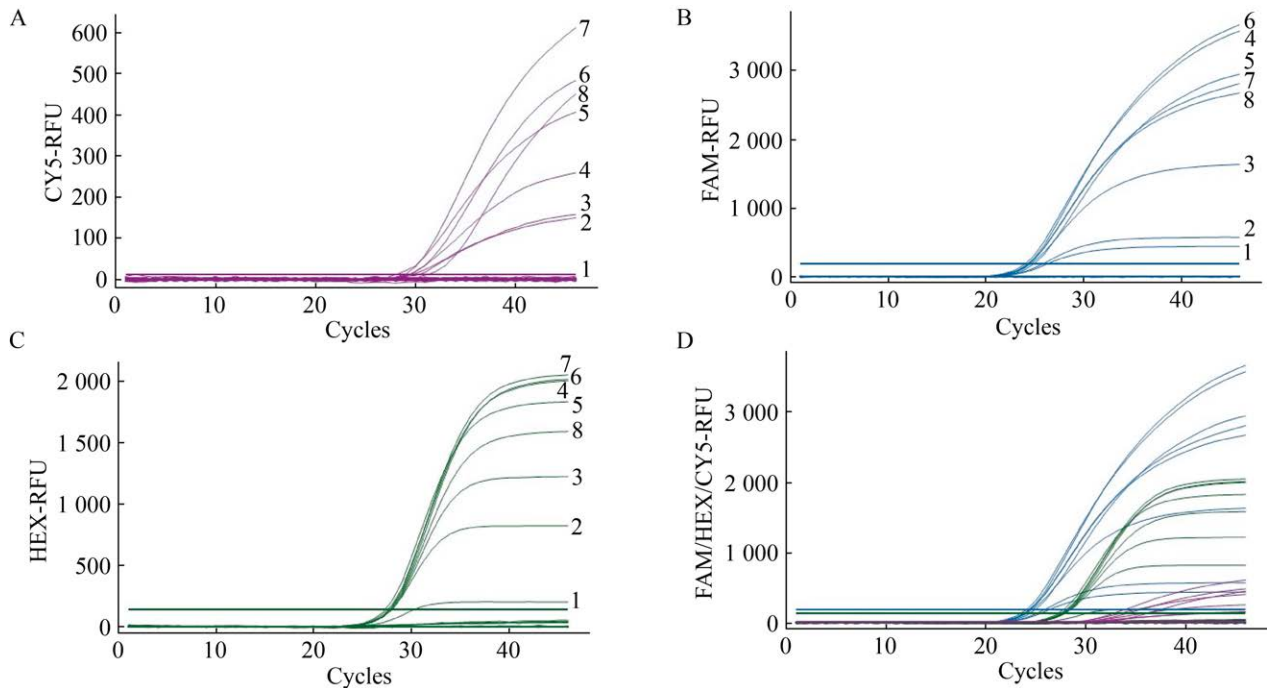


图 4 探针终浓度条件优化试验

Figure 4 Probe final concentration condition optimization test. A: CY5; B: FAM; C: HEX; D: FAM/HEX/CY5. 1–8: 50–400 nmol/L; FAM: Blue; HEX: Green; CY5: Purple.

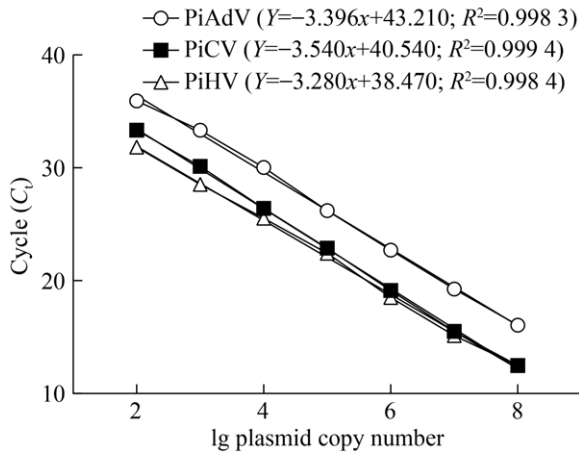


图5 三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的标准曲线  
Figure 5 Standard curves of the triple TaqMan RT-qPCR assay.

具有良好的线性关系, 可以实现对未知临床样本病毒载量的定量分析目的。

## 2.5 特异性试验结果

使用优化后的最佳反应条件进行 PiAdV I、PiCV、PiHV、PPV、PiRV、PTTV 和 FAdV-4 核酸 DNA 或 cDNA 检测, 同时以去离子水作为模板设置阴性对照, 对建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法进行方法特异性评价。图 6 结果显示, 仅有 PiAdV I、PiCV 和 PiHV 检测出现 S 型扩增曲线和荧光信号, 说明本研究建立的 PiAdV、PiCV、PiHV 三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法与其他常见的病毒核酸及 FAdV-4 核酸未发生交叉反应, 特异性良好。

