УДК: 616-002.592-07-091.8

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ВИЯВЛЕННЯ *M. TUBERCULOSIS* РІЗНИМИ ГІСТОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ У ЛЕГЕНЕВІЙ ТКАНИНІ З ТУБЕРКУЛЬОМОЮ ЗА РІЗНОЇ АКТИВНОСТІ СПЕЦИФІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ

Ліскіна І.В., Загаба Л.М., Кузовкова С.Д., Мельник О.О.

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України», Київ, Україна
liskina@ifp.kiev.ua

Рецензенти: проф. Сільченко В.П., д.мед.н. Журило О.А.

Актуальність. Сучасна гістологічна діагностика туберкульозу із застосуванням гістобактеріоскопії базується на застосуванні методу Ціля-Нільсена, флуоресцентного та імуногістохімічного методів. Та переважно застосовується при позалегеневих формах туберкульозу. З науково-практичних позицій доцільне комплексне застосування цих методів.

Мета. Провести порівняльний аналіз з виявлення *M. Tuberculosis* та її антигенів різними гістологічними методами у легеневій тканині з туберкульомою за різної активності специфічного запального процесу.

Матеріали та методи. Матеріалом досліджень слугували 34 резектати легень з туберкульомами, сформовано 2 групи: основна група – 19 випадків із високим ступенем активності специфічного запалення; група порівняння – 15 випадків з помірно-низькою активністю. Застосовані методи Ціля-Нільсена, флуоресцентний та імуногістохімічний. Кількість інфікованих клітин та позаклітинних мікобактерій визначали за робочою градацією: рідко (1–5), помірна кількість (6–15), багато (більше 16) бактерій в полі зору мікроскопу. При імуногістохімічному дослідженні визначали типи та відносну кількість клітин з чіткою позитивною реакцією.

Результати. Усі методи морфологічної діагностики виявили вільно розташовані МБТ в некротичному вмісті та капсулі туберкульоми, та в альвеолах легень на віддаленні. Найбільша кількість вільно розташованих мікобактерій виявлялася при застосуванні флуоресцентного методу та при імуногістохімічному дослідженні. Метод Ціля-Нільсена показав вірогідне переважання спостережень помірної кількості інфікованих альвеолярних макрофагів в основній групі та малої кількості інфікованих макрофагів у групі з помірно-низьким ступенем активності запального процесу ($p<0,01$). У фазу прогресування туберкульозного запалення достовірно частіше виявляли велику кількість макрофагів з позитивною реакцією до антигенів МБТ ($p<0,001$). Найкращі показники діагностичних стандартів встановлені для флуоресцентного та імуногістохімічного методів.

Висновок. Комплексне гістологічне дослідження забезпечило найбільш повні дані про наявність, локалізацію та розподіл в ураженій тканині як власне цілісних МБТ, так і їх антигенів та їх зміни за різної активності специфічного запального процесу. Імуногістохімічне дослідження показало, що накопичення антигенів МБТ спостерігається в різних типах клітин макрофагально-моноцитарного ряду.

Ключові слова: туберкульома легень, гістобактеріоскопія, імуногістохімія, *M. Tuberculosis,* антигени.

Актуальність. Ситуація з туберкульозу в Україні залишається досить складною. Своєчасна діагностика цього інфекційного захворювання є одним із головних чинників як вдалого лікування, так і вирішення низки соціально-організаційних питань епідемічного контролю. Згідно щорічних звітів ВООЗ «Tuberculosis Global Report», мікробіологічний культуральний метод дослідження є «золотим стандартом» в діагностиці туберкульозу, оскільки він дозволяє не тільки виділити культуру збудника, але й і визначити спектр чутливості до протитуберкульозних препаратів [9]. Тоді як гістологічна верифікація залишається додатковим методом діагностики туберкульозу у світовому масштабі та застосовується переважно при позалегеневих формах туберкульозу [10, 13, 14].

