

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—2024

临床脑脊液分析技术规范

Technical specification for clinical cerebrospinal fluid analysis

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
征求意见稿

目 次

前 言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3.1 脑脊液.....	1
3.2 脑脊液分析.....	1
4 脑脊液样本保存	1
4.1 灭菌塑料生化管收集脑脊液.....	1
4.2 脑脊液采集量.....	1
4.3 脑脊液保存.....	1
5 脑脊液的一般检查	2
5.1 肉眼观察.....	2
5.2 细胞计数.....	2
5.3 细胞分类.....	3
5.4 脑脊液的总蛋白质检测.....	4
6 脑脊液的化学性质检查	5
7 脑脊液的特殊检查	5
附 录 A.....	6
附 录 B.....	7
附 录 C.....	8
附 录 D.....	9

中国兽医协会
征求意见稿

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：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
征求意见稿

中国兽医协会
征求意见稿

临床脑脊液分析技术规范

1 范围

本文件规定了犬猫脑脊液分析的流程及技术要点，包括脑脊液样本保存、物理性质检查、化学性质检查及细胞学检查。

本文件适用于宠物诊疗机构及其兽医工作人员对犬猫脑脊液样本进行分析，来源于其他动物的脑脊液样本可参考本文件执行。

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、缩略词适用于本文件。

3.1 脑脊液

存在于脑室及蛛网膜下腔的一种无色透明液体，由侧脑室的脉络丛产生，属于血浆超滤液。

3.2 脑脊液分析

脑脊液分析是一种辅助诊断性检查，通过分析脑脊液的细胞数量、细胞成分和蛋白质浓度等方面综合诊断中枢神经系统性疾病。

4 脑脊液样本保存

4.1 灭菌塑料生化管收集脑脊液

与玻璃试管相比，不易产生带电离子，避免在管壁附着细胞。通常不使用抗凝管，因为EDTA具有杀菌作用，会影响细菌培养结果，还会导致蛋白质假性升高和细胞数量假性减少；肝素会导致细胞形态发生改变，影响细胞计数。

4.2 脑脊液采集量

通常安全的脑脊液采集量为0.2 mL/kg，一般不少于1.0 mL（1mL/5kg），通常1~1.5 mL，约10滴。

4.3 脑脊液保存

脑脊液的蛋白质含量少，渗透压较低，导致细胞变性快，即使冷藏保存也不能阻止细胞变性。保存时间延长，以中性粒细胞为主的细胞会比单核细胞变性速度快，因此随着时间延长，细胞数和细胞分布比例都会发生改变。

在脑脊液采集后立即进行细胞的分类计数和细胞涂片检查细胞类型，最迟也是在冷藏保存的30 min之内完成。

如若需要提交商业实验室检查，建议在本院完成蛋白质检测、细胞计数和细胞涂片。对于送检样本，可以添加自身血清制备成11%溶液（如，250 μL 的脑脊液中加入自身血清30 μL ），血清中不能含有血红蛋白和脂质（即溶血和乳糜血清不可用），冷藏保存48 h内可用。脑脊液保存可参见表1。

表1 脑脊液的保存

细胞数的计算	不能长时间保存，采集后立即（最迟30 min内）进行分析。
细胞涂片制备进行细胞分类	不能长时间保存，采集后立即（最迟30 min内）进行分析。
蛋白质、葡萄糖的检测	尽快离心取上清液可冷冻保存。
各种抗体滴度的检测	可冷冻保存。
细菌培养	接种至含巯基乙酸盐（TGC）培养基或灭菌管后，37 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5 脑脊液的一般检查

5.1 肉眼观察

正常脑脊液为无色透明液体，发生浑浊或异常颜色时，提示疾病状态。颜色和性状发生改变的临床意义见表2。

表2 脑脊液颜色和性状变化的临床意义

颜色和性状变化	临床意义
红色	提示颅腔内正在出血，需要与穿刺取样时末梢血液污染（医源性出血）相区别，见表3。
黄变	提示髓腔内发生过出血。重度黄疸和脑脊液蛋白质含量显著升高时，也会发生黄变。
浑浊	提示细胞数量增多和蛋白质含量升高。一般单核细胞数超过200个/ μL ，红细胞数超过400个/ μL 时。

