

## Сравнительная характеристика иммуногистохимического выявления антигенов *M. tuberculosis* и микобактерий методом Циля–Нильсена в легочной ткани с туберкулезом на фоне прогрессирующего течения туберкулеза

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

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

**Цель работы** – сопоставить характер экспрессии антигенов *M. tuberculosis* при иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании и выявления кислотоустойчивых бактерий (КУБ) методом Циля–Нильсена в легочной ткани с туберкулезом при хроническом течении туберкулезного процесса в фазу обострения.

**Материалы и методы.** Материал исследования – резектаты легких, 19 случаев. Изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 микрон, окрашивали гематоксилином и еозином методом Циля–Нильсена и проводили ИГХ исследование. Использовано кроличье поликлональное антитело *Mycobacterium tuberculosis* Antibody (США), разведение – 1:2500. Оценка положительной реакции по условной шкале: + – фоновая окраска, бледно-желтая, диффузная; ++ – мелкогранулярная (светло-коричневая); +++ – грубо гранулярная (интенсивно коричневая). Количественная градация КУБ вне или внутри макрофагов в одном поле зрения: мало – 1–5 единиц; умеренное количество – 6–15 и много – более 15.

**Результаты.** Морфологические признаки прогрессирования специфического воспаления были во всех случаях. Метод Циля–Нильсена: наиболее часто внеклеточные КУБ выявлялись в некротическом ядре (84,2 %) и грануляционном слое капсулы туберкулема (68,4 %). Чаще определялись единичные КУБ. Большее количество бактерий было внутри клеток. В 84,2 % наблюдений КУБ выявлены в макрофагах внутри альвеол в умеренном количестве.

ИГХ исследование: во всех случаях определялись клетки с позитивной реакцией (+++) на антигены *M. tuberculosis*. Макрофаги внутри альвеол вне туберкулемы с такой реакцией были в 94,7 %; несколько меньше, в 84,2 % – макрофаги и эпителиоидные клетки грануляционного слоя капсулы туберкулемы. Удельный вес наблюдений большого количества клеток в альвеолах достигал 77,8 %, а в грануляционном слое капсулы – 30,0–50,0 %. Мелкогранулярная окраска клеток в этих же участках легочной ткани отмечалась чаще, преобладали случаи наблюдений большого и/или умеренного количества клеток.

**Выводы.** КУБ выявлены в 94,7 % случаев методом Циля–Нильсена. При ИГХ исследовании позитивная реакция клеток макрофагального ряда была во всех случаях. ИГХ исследование показало, что максимальная антигенная нагрузка определялась в макрофагах внутри альвеол вне туберкулемы и несколько меньше – в клетках макрофагального ряда грануляционного слоя капсулы. Результаты обоих методов выявления микобактерий и/или их фрагментов совпали по максимальному количеству наблюдений локализации структур возбудителя, а именно: в грануляционном слое капсулы туберкулемы и сохраненных альвеолярных пространствах вне туберкулемы.

**Ключевые слова:** туберкулема легких, *M. tuberculosis*, антигены, иммуногистохимия, гистохимия.

**Патология.** – 2017. – Т. 14, № 3(41). – С. 337–343

**DOI:** 10.14739/2310-1237.2017.3.118754

**E-mail:** liskina@ifp.kiev.ua

## Порівняльна характеристика імуногістохімічного виявлення антигенів *M. tuberculosis* і мікобактерій за методом Ціля–Нільсена в легеневій тканині з туберкульозом на тлі прогресуючого перебігу туберкульозу

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

**Мета роботи** – порівняти характер експресії антигенів *M. tuberculosis* під час імуногістохімічного (ІГХ) дослідження, виявлення кислостійких бактерій (КСБ) методом Ціля–Нільсена в легеневій тканині з туберкульозом при хронічному перебігу туберкулезного процесу у фазу загострення.

**Матеріали та методи.** Матеріал дослідження – резектати легень, 19 випадків. Виготовляли серійні зрізи товщиною 5–6 мікронів, забарвлювали гематоксилином та еозином методом Ціля–Нільсена та проводили ІГХ дослідження. Використали кроляче поліклональне антитіло *Mycobacterium tuberculosis* Antibody (США), розведення 1:2500. Оцінювання позитивної реакції за умовною шкалою: + – фонове забарвлення, блідо-жовте, дифузне; ++ – дрібногранульоване (світло-коричневе); +++ – грубо гранульоване (інтенсивно коричневе). Кількісна градация КСБ – поза або всередині макрофагів у полі зору: мало – 1–5 одиниць; помірна кількість – 6–15 і багато – понад 15.

**Результати.** Морфологічні ознаки прогресування специфічного запалення були в усіх випадках. Метод Ціля–Нільсена: найчастіше позаклітинні КСБ виявлені в некротичному ядрі (84,2 %) та грануляційному шарі капсули туберкулема (68,4 %). Частіше спостерігали поодинокі КСБ. Велика кількість паличок містилася всередині макрофагів. Найбільше випадків – 84,2 % спостережень – у макрофагах всередині альвеол, у помірній кількості. ІГХ дослідження: в усіх випадках визначені клітини з позитивною реакцією (+++) на антигени *M. tuberculosis*. Макрофаги з такою реакцією всередині альвеол поза туберкульозом спостерігали в 94,7 %; дещо менше – 84,2 % – макрофаги та епітеліоїдні клітини грануляційного шару капсули туберкульозом. Питома вага спостережень великої кількості клітин в альвеолах сягала 77,8 %, а в грануляційному шарі капсули – 30,0–50,0 %. Дрібногранульоване забарвлення клітин у цих самих ділянках легеневої тканини відзначали частіше, переважали випадки спостережень значної та/або помірної кількості клітин.

