

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

动物血涂片制备操作规程

Technical specification for animal blood smear preparation

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 术语和定义、缩略词	1
3 血涂片的制备	1
4 染色	3
5 质量评估	3
附 录 A（规范性附录） 瑞氏-姬姆萨染色	5
附 录 B（规范性附录） 迪夫快速染色	6
附 录 C（规范性附录） Diff-Quik 染色	8
附 录 D（规范性附录） 新亚甲蓝染色	9

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由北京中农大动物医院有限公司提出。

本标准由中国兽医协会归口。

本标准主要起草单位：北京中农大动物医院有限公司、中国农业大学、北京小动物诊疗行业协会、上海蓝石宠物医院管理有限公司、启晟（天津）宠物医院管理有限公司。

本标准主要起草人：刘洋、张琼、夏兆飞、吕艳丽、黄薇、王姜维、陈艳云。

中国兽医协会
CVMA

动物血涂片制备操作规程

1 范围

本标准规定了血涂片制备、染色和质量评估的方法。

本标准适用于全国各级动物诊疗机构的医务人员进行血涂片的制备和染色。

2 术语和定义、缩略词

下列术语和定义、缩略词适用于本文件。

2.1

血涂片

将一滴血液样本制成薄层血膜，染色后在显微镜下观察有无细胞数量、形态异常，有无异常病原微生物等结构，以提供诊断信息。

2.2

抗凝剂

利用物理或化学方法，去除或抑制血液中的凝血因子，防止血液凝固的化学试剂或物质。

2.3

新鲜全血

新鲜采集、未加入抗凝剂且尚未凝固的血液。

2.4

淡黄层

血液样本经密度梯度离心后，形成的位于血浆和红细胞之间的分层称为淡黄层，是白细胞和血小板集中的区域。

2.5

EDTA

ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

3 血涂片的制备

3.1 推片法制备血涂片

3.1.1 准备材料

新鲜全血或EDTA抗凝血、带磨砂边的载玻片、盖玻片、手套和铅笔。

3.1.2 操作步骤

以下涂片制备过程以右利手人员操作为例，其他人员可根据个人习惯进行操作：

- a) 操作人员佩戴手套，取一张干燥、洁净、表面无油脂或杂质的载玻片，左手持该载玻片的两端；或将载玻片置于水平台面上，并以左手固定其位置。
- b) 在距载玻片磨砂边约 1cm 处，滴加一滴新鲜全血或 EDTA 抗凝血。
- c) 右手取一盖玻片，拇指和中指持盖玻片两侧，食指轻触盖玻片；或领取一张载玻片代替盖玻片。
- d) 盖玻片一侧轻触载玻片表面，二者保持 30°~45° 夹角，回拉盖玻片，直至其接触血滴，此时，血液会沿盖玻片向两侧延伸至盖玻片宽度。
- e) 向远离血滴的方向迅速而平稳地推盖玻片，血液即可在载玻片表面形成一层由厚至薄均匀过渡的血膜。
- f) 将制备好的血涂片自然风干，或在空气中挥动加速风干。
- g) 在载玻片的磨砂边用铅笔对血涂片进行标记。

3.1.3 注意事项

推片法制备血涂片时需注意：

- a) 载玻片表面须洁净、干燥、无杂质，且不可重复使用。
- b) 盖玻片边缘应平滑、无毛糙。
- c) 推片时，勿在垂直方向上对盖玻片施力，也不可过早离开载玻片表面。
- d) 应根据血液浓稠程度调整盖玻片与载玻片的角度及推片速度，若血液稀薄，则应加大二者的角度并快速推片；若血液浓稠，则应减小二者的角度并缓慢推片。
- e) 血膜的长度宜为载玻片的 1/2 至 2/3，不可超出载玻片，宽度宜略窄于载玻片。
- f) 自然风干血涂片，避免用吸水纸吸干或擦干。
- g) 血涂片不可接触福尔马林蒸汽，不可冷藏保存。

