

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Сметанина С.В.¹, Пуряева Е.В.¹, Славнова Е.Н.², Гамаюнов С.В.¹, Мануйленко О.А.³,
Балавина Е.В.⁴, Гуревич И.М.¹, Ускова Е.Ю.¹

ГИБКОСТЬ ПРОТОКОЛА ОКРАСКИ ТРАДИЦИОННЫХ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПО ПАПАНИКОЛАУ. К ВОПРОСУ СТАНДАРТИЗАЦИИ

¹ ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» 603163, Нижний Новгород, Россия;

² Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия;

³ ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 40 Автозаводского района г. Нижнего Новгорода» 603083, г. Нижний Новгород, Россия;

⁴ ГБУЗ НО «Борская ЦРБ» 606440, Нижегородская область, г. Бор, Россия

В связи с тем, что в России скрининг рака шейки матки (РШМ) должен проводиться путём окрашивания мазков по Папаниколау целью данной работы было изучение вариантов протокола окраски по Папаниколау эксфолиативных вагинальных мазков путем обзора англоязычной и отечественной литературы. Метод регидратации высушенных на воздухе мазков с шейки матки с последующей фиксацией и окрашиванием может решить большинство проблем, связанных с влажной фиксацией биологического материала на предметном стекле, если окрашивание производят по Папаниколау. Существует несколько зарубежных исследований, посвященных регидратации мазков с шейки матки как альтернативный вариант влажной фиксации при нанесении мазков традиционным способом. В отечественной литературе работы по данной теме отсутствуют. Для достижения этой цели мы провели валидизацию методики в лаборатории с учетом материально-технического обеспечения и особенностей получения и доставки материала.

Регидратация с последующей фиксацией высушенных на воздухе мазков является простым, общедоступным, применимым и надежным методом фиксации, который сравним с традиционным методом влажной фиксации, используемым для мазков из шейки матки, и может применяться для рутинной оценки.

Ключевые слова: цитологическая диагностика; фиксация цитологических образцов; окраска по Папаниколау.

Для цитирования: Сметанина С.В., Пуряева Е.В., Славнова Е.Н., Гамаюнов С.В., Мануйленко О.А., Балавина Е.В., Гуревич И.М., Ускова Е.Ю. Гибкость протокола окраски традиционных цитологических препаратов по Папаниколау. К вопросу стандартизации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (1): 24-29.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-1-24-29>

Для корреспонденции: Сметанина Светлана Валерьевна, канд. мед. наук, зав. цитологической лабораторией; e-mail: smetanina7060@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 20.11.2023

Принята к печати 15.01.2024

Опубликовано 17.01.2024

S.V. Smetanina 1, E.V. Puriaeva1, E.N. Slavnova 2, S.V. Gamayunov 1, O.A. Manuilenko3, E.V. Balavina 4, I.M. Gurevich1, E.Yu.,Uskova1

FLEXIBILITY OF THE STAINING PROTOCOL FOR TRADITIONAL PAPANICOLAOU CYTOLOGY SLIDES. ON THE ISSUE OF STANDARDIZATION

¹Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center, 603163, Nizhny Novgorod, Russia;

²Moscow Research Oncological Institute named after P.A. Herzen - branch of the Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Radiology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 125284, Moscow, Russia;

³Nizhny Novgorod City Clinical Hospital № 40 Avtozavodsky District, 603083, Nizhny Novgorod, Russia;

⁴Nizhny Novgorod Bor Central District Hospital, 606440, Nizhny Novgorod, Russia

Due to the fact that in Russia, screening for cervical cancer (CC) should be carried out by staining smears with Papanicolaou, the

purpose of this work was to study options for the Papanicolaou staining protocol for exfoliative vaginal smears by reviewing English-language and domestic literature. The method of rehydrating air-dried cervical smears followed by fixation and staining can solve most of the problems associated with wet fixation of biological material on a glass slide if staining is performed using the Papanicolaou method. There are several foreign studies on the rehydration of cervical smears as an alternative to wet fixation when applying smears in the traditional way. There are no works on this topic in the domestic literature. To achieve this goal, we validated the method in the laboratory, taking into account logistics and the specifics of obtaining and delivering the material. Rehydration followed by fixation of air-dried smears is a simple, readily available, feasible and reliable fixation method that is comparable to the traditional wet fixation method used for cervical smears and can be used for routine evaluation.

