ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

爬行动物血细胞人工计数法

Code of practice for manual counting of blood cells in reptiles

（征求意见稿）

中国兽医协会 CVMA

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　规范性引用文件.....1
3　术语和定义.....1
4　爬行动物血液细胞的组成.....1
5　爬行动物血液的常规评估.....1
6　抗凝剂选择及对血细胞和血涂片质量的影响.....2
7　红细胞计数.....2
8　红细胞压积（Pcv）.....2
9　平均红细胞体积（MCV）.....3
10　血红蛋白估计.....3
11　平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）.....4
12　平均红细胞血红蛋白量（MCH）.....4
13　白细胞计数.....4
14　血涂片估计白细胞计数.....6
15　不同细胞组绝对值的计算.....6
16　凝血细胞计数.....7
17　数据分析注意事项.....7
附录A（规范性）　Natt　和　Herrick's染液.....8
附录B（规范性）　血涂片.....10

中国兽医协会 CVMA

前　言

本文件按照GB/T　1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规则起草。
本文件由北京中农大动物医院有限公司提出。
本文件由中国兽医协会归口。
本文件主要起草单位：北京中农大动物医院有限公司、中国农业大学、北京农业职业学院。
本文件主要起草人：张雪芳、林嘉宝、刘洋、马文、吕艳丽、夏兆飞

中国兽医协会 CVMA

爬行动物血细胞人工计数法

1 范围

本文件规定了临床爬行动物各类血细胞的识别和人工计数方法。

本文件适用于临床爬行动物血液学分析和计数。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

3.1 血细胞比容 Packed cell volume,PCV

红细胞占全血容量的百分比

3.2 平均红细胞体积 Mean Corpuscular volume，MCV

每个红细胞的平均体积

3.3 平均红细胞血红蛋白含量 Mean Corpuscular Hemoglobin，MCH

每个红细胞内所含血红蛋白的平均量

3.4 平均红细胞血红蛋白浓度 Mean corpuscular hemoglobin concentration， MCHC

每升或每分升红细胞中所含血红蛋白克数

4 爬行动物血液细胞的组成

a） 有核红细胞
b） 有核血小板
c） 白细胞：异嗜性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜苯胺蓝细胞

5 爬行动物血液的常规评估

——血细胞形态、血液寄生虫、异常细胞；
——细胞数量：红细胞总数、白细胞总数、血小板总数；

中国兽医协会 CVMA

——白细胞分类计数；
——血红蛋白；
——MCV、MCH、MCHC。

6 抗凝剂选择及对血细胞和血涂片质量的影响

根据物种和品种选择不同的抗凝剂
——EDTA 和肝素锂，EDTA 可能会导致部分爬行动物溶血，宜选择肝素锂。
——肝素锂抗凝后的爬行动物血液制作血涂片染色后可能导致整个背景呈蓝色，导致白细胞和血小板聚集。
——应使用新鲜血液，采集后立即制作血涂片。
——如果不能立即对用肝素或 EDTA 抗凝的全血样本进行评价，应将样本应保存在 4℃，并在采集后的 24 小时内进行评价。

7 红细胞计数

7.1 Natt-Herrick's 方法

7.1.1 材料

5mL 移液器、20mL 微量移液器、混匀器、移液枪、带盖的培养皿（直径 8.5cm）、滤纸（直径 8.5cm）、棉棒、蒸馏水、Neubauer 血细胞计数板和盖玻片、显微镜（宜使用相差显微镜）。

7.1.2 方法

——取 4mL Natt-Herrick's 溶液到样本管中，用移液枪从样本中吸取 20μL 抗凝血，擦拭枪头尖端的外部，将全血打入 Natt-Herrick's 溶液中；
——使用混匀器中将液体混匀；
——使用干净、干燥的血细胞计数器，固定盖玻片，用移液枪吸取少量混匀液体放入血细胞计数器，避免气泡进入；
——将滤纸放在培养皿中，用蒸馏水轻轻润湿滤纸；
——棉拭子掰成两段，将棉拭子（6 厘米长）放在带盖培养皿的底部；
——装载血的血细胞计数器放在棉拭子上，放在湿的有盖的培养皿中避免样本脱水；
——等待 5 分钟，细胞沉淀，计数 5×16 小方格的细胞（共 80 个小方格），小方格内数上不数下，数左不数右。

7.1.3 计算

红细胞总数的计算方式见公式（1）

$$\text{红细胞数（}\ RBC\,\text{s})/L=\left(\text{五个中方格的}\ \ RBC\ \text{总数}\ \div 5\right)\times 25\times 10^{7}\text{（0.1ul到1）}\times 200\text{（稀释倍数）}$$

$$\text{简化为红细胞数（}\ \ RBC\,\text{s})/L=N/100\times 10^{12}\qquad\text{……(1)}$$

8 红细胞压积（PCV）

8.1 材料和设备

毛细离心管、黏土、毛细血管离心机、读卡器

8.2 方法

——把毛细离心管放入抗凝全血（肝素锂、EDTA 等）中，使血液吸到毛细离心管的四分之三位置；

——毛细血管一侧末端用黏土密封；
——将密封好的毛细离心管放入离心机中，堵塞的一端朝外，12000g 离心 5 分钟；
——离心后的血在离心管中分为三层，上层为血浆，中间层为白细胞和血小板，下层为红细胞；
——使用红细胞压积读数器测量 PCV：黏土一端对准读卡器的低端，血浆顶部对准读卡器最上方，位置刻度对准中间淡黄层最下方并读数。