У сучасній гістологічній діагностиці туберкульозу одним із провідних методів морфологічного дослідження є гістобактеріоскопія. Гістобактеріоскопія – це метод мікроскопічного виявлення мікроорганізмів у тканинах [2]. Базуючись на специфічних гістохімічних реакціях, цей метод дозволяє виявляти паличковидні та кокові форми кислотостійких мікобактерій у різних тканинах, а також візуалізувати їх внутрішньоклітинну локалізацію, що має значення при вивченні персистенції та розповсюдження бацил в ураженій тканині [20].

Наразі широко розповсюджені та застосовуються два методи морфологічної діагностики туберкульозу – метод Ціль-Нільсена (ЦН) та флуоресцентний метод (ФМ). Кожний з них має свої переваги та недоліки. Найбільш «давнім» можна вважати метод ЦН, та до теперішнього часу він широко використовується як у мікробіологічній практиці, так і при морфологічній діагностиці туберкульозної інфекції. До переваг методу ЦН можна віднести: можливість виявлення типових паличковидних мікобактерій, як вільно розташованих, так і всередині клітин, вияв-

лення кокових форм збудника та морфологічних проявів корд-фактору. Поряд з цим, до недоліків методу можна віднести необхідність проведення дослідження при великому збільшенні мікроскопу (х1000) з імерсією, його трудомісткість. До того ж, метод виявляє усі кислотостійкі збудники, тобто мікобактерії усіх штамів, а не тільки *Mycobacterium Tuberculosis*. Встановлено, що виявлення мікобактерій за Цілем-Нільсеном має відносно низькі рівні чутливості та специфічності (0-44 %) [7, 13]. Враховуючи особливості механізму фарбування за ЦН та його відносно низькі чутливість й специфічність, зрозуміло, що цей метод має досить обмежену діагностичну цінність та не дає можливості патофізіологічної оцінки наявності мікобактеріальних антигенів в ураженій тканині легень.

Флуоресцентний метод був розроблений пізніше, та не так широко застосовується для діагностики туберкульозу. Зокрема, його застосування можливо лише при наявності люмінесцентного мікроскопу. Метод також має свої переваги та недоліки. До переваг ФМ можна віднести легку можливість виявлення більшої кількості мікобактерій в одному полі зору, що пов'язано з яскравим світінням жовтим або помаранчевим кольором збудника на темному фоні та робочим збільшенням мікроскопу х 400; можливість спостереження морфологічних проявів вірулентності збудника (корд-фактору). Недоліком флуоресцентного методу можна вважати прихованість архітектоніки уражених тканин при контрастуванні препаратів [16]. Відомо, що ФМ має приблизно такий же рівень специфічності, що й метод ЦН, але його чутливість в середньому на 10 % більша [6, 8].

Найбільш сучасним методом дослідження є імуногістохімічний (ІГХ) метод. Дослідження туберкульозного ураження легеневої тканини із застосуванням ІГХ методу продемонстрували його певні переваги щодо інших методів. ІГХ метод дає змогу об'єктивно виявляти наявність антигенних компонентів *Mycobacterium Tuberculosis* (МБТ) у різних клітинах при застосуванні різних антитіл до МБТ [13, 15]. Основою впровадження методу слугували відомості щодо продукції великої кількості поліклональних і моноклональних антитіл в розвитку специфічних клітинних тканинних реакцій за присутності бактерій туберкульозу [18]. За даними літератури, чутливість та специфічність ІГХ методу складають 89-98 %, відповідно; тобто цей метод є найбільш результативним [5]. До відносних недоліків цього дослідження можна віднести необхідність спеціальної вартісної апаратури та досить високу вартість розхідних реагентів. Окрім того, в промислове виробництво реагентів для ІГХ поки що не запущено жодне моноклональне антитіло (АТ) до *M.Tuberculosis,* а поліклональні АТ реагують з різними штамами мікобактерій, тобто не забезпечують вірогідне виявлення саме МБТ.