Key words: cytological diagnostics; fixation of cytological samples; Papanicolaou staining.

For citation: Smetanina S.V., Puriaeva E.V., Slavnova E.N., Gamayunov S.V., Manuilenko O.A., Balavina E.V., Gurevich I.M., Uskova E.Yu. Flexibility of the staining protocol for traditional Papanicolaou cytology slides. On the issue of standardization. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (1): 24-29 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-1-24-29>

For correspondence: Smetanina Svetlana Valerievna, Candidate of Medical Sciences, Head of the Cytological Laboratory; e-mail: smetanina7060@gmail.com

Information about authors:

Smetanina S.V., <https://orcid.org/0000-0002-7000-5910>;
Puriaeva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7021-9062>;
Gamayunov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-0223-0753>;
Slavnova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-2307-4355>;
Manuilenko O.A., <https://orcid.org/009-0005-7331-5710>;
Balavina E.V., <https://orcid.org/0009-0002-9711-2502>;
Gurevich I.M., <https://orcid.org/0009-0000-1545-4046>;
Uskova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1694-2321>.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interest.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 20.11.2023
Accepted 15.01.2024
Published 17.01.2024

Введение. Цитологический диагноз злокачественного новообразования, в основном, основан на анализе ядерного хроматина в окрашенных клетках. Степень ядерной атипии наряду с цитоплазматической морфологией являются признаками, с помощью которых можно цитологически определить потенциал злокачественности клеток. Эти диагностические принципы сформировались благодаря кропотливым, последовательным исследованиям ученых на предмет их клинической значимости с параллельным поиском оптимальной рецептуры химических красителей, влияющих на качество препаратов посредством индивидуальной фиксации и окрашивания клеток [1]. Среди основных достижений в истории цитопатологии основополагающим был одноименный метод окраски по Папаниколау, изобретенный доктором Джорджем Н. Папаниколау в 1942 году [1].

На протяжении более 50-ти лет за рубежом окраска Папаниколау, предложенная и модифицированная Джорджем Н. Папаниколау, использовалась в качестве универсального скринингового теста для выявления рака шейки матки. На протяжении многих лет этот метод претерпевал различные модификации в разных научных лабораториях, что отразилось в разнообразии протоколов окраски у производителей, в том числе отечественных, по длительности экспозиции цитологического препарата в каждом компоненте краски и фиксаторе [2,3].

В настоящее время в западных странах при скрининге РШМ осуществляется стандартная окраска по Папаниколау препаратов, взятых, в основном, по методу жидкостной цитологии. В свою очередь в России основной метод нанесения вагинальных мазков - это традиционный, и в большинстве цитологических ла-

бораторий основным красителем являлся азур-эозин (окраска по Романовскому, Паппенгейму, Лейшману). Такая ситуация во многом связана со сложившимися традициями и ограниченными ресурсами. В поисках быстрой методики окрашивания, обеспечивающей столь же изысканные цитоморфологические характеристики и не уступающие окрашиванию по Папаниколау, на сегодняшний день доступны экспресс красители Diff-Quik [4], LEUKODIF 200 [5] и МЛТ-ДИФФ-КВИК отечественного производителя [2].

На основании действующих нормативных документов¹ скрининг РШМ в России должен проводиться путём окрашивания мазков по Папаниколау. Необходимо отметить, что успешное использование азур-эозиновых красителей с 60-х годов прошлого столетия показало свою эффективность [6].