9 平均红细胞体积（MCV）

——单个红细胞的平均体积
——MCV 的计算见公式（2）

$$MCV(\mathrm{fL}) = PCV \times 10 \div RBC数量(\mathrm{uL}) \quad \cdots\cdots (2)$$

10 血红蛋白估算

10.1 氧合血红蛋白法

10.1.1 材料和设备

5mL 带盖的样本管、1000ml 锥形瓶、移液器、玻璃棒、牙签、比色皿、擦镜纸、血红蛋白仪。

10.1.2 氨溶液

4mL 的氨溶液（比重约为 0.88），用蒸馏水定容到 1000mL，储存在 8-12℃

10.1.3 方法

——用移液枪将 4mL 氨溶液转移到样本管中；
——用移液枪吸出 20μL 全血，放入样本管中，混匀器混匀；
——将 3.5mL 稀释全血倒入比色皿中，同时用牙签去除胶冻的细胞核；
——以氨溶液做空白，将血红蛋白仪调零，用血红蛋白计或分光光度计在 570nm 和 880nm 读数。

11 平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）

——血红蛋白重量和所占容积的比例；
——MCHC 的计算见公式（3）。

$$MCHC(g/dL) = Hb(g/dL) \div PCV(\%) \times 100 \quad \cdots\cdots (3)$$

中国兽医协会 CVMA

12 平均红细胞血红蛋白量（MCH）

——单个红细胞平均血红蛋白含量；
——MCH 含量的计算见公式（4）。

$$MCH(pg) = Hb(g/dL) \div RBC(\times 10^9/uL) \times 10 \quad \cdots\cdots (4)$$

13 白细胞计数

计数方法包括两种：间接法（血涂片评估、嗜酸性粒细胞 Unopette 5877）和直接（Natt and Herrick’s）。

13.1.1 材料和设备

嗜酸性粒细胞 Unopette 5877（含有 0.1%荧光桃红 B 稀释液、25μL 移液枪头、一次性吸管）试剂盒、血细胞计数器、血细胞计数器盖玻片、显微镜

13.1.2 方法

——瑞氏吉姆莎染色血涂片对白细胞进行分类计数，确定异嗜性粒细胞和嗜酸性细胞的相对数量；
——肝素化全血 25μL 加入到嗜酸性粒细胞 unopette5877 稀释液中（1:32 稀释），室温孵育 10 分钟；
——孵育稀释的样品转移到血细胞计数器中；

——滤纸放在培养皿中，用蒸馏水轻轻润湿滤纸。棉签棒掰成两段，放入带盖的培养皿底部；

——将装载稀释血的血小板计数器保存在带盖的培养皿的小棒上，避免脱水；

——孵育 10 分钟；
——在血细胞计数器中 10x 物镜对两侧 18 个大正方格内异嗜细胞和嗜酸性细胞的绝对数量计数。

13.1.3 总白细胞计算

总白细胞的计算方式见公式（5）。

$$TWBC/uL = (\text{两个室总异嗜性粒细胞} + \text{嗜酸性粒细胞}) \times 1.1 \times 16 \times 100 \div (\text{异嗜\%} + \text{嗜酸\%})$$

$$\cdots\cdots (5)$$

13.1.4 注意

存放在黑暗、阴凉的地方。暴露在光线下会导致荧光桃红 B 染色液的破坏。

13.1.5 优缺点

优点：相对容易操作，比 Natt-Herrick’s 的方法更精确。

缺点：需依赖嗜酸性粒细胞和异嗜性粒细胞的数量，当单核细胞超过粒细胞时，计数准确性会降低。

13.2 Natt-Herrick’s 方法

中国兽医协会 CVMA

计数四个角中方格的白细胞，计算白细胞的数量

13.2.1 材料和设备

Natt-Herrick's 溶液、肝素抗凝血、移液枪、试管

13.2.2 方法

——取 4mL Natt-Herrick's 溶液到样本管中，用移液枪从样本中吸取 20μL 血，放入样本管中；
——将样本管放在混匀器中混匀；
——使用干净、干燥的血细胞计数器，固定盖玻片，用移液枪吸取少量混匀液体放入血细胞计数器，不要过多或过低的填充腔，避免气泡进入；
——将滤纸放在培养皿中，用蒸馏水轻轻润湿滤纸；
——棉拭子掰成两段，将棉拭子（6 厘米长）放在带盖培养皿的底部；
——装载血的血细胞计数器放在棉拭子上，盖上培养皿避免样本脱水；
——孵育 5 分钟，细胞沉淀，计数 9 个大方格的细胞。