Зрозуміло, що тривалість туберкульозного запального процесу, особливості його перебігу тісно пов'язані з кількістю та біологічними властивостями, притаманними *M. Tuberculosis*, що обумовлює актуальність та доцільність вивчення наявності і кількісного розподілу МБТ в різних гістологічних структурах легень, особливо при тривалому перебігу легеневого туберкульозу. Доведено, що ІГХ дослідження має суттєве науково-практичне значення при вивченні механізмів існування мікобактеріальної інфекції в макроорганізмі, а саме: забезпечує об'єктивний аналіз тканинної локалізації антигенів (АГ) МБТ, можливість дослідження відносної кількості та розподілу АГ у гістологічних структурах [13, 14, 17], зокрема, у легеневій тканині, що неможливо при застосуванні методів Ціля-Нільсена та флуоресцентного [17]. Ми припустили, що одночасне застосування усіх трьох методів дозволить найбільш повно та об'єктивно оцінити наявність та кількісний розподіл як цілісних МБТ, так і антигенів збудника у легеневій тканині при хронічному перебігу легеневого туберкульозу.

Мета дослідження – провести порівняльний аналіз з виявлення *M. Tuberculosis* та її антигенів різними гістологічними методами у легеневій тканині з туберкульомою за різної активності специфічного запального процесу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом морфологічних досліджень слугували 34 резектати легень з туберкульомами від хворих, які отримали хірургічне лікування у клініці ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України». Було сформовано 2 групи – основна та група порівняння. До основної групи увійшло 19 випадків із морфологічно визначеним високим ступенем активності специфічного запалення; група порівняння – 15 випадків з помірно-низьким ступенем активності. Морфологічне визначення ступеня активності специфічного запалення у легеневій тканині проводили за раніше розробленими гістологічними критеріями [1]. В кожному випадку виготовлювали 4 серійні зрізи легеневої тканини, товщиною 4-5 мікрон. Один забарвлювали гематоксиліном і еозином, другий – методом Ціля-Нільсена, третій – оброблювали для флуоресцентного дослідження та четвертий – для ІГХ методу.

Застосовані два гістохімічних методи виявлення мікобактерій: метод Ціль-Нільсена [3] та флуоресцентний (аурамін-родаміновий) метод з використанням набору реагентів «Tb-fluor», виробництва Німеччини (MERCK) [12].

ІГХ дослідження проводили з використанням поліклонального антитіла до *M. Tuberculosis* (PA1-7231), робоче розведення 1:2500, на автостейнері

AUTOSTAINER 360-2D Thermo Fisher Scientific (США) з системою візуалізації UltraVision Quanto.

Досліджували внутрішній вміст туберкульоми (Тб), її капсулу та перифокальні ділянки візуально не зміненої легеневої тканини. Кількість позаклітинних мікобактерій визначали за умовно прийнятою робочою градацією, яка зіставна з аналогічними запропонованими гістологічними шкалами підрахунку кількості бацил [11]: рідко (1-5), помірна кількість (6-15), багато (більше 16) бактерій в одному полі зору. За цією ж градацією визначали і кількість інфікованих клітин.

При ІГХ дослідженні визначали типи та відносну кількість клітин, в яких виявлялися антигени, оцінювали інтенсивність експресії (позитивної реакції) за умовно прийнятою робочою градацією: + – подібна до фонового забарвлення, блідо-жовтого кольору, дифузна; ++ – грудкова, переважно – дрібно-грудкова (світло-коричневого кольору); +++ – виразно грубо-грудкова (інтенсивно коричнева), яка застосовувалася в подібних дослідженнях [13, 15].

Мікроскопічне дослідження проводили на мікроскопах OLYMPUS CX21 та OLYMPUS BX41. Робочі збільшення мікроскопу – x100, x200, x400 та x1000.

Статистична обробка проводилася з використанням параметричних та непараметричних критеріїв. Оцінка відмінностей проводилася методами варіаційної та рангової статистики із застосуванням t-критерію Стьюдента-Фішера [4]. Відмінності вважали вірогідними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведений порівняльний аналіз щодо загальної кількості спостережень позаклітинно розташованих МБТ в різних структурах легеневої тканини з туберкульомою за різної активності специфічного запального процесу при різних гістологічних методах (табл. 1).