表3 髓腔内出血和医源性出血的区别

髓腔内出血	医源性出血
① 脑脊液始终为红色，离心后上清液成黄变（红细胞破坏后产生的胆红素）。	① 发生血液污染时，最初为红色，随后颜色变浅，刚刚出血时可见血色的细带。
② 可能出现巨噬细胞吞噬红细胞现象，或可见红细胞的降解产物，含铁血黄素或类胆红素结晶	② 通常富集后可见少量细胞，包括中性粒细胞和完整红细胞。

5.2 细胞计数

5.2.1 细胞计数板计数

脑脊液正常的单核细胞数，犬 <5 个/ μL ，猫 <3 个/ μL ；无红细胞。由于细胞量极少，因此无法使用血细胞计数仪进行自动化检测。

脑脊液细胞数量少，不需要稀释，可直接滴入计数板内进行细胞观察和计数。具体操作步骤如下：

- 准备材料：1个洁净的细胞计数板、1张洁净的盖玻片、10 μ L枪头；
- 用75%酒精对细胞计数板和盖玻片进行清洁，用擦镜纸擦拭干净；
- 在细胞计数板上正中央区域盖上盖玻片；
- 用10 μ L移液枪吸取未稀释的脑脊液，从盖玻片的两侧滴入两个计数室中（如图1），注意不要有气泡产生，如果存在气泡，请重新再进行制备；
- 扩散完成放入显微镜上进行细胞计数，显微镜光圈调小，调低载物台，可见10倍物镜和40倍物镜下进行细胞计数和分类；
- 计算两个计数室中的中心大方格和四个角的大方格（如图1）里面的红细胞和有核细胞（每个大方格是0.1 μ L，2个计数室共计数10个大方格的细胞数，即是1 μ L的细胞数），如果红细胞较多，只计数1个大方格的红细胞数，乘以10即可得到1 μ L的红细胞数。



图2 计数中心大格和四个角大方格的红细胞和有核细胞数

5.2.2 细胞数的校对

当脑脊液被血液污染时，需要考虑对细胞数进行校对，红细胞数超过500个/ μ L的末梢血污染，脑脊液的有核细胞数需要进行校对。

校对公式如下：

- 简单校对方法：犬红细胞每500个，猫红细胞每100个，有核细胞数减去1个。
- 在已知外周血细胞计数的情况下的进行校对： $\text{脑脊液校对后的有核细胞数} = \text{脑脊液计数的有核细胞数} - \text{脑脊液中红细胞数} \times (\text{外周血红细胞数} / \text{白细胞数})$ ，细胞数单位均为个/ μ L。

5.3 细胞分类

脑脊液蛋白质含量少，渗透压低，细胞极易被破坏，因此在处理脑脊液细胞样本时，不能与处于外周血一样使用玻片推片法或离心机处理。目前，常用的脑脊液细胞处理方法包括：富集细胞离心法和自然沉降法。

5.3.1 富集细胞离心法

富集细胞离心法是指在离心脑脊液的同时将细胞富集于载玻片上，从而制作出单层细胞涂片。该方法需要特殊设备，对细胞的破坏小且富集细胞效果好，是脑脊液细胞涂片制备最合适的方法。其步骤如下：

- 准备材料：细胞离心机、标准的打孔器、滤纸、洁净的玻片、移液枪；
- 用打孔器在滤纸上打孔后，将滤纸放在洁净的玻片上方；
- 在玻片和滤纸上方放置细胞离心机加样装置，制备两个玻片，固定于离心机相对的两侧；
- 根据采集的脑脊液量，一般将100 μ L的脑脊液注入加样装置里，离心机对侧可注入同等量的生理盐水，盖上离心机；
- 以转速1000 rpm可离心5 min，或设置其他不同的旋转速度和时间；
- 离心结束后，取出玻片，立即风干玻片并进行瑞氏吉姆萨染色/快速迪夫染色，染色时间比染色血涂片的时间短，染色玻片结束后风干并进行显微镜检查。

