

1 день 25.03.19

**Изучение нормативных документов, регламентирующих работу
цитологической лаборатории**

1. Приказ №297 от 09.07.2001 «О профилактике профессионального заражения ВИЧ-инфекцией»
2. СП 3.1.1.2341-08 «Профилактика вирусного гепатита В»
3. СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений»
4. СП 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»
5. Приказ МЗ РФ от 25.09.95 № 143/270. О создании технического комитета по клиническим лабораторным исследованиям и диагностическим тест-системам инвитро.
6. Приказ МЗ РФ от 25.12.97 № 380. О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения РФ.
7. Приказ МЗ РФ от 7.02.2000 № 45. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ»
8. Приказ №545 МЗ СССР от 23.08.85 «О дальнейшем совершенствовании контроля качества клинических лабораторных исследований»
9. Приказ №60 от 19.02.1996 МЗ РФ «О мерах по дальнейшему совершенствованию Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований»
10. Приказ от 26.05.2003 № 220. Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинико-лабораторных исследований с использованием контрольных материалов».

2 день 26.03.19

Приготовление цитологического препарата

Подготовка предметных стёкол для цитологического исследования. Стекла для приготовления цитологических препаратов должны быть чистые, обезжиренные и сухие.

1. Стекла тщательно промывают щеткой в теплой мыльной (или с моющим средством) воде.
2. Основательно промывают в проточной теплой воде.
3. Затем кипятят 1—2 часа в воде с добавлением соды (2—3%) или моющего средства.
4. После хорошо ополаскивают в чистой горячей воде и промывают в проточной (1—2 часа).

Обработанные и промытые в воде стекла протирают мягкой тряпкой, держа стекла за края, и хранят в смеси Никифорова. По мере надобности пинцетом извлекают стекла из смеси Никифорова и протирают сухой тряпкой. Обработанные таким образом стекла могут быть использованы для приготовления цитологических препаратов.

Получение цитологического мазка

Полученное количество материала не всегда определяет возможности диагностики, иногда очень малое количество материала является достаточным для постановки диагноза. Наличие большого количества крови часто является помехой. При её наличии мазки необходимо делать как можно скорее, иначе наступает свертывание и из свернувшегося сгустка очень трудно сделать мазки и провести исследование. Материал наносят на стекло и очень аккуратно делают мазки, т. к. клетки очень ранимы, а наличие большого количества разрушенных клеток мешает правильной диагностике. Правильно приготовленный мазок из нормальной или патологической измененной ткани должен отвечать следующим условиям:

- Мазок должен начинаться на 1 см от узкого края предметного стекла и заканчиваться примерно в 1,5 см от другого края предметного стекла; мазок не должен достигать длинного края стекла, между мазком и краем предметного стекла должно оставаться расстояние примерно 0,3 см.
- Хороший мазок должен быть максимально тонким (максимально приближающимся к однослойному), равномерной толщины (не волнообразным) на всём протяжении.
- Мазок из осадка жидкого материала (жидкость из серозной полости, смыв из различных органов, содержимое кистозной полости и т.п.) должен заканчиваться у одного из узких краёв предметного стекла в виде следа, оставленного как бы тонкой щёткой.
- Клетки в мазке должны быть равномерно распределены, все участки мазка должны хорошо просматриваться и не содержать «толстые

участки», содержащие непросматриваемые (плохо просматриваемые) скопления или комплексы клеток.

Фиксация мазка

Фиксация мазка проводится в соответствии с методикой, обусловленной биологическим материалом, взятием для цитологического исследования (влажная фиксация биологического материала или подсушивание его на воздухе). При влажной фиксации приготовленный мазок помещается в фиксирующую жидкость, затем подсушиваем на воздухе. Недостаточная фиксация мазка ведет к некачественному окрашиванию клеток.

