

І. В. Ліскіна, О. О. Мельник, Л. М. Загаба, С. Д. Кузовкова
ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ АНТИГЕНІВ *M. TUBERCULOSIS*
ТА ВИЯВЛЕННЯ КСБ ЗА МЕТОДОМ ЦІЛЬ-НІЛЬСЕНА У ЛЕГЕНЕВІЙ
ТКАНИНІ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ТУБЕРКУЛЬОЗІ У ФОРМІ ТУБЕРКУЛЬОМИ
У ФАЗУ ЗАГОСТРЕННЯ

ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України"

Актуальність

Гістологічна діагностика ТБ залишається певною мірою дискусійним питанням в загальній діагностиці ТБ. З однієї сторони, позалегеновий ТБ, який зазвичай потребує патогістологічного дослідження, складає лише 10-15% від усіх випадків [6, 11], з іншої — поширення ВІЛ-інфекції призводить як до зростання кількості позалегенового ТБ, так і до атипового клінічного перебігу легеневого ТБ [2, 5, 14]. Враховуючи доведені обмеження рівнів чутливості та специфічності при забарвленні гістологічних зразків за Цілем-Нільсеном [16], необхідності визначення мікобактерій, реальних можливостей культуральних мікробіологічних досліджень та наявні молекулярні та серологічні технології [7, 13], гістоморфологічний аналіз залишається єдиним можливим методом діагностики ТБ лише в окремих пацієнтів [4, 9, 10, 12].

Гранульоматозні реакції, а в деяких випадках, і не гранульоматозні реакції, такі як скупченість пінистих макрофагів [3], мікобактеріальна псевдопухлина [8] є проявами власне туберкульозу лише тоді, коли присутність туберкульозних бактерій підтверджена в тканині. Нещодавні дослідження показали, що результати ПЛР також є прийнятними лише тоді, коли присутність *M. Tuberculosis* можливо підтвердити в ураженій тканині [17]. Виявлення ланцюжків з бацил, які частіше спостерігаються в некротичних вогнищах при фарбуванні зразків тканини за Цілем-Нільсеном [15], вказує на асоціацію тканинної реакції з туберкульозною інфекцією. Але забарвлення за Цілем-Нільсеном виказує відносно низьку чутливість щодо виявлення МБТ, діапазон позитивних знахідок становить 0–44 % [6]. Більш того, необхідна присутність мінімум 10^4 одиниць збудника у одному зразку (або в 1 мл) для встановлення діагнозу [17]. Враховуючи особливості механізму фарбування клітин та/або тканини за Цілем-Нільсеном та його відносно низьку чутливість й специфічність, зрозуміло, що цей метод має обмежену діагностичну цінність та не дає можливості патофізіологічної оцінки наявності МБТ антигенів в ураженій тканині.

Натепер виявлення антигенів МБТ із застосуванням імуногістохімічного (ІГХ) дослідження є досить добре розробленою технологією з її переважним застосуван-

ням в дослідницьких проектах. Базисом для таких досліджень стали відомості щодо продукції значної кількості поліклональних та моноклональних антитіл в специфічних тканинних реакціях за присутності бацил.

Наразі в джерелах літератури практично відсутні дані щодо присутності та розповсюдженості антигенів МБТ при тривалому хронічному перебігу легеневого туберкульозу, зокрема під впливом курсів хіміотерапії та за різної активності специфічного запального процесу.

Мета — провести порівняльний аналіз щодо експресії антигенів *M. Tuberculosis* та виявлення кислотостійких бактерій (КСБ) за гістохімічним методом Ціля-Нільсена у легеневій тканині з хронічним туберкульозним процесом у формі туберкульоми (Т) у фазу прогресування специфічного запалення.

Матеріали і методи дослідження

Матеріалом для гістологічного та ІГХ досліджень слугували резектати легень з Т від 19 хворих, яким було здійснене хірургічне лікування у клініці ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України". Морфологічно в усіх випадках був встановлений високий ступінь активності специфічного запалення. Морфологічне визначення ступеня активності специфічного запалення у легеневій тканині проводили за раніше розробленою робочою класифікацією [1]. З цією метою досліджували гістологічні препарати легеневої тканини, забарвлені за традиційною методикою гематоксилін-еозином.

Для кожного випадку готували по 3 серійні зрізи легеневої тканини з туберкульозом, товщиною 5–6 мікрон. Один забарвлювали за традиційною оглядовою методикою гематоксиліном і еозином, другий — за методом Ціль-Нільсена. Третій зріз готувався для ІГХ дослідження.

ІГХ дослідження проводилося на автостейнері AUTOSTAINER 360-2D виробництва компанії Thermo Fisher Scientific (США), для візуалізації продуктів гістохімічної реакції застосовували систему Ultra Vision Quanto HRP DAB. У роботі використане кроляче поліклональне антитіло *Mycobacterium tuberculosis* Antibody (PA1-7231); робоче розведення 1:2500, виробництва компанії Thermo Fisher Scientific (США).

