

团 体 标 准

T/CVMA××××—2021

犬利什曼病诊断技术规范

Diagnostic technical specification for canine leishmaniasis

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中国兽医协会

发布

目 次

前言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 诊断依据.....	1
4.1 流行病学.....	1
4.2 临床表现.....	1
4.3 实验室检查.....	1
5 诊断原则.....	2
6 诊断标准.....	2
6.1 疑似病例.....	2
6.2 临床诊断病例.....	2
6.3 确诊病例.....	2
7 鉴别诊断.....	2
附 录 A（规范性） 细胞学样本采集和制备方法.....	3
附 录 B（资料性） 犬利什曼病巢式 PCR 检测方法.....	5

前 言

本标准文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规定起草。

本文件由北京中农大动物医院有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国农业大学、北京中农大动物医院有限公司、北京小动物诊疗行业协会。

本文件主要起草人：刘洋、夏兆飞、吕艳丽、刘钢、林嘉宝、许楚楚、张海霞、陈丝雨。

中国兽医协会
CVMA

犬利什曼病诊断技术规范

1 范围

本文件规定了犬利什曼病的诊断依据、诊断原则、诊断标准和鉴别诊断。
本文件适用于对犬利什曼病的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 15986 黑热病诊断标准及处理原则

WS 258 黑热病诊断标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

无鞭毛体 amastigote

利什曼原虫寄生于人和犬巨噬细胞内、无运动能力的生活阶段，虫体呈卵圆形，鞭毛不伸出体外。

3.2

前鞭毛体 promastigote

利什曼原虫寄生于白蛉消化道内或在培养基内的生活阶段，虫体呈梭形，较无鞭毛体大，鞭毛自虫体前端伸出，具有运动能力。

4 诊断依据

4.1 流行病学

生活在利什曼病流行区内，或在白蛉季节内（5~9月）曾进入流行区的犬只。

4.2 临床表现

患犬出现皮肤结痂或溃疡、局部或广泛性淋巴结增大、发热、体重下降、食欲下降、运动不耐受、脾脏增大、鼻衄、眼部病变等。患犬也可不出现临床症状。

4.3 实验室检查

4.3.1 全血细胞计数

患犬可出现贫血、白细胞增多或减少、血小板减少。

4.3.2 血清生化

典型的生化异常为高蛋白血症、高球蛋白血症、低白蛋白血症和低白蛋白/球蛋白。根据器官受累的情况，还可能出现氮质血症、丙氨酸氨基转移酶和碱性磷酸酶等肝脏漏出酶或胆汁淤积酶的升高。

4.3.3 血清蛋白电泳

多克隆的 β 球蛋白和 γ 球蛋白升高，也可出现单克隆 γ 球蛋白升高。

4.3.4 细胞学检查

来源于皮肤、淋巴结、脾脏或骨髓等部位的细胞学涂片上观察到利什曼原虫无鞭毛体。细胞学样本采集见附录A。

4.3.5 组织病理学检查

从皮肤、淋巴结、脾脏或骨髓等部位采集的组织切片中观察到利什曼原虫无鞭毛体。

4.3.6 血清学检查

用间接荧光抗体试验（IFA）、酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫色谱法等方法检测患犬外周血中的循环抗体，检测结果为阳性。犬利什曼病的血清学检查见GB 15986-1995附录B或WS 258-2006附录B。

4.3.7 核酸检测

利什曼原虫核酸用聚合酶链式反应（PCR）检测呈阳性，推荐方法参见附录B。

5 诊断原则

根据患犬流行病学、临床表现和实验室结果进行综合判断，病例确诊需要实验室证据。

6 诊断标准

6.1 疑似病例

符合4.1、4.2、4.3.2和4.3.3。

6.2 临床诊断病例

疑似病例同时符合4.3.6。

6.3 确诊病例

临床诊断病例同时符合4.3.4、4.3.5和4.3.7中至少一条。

7 鉴别诊断

犬利士曼病应与犬埃利希体病、钩端螺旋体病、组织细胞增多症、皮肤淋巴瘤、肥大细胞瘤、蠕形螨等相鉴别。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
(规范性)
细胞学样本采集和制备方法