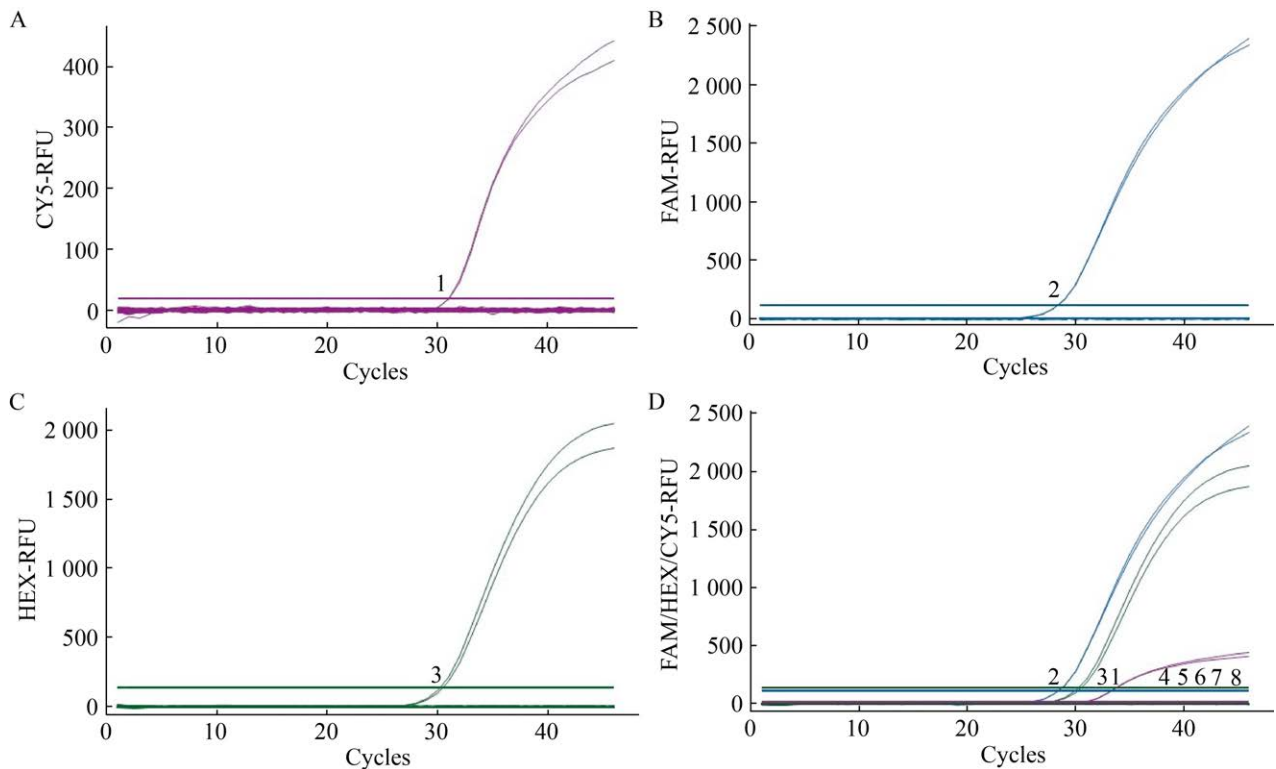


图6 三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的特异性试验 A: CY5; B: FAM; C: HEX; D: FAM/HEX/CY5。1: I型鸽腺病毒; 2: 鸽圆环病毒; 3: 鸽疱疹病毒; 4: 鸽痘病毒; 5: 鸽轮状病毒; 6: 鸽细环病毒; 7: 禽腺病毒 4 型; 8: 阴性对照。

Figure 6 Specificity test of the triplex TaqMan RT-qPCR assay. A: CY5; B: FAM; C: HEX; D: FAM/HEX/CY5. 1: Pigeon adenovirus I (PiAdV I); 2: Pigeon circovirus (PiCV); 3: Pigeon herpesvirus (PiHV); 4: Pigeon pox virus (PPV); 5: Pigeon rotavirus (PiRV); 6: Pigeon torque teno virus (PTTV); 7: Fowl adenovirus 4 (FAdV-4); 8: Negative control.

## 2.6 敏感性试验结果

以质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 的不同拷贝数浓度为反应模板,同时设置阴性对照,使用优化后的最佳反应条件进行 RT-qPCR 扩增,对建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法进行敏感性试验,同时与常规 PCR 方法试验结果进行比较。常规 PCR 检测方法中, PiAdV (图 7A)、PiCV (图 7B)、PiHV (图 7C)最低检出限分别为  $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ;如图 8、图 9 所示,在 25 次最低浓度重复检测中, PiAdV 检出率为 96% (24/25), PiCV 和 PiHV 检出率为 100%, 检出率均 >95%, 建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的可稳定检出的最低限分别为 10 copies/ $\mu\text{L}$ 、10 copies/ $\mu\text{L}$ 、1 copy/ $\mu\text{L}$ 。由此可知,本研究建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法敏感度是常规 PCR 方法的 100–1 000 倍,结果说明该三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法敏感性较高,在临床样本检测中更具优势。

## 2.7 包容性试验结果

采用建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法对 PiAdV、PiCV 和 PiHV 7 种不同病毒株的核酸 DNA 或质粒进行检测。结果显示,在三重 TaqMan RT-qPCR 反应体系中,可特异性检测 PiAdV、PiCV 和 PiHV 的不同来源病毒株(图 10),建立的多重 TaqMan RT-qPCR 检测方法对不同病毒株具有较好的包容性和高通量性。该检测方法不仅可以特异性检测 PiCV 和 PiHV 不同病毒株,还可以特异性检测 PiAdV I 和 PiAdV II 不同病毒株。

## 2.8 抗干扰性试验结果

在使用建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法进行抗干扰性试验验证中,观察扩增曲线和荧光信号并进行数据分析。结果显示,任意 1 种高拷贝数浓度( $10^8$ )的病毒质粒标准品对于其余 2 种低拷贝数浓度( $10^2$ )的病毒质粒标准品和任意 2 种高拷贝数浓度的病毒质粒标准品

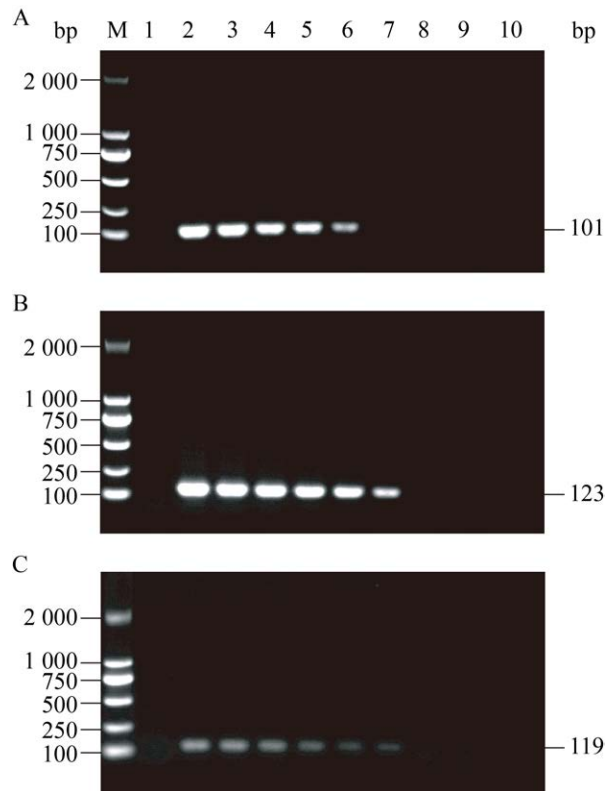


图 7 鸽腺病毒(A)、鸽圆环病毒(B)、鸽疱疹病毒(C)常规 PCR 方法的敏感性试验 1: 阴性对照; 2–10:  $1.0 \times 10^8$ – $1.0 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

Figure 7 Sensitivity tests of conventional PCR methods for pigeon adenovirus (PiAdV) (A), pigeon circovirus (PiCV) (B), and pigeon herpesvirus (PiHV) (C). 1: Negative control; 2–10:  $1.0 \times 10^8$ – $1.0 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ .

