

中疾控寄疾便函〔2020〕114号

中国疾控中心寄生虫病所关于印发黑热病防治项目工作指导方案的通知

山西省、内蒙古自治区、河南省、四川省、陕西省、甘肃省、新疆维吾尔自治区疾控中心：

2019年财政部和国家卫健委下发了《2019年基本公共卫生服务补助资金预算的通知》（财社〔2019〕52号），在7个黑热病重点流行省区开展黑热病防治项目工作。为指导各地做好黑热病防治项目工作，按照国家卫健委疾控局工作部署，我所组织制定了《黑热病防治项目工作指导方案》，现印发各单位，请参照执行。

附件：黑热病防治项目工作指导方案

中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

2020年7月6日

寄生虫病预防控制所

附件：

黑热病防治项目工作指导方案

黑热病亦称内脏利什曼病，是由媒介白蛉传播的利什曼原虫寄生于人体单核-巨噬细胞系统所引起的自然疫源性寄生虫病。近年来，我国黑热病报告病例数呈总体下降趋势，但疫点扩散，局部地区暴发风险仍然存在。为进一步加强各地黑热病防治工作，2019年财政部、国家卫健委在基本公共卫生服务项目-重大疾病与健康危害因素监测项目的“疟疾等其他寄生虫病监测”任务中安排了黑热病防治项目任务（财社〔2019〕52号），为指导各地做好黑热病防治工作，更好地完成相关公共卫生服务项目，特制定本方案。

一、项目目标

通过建立健全黑热病监测防治体系，开展病例发现与救治、宿主和媒介等流行因素监测、基层人员能力建设等工作，及时掌握疫情动态和流行因素变化，有效控制重点地区黑热病局部疫情暴发和扩散，逐步降低流行区黑热病的发病率，实现控制和消除黑热病的目标。

二、项目范围

依据我国重点地区黑热病流行现状，2019年起在黑热病重点流行区的7个省（区、市）共10个县（市）设置防治项目（见附表1）。防治项目以县（市）为单位，并根据防治工作需要调整和补充，具体项目县由中国疾控中心寄生虫病所与相关省（自治区）疾控中心沟通确定。黑热病防治项目基本情况登记入附表2。

三、项目内容（任务）及指标

在对黑热病病例、传染源犬和媒介监测基础上，通过规范治疗、媒介控制、健康教育以及人员培训等防治能力建设，不断加强黑热病防治工作。主要内容及工作指标如下：

（一）疫情监测

1、病例监测

对于确诊的病例，在诊断后 24 小时内通过中国传染病信息管理系统上报，24 小时报告率达到 100%。患者居住地县区疾控中心在病例报告后 10 天内完成《黑热病个案调查表》（附表 3），随同传染病报告卡一同逐级上报。病例流行病学个案调查率达到 100%。黑热病防治项目病例管理情况登记入附表 4。

2、人群监测

在试点县选择近五年有本地病例报告的村，以病家为中心，随机采集不少于 100 人份全血样 3~5ml，进行利什曼原虫 PCR 检测（附录 1）。其中属于 I 类流行县（区）每年监测一次，II、III 类流行县（区）每三年监测一次。

3、犬监测

对病家及其四邻的犬，采用 rK39 快速检测法筛查，并进一步做骨髓穿刺涂片查利什曼原虫。其中：I、II 类县（区）每年对上一年度有本地病例自然村的家犬全部登记，每县（区）每年监测 100 条犬，每年监测一次；III 类县（区）对最近一年有病例的所在自然村家犬全部登记，每县（区）每年监测 50 条犬，每三年监测一次（附表 5、附表 6）。

4、媒介监测

5~9 月份每月两次，采用人工小时法或者诱蛉灯法，开展媒

介种类、分布、密度、自然感染率等调查(附表 7)。其中：I，II 类县(区)每三年监测一次；III类县(区)连续监测三年。

(二) 防治措施

1、诊断治疗

依据《黑热病诊断标准 WS258-2006》，对发现的患者及时进行诊断。对诊断的疑似、临床和确诊病例按照《黑热病治疗方案》(见附录 2)进行规范化治疗。病例规范治疗率达到 95%。

