

# 中国疾病预防控制中心关于印发全国黑热病 监测方案（2024年版）的通知

各省、自治区、直辖市及新疆生产建设兵团疾病预防控制中心，江苏、安徽、山东、江西、云南省寄生虫病防治研究所，青海省地方病预防控制所：

近年来，我国部分黑热病流行区疫情出现回升、复燃，危害人民身体健康和社会经济发展。为指导全国各地做好黑热病监测工作，及时掌握全国黑热病流行态势和传播风险因素，全面落实《全国包虫病等重点寄生虫病综合防治实施方案（2024—2030年）》相关要求，我中心组织专家制定了《全国黑热病监测方案（2024年版）》，现予印发，请参照执行。

中国疾病预防控制中心

2024年6月24日

# 全国黑热病监测方案（2024年版）

黑热病又称内脏利什曼病，是利什曼原虫经白蛉叮咬传播、寄生于人体单核-巨噬细胞系统所引起的人兽共患寄生虫病。我国黑热病主要流行于中西部地区，按流行病学特征分为人源型、犬源型和野生动物源型黑热病三种类型。近年来，我国黑热病流行区疫情出现回升、复燃，对人民身体健康和社会经济发展造成一定危害。为及时掌握全国黑热病流行态势和传播风险因素，评价黑热病防治效果，全面落实《全国包虫病等重点寄生虫病综合防治实施方案（2024—2030年）》相关要求，特制订本方案。

## 一、监测目的

（一）掌握黑热病流行及其影响因素变化情况，分析疫情趋势，评估传播风险。

（二）加强黑热病新发、复燃和聚集性疫情等突发疫情的报告和处置。

（三）评价黑热病防治效果，为采取有效干预措施提供依据。

## 二、病例和突发公共卫生事件定义

（一）黑热病病例：根据《黑热病诊断标准（WS 258-2006）》进行病例诊断，分为疑似病例、临床诊断病例和确诊病例。

（二）黑热病突发公共卫生事件：以县(市、区)为单位，符合以下情况之一，即按照黑热病突发公共卫生事件进行报

告并采取相应的调查处置措施。

1. 新发：历史上无本地感染黑热病病例记录的非流行县（市、区），首次出现本地感染黑热病病例。

2. 复燃：近 5 年无本地感染黑热病病例的历史流行县（市、区），再次出现本地感染黑热病病例。

3. 聚集性疫情：一个月内报告 10 例及以上本地感染黑热病病例。

### 三、监测内容

#### （一）常规监测

##### 1. 病例报告

根据《中华人民共和国传染病防治法》和《传染病报告信息管理规范（2015 年版）》，各级各类医疗卫生机构及其执行职务的医务人员，对发现的黑热病疑似病例、临床诊断病例和确诊病例，在诊断后 24 小时内填写传染病报告卡，通过中国疾病预防控制中心信息系统进行网络直报。不具备网络直报条件的应在诊断后 24 小时内向相应单位送（寄）出传染病报告卡，县（市、区）级疾病预防控制中心和具备条件的乡镇卫生院收到传染病报告卡后立即进行网络直报。

若为输入病例，应在备注栏中标注其输入来源国家或地区；病例实验室检测方法须在备注栏中注明（免疫学检测、核酸检测、穿刺物涂片、穿刺物培养）。病例诊断发生变更后，及时在信息系统中进行订正。

##### 2. 病例核实与个案流调

县（市、区）级疾病预防控制中心应有专人负责每日浏览

中国疾病预防控制中心信息系统，发现本辖区内报告的黑热病病例后，应当立即与报告单位联系，对报告病例进行复核，病例诊断发生变更后，及时在信息系统中进行订正。

病例报告所在地县（市、区）级疾病预防控制机构应在接到报告后的 7 日内完成临床诊断病例和确诊病例的流行病学个案调查，调查内容包括病例基本情况、本次发病、诊断和治疗情况以及流行病学史和感染来源的初步判断等，填写黑热病个案调查表（附表 1），并通过中国疾病预防控制中心信息系统（监测报告管理-流病调查模块）上报。

病例报告所在地县（市、区）级疾病预防控制机构在病例报告 6 个月后，对报告病例进行随访，包括不良反应、是否复发等，填写黑热病病例随访表（附表 2），并通过中国疾病预防控制中心信息系统（监测报告管理-流病调查模块）上报。