( $10^8$ )对于其余 1 种低拷贝数浓度( $10^2$ )的病毒质粒标准品的扩增均无抑制作用(图 11)。由此说明,对于 3 种病毒的检测样本,在任何浓度下均未观察到由相互干扰引起的扩增抑制,增加了该三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法结果的可靠性和信服力。

## 2.9 重复性试验结果

以质粒标准品 pMD19-T-PiAdV I、pMD19-T-PiCV 和 pMD19-T-PiHV 的 3 种不同拷贝数浓度为反应模板,同时以去离子水作阴性对照,每个质粒拷贝数进行批内(同一时间)、批间(不同时间、不同批次 RT-qPCR 酶预混体

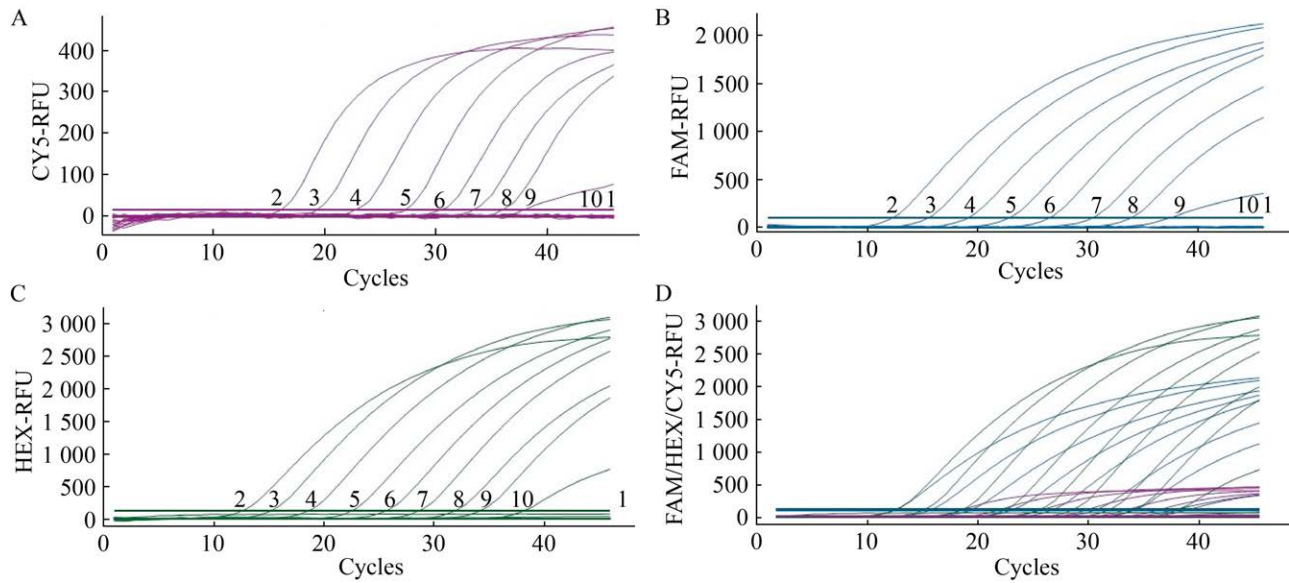


图 8 鸽腺病毒(A)、鸽圆环病毒(B)、鸽疱疹病毒(C)及 3 种病毒(D)三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的敏感性试验 1: 阴性对照; 2-10:  $1.0 \times 10^8$ – $1.0 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

Figure 8 Sensitivity test of the triple TaqMan RT-qPCR assay for pigeon adenovirus (PiAdV) (A), pigeon circovirus (PiCV) (B), pigeon herpesvirus (PiHV) (C), and three viruses (D). 1: Negative control; 2-10:  $1.0 \times 10^8$ – $1.0 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ .

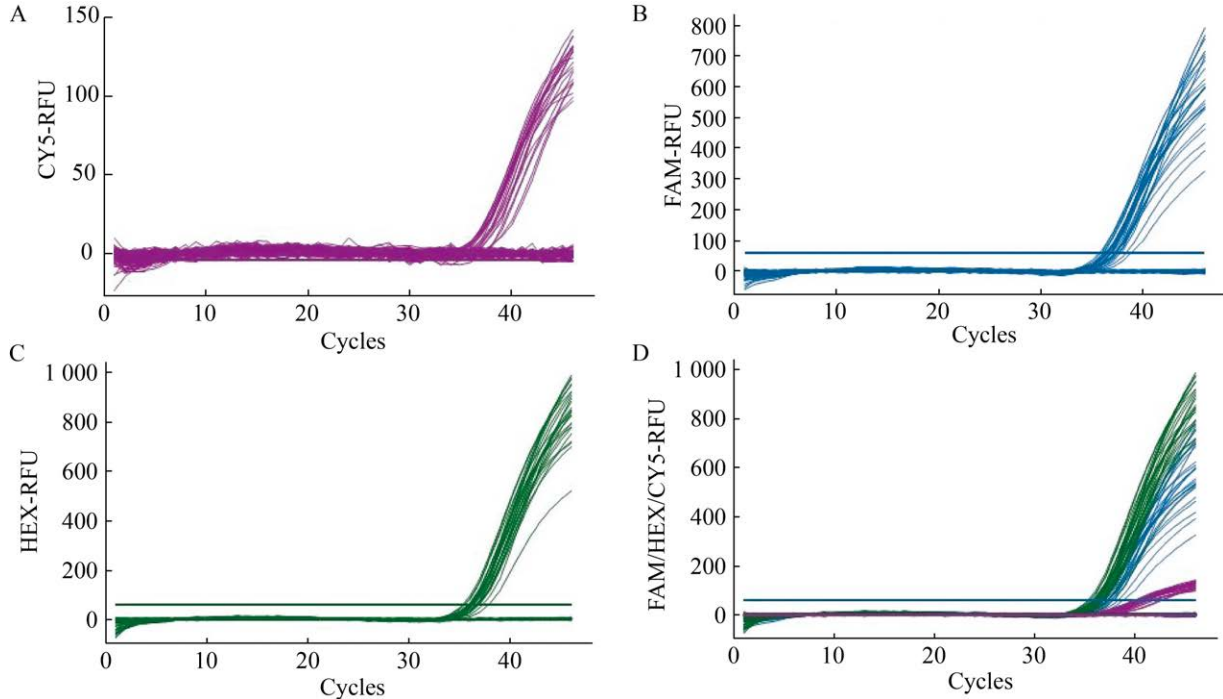


图 9 鸽腺病毒(A)、鸽圆环病毒(B)、鸽疱疹病毒(C)及 3 种病毒(D)三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法最低检测限的重复性试验

Figure 9 Repeatability test of the lowest detection limit of the triple TaqMan RT-qPCR assay for pigeon adenovirus (PiAdV) (A), pigeon circovirus (PiCV) (B), pigeon herpesvirus (PiHV) (C), and three viruses (D).

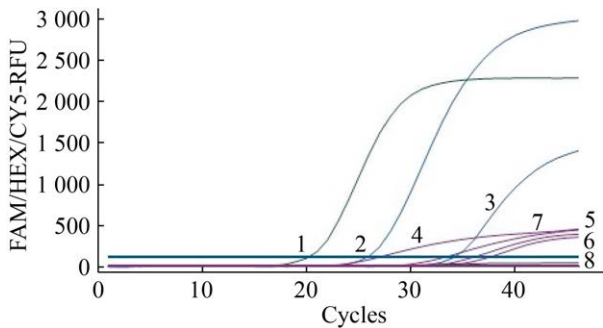


图 10 三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的包容性试验 1: 鸽疱疹病毒 BJ; 2: 鸽圆环病毒 Fa3/Beijing/2021; 3: 鸽圆环病毒 zj2; 4: pUC57-PiAdV CH/GS/1/2023; 5: 鸽腺病毒 CH/BJ/2022; 6: 鸽腺病毒 I IDA4; 7: 鸽腺病毒 II YPDS-Y-V1.A19.11-2013; 8: 阴性对照。

Figure 10 Inclusive test of the triplex TaqMan RT-qPCR assay. 1: PiHV BJ; 2: PiCV Fa3/Beijing/2021; 3: PiCV zj2; 4: pUC57-PiAdV CH/GS/1/2023; 5: PiAdV CH/BJ/2022; 6: PiAdV I IDA4; 7: PiAdV II YPDS-Y-V1.A19.11-2013; 8: Negative control.

系)重复扩增试验各 3 次,在优化后的最佳反应条件下进行三重 RT-qPCR 扩增,对建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法进行重复性评价。由表 4 可知,本检测方法批内重复试验变异系数为 0.075%–0.210%,批间重复试验变异系数为 0.638%–1.450%,批内重复和批间重复变异系数均小于 2.0%。由此可知,重复性试验结果表明所建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法具有良好的重复性和稳定性。

### 2.10 临床样本检测结果

为了验证所建检测方法的临床应用可行性,以 152 份病鸽临床样本基因组为反应模板,用建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法和常规 PCR 方法对临床样本进行检测。结果显示:三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法阳性样品检出率分别为 PiAdV 55.92% (85/152)、PiCV 51.32% (78/152)、PiHV 40.13% (61/152),其中,北京阳性样品 PiAdV (26)、PiCV (21)、PiHV (16),天津阳性样品 PiAdV (40)、PiCV (39)、PiHV

(33),河北阳性样品 PiAdV (19)、PiCV (18)、PiHV (12)。在常规 PCR 方法检测中阳性检出率分别为 PiAdV 51.97% (79/152)、PiCV 45.39% (69/152)、PiHV 30.92% (47/152)。三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法与常规 PCR 方法临床样本检测的阳性符合率为 100%。对于在荧光定量 PCR 方法中呈阳性而常规 PCR 方法呈现阴性的临床样品,对其扩增产物进行了 Sanger 测序。经 BLAST 比对,其序列与目的病毒序列一致。数据统计分析(图 12)可知,3 种病毒混合感染在临床样本中占比 21.71% (33/152)。临床样本检测结果表明,建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法具有良好的临床适用性和较高的灵敏度。

## 3 讨论

鸽业是我国传统的养殖业之一,具有悠久的历史 and 广泛的区域分布。然而,随着时代的发展,养殖业模式逐渐向集约化、立体化和工业化方式转变,在密集环境中,鸽群易受到传染性病原体的侵袭,造成大范围的感染和传播<sup>[18]</sup>。其中,鸽腺病毒、鸽圆环病毒和鸽疱疹病毒的混合感染是造成鸽业养殖巨大经济损失的原因之一。另外,幼鸽病综合征(young pigeon disease syndrome, YPDS)是一种主要影响幼鸽的高度传染性、多因素疾病,主要特征是高死亡率、快速传播和具有复杂的病原体组成<sup>[19]</sup>。早期研究认为,YPDS 由鸽腺病毒或鸽疱疹病毒单一感染引起,但近年来分子流行病学研究发现,YPDS 暴发的关键因素与鸽圆环病毒感染引起的免疫抑制密切相关<sup>[20]</sup>。相关研究表明,当鸽圆环病毒侵入机体后破坏法氏囊和胸腺的淋巴细胞,宿主发生免疫抑制<sup>[21]</sup>,致使宿主易继发感染鸽腺病毒肝炎和鸽疱疹病毒呼吸道感染。对于 YPDS 而言,诊断方法的建立仍是必要的,但传统检测技术存在一定的局限性。病原分离方法无法对 PiCV 进行有效分离,并且操作繁琐,时间周期较长<sup>[22]</sup>。血清学检测无法对既往感染、现症感染进行有效区分,并且 PiCV 感染往往

