



І.В. Ліскіна

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології
імені Ф.Г. Яновського НАМН України», Київ

Діагностичні можливості імуногістохімічного дослідження в разі туберкульозного запального процесу

У статті проаналізовано стан гістологічної діагностики туберкульозного ураження різних тканин і органів людини, а саме: широкого впровадження в практичну медицину та наукові розробки імуногістохімічного методу дослідження, який дає змогу візуалізувати фрагменти або цілі структури мікобактерій за їхніми антигенами. Наведено дані про застосування низки специфічних антитіл до антигенів *M. tuberculosis* з описанням їхніх переваг та недоліків, а також можливі шляхи вдосконалення цього методу.

Ключові слова

Туберкульозний запальний процес, імуногістохімічне дослідження, антитіла до антигенів мікобактерій туберкульозу.

Туберкульоз (ТБ) залишається однією з найважливіших проблем здоров'я всього людства, оскільки щороку мільйони людей захворюють на цю недугу. Разом із інфекцією вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) він є головною причиною смерті в світі від інфекційних хвороб [13]. У 2014 р., за даними ВООЗ, зареєстровано 9,6 млн нових випадків захворювання на ТБ та 1,5 млн смертей від ТБ (1,1 млн ВІЛ-негативних та 0,4 млн ВІЛ-інфікованих). Кількість летальних наслідків від ТБ неприпустимо значна, оскільки наразі вважають, що вчасна діагностика та коректне лікування ТБ сприяють виліковуванню або ж досягненню стійкої ремісії хвороби практично в усіх випадках.

Загальне постаріння населення планети, а також зростання кількості випадків хіміорезистентного ТБ вимагають посилення заходів щодо поліпшення швидкої/своєчасної діагностики ТБ та продовження науково-практичних розробок у сфері діагностики ТБ з визначенням профілю хіміорезистентності збудника, удосконалення організаційних заходів для поліпшення ТБ-контролю [32].

У клінічній практиці швидка діагностика туберкульозного запалення часто зазнає труднощів, тобто питання раннього виявлення ТБ як за ураження легень, так і, особливо, позалегенового туберкульозного ураження до кінця не вирішене. У діагностиці ТБ одним із вирішальних кроків є своєчасне встановлення точного діагнозу активного ТБ легень (бактеріовиділення з харкотинням), оскільки від цього залежать як вчасне призначення адекватної протитуберкульозної терапії у конкретного хворого, так і контроль за ТБ у суспільстві, адекватне запровадження організаційно-профілактичних заходів щодо поширення хвороби серед населення.

Променева діагностика є інформативним, але неспецифічним методом дослідження при ТБ легень. Мало того, туберкульозне ураження може мати атиповий перебіг як за клінічною картиною, так й за рентгенологічними ознаками, що призводить до встановлення помилкового діагнозу, зокрема позагоспітальної пневмонії [20, 32].

Найпоширеніші в медичній практиці лабораторні дослідження за підозри на ТБ легень — бактеріоскопія харкотиння та культуральні мікробіологічні дослідження щодо виявлення мікобактерій туберкульозу (МБТ). Але тривалість традиційного культурального дослідження ста-

новить 2–6 тиж, а бактеріоскопія має досить низьку чутливість та низку обмежень. У останні роки активно впроваджують молекулярно-генетичні та імунологічні методи ранньої діагностики активного ТБ з або без визначення хіміорезистентності штамів МБТ [28]. Вважають, що одним із найдоказовіших методів виявлення мікобактерій наразі є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [4]. Та ці методи потребують вартісного специфічного обладнання, дорогих матеріалів та належної кваліфікації дослідника.

Комп'ютерна томографія органів грудної порожнини, гістопатологічне дослідження біопсійних зразків та нові молекулярні діагностичні тести мають безперечне значення для використання за раннього розвитку туберкульозної інфекції, в разі диференціальної діагностики — для уточнення діагнозу, зокрема у пацієнтів без бактеріовиділення та з позалегеневими формами ТБ.

Гістологічна діагностика ТБ залишається певною мірою дискусійним питанням у загальній діагностиці ТБ. З одного боку, позалегеневий ТБ, який зазвичай потребує патогістологічного дослідження, становить лише 10–15 % [18, 31], з іншого — поширення ВІЛ-інфекції призводить як до зростання кількості випадків позалегеневого ТБ, так і до атипового клінічного перебігу легеневого ТБ [9, 15, 34]. Ко-інфекція ВІЛ/ТБ, за сучасними даними [5, 40], охоплює до 50 % випадків позалегеневого ТБ. З огляду на обмеження рівнів чутливості та специфічності в разі забарвлення гістологічних зразків за Цілем—Нільсеном [38], потреби у визначенні мікобактерій, реальних можливостей культуральних мікробіологічних досліджень та наявні молекулярні та серологічні технології [21, 32] гістоморфологічний аналіз залишається єдиним можливим методом діагностики ТБ лише в окремих пацієнтів [14, 25, 26, 29].