13.2.3 总白细胞计算

总白细胞的计算方式见公式（6）

$$WBC/mm^3 = (\text{九个大方格总细胞数} + 10\%) \times 200 \quad \cdots\cdots (6)$$

14 血涂片估计白细胞计数

——制作一张完美的血涂片（足够的单层区域、细胞形态良好、无抗凝剂的新鲜血液制备）
——瑞士吉姆萨染色液对玻片进行染色
——计数单层区域 10 个视野白细胞，计算每个视野的平均白细胞数

14.1 计算

血涂片法总白细胞的计算方式见公式（7）

$$\text{估计}WBC/\text{uL} = (10\text{个视野平均细胞数}) \times (\text{物镜})^2 \quad \cdots\cdots (7)$$

14.2 注意事项

在哺乳动物中，人工变异系数为30%，比较和检测个别患病动物注意这种差异。

15 不同细胞组绝对值的计算

——对 100 个白细胞进行分类计数；
——细胞绝对数量的计算方式见公式（8）。

$$\text{这种细胞的绝对数} \times 10^9/L = (\text{细胞占白细胞计数的百分比} \times \text{总白细胞}) \div 100 \quad \cdots\cdots (8)$$

16 凝血细胞计数

Natt-Herrick’s 法和血涂片法

16.1 Natt-Herrick’s 法

方法同红细胞方法，缺点是很难区分凝血细胞和小淋巴细胞，从而造成计数错误。同时时间也非常久，紧急病例不适用。

16.2 血涂片评估

——血涂片单层区域 10 个油镜视野平均凝血细胞；
——凝血细胞平均小于 1 个为血小板减少；
——凝血细胞平均大于 5 个提示血小板增多；
——凝血细胞数量的计算方式见公式（9）。

$$PLT/uL = (\text{高倍镜下10个视野平均凝血细胞数量}) \times 2000 \quad \cdots\cdots (9)$$

16.3 注意事项

实际凝血细胞数量很难确定，因为凝血细胞容易聚集。因此外周血涂片估计，凝血细胞浓度经常被描述为正常、升高或降低。

17 数据分析注意事项

影响分析数据的生理和外部因素
——年龄，性别，环境，季节，营养状况，检测方法和误差等因素，再考虑疾病相关问题；
——从爬行动物采集血液样本经常受到淋巴液污染（如龟的背甲下静脉），可以评估血细胞形态特征，但不能用于血细胞计数。

中国兽医协会 CVMA

附 录 A
（规范性）
Natt-Herrick’s染液

A.1 Natt-Herrick’s染液配置

表A.1 染液成分

成分	剂量
NaCl	3.88g
Na2SO4	2.5g
Na2HPO4.12H2O	2.91g
KH2PO4	0.25g
40%甲醛	7.5mL
龙胆紫 2B	0.1g
蒸馏水	到 1000mL

注：过滤之前，孵育12小时

将上述化学品按规定的顺序溶解在蒸馏水中，并在容量瓶中稀释至总体积为1000mL。孵育12小时后，溶液经精细滤纸过滤，溶液的pH是7.3。

A.1.1 染色后细胞形态和颜色

A.1.1.1 红细胞

大的卵圆形红细胞的细胞核呈紫色，细胞质也呈紫色，但紫色程度小的多。由于红细胞的形状很特殊，所以将其与白细胞和血小板区分开来并不困难。

A.1.1.2 白细胞

白细胞的细胞核被染成深蓝紫色，细胞质染成浅紫色。细胞质染色颗粒可以完全充满细胞，很容易将该细胞与其他细胞区分开。

A.1.1.3 凝血细胞

血液中最小的细胞是凝血细胞。这种细胞通常呈椭圆形，细胞核染成浅紫色。它的细胞质通常是无色的，但可以染成淡紫色。

中国兽医协会 CVMA

附 录 B
（规范性）
血涂片

B.1 准备血涂片（最常用）

a) 在载玻片的磨砂端标记姓名；
b) 在载玻片靠近磨砂端上滴一滴混合均匀的血；
c) 一手固定载玻片，另一手用拇指和食指持盖玻片；
d) 将盖玻片的一端置于血滴的前方，两玻片呈 30-45 度角。将盖玻片稍微往后触碰血滴，此时血液会沿着推片边缘扩散。扩散完成后立即向前推去；
e) 将玻片在空气中轻轻挥动风干，或用吹风机吹干。

B.2 血涂片区域

a) 三个区域：a、体细胞区 b、单层区域 c、羽状区（最外层）；
b) 体细胞区一般较厚，细胞通常收缩、扭曲，染色不良，无法进行可靠的评估；
c) 单层区细胞形态舒展，用于细胞分类计数，是细胞形态评估最佳的区域；
d) 羽状区是寻找微生物（微丝蚴）、聚集血小板、大型非典型细胞、肿瘤细胞、聚集血小板的最佳区域。

B.3 读片

a) 先用 10 或 20 倍物镜快速扫描整个血涂片，从体细胞区到单层区到羽状缘；
b) 在低倍镜下，可以检查血涂片的染色、整体厚度、细胞分布、单层面积、背景等，羽状缘观察聚集的血小板、大型寄生虫和大型非典型细胞；
c) 单层区域观察细胞并计数。

中国兽医协会 CVMA