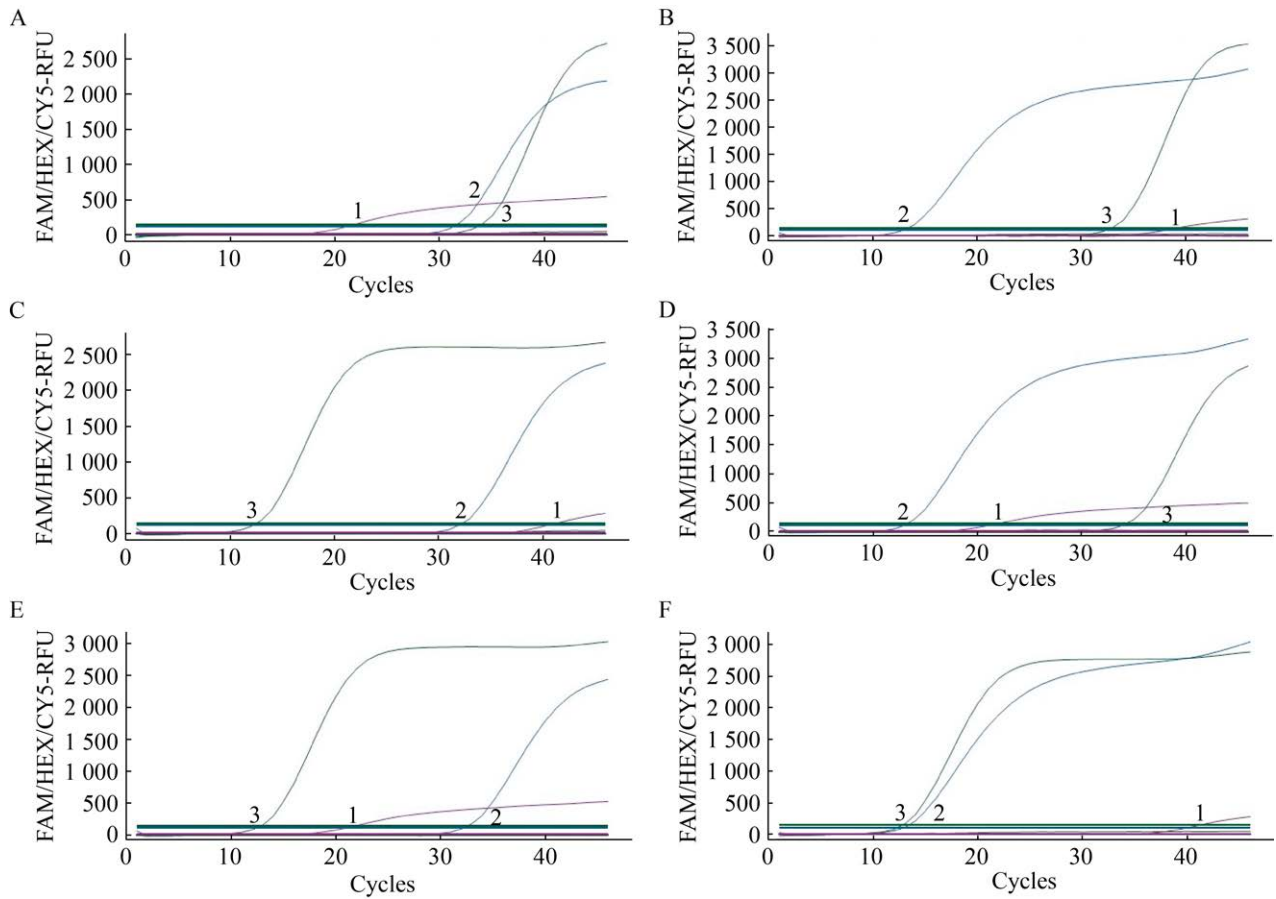


图 11 三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的抗干扰性试验 A-C: 1 个高浓度质粒标准品和 2 个低浓度质粒标准品; D-F: 2 个高浓度质粒标准品和 1 个低浓度质粒标准品。

Figure 11 Anti-interference test of the triple TaqMan RT-qPCR assay. A-C: One high concentration plasmid standard and two low concentration plasmid standards; D-F: Two high concentration plasmid standards and one low concentration plasmid standard.

表 4 三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法的批内、批间重复性试验

Table 4 Intra-assay and inter-assay repeatability tests of the triple TaqMan RT-qPCR assay

Plasmid standard	Concentration (copies/ $\mu$ L)	Intra-assay repeatability		Inter-assay repeatability			
		Mean $\pm$ SD	CV (%)	Mean $\pm$ SD	CV (%)	Mean $\pm$ SD	CV (%)
PMD19-T-PiAdV I	$1.00\times 10^8$	16.073 $\pm$ 0.025	0.155	16.333 $\pm$ 0.237	1.450	16.240 $\pm$ 0.150	0.922
	$1.00\times 10^6$	22.693 $\pm$ 0.017	0.075	22.880 $\pm$ 0.151	0.661	22.897 $\pm$ 0.146	0.638
	$1.00\times 10^4$	30.083 $\pm$ 0.033	0.110	30.313 $\pm$ 0.204	0.673	30.273 $\pm$ 0.232	0.767
PMD19-T-PiCV	$1.00\times 10^8$	12.273 $\pm$ 0.021	0.167	12.390 $\pm$ 0.136	1.097	12.460 $\pm$ 0.148	1.185
	$1.00\times 10^6$	19.203 $\pm$ 0.025	0.130	19.487 $\pm$ 0.246	1.263	19.480 $\pm$ 0.224	1.149
	$1.00\times 10^4$	26.560 $\pm$ 0.045	0.171	26.857 $\pm$ 0.264	0.982	26.733 $\pm$ 0.192	0.718
PMD19-T-PiHV	$1.00\times 10^8$	12.527 $\pm$ 0.026	0.210	12.730 $\pm$ 0.179	1.407	12.720 $\pm$ 0.169	1.326
	$1.00\times 10^6$	18.493 $\pm$ 0.021	0.111	18.797 $\pm$ 0.257	1.370	18.817 $\pm$ 0.261	1.389
	$1.00\times 10^4$	25.520 $\pm$ 0.029	0.115	25.837 $\pm$ 0.287	1.110	25.970 $\pm$ 0.359	1.383

