

“十四五”实验动物重点专项成果专栏

# 针对禽致病性大肠埃希菌 *ISS* 及 *ompT* 基因的 TaqMan 双重荧光定量 PCR 方法的建立及应用\*

林蔚<sup>1</sup> 武景琦<sup>1</sup> 杨佳美<sup>1</sup> 郭影成<sup>2</sup> 李立恒<sup>3</sup> 赵丽丽<sup>1</sup>

(1. 吉林大学动物医学学院, 人兽共患病研究所, 人兽共患病研究教育部重点实验室, 人畜共患传染病重症诊治全国重点实验室, 长春 130062) (2. 吉林市丰满区红旗街道综合服务中心, 吉林 132013) (3. 吉林市丰满区畜牧总站, 吉林 132013)

**摘要:**目的 建立一种检测禽致病性大肠埃希菌(APEC)的双重 TaqMan qPCR 方法。方法 以 APEC 保守基因 *ISS* (血清抗性基因)及 *ompT*(保护蛋白基因)为靶标设计特异性引物,以 Blunt-*ISS* 及 Blunt-*ompT* 质粒标准品为模板,建立双重 qPCR 检测方法。结果 *ISS* 建立的 qPCR 方法标准曲线为  $Y = -3.367X + 38.518$ ,  $R^2 = 0.99$ , 拷贝数  $10^2 \sim 10^9$  范围内与 *Ct* 值有很好的线性关系;*ompT* 建立的 qPCR 方法标准曲线为  $Y = -3.314X + 36.817$ ,  $R^2 = 0.997$ , 拷贝数  $10^2 \sim 10^9$  范围内与 *Ct* 值有很好的线性关系。特异性试验显示两种方法与其他鸭病无交叉反应;敏感性实验表明,两种方法对 Blunt-*ISS* 及 Blunt-*ompT* 的最低检测限均为  $10^2$  拷贝数;重复性实验表明,相同条件下建立的两种方法重复性良好;60 份临床组织样品检测结果与普通 PCR 符合率为 100%。结论 本研究建立的 TaqMan qPCR 方法特异性强,灵敏度高,重复性好,适用于临床检测。

**关键词:** 禽致病性大肠埃希菌; *ISS*; *ompT*; 双重荧光定量 PCR; TaqMan

中图分类号: Q95-3 文献标志码: A 文章编号: 1006-6179(2026)01-0022-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2026.01.004

## Development and Application of a TaqMan Dual-Fluorescence Quantitative PCR Method Targeting the *ISS* and *ompT* Genes of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC)

Lin Wei<sup>1</sup>, Wu Jingqi<sup>1</sup>, Yang Jiamei<sup>1</sup>, Guo Yingcheng<sup>2</sup>, Li Liheng<sup>3</sup>, Zhao Lili<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, National Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Severe Zoonotic Infectious Diseases, Institute of Zoonosis, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

(2. Fengman District Hongqi Sub-District Comprehensive Service Center of Jilin City, Jilin 132013, China)

(3. Fengman District Animal Husbandry General Station of Jilin City, Jilin 132013, China)

**Abstract: Objective** To establish a dual TaqMan qPCR method for detecting avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Methods** Specific primers were designed targeting the conserved genes *ISS* (serum resistance gene) and *ompT* (protective protein gene) of APEC. Using Blunt-*ISS* and Blunt-*ompT* plasmid standards as templates, a dual qPCR detection method was established. **Results** The standard curve for the qPCR method targeting *ISS* was  $Y = -3.367X + 38.518$ , with  $R^2 = 0.99$ , showing a strong linear relationship between the *Ct* value and copy numbers ranging from  $10^2$  to  $10^9$ . The standard curve for the qPCR method targeting *ompT* was  $Y = -3.314X + 36.817$ , with  $R^2 = 0.997$ , also demonstrating a strong linear relationship between the *Ct* value and copy numbers ranging from  $10^2$  to  $10^9$ . Specificity tests

收稿日期: 2025-03-17

\* 基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目(2021YFF0703000)。

作者简介: 林蔚(2002—), 男, 硕士研究生, 研究方向为兽医公共卫生。E-mail: 2294302409@qq.com。

通信作者: 赵丽丽(1983—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为兽医公共卫生。E-mail: zhaolili@jlu.edu.cn。

confirmed no cross-reactivity with other duck pathogens. Sensitivity experiments indicated that the limit of detection (LOD) for both Blunt-*ISS* and Blunt-*ompT* was  $10^2$  copies. Repeatability tests showed that both method exhibited excellent reproducibility under identical conditions. Clinical testing of 60 tissue samples revealed 100% concordance with conventional PCR. **Conclusion** The TaqMan qPCR method established in this study is highly specific, sensitive, reproducible, and suitable for clinical detection.

