ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 67—2021

细胞学样本采集及涂片制备技术规范

Technical specification for acquisition and preparation of cytology specimen

中国兽医协会
CVMA

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 样本采集和涂片制备……1
4.1 操作前准备……1
4.2 样本采集和涂片制备……2
5 涂片染色……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

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、启晟（天津）宠物医院管理有限公司、中国农业大学、北京小动物诊疗行业协会。

本文件主要起草人：刘洋、李浩运、陈艳云、许楚楚、夏兆飞、吕艳丽、张琼。

中国兽医协会
CVMA

细胞学样本采集及涂片制备技术规范

1 范围

本文件规定了兽医细胞学样本采集、涂片制备和染色的操作方法及注意事项。
本文件适用于对动物或活检组织进行细胞学样本的采集和处理。

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

细胞学 cytology
研究所获样本中细胞类型、数量和形态，并为临床兽医提供诊断信息的学科。

4 样本采集和涂片制备

4.1 操作前准备

4.1.1 材料准备

橡胶手套、晾片板、载玻片、盖玻片、6 mL~12 mL注射器、20G~23G针头、无菌拭子、酒精棉、碘伏棉、干棉球、纱布、铅笔或不易脱色的记号笔、钝手术刀片、刻度尺、电推剪。

4.1.2 动物准备

若从活体动物采集细胞学样本，则操作人员应为动物做好下述准备：

a) 操作人员确认病例及病变信息。
b) 根据采样部位选择保定姿势对动物进行保定；若动物不配合或待采样的部位操作受限，可对动物镇静或麻醉后进行采样。
c) 采样部位剃毛，对于皮肤或皮下待检部位，以穿刺位点为中心，用酒精棉顺时针向外消毒；对于体腔或内脏器官，以穿刺位点为中心，依次用酒精棉、碘伏棉、酒精棉顺时针向外消毒。
d) 若病变处破溃或有大量渗出，用纱布清理多余分泌物。

4.1.3 活检样本准备

可对活检样本进行细胞学采样，准备事项如下：

a) 操作人员核对活检样本信息。

b) 最大直径≤1 cm 的样本，可用纱布沾取表面多余组织液后采样；最大直径＞1 cm 的活检样本，应切开但不切断的 1cm 厚度的组织，用纱布沾取表面多余液体后采样。

4.2 样本采集和涂片制备

4.2.1 细针抽吸

细针抽吸法采样及涂片制备步骤如下：

a) 左手固定病变或进针位置。
b) 右手持连接针头的注射器，移除针帽后，中指或无名指控制注射器针栓。
c) 将针头刺入目标位置后，保持针头位置，右手中指或无名指向外拉针栓，使注射器形成 1 mL~2 mL 负压。
d) 在保持负压且针头不离开病变部位的情况下，将针头朝不同方向来回移动 8~10 次，或在针头中观察到样本即可停止，如果期间注射器内出现大量血液，则应立刻停止抽吸。
e) 保持针头在病变内，释放负压后，拔出针头和注射器，用干棉球按压进针位置。
f) 分离针头和注射器，将注射器抽入空气后，再次连接针头和注射器，推动针栓，将针头内样本转移至载玻片上。若针头内样本较多，可转移至多张洁净的载玻片上。
g) 若载玻片上的样本较多，可另取一张载玻片，十字交叉置于前一载玻片和样本之上，待样本完全散开之前，水平移动第二张载玻片，细胞学样本即可均匀而分散地分布于载玻片表面。
h) 若载玻片上的样本较少，可用注射器针尖将样本沿多个方向划拨。
i) 若样本为液体，可另取一张盖玻片，与载玻片保持 30°~45°夹角，其边缘从远离样本的位置靠近并接触样本，此时，样本会沿盖玻片边缘散开，然后迅速而平稳地向远端推动盖玻片，直至样本完全在载玻片表面散开，亦可在载玻片全长 1/2~2/3 处将盖玻片抬起。
j) 用铅笔在载玻片磨砂面标记病例信息和采样方式。

4.2.2 细针活检

以下操作方法以右利手操作人员为例，其他人员可根据个人习惯调整：

a) 左手固定病变或进针位置。
b) 右手持连接针头的注射器，不向注射器施加负压，将针头刺入目标位置；亦可仅持针头进行操作。
c) 保持针头在病变内，将针头朝不同方向来回移动 8~10 次，或在针头中观察到样本即可停止。
d) 拔出针头和注射器，用干棉球按压进针位置。
e) 分离针头和注射器，将注射器抽入空气后，再次连接针头和注射器，推动针栓，将注射器内样本转移至载玻片上。
f) 同 4.2.1g）、h）、i)、j）。

4.2.3 棉拭子采样

将无菌棉拭子在病变表面旋转涂抹，之后将拭子上的样本通过在载玻片表面滚动的方式转移到载玻片上。

4.2.4 刮片采样

用纱布沾取表面多余组织液或渗出液后，用钝手术刀片垂直于组织表面刮取3~5次，将刀片上获得的样本涂抹至载玻片上，若样本较多，可按照4.2.1g）进行操作。

4.2.5 压印采样

用纱布沾取组织或病变表面多余的液体，直至其近乎干燥。将洁净的载玻片按压于组织或病变表面，即可有部分样本粘附于载玻片上。

4.2.6 注意事项

进行细胞学样本采集时应注意：

——提前将6~10张表面洁净、干燥、无油脂或杂质的载玻片平摊在晾片板上备用。

——根据采样部位、动物配合程度、病变大小和性质确定采样方法，对同一组织或病变可采用多种采样方式，宜选用细针抽吸或细针活检。其中，对于易出血或细胞易破碎的组织或病变宜选用细针活检；窦道、阴道等腔隙宜选择棉拭子采样。

——眼观明显不同的病变应分别采样和制片。同一病变从不同位置进行2~3样本采集。每处病变至少获得2~4张涂片。

——采样时应避开病变表面破溃处和中央区域。若穿刺采样过程中观察到针头中出现血液，则立即停止采样并尽快制备涂片。

——避免采集样本时力度过大或反复采样。

——避免涂片制备时施力过大。

——有些病变难以获得细胞样本，不建议进行细胞学诊断。

5 涂片染色

可采用罗曼诺夫斯基方法对细胞学涂片进行染色，具体操作符合附录A、B和C。

中国兽医协会 CVMA

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。

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 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。

中国兽医协会 CVMA

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~30 s。
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 20~30 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

中国兽医协会 CVMA

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。

中国兽医协会 CVMA