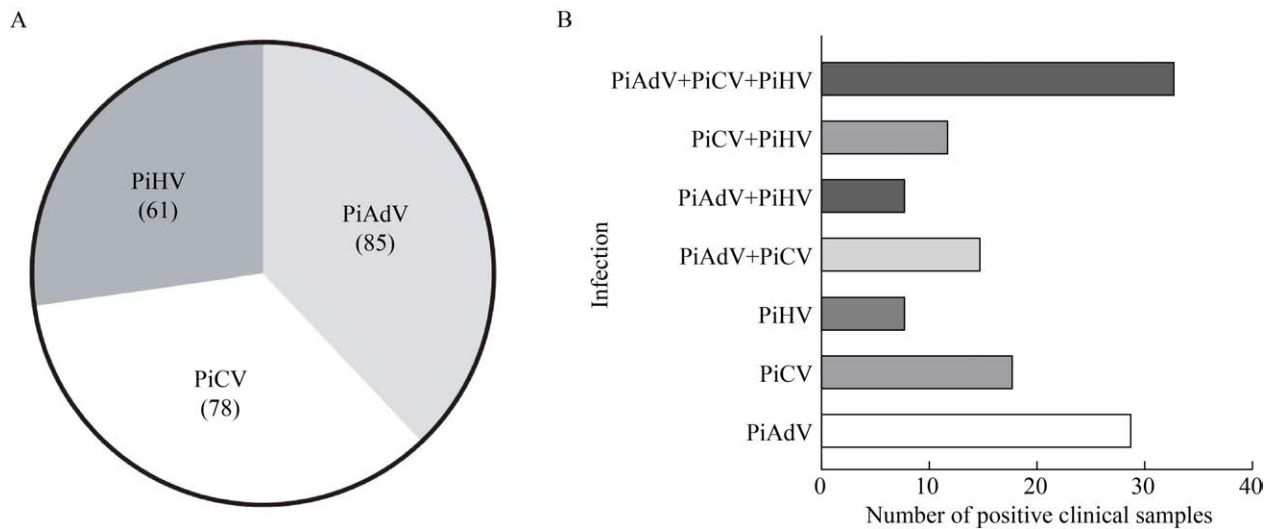


图 12 临床样本的三重 TaqMan RT-qPCR 检测结果 A: PiAdV、PiCV、PiHV 阳性的临床样本分布; B: PiAdV、PiCV 和 PiHV 的感染及混合感染发生率。

Figure 12 The clinical samples were tested positive by the triplex TaqMan RT-qPCR assay. A: Distribution of clinical samples positive for PiAdV, PiCV, PiHV; B: Incidence of PiAdV, PiCV, and PiHV infections and mixed infections.

会延迟抗体的生成,导致病例漏检率高。病理学切片观察无法对混合感染的病原体进行有效区分,导致无法对病鸽进行精准治疗和科学干预。当下,PCR 技术被应用于病原的快速检测,但常规 PCR 检出限较高且操作复杂,难以满足大量样本和早期筛查的需求。因此,RT-qPCR 因其高效性被广泛应用。本研究通过对 PiAdV I型、PiAdV II型、PiCV 和 PiHV 不同毒株基因序列进行比对,获取其基因保守区域,在其保守区域设计特异性检测引物和探针,经引物、探针验证和反应条件优化,建立一种三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法。在本研究中,通过梯度稀释的病毒质粒标准品绘制了各病原 RT-qPCR 方法的标准曲线。结果显示, PiAdV、PiCV 和 PiHV 的标准曲线方程分别为  $y=-3.396x+43.210$  ( $R^2$  为 0.998 3)、 $y=-3.540x+40.540$  ( $R^2=0.999 4$ )和  $y=-3.280x+38.470$  ( $R^2=0.998 4$ )。所有  $R^2$  值均大于 0.998 0,表明标准曲线具有优异的线性关系,可精准量化病毒载量(检测限分别

为 PiAdV 10 copies/ $\mu$ L、PiCV 10 copies/ $\mu$ L、PiHV 1 copy/ $\mu$ L),其敏感度较常规 PCR 方法提升 100–1 000 倍。该方法的建立不仅为评估病毒复制动态提供了高精度工具,更为揭示 PiAdV/PiCV/PiHV 混合感染的协同致病机制奠定了方法学基础。相较于现有技术,本方法的优势体现在多重检测能力与敏感度双重提升方面。既往研究中,兰世捷等<sup>[23]</sup>(双重 PCR, PiCV/PiHV)、倪维玲等(多重 PCR, PiAdV/PiCV/PiHV)<sup>[24]</sup>建立的常规 PCR 方法检出限为  $1.00 \times 10^2 - 1.15 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L,敏感度较本研究方法低 2–5 个数量级。此外,尽管安乐乐等<sup>[25]</sup>(PiAdV I型 TaqMan RT-qPCR)、李鹏等<sup>[26]</sup>(PiHV SYBR Green I RT-qPCR)、和郭学波等<sup>[27]</sup>(PiCV TaqMan RT-qPCR)基于 RT-qPCR 技术显著提高了单一病毒检测敏感度(检出限达  $10^1 - 10^2$  copies/ $\mu$ L),但其单一病原检测模式难以满足 YPDS 混合感染的临床诊断需求。例如,在 PiCV 诱导免疫抑制的背景下, PiAdV 或

