

T/CVDA

团体标准

T/CVDA 31-2024

动物细胞学采样及制片技术标准

Technical Standard for Animal Cytology Sampling and Slides Preparation

2024-12-30 发布

2025-01-01 实施

中国兽药协会 发布

目 录

前 言.....	1
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
3.1 细胞学制片 Cytology Section.....	1
3.2 细胞学诊断 Cytology Diagnosis.....	1
3.3 固定 Fixing.....	1
3.4 穿透 Penetration.....	1
3.5 染色 Stain.....	1
3.6 脱色 Destaining.....	1
4 基本要求.....	2
4.1 一般要求.....	2
4.2 样本采集与处理.....	2
4.3 制片.....	5
4.4 染色.....	5
4.5 显微镜观察与诊断.....	7
4.6 质量控制与实验室管理.....	7
4.7 安全与伦理.....	7

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。

本文件由中国兽药协会提出并归口管理。

本文件起草单位：元医（杭州）科技有限公司、杭州瑞派宠物医院管理有限公司、东西志览国际文化发展无锡有限公司。

本文件主要起草人：曹迪、林琳、华聪、姜亚萍、王燕、陈铃霞、胡敏、李青松、蒋诗琪、赖晓云、赵星星、莫睿文。

动物细胞学采样及制片技术标准

1 范围

本文件规定了动物细胞学样本采集及制片标准操作方法及注意事项。

本文件适用于动物医院、动物第三方临床检验实验室或动物细胞研究实验室，这种技术方法广泛应用于动物医学领域，帮助兽医医生准确地识别和诊断动物的疾病。动物细胞学诊断的范围包括肿瘤学、感染性疾病、自身免疫性疾病、药物毒性和中毒疾病、部分遗传性疾病、营养不良和代谢性疾病等方面。

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

动物细胞学制片及诊断是通过显微镜检查动物组织或体液中的细胞来确定疾病的存在、性质和范围。在动物细胞学制片技术标准中，以下术语和定义可能会用到：

3.1 细胞学制片 Cytology Section

特指用于制作细胞薄片的技术，用于细胞形态学研究和诊断。

3.2 细胞学诊断 Cytology Diagnosis

根据细胞学检查结果，对细胞异常形态等进行诊断和分类。

3.3 固定 Fixing

使用化学固定剂（如福尔马林、酒精等）处理细胞或组织，以保持其结构和形态。

3.4 穿透 Penetration

固定剂充分渗透到细胞或组织内部的过程，确保细胞结构均匀固定。

3.5 染色 Stain

使用染色剂（如苏木精、伊红、甲苯胺蓝等）对固定后的细胞或组织进行处理，以增强特定结构的可见性。

3.6 脱色 Destaining

去除染色剂以外的非特异性染料或背景颜色的过程，以便于更好观察特定结构。

这些术语和定义有助于更好地理解动物细胞学制片过程和目的。

4 基本要求

4.1 一般要求

动物细胞学制片及诊断技术标准是确保动物细胞学采样制片结果的质量、诊断准确性的关键指导文件。这些标准涉及从样本的采集、处理、制片、染色、观察到最终诊断的全过程。以下是一些基本要求：

4.2 样本采集与处理

4.2.1 一般要求

- a) 采集动物组织或细胞样本时，必须遵循无菌操作原则，防止样本污染。
- b) 根据不同动物种属和组织部位，采用适当的方法，如细针穿刺、组织块切割或体液收集等。
- c) 样本处理包括分散细胞、固定细胞、以及后续的染色前处理。

4.2.2 样本采集及前处理

4.2.2.1 常见细胞学病灶分类

按照采样不同病变的层面及结构，由低到高分为：封闭、孔道、凹陷、侵蚀、平面、覆盖、突起、鼓包，其中细分为：

- a) 封闭：关节腔、胸腹腔、心包、胸腹腔脏器所有未与表面有接触的所有组织。
- b) 孔道：蜂窝织炎、窦道、孔洞、开裂等具有对外开放的通道或缝隙类。
- c) 凹陷：糜烂、侵蚀、溃疡等表面向下凹陷的大类。
- d) 平面：斑点、斑片、脱毛、皮屑、色素异常等非突起或微突起类。
- e) 硬化增厚：胼胝、苔藓化。
- f) 凸起：丘疹、斑块、风疹、结节、粉刺、瘢痕等突起较明显类。
- g) 鼓包：脓包、大疱、囊肿、血肿等突起皮肤较多，且具有液性与实性混合的病变（大疱除外）。