**Key words:** Avian pathogenic *Escherichia coli*; *ISS*; *ompT*; dual-fluorescence quantitative PCR; TaqMan

禽大肠埃希菌病是一种常见的畜禽疾病,对免疫力低下的畜禽有很强的感染力,雏禽易继发其他疾病而感染,成年禽则影响产蛋率,对畜禽养殖产生不可预估的损失。对实验动物而言,禽致病性大肠埃希菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)严重危害禽类的呼吸器官与消化器官,引起实验动物纤维素性心包炎、纤维素性肝周炎、纤维素性腹膜炎和气囊炎,肝因纤维素沉积形成黄油样外观,肾肿大、出血,严重者死亡。及时检出大肠埃希菌病,可有效保障家禽安全及减少实验动物经济损失,因此建立一种检测禽大肠埃希菌病的方法尤为重要<sup>[1]</sup>。TaqMan 荧光定量 PCR 是一种可以对样本中 DNA 进行定量检测的方法,具有快速、灵敏、特异性好的特点,可以为禽大肠埃希菌的防控、诊断、流行病学调查提供依据<sup>[2]</sup>。

*ISS* 是一种与大肠埃希菌致病有关的基因。在某些致病性大肠埃希菌菌株中,*ISS* 基因编码一种与细菌的黏附和侵袭能力相关的蛋白。*ISS* 基因的表达可能增强 APEC 对宿主细胞的黏附能力,从而促进感染<sup>[3-4]</sup>。*ompT* 基因可能编码一种外膜蛋白 T (outer membrane protease T, OmpT),这种蛋白是细菌细胞外膜的重要组成部分。外膜蛋白通常参与细菌的黏附、侵袭和免疫逃逸等过程,有些外膜蛋白甚至直接损伤细胞,对机体健康造成严重危害<sup>[5-6]</sup>。*ISS* 及 *ompT* 基因在 APEC 中保守性较高,因此本实验依据这两个基因建立双重荧光定量 TaqMan PCR 方法以检测 APEC,以期为 APEC 的防控提供新的技术支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 临床样品及病原:** 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、禽大肠埃希菌 (avian *Escherichia coli*)、APEC、禽 4 型腺病毒 (avian adenovirus serotype 4, AAV-4)、鸭星状

病毒 (duck astrovirus, DAstV)、3 型鸭甲型肝炎病毒 (duck hepatitis A virus type 3, DHA-3) 均由实验室保存。60 份来自长春周边养殖场的发病鸭的临床样品,样品均保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

**1.1.2 主要试剂:**  $2\times$  SanTaq PCR Mix (批号: K510KC0053)、GL DNA Marker 2000 (批号: A5A1162)、 $5\times$  Ultra-Universal TOPO Cloning Mix (批号: 7E1151K4) [均购自生工生物工程(上海)股份有限公司];  $2\times$  AceQ Universal U+Probe Master Mix V2 (批号: 7G72013)、DNA 回收试剂盒 (批号: 7E740D3) (均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司); DH5 $\alpha$  细胞 (批号: CB101)、质粒小提试剂盒 (批号: A1106B) (均购自天根生化科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 引物设计及合成:** 参照 GenBank 中禽大肠埃希菌保守基因序列,利用 Beacon design8 设计两对引物:*ISS* (F: 5'-CAGGATGTGCTCAACAAA-3', R: 5'-CCGAAACGAAGAAATGATG-3', Probe: FAM-AACCGACAGCAGTAACACCAA, 扩增产物预计 90 bp) 与 *ompT* (F: 5'-GCGATTATGAAGCAATCA-3', R: 5'-GTCGAATGGTAATGTCTTG-3', Probe: FAM-AGCGTTAATGTCGGCAAATATACCCAT, 扩增产物预计 115 bp), 由生工生物工程有限公司合成。

