

寄生虫：种质资源技术规范丛书

寄生虫 种质资源保藏技术规程

(第一分册)

主编 ● 周晓农

Technical Regulation for Preservation of
Parasitic Germplasm Resources

上海科学技术出版社

寄生虫种质资源技术规范丛书

寄生虫种质资源保藏技术规程

(第一分册)

Technical Regulation for Preservation of
Parasitic Germplasm Resources

主编 周晓农

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

寄生虫种质资源保藏技术规程. 第一分册 / 周晓农主编. —上海: 上海科学技术出版社, 2009.3
(寄生虫种质资源技术规范丛书)
ISBN 978-7-5323-9685-6/R·2596

I. 寄... II. 周... III. 寄生虫-种质资源-保藏-技术操作规程 IV. Q958.9-65

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 184199 号

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行
上海科学技术出版社
(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)
新华书店上海发行所经销
常熟市兴达印刷有限公司印刷
开本 787×1092 1/16 印张 4.5
字数: 63 千字
2009 年 3 月第 1 版 2009 年 3 月第 1 次印刷
定价: 25.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向工厂联系调换

内 容 提 要

《寄生虫种质资源保藏技术规程》将我国重要寄生虫种质资源保藏、保种与标本制作等技术规程以分册形式陆续出版。本第一分册包括鸡球虫、梨形虫、马来布鲁线虫、旋毛虫、媒介蜱类等5个保种技术规程,以及医学昆虫、寄生虫生物材料、寄生虫及媒介模式标本等3个保藏技术规程。

本规程配有相应的DVD示教片,可作为医学、兽医、动物、植物等领域从事寄生虫学与寄生虫病的临床、教学、科研和防治人员的工作手册和参考用书。

《寄生虫种质资源保藏技术规程》编辑委员会

主 编 周晓农

副 主 编 林矫矫

编 委 会(按姓氏笔画顺序排列)

朱淮民 刘光远 刘金明 关贵全 吴忠道 何国声 宋铭忻 张 仪
陈立杰 陈盛霞 陈韶红 林金祥 林矫矫 罗建勋 周 婷 胡 薇
段玉玺 黄 兵 曹建平

参编人员(按姓氏笔画顺序排列)

马广鹏 朱顺海 李小红 沈玉娟 张德林 陈兆国 林宇光 赵其平
徐梅倩 周 卉 殷 宏 姜连连 黄 燕 曹 杰 韩红玉 董 辉
路义鑫 傅志强

审阅专家(按姓氏笔画顺序排列)

朱昌亮 汤林华 吴惠敏 沈 杰 徐大刚 唐崇惕 常正山

寄生虫是寄生于人体、动物、植物等宿主体内或体表的一类营寄生生活的单细胞原生生物和多细胞无脊椎动物的动物性寄生物。根据生物界分类地位,寄生虫跨越动物界和原生生物界,拥有复杂的生活史和独特的生物学特性。寄生虫在移行、定居、发育和繁殖过程中对宿主造成损害而致病,甚至致死,因此受到关注。寄生虫学(parasitology)于19世纪初开始作为一门独立学科,专门研究寄生原虫、蠕虫、节肢动物及其他生物媒介等。

寄生虫(parasite)作为病原体是人体、动物、植物寄生虫病防治与研究不可缺少的种质资源,有些虫种(如锥虫、秀丽杆线虫等)还被用作模式生物,寄生虫种质资源也是生命科学研究不可缺少的生物资源。迄今,由于再现寄生虫病的危害和新现寄生虫病的威胁日益显现,寄生虫学与寄生虫病防治及其研究工作方兴未艾,即使在寄生虫病已经得到较好控制的国家(如欧美和澳大利亚等),至今仍然保存着许多寄生虫虫种、虫株等资源储备,对于寄生虫的研究工作亦从未间断。

近半个多世纪以来,我国寄生虫学发展与寄生虫病防治的科技进步有效地推动了寄生虫病控制的进程,全国疾病预防控制系统、农业兽医系统、海关系统以及相关大专院校,在长期的工作实践中都积累了各具特色的寄生虫种质资源。为了实现寄生虫保种传代技术的标准化,保障虫种资源生物性状的稳定性和保藏的安全性,进一步充分发挥这些宝贵资源在疾病预防控制及其研究中的作用,在国家自然资源平台项目的支持下,各相关单位协作建立了全国寄生虫种质资源平台,系统地整理了全国人体、家畜与植物的寄生虫种质资源,总结了相关技术建立的经验,建立了虫种资源的保存技术标准和技术规范。