Гранульоматозні реакції, а в деяких випадках і не гранульоматозні, такі як присутність пінистих макрофагів [10], мікобактеріальна псевдопухлина [22], є виявами власне туберкульозу лише тоді, коли присутність туберкульозних бактерій підтверджена в тканині. Нещодавні дослідження засвідчили, що результати ПЛР є прийнятними лише тоді, коли присутність *M. tuberculosis* можна підтвердити в ураженій тканині [39]. Виявлення ланцюжків із бацил, які частіше спостерігаються в некротичних осередках у разі фарбування зразків тканини за Цілем—Нільсеном [35], вказує на асоціацію тканинної реакції з туберкульозною інфекцією. Але забарвлення за Цілем—Нільсеном має відносно низьку чутливість щодо виявлення МБТ, діапазон позитивних знахідок становить 0–44 % [18].

Мало того, потрібно мінімум 10^4 одиниці збудника в одному зразку (або в 1 мл) для встановлення діагнозу [39]. З огляду на особливості механізму фарбування за Цілем—Нільсеном та його відносно низьку чутливість і специфічність, зрозуміло, що цей метод має обмежену діагностичну цінність та не дає можливості для патофізіологічної оцінки наявності МБТ-антигенів в ураженій тканині.

Нині виявлення антигенів МБТ із застосуванням імуногістохімічного (ІГХ) дослідження є досить добре розробленою технікою з її переважним застосуванням у дослідницьких проєктах. Базисом для них стали відомості щодо продукції значної кількості поліклональних та моноклональних антитіл у специфічних тканинних реакціях за присутності бацил.

Низка досліджень свідчить, що чутливість такого дослідження може становити від 64 до 100 % щодо виявлення МБТ у разі застосування різних специфічних антитіл до мікобактерій [12, 14, 30]. Наразі опубліковано (за результатами пошуку в електронній базі Національної медичної бібліотеки США, e-library.ru, інших російськомовних та вітчизняних медичних виданнях) відносно небагато досліджень щодо поглибленого аналізу різних гістологічних методів забарвлення тканини для виявлення МБТ [39]. Ці методи лише коротко згадують у посібниках або підручниках з патології, що не сприяє розробці стандартів морфологічної оцінки з позицій ІГХ різних гранульоматозних реакцій, зокрема й за туберкульозного ураження. Представлені лише поодинокі висновки щодо доцільності імуногістохімічного дослідження випадків малих розмірів біоптатів [30].

Важливим чинником у питанні діагностики туберкульозу з використанням ІГХ-дослідження є створення та вибір первинних антитіл для цього методу. Зрозуміло, що в перебігу туберкульозного процесу тривала персистенція МБТ призводить до розвитку численних патологічних клітинних і гуморальних імунологічних реакцій в ураженій тканині за участю багатьох різних власних антигенів МБТ — як соматичних, так і тих, які бацила продукує. Саме вибір специфічного та прийнятного для ІГХ-дослідження антигенного компонента МБТ з діагностичною метою досі є одним із головних завдань імунології та імуногістохімії туберкульозу, зокрема. В цьому аспекті примітна робота Т. Mustafa і співавторів. [24], у якій автори досліджували низку антигенів, які виробляє МБТ (МРТ32, МРТ44, МРТ46, МРТ51, МРТ53, МРТ59, МРТ63 та МРТ64) в процесі життєдіяльності, та її соматичні антигени (Mse1A, Hsp65 та МРТ57), вико-

ристовуючи поліклональні кролячі антитіла. Останні були отримані власноруч, з використанням штаму *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) архіву Національного інституту здоров'я (Японія). Матеріалом для дослідження слугували фрагменти тканини лімфатичних вузлів та легень людини, загалом 20 випадків туберкульозу, який спочатку було верифіковано за комплексом клінічних, мікробіологічних та гістологічних даних. Паралельно здійснювали рутинне забарвлення серійних зрізів за Цілем—Нільсеном та проводили гніздову ПЛР з парафінових блоків цих самих випадків. За результатами дослідження було зроблено кілька важливих висновків. Результати ПЛР в усіх випадках були позитивними, в разі забарвлення за Цілем—Нільсеном виявили значну кількість лише в легеневій тканині. Щодо результатів ІГХ дослідження, то було з'ясовано, що антигени, які виділяють МБТ у процесі життєдіяльності, по-різному представлені в різних органах і тканинах макроорганізму під час розвитку інфекції, тоді як соматичні антигени МБТ мають відносно однаковий тип експресії в різних тканинах. Окрім того, саме антиген МРТ64, який виробляє МБТ, виявляли в усіх випадках, хоча і з різним ступенем експресії. Ще одним важливим аспектом цього дослідження було виявлення фонового забарвлення у разі негативного контролю. Виразність забарвлення була слабкою та мала дифузний характер за локалізації в цитоплазмі клітин, а не гранулярний. Окрім того, інколи забарвлювалися ядра клітин, що є артефактом. Це також не враховували як позитивну реакцію.