5.3.2 自然沉降法

该方法不需要特殊设备，简单易操作，但制作过程需要30 min以上，有些细胞可能会被破坏，细胞富集方法比富集细胞离心法要低。其步骤如下：

- a) 准备材料：标准的打孔器、2个活页长尾夹、滤纸、洁净的玻璃片、1mL注射器针筒（剪成两半，弃掉含针尖的那一半）；
- b) 用打孔器在滤纸上打孔后，将滤纸放在洁净的玻璃片上方；
- c) 将1 mL针筒含凸缘的末端与滤纸上的孔相对，用2个活页长尾夹将注射器针筒的凸缘与玻片进行固定，置于桌平面（如图2）；
- d) 将0.25 ~ 0.5 mL的脑脊液注入注射器针筒的顶端，脑脊液会从注射器底部扩散至滤纸上，细胞黏附于滤纸孔下方的玻片上，扩散30 min；
- e) 风干玻片，进行瑞氏吉姆萨染色/快速迪夫染色；
- f) 风干染色玻片，进行显微镜检查，进行细胞分类。

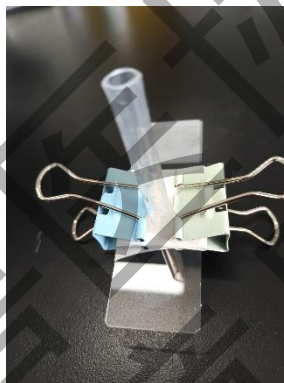


图2 简易细胞沉降装置

5.3.3 细胞诊断的解析

脑脊液中可见的细胞包括：小单核球细胞，如小淋巴细胞、室管膜细胞、脉络丛细胞、神经胶质细胞；大单核球细胞，如单核细胞、大淋巴细胞和巨噬细胞；多核球细胞：中性粒细胞和嗜酸性粒细胞；无核细胞，如红细胞。

脑脊液中红细胞数量增多提示髓腔内出血或穿刺时的末梢血液污染（医源性出血），有核细胞数量增多提示脑脊液内、中枢神经内或神经根存在炎症或细胞浸润。此外，坏死或肿瘤等继发引起炎性细胞或肿瘤细胞浸润。关于不同细胞类型增多，其临床诊断意义不同，参见附录A。

5.4 脑脊液的总蛋白质检测

脑脊液中的蛋白质浓度非常低，是外周血的1/200以下，需要进行特殊的测定法（微量蛋白检测法），此时需要提交给专业实验室进行检测。如果没有微量蛋白检测法，可以考虑尿试纸条的半定量检测，检测方法如下：

5.4.1 尿试纸条半定量检测

犬猫的正常蛋白浓度小于25 mg/dL，腰椎穿刺采集脑脊液的蛋白水平更高，小于40 mg/dL，约是延髓池脑脊液的2倍。

- a) 准备材料：1根尿试纸条、1根吸管、尿液分析仪；
- b) 吸取少量脑脊液滴入尿试纸条的蛋白检测试纸上；

c) 放入尿液分析仪上进行检测，蛋白结果为半定量结果，如下五种结果：

微量	1+	2+	3+	4+
<30 mg/dL	30 mg/dL	100 mg/dL	300 mg/dL	>2000 mg/dL

5.4.2 微量蛋白的校对

当脑脊液被外周血液污染（医源性出血），可导致蛋白质浓度升高，此时需要对蛋白质浓度进行校对，其校对公式如下：

微量蛋白校对公式：每红细胞数 1000 个/ μ L，可以将微量蛋白检测值下调 1 mg/dL。

5.4.3 微量蛋白的解析

脑脊液中的蛋白质几乎全部来自血清，由于受血脑屏障的作用，脑脊液中蛋白质浓度不及血液蛋白质的 1/200，其浓度单位为 mg/dL 且组成成分也有所不同。蛋白质浓度升高提示血脑屏障变化（通透性增加），主要是白蛋白浓度升高，另外提示中枢神经内炎症，主要是免疫球蛋白浓度升高。临床常把蛋白质浓度和细胞数量结合分析，其临床解析见附录 B。

