

犬内脏利什曼病诊断方法的研究进展

丁丹, 汪俊云*

【提要】 犬内脏利什曼病由婴儿利什曼原虫 (*Leishmania infantum*) 感染引起, 病犬和无症状感染犬是动物源型内脏利什曼病流行区人内脏利什曼病的主要传染源。对犬内脏利什曼病的诊断是控制动物源型内脏利什曼病的关键, 应高度重视诊断方法的研究。本文就犬内脏利什曼病诊断方法的研究进展作一综述。

【关键词】 犬内脏利什曼病; 诊断; 病原学方法; 分子生物学方法; 免疫学方法

中图分类号: R531.6 文献标识码: A

Research Progress on the Diagnosis Technology of Canine Visceral Leishmaniasis

DING Dan, WANG Jun-yun*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Canine visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania infantum*. Infected dogs, either symptomatic or asymptomatic, are considered as the major reservoirs for zoonotic visceral leishmaniasis. Accurate and rapid detection of canine leishmanial infection is crucial for control of human visceral leishmaniasis due to its role in the transmission of the infection to vectors. Various techniques based on parasitology, immunology and molecular biology have been studied and evaluated for detecting canine leishmanial infection. This article reviews the progress in techniques and methods for its diagnosis.

【Key words】 Canine visceral leishmaniasis; Diagnosis; Parasitological method; Immunological method; Molecular method

Supported by the National Science and Technology Major Project (No. 2012ZX10004-220)

* Corresponding author, E-mail: wangjy0@yahoo.com.cn

内脏利什曼病 (visceral leishmaniasis) 又称黑热病 (kala-azar), 是由亲内脏的利什曼原虫虫种杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 和婴儿利什曼原虫 (*L. infantum*) 寄生于人体巨噬细胞所引起的一种严重危害人群生命和健康的人兽共患寄生虫病, 由媒介白蛉传播。内脏利什曼病可区分为人源型和动物源型。动物源型内脏利什曼病是由婴儿利什曼原虫感染所致, 犬是主要传染源^[1]。此型内脏利什曼病危害最严重, 分布最广, 波及北非、亚洲、欧洲和南美。犬感染利什曼原虫后的主要症状为局部或全身淋巴结肿大、体重明

显下降、肝脾肿大、鼻衄、角膜结膜炎、皮毛无光泽或脱落等。大部分犬感染利什曼原虫后, 在较长的时间内无症状, 无症状感染犬与有症状犬一样, 均可成为传染源^[2]。由于无症状感染犬在群体中所占比例较大, 因此在疾病传播中起重要作用。清除病犬和无症状感染犬是防治人类内脏利什曼病的优先策略, 尤其是对无症状感染犬的早期诊断最为关键, 因此, 对犬内脏利什曼病诊断方法的研究受到同行高度重视, 病原学方法、分子生物学方法和免疫学方法均有应用。

1 病原学方法

1.1 镜检法 镜检法是将骨髓、淋巴结或脾穿刺物涂片, 外周血 (peripheral blood, PB) 和皮肤材料也有应用, 涂片干燥后甲醛固定, 一般用吉氏染液染色, 镜检, 观察到无鞭毛体则判为阳性。该方法以查出病

基金项目: 国家科技重大专项 (No. 2012ZX10004-220)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: wangjy0@yahoo.com.cn

原体为诊断依据,故特异性高,但其敏感性随所观察视野的数量和镜检者的技能经验而异。镜检法检测有症状感染犬的敏感性远高于无症状感染犬。Giudice 等^[3]对 1 438 只犬进行外周血涂片检测,婴儿利什曼原虫感染检出率仅为 0.28%。Saridomichelakis 等^[4]对 79 只有症状感染犬和 52 只无症状感染犬进行淋巴结和骨髓穿刺物涂片镜检,无症状感染犬的敏感性 (27.6%) 低于有症状感染犬的敏感性 (94.7%)。增加观察时间和视野数可提高检查的敏感性。