2、传染源犬控制

对骨髓检测阳性、有外观症状检出利什曼原虫的犬，采取杀灭措施，消除传染源。对无外观症状，rk39 快速检测阳性，但骨髓涂片阴性犬留待观察，建议捕杀(见附录 3)。

3、媒介控制(附表 8)

(1) 人源型黑热病流行县(区)，由患者居住地县区疾控中心，在黑热病传播季节来临前，以上年度确诊的黑热病病人居住、治疗等地为中心，对半径 100 米范围内的住房、畜圈、禽舍、空房等建筑内外墙壁应用高效低毒类杀虫剂进行滞留喷洒。

(2) 野生动物源型黑热病流行县(区)，选择 1 个黑热病重点流行乡镇。在白蛉活动季节，对 3 岁以下的婴儿发放长效蚊帐 500 顶，评估蚊帐用于黑热病防治的效果。

(3) 犬源型黑热病流行县(区)，选择 1 个黑热病重点流行乡镇 1-2 个村，白蛉活动季节来临前，发放犬驱蛉项圈 1000 个，覆盖率达到 80%以上，评估驱蛉项圈用于黑热病防治的效果。同

时对村庄周围各类白蛉孳生栖息洞穴进行滞留喷洒，喷洒时间以 5 月下旬至 6 月上旬间为宜。

4、健康教育(附表 9)

对项目县（区）居民、中小学生开展黑热病防治知识健教宣传，群众知识知晓率不低于 70%。每县调查村民不少于 100 名，学生不少于 200 名。

（三）能力建设

定期对基层专业人员开展培训，各省疾病预防控制中心对项目县疾病预防控制中心和医疗机构相关人员接受黑热病防治知识、技能培训比例不低于 80%。

四、项目组织保障

项目工作的组织管理以县为主，项目县人民政府成立项目工作领导小组和技术指导小组，根据当地实际制定实施方案，并组织协调各乡镇和相关部门共同做好项目工作。所在省（区、市）卫生健康行政部门要加强对项目工作的领导、指导和支持。中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所会同省、市疾控机构对项目工作进行技术指导和业务管理。县级防治机构要将项目工作作为一项常规性的业务工作，纳入工作计划，安排技术骨干，并保持人员相对稳定，确保项目工作质量。

五、项目数据整理及上报

各项目县区疾病预防控制中心应严格按照方案要求，认真实施现场监测和控制措施，准确填写相关调查表，并安排专人负责

项目数据的收集和整理，于当年11月底前上报省级疾控中心，省级疾控中心审核、汇总形成省级数据库，于当年12月31日前上报中国疾病预防控制中心寄生虫病所。

附表：

- 附表1 黑热病防治项目县（市、区）
- 附表2 黑热病防治项目基本情况调查表
- 附表3 黑热病个案调查表
- 附表4 黑热病防治试点病例管理情况汇总表
- 附表5 犬感染情况调查记录表
- 附表6 黑热病防治项目犬监测汇总表
- 附表7 黑热病媒介白蛉密度及利什曼原虫感染情况记录表
- 附表8 黑热病防治项目媒介控制工作情况汇总表
- 附表9 黑热病防治项目健教工作情况收集表

附录：

- 附录1 多聚酶链反应（PCR）检测利什曼原虫方法
- 附录2 黑热病治疗方案
- 附录3 犬利什曼病检查方法和处理措施

附表 1

黑热病防治项目县（市、区）

| 流行类型 | 省（自治区） | 县（市、区）名 | 流行县分类 |
|--------|--------|----------|-------------|
| 人源型 | 新疆 | 喀什市 | II类县 |
| 野生动物源型 | 新疆 | 伽师县 | I类县 |
| | 内蒙 | 额济纳旗 | 发现病例即为III类县 |
| 犬源型 | 甘肃 | 宕昌县、武都区 | I类县 |
| | 四川 | 九寨沟县、汶川县 | II类县 |
| | 陕西 | 韩城市 | II类县 |
| | 山西 | 阳泉市郊区 | II类县 |
| | 河南 | 林州市 | II类县 |