6 脑脊液的化学性质检查

脑脊液的化学性质检查可以反应中枢神经系统的病理状态，是对神经系统疾病诊断的重要内容。目前，可以对脑脊液中的乳酸脱氢酶、天冬氨酸转氨酶、肌酸激酶、葡萄糖、电解质、白蛋白、离子钙等进行检测。检测这些项目的方法与血液生化检测项目方法相同，脑脊液的化学性质检查项目和临床意义见附录C。

7 脑脊液的特殊检查

脑脊液中怀疑存在杆菌、球菌或真菌感染元素，提示败血性脑膜炎，此时需要考虑对脑脊液进行微生物培养及药敏试验。需要将脑脊液样本提交专业实验室进行培养，具体操作流程以专业实验室要求为准。

脑脊液中怀疑存在寄生虫感染元素，如弓形虫、新孢子虫等，需要进行分子诊断，如聚合酶链式反应（PCR）、酶联免疫吸附试验（ELISA）等抗原或抗体检测，需要将脑脊液样本提交专业实验室进行检测，具体操作流程以专业实验室要求为准。

脑脊液中还存在病毒性感染元素，如犬瘟热病毒（CDV）、猫传染性腹膜炎（FIP）等，需要进行分子诊断，如聚合酶链式反应（PCR）、酶联免疫吸附试验（ELISA）等抗原或抗体检测，需要将脑脊液样本提交专业实验室进行检测，具体操作流程以专业实验室要求为准。

脑脊液中含有神经细胞、胶质细胞、髓鞘细胞释放或被诱导的各种酶和神经递质，当这些细胞受损后会被释放进入脑脊液中，导致这些酶或神经递质浓度升高，从而对某些神经系统疾病进行诊断。目前，神经细胞的特异性标记物是神经元特异性烯醇化酶，胶质细胞的标记物是S-100蛋白质，髓鞘的标记物是髓鞘碱性蛋白，星形细胞的标记物是胶质纤维酸性蛋白，神经递质高香草酸及下丘脑分泌的食欲素等，可以作为犬某些神经系统疾病的诊断。脑脊液的特殊检查项目和临床意义见附录D。

附录 A

(资料性附录)

犬猫脑脊液细胞分类和临床意义

表 A.1 犬猫脑脊液细胞数增多分类和临床意义

细胞增多分类	临床意义
中性粒细胞增多症 (中性粒细胞为主)	<ul style="list-style-type: none"> ① 犬类固醇反应性脑膜炎，中大型犬常见，如比格犬、伯恩山犬、拳师犬等 ② 猫传染性腹膜炎 ③ 犬猫严重癫痫 ④ 犬猫任何造成中枢神经系统坏死的疾病 ⑤ 脊髓造影后/脊髓炎 ⑥ 脑膜瘤 ⑦ 犬落基山斑点热 ⑧ 犬猫细菌性感染
淋巴细胞增多症 (淋巴细胞所占比例超过50%)	<ul style="list-style-type: none"> ① 犬猫病毒性脑膜炎，如犬瘟热病毒、狂犬病毒等 ② 犬严重坏死性脑膜脑炎，与品种相关，如巴哥犬、马尔济斯犬、吉娃娃犬、约克夏和其他玩赏犬种等 ③ 猫脑脊髓灰质炎 ④ 中枢神经系统淋巴瘤 ⑤ 感染性脑膜炎，如弓形虫、新孢子虫、艾利希氏体、新型隐球菌等 ⑥ 肉芽肿性脑膜脑炎 ⑦ 类固醇反应性脑膜炎
嗜酸性粒细胞增多症 (嗜酸性粒细胞所占比例超过20%)	<ul style="list-style-type: none"> ① 犬猫类固醇反应性炎症性中枢神经系统疾病(如，嗜酸性粒细胞性脑膜炎、脑膜脑炎、脑膜脊髓炎) ② 与感染有关，如寄生虫移行、弓形虫、新孢子虫、新型隐球菌等
混合性细胞增多症 (淋巴细胞、单核细胞增多和/或中性粒细胞增多)	<ul style="list-style-type: none"> ① 真菌感染，如新型隐球菌、芽生菌与曲霉菌等 ② 立克次氏体感染，如艾利希氏体和落基山斑点热 ③ 原虫或藻类感染，如弓形虫、新孢子虫与原藻病 ④ 犬类固醇反应性脑膜脑炎 ⑤ 猫慢性传染性腹膜炎 ⑥ 任何引起中枢神经系统阻塞或脊髓软化等疾病