### 3. 突发公共卫生事件的发现和报告

各级各类医疗卫生机构获得黑热病突发公共卫生事件信息时，在 2 小时内以电话或传真等方式向属地疾控机构报告，具备网络直报条件的同时进行网络直报；不具备网络直报条件的责任报告单位和责任报告人，应采用最快方式向属地疾控机构报告，疾控机构在核实疫情后的 2 小时内通过突发公共卫生事件管理信息系统完成事件信息初次报告，同时以电话或传真等方式报告同级卫生行政部门。卫生行政部门应当尽快组织有关专家进行现场调查处置工作。疾控机构根据事件发生、发展、控制过程进行进程报告和结案报告。

#### （二）监测点监测

## 1. 监测点选择

在北京、河北、山西、内蒙古、河南、四川、陕西、甘肃、新疆和新疆生产建设兵团等省份（兵团）近 10 年有本地感染病例报告的重点流行县（市、区）设立监测点开展监测工作，监测点名单见附录 1。

## 2. 监测内容与方法

### （1）哨点医院发热病人监测

每个监测点设立 1-2 家县级及以上综合医院为哨点医院，对发热门诊、血液科、儿科、感染科等出现长期（2 周及以上）不规则发热的病人开展病例筛查。每家哨点医院每年至少采集 50 人份 EDTA 抗凝全血样（每份 2-3ml），冬春季（11 月-4 月）采样病例数不少于 70%。若前一年区县报告病例总数大于 5 例，则区县内的每家哨点医院需要对所有出现 2 周及以上不规则发热病例采集抗凝全血液，-20℃低温保存。由当地县（市、区）级疾病预防控制机构使用 rk39 试纸条开展病例检测，并填写检测结果（附表 3）。阳性样本送地市级和省级疾控机构逐级进行 PCR 复核，不具备条件的省份，样本送中国疾控中心寄生虫病所复核。

### （2）动物宿主监测

在犬源型黑热病流行区监测点，开展宿主犬监测，在近 5 年有本地感染病例行政村或周围行政村，每年 4 月-7 月共采集 50 份 EDTA 抗凝犬全血样（每份 2-3ml），采用 rk39 试纸条进行检测。剩余血样-20℃低温保存，送至省级疾病预防控制机构开展利什曼原虫 PCR 检测（检测方法见附录 2），填写

附表 4。在野生动物源型黑热病监测点，开展野生动物监测，每年采集不少于 200 只宿主野生动物，开展脏器印片镜检（检测方法见附录 3），填写附表 5。

### （3）媒介监测

在监测县选择近 5 年发病率较高的 1 个行政村开展媒介监测，犬源型黑热病流行区所选媒介监测村应与宿主犬监测所选村一致。县（市、区）级疾控机构每年 5 月-9 月，每半月开展 1 次（间隔 10 天）媒介监测，每次连续 2 天。选择晴朗天气，在每个行政村至少选择 3 种生境，开展媒介种群、密度、季节消长监测（监测方法见附录 4）和媒介利什曼原虫感染率检测（检测方法见附录 2），并填写附表 6。

地市级和省级疾控机构每年在各监测县（市、区）抽取 500 只样本进行蛉种鉴定和利什曼原虫感染率检测，捕获白蛉少于 500 只时全检。

### （4）流行因素监测

每年收集各监测村的人口、气象、地形等基本情况资料，填写附表 7。

## 四、数据收集、分析和反馈

### （一）数据收集、报告与审核

承担监测任务的县（市、区）级疾病预防控制机构负责调查、收集和整理本县的监测数据，并在规定的时限内进行上报。病例个案调查表和随访表完成后及时通过中国疾病预防控制中心信息系统（监测报告管理-流病调查模块）进行上报；监测点的监测数据通过寄生虫病防治信息管理系统上报，其

中媒介白蛉监测在每月完成后上报，人群、动物宿主和流行因素监测在完成后第一时间上报。地市级、省级疾病预防机构应及时完成监测数据的审核。中国疾病预防控制中心负责汇总、审核全国监测点数据。

## （二）资料分析

市级、省级疾病预防控制机构负责汇总、审核本市、本省病例监测、流行因素监测数据并及时进行综合分析，根据疫情形势和防控需要定期开展月度、季度、年度等监测数据分析，研判疫情形势及传播风险，为防治工作提出对策建议。中国疾病预防控制中心定期开展全国黑热病监测分析，会同省级疾病预防控制机构研判疫情形势及传播风险，为防治工作提出对策建议。