**1.2.2 质粒标准品 Blunt-*ISS* 与 Blunt-*ompT* 的构建与鉴定:** 使用细菌 DNA 提取试剂盒提取 APEC DNA, 以提取的 DNA 为模板, *ISS-F/ISS-R*、*ompT-F/ompT-R* 为引物进行普通 PCR, 扩增程序为:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 60 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s, 40 个循环,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s。使用普通 DNA 产物纯化试剂盒回收纯化 PCR 扩增产物, 将其与 Blunt 连接构建重组质粒, 重组质粒加入 DH5 $\alpha$  感受态细胞转化, 涂板扩繁。经 PCR 和测序鉴定正确的重组质粒作为质粒标准品, 命名为 Blunt-*ISS* 及 Blunt-*ompT*, 利用分光光度计测定 Blunt-*ISS* 及 Blunt-*ompT* 浓度, 按以下公式换算成拷贝数: 拷贝数/ $\mu\text{L}$  =  $(6.02\times 10^{23})\times\text{DNA 量}/(\text{DNA 长度}\times 660)$ 。

**1.2.3 反应体系及条件:**模板使用 20  $\mu\text{L}$  反应体系。2  $\times$  AceQ Universal U + Probe Master Mix V2 10  $\mu\text{L}$ , 加入上下游引物 0.5  $\mu\text{L}$ , 探针 0.2  $\mu\text{L}$ , 质粒 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu\text{L}$ 。qPCR 扩增程序, 预处理: 50  $^{\circ}\text{C}$  2 min  $\rightarrow$  预变性: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min  $\rightarrow$  变性: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 退火+延伸: 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。

**1.2.4 标准曲线构建:**质粒标准品经过 10 倍稀释, 质粒浓度范围为  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ , 每个稀释度设 3 个重复, 实时荧光定量 PCR 确认标准曲线。

**1.2.5 qPCR 敏感性实验:**质粒标准品经 10 倍稀释, 质粒浓度范围为  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ , 各取 1  $\mu\text{L}$  标准质粒做 qPCR 检测, 确定最低检出量。TaqMan 探针技术: 采用特异性荧光探针 (如 FAM、VIC 标记), 仅与目标序列结合, 避免非特异性扩增 (如 SYBR Green 可能受引物二聚体干扰)。双靶标验证: 同时检测两个基因可提高结果的可信度, 减少单一靶标可能导致的假阳性/假阴性问题。

**1.2.6 qPCR 特异性实验:**按照本实验建立的 qPCR 方法, 对其他鸭病 (禽大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、AAV-4、DAstV、DHA-3) 待检样品进行检测, 验证建立的 qPCR 方法的特异性。

**1.2.7 qPCR 重复性实验:**重复性实验即组内重复与组间重复。组内重复: 在同一试验中用  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$  copies 的大肠埃希菌模板做 3 个重复, 计算各浓度荧光  $C_t$  值的标准差和变异系数; 组间实验: 对组间重复的模板在 10 d 后重复进行实验, 计算各浓度荧光  $C_t$  值的标准差和变异系数。

**1.2.8 临床样品检测:**利用已建立的 qPCR 方法和一般 PCR 方法对来自长春周围养殖场的 30 份鸭咽拭子样品进行检测, 使用天根生化科技有限公司 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 检出其阳性率。

## 2 结果

### 2.1 质粒标准品 Blunt-ISS 与 Blunt-ompT 的构建

使用细菌 DNA 提取试剂盒提取 APEC DNA, 以提取的 DNA 为模板, ISS-F/ISS-R、ompT-F/ompT-R 为引物进行普通 PCR, 胶图见图 1。

### 2.2 qPCR 标准曲线的建立

以  $10^1 \sim 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  标准品阳性模板进行反应, 得到扩增曲线和标准曲线。从图 2, 图 3 可知, ISS 体系中模板拷贝数在  $10^2 \sim 10^9$  范围内有很好的