近年发展起来的血块黄层定量 (quantitative buffy coat, QBC) 技术,即取外周血离心分离白细胞,吖啶橙染色后在荧光显微镜下观察无鞭毛体,可显著提高检测的敏感性。Liarte 等^[5]应用 QBC 技术检测 28 只利什曼原虫感染犬的外周血,结果 27 只为阳性,敏感性达 96%。

1.2 培养法 将犬的脾、肝和淋巴结等穿刺物或组织材料接种于培养基中,置 22~25 °C 培养,2 周后取培养液在倒置显微镜下观察,每周检查 1 次,连续培养观察 1 个月,若查到前鞭毛体则判为阳性,4 周后仍未观察到原虫,可判定为阴性结果。采用单相培养基 (如 Schneider 培养基、M199、RPMI 1640、Grace 培养基) 或双相培养基 (如 NNN (Nory-MacNeal-Nicoll) 培养基)。Barrouin-Melo 等^[6]采用添加 10% 胎牛血清的 Schneider 培养基培养 64 只血清阳性犬的脾脏和腿弯处淋巴结穿刺物,结果 11 只犬的脾脏和淋巴结穿刺物培养均为阳性,36 只犬仅脾脏穿刺物培养阳性,1 只犬仅淋巴结穿刺物培养阳性,因此脾脏穿刺物的敏感性为 97.7% (47/48),高于淋巴结的敏感性 25% (12/48),表明脾脏穿刺物诊断的敏感性高。培养法可提高检出率,但耗时耗力,较不适用于现场诊断。

1.3 动物接种法 将犬的脾、淋巴结和骨髓等组织材料接种于易感动物 (如金色地鼠和 BALB/c 小鼠等),1~2 个月后取接种鼠的肝和脾组织涂片,检查有无鞭毛体。此法耗时较长,较不适用于临床诊断。

1.4 组织病理检查 将犬的组织材料用甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素-伊红 (HE) 染色后,观察有无鞭毛体。Xavier 等^[7]取 29 只已确诊为感染利什曼原虫犬的皮肤组织进行 HE 染色,结果 13 只为阳性,敏感性为 44.8%。Bourdoiseau 等^[8]对血清阳性犬的 34 份皮肤样品和 15 份淋巴结样品进行 HE 染色,敏感性分别为 32.4% (11/34) 和 8/15。因此,组织病理学检查虽特异性较高,但敏感性仍较低,不常用。

综上所述,病原学检查特异性高,目前仍是金标准方法。但由于利什曼原虫在犬体内分布广,单一组织取样镜检往往检出率较低,且取样和检查过程较为

繁琐,对操作人员要求较高,若虫荷低,会出现假阴性结果,降低敏感性。

2 分子生物学方法

2.1 杂交法

2.1.1 Southern 印迹杂交法 Southern 印迹杂交是将电泳分离的待测 DNA 片段结合到固相支持物上,与存在于液相中标记的特异核酸探针进行杂交,具有敏感、特异的特点。若与 PCR 法结合使用,可进一步提高检测的敏感性。Ferreira 等^[9]收集 23 只血清阳性犬的 PB、滤纸干血清 (filter paper, FP) 和眼结膜拭子 (conjunctival swab, CS),采用酚抽提法和煮沸法分别提取核酸,两组均进行 PCR 和 PCR 结合 Southern 杂交法检测。酚抽提法组 PCR 检测, PB、FP 和 CS 等 3 种样品的检出率分别为 13%、8.7% 和 73.9%; PCR 结合 Southern 杂交法检测,检出率分别为 21.7%、30.4% 和 91.3%,高于 PCR 检测法。煮沸法组也得到同样结果,表明 Southern 杂交法与 PCR 结合可提高检测敏感性。