## （三）结果反馈

市级、省级疾病预防控制机构应及时将定期监测结果报市级、省级疾病控制行政部门，并向县、市疾病预防控制机构反馈。中国疾病预防控制中心及时将监测分析结果报国家疾病预防控制中心，并向省级疾病预防控制机构反馈。

# 五、质量控制

全国黑热病监测的质量控制工作实行分级管理，由各级疾病预防控制机构做好各阶段、各环节的质量控制。

## （一）培训

中国疾病预防控制中心负责对省级疾病预防控制机构进行黑热病监测工作的师资培训；各省份（兵团）疾控中心负责对市、县级承担监测任务的疾病预防控制机构从事监测工

作的人员进行业务培训。监测点相关专业技术人员的受培训率不低于 90%。

### **(二) 病例复核**

省级疾病预防控制机构负责对监测点所报黑热病病例至少抽样 30%进行核实,发病率较低及发病不稳定地区的监测点需全部核实,符合率不低于 90%。

### **(三) 媒介样本复核**

省级疾病预防控制机构负责对各监测点保存的白蛉样本鉴定进行复查,至少抽样 30%,抽样复核符合率不低于 80%。否则要对监测点进行媒介鉴定技术培训。

### **(四) 资料审核管理工作**

监测项目数据、资料管理实行调查人员、填报人员、统计分析人员和审核人员负责制,各环节工作完成后其责任人应签名负责。各监测县(市、区)疾控机构应指定专人负责定期对监测的原始记录、总结等技术资料和档案的完整性、可靠性进行抽查。

## **六、组织与经费保障**

中国疾病预防控制中心负责全国黑热病监测方案的制定、监测工作的组织实施、技术指导、师资培训、质量控制、资料汇总、数据分析、风险评估、结果反馈以及监测系统评估。

各省级疾病预防控制机构负责辖区黑热病监测工作的技术指导、培训、质量控制、资料汇总与审核、数据分析与结果反馈。

各市级疾病预防控制中心负责辖区黑热病监测工作的现场工作质量控制、资料审核与上报。

各县级疾病预防控制中心具体承担监测任务，负责监测工作的具体实施，应将黑热病监测作为一项重要工作，纳入年度计划，确保工作顺利进行。

- 附表：
1. 黑热病个案调查表
  2. 黑热病病例随访表
  3. 哨点医院发热人群黑热病检测结果登记表
  4. 犬感染情况调查记录表
  5. 黑热病宿主野生动物镜检结果登记表
  6. 黑热病传播媒介白蛉监测记录表
  7. 黑热病监测点基本情况调查表

- 附录：
1. 黑热病监测点名单
  2. 聚合酶链式反应（PCR）检测利什曼原虫方法
  3. 野生动物脏器印片镜检检测方法
  4. 黑热病传播媒介白蛉监测方法

## 附表 1

# 黑热病个案调查表

卡片 ID \_\_\_\_\_ (传染病监测系统卡片 ID)

### 1. 基本情况

- 1.1 姓名 \_\_\_\_\_ 1.2 性别 \_\_\_\_\_ 1.3 出生日期 \_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日  
1.4 职业 \_\_\_\_\_ 1.5 本人或家长联系电话 \_\_\_\_\_  
1.6 患者现居住地: \_\_\_\_\_省\_\_\_\_市\_\_\_\_县\_\_\_\_乡(街道)\_\_\_\_村(居委会)  
1.7 患者户籍所在地: \_\_\_\_\_省\_\_\_\_市\_\_\_\_县\_\_\_\_乡(街道)\_\_\_\_村(居委会)

### 2. 流行病学史

- 2.1 患者近 2 年是否有黑热病流行区外出史 (在相应的项后打√):  
(1) 无 (2) 有, 则  
2.1.1 外出地点: \_\_\_\_\_国家或\_\_\_\_省\_\_\_\_县\_\_\_\_乡(街道)  
2.1.2 外出时间: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日至\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日  
2.2 患者家庭成员中近 5 年内是否有过黑热病病人: (1) 有 (2) 无 (3) 不清楚  
2.3 患者所在的自然村组中是否有过黑热病病人: (1) 有 (2) 无 (3) 不清楚  
2.4 本次发病时间: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日  
2.5 初诊时间: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日  
2.6 初诊医疗机构: \_\_\_\_\_  
2.7 本次发病属于: (1) 初发 (2) 复发, 则  
2.7.1 第一次发病时间: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日  
2.8 患者可能的感染地:  
(1) 境外输入 (2) 外地输入 (3) 本地感染 (4) 不清  
2.8.1 感染地点: \_\_\_\_\_国家或\_\_\_\_县\_\_\_\_乡(街道)\_\_\_\_村(居委会)  
2.9 患者发现方式: (1) 主动就诊 (2) 人群筛查或疫点调查 (3) 其他