3.2 盖玻片法制备血涂片

3.2.1 准备材料

新鲜全血或 EDTA 抗凝血、盖玻片、手套和铅笔。

3.2.2 操作步骤

盖玻片法制备血涂片的操作步骤如下：

- a) 操作人员佩戴手套，取一张干燥、洁净、表面无油脂或杂质的盖玻片，在其中央滴加一滴新鲜全血或 EDTA 抗凝血。
- b) 另取一张盖玻片，十字交叉置于前一盖玻片及血滴上方。
- c) 在血液完全散开前，迅速地平行拉开两张盖玻片，血液即在盖玻片上形成均匀分布的血膜。
- d) 将制备好的血涂片自然风干，或在空气中挥动加速风干。

3.2.3 注意事项

盖玻片法制备血涂片时需注意：

- a) 盖玻片表面应干燥、洁净、无油脂或杂质，且不可重复使用。
- b) 应在血液完全散开前将两张盖玻片拉开。
- c) 应平行拉开盖玻片，不可在垂直方向上挤压或分开两张盖玻片。
- d) 自然风干血涂片，避免用吸水纸吸干或擦干。

- e) 血涂片不可接触福尔马林蒸汽, 不可冷藏保存。

3.3 淡黄层涂片的制备

3.3.1 准备材料

EDTA抗凝血、毛细管、黏土密封剂、医用砂轮、载玻片、纸巾、毛细管离心机、手套和铅笔。

3.3.2 操作步骤

制备淡黄层涂片的操作步骤如下:

- a) 用毛细管吸取 EDTA 抗凝血, 使血液充满管腔的 $2/3 \sim 3/4$, 用纸巾将毛细管外部多余的血液擦净。
- b) 将毛细管垂直插入黏土密封剂内, 轻轻旋转毛细管并将其取出。插入毛细管中的密封剂长度不少于 4mm。
- c) 将毛细管放入毛细管离心机内, 封口端朝向离心机转子的边缘, 10000g 离心 5 分钟。
- d) 取出离心后的毛细管, 在红细胞与淡黄层交接处约 1~2mm 的红细胞层, 用医用砂轮切割毛细管, 取含淡黄层的一段毛细管备用。
- e) 取一张干燥、洁净、表面无油脂或杂质的载玻片, 将淡黄层细胞和少量血浆滴于载玻片靠近磨砂边约 1cm 处。
- f) 另取一张洁净的载玻片, 十字交叉置于淡黄层样本上, 在样本完全散开前, 平稳地推拉第二张载玻片, 制成一层细胞膜。
- g) 将制备好的淡黄层涂片自然风干, 或在空气中挥动加速风干。
- h) 用铅笔在载玻片磨砂边上进行标记。

3.3.3 注意事项

制备淡黄层涂片时须注意:

- a) 载玻片应洁净、干燥、表面无油脂或杂质, 且不可重复使用。
- b) 切割毛细管时避免断端碎片掉落于淡黄层样本中。
- c) 推片时, 避免挤压样本, 不可在垂直方向上向载玻片施力或过早地将两张载玻片分开。
- d) 自然风干淡黄层涂片, 避免用吸水纸吸干或擦干。
- e) 血涂片不可接触福尔马林蒸汽, 不可冷藏保存。

4 染色

血涂片或淡黄层涂片可选用瑞氏-姬姆萨、迪夫或Diff-Quik等罗曼诺夫斯基染色法进行染色, 具体操作见附录A、B和C。血涂片或EDTA抗凝血还可进行新亚甲蓝染色, 具体操作见附录D。

5 质量评估

5.1 大体评估

制备好的血涂片应满足以下条件, 否则应舍弃并重新制备:

- a) 血液样本应全部位于血涂片上。
- b) 血膜均匀过渡, 无空泡、间断或划痕。
- c) 推片法血涂片应有火焰状的羽状尾。

- d) 染色后的涂片无明显颜色差异或分界。
- e) 罗曼诺夫斯基染色的涂片呈蓝色至紫红色，新亚甲蓝染色后的涂片呈淡蓝色。

5.2 显微镜评估

血涂片的质量评估可在显微镜目镜10倍×物镜10倍放大下进行：

- a) 推片法制备的血涂片血细胞由厚至薄均匀分布，有足够大的单细胞层，白细胞分布均匀而非聚集于尾部。
- b) 盖玻片法制备的血涂片血细胞呈单层均匀分布。
- c) 淡黄层涂片中央厚、四周薄，有足够大的单细胞层。
- d) 细胞完整，无显著的细胞破裂现象。
- e) 罗曼诺夫斯基染色中，红细胞呈橘红色至粉红色，白细胞细胞核呈不同程度的蓝色。
- f) 新亚甲蓝染色中，红细胞呈淡绿色，白细胞细胞核及颗粒、血小板颗粒呈蓝色。