《寄生虫种质资源保藏技术规程》是国内首次出版的寄生虫种质资源保藏技术规范丛书。30 多位国内从事医学、兽医、动物、植物等领域的寄生虫学与寄生虫病研究、教学的专家在总结 50 多年实践经验的基础上,吸取国内外有关寄生虫种质资源保藏、利用的技术标准和先进方法,广泛征求国内寄生虫学专家意见,经反复修改和项目专家组多次论证后完成本套丛书。本规程配有 DVD 示教片,可供医学、兽医、动物、植物等领域从事寄生虫学与寄生虫病的临床、教学、科研和防治的专业人员参考。

《寄生虫种质资源保藏技术规程》是由科技部和财政部组织立项、在卫生部科技教育司具体指导下,在中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所负责承担的国家自然科技资源共享平台项目《重要寄生虫虫种资源标准化整理、整合及共享试点》(项目编号 2004DKA30480; 2005DKA21104)支持下,及全国有关科研单位、高等院校等单位的大力协助下完成的,在此谨致诚挚的谢意!在编写过程中,参考了国内外相关文献,限于篇幅,仅列出主要参考文献。由于寄生虫学科的不断发

编 者

2008 年 12 月 8 日

目 录

1	鸡球虫的保种技术规程
7	梨形虫的保种技术规程
13	马来布鲁线虫的保种技术规程
20	旋毛虫的保种技术规程
25	媒介蜱类的保种技术规程
32	医学昆虫的保藏与标本制作技术规程
45	寄生虫生物材料保藏技术规程
53	寄生虫及媒介模式标本保藏技术规程

鸡球虫的保种技术规程

1. 概论

鸡球虫是多种寄生于鸡的球虫的统称,隶属于动物界(Animalia)、原生动物亚界(Protozoa)、顶器复合门(Apicomplexa)、孢子虫纲(Sporozoa)、球虫亚纲(Coccidiasina)、真球虫目(Eucoccidiorida)、艾美耳科(Eimeriidae)、艾美耳属(*Eimeria*)。鸡球虫是鸡最常见且危害严重的病原,全世界每年因鸡球虫病造成的经济损失超过 30 亿美元。

鸡球虫的生活史基本相同,都必须经过孢子生殖(sporogony)、裂殖生殖(schizogony 或 merogony)和配子生殖(gametogony)三个阶段。未孢子化的鸡球虫卵囊不具感染性,当其经粪便排出体外,在适宜的温度和湿度下,发育成具有感染性的孢子化卵囊,孢子化卵囊含 4 个孢子囊,每个孢子囊含 2 个子孢子,此阶段为孢子生殖。孢子化卵囊被鸡食入后,子孢子释放、进入肠上皮细胞形成滋养体,发育成裂殖体和裂殖子,裂殖子再进入新的肠上皮细胞,发育成新一代裂殖体和裂殖子,此阶段为裂殖生殖。经裂殖生殖 2~3 次循环后,裂殖子进入肠上皮细胞,一部分发育成大配子体,另一部分发育成小配子体,大、小配子体分别发育成大配子和小配子,小配子钻入大配子形成合子,合子再发育成未孢子化卵囊,此阶段为配子生殖。从孢子生殖到裂殖生殖,再由裂殖生殖到配子生殖,又从配子生殖到下一个世代的孢子生殖的三个发育阶段中,孢子生殖在外界环境中完成,称外生发育阶段,裂殖生殖和配子生殖在鸡体内进行,称内生发育阶段。孢子生殖和裂殖生殖是无性生殖,配子生殖是有性生殖。

据统计,全世界已报道的鸡球虫共有 15 种,已为多数学者公认的 9 种包括堆形艾美耳球虫(*Eimeria acervulina*)、布氏艾美耳球虫(*E. brunetti*)、哈氏艾美耳球虫(*E. hagani*)、巨型艾美耳球虫(*E. maxima*)、和缓艾美耳球虫(*E. mitis*)、变位艾美耳球虫(*E. mivati*)、毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*)、早熟艾美耳球虫(*E. praecox*)、柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*),其中柔嫩艾美耳球虫、毒害艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫、堆形艾美耳球虫、布氏艾美耳球虫是重