**Ключові слова:** туберкульоз легень, *M. tuberculosis*, антигени, імуногістохімія, гистохімія.

**Патология.** – 2017. – Т. 14, № 3(41). – С. 337–343

**Висновки.** КСБ виявлені в 94,7 % випадків методом Циля–Нильсена. Під час ІГХ дослідження позитивна реакція клітин макрофагального ряду була в усіх випадках. ІГХ дослідження показало: максимальне антигенне навантаження визначалось у макрофагах всередині альвеол поза туберкульоми та дещо менше – у клітинах макрофагального ряду грануляційного шару капсули. Результати обох методів виявлення мікобактерій та/або їхніх фрагментів збіглись за максимальною кількістю спостережень локалізації структур збудника, а саме: у грануляційному шарі капсули туберкульоми та збережених альвеолярних просторах поза туберкульоми.

**Key words:**

pulmonary tuberculoma, *M. tuberculosis*, antigens, immunohistochemistry, histochemistry.

**Pathologia**

2017; 14 (3), 337–343

## Comparative characteristics of immunohistochemical detection of *M. tuberculosis* antigens and mycobacteria by Ziehl–Neelsen method in lung tissue with tuberculoma during progressive course of tuberculosis

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

**The aim of the study** – to compare the character of expression of *M. tuberculosis* antigens in immunohistochemical (IHC) study and detection of acid-fast bacilli (AFB) by Ziehl–Neelsen method in lung tissue with tuberculoma in the chronic course of tuberculosis during the exacerbation phase.

**Materials and methods.** The materials for the study were resected lungs, in total 19 cases. The thickness of the serial sections was 5–6 microns. Staining was carried out with hematoxylin and eosin, by Ziehl–Neelsen, and the IHC. IHC study used a rabbit polyclonal antibody to *Mycobacterium tuberculosis*. Antibody (USA) was used at 1:2500 dilution. Assessing of the positive reaction was according to the conditional scale: + – background color, pale yellow, diffuse; ++ – fine-granular (light brown); +++ – coarse-granular (intense brown). Quantitative gradation of AFB was the following: out or within macrophages in one field of view: few, 1–5 units; a moderate amount – 6–15, and many – more than 15.

**Results.** In all the cases pulmonary tuberculosis had morphological signs of the progression of a specific inflammatory process. Ziehl–Neelsen stain showed that the most frequently free located AFB were detected in the necrotic nucleus (84.2 %) and granulation layer of the capsule of tuberculoma (68.4 %). Most often single bacilli were noted. A greater number of bacilli were found inside macrophages. The most frequently intracellular bacilli were found in macrophages located in alveolar spaces – 84.2 % observations in a moderate number. IHC study showed that in all the cases, cells with a coarse-granular positivity (+++) to MBT antigens were determined. Macrophages within the alveoli outside tuberculoma, with same positivity were in 94.7 %; fewer – macrophages and epithelioid cells were in the granulation layer of the tuberculoma capsule, a total of 84.2 %. The percentage of observations of a large number of cells in the alveoli reached 77.8 %, and in the granulation layer of the capsule – 30.0–50.0 %. More often the fine-granular staining of cells in the same parts of lung tissue was observed, a cases of large and/or moderate number of cells prevailed.

**Conclusions.** The AFB was identified in 94.7 % cases by Ziehl–Neelsen method. In IHC study a positive reaction of macrophage cells was detected in all the cases (100 %). IHC study showed that maximum antigenic load was determined in macrophages localized inside alveoli outside of tuberculoma and slightly less in macrophage cells of the granulation layer of the tuberculoma's capsule. The results of both methods for detecting mycobacteria and/or their fragments demonstrated the coincidence of the maximum number of observations of localization of the bacilli structures, namely in granulation layer of the tuberculoma's capsule and the preserved alveolar spaces outside the tuberculoma.

В проблеме лабораторной диагностики туберкулеза (ТБ) собственно гистологическая диагностика ТБ занимает особое положение, оставаясь в некоторой степени дискуссионным вопросом. С одной стороны, внелегочный ТБ, который чаще всего требует патогистологического исследования, составляет лишь 10–15 % от всех случаев этой инфекции [9,14]. С другой – неуклонное распространение ВИЧ-инфекции, в частности, в Украине приводит как к увеличению количества развития внелегочных форм ТБ, так и к росту количества случаев атипичного клинического течения легочного ТБ [2,5,7,16]. Учитывая доказанные ограничения уровня диагностической чувствительности и специфичности при окраске гистологических образцов по Цилю–Нильсену [18], необходимость объективного выявления микобактерий, реальные возможности культуральных, молекулярно-генетических, серологических технологий [4,10,15], гистоморфологический анализ остается единственным возможным методом диагностики ТБ только в немногочисленных клинических случаях [12,13].