Як видно з таблиці 1, найбільш часто вільно розташовані МБТ виявлялися в некротичному вмісті та капсулі туберкульоми, а також в альвеолярних просторах на віддаленні від туберкульоми, незалежно від морфологічного методу їх виявлення. Причому в обох групах дослідження, незалежно від застосованого методу, переважали спостереження поодиноких бацил у зазначених гістологічних структурах легені. Значно рідше виявляли помірну кількість структур збудника, при застосуванні усіх трьох методів обробки гістологічних зрізів. Але значна кількість мікобактерій (градація «багато») виявлялася лише при застосуванні ФМ та ІГХ дослідження.

Аналіз кількості позитивних спостережень збудника відносно ступеня активності специфічного запального процесу показав, що також, незалежно від методу дослідження, частіше МБТ виявляли при високому ступені активності порівняно до помірно-низького. Але достовірної різниці у частоті спостережень не було встановлено. Слід відмітити наступні методологічні особливості різних методів. Вогнища специфічної пневмонії спостерігалися лише при високому ступені активності туберкульозного запалення, що підтверджується і виявленням бацил з такою локалізацією лише в основній групі. Найкраще ці структури візуалізуються при традиційному забарвленні гематоксиліном і еозином, але досить добре вони визначаються і при методі ЦН та ІГХ обробці. ФМ, як показали наші результати, для цих структур не є інформативним, що, вірогідно, пояснюється особливостями самого методу, який не забезпечує визначення чіткої локалізації МБТ у тканині, яка досліджується. Як не дивно, найбільша кількість випадків виявлення бацил встановлена при застосуванні методу ЦН, хоча вона вірогідно не відрізнялася від кількості спостережень при інших методах. Водночас, слід зауважити, що ІГХ дослідження перш за все спрямоване на візуалізацію антигенів МБТ, а не їх цілісних структур, що може пояснити відносно невеликий рівень частоти спостережень останніх.

Згідно попередніх досліджень, підтверджено тривале персистування мікобактерій всередині пінистих макрофагів (Мф) [20]. Такі клітини можуть виступати не тільки проміжним етапом біологічного знищення МБТ, але й слугувати внутрішнь-

Таблиця 1

Частота спостережень та відносна кількість бацил у різних гістологічних структурах легень при застосуванні різних методів

Локалізація (легенева структура)	Градація, кількість бацил у основній групі / групі порівняння								
	Мало			Помірна кількість			Багато		
	ЦН	ФМ	ІГХ	ЦН	ФМ	ІГХ	ЦН	ФМ	ІГХ
Некротичний вміст Тб	15/8	4/6	13/10	1/–	3/1	5/–	–	1/1	1/–
Капсула Тб	10/6	8/7	8/4	3/–	2/1	3/–	–	2/1	3/–
Альвеолярні простори	6/3	10/8	1/1	3/–	3/2–	3/–	–	4/4	14/–
Вогнища специфічної пневмонії	4/–	–	6/–	1/–	–	–	–	–	–

оклітинним резервуаром інфекції, з можливістю подальшого розповсюдження мікобактерій [19]. Тому важливим фрагментом нашого дослідження було виявлення збудника або його антигенів у різних клітинах ураженої легеневої тканини. Проведено визначення позитивних спостережень та відносної кількості внутрішньоклітинних мікобактерій або ж їх антигенів (клітини з чіткою позитивною реакцією до АГ МБТ) із застосуванням методів ЦН та ІГХ (табл. 2).

Як показано в таблиці 2, при забарвленні за ЦН бацили виявлялися тільки у макрофагах різних гістологічних структур. ІГХ дослідження щодо виявлення АГ МБТ показало, що накопичення антигенів спостерігалося в наступних клітинах – макрофагах, епітеліоїдних клітинах, моноцитах та гігантських багатоядерних клітинах Пирогова-Лангханса. Тобто, ІГХ метод об'єктивно продемонстрував безпосереднє залучення різних клітин макрофагального ряду у специфічний запальний процес.