4.2.2.2 前置探查

a) 超声引导：在条件允许时，应使用超声探头对（封闭、孔道、凹陷、鼓包等）病灶的层深、体积、实性、液性、范围、血管分布等情况进行相应的探查，并进行记录。同时准备相关采集用具及大小型号与深度预估，及血管回避。当出现外表溃烂、渗出等病变情况，可使用探头外覆盖手法（检查手套或其他薄膜）。

b) 临床触诊：应对病灶进行实性、液性、囊性位置及分布进行检查及记录、同时硬结的实性深度、宽度、游离性进行检查记录。同时还需要记录病灶温度、瘙痒、痛感等观察结果。

c) 对于平面或微突、微凹的病灶，进行外观描述并记录。

4.2.2.3 采样方式

a) 拔毛：应顺毛流方向，止血钳夹住皮肤表面起，毛发 0.5cm 处，匀速拔出。

b) 浅刮：使用刀片或载玻片等锐利边缘，向自体一侧方向，快速刮动，不可逆方向操作。直到组织眼观湿润，不出血。

c) 深刮：同浅刮，直到微量、缓慢的红色血液渗出。

d) 穿刺：分为非负压及负压穿刺。其中淋巴结使用非负压穿刺采样手法。同时建议任何组织穿刺采样初始均使用非负法手法。根据采样结果的样本量，考虑递增为负压或更换更大号采样器具。采样应遵从，先浅后深，先外后内，先实质后液性的采样手法。以免造成多余污染和干扰。

e) 细胞刷：采样做刮取姿势，向一个方向刷动采样，不可进行逆方向的往复运动。

f) 拭子：旋转刮擦，并且旋转方向自始至终顺应同一个方向，不可中途变更不同性质及部位。

4.2.2.4 样本制备要求

4.2.2.4.1 封闭样本：穿刺手法（建议超声引导下操作）

样本常见分别为：实性、粘性、液性及骨髓血。其中实性样本应初步采样尽量避开血管，进行至少 2 张相对浅层的载玻片制片及 2 张深层的样本片。同时制片手法推荐为：一字/十字制片法（推荐一字制片法，可总计获得 8 张样本）。

样本结果：样本量充盈，在有形物观察区，细胞量（非成熟红细胞）应达到至少 5/LPF，总计细胞数量（非成熟红细胞）不低于 200 颗/张。当所有样本平均低于这个数量或血液污染严重、着色不良、挤压严重、堆层过厚、细胞变形破裂严重的情况下。当次样本不应出具有效报告。

穿刺手法：对完全未知性质及预估的组织及淋巴结，首次穿刺采样应采用非负压穿刺法，评估细胞脱落量后，保持或加重采样手法。

4.2.2.4.2 粘性、液性样本

对于粘性、液性样本，采样后制片时，可通过稀释法，降低背景大量片状着色所以对样本观察的干扰。其中关节液需先进行粘度测试。所有稀释样本应严格记录稀释比例，镜检后乘以这个比例，并换算成真实的细胞密度。

对于粘性、液性样本需要富集细胞。则使用离心富集法与重力富集法。推荐离心富集法。因为这种

方法可通过晃动与震荡将原本离散而因离心聚集的细胞重新打散。减少细胞来源判读的误区（尤其腺体细胞与巨噬细胞）。同样严格记录浓缩比例，并镜检后除以这个比例，并换算成真实的细胞密度。

4.2.2.4.3 骨髓血

对于骨髓血，应提前制作抗凝的注射器进行采样或提前预备制片助手（防止快速凝固），推荐使用十字/一字拉片法。

样本结果：样本量充盈，在有形物观察区，细胞量（非成熟红细胞）应达到至少 10/LPF，总计细胞数量（非成熟红细胞）不低于 400 颗/张。当所有样本平均低于这个数量或血液污染严重、着色不良、挤压严重、堆层过厚、细胞变形破裂严重的情况下，当次样本不应出具有效报告。

4.2.2.4.4 凸起

对于突出厚度在凸起及一下，无法进行穿刺的组织，及在凹陷及凹陷以上的组织（均无病变下的深层实质性或囊性病变），建议使用刮片/粘片法，应对当前组织进行毛发、粘黏、浅刮、深刮的采样流程。