附表 2

黑热病防治项目基本情况调查表

_____省（自治区、直辖市）_____市（地、州）_____县（市、区）_____

_____乡镇/街道_____村/社区

行政村编号：□□□□□□□□□□

防治试点类型：1、固定点 2、流动点

1. 自然因素

1.1 地形：①平原 ②高原③山地丘陵④绿洲⑤荒漠

1.2 经度：□□□°□□′；

1.3 纬度：□□°□□′；

1.4 海拔：_____m；

1.5 上一年度年均气温：_____℃；

1.6 上一年度年降雨量：_____ mm；

2. 人口数*

2.1 总人口数：_____；

2.2 常住人口数：_____；

3. 总户数：_____

*人口数：上一年度以县为单位人口数统计

调查人：_____

调查日期：□□□□年□□月□□日

附表 3

黑热病个案调查表

1. 基本情况:

姓名_____ 性别_____ 年龄_____ 籍贯_____ 民族_____

家长姓名_____ 联系电话_____

住址_____ 省_____ 县(市)_____ 乡(镇)_____ 村_____ 自然村(组)

身份证号码_____ 职业_____ 联系电话_____

患者家庭现住址: _____ 县_____ 乡(街道)_____ 村(居委会) _____ 自然村(组)

患者户籍所在地: _____ 县_____ 乡(街道)_____ 村(居委会) _____ 自然村(组)

2. 流行病学史

患者是否有外出史: (1) 无 (2) 有 如“有”请回答下列问题

外出地点: _____ 县_____ 乡(街道)_____ 村(居委会) _____ 自然村(组)

外出时间: _____ 年_____ 月_____ 日至_____ 年_____ 月_____ 日

患者家庭成员中是否有过黑热病病人: (1) 无 (2) 有 (3) 不知道

患者所在的自然村组中是否有过黑热病病人: (1) 无 (2) 有 (3) 不知道

本次发病属于: (1) 初发 (2) 复发

本次发病时间: _____ 年_____ 月_____ 日

如填“复发”

第一次发病时间: _____ 年_____ 月_____ 日

是否有其他慢性疾病(如艾滋病)等的感染: (1) 是 (2) 否 (3) 不知道

3. 传染源来源

是否有畜圈: (1) 是 (2) 否

畜圈距居住地的距离_____ 米

家庭是否养羊: (1) 是 (2) 否 (3) 其他_____

家庭周围是否有野生动物: (1) 是 (2) 否 (3) 不知道

是否养犬: (1) 是 (2) 否 (3) 其他_____

犬只健康情况: (1) 健康 (2) 病犬

家庭是否有白蛉: (1) 是 (2) 否 (3) 不知道

您是否曾被蚊虫叮咬: (1) 是 (2) 偶尔 (3) 经常 (4) 否 (5) 不知道

家庭是否使用蚊帐、驱蚊药等: (1) 是 (2) 否

患者是否有露宿习惯: (1) 否 (2) 是

是否有野外作业: (1) 否 (2) 是

黄昏是否经常外出: (1) 是 (2) 偶尔 (3) 经常 (4) 否

4.临床症状及实验室检测

4.1 主要临床表现（在相应的项后打√）

发热（弛张___间歇___稽留___双峰___不规则___）咳嗽___气喘___鼻钮___

牙齿出血___腹痛___腹胀___腹泻___食欲减退___消化不良___

其他症状_____

查体：全血细胞减少（红细胞___；白细胞___；血小板___）贫血___

浅表淋巴结_____

肝肿大___脾肿大___B超检查提示肝脾：_____

主要并发症：（1）无（2）有（3）不知道 如填“有”请在相应的项后打√：

肺炎___粒性白细胞缺乏症___痢疾、伤寒___肾炎___其他___

4.2 实验室检查

血常规：WBC:_____RBC:_____PLT:_____

血清总蛋白_____白蛋白___球蛋白_____

白/球蛋白比例_____

快速诊断试条（rk39）_____骨髓穿刺涂片镜检_____

穿刺物（肝脾、淋巴结、骨髓）培养_____血培养_____

PCR 检测_____

5.本次发病及治疗情况

治疗药物名称：_____治疗剂量（每天的药物用量）_____

治疗开始时间_____天

治疗结果：（1）治愈（2）好转（3）死亡 如填“死亡”请回答下列问题

死亡时间___年___月___日

死亡原因

是否为（器官移植，HIV人群）特殊人群（1）否（2）是

调查单位:_____

调查员:_____调查日期:___年___月___日

附表 4

黑热病防治项目病例管理情况汇总表

____省（区、兵团）____市（地、州）____县（市、区）

| 年份 | 总人口数 | 新发患病人数 | 药物治疗病人 人数 | 个案流调例数 | 随访病人数 | 备注 |
|------|------|--------|--------------|--------|-------|----|
| 2019 | | | | | | |
| 2020 | | | | | | |
| 2021 | | | | | | |
| 2022 | | | | | | |