В ряде гистологических исследований показано, что гранулематозные клеточные реакции, а в

некоторых случаях и негранулематозные реакции, например такие, как скопления пенистых макрофагов [6], микобактериальная псевдоопухоль [11], являются проявлениями собственно туберкулеза только тогда, когда наличие микобактерий туберкулеза (МБТ) подтверждено в пораженной ткани. Недавние исследования показали, что результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) также являются достоверными только в случаях возможности выявления *M. tuberculosis* в пораженных тканях макроорганизма [19]. Наблюдения цепочек из микобактерий, которые чаще всего можно выявить в очагах некроза при окраске образцов ткани по Цилю–Нильсену [17], указывают на ассоциацию тканевой реакции с туберкулезной инфекцией. Но, как известно, окраска по Цилю–Нильсену обычно имеет относительно низкую чувствительность в отношении визуализации МБТ, диапазон положительных находок составляет 0–44 % [9]. Кроме того, обычно требуется присутствие достаточно большого количества бактерий – минимум  $10^4$  единиц в одном образце (или в 1 мл), для достоверного установления диагноза [19]. А если учитывать еще особенности механизма окраски клеток и/или ткани по Цилю–Нильсену и не-

высокие уровни чувствительности и специфичности этого метода, то становится очевидным, что метод имеет ограниченную диагностическую ценность и не обеспечивает возможности патофизиологической оценки присутствия/накопления антигенов МБТ в пораженной ткани.

На сегодняшний день обнаружение антигенов МБТ при использовании иммуногистохимического (ИГХ) метода исследования является достаточно хорошо разработанной технологией с ее преимущественным применением в исследовательских целях. Основой для такого рода исследований послужили данные о продуцировании большого количества поликлональных и моноклональных антител в ходе развития специфических клеточных тканевых реакций в присутствии бактерий.

Тем не менее в научной литературе недостаточно представлены результаты исследований по поводу наличия, количества и локализации антигенов МБТ при длительном развитии туберкулеза, в частности, при такой его форме как туберкулема. Нет достоверных данных о влиянии на эти показатели курсов специфической химиотерапии, а также учета фазы процесса: обострения, стабилизации или регрессии при анализе полученных результатов.

## Цель работы

Провести сопоставление характера экспрессии антигенов *M. tuberculosis* при иммуногистохимическом исследовании и выявления кислотоустойчивых бактерий (КУБ) методом Циля–Нильсена в легочной ткани с туберкулемой при хроническом течении туберкулезного процесса в фазу обострения.

## Материалы и методы исследования

Материалом для исследований послужили резектаты легких с наличием в них туберкулемы от 19 пациентов, которым проводилось дополнительное хирургическое лечение по поводу туберкулеза легких в клинике ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф. Г. Яновского НАМН Украины». До выполнения операции пациенты получили основной курс или несколько курсов специфической химиотерапии, однако удовлетворительного результата лечения достигнуто не было. Исходное гистологическое исследование проводили по гистопрепаратам, окрашенным по традиционной методике гематоксилином и эозином, с целью установления морфологической активности специфического воспалительного процесса согласно ранее установленным цитологическим и гистологическим критериям [3]. Во всех случаях была определена высокая степень активности специфического воспалительного процесса. Всего в каждом случае изготавливали четыре серийных среза легочной ткани с наличием участка туберкулемы и прилежащей легочной паренхимы. Толщина срезов составляла 5–6 микрон. Один срез окрашивался гематоксилином и эозином, другой – по методу Циля–Нильсена, третий и четвертый срезы (опыт и контроль) включали в ИГХ исследование.

ИГХ исследование проводили с использованием автостейнера AUTOSTAINER 360-2D производства

компании Thermo Fisher Scientific (США), для визуализации продуктов иммуногистохимической реакции использована система UltraVision Quanto HRP DAB. Для выявления микобактериальных антигенов применяли кроличье поликлональное антитело *Mycobacterium tuberculosis* Antibody (PA1-7231) производства компании Thermo Fisher Scientific (США), рабочее разведение – 1:2500. Микроскопическое исследование проводили на микроскопах OLYMPUS CX21 и OLYMPUS BX51. Рабочие увеличения микроскопов – x100, x200, x400, x1000. На малых увеличениях определяли наличие в препарате разных гистологических структур ткани легкого, в том числе – специфического характера. Большие увеличения (x400, x1000) применяли на этапе определения характера и выраженности экспрессии микобактериальных антигенов и для обнаружения КУБ.

Определение наличия разных форм и локализации КУБ в срезах ткани выполнялось по препаратам с окраской по Цилю–Нильсену. Для этого была использована следующая рабочая количественная градация обнаруженных КУБ – внеклеточно или же внутри макрофагов в одном поле зрения микроскопа (x1000): мало – 1–5 единиц; умеренное количество – 6–15 единиц и много – более 15 единиц. В гистопрепаратах с ИГХ обработкой определяли типы и относительное количество клеток с положительной реакцией (то есть с наличием антигенов микобактерии), внеклеточные скопления антигенного вещества. Оценивали уровень интенсивности положительной реакции (экспрессии) по условно принятой рабочей шкале: + – фонная окраска, бледно-желтая, диффузного характера; ++ – гранулярная, преимущественно – мелкогранулярная (светло-коричневого цвета); +++ – выраженная грубогранулярная (интенсивно-коричневого цвета).

Микрофотографии тканевых срезов получали, используя фотокамеру-приставку к микроскопу OLYMPUS DP73 (Япония) с выведением изображения на компьютер с помощью программы cellSenc Standart.

Полученные данные статистически обработаны методом вариационной статистики с использованием математических и статистических функций программы Microsoft Excel 2007. Статистическую значимость различий частоты встречаемости признаков оценивали с помощью точного углового преобразования Фишера.