要的致病性虫种。

为了实现鸡球虫的保种、传代操作技术的标准化,保障虫种资源生物性状的稳定性,为科研、教学、生产提供标准化的虫种资源,特制定本规程。

2. 技术规程

2.1 范围

本规程规定了鸡球虫活体传代操作的基本原理、方法及技术要求。

本规程适用于堆形艾美耳球虫、布氏艾美耳球虫、哈氏艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫、和缓艾美耳球虫、变位艾美耳球虫、毒害艾美耳球虫、早熟艾美耳球虫、柔嫩艾美耳球虫的传代与保藏。

2.2 术语与定义

下列术语和定义适用于本规程。

2.2.1 鸡球虫 *chicken coccidia*

指寄生于鸡肠道上皮细胞内的一类艾美耳球虫。

2.2.2 未孢子化卵囊 *unsporulated oocyst*

指卵囊内充满着细胞质团、没有形成囊体。为不具有感染力的卵囊。

2.2.3 孢子化卵囊 *sporulated oocyst*

指卵囊内的细胞质团发育成4个孢子囊,每个孢子囊内形成2个子孢子。为具有感染力的卵囊。

2.2.4 孢子生殖 *sporogony*

指随粪便排到外界环境中的未孢子化卵囊,在适宜的温度、湿度及有氧条件下发育成孢子化卵囊的过程。

2.3 原理

鸡球虫对宿主具有高度特异性,生活史通过鸡的感染实现。鸡球虫的裂殖生殖和配子生殖在鸡体内完成,孢子生殖在鸡体外完成。收集鸡肠道内或粪便中的未孢子化卵囊,置于适当的环境中使其孢子化而成为具有感染力的孢子化卵囊。孢子化卵囊可在适宜的湿度、温度下存活较长时间,常置于4℃低温环境中保藏。通常,为保持虫种的毒力、免疫原性等生物性状的稳定,每次宿主传代的间隔时间一般不超过6个月。

2.4 技术要求

2.4.1 传达、保藏方法

鸡活体内传代结合低温保存。

2.4.2 标记牌

应用黏贴纸制作成标记牌,并标明资源编号、虫种名称、收集时间、卵囊浓度、虫种来源、繁殖代次等信息。

2.4.3 保藏容器

一般以棕色玻璃瓶或塑料瓶作为保藏容器,以口径较小为宜。

2.4.4 保藏基物

2.5%的重铬酸钾溶液。

2.4.5 保藏温度和时间

4℃冰箱保藏6个月。

2.4.6 传代、繁殖复核

进行大量鸡球虫传代繁殖时,仔细核对各虫种/株的编号。每次传代繁殖后,对照原保藏的标签号,核实无误再行存放。

2.4.7 保藏指标

当获得的虫种或虫株可致鸡发生典型症状,虫体具有典型的形态(必要时进行单卵囊分离),确认为单一虫种后登记保藏。

重要的稀有虫种,应备份分别由两人或两个实验室负责保藏。国际、国内赠与或交换的标准虫株,根据其提供的相关资料和要求,登记保藏。

2.5 操作方法与步骤

2.5.1 实验动物

不同品种的鸡对各种球虫的易感性略有差异,选用经实验验证、较易感的品种作为传代繁殖用实验动物,以获取最大量的卵囊。

通常使用7~14 d龄清洁级雏鸡,也可使用出壳便在无球虫环境中饲养的普通级雏鸡。

2.5.2 饲养条件

用于球虫传代的鸡须在隔离器中饲养,或在经消毒、确认为无球虫污染的普通实验动物房内饲养。饲养人员进入鸡舍,要更换衣服、鞋子,戴上手套,以防止污染而致交叉感染。鸡笼底部应配置粪盘收集粪便。鸡笼、粪盘、饲槽、水槽等用具使用前应置于60~80℃烤箱中消毒30 min。饲料经高温灭菌消毒。鸡舍需经清洗、干燥、熏蒸消毒后使用。饮水使用煮沸冷却后的自来水。