2.1.2 斑点杂交 斑点杂交是直接将被测 DNA 或 RNA 固定在滤膜上,与标记的特异核酸探针进行杂交。同 Southern 杂交法一样,常与 PCR 联用,可进一步提高检测的敏感性。Reale 等^[10]对 52 只犬的外周血和淋巴结穿刺物进行 PCR 和 PCR-斑点杂交检测,结果后者的敏感性比前者高 3%。王子龙等^[11]用生物素标记动基体 DNA (kinetoplast DNA, kDNA) 探针对甘肃文县 30 只家犬耳缘皮肤组织印迹进行杂交试验,检出阳性率为 26.7%,与骨髓涂片法结果有较高的一致性。该方法具有简单快速、结果易于观察等优点。

2.2 PCR 法 利什曼原虫具有独特的线粒体——动基体,其 DNA (kDNA) 占细胞总 DNA 的 20%。kDNA 是由成千上万拷贝的小环与拷贝数较少的大环,拓扑学上互相连环形成巨大的有高度组织结构的盘状网络,其中 95% 为小环。所有利什曼原虫小环有几个区域的 DNA 序列高度保守 (约 100~200 bp 的序列具有 85%~90% 的保守性),其余序列则显示高度异质性。因此,利什曼原虫 kDNA 作为检测靶应用于检测显示较高的优越性^[12]。其他的一些重复 DNA 序列,如小亚单位核糖体核糖核酸 (SSrRNA)^[13] 和剪接前导序列 (spliced-leader RNA, SLRNA)^[14] 等也可作为检测靶分子,但由于 kDNA 具有高拷贝数,使其在敏感性方面更具优势。Lachaud 等^[15]以犬外周血为材料,以 16S rRNA 和 kDNA 为靶基因进行核酸扩增,其检出限分别为 5 个原虫/ml 血和 0.001 个原虫/ml 血,后者的敏感性远高于前者。Oliveira 等^[16]用 5 种不同的引物,分别以动基体 DNA 为靶基因设计的 4 种引物 (MP3H-MP1L、B1-B2、LBF1-LBR1

和 13A-13B 以及源自剪接前导序列的 LU5A-LB3C), 以犬外周血和皮肤为材料进行 PCR 扩增, MP3H-MP1L 的敏感性最高 (检出限为 2 fg DNA)。高春花等^[17]以 kDNA 为检测靶对甘肃文县 79 只无症状犬的外周血进行检测, 其检出限达 0.1 个原虫/ml 血。近年来, 有研究采用犬眼结膜拭子进行 PCR 检测, 不仅采样简便, 同时显示较高的特异性和敏感性, 均约达 90%^[9,18]。

巢式 PCR (nested PCR) 使用 2 套引物 (第 2 对引物位于第 1 轮扩增产物内部) 通过 2 轮 PCR 反应, 扩增特异性的 DNA 片段, 不仅大大提高检测的敏感性, 也可提高检测的特异性。Fisa 等^[19]用巢式 PCR 法检测犬外周血, 检测的特异性为 100%, 敏感性为 95%。

2.3 实时荧光定量 PCR 技术

近年来发展的实时荧光定量 PCR 技术 (quantitative real-time PCR, qrt PCR) 是基于荧光探针或荧光染料, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线定量检测利什曼原虫, 此法可确定虫荷。Solca 等^[20]采用传统 PCR 和 qrtPCR 检测脾脏穿刺物, 敏感性分别为 88.9% 和 83.3%, 两种方法检测结果无显著差异。

目前实时荧光定量 PCR 有 2 种方法: 荧光染料掺入法和探针法。后者能与扩增 DNA 序列中的特定寡聚核苷酸序列相结合, 故特异性更高。但 Da 等^[21]以骨髓穿刺物涂片为材料, kDNA 为靶序列, *TaqMan* 荧光探针法和 SYBR Green 染料法分别进行实时荧光检测, 测得各样品的原虫数量基本相同, 且两种方法的检出限均为 0.1 个原虫或 20 ng。考虑到成本问题, 使用 SYBR Green 进行实时荧光定量 PCR 检测更为经济。