Т. Mustafa і співавт. [25] для поліпшення гістологічної діагностики туберкульозних лімфаденітів проводили ІГХ-дослідження з використанням двох первинних антитіл — поліклонального anti-BCG (Dako) з розведенням 1 : 5000 та anti-MPT64 у розведенні 1 : 250. Останнє антитіло до антигену, який секретує МБТ, отримували власноруч за описаною методикою [27]. Суттєвою особливістю антигену МРТ64 є те, що його не виробляють нетуберкульозні мікобактерії, тобто цей маркер є специфічним саме для *M. tuberculosis*. ПЛР з ампліфікацією IS6110 з ДНК МБТ з матеріалу біопсій застосовували як золотий стандарт. Саме використання під час ІГХ дослідження зразків біопсій антитіла anti-MPT64 забезпечило чутливість методу на рівні 90 % і специфічність — 83 %. Результати застосування поліклонального anti-BCG були нижчими та визначалося фонове забарвлення. Збіжність результатів ПЛР і ІГХ-дослідження становила 87 % ($k = 0,73$). Таким чином, наразі одним із найвдаліших антитіл для діагностики

туберкульозу людини вважають anti-MPT64. Подібні результати отримано й у разі застосування anti-MPT64 в імуоцитохімічному дослідженні з діагностичною метою [37].

Мало того, антитіло до антигену МРТ64 та низку інших первинних антитіл застосовували для вивчення різного ступеня залучення протеїнів у розвиток запального процесу, зумовленого як туберкульозними, так і нетуберкульозними мікобактеріями [26]. Встановлено, що саме туберкульозні мікобактерії знижують рівень апоптозу та підвищують вміст запальних цитокінів у гранульомах порівняно з нетуберкульозними. Саме протеїн МРТ64 має значення для пригнічення апоптозу макрофагів у гранульомах. Тобто застосування комплексного ІГХ-дослідження дало змогу не тільки диференціювати збудника хвороби, а й уточнити механізми клітинної імунної відповіді в присутності різних мікобактерій.

Дослідження можливості різної морфології збудника туберкульозу в тканині вказують на важливість ІГХ-методу для дослідження різних морфологічних варіантів ТБ-антигенів в ураженій тканині.

Загалом опубліковані відомості з питання застосування ІГХ-дослідження в патоморфології можна розподілити на два основних напрями — практичний метод діагностики щодо МБТ в уражених тканинах з визначенням рівнів діагностичного стандарту (чутливість, специфічність та ефективність) та науково-практичний аспект, коли власне аналізують тканинну локалізацію, особливості виявлення (забарвлення) конкретного антигену або антигенів МБТ у світлі останніх відомостей щодо патогенезу туберкульозної інфекції в організмі людини, тобто з урахуванням гранульоматозних та негранульоматозних імунних клітинних реакцій на тканинному рівні.

С. Karimi і співавт. [18] порівнювали рівні чутливості та специфічності традиційного методу Ціля—Нільсена і ІГХ-дослідження з метою діагностики туберкульозу (на біопсійному матеріалі хворих — плеврі, лімфатичних вузлах та легеневій тканині), а також оцінювали значення правильного (адекватного) гістологічного аналізу результатів забарвлення тканини з гранульоматозним процесом при ІГХ-дослідженні з поліклональним антитілом rAbBCG (DAKO, code no. B 0124) до МБТ відносно власне діагностики, імулокалізації та морфології самого збудника туберкульозу в разі зазначеного методу дослідження. Вельми цінним результатом роботи є детальний опис та визначення особливостей виявлення МБТ-антигенів або часточок (фрагментів) збудника саме в разі застосування полікло-

нального антитіла, оскільки він більше або такий само чутливий, як і моноклональні антитіла, але менш специфічний, а його застосування часто супроводжується фоновим забарвленням [1]. Встановлено, що чутливість та специфічність виявлення МБТ у разі ІГХ-дослідження сягали 100 % за умови адекватного аналізу забарвлення клітин (переважно це були епітеліоїдні клітини з грубими грудками-включеннями в цитоплазмі) тканини зразка та виявлення фрагментів або округлих форм збудника, тоді як фоновим забарвленням вважали дрібнозернисте або дифузне неінтенсивне забарвлення цитоплазми клітин макрофагального ряду й рідини (за результатами контрольної групи). Автори наголошують на важливості адекватного розведення антитіла та ретельного дотримання технології ІГХ-дослідження задля правильної оцінки забарвлення обраним поліклональним антитілом до *M. tuberculosis*. У подібному дослідженні з використанням поліклонального антитіла рAbBCG [19] для діагностики позалегенового ТБ (лімфаденіти, ураження шкіри, травного каналу та хребта) було отримано високі показники чутливості (95,6 %) методу, але засвідчено досить невисоку його специфічність (35,1 %). Останній показник, ймовірно, пов'язаний саме з поліклональним характером застосованого антитіла.