2.5.3 配制卵囊液

从冰箱取出球虫卵囊液,加入10倍量水,混匀后2 000~2 500 r/min离心10 min,弃上清液,重复3~5次以去除重铬酸钾。若该卵囊保存前未做纯化,则将卵囊液经2 000~2 500 r/min离心5 min,沉淀中加入5倍体积的饱和盐水悬浮,3 000 r/min离心10 min,吸取含卵囊的上层液体,加入10倍体积的水混匀,3 000 r/min离心10 min,弃上清液,重复3~5次以去除盐分。在离心沉淀中加入5~10 ml水,用血球计数板计数卵囊,确定卵囊液浓度。按每只鸡接种卵囊液0.5~1 ml计算,将卵囊液稀释至每毫升所含的卵囊量。传代感染常用接种剂量参考附录。

2.5.4 人工接种

进行鸡球虫人工接种一般需两人合作。一人用一只手握住鸡身体,另一只手抓住鸡头部并使其张开嘴。另一人用注射器(1 ml或5 ml,针头套有塑料管)定量吸入卵囊液,然后将塑料管轻轻插入食管,缓慢将卵囊液全部注入。注意每次用注射器吸取卵囊液前要摇动卵囊液瓶,使卵囊液均匀,接种时确保卵囊液不溢出口腔。

2.5.5 收取卵囊

采集的样本及时间取决于球虫卵囊形成的部位与开始从粪便排出的时间。鸡球虫在肠道寄生的部位以及从感染至粪便最早排出卵囊的时间(潜伏期)因虫种而异。9种主要鸡球虫的肠道寄生部位、感染后从粪便收集卵囊时间和潜伏期见附录。

2.5.5.1 粪便中收取卵囊

按附录所列不同虫种的潜伏期确定从鸡粪便中收集卵囊的时间,逐天从粪盘中收集鸡粪便样品,置于消毒过的容器中,加水搅拌均匀。将粪便混匀物经两层医用纱布或60目铜丝网过滤后,1 500~2 000 r/min离心10 min,弃上清液。

饱和盐水浮聚法收取卵囊:加入不低于沉淀物5倍体积的饱和盐水混匀,1 500~2 000 r/min离心10 min。用吸管或注射器收集上层含有卵囊的饱和盐水溶液,加入10倍体积的水混匀后3 000 r/min离心10 min,弃上清液。重复3~5次,以洗去卵囊液中剩余盐分,并每次镜检确定卵囊已完全沉淀。

2.5.5.2 肠道中收取卵囊

接种柔嫩艾美耳球虫、毒害艾美耳球虫的鸡,在感染后第7~8 d收集盲肠;接种布氏艾美耳球虫的鸡,在感染后第6~7 d收集直肠及小肠后段;接种其他虫种的鸡,在感染后第6~7 d收集小肠。

将收集的肠道置于灭菌处理的平皿内,移入灭菌匀浆机粉碎;或将肠道纵

向剪开后,用载玻片刮取肠道内容物,加水搅拌均匀。加入胰蛋白酶,使其终浓度为1.5% (W/V),41℃水浴30 min,依次用50目、100目、200目、400目过滤,收集滤液,1 500 r/min离心10 min,弃上清液。

按2.5.5.1方法对沉淀物进行饱和盐水浮聚法收取卵囊。

2.5.6 培养卵囊

在经饱和盐水漂浮处理的卵囊沉淀物中,加入2.5%重铬酸钾溶液,混匀计数使卵囊浓度不超过30万/ml。将此卵囊液移入培养皿,置于28~30℃的恒温箱中培养。每天对培养物轻轻搅拌3~5次,并观察卵囊孢子发育情况,待卵囊孢子化率达85%以上时(通常2~3 d)停止培养。

2.5.7 保存孢子化卵囊

将孢子化卵囊液移入保藏容器,保存于4℃冰箱。若需较长时间保存,则每6个月进行一次传代。每次用以传代的虫株均需保存到传代结束并确保传代成功时。

2.5.8 传代后鸡舍及实验用品的消毒

使用后的鸡舍和器具应及时清洗干净,并对鸡舍进行熏蒸消毒。实验用具以及鸡笼、粪盘、水槽、水槽等洗净后,置于60~80℃烤箱中干烤30 min。实验动物和废弃物运至动物尸体处理站进行无害化处理。鸡粪收集装袋,进行堆积发酵处理。

