

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

Державна установа “Національний інститут фізичної та пульмонології ім. Ф. Г. Яновського
НАМН України”, 03680 Київ

ГІСТОБАКТЕРІОСКОПІЯ РЕЗЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ У МОРФОЛОГІЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНЬ

(Представлено акад. НАМН України Ю. І. Феценком)

Розглянуто значення та місце гістобактеріоскопії резекційного матеріалу, а також перспективи імуногістохімічного дослідження у діагностиці туберкульозного процесу. Наведені власні результати гістобактеріоскопічного дослідження з виявлення мікобактерій туберкульозу в резекційному матеріалі легеневої тканини на базі 50 випадків з наявністю туберкульозу та з фіброзно-кавернозним туберкульозом. Використання при гістобактеріоскопії двох гістохімічних методів забарвлення — традиційного за Цілем — Нільсеном та флуоресцентного із застосуванням *Kit “Tb-Fluor”* — підвищило рівень виявлення мікобактерій в легеневій тканині при туберкульозах до 76,0 %, а при фіброзно-кавернозному туберкульозі — до 100 % випадків. Показано достовірно вищу ефективність комплексної гістобактеріоскопії порівняно з традиційним мікробіологічним дослідженням харкотиння та операційного матеріалу. Поеднане застосування обох методів забарвлення для прямого гістологічного виявлення кислотостійких бактерій забезпечило отримання додаткової інформації щодо локалізації та кількісної представленості збудника в легеневій тканині.

Ключові слова: гістобактеріоскопія, мікобактерії туберкульозу, туберкульоз легень.

Сучасний стан діагностики туберкульозу легень.

Згідно з визначенням ВООЗ, основною складовою частиною сучасної всесвітньої програми боротьби з туберкульозом (ТБ) є бактеріологічне підтвердження наявності *M. tuberculosis* та визначення лікарської стійкості до препаратів у збудника [20]. Відповідно до рекомендацій ВООЗ, в останньому Уніфікованому клінічному протоколі медичної допомоги дорослим, хворим на ТБ, прийнятому в Україні в 2014 році, діагноз цього захворювання в осіб з підозрою на нього далі підтверджують (скасовують) у спеціалізованих протитуберкульозних закладах (спеціалізованих структурних підрозділах закладів охорони здоров'я) вторинної/третинної медичної допомоги на підставі лабораторних даних (позитивний результат мікроскопії мазка мокротиння на кислотостійкі

бактерії (КСБ), культурального дослідження, молекулярно-генетичних методів), клінічних симптомів та/або рентгенологічних, та/або морфологічних даних (біопсія ураженого органа) [10]. Наразі в Україні для контролю лікування й оцінювання остаточного його результату у хворих на ТБ також широко використовують мікроскопічне і бактеріологічне дослідження мокротиння [14, 15].

Точна та швидка діагностика ТБ є принциповим моментом для визначення належного клінічного підходу та проведення заходів інфекційного контролю. Але, незважаючи на те що за останні 10-15 років з'явилося багато нових та удосконалених методів діагностики ТБ, багато країн у повсякденній практиці продовжують використовувати ту саму мікроскопію мазка мокротиння, якою користувалися ще 100 років тому. Зазначена ситуація зумовлює

Лабораторія патоморфології

І. В. Ліскіна — зав. лаб., д.м.н. (liskina@ifp.kiev.ua)

С. Д. Кузовкова — с.н.с., к.м.н.

Л. М. Загаба — н.с., к.м.н.

О. О. Мельник — м.н.с.

© І. В. Ліскіна, С. Д. Кузовкова, Л. М. Загаба, О. О. Мельник, 2015.

постійний моніторинг та порівняльний аналіз загальновідомих методів і нових розробок у галузі діагностики для ефективної боротьби з ТБ [12].

Натепер при мікробіологічному дослідженні впроваджується група методів, заснованих на фенотипових особливостях мікобактерій, що дають змогу отримати “експрес-результат” шляхом використання різних технологій для виявлення ранніх ознак росту або життєдіяльності мікобактерій: виміру метаболізму за допомогою кольорових індикаторів, визначення споживання кисню. Для цього розроблені системи експрес-виявлення росту мікобактерій — *MGIT*, радіометрична система *BACTEC TB-460* та інноваційна, повністю автоматизована система культивування мікобактерій *BACTEC MGIT 960* із флуоресцентним принципом детекції росту мікроорганізмів [4].