Загалом, незалежно від застосованого методу, в обох групах дослідження виявлена відносно незначна кількість спостережень інфікованих клітин та клітин з позитивною реакцією до АГ МБТ. Аналіз кількості позитивних випадків внутрішньоклітинної локалізації бацил відносно ступеня активності специфічного запального процесу показав, що також, незалежно від методу дослідження, частіше клітини з МБТ та клітини з позитивною реакцією на АГ виявляли при високому ступені активності порівняно до помірно-низького. Виключення становили спостереження інфікованих макрофагів в альвеолах мало зміненої легеневої паренхіми. Визначена достовірно більша кількість спостережень інфікованих макрофагів у помірній кількості при забарвленні методом ЦН, та велика кількість макрофагів з позитивною реакцією до АГ МБТ при ІГХ методі в основній групі. Тоді як при зниженні активності туберкульозного запалення достовірно переважали випадки поодиноких інфікованих макрофагів при забарвленні за ЦН.

В капсулі туберкульоми методом ЦН та при ІГХ дослідженні тільки в основній групі визначено багато інфікованих макрофагів та клітин з позитивною реакцією до антигену. Випадки великої кількості клітин з позитивною реакцією до АГ МБТ виявлені у макрофагах, епітеліоїдних клітинах та моноцитах. Лише в основній групі метод ЦН дозволив виявити 4 випадки значної кількості інфікованих макрофагів.

В осередках специфічної пневмонії тільки в основній групі дослідження виявлялися інфіковані макрофаги та клітини з позитивною реакцією до АГ МБТ. За методом ЦН частіше інфіковані макрофаги спостерігалися в помірній кількості випадків, а при

Таблиця 2

Кількість спостережень внутрішньоклітинних бацил при методі Ціля-Нільсена та клітин з позитивною реакцією до АТ МБТ (ІГХ) в різних гістологічних структурах легень,

Гістологічні структури / клітини	Кількість інфікованих клітин у основній групі / групі порівняння					
	Мало		Помірна кількість		Багато	
	ЦН	ІГХ експресія +++ – ++	ЦН	ІГХ експресія +++ – ++	ЦН	ІГХ експресія +++ – ++
Капсула туберкульози						
макрофаги	4/4	3/5	1/1	5/2	4/–	6/–
епітеліоїдні клітини	–	1/3	–	3/4	–	10/–
гігантські багатоядерні клітини	–	4/1	–	3/2	–	2/–
моноцити	–	3/4	–	2/1	–	8/2
Альвеолярні простори на віддаленні від туберкульози						
макрофаги	3/9 *	–/7	9/1 *	2/5	4/–	17/1 **
епітеліоїдні клітини	–	4/1	–	2/1	–	–/–
моноцити	–	4/6	–	3/4	–	2/–
Осередки специфічної пневмонії						
макрофаги	1/–	5/–	5/–	5/–	1/–	2/–
епітеліоїдні клітини	–	1/–	–	3/–	–	1/–
моноцити	–	5/–	–	1/–	–	1/–
Гранульоми на відстані від туберкульоми						
макрофаги	–	5/4	–	2/–	–	–/–
епітеліоїдні клітини	–	4/3	–	2/–	–	1/–
гігантські багатоядерні клітини	–	2/3	–	1/–	–	1/–
моноцити	–	4/2	–	4/1	–	/–

Примітка. * – різниця показника між групами на рівні $p < 0,01$.
** – різниці показника між групами на рівні $p < 0,001$.

ІГХ дослідженні переважно у макрофагах та моноцитах виявлено накопичення АГ МБТ у відносно різній кількості клітин та у невеликому відсотку спостережень.

Методом ЦН взагалі не виявлено внутрішньоклітинного розташування бацил в гранульомах. Тоді як ІГХ дослідження виявило накопичення АГ МБТ у всіх клітинах макрофагально-моноцитарного ряду в малій та помірній кількості, частіше – у випадках з високою активністю туберкульозного запалення.

Незалежно від групи дослідження, при ІГХ обробці майже в половині випадків у різних ділянках легеневої тканини з туберкульомою, як внутрішньоклітинно, так і позаклітинно, визначали рівень експресії (+), що відповідає фоновому забарвленню при використанні поліклональних антитіл. Тому такий рівень експресії нами не враховувався.

Визначена загальна частота виявлення МТБ при застосуванні різних гістологічних методів (табл. 3).