对于敏感及脆弱部位的黏膜、窦道、孔洞，则推荐细胞刷/致密拭子，或冲洗/灌洗法。

最终样本量参考粘性、液性样本处。

4.2.2.4.5 孔道：灌洗、细胞刷

对于具有敞口的孔道类，应首先评估表面是否破溃与渗出，在采样时是否会因此而受到污染，若无，则直接进行采样；若有，则需要对表面进行清理，必要时对表层进行消毒处理。

通过灌洗及细胞刷获取的样本，可通过无菌生理盐水进行浓度调配及洗脱器具上黏附的细胞，之后通过离心富集法，进行细胞的富集，并进行制片，制片推荐使用推片法的线性制片。

最终样本量参考粘性、液性样本处。

4.2.2.4.6 凹陷

如在皮肤或部位可通过手指将起顶起的部位，建议使用刮片法。如部位敏感度及角度不允许，则推荐使用细胞刷采样法。后续制片手法及质量要求均参考前文。

4.2.2.4.7 平面

使用标准的毛发、粘片、浅刮、深刮的标准皮肤采样制片流程。

4.2.2.4.8 硬化

对于结痂，应掀起结痂，采集结痂下的皮肤组织，并进行平面及突起的采样制片流程。而对于较厚的硬化，则建议进行活检打孔，活得样本进行压片制片。也可通过病理进行检测。对于较薄的硬化，则

可以通过刮除、或切除来获得下层柔软的样本。

最终样本量参考粘性、液性样本处。

4.2.2.4.9 鼓包及皮下结节

应先使用超声或触诊探查，对游离性、软、硬区做印象建立，软区较多或面积较大时，应超声辅助，对该区探测是否为液性区域。行穿刺采样操作，但需按由浅至深，由边缘至中心的，多角度，多次采样。以防止血性、液性对实质区域细胞的污染，并减少判读价值。

最终样本量参考粘性、液性样本处。

4.2.2.4.10 活检组织

活检组织进行粘片制片前，应使用手术刀或手术剪，对大块的组织进行 0.5-0.8cm 的修整。并将眼观怀疑病变的面朝下，在定性滤纸上蘸去多与液体，并保持粘性后，粘片于载玻片上进行粘片制片。

最终样本量参考粘性、液性样本处。

4.3 制片

4.3.1 一般要求

- a) 制片包括将处理后的细胞或组织均匀涂抹在载玻片上，并进行适当的固定。
- b) 涂片应均匀、薄厚适中，以便于染色和显微镜观察。
- c) 制片过程中要确保细胞或组织的结构不被破坏。

4.3.2 具体制片技术

- a) 液性样本：使用血涂片推片法。如样本过多，则做急停制片或飞机制片。
- b) 粘性样本：使用十字交叉或一字法制片。
- c) 固体样本：视样本量而定，足量样本进行十字、一字制片法。样本较少，可采用海星法制片。

4.4 染色

4.4.1 一般要求

- a) 染色是制片过程中的关键步骤，目的是使细胞结构更加清晰，便于观察。
- b) 染料选择应根据细胞类型和观察的目的来确定，常用的有瑞士-吉姆萨染色或迪夫快速染色。
- c) 染色过程中要控制好时间，避免过染或染色不足。

4.4.2 瑞氏-姬姆萨染色

a) 准备材料：涂片样本、瑞氏-姬姆萨染液（A）、磷酸盐缓冲液（B）、洗耳球、染色架、计时器、吸水纸、去离子水或蒸馏水及冲洗瓶。

b) 操作步骤：涂片样本的载玻片需充分固定、干燥。将样本载玻片样本向上，放在水平的染色架上。滴入瑞氏-姬姆萨染液 A 液 300 μ l 或 8-10 滴。之后滴入瑞氏-姬姆萨染液 B 液（磷酸缓冲液）3-6 倍 A 液的量。使用洗耳球轻轻隔空吹打混匀。并静置 2.5 分钟或 5 分钟。推荐不是过厚的样本，混匀染色 3 分钟。使用冲洗瓶轻柔挤出，去离子水或蒸馏水。冲洗载玻片的磨砂端，不可直接冲洗样本区域。待水流颜色纯净后，使用吸水纸与洗耳球干燥载玻片。即可镜下观察。

c) 注意事项：瑞氏-姬姆萨染色属于滴染类染色法，切记染色液使用量要充足。尤其是 B 液使用量要足够。否则少量的染液会受到样本本身酸碱的影响而导致颜色偏差或失败。

