

团 体 标 准

T/CVMA 335—2026

大熊猫外周血涂片制备与染色技术规程

Technical procedures for preparation and staining of Giant Panda
peripheral blood smears

2026-1-14 发布

2026-1-14 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国团体

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国大熊猫保护研究中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国大熊猫保护研究中心、四川大学华西医院、成都辉跃中科生物科技有限公司、唐山动物园。

本文件主要起草人：李才武、陈豪、毛志刚、陈思、刘超男、朱艳、李承瑶、杨梦芳、陈丹钰、周汝学、李德生、魏荣平、张贵权、冯刚。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

大熊猫外周血涂片制备与染色技术规程

1 范围

本文件规定了大熊猫外周血涂片制备、染色和质量评估、废弃物处理、记录与报告的方法。

本文件适用于大熊猫外周血液样本血涂片的制备操作，包括野生大熊猫的救护、圈养大熊猫日常体检及疾病诊疗等场景下的血涂片制作。本文件规范大熊猫外周血涂片的制备流程，保证血涂片的质量，为大熊猫血液细胞形态学观察、疾病诊断、健康监测等提供准确可靠的样本基础。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

T/CVMA 233 大熊猫健康体检规范

T/CVMA 235 大熊猫血液采集技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

血细胞形态学检查 blood cell morphological examination

对血液有形成分质量的检查和数量的评估，主要包括对红细胞、白细胞及血小板的大小、形态、染色及结构等方面的检查。

3.2

血涂片 blood smear

血细胞形态学检查的基本方法。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异常、形态异常，有无病原微生物等结构，以提供诊断信息。通过将血液制备成涂片，经过染色后在显微镜下观察其形态，为疾病的筛查与诊断提供依据。

4 仪器、试剂与耗材

光学显微镜（配备油镜）、全自动推染片机或者半自动染片机（需人工制备血涂片后机器染色）、载玻片、推片、抗凝血液样本（如EDTA抗凝血）、染色剂（如瑞氏染色、吉姆萨染色等）、甲醇（AR级，无丙酮，用于固定）、蒸馏水或缓冲液（用于染色）、吸水纸。

5 血涂片的制备

5.1 人工制备血涂片操作

5.1.1 人员防护准备

操作人员需穿戴手套、口罩、实验服，避免直接接触血液样本。

5.1.2 采血

血液采样方法按照 T/CVMA 235 相关内容进行。采样后应尽快进行血涂片制备，避免使用陈旧性血液样本推片。轻轻摇动抗凝管，使血液混匀。

5.1.3 滴样

用微量移液器或毛细管吸取 5~20 μl 血液，将血滴滴在载玻片一端，距边缘约 1 cm 处或者整片的 3/4 处的中央。

5.1.4 推片

推玻片以与载玻片 30°~45°角接触血滴，待血液沿推玻片边缘展开，快速、平稳地向前推成薄层，形成舌形或椭圆形的血膜。推片时应保持力度均匀，避免细胞堆积或血膜过厚。

5.1.5 干燥

将涂片置于室温下自然晾干，避免加热或吹干，防止细胞变形。天气寒冷或潮湿时，为避免干燥时间过长导致细胞变形、皱缩，可置于 37℃温箱促干。

5.1.6 染色

5.1.6.1 瑞氏染色法。滴加 3~5 滴瑞氏染液覆盖涂片，染色 0.5 min~1 min。加入等量或稍多的缓冲液与染液混合，混匀，继续染色 5 min~10 min。用蒸馏水轻轻冲洗，去除多余染液，直立晾干。

5.1.6.2 吉姆萨染色法。将涂片先用甲醇固定 3 min~5 min，固定完成后浸入吉姆萨染液中，染色 15 min~30 min，用蒸馏水冲洗，晾干。

5.2 全自动血涂片制备仪制备血涂片操作

5.2.1 准备

5.2.1.1 设备与试剂准备

全自动推染片机或者半自动染片机（需人工制备血涂片后机器染色）。

5.2.1.2 人员防护准备

操作人员需穿戴手套、口罩、实验服，避免直接接触血液样本。操作区域应清洁、无尘，避免样本污染。

5.2.2 取样

推染片机可根据血液标本的红细胞比容或黏度来调整滴加的血量（2 μl ~4 μl ）。

5.2.3 进样

自动进样模式和手动进样模式。使用自动进样器进样时，将需推片的血标本放入与仪器匹配的试管架中，送入轨道后，仪器根据程序自动混匀血样、吸样并执行推染片过程。使用手动进样器进样时，在仪器上对样本编号后，将待推片血样轻柔颠倒混匀 6~8 次后再进样，仪器吸样后自动执行推染片过程。