Як видно з таблиці 3, загалом усі методи гістологічної діагностики виказали високі результати щодо виявлення МБТ та їх антигенів. За результатами нашого дослідження, найбільша чутливість виявлення МБТ та їх антигенів визначена для ФМ та ІГХ методу – 86,7–100,0 % та 94,7–100,0 %, а методу ЦН була меншою (діапазон 86,7–94,7 %). При визначенні рівня результативності методів встановлено, що ФМ та ІГХ методи мають найвищі показники (94,1 % та 97,1 %).

Таким чином, комплексне гістологічне дослідження забезпечило найбільш повні дані про наявність, локалізацію та розподіл в ураженій тканині як власне цілісних МБТ, так і їх антигенів. Імуногістохімічне дослідження прояснює питання щодо характеру та різниці в антигенній завантаженості різних типів клітин макрофагально-моноцитарного ряду, залучених у розвиток туберкульозного процесу.

Об'єктивно визначено, що у фазу прогресування туберкульозного запального процесу, тобто при високому ступені активності, найбільша кількість мікобактерій розміщується у некротичному вмісті, капсулі туберкульоми та в альвеолярних просторах ділянок мало зміненої легеневої паренхіми. ІГХ дослідження додатково показало, що найбільша антигенна завантаженість при високій активності туберкульозного запалення припадає саме на макрофаги та моноцити, локалізовані у різних гістологічних структурах легеневої тканини. При зниженні активності туберкульозного запалення визначається зменшення кількості мікобактерій та їх антигенів у досліджуваних ділянках.

ВИСНОВКИ

1. Усі застосовані нами методи морфологічної діагностики виявили вільно розташовані МБТ в некротичному вмісті та капсулі туберкульоми та в альвеолярних просторах легень на віддаленні. Найбільша кількість вільно розташованих мікобактерій виявлялася при застосуванні флуоресцентного методу та при імуногістохімічному дослідженні.

2. Частота зустрічальності внутрішньоклітинної локалізації МБТ при застосуванні методу Ціля-Нільсена та рівень експресії мікобактеральних антигенів при імуногістохімічному дослідженні демонструють односпрямовані зміни при різній активності специфічного запального процесу.

3. Методом Ціля-Нільсена визначено вірогідне переважання спостережень помірної кількості інфікованих альвеолярних макрофагів в основній групі та інфікованих макрофагів малої кількості у групі з помірно-низьким ступенем активності запального процесу ($p < 0,01$).

4. При імуногістохімічному дослідженні у фазу прогресування туберкульозного запалення достовірно частіше виявляли велику кількість макрофагів з позитивною реакцією до антигенів *M. Tuberculosis*.

5. При зниженні активності туберкульозного запалення визначається зменшення мікобактерій та їх антигенів в усіх гістологічних структурах при використанні усіх методів.

6. Найкращі показники діагностичних стандартів встановлені для флуоресцентного та імуногістохімічного методів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерело фінансування. Дана робота виконана в рамках НДР «Дослідити місцеві імуноморфологічні реакції легеневої тканини хворих при хрон-

Таблиця 3

Загальна частота виявлення *M. Tuberculosis* та її антигенних структур у легеневій тканині з туберкульомою різними методами

Група	Методи, частота виявлення, абс. (%)			
	ЦН	ФМ	ІГХ дослідження	
			АГ МБТ, експресія (+++) – (++)	Цілісні бацили
Основна (n=19)	18 (94,7)	19 (100,0)	19 (100,0)	18 (94,7)
Порівняння (n=15)	13 (86,7)	13 (86,7)	13 (86,7)	11 (73,3)