注：

1. 本表由县级疾控机构分年度填报；
2. “总人口数”以上一年度统计年鉴为准；
3. 药物治疗人数，指以斯锑黑克等药物治疗患者数；
4. 个案流调例数：完成病例个案流行病学调查病例数
5. 随访病人数，指药物治疗后进行随访的患者数。

附表 5

_____县黑热病防治项目犬感染情况调查原始记录表

监测村名:

| 户主姓名 | 犬编号 | 住户地址 (门牌号码) | 犬龄 | 外观表现 (脱毛、烂鼻、指甲弯曲、脱屑、精神萎靡) | Rk39试条检测结果 (犬源型) | | 骨髓穿刺检测结果 | 备注 |
|------|-----|-------------|----|---------------------------|------------------|----|----------|----|
| | | | | | 阴性 | 阳性 | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |

备注：外观表现 (1. 脱毛 2. 烂鼻 3. 指甲弯曲 4. 脱屑 5 精神萎靡)

骨髓穿刺检测结果 (1. 阳性 2. 阴性 3. 未检测)

附表 6

黑热病防治项目犬监测汇总表

_____省（区、兵团）_____市（地、州）_____县（市、区）

| 年份 | 检测犬只数 | 阳性犬只数 | 犬阳性率 |
|------|-------|-------|------|
| 2019 | | | |
| 2020 | | | |
| 2021 | | | |
| 2022 | | | |

注：本表由犬源型黑热病流行区监测点所在县级疾控机构分年度填报；
阳性犬只数：指以rk39试纸条检测，呈阳性的犬只数。

附表 7

_____县（市）黑热病媒介白蛉密度及利什曼原虫感染情况记录表
（诱蛉灯法）

村名_____ 环境类型_____ 经纬度_____ 海拔 _____ 捕蛉日期_____

天气_____ 最高气温_____ 最低气温_____ 风速 _____ 湿度_____

捕蛉时间_____ 捕蛉人_____

| 捕蛉日期 | 蛉种 | 捕获白蛉数量（只） | | | 密度计算 （只/灯 /晚 ） | 阳性白蛉数 | 环境（1. 畜圈 2. 院落） |
|------|----|-----------|------|-------|-------------------|-------|--------------------|
| | | ♀（只） | ♂（只） | 合计（只） | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

填表人

审核人

附表 8

黑热病防治项目媒介控制工作情况汇总表

____省（区、兵团）____市（地、州）____县（市、区）

| 年份 | 村人口数 | 2岁以下儿童数 | 发放长效蚊帐数 | 病家数 | 药物喷洒病家数 | 犬只数量 | 发放犬趋龄项圈数 |
|------|------|---------|---------|-----|---------|------|----------|
| 2019 | | | | | | | |
| 2020 | | | | | | | |
| 2021 | | | | | | | |
| 2022 | | | | | | | |

附表 9

黑热病防治项目健教工作情况收集表

| 年份 | 行政村和社区总数 | 开展健康教育的行政村和社区数 | 群众健康教育调查总人数 | 群众健康教育调查合格人数 | 各级医疗卫生机构专业人员接受培训人数 | 各级医疗卫生机构专业人员培训合格人数 |
|------|----------|----------------|-------------|--------------|--------------------|--------------------|
| 2019 | | | | | | |
| 2020 | | | | | | |
| 2021 | | | | | | |
| 2022 | | | | | | |
| 2023 | | | | | | |

附录 1

多聚酶链反应 (PCR) 检测利什曼原虫方法

一、样品采集

取人或犬静脉血，每份血样不少于 2ml，注入预先加有乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) -肝素的离心管中，充分摇匀，-20℃ 保存备用。