注：使用全自动血涂片制备仪的自动进样模式制备血涂片时，应保证采血量至少在 1.5 mL，不能有血凝块。使用全自动血涂片制备仪的手动进样模式制备血涂片时，应保证采血量至少在 0.5 mL，不能有血凝块。

5.2.4 推片

推片角度（ 20.0° ~ 36.0° ）、速度（30 mm/s~185 mm/s），血滴延展时间（0.5 s~3.0 s），仪器可根据血细胞分析的血细胞比容测定（HCT）检测结果调整血滴延展时间、推片速度和角度。

5.2.5 染色流程

采用自动推染片机进行染色，按照仪器程序进行。如果染色不佳，可调节染色速度或者试剂比例关系；如果是试剂问题，应及时更换新批号染液。不同厂家仪器染色步骤略有差异，以仪器说明书为准。定期对仪器的推染片效果进行评估，做好仪器的维护保养。定期更换仪器推玻片和染液、缓冲液。

6 质量控制

6.1 涂片质量

血膜由厚到薄逐渐过渡，厚薄适宜，头、体、尾分明，末端呈方形或羽毛状且无颗粒状、划线或裂隙；血膜至少长 25 mm，至载玻片两侧边缘的距离约为 5 mm，且边缘光滑；血细胞从厚区到薄区逐步均匀分布，在镜检区域内，细胞形态应无人为异常改变；无人为污染。

6.2 染色质量

血涂片质量肉眼观察血膜外观为淡紫红色。显微镜观察染色应清晰，细胞分布均匀，血细胞无人为形态改变；观察区域无细胞叠加、无空泡、无溶血，无细胞脱落痕迹，细胞核与细胞质对比明显，无沉淀或过染。细胞染色效果红细胞呈淡粉红色，白细胞胞质能显示各自特有的色彩，白细胞核呈红色或者紫红色，核染色质清晰可见，细胞内外无或少见染料沉着。如染色不理想，可重新制备涂片。

7 废弃物处理

7.1 生物安全

废弃的载玻片、推玻片、染液等应按生物安全相关要求处理。锐器（如破损载玻片）放入专用锐器盒。

7.2 消毒

实验结束后，对操作台和设备进行消毒。

8 记录与报告

8.1 记录保存

详细记录涂片制备、染色和观察结果，保存原始数据。将合格的血涂片放入专用的玻片盒内，做好标识，注明大熊猫个体编号、采血时间等信息，保存于阴凉干燥处。血涂片的保存时间应根据实际需求确定，一般至少保存 6 个月，以便后续复查或进一步分析。

8.2 报告编写

根据观察结果编写报告，提供科学依据。报告应包括细胞形态描述、白细胞分类计数、细胞内含物、寄生虫等异常发现及建议。大熊猫血液指标参考值见 T/CVMA 233 中相关内容。正常血液涂片参考图片见附录 A 中附图 A.1 和附图 A.2。

9 注意事项

9.1 推片注意事项

推片时，注意以下事项：

- a) 载玻片表面须洁净、干燥、无杂质，且不可重复使用；
- b) 推玻片边缘应平滑、无毛糙；
- c) 推片时，勿在垂直方向上对推片施力，也不可过早离开载玻片表面；
- d) 应根据血液浓稠程度调整推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，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；
- e) 自然风干血涂片，避免用吸水纸吸干或擦干；
- f) 血涂片不可接触福尔马林蒸汽，不可冷藏保存。