В данном сообщении считаем необходимым отметить ряд проблем, которые затрудняют внедрение качественного окрашивания по Папаниколау цитологических препаратов, нанесенных традиционным способом при проведении скрининга РШМ (аспекты жидкостной цитологии в данной статье не рассматриваются):

Трудоемкость и многостадийность методики, требующая автоматизацию процесса.

Высокая токсичность составляющих компонентов красителя, требующая оборудованного рабочего места с мощной вытяжкой при ручной окраске и при заклю-

1. Приказ Минздрава Российской Федерации № 124н от 13.03.2019 г. «Об утверждении порядка проведения профилактического медицинского осмотра и диспансеризации определенных групп взрослого населения»;

ГОСТ 57005-2016 Диагностика в онкологии. Скрининг. Рак шейки матки. ГОСТ 57005-2016.

чении препарата под покрывное стекло.

Отсутствие принципа стандартности: а) постепенного воздействия применяемых веществ на клетки, то есть несоблюдение оптимальных условий фиксации/обезвоживания; б) наличие длительного интервала времени при полном обезвоживании/высыхании до процесса окрашивания.

При окраске цитологических препаратов основное внимание уделяется корректной фиксации препаратов, целью которой является сохранение цитоморфологических характеристик и диагностически важных элементов клеток. Фиксация приводит к огрублению клеточных структур и делает рисунок ядерного хроматина и его детали более четким. Методики фиксации делят на влажные и сухие. Есть стандартизированные валидизированные методики, где в качестве фиксатора используется 1 % уксус [3], 100 % метанол, 80 % изопропанол, 80 % пропанол [7]. При использовании этилового спирта в качестве фиксатора, цитологические препараты должны быть влажными. Методика заключается в погружении препарата в фиксатор на 20–30 минут с последующим полным высыханием и доставкой его в лабораторию. В литературе отмечено, что укороченная экспозиция не допускается, в свою очередь, длительная фиксация в течение нескольких дней или даже недель не меняет клеточные характеристики [7]. В инструкциях, в том числе и у отечественных производителей, допускается использование фиксаторов в виде аэрозолей на спиртовой основе, которые наносят на влажный цитологический препарат и выдерживают время до полного высыхания [7 - 10]. На наш взгляд, аэрозольные фиксаторы по времени экспозиции с биологическим материалом (не более 2 мин) не позволяют качественно произвести фиксацию, которая требует более длительного контакта клеток с фиксатором (20-30 минут). Соответственно, по времени экспозиции биологического материала, методики с погружением влажного цитологического препарата в спирт и аэрозольная спиртовая фиксация влажного цитологического препарата не являются равноценными.

Необходимо отметить, что оригинальный протокол фиксации традиционных цитологических препаратов по Папаниколау, предшествующий окрашиванию, заключался в поэтапной процедуре регидратации/дегидратации клеток путем перемещения предметных стекол в спиртовых растворах нисходящей/восходящей крепости подобно гистологической проводке [1,7,11-14], что в последующем обеспечивает качественную окраску. Основным условием стандартного протокола пробоподготовки цитологических препаратов является недопущение высыхания препарата от момента фиксации до нанесения красителей и четкое соблюдение самого протокола окраски. Таким образом, моментальная фиксация «влажного» препарата, полученного при гинекологическом осмотре, не актуальна, так как, во-первых, обеспечить 20-30-ти минутную фиксацию в 95 % спирте гинеколог/акушерка не сможет, во-вторых, длительная транспортировка подсушенных препаратов в лабораторию (в нашем случае до 2-х недель из отдаленных районов) способствует полному обезвоживанию клеток. Оба пункта являются следствием несоблюдения оптимальных условий обезвоживания клеток и отрицательно сказываются на дальнейшей обработке материала.