附 录 A
（规范性附录）
瑞氏-姬姆萨染色

A.1 准备材料

涂片样本、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.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 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
(规范性附录)
迪夫快速染色

B.1 滴染法

B.1.1 准备材料

涂片样本、迪夫A液、迪夫B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。

B.1.2 操作步骤

迪夫染色滴染法操作步骤如下：

- a) 将风干涂片水平置于染色架上，有样本的一面朝上。
- b) 滴加迪夫 A 液，使其完全覆盖涂片，染色 20~30s。
- c) 用磷酸盐缓冲液将涂片上的 A 液冲净，并将涂片上多余的液体倾倒掉。
- d) 滴加迪夫 B 液，使其完全覆盖涂片，染色 20~30s。
- e) 用去离子水或蒸馏水冲洗涂片，直至冲净染液。
- f) 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。

B.1.3 注意事项

采用滴染法进行迪夫染色时的注意事项同附录A.3。

B.2 浸染法

B.2.1 准备材料

涂片样本、迪夫A液、迪夫B液、磷酸盐缓冲液、洗耳球、染色缸、计时器、吸水纸、去离子水或蒸馏水。

B.2.2 操作步骤

迪夫染色浸染法操作步骤如下：

- a) 将迪夫 A 液、B 液和磷酸盐缓冲液分别置于染色缸内。
- b) 将风干涂片的样本部分完全浸入迪夫 A 液中，小幅度上下移动玻片，浸染 20~30s。
- c) 将涂片从 A 液中取出，在染缸边缘拭去多余染液。
- d) 将涂片样本部分完全浸入磷酸盐缓冲液中，小幅度上下移动玻片 8~10 次。
- e) 将涂片从磷酸盐缓冲液中取出，在染缸边缘拭去多余液体。
- f) 将涂片样本部分完全浸入迪夫 B 液中，小幅度上下移动玻片，浸染 20~30s。
- g) 将涂片从 B 液中取出，在染缸边缘拭去多余染液，并用流动的去离子水或蒸馏水冲洗干净。
- h) 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。

B.2.3 注意事项

采用浸染法进行迪夫染色时，应注意：

- a) 涂片内有易脱落的成分时，应避免采用浸染法染色。
- b) 染缸内的染液可重复利用，但易造成涂片样本污染，应定期更换。
- c) 同附录 A.3 的 a)、b)、e) 和 f)。

中国兽医协会
CVMA

附录 C
(规范性附录)
Diff-Quik 染色

C.1 准备材料

涂片样本、Diff-Quik染液套组、洗耳球、染色缸、计时器、吸水纸、去离子水或蒸馏水。

C.2 操作步骤

Diff-Quik染色的操作步骤如下：

- a) 将 Diff-Quik 染液套组中的 A、B、C 液分别置于染色缸内。
- b) 将风干涂片的样本部分浸入 A 液，小幅度上下移动玻片，固定 10~20s。
- c) 将固定后的涂片依次浸入 B 液和 C 液，各染色 5~10s，染色时可小幅度上下移动玻片。
- d) 用流动的去离子水或蒸馏水将染液冲洗干净；或将玻片置于含去离子水或蒸馏水的容器中，轻柔晃动玻片，以洗去染液。
- 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。

C.3 注意事项

采用Diff-Quik染色时的注意事项同附录B.2.3。

附 录 D
(规范性附录)
新亚甲蓝染色

D.1 准备材料

EDTA抗凝血、新亚甲蓝染液、塑料试管、计时器、载玻片、盖玻片。

D.2 操作步骤

新亚甲蓝染色的操作步骤如下：

- a) 取一滴 EDTA 抗凝血于塑料试管中，另滴加 1~2 滴新亚甲蓝染液于同一试管中，并将血样和染液混匀。
- b) 将塑料试管在室温下静置 20min 或更长时间。
- c) 取一滴血样-染液混合物，采用推片法制备血涂片，操作见 3.1.2。

D.3 注意事项

新亚甲蓝染色时应注意：

- a) 染色时间应充足，环境温度较低时，可适当延长染色时间。
 - b) 其他注意事项同 3.1.3。
-