У іншому дослідженні [39] також застосовували поліклональне антитіло рAbBCG (DAKO, Hamburg, Germany) у розведенні 1 : 300 для виявлення МБТ та їхніх структур у тканинах резектатів легень, біопсій плеври, лімфатичних вузлів, кісткового мозку та шкіри. Встановлювали локалізацію забарвлених мікобактеріальних антигенів. Останні виявлено в інфікованих макрофагах — як цілі бактерії, так і їхні часточки, а також помічено позаклітинні МБТ. Причому це були випадки, коли в серійних гістологічних зрізах, забарвлених за Цілем—Нільсеном, кислотостійкі палички (КСП) (МБТ) не виявлялися. Позитивна реакція на рAbBCG була верифікована додатковим застосуванням ПЛР-аналізу в цих випадках або ж культуральним мікробіологічним посівом з тканини цих самих випадків. Зроблено висновок про перевагу саме ІГХ-дослідження для встановлення точної локалізації патогену в ураженій тканині.

Для поліпшення діагностики такої поширеної форми позалегенового туберкульозу як периферичний лімфаденіт S. Sumi та V.V. Radhakrishnan [36] запропонували застосовувати низку поліклональних кролячих антитіл проти рекомбінантних мікобактеріальних протеїнів-ESAT-6, HspX, Tb8.4 та PlcA для ІГХ-дослідження. Зазначені антитіла є високоспецифічними саме

для *M. tuberculosis*, і вони мало представлені або їх не виробляють нетуберкульозні мікобактерії. Результати ІГХ-дослідження корелювали з результатами методу забарвлення за Цілем—Нільсеном. З'ясовано, що застосування антитіла anti-ESAT-6 забезпечило найвищу чутливість методу дослідження (88,6%), а найвищий рівень специфічності спостерігався в разі використання антитіл anti-ESAT-6 і anti-PlcA. Автори пропонують застосовувати anti-ESAT-6 для діагностики туберкульозного лімфаденіту, особливо у випадках, коли традиційні діагностичні методи неспроможні виявити МБТ.

У якості діагностичного підходу з науковим обґрунтуванням було застосовано три антитіла: anti-LTA4H, anti-PSME2 та anti-ATP6V1B2 [23], які обрали для ІГХ-дослідження за результатами інтегративного гено-протеїнового аналізу (генного аналізу та вивчення профілю низки найбільш представлених білків біоматеріалу) тканини лімфатичних вузлів людини. Туберкульозне ураження верифіковано за культуральними мікробіологічними дослідженнями щодо виявлення МБТ у цих випадках. Відомо, що три молекули — LTA4H, PSME2 та ATP6V1B2 — мають ключове значення під час розвитку запальної реакції, зокрема при туберкульозі. У різних тканинах організму можуть нагромаджуватися ці молекули або ж, навпаки, зменшуватися їхня кількість, що пов'язано з різним характером перебігу запального процесу. При туберкульозі лімфатичних вузлів під час ІГХ-дослідження з антитілами до цих білків виявили вкрай нерівномірне інтенсивне забарвлення тканини зразків порівняно з контролем, де не зауважено специфічної колориметричної реакції. Результати дослідження продемонстрували, що запальний процес у поєднанні з порушенням механізмів клітинної репарації (відновлення) є головними чинниками розвитку як туберкульозного ураження лімфатичних вузлів, так і легеневого туберкульозу, тоді як порушення метаболізму жирних кислот більше пов'язане саме з типом ураженої тканини.

З урахуванням можливості несправжньої позитивної реакції при ІГХ-дослідженні із застосуванням поліклональних антитіл до *M. tuberculosis* Y. Ihama і співавт. [16] застосовували моноклональне мишаче антитіло до 38-kDa антигену комплексу *M. tuberculosis* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, United States), яке забезпечило верифікацію діагнозу в 40 % спостережень порівняно з відповідними негативними результатами забарвлення за Цілем—Нільсеном зрізів цих же випадків біопсії кишечника. Дослідники також акцентували увагу на адекватній оцінці

отриманих зразків: позитивною вважали тканинну реакцію у вигляді досить інтенсивно забарвлених грубих грудочок-включень у цитоплазмі CD68⁺-клітин туберкульозних гранульом.