1. Правильная фиксация мазка обуславливает стойкость клеток по отношению к содержащейся в красках воде, которая в нефиксированном мазке изменяет строение клеточных элементов. При фиксации мазка происходит коагуляция белка, в результате чего клетки прикрепляются к предметному стеклу;

2. При фиксации цитологических препаратов должны использоваться фиксаторы: метиловый спирт, этиловый спирт, смесь Никифорова, фиксатор Май-Грюнвальда, фиксатор Лейшмана, ацетон (для иммуноцитохимии). Если это специально не оговорено методикой, то, как правило, фиксируют высушенные мазки. Лучшим фиксатором для цитологических препаратов является *метанол*. В метаноле фиксацию проводят от трех до десяти минут. Кроме того, для фиксации может быть использован *этиловый спирт 100°*. Время фиксации составляет 10—30 минут. В качестве фиксатора может использоваться смесь *Никифорова* (время фиксации минимум 15 минут, максимум 1—2 часа). Некоторые красители (Лейшман, Май-Грюнвальд) являются одновременно фиксаторами.

3 день 27.03.19

Окрашивание мазка

Качественное окрашивание позволяет правильно идентифицировать клеточные элементы мазка и оценить их особенности при микроскопии. В адекватно окрашенном мазке структуры цитоплазмы, ядра, ядерного хроматина, ядрышек.

При применении любой методики окрашивание мазка важно точно соблюдать последовательность процедур приготовления растворов и временные промежутки времени в течение процесса окрашивания. Существующие в продаже партии красителя имеют различную интенсивность окраски. Это обязывает опытным путём установить оптимальные концентрации (разведение) и время окрашивания для каждого флакона красителя, который устанавливает при окрашивании серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия. При приготовлении растворов необходимо учитывать рН воды:

она должна быть нейтральной (рН 6,8 – 7, 2) что обеспечивается использованием буферных растворов.

Рекомендуемые методы окрашивания цитологических мазков: азур – эозиновый, по Романовскому – Гимзе, Лейшману, Мая – Грюнвальду, Паппенгейму; гематоксилин – эозиновый, метод Папаниколау.

Окраска по Романовскому-Гимзе. Краситель состоит из щелочной части (азур II - ярко-синий цвет), и кислой части (эозин - розово-красный цвет).

В настоящее время используется готовый краситель Романовского-Гимзе, из которого перед началом работы готовят рабочий раствор из расчета 1 капля краски на 1 мл дистиллированной воды.

Высохший фиксированный мазок помещается в кювету с рабочим раствором краски на 25-40 минут (конкретное время устанавливается опытным путем для каждой партии красителя). Бактерии окрашиваются в фиолетово-красный цвет, цитоплазма клеток – в голубой, ядра – в красный. При окрашивании простейших их цитоплазма приобретает голубой цвет, а ядра – красно-фиолетовый.

Результаты окрашивания мазков крови:

- Ядра клеток – красно-фиолетовые.
- Эозинофильные гранулы – красновато-коричневые.
- Базофильные гранулы – синие.
- Нейтрофильные гранулы – фиолетовые.
- Цитоплазма лимфоцитов – голубая.
- Эритроциты – бледно-красные.
- Тромбоциты – наружная часть синяя (более светлая); внутренняя фиолетовая (более темная).

Окраска по Мая-Грюнвальду. Данный метод очень удобен для визуализации гранулоцитов. Для окрашивания применяется готовый раствор эозин-метиленового синего по Мая-Грюнвальду. Мазок без предварительной фиксации заливают красителем, через 5 минут промывают и высушивают.

- Лимфоциты– ядра: сине-фиолетовые; цитоплазма: голубая.
- Моноциты– ядра: сине-фиолетовые; цитоплазма: серо-голубая.
- Гранулоциты – ядра: сине-фиолетовые; гранулы: красные, фиолетовые, темно-синие (зависит от типа).
- Тромбоциты– наружная часть голубая; внутренняя – фиолетовая.
- Эритроциты– розовые.

Окраска по Паппенгейму. Представляет собой комбинацию двух предыдущих методов. Сухие нефиксированные мазки помещаются в кювету с раствором Мая-Грюнвальда на 3 – 5 минут. После этого контейнер с мазками ополаскивается дистиллированной водой, после чего мазки помещаются в кювету с разведенным раствором Романовского-Гимзы на 20 – 30 минут. После этого мазки промываются проточной водой и высушиваются.

