

赴美猪病实验室诊断技术学习考察报告

Trip report of Chinese swine disease lab tech study team to the U.S.

大型养猪公司猪病诊断实验室技术赴美学习班

执笔: 伍少钦 樊福好

应美国谷物协会 (USGC) 北京办事处的邀请, 广东、广西、海南和河南等大型规模猪场和研究机构的7名专业兽医人员2006年7月23日至8月6日赴美参加了《大型养猪公司猪病诊断实验室技术学习班》。此次学习主要分为两个阶段, 第一阶段在明尼苏达州, 分别在明尼苏达大学兽医学院、明尼苏达州2家执业兽医诊所和明尼苏达州一家农场; 第二阶段是在爱荷华州立大学兽医学院。

7月25日, 在明尼苏达大学兽医学院的紧张学习正式开始, 一直持续到7月31日。经朱汉守教授的合理安排、郭学武和HyunBum Kim等研究生的协助下和其他老师的积极配合, 一周时间里我们学到了很多理论知识和实验室操作技能。

在朱教授的实验室, 我们观察并操作猪肺巨噬细胞采集全过程和进行巨噬细胞培养的实验; 观察用于细胞培养的猪肾组织的采集和进行猪肾细胞的培养实验。在实验的等待过程中, 朱教授为我们讲授猪病病毒学方面的知识, 包括病毒的结构、病毒的分类、细胞的培养、病毒的培养的基本设备、如何防止细胞培养中的污染、病毒病的诊断方法 (IFA、IPMA 等)、田间样品病毒的处理等。

在Marie Gramer博士的带领下, 我们参观了兽医学院诊断中心的血清学、分子生物学、细菌培养等实验室, 观察了外来样品接收、剖检取材和无害化处理等设施。Simone Olivier博士给我们讲述了猪场常见细菌病的病原 (副猪嗜血杆菌、猪放线杆菌、猪链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等) 和临床危害, 以及如何进行分离培养、鉴别。在细菌学实验室, 我们察看了她们用麦康凯、绵羊血琼脂、巧克力琼脂、亮绿琼脂等培养基培养的副猪嗜血杆菌、猪放线杆菌、猪链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌等细菌的不同菌落和形态; 有些细菌只能在特定的培养基上生长, 比如副猪嗜血杆菌要用绵羊血琼脂培养基, 并且只在葡萄球菌线周边生长。同时, 观看她们近段时间对这些细菌做的生化鉴定试验。然后我们做了副猪嗜血杆菌的培养和相关细菌的药敏试验 (第二天上午观察结果), 每人还对大肠杆菌、副猪嗜血杆菌等细菌进行革兰氏染色, 并用显微镜进行观察。

在朱教授的指导下, 我们用免疫荧光抗体 (IFA) 方法检测 Marc-145 细胞中的 PRRS 病毒, 用免疫过氧化酶单层细胞试验 (IPMA) 的方法检测感染 PCV-2 的 PK-15 细胞中的病毒。实验的结果相当成功, 只是在做 IPMA 试验时, 由于显色剂的年代过久, 显色结果不是很理想。在实验的等待过程中, 朱教授给我们讲授 PRRS 病毒的分类, 感染细胞产生的病变, 临床病变, 血清学检测的方法及诊断等。接近中午时, 我们去细菌学实验室观看了昨天细菌培养和药敏试验的结果。下午接着做上午的试验, 实验等待过程中, 朱教授继续给我们补充理论知识, 主要讲授了与 PCV-2 相关的 PMWS 和 PDNS 两种疾病, 指出 PCV-2 疫苗对防治 PCV-2 相关疾病有一定的作用。美国的富道公司已经获许生产 PCV-2 疫苗, 英特

威公司正在做临床中试，根据部分用户的使用反馈，疫苗的效果不错。

在兽医科学楼229室。给我们学习了分子诊断的有关技术，包括限制性内切酶消化的注意事项、引物设计所需的一些软件以及设计中的一些常识，之后带领我们做了一个限制性DNA内切酶酶切的试验。同时给我们介绍了分子诊断中心（对外服务）主要开展PRRS（常规定性PCR、区分北美和欧洲型、实时定量PCR、序列分析等）、PCV（II型PCR、I和II通用PCR、II型序列分析）和SIV（常规定性PCR、亚型鉴定、序列分析）的分子诊断。我们还详细了解了样品的采集和来源，由于同生产实际联系紧密，引起大家的兴趣。在我们的要求下，当天下午我们参观了他们PCR样品采集、接收和处理的全过程，给我们演示了ABI 7500实时PCR的操作过程和原理。明尼苏达大学兽医学院分子诊断中心PRRS方面的诊断在美国享有盛誉，根据送检的样品（一般为血清、精液、血拭子和组织等），多次给客户提出PRRS将要爆发的正确预警，为客户挽回不少经济损失。Kay S. Faaberg博士（分子诊断中心的负责人）给我们讲述了猪病毒病的分子诊断方面的知识，着重讲述了PRRSV北美株的进化史和欧洲株在北美的演化。应我们的要求，她还特别讲了猪流感（SIV）的研究进展。