В 1954 году L.J. Lencioni и соавт. [15] были первыми, кто рассмотрел возможность регидратации ваги-

нальной эксфолиативной цитологии с использованием водопроводной воды с удовлетворительными результатами для решения проблем полного обезвоживания клеток на воздухе и плохой фиксации. Но до недавних лет эта методология не получила широкого признания в цитологии шейки матки. С 2002 года было проведено множество исследований по анализу влияния метода регидратации на мазки с шейки матки. [7,14,16 -19]. Авторы тестировали различные регидратирующие агенты, такие как гипотонические, физиологический растворы, водопроводную воду, водный глицерин. Регидратационные жидкости, такие как гипотонические растворы, водопроводная вода и водный глицерин, продемонстрировали лизис ядродержащих клеток вместе с эритроцитами. [22]. Был сделан вывод, что физиологический раствор является лучшей регидратирующей жидкостью, поскольку она не вызывает лизис ядродержащих клеток, легко доступна и имеет низкую стоимость [13, 14, 16, 22 -26].

В связи с вышеизложенным, учитывая отсутствие в отечественной литературе работ по данной теме, считаем необходимым довести до сведения существующий протокол окрашивания вагинальной эксфолиативной цитологии с учетом регидратации клеток.

Целью исследования явилось сравнение цитоморфологических особенностей мазков, фиксированных различными методами, а также оценка конкурентоспособности регидратированного, высушенного на воздухе Пап-мазка (окрашенный мазок по Папаниколау) по отношению к Пап-мазку с влажной фиксацией.

Материал и методы. Приводим последовательность процедур при окрашивании цитологических препаратов, высушенных на воздухе:

1. Поэтапная регидратация цитологических препаратов в спиртах нисходящей крепости: 80, 70, 50 %, физиологический раствор. Время воздействия каждого раствора не более 30 секунд.
2. Окрашивание мазков гематоксилином в течение 2 минут.
3. Промывание препаратов водопроводной водой до появления синей окраски.
4. Дегидратация в спиртах восходящей крепости: 50, 70, 80 %. Время воздействия каждого раствора 30 секунд.
5. Окрашивание препаратов оранжевым G 6 в течение 30-100 секунд.
6. Трехкратное промывание в 95 % растворе этилового спирта.
7. Окрашивание раствором красителя EA 50 в течение 1,5 минуты.
8. Трехкратное промывание в 95 % растворе этилового спирта.
9. Поэтапное обезвоживание в растворах: 96 % этилового спирта; этилового спирта и ксилола в пропорции 1:1; ксилоле.
10. Заключение препарата под покрывное стекло.

В течение трех месяцев на базе 2-х медицинских организаций Нижегородской области в рамках скрининга рака шейки матки производили получение гинекологического материала у 3180 женщин в возрасте от 21 до 64 лет, большинство пациенток было в возрастной группе 25-59 лет. 84 % женщин жалоб не предъявляли. Материал наносили на четыре предметных стекла и маркировали «А, В, С, D»

добавляя к букве порядковый номер случая:

Препарат «А», после получения моментально фиксировали в течение 20 минут в 95 % этаноле, при поступлении в лабораторию окрашивали по Папаниколау, согласно инструкции к красителю.

Препарат «В» высушивали на воздухе, при поступлении в лабораторию окрашивали по Папаниколау, согласно инструкции к красителю.

Препарат «С» высушивали на воздухе и окрашивали по Романовскому-Гимзе.

Препарат «D», высушивали на воздухе, при поступлении в лабораторию подвергали регидратации, а затем сразу окрашивали по Папаниколау по представленному выше протоколу, полностью исключая высыхание клеток между всеми этапами протокола.

Весь собранный материал для окрашивания и последующей оценки поступал в цитологическую лабораторию ОПАО «НОКОД». Следует отметить, что каждый случай был проанализирован пятью врачами с получением 15 900 отчетов. Оценка полученных результатов производилась по нескольким цитоморфологическим параметрам: клеточность, фон препарата, артефакты при высушивании, клеточные границы, ядерные границы, рисунок хроматина, окрашивание цитоплазмы (см. таблицу).