ічному туберкульозному запаленні», № державної реєстрації 0116U000187, 2016-2018 гг.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гістологічна діагностика ступеня активності туберкульозного запального процесу при туберкульомах легень : інформаційний лист / І.В. Ліскіна, та ін. ; Нац. ін-т фтизіатрії і пульмонології. – К. : ДУ НІФП, 2010. 4 с.
2. Гринберг Л.М. Баранова Е.Ю., Кондрашов Д.Л. Гистобактериоскопия в морфологической диагностике туберкулеза легких: Пособие для врачей. Екатеринбург : [б. в.], 2004.18 с.
3. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб. : СпецЛит, 2010. С. 63-64.
4. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К. : Морион, 2001. 408 с.
5. Bekmurzayeva A., Sypabekova M., Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis // Tuberculosis. 2013. Vol. 93. P. 381-388.
6. Comparison among three cold staining methods in the primary diagnosis of tuberculosis: a pilot study / S. Gupta et al. // J. Bras. Pneumol. 2010. Vol. 36, No. 5. P. 612-616.
7. Comparison of LuminЩ LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis / A. Trusov et al. // International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2009. Vol. 13, No. 7. P. 836–841.
8. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review / K.R. Steingart et al. // Lancet Infect. Dis. 2006. Vol. 6, No. 9. P. 570-581.
9. Global Tuberculosis Report. – World Health Organization, 2015. – 204 p.
10. Global Tuberculosis Report. – World Health Organization, 2016. – 214 p.
11. Granuloma formation and host defense in chronic Mycobacterium tuberculosis infection requires PYCARD/ASC but not NLRP3 or caspase-1 / E.M. TeKippe et al. // PLoS ONE. 2010. Vol. 5 (8). 10 pages. URL: doi:10.1371/journal. pone. 0012320 (дата звернення 04.09.2017).
12. Greenwood N., Fox H. A comparison of methods for staining tubercle bacilli in histological sections // J. Clin. Path. 1973. No. 26. P. 253-257.
13. Histopathological findings in immunohistological staining of the granulomatous tissue reaction associated with tuberculosis / S. Karimi et al. // Tuberculosis Research and Treatment. 2014. Article ID 858396, 6 pages. URL: http://dx.doi.org/10.1155/2014/858396 (дата звернення 04.09.2017).
14. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64 / M.R. Purohit et al. // Diagnostic Pathology. 2007. Vol. 2. P. 36. URL: http://www.diagnosticpathology.org/content/2/1/36. (дата звернення 04.09.2017).
15. Immunohistochemical findings of the granulomatous reaction associated with tuberculosis / S. Karimi et al. // Int J Mycobacteriol. 2016. Vol. 5, No. l. URL: doi: 10.1016/j.ijmyco.2016.11.001 (дата звернення 04.09.2017).
16. Location of intra- and extracellular M. tuberculosis populations in lungs of mice and guinea pigs during disease progression and after drug treatment / D.R. Hoff, et al. // PLoS ONE. 2011. URL: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017550 (дата звернення 04.09.2017).
17. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl–Neelsen-negative Mycobacterium tuberculosis organisms and their precise localization in human tissue / T. Ulrichs et al. // J. Pathol. 2005. Vol. 205. P. 633-640.
18. Mukherjee A., Kalra N., Beena K.R. Immunohistochemical detection of mycobacterial antigen in tuberculous lymphadenitis // Ind. J. Tub. 2002. No. 49. P. 213-216.
19. Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research / L. Dedieu et al. // Biochimie. 2013. Vol. 1. P. 66-73.
20. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Review // Nature Reviews Immunology. 2012. Vol. 12. P. 352-366.

Отримано: 04.09.2017

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЯВЛЕНИЯ *M. TUBERCULOSIS* РАЗНЫМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ С ТУБЕРКУЛЕМОЙ ПРИ РАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Лискина И.В., Загаба Л.М., Кузовкова С.Д., Мельник О.А.

ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского НАМН Украины», Киев, Украина

Актуальность. Современная гистологическая диагностика туберкулеза с применением гистобактериоскопии основывается на использовании метода Циль-Нильсена, флуоресцентного и иммуногистохимического методов. И преимущественно выполняется при внелегочных формах туберкулеза. С научно-практических позиций целесообразно комплексное применение этих методов.

Цель. Выполнить сравнительный анализ по обнаружению *M. Tuberculosis* и их антигенов разными гистологическими методами в легочной ткани с туберкулемой при различной активности специфического воспалительного процесса.

Материалы и методы. Материалом исследований служили 34 резектата легких с туберкулемами, сформировано 2 группы: основная группа – 19 случаев с высокой степенью активности специфического воспаления; группа сравнения – 15 случаев с умеренно-низкой активностью. Использовали методы Циль-Нильсена, флуоресцентный и иммуногистохимический. Количество инфицированных клеток и внеклеточных микобактерий определяли по рабочей градации: редко (1-5), умеренное количество (6-15), много (больше 16) бактерий в поле зрения микроскопа. При иммуногистохимическом исследовании определяли тип и относительное количество клеток с четкой положительной реакцией.

