

团 体 标 准

T/CVMA 69—2021

动物血涂片制备操作规程

Technical specification for animal blood smear preparation

2021 - 12 - 22 发布

2021 - 12 - 22 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 血涂片的制备.....	1
4.1 盖玻片法制备血涂片.....	2
4.2 淡黄层涂片的制备.....	2
5 染色.....	2
6 质量评估.....	2
6.1 大体评估.....	3
6.2 显微镜评估.....	3
附 录 A（规范性） 瑞氏-姬姆萨染色.....	4
附 录 B（规范性） 迪夫快速染色.....	5
附 录 C（规范性） Diff-Quik 染色.....	7
附 录 D（规范性） 新亚甲蓝染色.....	8

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》的规定起草。

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。

本文件主要起草人：刘洋、张琼、许楚楚、夏兆飞、吕艳丽、张兆霞、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

本文件规定了动物血涂片制备、染色和质量评估的方法。
本文件适用于动物诊疗机构的医务人员进行血涂片的制备和染色。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

血涂片 blood smear

将一滴血液样本制成薄层血膜，以进行形态诊断的样本。

3.2

抗凝剂 anticoagulant

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。

3.3

新鲜全血 fresh whole blood

新鲜采集、未加入抗凝剂且尚未凝固的血液。

3.4

淡黄层 buffy-coat

抗凝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。

4 血涂片的制备

4.1 推片法制备血涂片

4.1.1 准备材料

准备新鲜全血或EDTA抗凝血、带磨砂边的载玻片、盖玻片、检查手套、铅笔或不易洗脱的记号笔。

4.1.2 操作步骤

血涂片的制作步骤如下：

- a) 操作人员佩戴检查手套，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 1 cm 处，滴加一滴新鲜全血或 EDTA 抗凝血。
- c) 右手取一盖玻片，盖玻片边缘应平滑、无毛糙。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 $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 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。推片时，不可在垂直方向上对盖玻片施力，也不可过早离开载玻片表面。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。
- f) 将制备好的血涂片自然风干，或在空气中挥动加速风干，不可用吸水纸吸干或擦干。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。
- g) 在载玻片的磨砂边用铅笔对血涂片进行标记。

4.2 淡黄层涂片的制备

4.2.1 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、检查手套和铅笔。

4.2.2 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 2/3~3/4，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 4 mm。
- 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，10000 g 离心 5 min。
- d) 取出离心后的毛细管，在红细胞与淡黄层交接处约 1 mm~2 mm 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 1 cm 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。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。
- 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，避免用吸水纸吸干或擦干。
- h) 用铅笔在载玻片磨砂边上进行标记。

5 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。

6 质量评估

6.1 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。

6.2 显微镜评估

血涂片的质量评估可在显微镜100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)
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、检查手套。

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，血膜一面朝上。
- b) 滴加瑞氏-姬姆萨染液，使其完全覆盖涂片，染色 1 min。
- 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 min~10 min。
- d) 用去离子水或蒸馏水从平放的涂片一端缓冲洗，避免直接冲洗有样本的部位，稀释并流去涂片表面多余的染色液，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

染色时应注意：

- 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)
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 s~30 s。
- 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。
- d) 滴加迪夫 B 液，使其完全覆盖涂片，染色 20 s~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 s~30 s。
- 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 s~30 s。
- 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)
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 s~20 s。
- c) 将固定后的涂片依次浸入 B 液和 C 液，各染色 5 s~10 s，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)
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 20 min 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。
-