参考文献

- [1] 蒋金书,主编.动物原虫病学.北京:中国农业大学出版社,2000.
- [2] 索勋,李国清,主编.鸡球虫病学.北京:中国农业大学出版社,1998.
- [3] 索勋,杨晓野.高级寄生虫学实验指导.北京:中国农业科学技术出版社,2005.
- [4] 沈杰,黄兵,主编.中国家畜家禽寄生虫名录.北京:中国农业科学技术出版社,2004.
- [5] 赵其平,黄兵,陈兆国,等.几种溶液对球虫卵囊漂浮效果的比较.上海畜牧兽医通讯,1995,5:18-19.
- [6] 黄兵,史天卫,吴薛忠,等.巨型艾美耳球虫纯种的鉴定与致病性研究.中国兽医寄生虫病,1995,3:12-14.
- [7] 黄兵,史天卫,赵其平,等.堆型艾美耳球虫的分离纯化与致病性试验.中国兽医科技,1994,24:23-24.
- [8] 黄兵,吴薛忠,史天卫,等.毒害艾美耳球虫纯种的初步确定与致病性

研究. 中国兽医寄生虫病, 1993, 1:24-28.

[9] 黄兵, 赵其平, 吴薛忠, 等. 柔嫩艾美耳球虫纯种的初步确定与致病性研究. 上海畜牧兽医通讯, 1993, 5:18-20.

[10] 黄兵, 赵其平, 何林华, 等. 三种艾美耳球虫感染鸡卵囊排泄期的观察. 中国兽医寄生虫病, 1995, 3:24-25.

附录

鸡球虫保种技术要求: 9 种鸡球虫保种技术要素见下表。

9 种鸡球虫保种技术要素表

种 名	每只鸡接种卵囊数 ($\times 100$)	感染后从粪便中分离时间 (d)	潜伏期 (h)	寄生部位
堆形艾美耳球虫	10 ~ 100	5 ~ 7	89	小肠
布氏艾美耳球虫	5 ~ 20	6 ~ 8	120	小肠、直肠
巨型艾美耳球虫	5 ~ 20	6 ~ 8	120	小肠
和缓艾美耳球虫	50 ~ 100	5 ~ 7	91	小肠
毒害艾美耳球虫	60 ~ 80	6 ~ 9	138	小肠、盲肠
早熟艾美耳球虫	5 ~ 10	5 ~ 7	84	小肠
柔嫩艾美耳球虫	5 ~ 20	6 ~ 8	132	盲肠
变位艾美耳球虫	10 ~ 100	5 ~ 7	96	小肠
哈氏艾美耳球虫	50 ~ 100	5 ~ 7	99	小肠

(黄 兵 姜连连 赵其平 韩红玉 董 辉)

梨形虫的保种技术规程

1. 概论

梨形虫是原生动物界(Protozoa)、顶器复合门(Apicomplexa)、梨形虫纲(Piroplasma)、梨形虫目(Piroplasmida)中的巴贝斯科(Babesiidae)巴贝斯属(*Babesia*)和泰勒科(Theileriidae)泰勒属(*Theileria*)的多种原虫的统称,过去曾翻译成“焦虫”,又因曾将其归类于孢子虫纲(Sporozoa)的血孢子虫目(Haemosporidia),故又称其为“血孢子虫”。

梨形虫是一种单细胞真核动物,为专性寄生虫。梨形虫的各个发育阶段都不能离开宿主,其生活周期需通过在媒介蜱与哺乳动物体内循环,这两种宿主,是保持其生物学特性稳定的必要条件。在蜱体内,梨形虫可进行有性繁殖和无性繁殖。巴贝斯虫可被蜱经卵传播,泰勒虫可被蜱以阶段性方式传播;在哺乳动物体内,巴贝斯虫主要寄生于红细胞内,而泰勒虫既可寄生于红细胞内,又可寄生于网状内皮细胞内。梨形虫媒介蜱的种类与传播方式因虫的种类而异,而媒介蜱叮咬是动物梨形虫自然感染的唯一传播方式。