Як зазначали раніше, особлива потреба в гістологічній верифікації туберкульозу виникає у разі його позалегенової локалізації. В роботі [14] використовували мишаче моноклональне антитіло — *Mycobacterium tuberculosis* species-specific (MTSS) до 38kDa-антигену комплексу *M. tuberculosis* з метою діагностики туберкульозного ураження. Методом порівняння слугувала традиційна методика забарвлення зразків за Цілем—Нільсеном, а контролем — позитивно забарвлені тканинні зрізи за Цілем—Нільсеном верифікованих випадків легеневого туберкульозу. У якості негативного контролю були випадки нетуберкульозних уражень лімфатичних вузлів. Ефективність діагностики становила 36,11 % за рутинного фарбування та 100 % — у разі ІГХ-дослідження. Автори зауважили особливу цінність саме моноклонального антитіла до МБТ, яке значно підвищує специфічність цього методу діагностики.

В.М. Еллініді зі співавт. [4] застосовували моноклональне антитіло до МБТ (clone 1.1/3/1) фірми Novocastra (Велика Британія) з метою виявлення МБТ у біоптатах легень від 10 хворих на ФКТ легень. Причому в разі забарвлення за Цілем—Нільсеном тільки у 5 виявлено КСП. Додатково було ще 11 випадків з негативним результатом забарвлення за Цілем—Нільсеном — 10 легеневої тканини (проводили диференціальну діагностику саркоїдозу та туберкульозу легень) та 1 з ураженням шкіри (при генералізованому туберкульозі). Внаслідок застосування ІГХ-дослідження у 8 з 10 випадків ФКТ легень виявлено МБТ, а також уточнено наявність туберкульозного ураження шкіри і в 3 із 10 випадків диференціальної діагностики. Крім того, описано особливості локалізації структур збудника в легеневій тканині та їхню морфологію (наявність різних форм існування МБТ — як паличко-, так і кокоподібних). Автори зробили висновок про значне поліпшення гістологічної діагностики туберкульозу, зокрема його абацилярних форм, у разі застосування ІГХ-методу. Розроблено патент щодо способу діагностики туберкульозу за модифікованим імуноцитохімічним методом [2].

Представлено дослідження [3] з діагностики туберкульозу сечового міхура з використанням поліклонального антитіла до МБТ фірми Vector (розведення 1 : 5000). Автори зазначають, що традиційне гістологічне забарвлення гематоксиліном і еозином дало змогу виявити типові озна-

ки гранульоматозного процесу лише у 2 пацієнтів, причому після додаткового фарбування серійних зрізів за Цілем—Нільсеном КСП не виявляли, а з 19 випадків з морфологічними ознаками продуктивного запалення в 2 виявлено КСП. При ІГХ-дослідженні позитивна реакція на МБТ-антиген загалом отримана в 5 випадках: у 2 з типовими морфологічними ознаками туберкульозного процесу, у 2 з виявленими КСП у разі забарвлення за Цілем—Нільсеном та ще в одному випадку. Автори зробили висновок про вищу чутливість методу ІГХ для діагностики туберкульозу сечового міхура.

М.Р. Purohit та співавт. [31] проводили ІГХ-дослідження передусім для з'ясування його діагностичного значення, з поліклональними антитілами anti-BCG (ДАКО) та anti-MPT64 (отримували у власній лабораторії). Досліджували матеріал біопсій органів черевної порожнини та лімфатичних вузлів, тобто в разі позалегенового туберкульозу. Додатково застосовували метод забарвлення за Цілем—Нільсеном зрізів тканини, причому частину біопсійного матеріалу кожного випадку скерували для культурального мікробіологічного дослідження. Золотим стандартом слугували результати гніздової полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на виявлення ДНК МБТ з парафінових блоків групи дослідження. Отримані досить показові результати. Чутливість та специфічність застосованих антитіл — anti-BCG (ДАКО) та anti-MPT64 загалом становила 88 та 85 % для першого і 92 та 97 % для другого, тоді як КСП у разі забарвлення за Цілем—Нільсеном виявлено лише в 14 зі 153 випадків (9,2 %), а *M. tuberculosis* помічено в процесі культурального дослідження лише в 20,7 %. Тобто доведено безперечну діагностичну перевагу ІГХ-дослідження для встановлення діагнозу позалегенового туберкульозу. Додатковий аналіз паттерну забарвлення зразків засвідчив незначну перевагу anti-MPT64, зокрема щодо інтенсивності забарвлення.

ІГХ-дослідження доцільне і для диференціальної діагностики туберкульозу з іншими гранульоматозними захворюваннями легень. S-S. Du та співавт. [11] використали низку протеїнів — антилептинові антитіла та антитіла до внутрішньоклітинної молекули адгезії 1 (ICAM-1) — для диференціальної діагностики туберкульозу без бациловиділення і саркоїдозу легень. Водночас паралельно визначали ці ж самі речовини у сироватці крові цих же самих пацієнтів. Встановлено різні рівні концентрації протеїнів, які попередньо відібрали за методом RayBiotech Human Cytokine Antibody Array G Series 1000, як у сироватці крові (за методом ELISA), так і різ-

ний рівень позитивної реакції при ІГХ-дослідженні біопсійного матеріалу (легеневої тканини та лімфатичних вузлів). Використовували анти-лептинові антитіла фірми Abscam (Велика Британія) та анти-ІСАМ-1 антитіла Eritomics (США). Помічено однакове спрямування різних концентрацій протеїнів у сироватці та в разі забарвлення тканини біопсій, а саме: рівень позитивної еспресії обох протеїнів був значно вищим при саркоїдозі, що дало підстави авторам пропонувати ці маркери для диференціальної діагностики туберкульозу і саркоїдозу.