Результаты. Из 3180 случаев с параллельно взятыми 4-ю мазками, адекватный материал (поддающийся просмотру и оценке) на препаратах «А» получен в 96,6 % ($n=3072$), в 99,7 % ($n=3170$) на препаратах «D», при окрашивании по Романовскому (препараты «С») в 99,3 % ($n=3158$), процент же адекватных препаратов «В» достигал лишь 59,2 % ($n=1882$), что было связано с высокой вероятностью появления артефактов высыхания.

Наблюдалась определенная разница, хоть и не самая существенная, по параметру клеточности материала в препаратах, фиксированных разными способами. По этому признаку регидратированные препараты с окраской по Папаниколау и препараты, окрашенные по Романовскому-Гимзе оставили за собой приоритет по отношению к препаратам с влажной фиксацией, окрашенные по Папаниколау. По-видимому, представленные цифры связаны с лучшей адгезией клеток к поверхности предметного стекла во время высушивания на воздухе. Потеря части кле-

ток отмечалась в препаратах «А» после погружения их в фиксатор в случаях нанесения материала толстым слоем.

Более чистый фон наблюдался в препаратах «D», поскольку процесс регидратации вызывает лизис эритроцитов, что позволило более детально рассмотреть клеточные элементы, а также увеличить частоту обнаружения инфекционных агентов (*Trichomonas vaginalis*, элементы дрожжевого гриба рода *Candida* spp.). Геморрагический фон наблюдался лишь в 13 % случаев.

Артефакты высушивания чаще наблюдались в препаратах «В» - 82 %, в «А» - 13 % наблюдений по сравнению с регидратированными препаратами «D» - 4,6 % и полного отсутствия в препаратах, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Данный факт может приводить к увеличению процента ложноотрицательных результатов при интерпретации.

Отчетливость ядерных и клеточных границ, а также визуализация рисунка ядерного хроматина сопоставимы в препаратах «А», «D», хотя в Пап-мазках с влажной фиксацией, незначительная мутность хроматина и несколько нечеткий контур ядерной мембраны отмечались чуть чаще. Вероятно, в связи с пересушиванием мазков при влажной фиксации связан факт некой размытости клеточных и ядерных границ. Характерное окрашивание для Пап-мазков цитоплазмы наблюдалось в препаратах «А» и «D» приблизительно одинаково и составляет соответственно 97 % и 98 %. Самые низкие показатели цитоморфологических параметров показали нефиксированные Пап-препараты («В»). В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, наблюдался довольно четко просматриваемый контур ядерной мембраны и клеточная граница. Чуть затруднен детальный просмотр рисунка ядерного хроматина. Цитоплазма в большинстве случаев окрашена удовлетворительно.

Интраэпителиальные поражения отсутствовали в 96,7 % случаев в Пап-мазках «А», «С», «D». В категорию NILM были отнесены воспалительные процессы, бактериальные вагинозы, кандидозные и атрофические кольпиты. При исследовании препаратов «А», «С», «D», плоскоклеточное интраэпителиальное поражение, включая ASCUS/LSIL/ASC-H/HSIL, было диагностировано в 3,3 % ($n=105$) наблюдениях.

Оценка полученных результатов по цитоморфологическим параметрам (в %)

Показатели	Препараты «А»	Препараты «В»	Препараты «С»	Препараты «D»
Клеточность:				
низкая	1	1	1	0
умеренная	32	38	27	26
высокая	67	61	73	74
Геморрагический фон препарата	55	72	56	13
Артефакты при высушивании	13	82	0	4,6
Клеточные границы:				
отчетливые	88	3	95	96
нечеткие	12	97	5	4
Ядерные границы:				
отчетливые	88	4	91	93
нечеткие	12	96	9	7
Рисунок ядерного хроматина:				
мутный	5	98	6	2
хорошо просматриваемый	95	2	94	98
Окрашивание цитоплазмы:				
неудовлетворительное	3	88	1	2
удовлетворительное	97	12	99	98