二、DNA 抽提

取抗凝全血加 20 倍体积的红细胞裂解液[NaCl 5mmol/L，皂素 1.5% (w/v)，乙二胺四乙酸二钠 (EDTA) 1 mmol/L]，彻底混匀，置室温 20min，12000g 离心 30min，去上清，沉淀物用 PBS 同法离心洗 3 次，沉淀用 10 倍于沉淀物体积的 NET (100 mmol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris, pH7.8) 悬浮，加蛋白酶 K 和 N-lauroylsarcosine 钠盐使其终浓度分别为 0.1mg/ml 和 1.5% (w/v)，混匀，55℃ 水浴过夜。次日 100℃ 处理 10min 后以 20,000g 20℃ 离心 1 小时，上清 (含核 DNA) 吸至另一管中，沉淀 (含 kDNA) 加入 500ul NET 将其悬浮，用酚/氯仿抽提法抽提，用乙醇沉淀 DNA，沉淀的 DNA 干燥后加 TE (Tris-HCl 10 mmol/L、EDTA 10mmol/L, pH8.0) 于 -20℃ 保存备用。

三、目的片段的扩增

选用两对对杜氏利什曼原虫和婴儿利什曼原虫特异的引物进行扩增，他们是 K13A-K13B (5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3', 5'-ATTTTACACCAACCCCCAGTT-3'，扩增片段大小为 120bp)；RV1-RV2 (5'-CTTTTCTGGTCCCCGCGGGTAGG-3', 5'-CCACCTGGCCTATTTT ACACCA-3'，扩增片段大小为 145bp)。按 50μl 反应体积为例，先配置 49.5μl PCR 反应液 (含 200 μmol/L dATP/dTTP/dGTP/dCTP，200 pmol/L 引物，2mM MgCl₂，相当于 1ml 血提取的 DNA)，加封石蜡油 50μl 后置沸水煮沸 10 min，立即置于已热启动的 PCR 仪，按下述条件进行扩增反应：94℃ 变性 3min，此时加 0.5 μl Taq 酶 (5μ/μl)，再按 94℃ 30 s，59℃ 30 s，72℃ 30 s 的条件循环 40 次，随后 72℃ 再延长 10 min。反应结束后取 10μl 反应液用 2% 琼脂糖凝胶电泳检查。目的片段出现判为阳性，否则为阴性。

四、对照

用黑热病病人或利什曼病犬全血抽提的 DNA 作模板进行扩增作为阳性对照，用健康人或健康犬全血抽提的 DNA 作模板进行扩增作为阴性对照。

附录 2

黑热病治疗方案

一、葡萄糖酸锑钠（斯锑黑克）治疗

目前治疗黑热病的首选药物是葡萄糖酸锑钠。葡萄糖酸锑钠（斯锑黑克）为山东新华制药厂出品，每支 6ml，含锑量为 100mg/ml。注射后 8 小时从小便内排泄的锑量占注射总量的 80%左右，故其蓄积作用很小，不必因为蓄积毒性而采用间歇疗法。

1、六日疗法：成人总剂量 120~150mg / kg，小儿总剂量 200~240mg / kg，平分 6 次，每日肌肉或静脉注射 1 次，6 天为一个疗程。

2、三周疗法：成人 150 mg /kg，儿童 200 mg/kg，平分 6 次，每周肌肉或静脉注射 2 次，3 周为一个疗程。此法适用于体质较差或病情较重、病程较长的患者。

患者经一个疗程的葡萄糖酸锑钠治疗后半个月内复查时如体温仍高于正常，白细胞计数未见增加，脾肿依旧，原虫仍不消失，应认定为未治愈。如经治疗后体温恢复正常，一般情况和血象都好转，脾肿亦见缩小，原虫亦未查见，但间隔数月后又开始发热，脾脏增大，又能查见原虫，即为复发。上述两种病人经用相同剂量进行第二个疗程后仍有治愈的可能，治疗时，一般剂量应在六日疗法的基础上加大 1/3，改用 8 日疗法进行治疗。

葡萄糖酸锑钠治疗黑热病的毒性反应一般为发热、食欲减退、恶心、呕吐、肌肉疼痛或发生心电图 T 波倒置和 QT 间期延长等，但一般都不严重，在短期内即可消失。

禁用葡萄糖酸锑钠指征为：1、并发肺炎；2、活动性肺结核；3、急性传染病；4、有心力衰竭现象者；5、肝脏受损严重者；6、大出血时。

经葡萄糖酸锑钠三个疗程以上仍未痊愈的病人，临床上称为抗锑性病例，可采用两性霉素 B 进行治疗。

二、两性霉素 B 治疗

两性霉素 B 为七烯类抗真菌抗生素，能与真菌细胞膜的麦角固醇相结合，损害膜的正常通透性，使细胞内物质外渗，导致真菌死亡。本品可进入含有利什曼原虫的巨噬细胞内，在细胞周围的药物浓度也很高。利什曼原虫也含有麦角固醇前体，故本品对虫体可产生与真菌膜相似的损害作用。