## Результаты и их обсуждение

Изначально при рутинном гистологическом исследовании уточнено, что во всех отобранных случаях туберкулем легких представлены морфологические признаки прогрессирования специфического воспалительного процесса.

Исследование срезов легочной ткани, окрашенных по Цилю–Нильсену, показало, что наиболее часто свободно расположенные КУБ выявлялись в некротическом ядре туберкулем (16 случаев, 84,2 %) и грануляционном слое капсулы туберкулем (13 случаев, 68,4 %). В 9 наблюдениях (47,4 %) возбудитель обнаруживался внутри альвеол вне самой туберкулемы и в 5 случаях (26,3 %) – в очагах специфической пневмонии вне туберкулемы. Чаще всего во всех наблюдениях отмечены единичные КУБ, только в пяти (26,3 %) изо



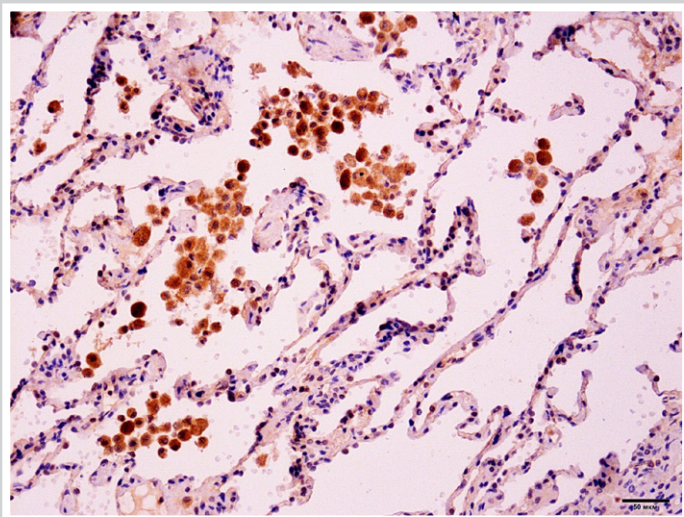


Рис. 1. В альвеолярных пространствах легкого определяются скопления макрофагов с грубо гранулярной и мелкогранулярной коричневой окраской цитоплазмы. ИГХ обработка с *Mycobacterium tuberculosis* Antibody. Ув.:  $\times 100$ .

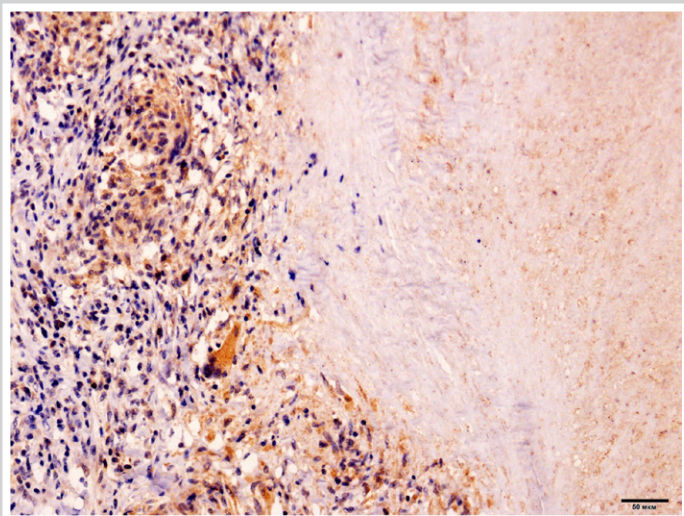


Рис. 2. Экспрессия антигенов МБТ в некротическом содержимом туберкулемы (справа) и в грануляционном слое капсулы (желто-коричневая окраска). ИГХ обработка с *Mycobacterium tuberculosis* Antibody. Ув.:  $\times 100$ .

всех 19 случаев были участки ткани, содержащие умеренное количество КУБ.

Гораздо больше и чаще выявляли палочки, которые локализовались внутри клеток, а именно – в цитоплазме макрофагов. Наиболее часто внутриклеточные КУБ были выявлены в макрофагах, расположенных в альвеолярных пространствах, – 16 (84,2 %) наблюдений. Несколько реже, в 11 случаях (57,9 %), подобные наблюдения были в макрофагах капсулы туберкулемы. В других гистологических структурах – очагах специфической (туберкулезной) пневмонии, туберкулезных очагах типа гранулемы с некрозом в центре и истинных гранулемах количество наблюдений составляло от 2 до 7 (10,5–36,8 %) в группе исследования. Существенным отличием от случаев

выявления внеклеточных бацилл было то, что более чем в половине всех таких наблюдений отмечено умеренное количество инфицированных клеток (6–15 в одном поле зрения (п/зр)), в 9 случаях были участки с большим скоплением инфицированных макрофагов (более 15 в п/зр), причем в 2 случаях значительные скопления макрофагов отмечены более чем в одной гистологической структуре в одном гистопреparate.

Суммируя результаты этого этапа исследования, можно утверждать, что в фазу прогрессирования туберкулезного воспаления большинство единиц возбудителя локализуется внутриклеточно, что можно рассматривать как один из видов биологической защиты микобактерий от противотуберкулезных химиопрепаратов.