- Ядра клеток – красно-фиолетовые.
- Цитоплазма лимфоидных клеток – светло-синяя.
- Лимфоидная азурная грануляция – ярко-синяя.
- Миелоидная азурная грануляция – фиолетовая.
- Нейтрофильные гранулы – светло-фиолетовые.
- Эозинофильные гранулы – красные, красно-коричневые.
- Базофильные гранулы – темно-фиолетовые, черные.
- Эритроциты – розовые
- Тельца Жолли – красновато-фиолетовые.
- Тельца Ауэра – ярко-красные.

4 – 5 дни 28.03.19 – 29.03.19

Изучение основных фоновых процессов и их цитологическая характеристика

I. **Фоновые процессы (пролиферативные).**

A. *Гиперпластические, связанные с гормональными нарушениями.*

1. Эндоцервикоз (железистая эрозия, псевдоэрозия, железистомышечная гиперплазия):

✓ простая псевдоэрозия (участки цилиндрического эпителия, отсутствует пролиферация эпителия), проба Шиллера (-) – не окрашенные участки;

✓ пролиферирующая эрозия (выраженная пролиферация цилиндрического эпителия), проба Шиллера (-) – не окрашенные участки;

✓ заживающая эрозия (метаплазия цилиндрического эпителия, перекрытие многослойным плоским), проба Шиллера ($\pm$) – светлый коричневато-желтый цвет: метаплазия цилиндрического эпителия на фоне люгольотрицательного неизмененного цилиндрического эпителия и люгольположительного плоского эпителия, начальная метаплазия цилиндрического эпителия – проба Шиллера (-), завершение формирования многослойного плоского эпителия – проба Шиллера (+).

2. Полипы:

✓ простой (цилиндрический эпителий),

✓ пролиферирующий (выраженная пролиферация цилиндрического эпителия, новообразование желез);

✓ эпидермизирующий (зависит от фазы метаплазии цилиндрического эпителия в многослойный плоский и определяется как незаконченная или законченная зона трансформации).

3. Папилломы (обычные клетки поверхностного и промежуточного слоев многослойного плоского эпителия). Самые спокойные заболевания.

4. Лейкоплакия (простая форма) – с ороговением по поверхности без заметной пролиферации клеток базального слоя (цитологически – пласты безъядерных чешуек), проба Шиллера (-).

5. Эндометриоз (эндометриальные клетки имплантируются в месте повреждения слизистой оболочки, затем пролиферируют, образуя очаги субэпителиального эндометриоза – кровянистые выделения из очага эндометриоза перед менструацией в лютеиновой фазе).

Б. Воспалительные процессы.

1. Истинные эрозии (дефект эпителиального покрова: многослойного плоского и цилиндрического эпителиев, а также в области доброкачественной зоны трансформации, экзо- и эндоцервицита). Фон – воспаление или атрофия. Проба Шиллера (-) в области дефекта.

2. Цервициты (кольпиты: острый, хронический; экзоцервицит – в области слизистой оболочки влагалищной части, эндоцервицит – цервикального канала). Наличие воспаления, характеризующегося различной степенью выраженности альтеративных, экссудативных и пролиферативных процессов.

В. Посттравматические изменения.

1. Разрывы (дефект эпителиального покрова: неизмененного многослойного плоского и цилиндрического эпителиев на фоне неизмененных тканей). Проба Шиллера (-) в месте разрыва.

2. Эктропион (развивается на месте разрыва или рубца от разрыва, в просвете влагалища гроздьями свисают железы). Разновидность эндоцервикоза.

3. Рубцовые изменения шейки матки (возникают на месте разрыва, метаплазия цилиндрического эпителия или многослойного плоского эпителия).

4. Шеечно-влагалищные свищи. Дефект эпителиального покрова. Фон – воспаление или атрофия.

Изучение дисплазий и основных принципов диагностики злокачественных новообразований

II. Предраковые состояния.

А. Дисплазия, возникающая на неизменной шейке или в области фоновых процессов.

1. Дисплазия слабо выраженная (легкая) (характеризуется базальноклеточной гиперплазией трети пласта, клетки неравномерно

окрашены, очень слабо выражен полиморфизм, повышено количество 2-х ядерных клеток и митозов). Проба Шиллера (-) – не окрашенные участки.