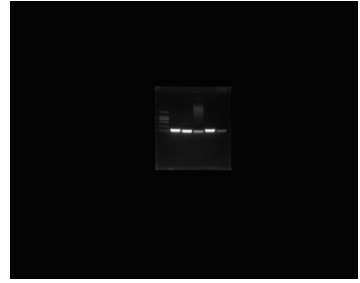


图 1 ISS 与 ompT PCR 结果

Fig. 1 PCR results of ISS and ompT

线性关系,  $Y = -3.367 + 38.518X$ ,  $R^2$  为 0.99; ompT 体系中模板拷贝数在  $10^2 \sim 10^9$  范围内有很好的线性关系,  $Y = -3.314 + 36.817X$ ,  $R^2$  为 0.997。

### 2.3 qPCR 敏感性实验结果

以 10 倍稀释的 APEC ( $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ ) 为模板进行扩增。敏感性结果见图 4。

### 2.4 qPCR 特异性实验结果

用本实验建立的方法对 APEC、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、禽大肠埃希菌、AAV-4、DAstV、DHA-3 进行检测, 结果显示, 只有 APEC 有荧光曲线而其他病原均无, 结果见图 5。

### 2.5 qPCR 重复性实验结果

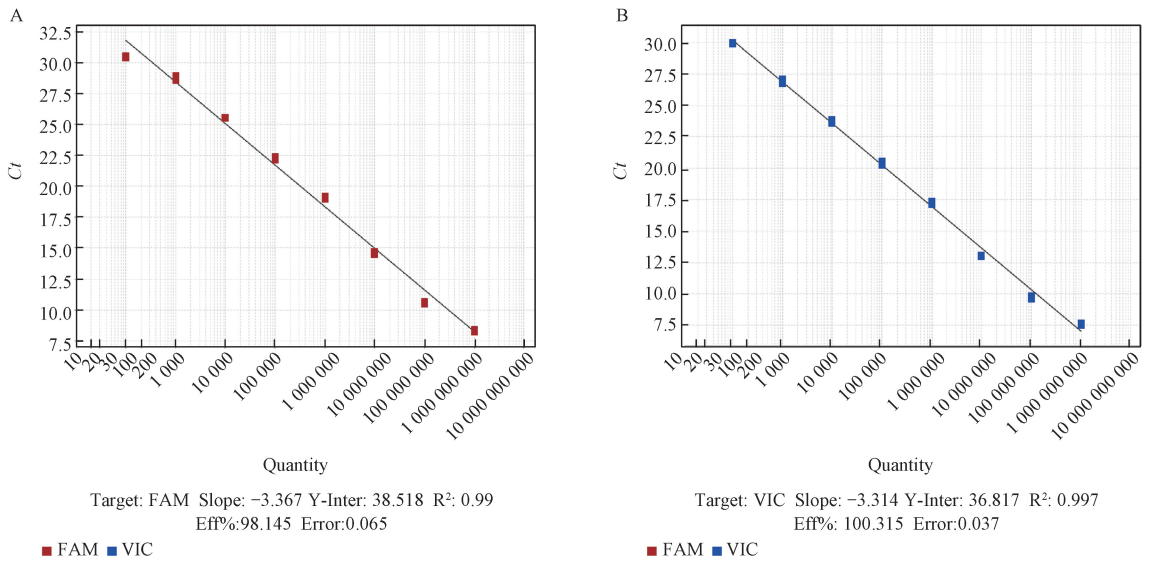
以  $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  稀释度的 APEC 标准质粒作为模板分别进行批内和批间重复性试验, 结果显示, 批内变异系数均小于 2%, 批间变异系数均小于 1%, 表明本研究建立的 qPCR 方法具有较好的重复性 (表 1, 表 2)。

### 2.6 临床样品检测结果

利用构建的 qPCR 方法, 对长春周围养殖场的 30 份鸭样进行检测, 检出 8 份阳性 (阳性率为 26.7%), 普通 PCR 阳性检出 5 份 (阳性率为 16.7%), 结果表明本实验建立的 qPCR 方法检测结果相较于普通 PCR 方法更加准确可靠, 可以用于临床样品的批量检测。