我们以猪伪狂犬病病毒（PRV）为代表做了一个最佳抗原浓度和最佳联结物浓度的ELISA筛选试验。实验等待过程中，朱教授给我们讲授了血清学方法和血清学诊断在猪病上的应用，着重讲述了血清学诊断（ELISA）在清除净化PRV中的作用。我们还学习了检测细小病毒（PPV）的血凝实验、检测SIV的血凝抑制试验和检测PPV抗体的琼脂扩散实验。在实验等待期间，朱教授给我们讲述流感病毒的进化，猪流感的临床症状，猪流感的诊断、流感对美国养猪业的危害以及流感疫苗在美国的使用情况等。

在明尼苏达州Mankato市，参观了MJ Biologics实验室；在朱教授的帮助下，该实验室开发出PRRS多毒株的自家灭活结构蛋白疫苗，同普通的PRRS疫苗相比，该产品含有更多的抗原成份以及具有更广泛的预防作用。接近中午时，我们到达位于Worthington市的Prairie Holdings Center，Wayne Freese首席执行官给我们做集团公司的简介，然后带我们参观他们的实验室。下午Wayne Freese先生带领我们参观中心下的一个执业诊所，诊所内不仅有一些常规的检测设备，还有用于生产灭活自家苗（细菌苗和病毒苗）的完善设备。

在Mapleton市Fitzsimmons博士的一家农场，他首先介绍公司的生产经营模式和生产工艺（采用三点式生产）以及他们猪场的疫苗药物使用情况，据他介绍，每头猪出保育前的药物疫苗费用仅为50-75美分。我们去他的保育舍和育肥舍内进行参观，猪舍配有自动加药系统，全部采用漏缝地板，猪舍内的氨味很浓，奇怪的是猪的健康度竟然很好。下午Mark Fitzsimmons博士和我们一起剖检了10多头产房刚断奶下来不久的病死猪，症状不怎么典型，怀疑有猪放线杆菌和巴氏杆菌的继发感染。下午15:30左右，我们依依不舍地与朱汉守教授道别，他悉心安排了我们9天的学习项目。15:40我们前往爱荷华州Ames市的爱

荷华州立大学。

8月3日，在Mabry教授的带领下，我们见到爱荷华州立大学兽医学院的Hoffman主任（兽医微生物学专家），尹敬镇教授（病毒学和分子生物学主任）和Jordan博士。首先由Hoffman主任给我们介绍兽医学院的历史，然后带领我们认路（浏览一下各个实验室的大概方位），这是兽医学院新生入学第一天的传统，因为兽医学院的地形相当复杂，一不小心就会迷路，同时我们在图书馆内参观了R. Allen Packer 兽医文物室。认路回来后，尹敬镇博士给我们简要讲了一下猪流感的情况，然后带我们现场参观血清学实验室（观看猪布病的纸片平板凝集和试管凝集试验，猪流感的琼脂扩散试验）。下午Jordan博士带我们参观剖检取材实验室，并和她一起做实地剖检取材实习，样品分别用于血清学检测、病理组织切片和PCR检测等。

我们参观了病毒学和分子生物学实验室，在这里我们看到了ABI 7500的实时PCR和ABI 7900HT序列检测仪，用于冰冻切片免疫组化和免疫荧光的相关仪器。紧接着尹博士还带我们参观了他们的细菌培养和鉴定实验室，在这里我们看到了昨天剖检的病料已经送到这里进行了细菌的培养。下午Derald Holtkamp博士为我们做了一个《利用诊断检测的基本原则》的专题报告。最后Jordan博士给我们讲解昨天下午的剖检病例，由于PCR的结果还没出来，因此不能做出最终的病理学诊断。

8月6日回到北京。短短的十多天的学习参观，由于内容安排得十分紧凑，我们学到很多新理论和操作技能，这对以后在猪场条件下开展实验室猪病的诊断是非常有益的。