Результаты ИГХ исследования показали, что практически во всех случаях определялись клетки с выраженной грубо гранулярной позитивной реакцией (+++) на антигены МБТ. Наибольшее число наблюдений макрофагов с грубо гранулярной реакцией выявлено внутри альвеол вне туберкулемы – всего 18 случаев (94,7 %) (рис. 1); несколько меньше наблюдений – макрофагов и эпителиоидных клеток с грубо гранулярной реакцией, было в грануляционном слое капсулы туберкулемы: всего 16 (84,2 %) (рис. 2). При этом удельный вес наблюдений большого количества клеток с экспрессией (+++) в альвеолах достигал 77,8 %, а в грануляционном слое капсулы туберкулемы – от 30 до 50 % в зависимости от типа клеток макрофагального ряда.

Реже встречались наблюдения умеренного количества клеток с выраженной экспрессией: в альвеолах – в 16,7 % случаев, в грануляционном слое – в 25 %. Реже всего наблюдали единичные клетки с грубо гранулярной окраской, причем во всех исследуемых гистологических структурах легкого.

Интересно, что мелкогранулярная окраска цитоплазмы клеток (уровень экспрессии ++) в этих же участках легочной ткани отмечалась наиболее часто, преобладали случаи наблюдений большого и/или умеренного количества клеток с такой интенсивностью окраски в поле зрения. В целом такие клеточные скопления отмечены практически во всех исследуемых гистологических структурах, в том числе внеклеточные скопления антигенных компонентов МБТ обнаружены в некротических массах туберкулемы (5 случаев, 26,3 %).

В полном соответствии со случаями клеток с экспрессией уровня (+++), наибольшее число наблюдений макрофагов с экспрессией (++) обнаружено в альвеолах вне туберкулемы – 14 (73,7 %), а также в клетках грануляционного слоя капсулы, в 10 (52,6 %) случаях это были типичные макрофаги и в 13 (68,4 %) случаях – эпителиоидные клетки. В 11 (57,9 %) наблюдениях выявлены макрофаги в очагах специфической пневмонии, и по 6 (31,6 %) случаев – макрофаги и эпителиоидные клетки гранулем.

С другой стороны, в отличие от случаев клеток с максимальным уровнем антигенной экспрессии, гораздо чаще обнаруживали эпителиоидные клетки с мелкогранулярной окраской цитоплазмы. Много таких наблюдений в грануляционном слое капсулы

туберкулемы – 13 (68,4 %) случаев, несколько меньше в гранулемах и очагах специфической пневмонии – 6 (31,6 %) и 5 (26,3 %) случаев соответственно.

Гигантские многоядерные клетки с грубо гранулярным окрашенным содержимым цитоплазмы наблюдали наиболее редко. Чаще эти клетки характеризовались мелкогранулярным светло-коричневым содержимым (экспрессия ++), с их размещением в грануляционном слое капсулы – 9 (47,4 %) случаев, и в гранулемах вне туберкулемы – 4 (21,1 %) случая.

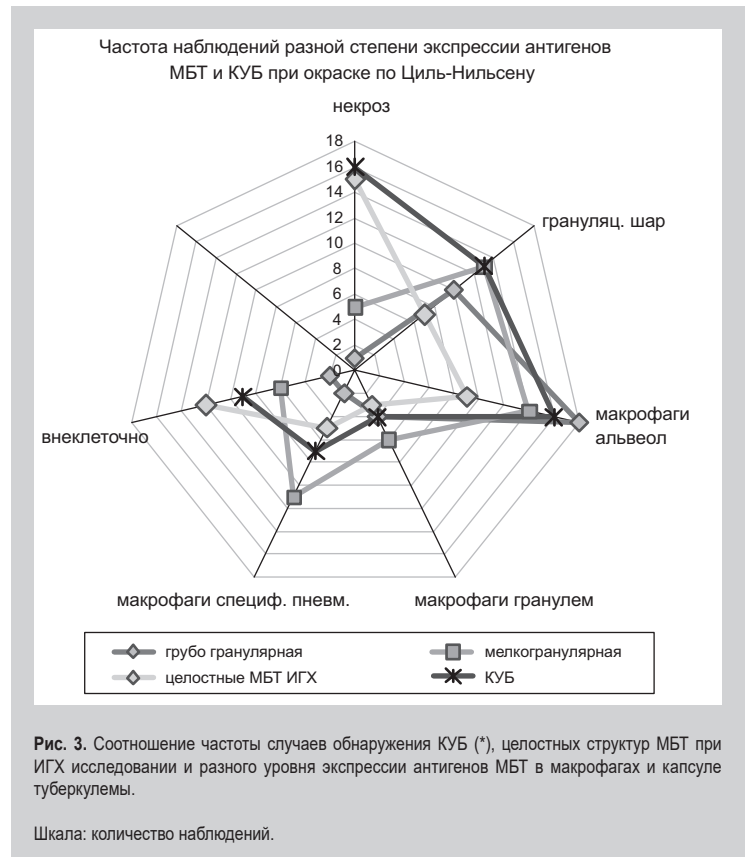
В целом можно отметить, что наибольшую антигенную нагрузку демонстрируют типичные макрофаги – как в структурах туберкулемы, так и в окружающей ее легочной паренхиме. Эпителиоидные клетки, которые, как ранее установлено, являются одним из видов специализированных макрофагов [8], в меньшей степени накапливают антигены МБТ. Что касается специализированных гигантских многоядерных макрофагов, то, согласно результатам нашего исследования, грубо гранулярные скопления в них обнаружены в единичных случаях, независимо от локализации этих клеток.

Слабая позитивная реакция, а именно: экспрессия антигенов уровня (+) в различных участках легочной ткани (как внутри клеток, так и во внеклеточных пространствах) – нами не учитывалась, так как она соответствует фоновой окраске при использовании поликлональных антител, что имело место и в нашем исследовании.