Застосовуються також немалекулярні індикаторні методи, які базуються на здатності мікобактерій туберкульозу (МБТ) підтримувати ріст бактеріофагів (віруси, які інфікують МБТ); кількість останніх залежить від кількості життєздатних МБТ — тест-система *FastPlaque* (Великобританія). Поширилося використання методів імунодіагностики діагностика ТБ в біологічних рідинах організму з використанням поліклональних чи моноклональних антитіл до антигенів *M. tuberculosis*, імуноферментний аналіз з визначенням рівня у сироватці крові антиген-специфічного інтерферону- γ , визначення у зразках мокротиння антитіл до антигенів міколітичної кислоти, тести з визначення інтерферону- γ , що вивільнився із сенсibilізованих Т-клітин після стимулювання антигенами МБТ з використанням комерційних наборів *QuantiFERON-TB Gold In-Tube* (Австралія), а також імуноферментних плям — *T-SPOT-TB* та *ELISpot* (Великобританія) [26]. У 1998 р. був повністю розшифрований геном МБТ. Це дозволило виділити специфічні для цього геному нуклеотидні послідовності ДНК, які використовуються при виявленні збудника туберкульозу методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в різних видах біологічного матеріалу. Наразі, згідно з рекомендаціями ВОЗ, запропоновано два методи молекулярної діагностики, які можуть бути використані для вирішення питання своєчасної діагностики ТБ — технологія ДНК-стріпів та *GeneXpert* [3, 18, 32, 37].

Що стосується випадків хірургічного лікування ТБ легень, то вкрай важливим є не лише мікробіологічна, імуноферментна чи молекулярно-біологічна діагностика ТБ, але й гістобактеріоскопічне дослідження видалених фрагментів або цілої легені з метою виявлення мікроорганізмів [16] та, у перспективі, — імуногістохімічні дослідження з виявлення антигенів МБТ в тканинах, оскільки во-

ни дозволяють уточнити фазу активності захворювання та біологічні особливості його перебігу.

Загалом гістологічна діагностика ТБ охоплює різні аспекти. Перш за все, це загальна оцінка характеру тканинних реакцій, які при ТБ можуть бути вкрай різноманітними — від розвитку гостро-некротичних осередків до формування обмежених невеликих форм з переважно параспецифічними тканинними реакціями; при цьому може спостерігатися надмірний розвиток волокнистої сполучної тканини з фіброзними та циротичними змінами легеневої тканини, тощо. Принципове значення має морфологічне визначення такої головної відмінної риси мікобактеріальної інфекції, як формування типових туберкульозних гранул — компактно організованих скупчень імунних клітин, які містять інфіковані (пінисті) та неінфіковані макрофаги, епітеліодні клітини, гігантські багатоядерні макрофаги, що оточені шаром лімфоцитів.

Гістологічна діагностика ТБ включає і гістобактеріоскопію — метод мікроскопічного виявлення мікроорганізмів у тканині із застосуванням селективних барвників. По-перше, гістобактеріоскопія, базуючись на специфічних гістохімічних методах, забезпечує пряме виявлення структур кислотостійких бактерій (КСБ) у тканині, по-друге — надає змогу визначення точної локалізації КСБ в контексті гранульоматозного ураження і, по-третє, дозволяє більш чітко встановити фазу активності перебігу захворювання з урахуванням розповсюдженості бактерій в тканині, їх біологічних форм та загальноприйнятих морфологічних ознак ступеня активності гранульоматозного запалення. Таким чином, виявлення навіть незначної кількості КСБ у гістологічних препаратах має істотне значення як для найближчого прогнозу характеру перебігу специфічного запалення, так і щодо можливості подальшої корекції хімотерапії.

Аналіз сучасних публікацій з діагностики ТБ показує, що метод гістобактеріоскопії використовується вкрай недостатньо і тому в наявній літературі представлені лише фрагментовані поодинокі відомості щодо локалізації МБТ в легеневій тканині, їх кількісного розподілу, особливо з урахуванням форми легеневого ТБ. Недостатньо вивчене значення окремих мікобактеріальних компонентів (антигенів) при тривалому розвитку туберкульозної інфекції. Ми не знайшли сучасних даних щодо питання особливостей локалізації МБТ в легеневій тканині, їх морфології та кількісного розподілу на фоні тривалої протитуберкульозної терапії.