### 3. 传染源及危险因素

- 3.1 住所是否有畜圈: (1) 否 (2) 是, 则  
3.1.1 畜圈距离居住地的距离 \_\_\_\_\_ (米)  
3.2 是否养羊: (1) 是 (2) 否 (3) 其他 \_\_\_\_\_  
3.3 是否养犬: (1) 是 (2) 否 (3) 其他 \_\_\_\_\_; 如填“是”, 则  
3.3.1 犬只健康情况: (1) 健康 (2) 病犬 (3) 不清  
3.4 住所周围是否发现野生动物: (1) 是 (2) 否 (3) 不清  
3.5 住所及周围是否发现白蛉: (1) 是 (2) 否 (3) 不清  
3.6 是否曾被白蛉叮咬: (1) 是 (2) 经常 (3) 偶尔 (4) 否 (5) 不清  
3.7 患者家庭是否使用蚊帐: (1) 是 (2) 否

- 3.8 患者家庭蚊香等杀虫剂使用情况：(1) 有 (2) 无  
3.9 患者是否有过露营或露宿：(1) 是 (2) 否  
3.10 患者是否使用驱避剂：(1) 是 (2) 否  
3.11 是否进行过野外作业：(1) 是 (2) 否  
3.12 户外是否曾被蚊虫叮咬：(1) 是 (2) 否  
3.13 黄昏时是否经常外出：(1) 是 (2) 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\_\_\_\_\_咳嗽\_\_\_\_\_鼻衄\_\_\_\_\_牙齿出血\_\_\_\_\_消化不良\_\_\_\_\_ 其他症状\_\_\_\_\_

4.2 查体（在相应的项后打√）

肝肿大\_\_\_\_\_脾肿大\_\_\_\_\_ B超检查提示肝脾\_\_\_\_\_

4.3 主要并发症： (1) 有 (2) 无 (3) 不清

如填“有”，请在相应的项后打√：肺炎\_\_\_\_\_ 肾炎\_\_\_\_\_ 其他\_\_\_\_\_

4.4 实验室检测

血常规：白细胞（WBC）：\_\_\_\_\_ 红细胞（RBC）：\_\_\_\_\_

血小板（PLT）：\_\_\_\_\_ 白蛋白：\_\_\_\_\_ 球蛋白：\_\_\_\_\_

白/球蛋白比例：\_\_\_\_\_

#### 5. 诊断及结果（在相应的项后打√）

5.1 快速诊断试条（rk39）：(1) 阴性 (2) 阳性 (3) 未做

5.2 骨髓穿刺涂片镜检：(1) 阴性 (2) 阳性 (3) 未做

5.3 穿刺物（肝脾、淋巴结、骨髓）培养：(1) 阴性 (2) 阳性 (3) 未做

5.4 PCR 检测：(1) 阴性 (2) 阳性 (3) 未做

#### 6. 本次发病及治疗情况

6.1 治疗药物名称：\_\_\_\_\_

6.2 治疗剂量（每天的药物用量）：\_\_\_\_\_

6.3 治疗开始时间：\_\_\_\_\_

6.4 治疗结果：(1) 治愈 (2) 好转 (3) 死亡

如填“死亡”，请回答下列问题

6.4.1 死亡时间：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日

6.4.2 死亡原因：\_\_\_\_\_

6.5 患者是否为器官移植或 HIV 感染等人群 (1) 是 (2) 否

调查单位：\_\_\_\_\_

调查员：\_\_\_\_\_调查日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日

## 附表 2

# 黑热病病例随访表

卡片 ID \_\_\_\_\_ (传染病监测系统卡片 ID)

### 1. 基本情况: (同个案调查表部分)

姓名 \_\_\_\_\_ 性别 \_\_\_\_\_ 出生日期 \_\_\_\_\_

本人或家长联系电话 \_\_\_\_\_

患者现居住地: \_\_\_\_\_ 县 \_\_\_\_\_ 乡(街道) \_\_\_\_\_ 村(居委会)