PiHV 的继发感染常被漏检,导致病因误判与治疗延误。在特异性方面,仅有 PiAdV I型、PiAdV II型、PiCV、PiHV 基因出现荧光信号和扩增曲线,与鸽源其他常见病原及 FAdV-4 无交叉反应,表明该方法的引物、探针具有严格的靶基因选择性,特异性强且包容性良好。不足之处在于,其中 PiAdV 引物和探针在禽腺病毒方面仅对 FAdV-4 进行特异性验证,其余禽腺病毒基因型则通过 SnapGene 软件进行基因序列特异性的初步验证(理论层面),未来需补充该方法在不同腺病毒的特异性验证工作。在重复性试验中,建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法展现出高度稳定性:批内变异系数为 0.075%–0.210%,批间变异系数为 0.638%–1.450%,显著低于国际分子诊断标准<sup>[28]</sup> (ISO 17822:2020)对 RT-qPCR 重复性的要求,该方法的高度稳定的检测性能适用于大规模临床样本的筛查工作。利用建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法对采集的 152 份临床样品进行应用检测,结果显示 PiAdV、PiCV、PiHV 阳性检出率分别为 55.92%、51.32%、40.13%,不仅表明该三重 TaqMan RT-qPCR 方法更灵敏、更可靠、临床样品检测适用性好,可以更好地在 YPDS 临床早期诊断中发挥作用,而且临床样本检测结果也说明了 PiAdV、PiCV、PiHV 的地区流行情况。本研究建立的三重 TaqMan RT-qPCR 检测方法通过“一次反应、同步定量”的创新设计,该方法实现了 YPDS 核心病原的全覆盖检测,为精准解析病毒相互作用机制与制定靶向防控策略提供了关键技术支撑。

## 4 结论

综上所述,本研究成功建立了一种特异性强、敏感度高、重复性好和可同步检测 PiAdV、PiCV 和 PiHV 的三重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法,填补了国内 YPDS 核心病原混合感染可同

步检测的空白,实现 PiAdV、PiCV、PiHV 动态监测,为 PiAdV、PiCV、PiHV 协同致病机制研究、早期诊断和流行病学调查提供了关键技术手段。

## 作者贡献声明

安乐乐:数据分析,方法论、撰写文章;宗保君:数据分析,执行调研;任晓婷:数据分析;张业涛:数据分析;赵永清:提出概念,数据收集与监管,获取基金,提供资源。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## REFERENCES

- [1] MAREK A, KAJÁN GL, KOSIOL C, HARRACH B, SCHLÖTTERER C, HESS M. Complete genome sequences of pigeon adenovirus 1 and duck adenovirus 2 extend the number of species within the genus Aviadenovirus[J]. *Virology*, 2014, 462: 107-114.
- [2] YANG ZY, ZHOU YT, LIN J, WANG XQ, HUANG C, GAO J, WANG GL, YANG BL, LIU GM, DUAN HJ, CUI J, ZHAO JC, LUO WJ, CHENG SS, LIU YH. Identification and characterization of pigeon adenovirus 1 as an emerging pathogen in pigeons from Northern and Northwest China[J]. *BMC Veterinary Research*, 2025, 21(1): 266.
- [3] WEI XH, WU BR, XU XY, ZHANG S, ZHAO SS, XU X, LIANG GY, GUO H, TANG Y, DIAO YX. Isolation and identification of pigeon adenovirus 1 and analysis of its pathogenicity in pigeons and chickens[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2025, 201: 107334.
- [4] LI Y, XIANG C, XING YN, JING SF, HE HX. The distribution of pigeon adenoviruses in Northern Chinese pigeon and turtledove flocks provides further evidence of viral cross-transmission[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2025, 86(3): ajvr.24.09.0272.
- [5] ZHU RS, LUO LZ, SHI ZQ, CHEN Y, XU J, LI GX, YU LX, CUI J. Epidemiology, genetic diversity and evolution of pigeon circovirus[J]. *Poultry Science*, 2025, 104(4): 104928.
- [6] 张娟,任鹏飞,李兴,高振,王仲兵,梁立滨.山西地区鸽圆环病毒全基因组序列的测定与分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2025, 47(1): 96-101.
- ZHANG J, REN PF, LI X, GAO Z, WANG ZB, LIANG LB. Genome sequencing and analysis of pigeon circovirus from the Shanxi Province[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2025, 47(1): 96-101 (in Chinese).