2. Дисплазия умеренно выраженная (изменения захватывают 1/2-2/3 толщи эпителиального пласта, преобладают парабазально-базальные с увеличенными ядрами, имеющими грубый неравномерно распределенный хроматин и неровные контуры; ядра полиморфны, нередко гиперхромны, пролиферация плоскоэпителиального промежуточного слоя).

3. Дисплазия выраженная (преобладают клетки парабазально-базального слоя с резко нарушенным ядерно-цитоплазматическим отношением и признаками атипичности ядер: они увеличены в размерах, гиперхромно окрашены, приобретают неправильную форму, структура хроматина становится грубозернистой, появляются многоядерные клетки; изменения со стороны цитоплазмы сводятся в основном к различной степени вакуолизации; форма клеток изменяется мало).

Б. Лейкоплакия с явлениями атипичности клеток:

✓ лейкоплакия с различной степенью пролиферации базального эпителия и нарушением созревания его в плоский;

✓ лейкоплакия с признаками анаплазии эпителиальных клеток.

В. Эритроплакия.

Возникает на фоне ложных эрозий или в цервикальном канале при наличии длительного хронического воспаления (бактериальной, трихомонадной и вирусной этиологии), способствовавшего атипизации регенеративной метаплазии. Проба Шиллера (-), на отдельных участках – слабоположительная.

Г. Аденоматоз (атипичная железистая гиперплазия эндометрия).

Наряду с мономорфными клетками железистого эпителия без нарушения ядерноцитоплазматического соотношения встречаются крупные клетки с увеличенными в размерах ядрами, с неровными их контурами и более грубой структурой хроматина. В ядрах обнаруживаются ядрышки. Цитоплазма таких клеток нередко содержит слизь. В результате разрастания островков многослойного плоского эпителия в мазках могут появляться клетки плоского эпителия.

Ш. Рак шейки матки.

А. Преклинические формы.

1. Рак in situ (злокачественный процесс, который ограничивается одним эпителиальным пластом и не дает инвазивного роста в окружающие ткани). В мазках выявляется большое количество клеток плоского эпителия с признаками дисплазии (атипичности), а также одиночные раковые клетки разной степени зрелости в зависимости от гистологической структуры преинвазивного рака.

2. Рак in situ с началом инвазии (злокачественный процесс с высокой степенью анаплазии, который ограничивается одним эпителиальным пластом с началом инвазии в окружающие ткани). В препарате встречаются парабазальные клетки с признаками атипии и типичные раковые клетки.

3. Микрокарцинома (злокачественный процесс развивается в цилиндрическом или железистом эпителии эндоцервикса). При микроскопии цитологического материала обнаруживается выраженная атипия цилиндрического эпителия и наличие опухолевых клеток с не резко выраженными признаками злокачественности.

Б. Клинические формы.

1. Плоскоклеточный рак:

✓ ороговевающий рак (характеризуется сохранением в раковых пластах признаков вертикальной анизоморфности с образованием рогового слоя клеток); цитологически отмечается крайне выраженный полиморфизм атипичных клеток плоского эпителия с признаками ороговения;

✓ неороговевающий рак (опухоль состоит из ячеек клеток, в которых сохраняются признаки вертикальной анизоморфности, но отсутствует орогование); цитологическая картина характеризуется менее выраженным полиморфизмом опухолевых клеток, которые расположены разрозненно или в виде скоплений, симпластов, синцитий.

2. Железистый рак (развивается из цилиндрического или железистого эпителия эндоцервикса). При цитологической диагностике выявляются полиморфные железисто-подобные комплексы с резко выраженными признаками злокачественности.

3. Низкодифференцированный рак (гистологически незрелая форма рака состоит из пластов, ячеек, тяжелой опухолевых клеток без какой-либо тенденции к дифференцировке). При исследовании выявляется резко выраженный аназоцитоз. В мазках содержатся отдельно расположенные полиморфные опухолевые клетки, которые не компонуются в какие-либо структуры.

Развитие рака матки