### 2. 本次治疗和复发情况

2.1 黑热病治疗药物名称 \_\_\_\_\_ 治疗总剂量 \_\_\_\_\_

2.2 治疗开始日期 \_\_\_\_\_ 治疗结束日期 \_\_\_\_\_

2.3 治疗中是否发生了不良反应? (1) 否 (2) 是, 则

2.3.1 不良反应具体表现为: \_\_\_\_\_

2.3.2 不良反应出现的日期为: \_\_\_\_\_

2.3.3 是否更换治疗药物? (1) 否 (2) 是, 具体为 \_\_\_\_\_

2.4 治疗结果: (1) 治愈 (2) 复发 (3) 死亡

如填“复发”, 请回答下列问题:

2.4.1 复发诊断日期: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

2.4.2 复发主要临床症状 (选择相应的编号): \_\_\_\_\_

①长期不规则发热 ②盗汗 ③消瘦 ④咳嗽 ⑤气喘 ⑥食欲减退、消化不良 ⑦鼻出血或齿龈出血 ⑧腹痛、腹胀、腹泻 ⑨肝或脾肿大 ⑩贫血;

2.4.3 复发确诊方法 (选择相应的编号): \_\_\_\_\_

①骨髓穿刺涂片镜检 ②穿刺物 (肝脾、淋巴结、骨髓) 培养

③PCR 检测 ④rk39检测 ⑤其他诊断方法

如填“死亡”, 请回答下列问题:

2.4.4 死亡日期: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

2.4.5 死亡原因 \_\_\_\_\_

调查单位: \_\_\_\_\_

调查员: \_\_\_\_\_ 调查日期: \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

### 附表 3

## 哨点医院发热人群黑热病检测结果登记表

\_\_\_\_\_省（区、兵团）\_\_\_\_\_市（地、州）\_\_\_\_\_县（市、区）

哨点医院名称：\_\_\_\_\_

#### 1. 分月度汇总表格

月份	连续 2 周及以上 不规则发热就 诊人数	采样数	rk39 检测数	rk39 检 测阳性 数	PCR 检测数	PCR 检测 阳性数
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						











## 附表 7

# 黑热病监测点基本情况调查表

\_\_\_\_\_省（自治区、兵团）\_\_\_\_\_市（地、州）\_\_\_\_\_县（市、区）  
\_\_\_\_\_乡镇\_\_\_\_\_村

### 1. 一般情况

1.1 海拔：\_\_\_\_\_米

1.2 主要地形：①平原 ②山区 ③盆地 ④河谷 ⑤其他

1.3 本度年均气温：\_\_\_\_\_℃

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
平均 气温												

1.4 本年度年降雨量：\_\_\_\_\_mm

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
平均 降水量												

1.5 主要饮用水源：①自来水 ②井水 ③山泉水 ④河湖水 ⑤其它

1.6 主要农作物：①旱粮 ②水稻 ③药材 ④经济作物 ⑤其它

1.7. 耕地面积：\_\_\_\_\_亩；林地面积：\_\_\_\_\_亩

1.8. 大牲畜总头数（包括牛、马、驴、骡）：\_\_\_\_\_

1.9 家犬只数：\_\_\_\_\_ 流浪犬只数：\_\_\_\_\_

1.10 多年无人居住空置房屋数：\_\_\_\_\_户，空置窑洞、煤洞、大棚等\_\_\_\_\_户

### 2. 人口情况

2.1 现居住户数：\_\_\_\_\_户；人口数\_\_\_\_\_人；男\_\_\_\_\_人；女\_\_\_\_\_人

2.2 年龄别人口数 0-1岁人口数：\_\_\_\_\_人；2-5岁人口数：\_\_\_\_\_人；

6-10岁人口数：\_\_\_\_\_人；11-15岁人口数：\_\_\_\_\_人；

16岁及以上人口数：\_\_\_\_\_人

3. 近5年村中是否有过黑热病病人：①有，\_\_\_\_\_例 ②无 ③不清；

调查人：\_\_\_\_\_调查日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_\_

## 附录 1

## 全国黑热病监测点名单

序号	省（直辖市、自治区、兵团）	监测点名单
1	北京	门头沟区、昌平区、延庆区
2	河北	井陘县、井陘矿区、信都区、唐县、曲阳县
3	山西	阳泉市郊区、阳泉市城区、阳泉市矿区、平定县、盂县、乡宁县、榆社县、襄垣县、河津市、襄汾县、潞城区、浮山县、曲沃县、高平市、文水县
4	内蒙古	额济纳旗
5	河南	林州市、荥阳市、巩义市、登封市、孟津区、龙安区、偃师区、新安县、淇滨区、新密市
6	四川	九寨沟县、汶川县、理县
7	陕西	韩城市、宜川县、华州区
8	甘肃	武都区、宕昌县、舟曲县
9	新疆	喀什市、伽师县
10	新疆生产建设兵团	第三师