Мікроскопічне дослідження проводили на мікроскопах OLYMPUS CX21 та OLYMPUS BX51. Робочі збільшення мікроскопу — $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$ та $\times 1000$. Малі збільшення ($\times 100$, $\times 200$) застосовували для визначення гістологічних структур легеневої тканини, які були наявні у зрізах, більш великі ($\times 400$, $\times 1000$) — для визначення характеру експресії антигенів мікобактерій та виявлення КСБ.

При гістологічному дослідженні спочатку за оглядовою методикою визначали ступінь активності специфічного запального процесу. Потім уточнювали наявність та локалізацію КСБ у легеневій тканині при її забарвленні за Ціль-Нільсеном. Була застосована наступна градація виявлених збудників (або кількості інфікованих макрофагів) в одному полі зору мікроскопа — мало, 1–5 одиниць; помірна кількість — 6–15 та багато — 15–25 одиниць. При ІГХ дослідженні визначали типи та відносну кількість клітин, в яких виявлялися антигени, їх позаклітинну присутність, а також оцінювали інтенсивність позитивної реакції (експресії) за умовно прийнятою робочою градацією: + — подібна до фонового забарвлення, блідо-жовте, дифузне; ++ — грудкова, переважно — дрібно-грудкова (світло-коричневого кольору); +++ — виразно грубо-грудкова (інтенсивно-коричневе забарвлення).

Мікрофотографії зрізів отримували з використанням фотокамери OLYMPUS DP73 з виводом їх на комп'ютер за допомогою програми CellSenc Standart.

Результати дослідження

При традиційному гістологічному дослідженні було уточнено, що в усіх випадках туберкульоз легенів мали місце морфологічні ознаки прогресування специфічного запального процесу.

Дослідження щодо виявлення типових паличкоподібних КСБ у легеневій тканині показало, що найчастіше вільно розміщені бацили спостерігалися у некротичному вмісті туберкульозу (16 випадків, 84,2 %) та грануляційному шарі капсули Т (13 випадків, 68,4 %). Окрім того, досить часто КСБ знаходили в альвеолярних просторах легеневої паренхіми поза Т (9 випадків, 47,4 %). Слід зазначити, що в більшості випадків спостерігали поодинокі бацили, лише в 3-х випадках виявлено помірну або значну кількість (6-25 одиниць в одному полі зору мікроскопа) типових КСБ. Також було встановлено, що значна кількість мікроорганізмів локалізувалася внутрішньоклітинно, а саме — у цитоплазмі макрофагів капсули туберкульозу та в макрофагах, що містилися в альвеолах біля туберкульозу — по 16 випадків, (84,2 % відповідно). В інших гістологічних структурах — фіброзному шарі туберкульозу, у вогнищах специфічної пневмонії біля Т, типових туберкульозних вогнищах, гранульомах такі спостереження складали від 2 до 7 випадків (10,5–36,8 %). Але, на відміну від вільно розташованих бацил, у більшості таких спостережень виявляли помірну кількість інфікованих клітин макрофагального ряду (6–15 клітин в 1 полі зору), а в 10 випадках виявляли багато чи дуже багато клітин (15–25 клітин у полі зору), тобто можна зробити припущення, що більшість збудників були фагоцитовані на момент проведення дослідження.

При ІГХ дослідженні щодо виявлення антигенів до МБТ було встановлено, що практично в усіх випадках були присутні клітини з виразною позитивною реакцією

(+++), на експресію антигенів МБТ. Найбільш часто це були макрофаги та епітеліоїдні клітини у грануляційному шарі Т, загалом 16 спостережень (84,2 %) та макрофаги, які скупчувалися в альвеолярних просторах біля туберкульозу (18 випадків, 94,7 %). Причому, частка спостережень значної кількості клітин з позитивною реакцією в грануляційному шарі складала від 43 до 50 %, а в альвеолах сягала 78 %. Мали місце поодинокі спостереження виразної позитивної реакції на наявність антигенів МБТ в некротичному вмісті Т, гігантських багатоядерних клітинах (ГК) грануляційного шару, у макрофагах та ГК гранульом, а також в епітеліоїдних клітинах вогнищ специфічної пневмонії та позаклітинно, на віддаленні від Т.