## 3 讨论

禽大肠埃希菌是现代畜禽养殖业面临的重要病原微生物, 在自然环境和养殖场广泛分布。该菌株能诱发败血症、腹膜炎等严重疾病及产蛋量减少的问题, 虽然致死率相对较低, 但其引发的继发性感染可对养殖业造成重大经济损失。在山东、江苏、浙江等家禽养殖密集区, APEC 发病率明显升高<sup>[7-8]</sup>。不当的饲养管理、环境应激和免疫抑制等多重因素交

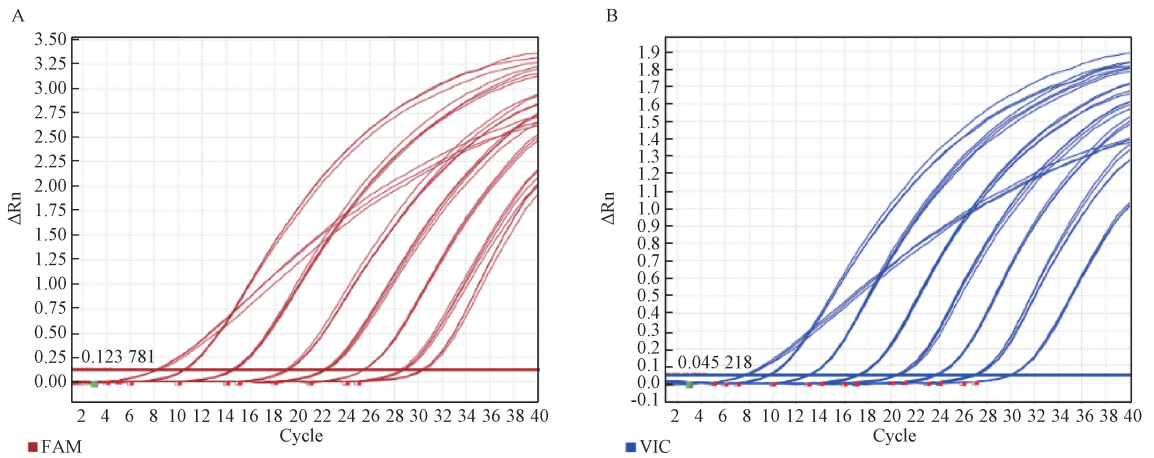


注:A. *ISS* qPCR 标准曲线;B. *ompT* qPCR 标准曲线。

Note. A. *ISS* qPCR standard curve. B. *ompT* qPCR standard curve.

图 2 标准曲线

Fig. 2 Standard curve



注:A. *ISS* qPCR 扩增曲线;B. *ompT* qPCR 扩增曲线。

Note. A. *ISS* qPCR amplification plot. B. *ompT* qPCR amplification plot.