## 附录 2

# 聚合酶链式反应 (PCR)

## 检测利什曼原虫方法

### 一、样本采集

#### (一) 犬只或人静脉血样品

使用 EDTA 抗凝负压采血管采血，每份血样不少于 2-3ml，充分摇匀，-20℃保存备用。

#### (二) 白蛉样本

将形态鉴定的白蛉雌蛉按采集蛉种、月份、监测县分组，每组 30 只白蛉。每组用研磨棒研磨碎后提取 DNA。

### 二、DNA 抽提

#### (一) 犬只或人静脉血样品 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 500u1NET 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。

## （二）白蛉样品 DNA 抽提

每组用研磨棒磨碎后，按照商品化 DNA 组织提取试剂盒说明书提取 DNA。

## 三、目的片段的扩增

人、犬和媒介白蛉利什曼原虫 PCR 检测方法：选用两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，包括 K13A-K13B ( 5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' , 5'-ATTTTACACCAACCCCAAGTT-3' , 扩增片段大小为 120bp); RV1-RV2 ( 5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3' , 5'-CCACCTGGCCTATTTT ACACCA-3' , 扩增片段大小为 145bp)。按 50 μ l 反应体积为例，先配置 49.5 μ l PCR 反应液（含 200 μ mol/L dATP/dTTP/dGTP/dCTP, 200 pmol/L 引物, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 相当于 1ml 血提取的 DNA），加封石蜡油 50 μ l 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 μ lTaq 酶（5 μ / μ l），再按 94℃ 30 s, 59° C 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 10 μ l 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

人、犬和媒介白蛉利什曼原虫 PCR 检测时，对应使用黑热病病人血、利什曼病犬全血、阳性白蛉样本抽提的 DNA 作模板进行扩增作为阳性对照，用健康人或健康犬全血、阴性白蛉样本抽提的 DNA 作模板进行扩增作为阴性对照。

## 附录 3

# 野生动物脏器印片镜检技术

### 一、实验动物解剖方法

野生宿主动物处死后，立即进行检测。

**消毒被解剖动物皮毛：**用 75%酒精（或碘酒）浸擦尸体颈胸腹部的皮毛，也可以用碘酒浸泡 1-2 分钟；**剪开动物腹部皮肤：**用镊子轻轻地提起动物腹部皮肤，在生殖和排泄孔的稍前方剪开一个裂口；从此裂口将剪刀伸入，沿身体腹中线向前剖至下颌，皮肤向两侧拉开剥离，尽量使胸腹部皮肤翻向外侧，观察脏器有无异常病变。