Помірно представлена позитивна реакція (++) щодо експресії антигенів МБТ також була добре представлена як у клітинах макрофагального ряду, так і поза клітинно, зокрема в некротичному вмісті Т (5 випадків, 26,3 %) та на віддаленні від Т, всередині альвеол (6 випадків, 31,6 %). У грануляційному шарі Т значна кількість спостережень такого рівня позитивної реакції була у макрофагах (10 випадків, 52,6 %). Значно частіше, порівняно до випадків клітин з виразною позитивністю, було спостережень епітеліоїдних клітин (13 випадків, 68,4 %) та ГК (7 випадків, 36,8 %). Поза структури Т найбільш часто виявляли позитивну реакцію (++) у макрофагах всередині альвеол (14 випадків, 73,7 %) та у вогнищах специфічної пневмонії (11 випадків, 57,9 %). Дещо рідше рівень експресії (++) спостерігали в епітеліоїдних клітинах, які входили до складу гранульом, відповідно 8 випадків (42,1 %).

Позитивна реакція на рівні (+) у клітинах різного типу та у позаклітинному ексудаті нами не враховувалася, оскільки вона відповідає фоновому забарвленню, що є характерною ознакою поліклональних антитіл, не виключення й таке до *M. Tuberculosis*.

Основні отримані результати представлені у вигляді діаграми на рис. 1.

Показники діаграми наочно демонструють наявність складних кореляційних зв'язків між кількістю бацил, які виявили у гістопрепаратах легеневої тканини, забарвленої за Ціль-Нільсеном, та виразною і помірною позитивною реакцією на антигени МБТ в ділянці казеозного некрозу, клітин грануляційного шару капсули та клітин-макрофагів з різною локалізацією при ІГХ дослідженні. Зокрема, визначається прямий взаємозв'язок між кількістю випадків з помірною позитивною реакцією клітин макрофагального ряду у поєднанні з кількістю випадків виявлення цілих паличкоподібних структур МБТ за антигенною представленістю, та кількістю спостережень бацил при забарвленні препаратів за Ціль-Нільсеном.

Висновки

У фазу прогресування специфічного туберкульозного запального процесу при туберкульозі легенів застосування гістохімічного методу забарвлення зрізів тканини за Ціль-Нільсеном дозволило виявити типові паличкоподібні КСБ у 18 (94,7 %) спостереженнях. ІГХ дослідження продемонструвало позитивну реакцію клітин макрофагального ряду та позаклітинні структури збудника щодо виявлення антигенів мікобактерій у всіх випадках (100 %).

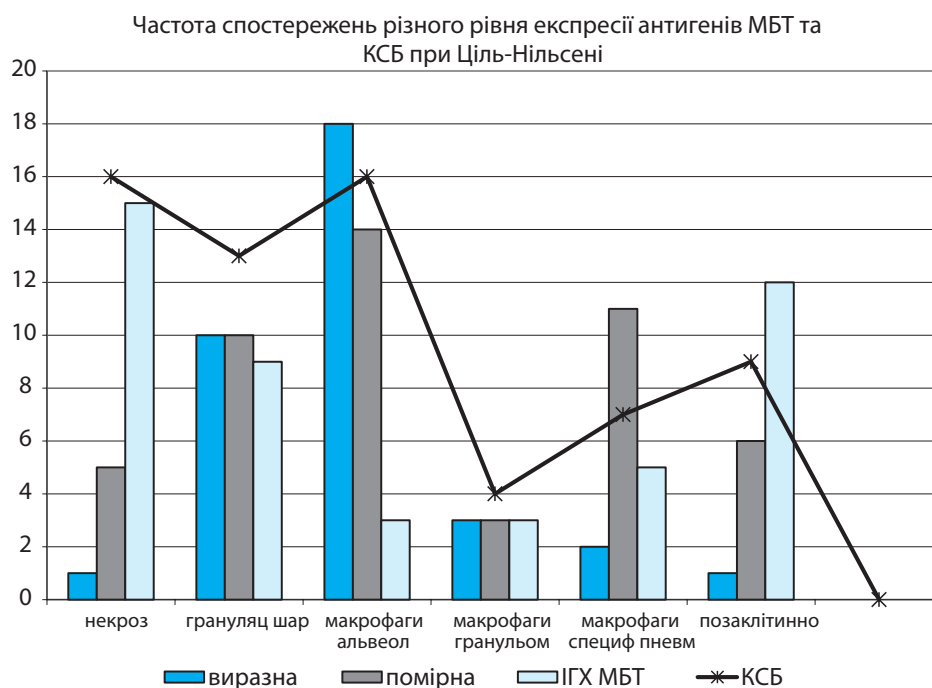


Рис. 1. Співвідношення частоти випадків з виявлення КСБ (#), цілих структур МБТ при ІГХ дослідженні та різного рівня експресії антигенів МБТ у клітинах та капсулі туберкульозу (стовпчики).

Встановлено, що порівняно значна та збізна між собою кількість випадків виявлення як КСБ, так і антигенів МБТ у клітинах макрофагального ряду при ІГХ дослідженні спостерігалася саме в грануляційному шарі капсули туберкульозу. До того ж, пов'язані між собою рівні частоти спостережень КСБ та цілих структур збудника, які спостерігали при ІГХ дослідженні, у таких ділянках легені — некротичному вмісті туберкульозу та в позаклітинних просторах поза туберкульозу.