9.2 染色注意事项

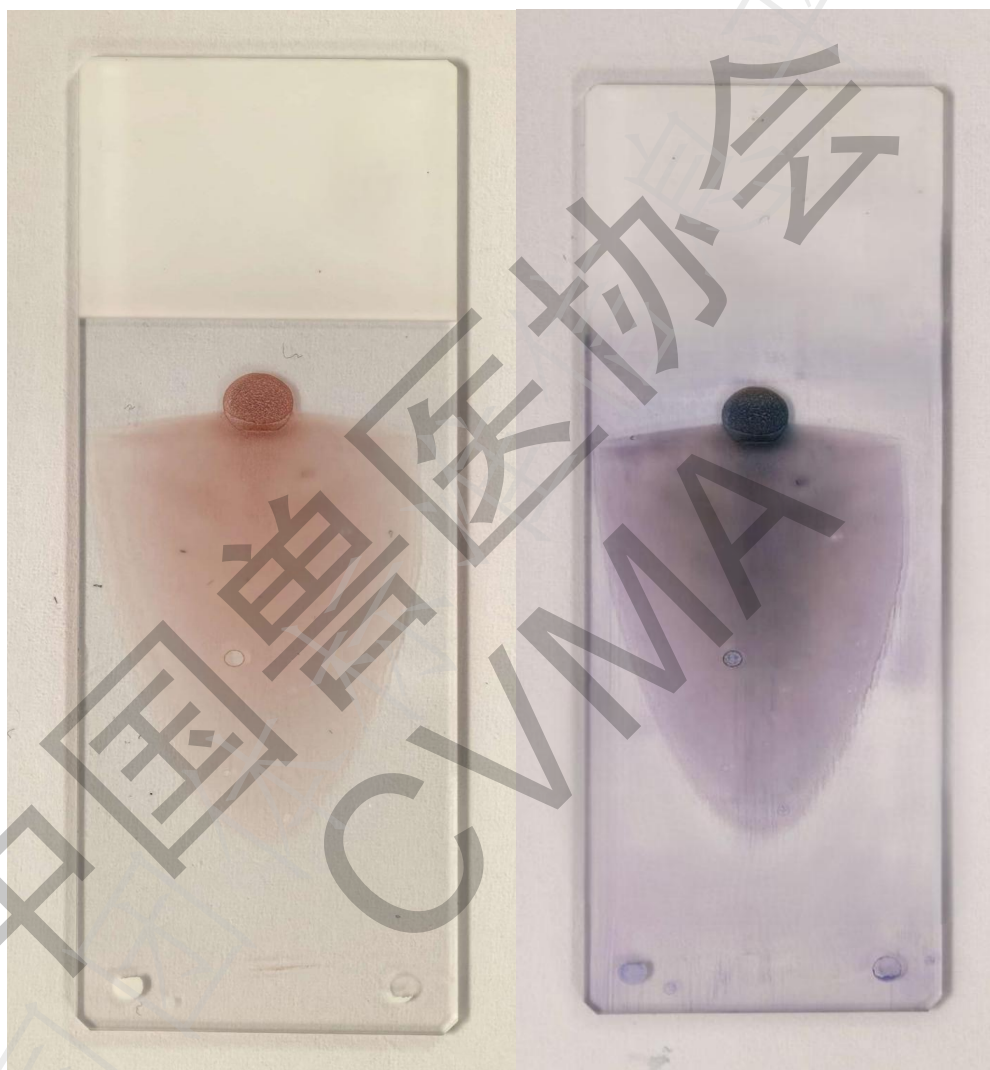
染色时，注意以下事项：

- a) 涂片样本应完全风干，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；
- b) 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 A
(资料性)
大熊猫血液涂片瑞氏染色示意图

A.1 大熊猫血液人工涂片瑞氏染色示意图

大熊猫血液人工涂片染色前和瑞氏染色后参考图片见图A.1。



注：图中左边血液涂片为染色前人工涂片，右边血液涂片为瑞氏染色后人工涂片。

图A.1 大熊猫血液人工涂片染色前和染色参考示意图（瑞氏染色）

A.2 大熊猫血液全自动涂片瑞氏染色示意图

大熊猫血液全自动涂片染色前和瑞氏染色后参考图片见图A.2。



注：图中左边血液涂片为染色前全自动涂片，右边血液涂片为瑞氏染色后全自动涂片。

图A. 2 大熊猫血液全自动涂片染色前和染色参考示意图（瑞氏染色）