Ще одне антитіло до протеїну Ag85В, який виробляє МБТ, є специфічним та досить ефективним для застосування з діагностичною метою при ІГХ-дослідженні [7]. Перспективним методом можна вважати й спробу об'єднання забарвлення за Цілем—Нільсеном з ІГХ-дослідженням із застосуванням поліклонального кролячого антитіла Ag85В-rAb1, яке власноруч отримували в лабораторних умовах [8]. Запропонований метод передбачає першим кроком ІГХ-виявлення антитіла в тканині з подальшим забарвленням цього ж зрізу карбол-фуксином Ціля за звичайним протоколом. Результати дослідження легеневої тканини людини забезпечили підвищення ефективності діагностики від 34,4 % за рутинного забарвлення за Цілем—Нільсеном до 65,6 % у разі застосування нової гібридної методики (53,8 % результативності ІГХ-позитивних реакцій). Окрім того, встановлено, що локалізація найінтенсивніше забарвленого субстрату антигену МБТ тісно корелює зі скупченнями КСП у легеневій тканині. Автори також враховували можливість фонового забарвлення в разі застосування поліклонального антитіла, яке загалом відповідало описаному в інших наукових публікаціях.

Засвідчено корисність гістологічного імунофлуоресцентного методу діагностики за латентної форми легеневого туберкульозу. В експерименті застосовували первинне антитіло anti-MTB-biotin (GeneTex, США), що дало змогу візуалізувати поодинокі структури бацил у клітинному вмісті, тоді як паралельно зроблені зрізи тканини забарвлювали за класичним методом Ціля—Нільсена. У них не виявляли, та в процесі мікробіологічного дослідження мікобактерії не формували колоній [33]. Автори вважають, що візуалізація та підрахунок дормантних МБТ у клінічних зразках з використанням імунофлуоресцентного гістологічного методу можуть підвищити чутливість діагностики

ТБ та мати перспективи щодо застосування для визначення наслідків лікування. Цей метод використовували і в роботі [17] під час вивчення особливостей легеневої тканини за активного туберкульозу легень, зокрема різних клітинних типів туберкульозних гранулом. Застосовано антитіла до тимозину Т4 і HIF-1a, а також до VEGF, CD31, CD68 (США) у різних розведеннях. Результати досліджень дали змогу встановити особливі типи розподілу мічених протеїнів у разі специфічного запалення та висловити припущення щодо їхньої ролі саме у фазу активності запального процесу.

Таким чином, представлено результати досліджень останніх років щодо впровадження як у наукові розробки, так і в практичну лабораторну медицину ІГХ-методу з використанням низки антитіл до різних антигенних структур МБТ—як моноклональних, так і поліклональних. Доведено безперечну користь і цінність використання такого методу дослідження з діагностичною метою і для вирішення низки наукових питань: імуноморфології туберкульозу за ураження різних органів та тканин макроорганізму, вивчення особливостей патогенезу туберкульозної інфекції та загалом специфічного запального процесу тощо.

Головною «незручністю» імуногістохімічного дослідження є те, що ІГХ-зразки отримують лише під час інвазивних діагностичних процедур з біопсією тканини, до того ж потрібно проводити низку специфічних лабораторних маніпуляцій з використанням численних вартісних розчинів та реактивів протягом певного часу кваліфікованим дослідником [6]. Окрім того, в разі застосування, зокрема поліклональних первинних антитіл до МБТ, часто спостерігається перехресна реактивність з мікобактеріями інших видів, що знижує специфічність дослідження. Отже, виникає потреба у валідації результатів іншими діагностичними методами, найбільш прийнятними з яких наразі є гніздова ПЛР з парафінових блоків біопсії та забарвлення серійних зрізів за Цілем—Нільсеном.

Залишається невирішеним остаточно питання вибору найбільш специфічного й чутливого до штамів *M. tuberculosis humanus* антитіла, придатного для ІГХ-дослідження. Потребують подальшої розробки та впровадження модифіковані імуногістохімічні технології з метою уникнення фонового забарвлення та можливості несправжніх позитивних реакцій у контрольних випадках.

Конфлікту інтересів немає.