使用方法：

1、少量递增法：开始治疗前 5 日每天依次用 0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg 和 1.0mg/kg，第 6 日起每天用 1.0 mg/kg，使注射总量达 20 mg/kg。

2、连续注射法：每天 0.75~1.0mg/kg，使注射总量达 15~20 mg/kg。

3、WHO 推荐的方法：每次用 0.5mg/kg，每日或间隔注射一次，使总剂量达 20mg/kg。药物溶于 5%的葡萄糖液内作静脉滴注，6 小时内注射完毕。在滴注过程中应注意避光。对黑热病的治愈率

一般在 95%左右。毒性反应有寒战，头痛、发热、食欲不振，贫血，肝肾功能减退和血钾下降等。口服解热止痛或抗组胺药物，可减轻其毒性反应。

三、脂质体两性霉素 B 治疗

脂质体两性霉素 B 是以脂质体作为两性霉素 B 的载体，可将药物直接运送到含有利什曼原虫的吞噬细胞内，毒性反应小而疗效高。可用 $3\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ，每日注射一次，使总量达 $15\text{mg}/\text{kg}$ 。

附录 3

犬利什曼病检查方法和处理措施

一、犬利什曼病检查采血方法

在犬主人的配合下，将犬用铁夹固定，侧卧地面，在犬前或后肢腕关节上方 2~3cm 直向上方处，用弯剪刀剪去此处的毛，用酒精棉球消毒，暴露犬正中静脉，用止血胶管勒紧前段，使血管充盈怒张。操作者手持注射器（针头 6.5~7 号），使针头与皮肤呈 35~40°角沿正中静脉刺进皮肤和血管，再以 2~5°角沿静脉平行进针，见回血后抽取采血 2ml 犬血，保存在含有 EDTA 的抗凝管中。

二、骨髓涂片的制作

取清洗过的玻片 2 张，1 张做载片，1 张做推片，要求推片的一侧边缘光滑，用右手大拇指和食指夹持推片中部，用推片的左下角刮取骨髓 1~1.5 μ L，将推片下缘平抵载玻片的中线，当骨髓在载玻片与推片之间向两侧扩展至约 2cm 宽时，使两玻片保持 25°角，从右向左迅速向前推成舌状骨髓膜。推制时速度要均匀，制成的骨髓膜应在玻片上形成一层平铺的骨髓细胞，骨髓细胞之间相互接触而不相互重叠。

骨髓膜染色前的处理：待骨髓膜自然干燥后，用铅笔将受检犬号码写在血膜上，然后用甲醇固定骨髓膜。

吉氏染色：取 pH 7.0~7.2 缓冲液或蒸馏水 2ml，加入吉氏染液 2 滴，混合均匀后，滴在厚骨髓膜上，染色 20~30 min，然后水洗、晾干。注意！吉氏染液稀释液一定要现配现用，放置时间超 30 min，就不能使用。取吉氏染液时，要用干燥滴管，防止水份混入，造成染液报废。

吉氏染液成分：吉姆萨粉 1g、甘油 50 ml、甲醇 50 ml。

配制方法：将染剂粉置研钵中，加少量甘油充分研磨，然后再加甘油，直至甘油全部加完。研磨后倒入棕色玻璃瓶内，用甲醇分几次冲洗研钵中的染液，倒入瓶内后塞紧瓶口，摇匀，置室温 1-2 周后过滤使用。

镜检：在后骨髓膜上先滴香柏油一滴，用油镜（100 \times ）镜检。镜检应从厚血膜上沿开始，从上而下，从左至右，再由右至左，往返一行接一行，一个视野接一个视野顺序地查完整个骨髓膜。

三、犬只检查步骤

1、先用犬 rk39 快速检测法筛查；

- 2、进行髌骨骨髓穿刺涂片，每犬涂片 3 张。
- 3、有皮肤症状者，实行皮肤黏膜涂片 3 张。