- [7] NATH BK, DAS T, PETERS A, DAS GUPTA S, SARKER S, FORWOOD JK, RAIDAL SR, DAS S. Australasian pigeon circoviruses demonstrate natural spillover infection[J]. *Viruses*, 2023, 15(10): 2025.
- [8] STENZEL T, DZIEWULSKA D, TYKAŁOWSKI B, KONCICKI A. The clinical infection with pigeon circovirus (PiCV) leads to lymphocyte B apoptosis but has no effect on lymphocyte T subpopulation[J]. *Pathogens*, 2020, 9(8): 632.
- [9] STENZEL T, DZIEWULSKA D, ŚMIAŁEK M, TYKAŁOWSKI B, KOWALCZYK J, KONCICKI A. Comparison of the immune response to vaccination with pigeon circovirus recombinant capsid protein (PiCV rCP) in pigeons uninfected and subclinically infected with PiCV[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0219175.
- [10] HELLEBUYCK T, GÖBEL S, PASMANS F, ADRIAENSEN C, MARTEL A. Co-occurrence of *Mycoplasma* species and pigeon herpesvirus-1 infection in racing pigeons (*Columba livia*)[J]. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 2017, 31(4): 351-355.
- [11] ZHANG LJ, LI ZH, LI S, HU XY, SUN HG, LI MX, YANG XH, BAI RN, SU JL. Characterization of the first columbid herpesvirus 1 isolate from a hybrid meat-type pigeon flock in China[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(2): 459-464.
- [12] SAHINDOKUYUCU I, TURKMEN MB, SUMER T, ELHAG AE, ALCIGIR ME, YAZICI Z, BARRY G, GULBAHAR MY, KUL O. First detection and molecular characterisation of a pigeon Aviadonavirus A and pigeon circovirus co-infection associated with young pigeon disease syndrome (YPDS) in Turkish pigeons (*Columba livia* Domestica)[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2022, 8(1): 139-149.
- [13] 王婉, 王彦红, 刘伊, 金文杰, 石火英. 鸡包涵体肝炎病原检测及病理学观察[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(2): 273-278.  
WANG W, WANG YH, LIU Y, JIN WJ, SHI HY. Pathogenic detection and pathological observation of inclusion body hepatitis in chicken[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(2): 273-278 (in Chinese).
- [14] 安乐乐, 罗迅, 杨宣叶, 胡欣妍, 赵永清. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF7 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *江苏农业学报*, 2024, 40(9): 1681-1688.  
AN LL, LUO X, YANG XY, HU XY, ZHAO YQ. Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of ORF7 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 40(9): 1681-1688 (in Chinese).
- [15] 黄拓欣, 李程, 李汶洁, 吴琚, 陈凝雪, 孙媛. 猪急性腹泻综合征冠状病毒链特异性 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. *病毒学报*, 2025, 41(2): 533-540.  
HUANG TX, LI C, LI WJ, WU J, CHEN NX, SUN Y. Establishment and application of strand specific SYBR green real-time quantitative PCR for swine acute diarrhea syndrome coronavirus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2025, 41(2): 533-540 (in Chinese).
- [16] 李彬, 王辉, 刁梓洋, 翟云逸, 陈家露, 周栋, 刘伟, 靳亚平, 王爱华. 奶牛流产三种病原多重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. *微生物学通报*, 2025, 52(2): 613-622.  
LI B, WANG H, DIAO ZY, ZHAI YY, CHEN JL, ZHOU D, LIU W, JIN YP, WANG AH. Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneously detecting three pathogens inducing abortions in dairy cows[J]. *Microbiology China*, 2025, 52(2): 613-622 (in Chinese).
- [17] 高月花, 朱彤, 刘丽萍, 郭效珍, 马芹, 胡峰, 汪建华, 于可响, 黄兵, 宋敏训, 李玉峰. 鸭冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *病毒学报*, 2023, 39(6): 1633-1641.  
GAO YH, ZHU T, LIU LP, GUO XZ, MA Q, HU F, WANG JH, YU KX, HUANG B, SONG MX, LI YF. Development and application of SYBR green real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of coronaviruses in duck[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2023, 39(6): 1633-1641 (in Chinese).
- [18] 杨志远, 周雨婷, 林健, 黄程, 高洁, 段会娟, 程水生, 赵际成, 罗伟珏, 刘月焕. 新发鸽腺病毒 A 型感染的病理变化[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(8): 1615-1616.  
YANG ZY, ZHOU YT, LIN J, HUANG C, GAO J, DUAN HJ, CHENG SS, ZHAO JC, LUO WJ, LIU YH. Pathological changes of a novel pigeon adenovirus type A infection[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(8): 1615-1616 (in Chinese).
- [19] TESKE L, RUBBENSTROTH D, MEIXNER M, LIERE K, BARTELS H, RAUTENSCHLEIN S. Identification of a novel Aviadonavirus, designated pigeon adenovirus 2 in domestic pigeons (*Columba livia*)[J]. *Virus Research*, 2017, 227: 15-22.
- [20] SHABANI H, TALAZADEH F, KAYDANI GA, SEIFI MR. Sequencing of pigeon circovirus and the first report of identification of beak and feather disease virus in clinical specimens of domestic pigeons[J]. *Veterinary Research Forum*, 2024, 15(3): 151-158.
- [21] STENZEL TA, PESTKA D, TYKAŁOWSKI B, ŚMIAŁEK M, KONCICKI A. Epidemiological investigation of selected pigeon viral infections in Poland[J]. *Veterinary Record*, 2012, 171(22): 562.
- [22] DZIEWULSKA D, TYKAŁOWSKI B, ŁUKASZUK E, STENZEL T. The course of pigeon circovirus infection in young pigeons experimentally kept under conditions mimicking the One Loft Race rearing system[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2025, 69(1): 1-6.
- [23] 兰世捷, 苗艳, 陈亮, 李洪彬, 朱庆贺, 冯万宇, 李丹, 沈思思, 张蕾, 钟鹏, 史同瑞, 江波涛, 罗天瑶, 王志强, 金振华, 吴宪. 鸽圆环病毒和鸽疱疹病毒双重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国家禽*, 2022, 44(4): 113-116.

- LAN SJ, MIAO Y, CHEN L, LI HB, ZHU QH, FENG WY, LI D, SHEN SS, ZHANG L, ZHONG P, SHI TR, JIANG BT, LUO TY, WANG ZQ, JIN ZH, WU X. Establishment and preliminary application of double PCR detection method for pigeon circovirus and pigeon herpesvirus[J]. *China Poultry*, 2022, 44(4): 113-116 (in Chinese).
- [24] 倪维玲, 孟利佳, 乔思娜, 陈立功, 徐倩倩, 侯绍华, 董世山. 三种鸽源病毒多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(12): 1518-1524. NI WL, MENG LJ, QIAO SN, CHEN LG, XU QQ, HOU SH, DONG SS. Establishment and preliminary application of multiplex PCR for detection on herpes, circovirus and adenovirus from pigeon[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(12): 1518-1524 (in Chinese).
- [25] 安乐乐, 刘倩芸, 蓝秋菊, 罗迅, 赵永清. 鸽腺病毒I型 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及遗传进化分析[J]. *江西农业大学学报*, 2025, 47(1): 167-177. AN LL, LIU QY, LAN QJ, LUO X, ZHAO YQ. Establishment of a TaqMan probe real-time quantitative PCR assay for detection of pigeon adenovirus type I and analysis of its genetic evolution[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2025, 47(1): 167-177 (in Chinese).
- [26] 李鹏. PiHV 和 PiAdV-1 核酸检测方法的建立与应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024. LI P. Establishment and application of nucleic acid detection methods for PiHV and PiAdV-1[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024 (in Chinese).
- [27] 郭学波, 赵承锋, 吴瑶, 吴琼, 胡学文. 鸽圆环病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2024, 54(2): 169-173. GUO XB, ZHAO CF, WU Y, WU Q, HU XW. Establishment and application of PCR assay for detect of pigeon circovirus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2024, 54(2): 169-173 (in Chinese).
- [28] *In vitro* diagnostic test systems: nucleic acid amplification-based examination procedures for detection and identification of microbial pathogens: laboratory quality practice guide: ISO 17822[S/OL]. 2020. <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/67022/2b6da53deb60491ba78d54ce9649ff1f/ISO-17822-2020.pdf>.