Список літератури

- Гильяров А.В. Теоретические основы иммуногистохимического метода исследований.— Режим доступа: <http://www.labpoint.ru> (labpoint.ru/upload/zagruzki/IGX_seminar.pdf).
- Пат. 2525428 Российская Федерация МПК8 G01N 33/53. Способ диагностики туберкулеза / Насыров Р.А., Боронина Т.А., Зварич Е.В. и др.; заявитель и патентообладатель ГУ «Санкт-Петербургский гос. педиатр. мед. университет» МЗ РФ.— № 2012147415/15; заявл. 07.11.12; опубл. 10.08.14. Бюл. № 22.— 9 с.
- Семенов С.А., Семенова Н.Ю., Чибиров К.Х. и др. Роль иммуногистохимического исследования в диагностике туберкулеза мочевого пузыря // Журн. инфектол.— 2014.— Т. 6, № 1.— С. 41—46.
- Эллиниди В.Н., Ариэль Б.М., Самусенко И.А., Туголукова Л.В. Иммуногистохимический метод в диагностике туберкулеза // Арх. патол.— 2007.— № 5.— С. 36—38.
- Ade S., Harries A.D., Trébucq A. National profile and treatment outcomes of patients with extrapulmonary tuberculosis in Bénin // PLoS One.— 2014.— Vol. 9, N 4.— P. e95603.— Режим доступа: doi:10.1371/journal.pone.0095603. e-Collection 2014.
- Bekmurzayeva A., Syapabekova M., Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis // Tuberculosis.— 2013.— Vol. 93.— P. 381—388.
- Che N., Qu Y., Zhang C. et al. Expression pattern of Mycobacterium tuberculosis Ag85B and its value in pathological diagnosis // Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.— 2014.— Vol. 43, N 9.— P. 600—603.
- Che N., Qu Y., Zhang C. et al. Double staining of bacilli and antigen Ag85B improves the accuracy of the pathological diagnosis of pulmonary tuberculosis // J. Clin. Pathol.— 2016.— Vol. 69 (7).— P. 600—606.— Doi:10.1136/jclinpath-2015-203244.
- 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, N 9.— P. 1009—1021.
- D'Avila H., Maya-Monteiro C.M., Bozza P.T. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections // International Immunopharmacology.— 2008.— Vol. 8, N 10.— P. 1308—1315.
- Du S.-S., Zhao M.-M., Zhang Y. et al. Screening for differentially expressed proteins relevant to the differential diagnosis of sarcoidosis and tuberculosis // PLoS ONE.— 2015.— Vol. 10 (9): e0132466.— Режим доступа: doi:10.1371/journal.pone.0132466.
- Furák J., Trójan I., Szóke T. et al. Histological and immunohistochemical structure of pulmonary tuberculous granulomas in untreated cases and cases treated with antitubercular drugs // Orvosi Hetilap.— 2003.— Vol. 144, N 27.— P. 1347—1352.
- Global Tuberculosis Report 2015 / 20th edition.— France: WHO Press, 2015.— 204 p.
- 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.
- G.T. Programme, Global Tuberculosis Control: WHO Report: Global Tuberculosis Programme / World Health Organization, 2010.— Режим доступа: http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/F530290AD0279399C12577D8003E9D65-Full_Report.pdf.
- Ihama Y., Hokama A., Hibiya K. et al. Diagnosis of intestinal tuberculosis using a monoclonal antibody to Mycobacterium tuberculosis // World J. Gastroenterol.— 2012.— Vol. 18, N 47.— P. 6974—6980.
- Kang Y.-J., Jo J.-O., Ock M.S. et al. Over-expression of thymosin β 4 in granulomatous lung tissue with active pulmonary tuberculosis // Tuberculosis.— 2014.— Vol. 94.— P. 323—331.
- 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.— Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/858396>.
- Kohli R., Punia R.S., Kaushik R. et al. Relative value of immunohistochemistry in detection of mycobacterial antigen in suspected cases of tuberculosis in tissue sections // Indian J. Pathology and Microbiology.— 2014.— Vol. 57, N 4.— P. 574—578.
- Krysl J., Korzeniewska-Kosela M., Muller N.L., FitzGerald J.M. Radiologic features of pulmonary tuberculosis: an assessment of 188 cases // Can. Assoc. Radiol. J.— 1994.— Vol. 45.— P. 101—107.
- Lawn S.D., Zumla A.I. Tuberculosis // Lancet.— 2011.— Vol. 378.— P. 57—72.
- 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» // Am. J. Surg. Pathol.— 1999.— Vol. 23, N 6.— P. 656—661.
- Maji A., Misra R., Mondal A.K. et al. Expression profiling of lymph nodes in tuberculosis patients reveal inflammatory milieu at site of infection.— 2015.— Режим доступа: www.nature.com/scientificreports/515214 | DOI: 10.1038/srep15214w.
- Mustafa T., Leversen N.A., Sviland L., Wiker H.G. Differential in vivo expression of mycobacterial antigens in Mycobacterium tuberculosis infected lungs and lymph node tissues // BMC. Infectious Diseases.— 2014.— Vol. 14.— P. 535—546.
- Mustafa T., Wiker H.G., 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, N 12.— P. 1606—1614.
- Mustafa T., Wiker H.G., Mørkve O., Sviland L. Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculosis compared to non-tuberculous mycobacteria: role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response // Clin. Exp. Immunol.— 2007.— Vol. 150.— P. 105—113.
- Nagai S., Wiker H.G., Harboe M. et al. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis // Infect. Immun.— 1991.— Vol. 59.— P. 372—382.
- Nyendak M.R., Lewinsohn D.A., Lewinsohn D.M. New Diagnostic Methods for Tuberculosis // Curr. Opin. Infect. Dis.— 2009.— Vol. 22, N 2.— P. 174—182.
- Pedersen J.S., Clarke I., Mills J. Improved detection of mycobacteria species in formalin-fixed tissue sections // Histopathology.— 2011.— Vol. 59, N 5.— P. 993—1005.
- Prapanna P., Srivastava R., Arora V.K. et al. Immunocytochemical detection of mycobacterial antigen in extrapulmonary tuberculosis // Diagn. Cytopathol.— 2014.— Vol. 42.— P. 391—395.
- Purohit M.R., Mustafa T., Wiker H.G. et al. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting Mycobacterium tuberculosis complex specific antigen MPT64 // Diagnostic Pathology.— 2007.— Vol. 2.— P. 36.— Режим доступа: <http://www.diagnosticpathology.org/content/2/1/36>.
- Ryu Y.J. Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Recent Advances and Diagnostic Algorithms // Tuberc. Respir. Dis.— 2015.— Vol. 78.— P. 64—71.
- Sabbian S., Eugenin E., Kaplan G. Detection of Mycobacterium tuberculosis in latently infected lungs by immunohistochemistry and confocal microscopy // J. Med. Microbiol.— 2014.— Vol. 63.— P. 1432—1435.
- 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, N 6.— P. 791—798.
- Somoskövi A., Hotaling J.E., Fitzgerald M. et al. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy // Chest.— 2001.— Vol. 120, N 1.— P. 250—257.
- Sumi S., Radhakrishnan V.V. Evaluation of immunohistochemistry with a panel of antibodies against recombinant mycobacterial antigens for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis // International Journal of Medicine and Medical Sciences.— 2009.— Vol. 1, N 5.— P. 215—219.
- Tadele A., Beyene D., Hussein J. et al. Immunocytochemical detection of Mycobacterium Tuberculosis complex specific