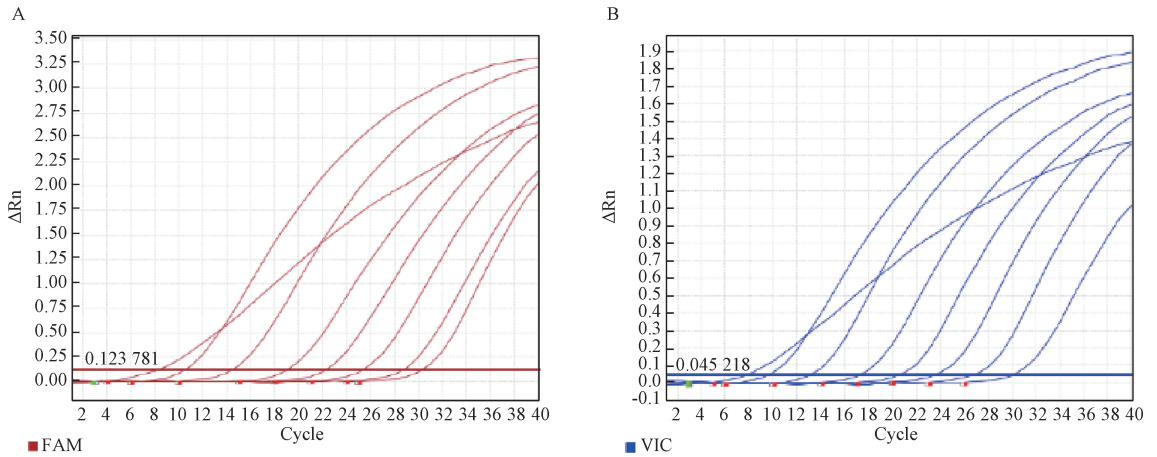
图 3 扩增曲线

Fig. 3 Amplification plot

相互作用,不仅扰乱养殖计划,还显著增加治疗成本并对食品安全产生威胁。高毒力 APEC 菌株可引起实验动物的急性败血症,导致实验动物短期内死亡,影响实验进程,使实验动物无法达到实验要求的健康标准;低毒力菌株可能导致亚临床感染,动物虽不表现明显症状,但出现生长迟缓、免疫功能异常等问题,干扰实验结果。慢性感染可能诱发肝周炎、心包炎、关节炎等病变,影响实验动物的生理状态;APEC 感染还可激活实验动物的免疫系统,导致白细胞介素-6、肿瘤坏死因子等细胞因子水平异常,干扰免疫相关实验,如疫苗效力评估、炎症模型研究等。因

此,开发高效、精准的 APEC 检测方法具有重要的现实意义<sup>[9-10]</sup>。

考虑到单一基因检测存在不确定性,难以全面反映感染状态<sup>[11]</sup>,因此本研究采用多重 qPCR 策略,基于 APEC 的保守基因 *ISS* 与 *ompT* 开展检测方法的构建,以提高检测的准确性和可信度<sup>[12]</sup>。何洪波<sup>[13]</sup>对 451 株 APEC 进行毒力基因检测,发现 70.5%的菌株呈 *ompT* 阳性,证实了 *ompT* 基因通过编码 *ompT* 蛋白降解大肠埃希菌素 A、E1 及 E2 在致病性中的重要作用。徐晓静等<sup>[14]</sup>以 SYBR Green I 实时定量 PCR 为基础对 APEC 感染过程中 *ompT* 的

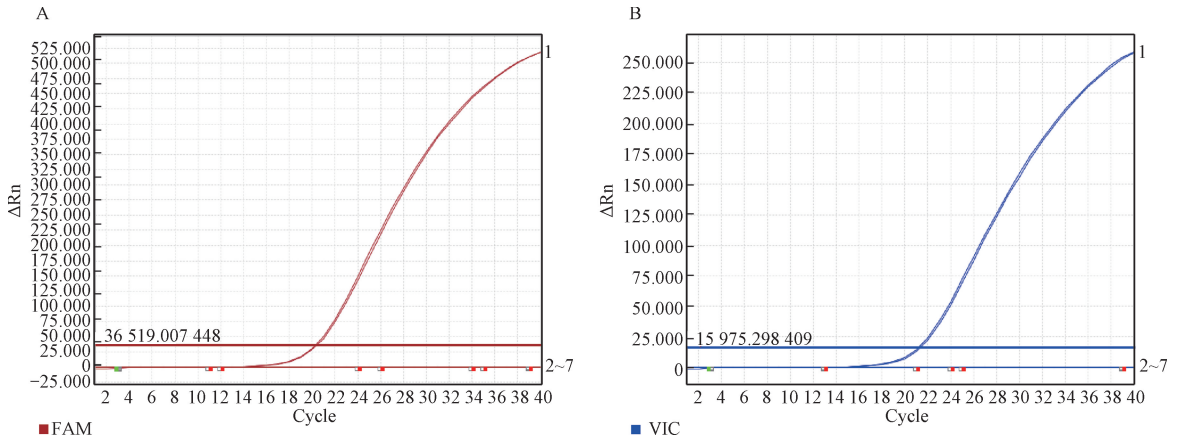


注: A. *ISS* 敏感性试验结果; B. *ompT* 敏感性试验结果。

Note. A. Sensitivity result of *ISS*. B. Sensitivity result of *ompT*.

图 4 荧光定量 PCR 检测的敏感性

Fig. 4 Sensitivity of quantitative fluorescent PCR detection



注: A. *ISS* 特异性试验结果; B. *ompT* 特异性试验结果。1. 禽致病性大肠埃希菌; 2~7. 其他病原。

Note. A. Specificity result of *ISS*. B. Specificity result of *ompT*. 1. APEC. 2-7. Other pathogens.