Обсуждение. Для сохранения цитоморфологических признаков при оценке клеточной атипии Пап-мазков требуется спиртовая фиксация влажных цитологических препаратов. При отсутствии таковой возникают артефакты при окраске по Папаниколау. Регидратация высушенных на воздухе мазков является простой, осуществимой, надежной методикой со своими преимуществами, которая сравнима с традиционным методом спиртовой фиксации влажных спиртовых препаратов и применима в регулярной практике, особенно в программах скрининга в сельской местности.

Фиксированные спиртом влажные Пап-мазки «А» в большинстве случаев (83,6 %) имели четкую морфологию. Цитоморфология была оптимальной в 13 % и субоптимальной в 3,4 % случаев. Высушенные на воздухе и регидратированные Пап-мазки «Д» показали четкую сохранность морфологических признаков в 95,1 % случаев, оптимальная сохранность в 4,6 % и субоптимальная сохранность в 0,3 %.

Данный факт можно объяснить, понимая процедуру получения материала. Эпителиальные клетки, попавшие в выделения путем десквамации, то есть естественным образом, имеют более высокую степень дегенерации по сравнению с жизнеспособными клетками. Следовательно, отторгшиеся клетки требуют щадящей обработки, что обеспечивается при плавном высушивании на воздухе и в последующем поэтапной регидратации и окрашивании без промежуточного высушивания в процессе всего цикла подготовки препарата к просмотру.

Результаты показали гибкость выбора различных методов окрашивания, что является практической альтернативой. Однако, в виду того, что при обработке препаратов клетки подвергаются воздействию различных красок и технологических жидкостей, в следствии чего цвет ядра, цитоплазмы многократно изменяется, многостадийность и трудоемкость окрашивания по Папаниколау требует автоматизации самого процесса.

Следует также отметить недостаток Пап-мазков «Д» - это может быть гипергидратация физиологическим раствором, длительность которого более 30 секунд, что приводит к разбуханию ядер и увеличению размера клеток и, соответственно, к неправильной интерпретации препарата.

Заключение. В традиционной цитологии подготовка образца путем фиксации влажных цитологических препаратов для окраски по Папаниколау отнимает много времени у гинекологов/акушеров, требует значительного объема этанола, ведение документации по его списанию. Кроме того, техника фиксации полученных препаратов нередко нарушается гинекологами/акушерами из-за недостаточной их подготовки, что приводит к потере материала и необходимости повторного его забора. В вагинальной эксфолиативной цитологии спиртовую фиксацию влажного традиционного Пап-мазка не стоит рассматривать как альтернативу Пап-мазку по методу жидкостной цитологии, который, несомненно, является "золотым" стандартом. Метод регидратации прост, практичен, оптимален для цитологического скрининга и интерпретации результатов, позволяет эффективно минимизировать потерю клеток, обеспечить сохранность цитоморфологических особенностей злокачественных клеток, что подтверждено результатами предыдущих исследований [7,14,27,28,29].

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3-5, 7, 11, 13-29 см.
REFERENCES)