- antigen, MPT64, improves diagnosis of tuberculous lymphadenitis and tuberculous pleuritis // BMC Infectious Diseases.— 2014.— Vol. 14.— P. 585 (9 p.).— Режим доступу: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/585>.
38. Trusov A., Bumgarner R., Valijev R. et al. Comparison of LuminU LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis // Int. J. Tuber. Lung Dis.— 2009.— Vol. 13, N 7.— P. 836–841.
39. 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.
40. Zielonka T.M. Risk factors for tuberculosis and specific manifestations of disease // Przegl. Epidemiol.— 2014.— Vol. 68.— P. 637–643.

И.В. Лискина

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

Диагностические возможности иммуногистохимического исследования при туберкулезном воспалительном процессе

В статье представлен анализ состояния гистологической диагностики туберкулезного поражения различных тканей и органов человека, а именно: широкого внедрения в практическую медицину и научные разработки иммуногистохимического метода исследования, который позволяет визуализировать фрагменты или целые структуры микобактерий по их антигенам. Приведены данные об использовании ряда специфических антител к антигенам *M. tuberculosis* с описанием их преимуществ и недостатков, а также возможные пути усовершенствования этого метода.

Ключевые слова: туберкулезный воспалительный процесс, иммуногистохимическое исследование, антитела к антигенам микобактерий туберкулеза.

I.V. Liskina

SI «National Institute of Phthisiology and Pulmonology named after F.G. Yanovsky of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Diagnostic possibilities of the immunohistochemistry at tuberculosis inflammatory process

The article presents an analysis of the current state of the histological diagnosis of tuberculous lesions of various human tissues and organs — namely the widespread introduction in practical medicine and scientific research studies of the immunohistochemical method, which allows you to visualize fragments or whole structure of mycobacteria by their antigens. The data on the use of a number of specific antibodies to the antigens of *M. Tuberculosis* are shown, describing their advantages and disadvantages, as well as possible ways to further improving of this method.

Key words: tuberculosis inflammation, immunohistochemistry, antibodies to the antigens of the MTB.

Контактна інформація:

Ліскіна Ірина Валентинівна, д. мед. н., зав. лабораторії патоморфології
03680, м. Київ, вул. М. Амосова, 10
Тел. (044) 275-55-11
E-mail: liskina@ifp.kiev.ua

Стаття надійшла до редакції 26 травня 2016 р.