Основные полученные нами данные представлены в виде диаграммы на рисунке 3.

Диаграмма демонстрирует, что высокий уровень совпадений (75–89 %) частоты определения экспрессии антигенов МБТ уровня ++ – +++ , а также КУБ при методе Циля–Нильсена выявился именно в макрофагах, расположенных в альвеолах вне туберкулемы, кроме того, практически совпадает частота обнаружения палочек при окраске по Цилю–Нильсену и целостных структур бактерий при ИГХ исследовании в некротическом содержимом туберкулемы. Достаточно близкие показатели частоты выявления получены при традиционном обнаружении КУБ, целостных структур бактерий при ИГХ исследовании и клеток с грубо гранулярным накоплением антигенов в цитоплазме макрофагов гранулем. Кроме того, и частота обнаружения клеток с мелкогранулярной окраской также незначительно отличалась в этих структурах.

Наибольший разброс показателей частоты обнаружения клеток с разной интенсивностью экспрессии антигенов МБТ, а также целостных структур и палочек при методе Циля–Нильсена отмечался в некротических массах ядра туберкулем и во внеклеточных пространствах. Эти факты можно объяснить следующим образом. Давно установлено [1, 13], что в некрозе накапливается весьма значительное количество целых МБТ, особенно в случаях прогрессирования туберкулезного воспаления. И понятно, что если это – массы детрита, то, как правило, в них отсутствуют сохраненные клеточные структуры, поэтому и наблюдения в них целых клеток с антигенами МБТ имели единичный характер. Что касается внеклеточных пространств, то, безусловно, в них проще обнаруживать целые МБТ, а скопление антигенов, скорее всего, происходит в



жидкой среде (экссудате). Последний имеет очаговый характер при туберкулемах, что может в определенной степени объяснить малое число наблюдений внеклеточных скоплений антигенов микобактерий.

Дополнительно выполнена статистическая обработка полученных количественных показателей при обоих методах выявления МБТ и/или их антигенов. В частности, установлено, что частота выявления макрофагов с грубо и мелкогранулярной окраской цитоплазмы при ИГХ исследовании (100 % случаев) достоверно выше частоты обнаружения целостных структур бактерий этим же способом в этих клетках (26,3 %), ( $\varphi_{\text{расчет}} = 6,362$ ,  $p < 0,01$ ). То есть можно предположить, что при хроническом течении туберкулеза даже в фазу обострения процесса количественно преобладает накопление антигенов МБТ в клетках макрофагального ряда по сравнению с количеством сохранных «целостных» бактерий в них. Вероятно, прежде всего, это связано с результатом медикаментозного противотуберкулезного лечения таких пациентов.

## Выводы

1. В фазу прогрессирования туберкулеза при туберкулемах легких традиционный гистохимический метод Циля–Нильсена позволил выявить кислотоустойчивые бактерии в 18 (94,7 %) случаях. При иммуногистохимическом исследовании достоверная позитивная реакция (уровень экспрессии ++ – +++ ) на присутствие микобактериальных антигенов в клетках макрофагального ряда и/или целостные структуры возбудителя обнаружены во всех случаях (100 %).



2. Установлено, що традиційний метод Циля–Нильсена дозволило виявити КУБ частіше в некротическому ядрі (16 випадів) і грануляційному шарі (13 випадів) капсули туберкулеми. По результатах ИГХ дослідження максимальна антигенна навантаження визначалась в макрофагах всередині альвеол поза туберкулеми (18 випадів) і декілька менше – в клітках макрофагального ряду грануляційного шару капсули туберкулеми (16 випадів). Результати обох методів виявлення мікобактерій і/або їх фрагментів продемонстрували співпадіння максимальної локалізації структур збудителя – грануляційний шар капсули туберкулеми і макрофаги збережених альвеолярних просторів поза туберкулеми.

3. Гістологічне дослідження серійних срезів легочної тканини з туберкулемою в фазу прогресування специфічного запального процесу, оброблених двома методами, показало, що саме комплексне дослідження забезпечує найбільш повні дані про наявність, локалізацію і розподіл в ураженій тканині як типових КУБ, так і антигенів МБТ.

3. ИГХ дослідження додатково прояснює питання про характер і різну антигенну навантаження різних типів кліток макрофагального ряду, залучених до розвитку туберкульозного процесу. Ці дані корисні для більш глибокого розуміння патогенетичних особливостей хронічного перебігу туберкульозу легких і, зокрема, пояснення способів і шляхів його прогресування.

#### Перспективи дальніших досліджень.

Продовженням такого роду досліджень, ймовірно, можна вважати вивчення наявності, локалізації і розподілу в ураженій тканині як типових КУБ, так і антигенів МБТ при різній активності хронічного перебігу туберкульозу, а також в випадках різних форм–фаз легочного туберкульозу. Ці дані послужать об'єктивною основою для уточнення різних етапів патогенезу легочного туберкульозу.