4.4.3 迪夫快速染色

a) 准备材料：涂片样本、Diff 染液：A、B、C 液、洗耳球、计时器、吸水纸、涮洗水缸 X2。

b) 操作步骤：样本干燥后放入至少 100ml 的 A 液中进行固定。固定时间最少为 10s，最长不超过 30 分钟。推荐固定时间为 1 分钟。将样本从 A 液取出，滴淋 2s，不可让样本干燥。放入 B 液。在 B 液中放置 15-20s 或轻轻提拉，眼观玻片上的红色 B 液完全附着，不出现斑驳即可。滴淋 2s 之后放入 C 液，15-20s 或 B 液的 1.5 倍时长。时间视环境温度与染液使用时间而增加。冬天推荐延长染色时间 5-10s，染液使用 1 个月后，时间液应延长 5-10s。将样本从 C 液取出后放入涮洗水缸中，轻轻移动，再放入另一涮洗水缸。最终样本玻片上滴下的水为无色即可。洗耳球与吸水纸干燥样本载玻片后即可进行镜下观察。

c) 注意事项：Diff（迪夫）快速染色属于浸染法。染色液本身对样本的酸碱纠正较差，必须在染色量较高大于 100ml 时才能达到理想的染色效果。因此不推荐迪夫的滴染或小容量装的容器内进行染色。

注意事项：A 液 B 液进入下一个染色缸中时，无需太过在意对下一缸的液体污染，因为本身下一个染色液就包含上一个染色液的成分。因此一定不要让样本在染色的过程中出现干燥。

4.4.4 革兰氏染色

a) 准备材料：涂片样本、革兰氏染色液组（A、B、C、D）洗耳球、染色架、计时器、吸水纸、去离子水或蒸馏水及冲洗瓶。

b) 操作步骤：样本完全干燥后，将样本面向上，放置于染色架上并调整水平。将 A 液结晶紫滴加在样本上，量需要较多 10 滴以上。快速革兰氏染液 10s，普通革兰氏染色 1min。计时完毕后，使用冲洗瓶的去离子水进行磨砂端的冲洗，水流不可直接冲击在样本之上。之后甩去多余液体，进行 B 液碘的染色。所有操作步骤同上。直到完成 C 液乙醇及 D 液沙黄。干燥后镜检或保存。

c) 注意事项：革兰氏染色时，应注意时间必须达标，否则细菌的阴阳性容易出现混乱。C 液的时间

间严格控制在快速 10s。过长后阴阳结果出现混乱。

4.5 显微镜观察与诊断

- a) 染色后的制片需在光学显微镜下观察，评估细胞形态、结构、数量等特征。
- b) 诊断应由经验丰富的专业人员根据细胞的形态学特征进行，必要时可结合分子生物学方法。
- c) 染色风干后，镜下观察：细胞应着色良好，轮廓清晰。无或很少的破裂细胞比例及拖拽形成的核丝。

4.6 质量控制与实验室管理

4.6.1 一般要求

- a) 实验室应建立严格的质量控制体系，确保制片和诊断过程的准确性。
- b) 定期对制片和染色过程进行质量评估，必要时进行校准和调整。
- c) 实验室人员需接受专业培训，确保制片和诊断技术的正确应用。

4.6.2 具体质量要求

以上所有制片结果，除毛发及骨髓血样本外，均沿用结果有效性判读：样本结果：样本量充盈，在有形物观察区，细胞量（非成熟红细胞）应达到至少 10/LPF，总计细胞数量（非成熟红细胞）不低于 400 颗/张。当所有样本平均低于这个数量或血液污染严重、着色不良、挤压严重、堆层过厚、细胞变形破裂严重的情况下。当次样本不应出具有效报告。

4.7 安全与伦理

- a) 在进行动物细胞学制片和诊断时，要遵守相关的安全规定，防止交叉污染和生物安全风险。
- b) 涉及动物实验时，需遵循动物实验伦理原则，确保动物福利。

总的来说，动物细胞学制片及诊断技术标准不仅关系到实验室工作的效率和质量，还涉及生物安全和伦理问题，因此，每个步骤都需要严格执行，并不断进行质量监控和优化。