据统计,国内外已报道的巴贝斯虫有 70 余种,泰勒虫有 15 种,在世界各地均有分布,由此引起的动物梨形虫病每年可造成 100 多亿美元的经济损失。

为了实现梨形虫在保种传代等操作过程的标准化,保障虫种资源生物性状的稳定性和保藏的安全性,为科研、教学、生产提供标准化的虫种资源,特制定本规程。

2. 技术规程

2.1 范围

本规程规定了梨形虫活体传代操作的基本原理、方法及技术要求。

本规程适用于巴贝斯虫属和泰勒虫属的各种病原虫种的传代与保藏。

2.2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规程。

2.2.1 梨形虫 *piroplasma*

指可通过蜱传播给哺乳动物、寄生于动物红细胞或网状内皮细胞内、引起动物或人类梨形虫病的一类血液原虫,主要是指巴贝斯虫和泰勒虫。

2.2.2 梨形虫虫种资源 *piroplasma resource*

指在野外采集获得,在实验室内,通过超低温保藏、动物或媒介蜱传代保藏,具有实际或潜在应用价值的虫种或虫株。

2.2.3 除脾动物 *spleen-ectomised animal*

指摘除脾脏的牛、羊、马、犬等哺乳动物,主要用于梨形虫的繁殖。

2.2.4 蜱 *tick*

蜱(*tick*)隶属于节肢动物门(*Arthropoda*),蛛形纲(*Arachnida*),蜱螨目(*Acarina*),蜱亚目(*Ixodida*),蜱总科(*Ixodoidea*),包括硬蜱科(*Ixodidae*)、软蜱科(*Argasidae*)和纳蜱科(*Nuttalliellidae*)。其中以硬蜱科居多,通称为硬蜱(*hard ticks*)。蜱是一类外寄生虫,主要寄生于动物体表,除可通过叮咬吸血给畜牧业生产造成直接危害外,还可充当动物梨形虫的传播媒介。

2.2.5 蜱传播试验 *transmission experiment*

指模拟疾病的自然发生过程,通过蜱体使梨形虫从感染动物传播给健康动物的试验过程。

2.2.6 染虫率 *parasitemia*

指被虫体感染的红细胞数占红细胞总数的比例。一般表示每 100 个红细胞中被虫体寄生的红细胞数。

2.3 原理

绝大多数梨形虫具有较强的宿主特异性,没有可替代的实验动物。实验室繁殖主要靠感染易感除脾动物实现。采用超低温保藏,可降低病原体的代谢水平,延长保藏时间,保持虫种的原有性状。在固定代次内进行蜱传播试验,使其经历完整的生活周期循环,对保持虫种形态、毒力及免疫原性稳定具有重要意义。

2.4 技术要求

2.4.1 传代、保藏方法

液氮容器内实施超低温保存,超过 8 年需经感染实验动物和蜱进行“复壮”。

2.4.2 标示牌

应用塑料或纸制作成标示牌,并标明资源编号、虫种名称、代次、染虫率、时间等信息。

2.4.3 液氮容器

保藏罐一般为容量 35 L 以上、口内径为 50 ~ 70 mm 的液氮容器。

2.4.4 保藏基物

通常为血细胞,特殊情况下,采用血细胞裂解物或淋巴组织。

2.4.5 保护剂

采用 10% 的二甲基亚砜(DMSO)。

2.4.6 营养液

添加有 20% 小牛血清的 1640、199 或 MEM 细胞培养液。

2.4.7 保藏期间的检测

定期检查液氮的余量、容器有无损坏、悬挂绳是否断落、标示牌内容是否清晰等。

2.4.8 传代、繁殖复核

大量病原体在传代繁殖过程中,各虫、株的编号、所用的动物均需反复核对无误。每次用动物进行继代繁殖后,对照原保藏的顺序号卡片名录,核实无误再行存放。

2.4.9 保藏指标

感染动物临床症状明显,虫体形态典型,并采用 PCR 方法确认为单一虫种后,方可进行保藏。

2.5 操作方法与步骤

2.5.1 实验动物

选自无梨形虫分布地区的 1 岁的动物(牛、羊、马和犬),雌、雄均可。于试验前 30 天切除脾脏,经病原学检查确认无梨形虫感染时,方可用于虫种的传代与繁殖。

2.5.2 超低温保藏

用原始虫株感染除脾动物,待红细胞染虫率达 1% 以上时,经颈静脉采集血液,以等量的 16% 改良阿氏液抗凝,并用该缓冲液 3 000 r/min 离心洗涤 3 次,计算血细胞比容,以 1 : 1(体积比)加入冷冻保存液,分装于 5 ml 冻存管中,用纱布包裹成包或置于液氮保藏筒内,于距离液氮液面上方约 9 cm 处悬浮 1.5 h,然后再缓慢浸入液氮(-196 °C)中,加挂标示牌,保藏有效期一般不超过 8 年。