图 5 荧光定量 PCR 检测的特异性

Fig. 5 Specificity of fluorescence quantitative PCR detection

表 1 *ISS* 重复性实验

Table 1 Reproducibility test of *ISS*

Blunt- <i>ISS</i> 模板	批内重复性实验			批间重复试验		
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	CV/%	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	CV/%
$10^7$	3	16.22 ± 0.08	0.51	3	16.64 ± 0.07	0.41
$10^6$	3	19.60 ± 0.10	0.54	3	19.26 ± 0.10	0.54
$10^5$	3	23.80 ± 0.32	1.38	3	23.56 ± 0.11	0.50

表 2 *ompT* 重复性实验

Table 2 Reproducibility test of *ompT*

Blunt- <i>ompT</i> 模板	批内重复性实验			批间重复试验		
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	CV/%	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	CV/%
$10^7$	3	17.98 ± 0.02	0.10	3	18.02 ± 0.10	0.57
$10^6$	3	20.67 ± 0.10	0.50	3	20.37 ± 0.12	0.57
$10^5$	3	24.70 ± 0.36	1.44	3	24.67 ± 0.12	0.50

表达水平进行了检测,通过相对标准曲线确定了定量 PCR 方法的高稳定性。同时,Leurs<sup>[15]</sup> 和 Goraichuk 等<sup>[16]</sup> 研究表明,双重 qPCR 在疫苗株检测中显示出高度特异性,可有效监测疫苗株在接种后定植和脱落情况;而 Wulsten 等<sup>[17]</sup> 开发的新型 qPCR 技术更进一步实现了对大肠埃希菌活/死菌的准确区分。此外,Fancher 等<sup>[18]</sup> 指出,鸡群中 APEC 的感染率不受季节、鸡群年龄或样本类型的显著影响,而 Al-Marri<sup>[19]</sup> 和 Li 等<sup>[20]</sup> 则强调抗生素滥用可能导致新血清型的出现,进一步加剧了检测难度。

本研究建立的 TaqMan qPCR 方法在实验中表现出良好的重复性、特异性及较高的敏感性,能够在 2 h 内实现 APEC 的快速定量检测。与传统培养法、滤膜法及免疫磁珠法等相比,多重 qPCR 技术不仅大幅缩短了检测周期,还极大地降低了因单一基因局限性带来的假阴性或假阳性风险,为禽大肠埃希菌的流行病学监测提供了更为可靠的实验手段。本研究可检测  $10^2 \sim 10^9$  拷贝数的模板,而孟庆美等<sup>[21]</sup> 研究中的多重 PCR 方法只能检测最低  $10^3$  拷贝数的模板,可见本实验的方法更为灵敏。目前采用的单一基因 PCR 方法,虽在扩增效率方面具有优势,但是同一时间只能检测一个基因,在对多个基因进行检测时,会造成试剂及时间的大量浪费,而且避免假阳性的效果也不如多重 qPCR 方法。近期国内外关于禽类病原体检测的研究进一步验证了多重 qPCR 技术在提高检测效率、特异性与灵敏性方面的优势。

综上所述,本研究通过构建基于 TaqMan 探针的多重 qPCR 检测方法,有效克服了单基因检测的不确定性,提供了一种简便、快速且高效的 APEC 定量检测手段,具有较高的应用价值和推广前景。

## 参 考 文 献

[ 1 ] 李鹏飞,黄嘉,毕睿晨,等. 禽大肠杆菌病的非抗生物质防控研究进展 [J]. 动物营养学报, 2024, 36(8): 4809-4022.

[ 2 ] 姜晓彤,王义敏,何元龙,等. 山东省禽源性大肠杆菌耐药性研究 [J]. 家禽科学, 2023, 45(4): 51-55;67.

[ 3 ] 樊琛,徐旺焯,曾庆华,等. 三株鸡源大肠杆菌 *iss* 基因的检测 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(22): 5969-5971.

[ 4 ] 李郁,魏建忠,朱启运,等. 安徽省肉鸡致病性大肠杆菌 *tsh* 和 *iss* 基因的检测及序列分析 [J]. 中国兽医科学, 2010, 40(2): 141-145.

[ 5 ] 王琦. 禽致病性大肠杆菌 *ompT* 缺失株特性及其对雏鸡小肠炎症相关基因表达的影响 [D]. 合肥:安徽农业大学, 2018.