Водночас, цілісні структури збудника, які виявляли при ІГХ дослідженні, вкрай рідко виявлялися у макрофагах альвеол, тоді як практично в усіх спостереженнях при цьому дослідженні спостерігали виразну та помірну позитивну реакцію (+++ — ++) макрофагів на експресію антигенів МБТ.

Отримані результати гістологічних досліджень з приводу виявлення КСБ у легеневій тканині з туберкульозом та скупчень антигенів МБТ в одних й тих самих випадках дають змогу зробити висновок про доцільність і переваги такого комплексного дослідження. Комплексний підхід забезпечує визначення не лише наявності та локалізації паличковидних КСБ, але й ділянок легеневої тканини з найбільшими скупченнями антигенів МБТ та кількості й типу клітин з антигенним навантаженням. Такі знання корисні для більш глибокого розуміння патогенезу хронічного перебігу легеневого туберкульозу, зокрема, при туберкульозах легенів у фазу прогресування специфічного запалення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гістологічна діагностика ступеня активності туберкульозного запального процесу при туберкульозах легень [Текст] : інформаційний лист / І. В. Ліска [та ін.] ; ДУ «Національний інститут фізіотерії і пульмонології». — Київ : ДУ НІФП НАМН, 2010. — 4 с.
2. Corbett E.L., Watt C.J., Walker N. et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic // Archives of Internal Medicine. — 2003. — Vol. 163, № 9. — P. 1009–1021.
3. D'Avila H., Maya-Monteiro C.M., and Bozza P.T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections // International Immunopharmacology. — 2008. — Vol. 8, № 10. — P. 1308–1315.
4. Goel M.M., Budhwar P. Immunohistochemical localization of Mycobacterium tuberculosis complex antigen with antibody to 38 kda antigen versus ziehl neelsen staining in tissue granulomas of extra-pulmonary tuberculosis // Indian J. Tuberc. — 2007. — Vol. 54. — P. 24–29.
5. G. T. Programme, Global Tuberculosis Control: WHO Report: Global Tuberculosis Programme / World Health Organization, 2010. — [Електронний ресурс].- Режим доступу: http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/F530290AD0279399C12577D8003E9D65-Full_Report.pdf.
6. Karimi S., Shamaei M., Pourabdollah M. et al. Histopathological findings in immunohistological staining of the granulomatous tissue reaction associated with tuberculosis // Tuberculosis Research and Treatment. — Vol. 2014. — Article ID 858396, 6 pages. — [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/858396>.
7. Lawn S.D., Zumla A.I. Tuberculosis // Lancet. — 2011. — Vol. 378. — P. 57–72.
8. Logani S., Lucas D.R., Cheng J.D. et al. 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. — 1999. — Vol. 23, № 6. — P. 656–661.
9. Mustafa T., Wiker H.G., S. G. M. Mfinanga S.G.M. et al. Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis // Modern Pathology. — 2006. — Vol. 19, № 12. — P. 1606–1614.
10. Mustafa T., Wiker H.G., O. Mørkve O. and Sviland L. Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non-tuberculous mycobacteria: role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response // Clinical and Experimental Immunology. — 2007. — Vol. 150. — P. 105–113.
11. Purohit M.R., Mustafa T., Wiker H.G., Mørkve O., and Sviland L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64 // Diagnostic Pathology. — 2007. — Vol. 2. — P. 36 — [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www.diagnosticpathology.org/content/2/1/36>.
12. Pedersen J. S., Clarke I., and Mills J. Improved detection of mycobacteria species in formalin-fixed tissue sections // Histopathology. — 2011. — Vol. 59, № 5. — P. 993–1005.
13. Ryu Y.J. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms // Tuberc. Respir. Dis. — 2015. — Vol. 78. — P. 64–71.
14. Siev M., Wilson D., Kainth S., et al. Antibodies against mycobacterial proteins as biomarkers for HIV-associated smear-negative tuberculosis // Clin. Vaccine Immunol. — 2014. — Vol. 21, № 6. — P. 791–798.
15. Somoskövi A., Hotaling J. E., Fitzgerald M. et al. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy // Chest. — 2001. — Vol. 120, № 1. — P. 250–257.
16. Trusov A., Bumgarner R., Valjev R. et al. Comparison of Lumin® LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis // International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. — 2009. — Vol. 13, № 7. — P. 836–841.
17. Ulrichs T., Lefmann M., Reich M. et al. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative Mycobacterium tuberculosis organisms and their precise localization in human tissue // J. Pathol. — 2005. — Vol. 205. — P. 633–640.