附录 B
(资料性附录)

犬猫脑脊液蛋白浓度和细胞数量结合分析

表 B.1 犬猫脑脊液蛋白质浓度和细胞数量结合分类和临床意义

蛋白质浓度和细胞数量分类	临床意义
蛋白质浓度升高* 细胞数量增多 [§]	存在活动性炎症
蛋白质浓度升高 细胞数量正常	肿瘤 变形性疾病 血管性疾病
蛋白质浓度正常 细胞数量正常	脑实质深部病变 不是中枢神经系统疾病

*犬猫脑脊液排除血液污染的校对后，小脑延髓池穿刺 > 25 mg/dL，腰椎穿刺 > 45 mg/dL

[§]犬猫脑脊液排除血液污染的校对后，有核细胞数 > 5个/ μ L，红细胞数 > 0个/ μ L

中国兽医意见稿

附录 C

(资料性附录)

犬猫脑脊液化学性质检查和临床意义

表 C.1 犬猫脑脊液化学性质检查和临床意义

化学性质检查项目结果	临床意义
乳酸脱氢酶活性升高	细菌性脑炎、病毒性脑炎、脑膜炎、淋巴瘤、转移性肿瘤等
天冬氨酸转移酶活性升高	化脓性脑膜炎、犬瘟热病毒性脑炎/脊髓炎、坏死性脑炎等
肌酸激酶活性升高	显著升高：椎间盘疾病、肿瘤、脑积水、寰枢椎不稳定、蛛网膜囊肿 升高：化脓性脑膜炎、犬瘟热病毒性脑炎/脊髓炎、坏死性脑炎
葡萄糖降低	病毒性脑炎（脊髓炎、脊膜炎）、细菌性脑炎（脊髓炎、脊膜炎）、部分坏死性脑炎
白蛋白升高	脑肿瘤引起血脑屏障破坏，出血或血液污染
低氯血症	脑炎、脊膜炎
低钙血症	甲状腺功能减退，营养不良
急性期反应蛋白升高或变化趋势 (C反应蛋白、血清淀粉样蛋白A、 α -1酸性糖蛋白、 α -2巨球蛋白、触珠蛋白等)	犬类固醇反应性脑膜炎-动脉炎的诊断与治疗监测 大部分炎性反应、感染性疾病、自体免疫性、肿瘤性和代谢性疾病

附录 D
(资料性附录)

犬猫脑脊液特殊检查和临床意义

表 D.1 犬猫脑脊液特殊检查和临床意义

脑脊液特殊检查项目结果	临床意义
神经元特异性烯醇化酶活性升高	坏死性脑炎、进行性脊髓软化、细菌性脑炎、病毒性脑炎、脑出血、脑肿瘤等
髓鞘碱性蛋白升高	犬瘟热病毒性脑炎/脊髓炎、出血性病变、重度脱髓鞘性疾病
S-100升高	人：头创伤、缺血性脑损伤、脑肿瘤、牛海绵状脑病
高香草酸升高	分离焦虑症、精神障碍
抗胶质纤维酸性蛋白抗体阳性	坏死性脑炎
食欲素降低	嗜眠（犬在吃饭、玩耍时突然倒地睡眠）

中国兽医意见稿