#### Список літератури

- [1] Авербах М.М. Туберкулеми легкого / М.М. Авербах. – М.: Гос. изд-во мед. літератури, 1962. – 343 с.
- [2] ВІЛ-інфекція в Україні: інформаційний бюлетень. – 2016. – №46 / ДУ «Український центр контролю за соціально небезпечними хворобами Міністерства охорони здоров'я України».
- [3] Гістологічна діагностика ступеня активності туберкульозного запального процесу при туберкульозах легень: інформаційний лист / І.В. Ліска, С.Д. Кузовкова, С.О. Кравченко та ін. – К.: ДУ НІФП НАМН, 2010. – 4 с.
- [4] Рекалова О.М. Імунологічні методи діагностики туберкульозу / О.М. Рекалова, О.І. Білогорцева, Н.Г. Коваль // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2017. – №1. – С. 75–81.
- [5] Antibodies against mycobacterial proteins as biomarkers for HIV-associated smear-negative tuberculosis / M. Siev, D. Wilson, S. Kainth, et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2014. – Vol. 21. – №6. – P. 791–798.
- [6] Comparison of LuminU LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis / A. Trusov, R. Bumgarner, R. Valijev, et al. // International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2009. – Vol. 13. – №7. – P. 836–841.
- [7] D'Avila H. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections / H. D'Avila, C.M. Maya-Monteiro, P.T. Bozza // International Immunopharmacology. – 2008. – Vol. 8. – №10. – P. 1308–1315.
- [8] Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis / T. Mustafa, H.G. Wiker, S.G. Mfinanga, et al. // Modern Pathology. – 2006. – Vol. 19. – №12. – P. 1606–1614.

- [9] Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64 / M.R. Purohit, T. Mustafa, H.G. Wiker, et al. // Diagnostic Pathology. – 2007. – Vol. 2. – P. 36.
- [10] Global Tuberculosis Control: WHO Report [Електронний ресурс]: Global Tuberculosis Programme / World Health Organization, 2010. – Режим доступу: [http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/F530290AD0279399C12577D8003E9D65-Full\\_Report.pdf](http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/F530290AD0279399C12577D8003E9D65-Full_Report.pdf).
- [11] Guirado E. Macrophages in tuberculosis: friend or foe / E. Guirado, L.S. Schlesinger, G. Kaplan // Semin. Immunopathol. – 2013. – Vol. 35. – №5. – P. 563–583.
- [12] Histopathological findings in immunohistological staining of the granulomatous tissue reaction associated with tuberculosis [Електронний ресурс] / S. Karimi, M. Shamaei, M. Pourabdollah, et al. // Tuberculosis Research and Treatment. – 2014. – Vol. 2014. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/858396>.
- [13] Lawn S.D. Tuberculosis / S.D. Lawn, A.I. Zumla // Lancet. – 2011. – Vol. 378. – P. 57–72.
- [14] Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy / A. Somoskövi, J.E. Hotaling, M. Fitzgerald, et al. // Chest. – 2001. – Vol. 120. – №1. – P. 250–257.
- [15] Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative Mycobacterium tuberculosis organisms and their precise localization in human tissue / T. Ulrichs, M. Lefmann, M. Reich, et al. // J. Pathol. – 2005. – Vol. 205. – P. 633–640.
- [16] Pedersen J.S. Improved detection of mycobacteria species in formalin-fixed tissue sections / J.S. Pedersen, I. Clarke, J. Mills // Histopathology. – 2011. – Vol. 59. – №5. – P. 993–1005.
- [17] Ryu Y.J. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms / Y.J. Ryu // Tuberc. Respir. Dis. – 2015. – Vol. 78. – P. 64–71.
- [18] Spindle cell tumors associated with mycobacteria in lymph nodes of HIV-positive patients: 'Kaposi sarcoma with mycobacteria' and 'mycobacterial pseudotumor' / S. Logani, D.R. Lucas, J.D. Cheng, et al. // American Journal of Surgical Pathology. – 1999. – Vol. 23. – №6. – P. 656–661.
- [19] The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic / E.L. Corbett, C.J. Watt, N. Walker et al. // Archives of Internal Medicine. – 2003. – Vol. 163. – №9. – P. 1009–1021.

#### References

- [1] Averbakh, M. M. (1962). *Tuberkulomy legkogo*. [Pulmonary tuberculosis]. Moscow: Gos. izd-vo med. literatury [in Russian].
- [2] ДУ «Український центр контролю за соціально небезпечними хворобами Міністерства охорони здоров'я України» (2016) ВІЛ-інфекція в Україні. [HIV-infection in Ukraine]. *Informatsiyni biuleten*, 46. [in Ukrainian].
- [3] Liskina, I. V., Kuzovkova, S. D., Kravchenko, S. O., Zahaba, L. M., & Lukianchuk, V. H. (2010). *Histolohichna diahnozyka stupenia aktyvnosti tiberkuloznoho zapalnoho protsesu pry tiberkulomakh lehen* [Histological diagnostics of the activity degree of tuberculosis inflammatory process in pulmonary tuberculosis]. Kyiv. [in Ukrainian].
- [4] Rekalova, O. M., Belohortseva, O. I., & Koval, N. G. (2017). *Imunolohichni metody diahnozyky tiberkulozu* [Immunological methods of diagnosis of tuberculosis]. *Tuberkuloz, lehenevi khvoroby, VIL-infektsiia*, 1, 75–81. [in Ukrainian].
- [5] Siev, M., Wilson, D., Kainth, S., Kasprovicz, V. O., Feintuch, C. M., Jenny-Avital, E. R., & Achkar, J. M. (2014) Antibodies against mycobacterial proteins as biomarkers for HIV-associated smear-negative tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol*, 21(6):791-8. doi: 10.1128/CVI.00805-13.
- [6] Trusov, A., Bumgarner, R., Valijev, R., Chestnova, R., Talevski, S., Vragoterova, C., & Neeley, E. S. (2009) Comparison of LuminU LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(7), 836–41.
- [7] D'Avila, H., Maya-Monteiro, C. M., & Bozza, P. T. (2008) Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International Immunopharmacology*, 8(10):1308-15. doi: 10.1016/j.intimp.2008.01.035.
- [8] Mustafa, T., Wiker, H. G., Mfinanga, S. G., Mørkve, O., & Sviland, L. (2006). Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Modern Pathology*, 9(12), 1606–14. doi: 10.1038/modpathol.3800697.
- [9] Purohit, M. R., Mustafa, T., Wiker, H. G., Mørkve, O., & Sviland, L. (2007). Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64. *Diagnostic Pathology*, 2, 36. doi: 10.1186/1746-1596-2-36.
- [10] World Health Organization (2010) Global Tuberculosis Control: WHO Report. Geneva. Retrieved from [http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/F530290AD0279399C12577D8003E9D65-Full\\_Report.pdf](http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/F530290AD0279399C12577D8003E9D65-Full_Report.pdf).
- [11] Guirado, E., Schlesinger, L. S., & Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin. Immunopathol*, 35(5), 563–83. doi: 10.1007/s00281-013-0388-2.