2. Безруков А.В., Кузнецов М.В., Мишукова А.А., Сниховская К.В. Возможности цитологического скрининга РШМ на автоматах окраски АФОМК. *Поликлиника*. 2020; 1(1):24-6.
6. Новик В.И. О методах окраски цитологических препаратов. *Новости клинической цитологии России*. 2017; 1-2(21):9-10.
8. МЛТ-ПАП-ДИФФ. Окраска микропрепаратов. Гематология. Цитология. Гистология. Доступно на <http://www.emco.ru/mlt-pap-diff-2> (активно до 8 ноября 2023 г.).
9. Инструкция по применению «Реагенты для проведения пробоподготовки, окрашивания и заключения под покровное стекло гистологических и цитологических препаратов». Доступно на http://docs.nevacert.ru/files/med_reestr_v2/o85378_instruction.pdf (активно до 8 ноября 2023 г.).
10. Цито-ПАП Окраска по Папаниколау. Доступно на <https://www.abrisplus.ru/catalog/tsitologiya/tsito-pap-nabor-reagentov-dlya-okraski-ginekologicheskikh-preparatov-po-metodu-papanikolaou/> (активно до 8 ноября 2023 г.).
12. Шабалова И.П., Джангирова Т.В., Никитина Л.В., Касоян К.Т., Волченко Н.Н., Савостикова М.В. и др. Стандартизованная аналитическая технология "Метод жидкостной цитологии" (проект). *Проблемы стандартизации в здравоохранении*. 2012; 7-8:48-58.

REFERENCES

1. Chantziantoniou N., Donnelly A.D., Mukherjee M., Boon M.E., Austin R.M. Inception and Development of the Papanicolaou Stain Method. *Acta Cytologica*. 2017; 61(4-5):266-80. DOI: 10.1159/000457827.
2. Bezrukov A.V., Kuznetsov M.V., Mishukova A.A., Snikhovskaya K.V. Possibilities of cytological screening of cervical cancer using AFOMC staining machines. *Poliklinika*. 2020; 1(1):24-6. (in Russian)
3. Goel G., Halder A., Joshi D., Anil A.C., Kapoor N. Rapid, economic, acetic acid Papanicolaou stain (REAP): an economical, rapid, and appropriate substitute to conventional Pap stain for staining cervical smears. *Journal of Cytology*. 2020; 37(4):170-3. DOI: 10.4103/JOC.JOC_89_20.
4. Agarwal P., Toi P.C., Subramaniam H., Apoorva Lakshmi S. Prospective comparison of cytological specimen adequacy assessment by different rapid staining techniques for rapid on-site evaluation in fine needle aspiration cytology and their cost-effectiveness. *Diagnostic Cytopathology*. 2019; 47(5):469-74. DOI: 10.1002/dc.24139.
5. Leucodiff 200 Lachema. Available at: <https://www.erbalachema.com/en/product-support/material-safety-data-sheets/clinical-chemistry-safety-data-sheets/leucodiff/> (accessed 8 November 2023).
6. Novik V.I. About methods of staining cytological preparations. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii*. 2017; 1-2(21):9-10. (in Russian)
7. Sathawane P., Kamal M.M., Deotale P.R., Mankar H. Nuances of the Papanicolaou stain. *CytoJournal*. 2022; 19:43. DOI: 10.25259/CMAS_03_18_2021.
8. MLT-PAP-DIFF. Staining of microslides. Hematology. Cytology. Histology. Available at: <http://www.emco.ru/mlt-pap-diff-2> (accessed 8 November 2023). (in Russian)
9. Instructions for use "Reagents for sample preparation, staining and covering histological and cytological preparations under a cover glass." Available at: http://docs.nevacert.ru/files/med_reestr_v2/o85378_instruction.pdf (accessed 8 November 2023). (in Russian)
10. Cyto-PAP Papanicolaou staining. Available at: <https://www.abrisplus.ru/catalog/tsitologiya/tsito-pap-nabor-reagentov-dlya-okraski-ginekologicheskikh-preparatov-po-metodu-papanikolaou/> (accessed 8 November 2023). (in Russian)
11. Raju K. Evolution of Pap stain. *Biomedical Research and Therapy*. 2016; 3(2): 490-500. DOI: 10.7603/s40730-016-0006-8.
12. Shabalova I.P., Dzhangirova T.V., Nikitina L.V., Kasoyan K.T., Volchenko N.N., Savostikova M.V. et al. Standardized analytical technology "Method of liquid cytology" (project). *Problemy standartizatsii v zdravookhraneni*. 2012; 7-8:48-58. (in Russian)
13. Alone P., Vodithala S., Vagha S. Rapid, economic, acetic acid, Papanicolaou (REAP) staining technique analogous to the routine Papanicolaou staining (PAP) technique [version 1; peer review: awaiting peer review]. *F1000Research*. 2023; 12:931. DOI: 10.12688/f1000research.135708.1.
14. Narayanan O.N., Bai A. Comparison of different methods of fixation