[ 6 ] 周业菲. 禽病原性大肠杆菌 *ompA*、*ompT* 基因和肠炎沙门氏菌 *ompA*、*pgtE* 基因突变株的构建及其生物学特性研究 [D].

扬州:扬州大学, 2013.

[ 7 ] 张亦,卞琳. 鹅大肠杆菌病诱因、危害与防治措施 [J]. 家禽科学, 2024, 46(11): 82-85.

[ 8 ] 朱三榜. 浅谈鹅大肠杆菌病诱因、危害与防治 [J]. 河南农业, 2024 (3): 65.

[ 9 ] 王伟. 鸡感染大肠杆菌的危害及防治措施 [J]. 中国畜禽种业, 2022, 18(9): 159-161.

[ 10 ] 杨为强,特蕾莎·阿古列斯,王淑娟. 鸡大肠杆菌病的诱因、危害与防治 [J]. 中国畜禽种业, 2021, 17(8): 188-189.

[ 11 ] 马雪青,张雨星,李平花,等. 羊肠道病毒 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国兽医科学, 2025, 55(6): 757-763.

[ 12 ] 郭伟,陈俊薇,刘煜茜,等. 柯萨奇病毒 B 组 4 型 TaqMan 探针一步法实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及验证 [J]. 中国生物制品学杂志, 2025, 38(2): 167-171.

[ 13 ] 何洪波. 禽病原性大肠杆菌 E058 株 *ompT*、*cvcA* 基因突变株的构建及其生物学特性 [D]. 扬州:扬州大学, 2012.

[ 14 ] 徐晓静,殷为民,赵李祥. *nlin* 大肠杆菌 *ompT* 基因的相对表达定量 PCR 方法的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(4): 269-272.

[ 15 ] LEURS K, GOOSSENS E, CHRISTENSEN H, et al. Development of a duplex qPCR for the differentiation of a live attenuated *Escherichia coli aroA* mutant vaccine strain from field isolates in chickens [J]. PLoS One, 2022, 17(12): e0278949.

[ 16 ] GORAICHUK I V, HARDEN M, SPACKMAN E, et al. The 28S rRNA RT-qPCR assay for host depletion evaluation to enhance avian virus detection in Illumina and Nanopore sequencing [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1328987.

[ 17 ] WULSTEN I F, THIECK M, GÖHLER A, et al. Chicken skin decontamination of thermotolerant *Campylobacter* spp. and hygiene indicator *Escherichia coli* assessed by viability real-time PCR [J]. Pathogens, 2022, 11(6): 706.

[ 18 ] FANCHER C A, THAMES H T, COLVIN M G, et al. Prevalence and molecular characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli* in “No Antibiotics Ever” broiler farms [J]. Microbiol Spectr, 2021, 9(3): e0083421.

[ 19 ] AL-MARRI T, AL-MARRI A, AL-ZANBAQI R, et al. Multidrug resistance, biofilm formation, and virulence genes of *Escherichia coli* from backyard poultry farms [J]. Vet World, 2021, 14(11): 2869-2877.

[ 20 ] LI T, CASTANEDA C D, MIOTTO J, et al. Effects of in ovo probiotic administration on the incidence of avian pathogenic *Escherichia coli* in broilers and an evaluation on its virulence and antimicrobial resistance properties [J]. Poult Sci, 2021, 100(3): 100903.

[ 21 ] 孟庆美,王少辉,韩先干,等. 禽致病性大肠杆菌毒力基因多重 PCR 方法的建立和应用 [J]. 微生物学报, 2014, 54(6): 696-702.

## [ 引用本文 ]

林蔚,武景琦,杨佳美,等. 针对禽致病性大肠埃希菌 *ISS* 及 *ompT* 基因的 TaqMan 双重荧光定量 PCR 方法的建立及应用 [J]. 实验动物科学, 2026, 43(1): 22-27.

LIN W, WU J Q, YANG J M, et al. Development and application of a TaqMan dual-fluorescence quantitative PCR method targeting the *ISS* and *ompT* genes of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) [J]. Lab Anim Sci, 2026, 43(1): 22-27.

DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2026.01.004.