尽管基于 PCR 的扩增技术具有良好的特异性和敏感性, 但仍存在一些局限, 如需要特定仪器和优化实验条件, 产物检测繁琐, 电泳检测扩增产物使用的溴乙锭具有致癌性, 且荧光染料价格昂贵, 目前还不适于现场使用。

3 免疫学方法

3.1 检测特异抗体

3.1.1 直接凝集试验 直接凝集试验 (DAT) 常用 0.4% 胰蛋白酶处理完整前鞭毛体, 2% 甲醛固定, 加终浓度为 0.1% 的考马斯亮蓝染色, 与系列稀释的血清混匀后孵育过夜, 第 2 天观察凝集反应。在稀释血清中加 2-巯基乙醇能降低非特异性凝集, 进一步改善检测效果^[22]。Mohebal 等^[23]采用前鞭毛体制成的抗原悬液对 268 份犬血清进行 DAT 试验, 滴度为 1:320 时, 敏感性为 70.9%, 特异性为 84.9%。Oskam 等^[24]采用杜氏利什曼原虫前鞭毛体制成的冻干抗原对 247 份犬血清进行

DAT 检测, 当滴度为 1:640 时, 其敏感性为 100%, 特异性为 98.8%。尽管 DAT 经济、操作简便, 但耗时费力。快速凝集筛查试验 (fast agglutination screening test, FAST) 是在 DAT 基础上发展起来的快速 DAT 检测方法, 可在更小的体积内容纳更多的抗原, 3 h 内即可完成检测, 适用于大规模的流行病学调查。Babakhan 等^[25]采用 FAST 检测 73 只 DAT 检测阳性的有症状犬和 74 只 DAT 检测阴性的无症状犬的血清, 当滴度为 1:160 时, FAST 的敏感性和特异性分别为 98.6% 和 78.7%, 与 DAT 检测的符合率为 86.6%。Gomez-Ochoa 等^[26]应用快速 DAT 检测 139 只利什曼原虫感染犬和 150 只非感染犬的血样, 敏感性和特异性分别为 100% 和 98.7%, 与传统 DAT 法检测效能相当。

3.1.2 间接免疫荧光抗体试验 间接免疫荧光抗体试验 (IFAT) 以前鞭毛体或无鞭毛体为抗原, 以荧光标记的第二抗体识别检测血样中与利什曼原虫特异结合的抗体, 于荧光显微镜下观察检测结果。Figueiredo 等^[27]应用 IFAT 法检测 305 只犬的血清, 当取 1:40 和 1:80 的滴度为阳性阈值时, 特异性分别为 65.5% 和 83.4%, 敏感性均为 100%。Fernandez-Perez 等^[28]采用前鞭毛体和无鞭毛体为抗原对 35 只犬进行 IFAT 检测, 当滴度为 1:800 时, 后者检出率为 83%, 高于前者 (71%)。Guillen 等^[29]以婴儿利什曼原虫前鞭毛体和灭活的感染埃立克体细胞为抗原作 IFAT 检测, 结果敏感性为 100%, 检测婴儿利什曼原虫和埃立克体的特异性分别为 100% 和 98.5%, 表明应用该法可对犬婴儿利什曼原虫感染和埃立克体感染进行鉴别检测。总体来说, IFAT 法检测显示了较好的敏感性和特异性, 但需要昂贵的设备, 在基层推广应用受到局限。

3.1.3 ELISA 试验 ELISA 试验是将抗原-抗体的特异性反应与酶-底物的高效催化产物作用相结合的敏感检测方法, 在疾病检测中应用广泛, 同样也应用于犬利什曼原虫感染的检测。在检测犬利什曼原虫感染应用中所使用的抗原, 有粗抗原、纯化抗原、合成多肽和重组抗原等。