- in Papanicolaou staining of cervical smears: Wetfixation and rehydration of air dried smears. *Tropical Journal of Pathology and Microbiology*. 2019; 5(1):15-9. DOI: 10.17511/jopm.2019.i1.03.
15. Lencioni L.J., Stafneri J.J., Cardonnet L.J. Vaginal and urinary sediment smear staining technique without previous fixation, adapted to Papanicolaous and shorris staining methods. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1954; 44:595-9.
 16. Rupinder K., Shubra W., Kanwal M. Rehydration of air-dried smears versus wet fixation : a cross-sectional study. *Acta Cytologica*. 2013; 57:364-8.
 17. Jaiwong K., Nimmanhaeminda K. The cytomorphic comparison between rehydrated air-dried and conventional wet-fixed pap smears. *Journal of the medical association of Thailand*. 2006; 89:1811-6.
 18. Gupta S., Sodhani P., Chachra K.L. Rehydration of air-dried cervical smears: a feasible alternative to conventional wet fixation. *Obstetrics and Gynecology*. 2003; 102:761-4.
 19. Sivaraman G., Iyengar K.R. Rehydrated air-dried pap smears as an alternative to wet-fixed smears. *Acta Cytologica*. 2002; 46:713-7.
 20. Ng W.F., Choi F.B., Cheung L.L., Wu C., Leung C.F., Ng C.S. Rehydration of air-dried smears with normal saline: application in fluid cytology. *Acta Cytologica*. 1994; 38:56-64.
 21. Elgert P.A., Gill G.W., George N. Papanicolaou cytopathology. *Laboratory Medicine*. 2009; 40:245-6.
 22. Grace A., Kay E., Leader M. Liquid based preparation in cervical cytology screening. *Current diagnostic pathology*. 2001; 7:91-5.
 23. Koss L.G. Squamous carcinoma of uterine cervix and its precursors. In: Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. Koss L.G., ed. 5th ed. Wolters Kluwer Health; 2015.
 24. Naib Z.M. The female genital tract. In: Cytopathology. Naib Z.M., ed. 4th ed. USA: Little, Brown and Company; 1996.
 25. Solomon D., Nayar R. The Bethesda system for reporting cervical cytology. Definitions, criteria and explanatory notes. 2nd ed. China: Springer, New York; 2004.
 26. Kapse S.S., Arakeri S.U., Yerranguntla D.P. Rehydration of air-dried smears with normal saline: an alternative for conventional wet fixation method in cervical cytological study. *Journal of Cytology*. 2018; 35:199-203.
 27. Jones C.A. Papanicolaou staining of air-dried smears: value in rapid diagnosis. *Cytopathology*. 1996; 7(5):333-9. DOI: 10.1111/j.1365-2303.1996.tb00312.x.
 28. Danquah K.O., Adankwah E., Dadzie H.E., Gyamfi D., Adjei E.A., Ossei Sampene P.P., Morhe E. Prolonged duration of air-dry fixation of cervical smears produces superior cytomorphic staining quality over Conventional wet-fixed smears. *Acta Cytologica*. 2023; 67(5):528-32. DOI: 10.1159/000530924.
 29. Kamalkant Shastri S., Joshi A. Modified ultrafast Papanicolaou stain in ultrasound guided FNAC of intraabdominal lesions. *Iranian Journal of Pathology*. 2020; 15(2):66-74. DOI: 10.30699/ijp.2020.98405.1971.