在实验结束后，需要对实验动物尸体进行妥善处理，以确保公共卫生和环境安全，以下是一些常见的实验动物尸体处理方法：

**灭菌处理：**实验动物尸体需要进行灭菌处理，以防止病原体的传播和污染。可以使用高温蒸汽灭菌器、化学消毒剂等方法进行灭菌处理。

**埋葬处理：**实验动物尸体可以进行埋葬处理，需要选择适宜的场地和深度，避免对环境和公共卫生造成影响。

**焚烧处理：**实验动物尸体可以进行焚烧处理。需要选择适宜的焚烧设备和温度，以确保完全燃烧和消毒。

**冷冻处理：**实验动物尸体可以进行冷冻处理。需要选择适宜的冷冻设备和温度，以确保尸体的质量和安全性。

**注意：**在进行实验动物尸体处理时，需要遵守相关法规和伦理要求，也需要注意环境和公共卫生的安全，避免对人

类和其他动物造成影响。

## 二、组织印片和镜检

切开组织：用锋利手术刀切开组织，用镊子将切面用吸水纸吸取粘连血迹。

组织印片：载玻片表面擦拭干净，做好标记，将肝脾切面细胞组织按一定顺序印在载玻片，在载玻片上留下“印记”（图 1）。

固定：载玻片略向下倾斜，用甲醇载玻片上的印记，充分干燥。

染色：在量筒内量 2ml 缓冲液或净水，滴加吉氏原液 4 滴（每毫升 2 滴）混匀，滴在已充分干燥的印记染色 30min，清水或缓冲液冲洗，晾干，等待镜检。

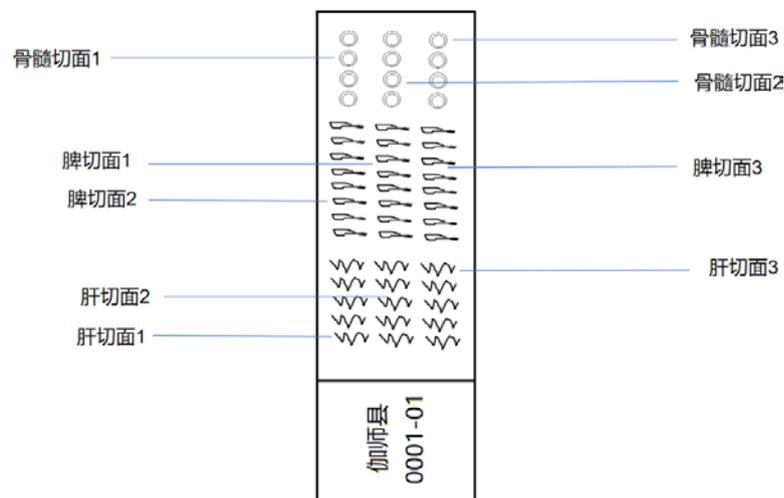


图 1. 肝脾等组织切面在载玻片上印片

镜检：在印片上先滴香柏油一滴，用油镜（100×）镜检。镜检应从印片上沿开始，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印片。

## 附录 4

# 黑热病传播媒介白蛉监测方法

### 一、监测村和生境的选择

我国黑热病分为人源型、犬源型和野生动物源型 3 种类型。不同流行类型黑热病媒介白蛉的种类及其适生生态环境等方面有显著差异，需根据流行区类型选择适当的生境开展白蛉调查。

（一）监测村：在监测县选择近 5 年发病率较高的 1 个行政村开展媒介监测，犬源型黑热病流行区所选媒介监测村应与宿主犬监测所选村一致。

（二）监测生境：在监测村至少选择 3 种生境开展调查，可选生境包括驴棚、骡棚、牛棚、羊舍、犬舍、鸡舍、病家或附近院落、空置房屋或窑洞。

### 二、调查频次

在监测点，5 月-9 月期间，选择天气晴朗，每半月开展 1 次（间隔 10 天）媒介监测，每次连续 2 天。调查当天傍晚气温 20 摄氏度以下或风力 4 级以上时顺延。

### 三、操作方法

1. 每个调查点用铁丝或者绳子悬挂 1 台诱蛉灯。
2. 诱蛉灯光源离地约 1.5 米（注意避免牲畜触碰损毁），诱蛉灯内放置适配的诱饵盒。
3. 诱蛉灯下面悬挂 1 个尼龙收集袋或蚊笼收集捕获的白蛉，

蚊笼上表面可覆盖 1-2 条浸湿的毛巾，以保持蚊笼内湿度，以提高捕获白蛉存活率。

4. 日落前 1 小时接通电源，开启诱蛉灯诱捕白蛉，直至次日日出后 1 小时，扎紧蚊笼袖口，摘下蚊笼后，再关闭电源。

5. 将覆盖有浸湿的毛巾蚊笼运送到实验室进行白蛉收集分类鉴定。

注备：白蛉鉴定技术熟练的监测点，可以在诱蛉灯下面悬挂尼龙网袋，代替蚊笼，使用蚊笼是为了提高捕获白蛉存活率，便于之后蛉种鉴定。

6. 进行种类、性别鉴定并计数，分别将每台灯每晚的调查结果填入数据记录表。

#### **四、计算公式**

白蛉密度〔只/（灯×夜）〕=捕获雌蛉只数÷（灯数×夜数）

#### **五、调查所需器材**

诱蛉灯、手电筒、电动吸蚊器、乙醚/氯仿、搪瓷盘、口罩、手套、镊子、计数器、解剖镜、成蛉标本制作和保存工具、冻存管、棉花、干燥剂等。