Ribeiro 等^[30]采用恰氏利什曼原虫和巴西利什曼原虫粗抗原, 分别检测 93 只犬的血清 (37 只感染恰氏利什曼原虫、4 只恰氏利什曼原虫和巴西利什曼原虫复合感染、17 只健康犬和 35 只感染埃立克体犬), 结果采用恰氏利什曼原虫粗抗原的滴度更高, 敏感性更高。Mohammadi 等^[31]采用粗抗原对 60 只有症状感染犬和无症状感染犬做血清甘露糖受体 ELISA 检测, 有症状犬和无症状犬的敏感性和特异性均相同, 分别为 77.8% 和 100%。粗抗原虽然敏感性较高, 但易与其他犬类疾病 (如立克次体病、埃立克体病和弓形虫病等) 产生

交叉反应, 并且使用粗抗原也不易标准化。

为克服应用粗抗原进行检测的缺点, 重组抗原的应用受到高度重视, 目前已对多种重组抗原 (rLdA2、rLiP0、rLiP2a、rLiP2b、rHSp83、rHSp70、rLiH3、LI gp63、KMP-11、rPSA、rk9、rk26、rk39、rk40 和 LicTXNPx 等) 的检测价值进行了评价, 发现 rk39 检测效能最好, 应用最为广泛。Porrozzi 等^[32]采用粗抗原、rk26、rk39 和 rA2 抗原, 检测 139 只犬 (50 只无症状感染犬、50 只有症状感染犬、20 只健康犬和 14 只患其它疾病犬) 的血清, 结果用 rk39 检测有症状犬的敏感性最高, 为 100%; 用 rk26、粗抗原和 rA2 则依次为 94%、88% 和 70%。由于感染犬的体液免疫反应具有个体差异, 单一重组抗原检测虽特异性提高, 但在检测的敏感性方面有局限, 因此制备复合重组抗原以提高检测的敏感性^[32-34], 目前已构建了多种复合重组抗原, 如 rLiP2a-rLiP2b-rLiP0-rLdA2 已商品化应用。Boarino 等^[34]构建并应用复合重组抗原 k9-k39-k26 对 343 只犬血清进行间接 ELISA 检测, 结果敏感性为 96%, 特异性为 99%, 显示了良好的应用前景。

3.1.4 免疫层析试条法 试条法具有操作简单快速、检测结果判断直观等特点, 受到广泛重视。目前已有应用 rk39 和 rk26 研制的免疫层析试条。Lemos 等^[35]应用 rk39 试条检测巴西两个流行区的 76 只利什曼原虫感染犬和 30 只非流行区犬, 结果敏感性为 83%, 特异性为 100%。Da 等^[36]采用 rk26 和 rk39 两种试条检测 114 只犬, 敏感性分别为 96% 和 94%, 特异性均为 100%。

以上以检测特异抗体的免疫学检测方法大都显示较好的敏感性, 受到广泛应用, 但这些方法均无法区分既往感染和现症感染, 还可能与犬立克次体病、埃立克体病和弓形虫病等存在交叉反应, 导致假阳性。

3.2 检测特异抗原

3.2.1 蛋白质印迹技术 蛋白质印迹 (Western blotting) 方法是在蛋白质电泳分离技术结合抗原抗体特异性反应的基础上发展起来的一项检测技术, 可借助特异性抗体来识别特定电泳条带 (特定抗原组分) 进行诊断, 该技术具有高敏感性和特异性的特点。当血清抗体滴度非常低时应用此技术检测更具优越性。Rami 等^[37]用 Western blotting 分析婴儿利什曼原虫粗抗原的蛋白组分, 分离出 50 多条蛋白条带, 其相对分子质量 (M_r) 为 12 000~170 000, 其中能被婴儿利什曼原虫感染犬的血清识别的蛋白组分有 37 种, M_r 为 14 000~91 000。当感染犬血清滴度为 1:6 400 时, M_r 为 14 000 和 16 000 的特异抗原仍可出现显色条, 敏感性最高为 100%, 且与其他未感染犬的血清反应, 特异性为 100%, 提示 M_r 为 14 000 和 16 000 的蛋白片段具有诊断价值。