Результаты. Все методы морфологической диагностики обнаруживали свободно расположенные МБТ в некротическом ядре и капсуле туберкулемы, а также в альвеолах легких на отдалении. Наибольшее количество свободно расположенных микобактерий выявлялось при использовании флуоресцентного метода и иммуногистохимического исследования. Метод Циль-Нильсена показал достоверное преобладание случаев умеренного количества инфицированных альвеолярных макрофагов в основной группе и малого количества инфицированных макрофагов в группе с умеренно-низкой степенью активности воспалительного процесса ($p<0,01$). В фазу прогрессирования туберкулезного воспаления достоверно чаще обнаруживали большое количество макрофагов с позитивной реакцией к антигенам МБТ ($p <0,001$). Лучшие показатели диагностических стандартов установлены для флуоресцентного и иммуногистохимического методов.

Вывод. Комплексное гистологическое исследование обеспечило наиболее полные данные о наличии, локализации и распределении в пораженной ткани как целостных МБТ, так и их антигенов, и изменения при разной активности специфического воспалительного процесса. Иммуногистохимическое исследование показало, что накопление антигенов МБТ наблюдается в различных типах клеток макрофагально-моноцитарного ряда.

Ключевые слова: туберкулема легких, гистобактериоскопия, иммуногистохимия, *M. Tuberculosis*, антигены.

COMPARATIVE ANALYSIS OF *M. TUBERCULOSIS* DETECTION BY DIFFERENT HISTOLOGICAL METHODS IN LUNG TISSUE WITH PULMONARY TUBERCULOMA WITH DIFFERENT ACTIVITY OF SPECIFIC INFLAMMATION

Liskina I.V., Zahaba L.M., Kuzovkova S.D., Melnyk O.A.

SO "National institute of phthisiology and pulmonology named after F.G. Yanovsky NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

Relevance. Modern histological diagnostics of tuberculosis with using of histobacterioscopy is based on the application of Ziehl-Neelsen method, fluorescent and immunohistochemical methods. And it is mainly used for extrapulmonary forms of tuberculosis. From a scientific and practical standpoint, it is advisable to use these methods in a combined.

Objective. To conduct a comparative analysis of the detection of *M. tuberculosis* and their antigens by various histological methods in pulmonary tissue with tuberculoma at different activities of a specific inflammatory process.

Materials and methods. The material for the study was 34 cases of resected parts of the lungs with tuberculoma, two groups were formed: the main group – 19 cases with a high degree of activity of specific inflammation; the comparison group – 15 cases with moderately or low activity. Ziehl-Neelsen staining, fluorescent and immunohistochemical methods were applied. The number of infected cells and extracellular bacilli was determined according to the working gradation: rarely (1-5), moderate (6-15), many (more than 16) bacteria in the field of view of the microscope. At the immunohistochemical examination it was determined the type and relative number of cells with clear positive results.

Results. All methods of histological diagnosis revealed a free located MBT in the necrotic nucleus and capsule of tuberculoma, and in alveolar spaces at a distance. The greatest number of free located mycobacteria was detected with using fluorescent method and immunohistochemical examination. The Ziehl-Neelsen showed a significant predominance of observations of a moderate amount of infected alveolar macrophages in the main group and a small number of infected macrophages in a group with a moderately or low activity of the inflammatory process ($p<0,01$). At the progression of tuberculosis, a large number of macrophages with a positive staining to MBT antigens ($p<0,001$) was more often detected. Highest indicators of diagnostic standards are established for fluorescent and immunohistochemical methods.

Conclusion. A combined histological study provided the most complete data on the presence, localization and distribution in the affected tissue of both whole structures MBTs and their antigens at the different activity of specific inflammation. Immunohistochemical study showed that the accumulation of MBT antigens is observed in different types of macrophages and monocytes cells.

Keywords: pulmonary tuberculoma, histobacterioscopy, immunohistochemistry, *M. Tuberculosis*, antigens.