- [12] Karimi, S., Shamaei, M., Pourabdollah, M., Sadr, M., Karbasi, M., Kiani, A., & Bahadori, M. (2014). Histopathological findings in immunohistological staining of the granulomatous tissue reaction associated with tuberculosis. *Tuberculosis Research and Treatment*, 2014. doi: 10.1155/2014/858396.
- [13] Lawn, S. D., & Zumla, A. I. (2011). Tuberculosis. *Lancet*, 378, 57–72.
- [14] Somoskövi, A., Hotaling, J. E., Fitzgerald, M., O'Donnell, D., Parsons, L. M., & Salfinger, M. (2001). Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest*, 120(1), 250–257. doi: 10.1378/chest.120.1.250.
- [15] Ulrichs, T., Lefmann, M., Reich, M., Morawietz, L., Roth, A., Brinkmann, V., et al. (2005). Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl–Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *Journal Pathology*, 205, 633–640. doi: 10.1002/path.1728.
- [16] Pedersen, J. S., Clarke, I., & Mills, J. (2011). Improved detection of mycobacteria species in formalin-fixed tissue sections. *Histopathology*, 59(5), 993–1005. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04015.x.
- [17] Ryu, Y. J. (2015). Diagnosis of pulmonary tuberculosis: recent advances and diagnostic algorithms. *Tuberculosis Respiratory Disease*, 78, 64–71. doi: 10.4046/trd.2015.78.2.64.
- [18] Logani, S., Lucas, D. R., Cheng, J. D., Ioachim, H. L., & Adsay, N. V. (1999). Spindle cell tumors associated with mycobacteria in lymph nodes of HIV-positive patients: 'Kaposi sarcoma with mycobacteria' and 'mycobacterial pseudotumor'. *American Journal of Surgical Pathology*, 23(6), 656–661.
- [19] Corbett, E. L., Watt, C. J., Walker, N., Maher, D., Williams, B. G., Ravigione, M. C., & Dye, C. (2003). The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of Internal Medicine*, 163(9), 1009–1021. doi: 10.1001/archinte.163.9.1009.

Zahaba L. M., MD, PhD, Researcher of the Laboratory of Pathomorphology, SI "National Institute of Phthysiology and Pulmonology named after F. G. Yanovsky of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Kuzovkova S. D., MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology, SI "National Institute of Phthysiology and Pulmonology named after F. G. Yanovsky of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Kuts V. V., Senior Researcher of the Department of Information and Computer Technologies, SI "National Institute of Phthysiology and Pulmonology named after F. G. Yanovsky of NAMS of Ukraine", Kyiv.

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 07.07.2017

Після доопрацювання / Revised: 18.09.2017

Прийнято до друку / Accepted: 29.09.2017

#### Сведения об авторах:

Лискина И. В., д-р мед. наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией патоморфологии, ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев.

Мельник О. А., младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев.

Загаба Л. М., канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев.

Кузовкова С. Д., канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии, ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев.

Куц В. В., старший научный сотрудник отдела информационно-компьютерных технологий, ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф. Г. Яновского НАМН Украины», г. Киев.

#### Відомості про авторів:

Ліскіна І. В., д-р мед. наук, старший науковий співробітник, зав. лабораторії патоморфології, ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського НАМН України», м. Київ.

Мельник О. О., молодший науковий співробітник лабораторії патоморфології, ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського НАМН України», м. Київ.

Загаба Л. М., канд. мед. наук, науковий співробітник лабораторії патоморфології, ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського НАМН України», м. Київ.

Кузовкова С. Д., канд. мед. наук, старший науковий співробітник лабораторії патоморфології, ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського НАМН України», м. Київ.

Куц В. В., старший науковий співробітник відділу інформаційно-комп'ютерних технологій, ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського НАМН України», м. Київ.

#### Information about authors:

Liskina I. V., MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Head of the Laboratory of Pathomorphology, SI "National Institute of Phthysiology and Pulmonology named after F. G. Yanovsky of NAMS of Ukraine", Kyiv.

Melnik O. A., Junior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology, SI "National Institute of Phthysiology and Pulmonology named after F. G. Yanovsky of NAMS of Ukraine", Kyiv.