3.2.2 单克隆抗体抗原斑点试验 单克隆抗体能识别单一抗原表位, 应用于诊断则显示高特异性的特点。研究者应用单克隆抗体抗原斑点试验法 (McAb-AST), 检测 10 只试验感染犬血清, 感染 5 d 后即出现阳性反应^[38], 表明该法可用于早期诊断。

3.2.3 免疫组织化学法 免疫组织化学法常作为经 HE 染色后样品确诊的辅助方法, 能对组织或细胞内的抗原进行定性和定位, 甚至定量分析。常见的有免疫荧光法和酶标法。Moreira 等^[39]采用直接免疫荧光法分别检测多症状感染犬、少症状感染犬和无症状感染犬的腿部淋巴结穿刺物, 其敏感性分别为 92.7%、60.0% 和 73.9%。Bourdoiseau 等^[8]使用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物法检测血清阳性犬的皮肤切片, 其敏感性为 52.9%, 高于 HE 染色。Xavier 等^[7]采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法也得到同样结果。

4 结语

动物源型内脏利什曼病是一种危害严重的人兽共患寄生虫病, 犬为主要传染源, 快速准确地诊断/检测病犬和无症状感染犬对控制该病具有重要意义。现有的诊断/检测方法均存在局限, 如病原学方法虽然特异, 但敏感性较差; 免疫学方法虽敏感性较好, 但特异性存在缺陷, 而检测抗体的免疫学方法不能区分既往感染和现症感染; 分子生物学方法虽在检测的敏感性和特异性方面具有优势, 但所需设备和技术要求较高。因此, 具有简单、快速、特异性强、设备要求简单等优点的技术可望成为检测犬利什曼原虫感染的理想方法。

参 考 文 献

- [1] Wang JY, Cui G, Chen HT, et al. Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of China[J]. Parasit Vectors, 2012, 5: 31.
- [2] Moshfe A, Mohebbi M, Edrissian G, et al. Canine visceral leishmaniasis: asymptomatic infected dogs as a source of *L. infantum* infection[J]. Acta Trop, 2009, 112(2): 101-105.
- [3] Giudice E, Passantino A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs—Short communication[J]. Acta Vet Hung, 2011, 59(2): 205-213.
- [4] Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides IS, et al. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 73(1): 82-86.
- [5] Liarte DB, Mendonca IL, Luz FC, et al. QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: preliminary data[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2001, 34(6): 577-581.
- [6] Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, et al. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004, 99(2): 195-197.
- [7] Xavier SC, De Andrade HM, Monte SJ, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions

- as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods [J]. BMC Vet Res, 2006, 2: 17-24.
- [8] Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes[J]. J Vet Diagn Invest, 1997, 9(4): 439-440.
- [9] Ferreira SA, Ituassu LT, De Melo MN, et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil[J]. Vet Parasitol, 2008, 152(3-4): 257-263.
- [10] Reale S, Maxia L, Vitale F, et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(9): 2931-2935.
- [11] Wang ZL, Hu XS, Lin FQ, et al. A preliminary survey of canine leishmaniasis by kinetoplast DNA touch blot hybridization[J]. Endemic Dis Bull, 1991, 6(2): 47-50. (in Chinese)
(王子龙, 胡孝素, 林芳清, 等. 皮肤组织印迹杂交法诊断犬利什曼病研究初报[J]. 地方病通报, 1991, 6(2): 47-50.)
- [12] Gao CH, Wang JY. Kinetoplast DNA of *Leishmania* spp. and its application[J]. Foreign Med Sci Parasit Dis, 2005, 32(1): 29-33. (in Chinese)
(高春花, 汪俊云. 利什曼原虫动基体 DNA 及其应用[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2005, 32(1): 29-33.)
- [13] Ica A, Inci A, Yildirim A, et al. Investigation of canine leishmaniasis by nested-PCR in Kayseri and vicinity[J]. Turkiye Parazitoloj Derg, 2008, 32(3): 187-191.
- [14] Reale S, Maxia L, Vitale F, et al. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(9): 2931-2935.
- [15] Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, et al. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers[J]. Parasitology, 2002, 125(Pt 3): 197-207.
- [16] Oliveira DM, Lonardon MV, Teodoro U, et al. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis [J]. Braz J Infect Dis, 2011, 15(3): 204-210.
- [17] Wang JY, Chen SB, Gao CH, et al. Survey on the *Leishmania infantum* asymptomatic infection in dogs in Wenxian county of Gansu Province[J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(8): 734-737. (in Chinese)
(汪俊云, 陈生邦, 高春花, 等. 甘肃文县婴儿利什曼原虫无症状感染犬的检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(8): 734-737.)
- [18] Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs[J]. J Infect Dis, 2004, 189(9): 1729-1733.
- [19] Fisa R, Riera C, Gallego M, et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates[J]. Vet Parasitol, 2001, 99(2): 105-111.
- [20] Solca MS, Guedes CE, Nascimento EG, et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs[J]. Vet Parasitol, 2012, 184(2-4): 133-140.
- [21] Da SR, Amorim AC, Brandao RM, et al. Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs [J]. Ann Trop Med Parasitol, 2010, 104(2): 137-143.
- [22] el Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, et al. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(10): 2252-2257.
- [23] Mohebbali M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination [J]. Vet Parasitol, 2004, 121(3-4): 239-245.
- [24] Oskam L, Slappendel RJ, Beijer EG, et al. Dog-DAT: a direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996, 16(3-4): 235-239.
- [25] Babakhan L, Mohebbali M, Akhouni B, et al. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: a comparative study using fast agglutination screening test (FAST) and direct agglutination test (DAT) in Iran[J]. Parasitol Res, 2009, 105(3): 717-720.
- [26] Gomez-Ochoa P, Castillo JA, Lucientes J, et al. Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(5): 967-968.
- [27] Figueiredo FB, Madeira MF, Nascimento LD, et al. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples [J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2010, 52(4): 193-196.
- [28] Fernandez-Perez FJ, Mendez S, De La Fuente C, et al. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence [J]. Am J Trop Med Hyg, 1999, 61(4): 652-653.
- [29] Guillen LJ, Lopez GM, Martin RE, et al. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniasis and ehrlichiosis[J]. Vet Parasitol, 2002, 109(3-4): 185-190.
- [30] Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, et al. Use of ELISA employing homologous and heterologous antigens for the detection of IgG and subclasses (IgG1 and IgG2) in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis [J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2011, 53(5): 283-289.
- [31] Mohammadi-Ghalehbin B, Hatam GR, Sarkari B, et al. A *Leishmania infantum* FML-ELISA for the detection of symptomatic and asymptomatic canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Iran[J]. Iran J Immunol, 2011, 8(4): 244-250.
- [32] Porrozzini R, Santos DCM, Teva A, et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs [J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(5): 544-548.
- [33] Soto M, Requena JM, Quijada L, et al. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(1): 58-63.
- [34] Boarino A, Scalone A, Gradoni L, et al. Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(5): 647-653.
- [35] Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MA, et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease [J]. Acta Trop, 2008, 107(2): 205-207.
- [36] Da CR, Franca JC, Mayrink W, et al. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003, 97(6): 678-682.
- [37] Rami M, Atarhouch T, Dakkak A. Identification of two highly performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniasis[J]. Vet Parasitol, 2005, 134(1-2): 25-31.
- [38] Wang YJ, Hu XS, Lin FQ. Early diagnosis of canine leishmaniasis by McAb-AST[J]. Parasit Infect Dis, 1993, 1(2): 37-39. (in Chinese)
(王雅静, 胡孝素, 林芳清. 用 McAb-AST 对犬内脏利什曼病早期诊断的初步研究[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 1993, 1(2): 37-39.)
- [39] Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs[J]. Vet Parasitol, 2007, 145(3-4): 245-252.

(收稿日期: 2012-04-01 编辑: 张争艳)