A. 1 准备工作

A. 1.1 材料准备

晾片板、载玻片、6~12mL注射器、20~23G针头、钝手术刀片、电推剪。

A. 1.2 操作人员准备

核对病例及病变信息后，将6~10张载玻片平摊在晾片板上备用，将注射器和针头连接备用。

A. 1.3 动物准备

根据采样部位选择保定姿势对动物进行保定；若动物不配合或待采样部位操作受限，可对动物镇静或麻醉后进行采样。采样部位剃毛，酒精棉消毒。

A. 2 样本采集和涂片制备

A. 2.1 皮肤样本

皮肤病变可采用刮片法进行。用钝手术刀片垂直于皮肤病变表面刮取数次，将刀片上获得的样本涂抹至载玻片上。

A. 2.2 淋巴结和脾脏样本

淋巴结和脾脏样本宜在超声引导下采用非负压式细针抽吸法进行：

- a) 超声确定穿刺部位后对待穿刺处皮肤进行术前消毒。
- b) 左手固定病变或进针位置。
- c) 右手持连接针头的注射器，不向注射器施加负压。
- d) 保持针头在病变内，将针头朝不同方向来回移动 8~10 次，或在针头中观察到样本即可停止。
- e) 拔出针头和注射器，用干棉球按压进针位置。
- f) 分离针头和注射器，将注射器抽入空气后，再次连接针头和注射器，推动针栓，将注射器内样本转移至载玻片上。
- g) 若载玻片上的样本较多，可另取一张载玻片，十字交叉置于前一载玻片和样本之上，待样本完全散开之前，水平移动第二张载玻片，细胞学样本即可均匀而分散地分布于载玻片表面。
- h) 若载玻片上的样本较少，可用注射器针尖将样本沿多个方向划拨。

A. 3 涂片染色

A. 3.1 准备材料

瑞氏-姬姆萨染液、磷酸盐缓冲液、洗耳球、染色架、计时器、吸水纸、去离子水或蒸馏水。

A.3.2 操作步骤

瑞氏-姬姆萨染色的操作步骤如下：

- a) 将风干涂片水平置于染色架上，有样本的一面朝上。
- b) 滴加瑞氏-姬姆萨染液，使其完全覆盖涂片，染色 1min。
- c) 滴加磷酸盐缓冲液，其体积约为瑞氏-姬姆萨染液的 2~3 倍，用洗耳球将二者充分混匀，染色 3~10min。
- d) 用去离子水或蒸馏水冲洗涂片，直至冲净染液。
- e) 将涂片倾斜放置于吸水纸上，自然晾干；或用吹风机冷风吹干。

A.3.3 注意事项

染色时须注意：

- a) 涂片样本应完全风干。
- b) 根据涂片厚薄、有核细胞数量多少及环境温度调整染色时间，涂片厚、有核细胞数量多及环境温度低时，可适当延长染色时间。
- c) 滴加的染液量应充足，避免染液蒸发导致染料沉淀物附着于涂片上。
- d) 染液应新鲜或定期过滤，避免形成染料沉淀物妨碍涂片观察。
- e) 不可用吸水纸覆盖在涂片上吸取水分。
- f) 不同厂家生产的染色时间稍有不同，以产品说明为准。

附 录 B
(资料性)
犬利什曼病巢式 PCR 检测方法

B.1 物品准备**B.1.1 引物设计**

本文件参照利什曼ITS-1为目的基因，推荐引物序列如表1。

表1利什曼原虫巢式PCR检测引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
LITSR	CTGGATCATTTCGATG
ITS1	TGATAACCACTTATCGCACTT
2-ITSf	CATTTTCGATGATTACACC
2-ITSr	CGTTCTCAACGAAATAAG

B.1.2 试剂与材料

乳胶手套、DNA提取试剂盒、核酸扩增预混液Premix、磷酸盐缓冲液、dd H₂O、琼脂糖、TAE溶液、核酸染料。

B.1.3 仪器与设备

II级生物安全柜、可调节微量移液器、PCR仪、微量台式离心机、微波炉、电泳仪、凝胶成像系统。

B.2 样本采集与制备

从皮肤、淋巴结和脾脏采集样本，操作方法见附录A，获得的样本转移至含有无菌磷酸盐缓冲液的离心管中。

B.3 核酸提取与扩增

提取采集样本的DNA，按照表2所示的反应体系和表3所示的反应条件进行巢式PCR。

表2犬利什曼病巢式PCR扩增体系

第一轮反应		第二轮反应	
试剂	体积	试剂	体积
DNA模板	2μL	DNA模板（第一轮产物）	1μL
Premix	25μL	Premix	12.5μL
上下游引物	各1μL	上下游引物	各0.5μL
ddH ₂ O	21μL	ddH ₂ O	10.5μL
扩增试剂总体系	50μL	扩增试剂总体系	25μL

表3犬利什曼病巢式PCR反应条件

步骤	温度	持续时间	循环次数
预变性	94℃	5min	1
变性	94℃	30s	30
退火	53℃	30s	
延伸	72℃	30s	
延伸	72℃	5min	1

注：两轮反应的条件相同

B.4 结果判定

第二轮产物目的片段大小为280~330bp，取6 μL第二轮PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，观察电泳结果，同时对PCR产物进行测序，将测序结果与GenBank中的利什曼原虫序列进行Blast比对。目的条带为阳性并且序列比对结果与利什曼原虫相符者，可判定为利什曼原虫阳性。