Актуальність гістобактеріоскопії. Поширено уявлення, що в осіб з позитивною туберкуліновою

шкірною пробою без клінічних ознак захворювання МБТ можуть виживати в макроорганізмі в неактивному або латентному стані в певних структурах, але цей факт ніколи не був доведений. Застосування ПЛР дозволило встановити наявність життєздатних МБТ у легеневій тканині, причому локалізація таких мікобактерій не була пов'язана з гранульомами, запально-клітинними інфільтратами або фіброзними утвореннями. Ці результати ставлять під сумнів традиційне припущення, що латентні МБТ зберігаються переважно, якщо не виключно, в ізольованих грануломатозних вогнищах в різних тканинах організму [25].

У той же час, *T. Ulrichs* та співавт. [40] відзначають, що, незважаючи на те що ПЛР характеризується високою діагностичною чутливістю, вона не дозволяє визначити топографо-анатомічну локалізацію МБТ в тканинах або стадію захворювання. Окрім того встановлено, що результати ПЛР можуть бути хибно-позитивними.

Довготривале персистенування мікроорганізмів у макроорганізмі хазяїна може призводити до змін їх властивостей. Може відбуватися посилення чи послаблення вірулентності мікроорганізмів, що супроводжується зміною будови бактерії (її морфології), яку можна визначити, зокрема при гістобактеріоскопічному дослідженні [9].

Тривалість і вираженість туберкульозного запального процесу, особливості його перебігу тісно пов'язані з кількістю та біологічними властивостями, притаманними збуднику. Ці факти також зумовлюють актуальність та доцільність вивчення наявності і кількісного розподілу в різних морфологічних структурах легень МБТ при різних формах легеневого ТБ.

За даними літератури, рутинний гістологічний метод визначення КСБ за Цілем — Нільсеном є позитивним приблизно в одній третині випадків з мікробіологічно підтвердженою туберкульозною інфекцією, тому зазвичай діагностика ТБ у зрізах тканин обов'язково включає традиційну гістологічну оцінку особливостей картини грануломатозного запалення [31]. Приблизно такий же рівень діагностичної специфічності має аураміно-родамінний флуоресцентний метод виявлення КСБ, але було відзначено, що його чутливість в середньому на 10 % більша, ніж методу Ціля — Нільсена [23, 36].

Взагалі багатьма авторами відзначається, що флуоресцентний метод визначення мікобактерій є більш чутливим, ніж традиційне забарвлення за методом Ціля — Нільсена [17, 29, 40]. Це пов'язано з тим, що люмінесцентна мікроскопія заснована на тому, що спеціальні барвники (аурамін, родамін та ін.) поєднуються з воскоподібними

структурами *M. tuberculosis* і мікроорганізми, що таким чином забарвлюються, починають світитися оранжовим, яскраво червоним чи зеленим світлом на чорному чи темно-зеленому фоні при їх опроміненні ультрафіолетовим світлом у певному діапазоні спектра. Ореол, що утворюється за рахунок виблискування, збільшує видимі розміри клітин, тому люмінесцентна мікроскопія проводиться при робочому збільшенні мікроскопу $\times 200-400$, що поширює поле зору і істотно скорочує час, який необхідний для вивчення мазка/зрізу тканини порівняно з методом Ціля — Нільсена, який потребує збільшення $\times 1000$. Пошук мікобактерій в тканинах при флуоресцентному методі полегшує також висока різкість і контрастність картини, що особливо важливо при дослідженні олігобактеріального матеріалу [2]. Але застосування цього методу в гістобактеріоскопії має і недоліки, до яких належить прихованість архітекtonіки тканин після контрастування препаратів [24].

Ось чому можна вважати доцільним комплексне використання двох і більше методів прямого виявлення кислотостійких мікобактерій в тканині легень при поглибленому їх дослідженні. Зокрема, досить вдалим є використання традиційної методики Ціля — Нільсена та аураміно-родамінного флуоресцентного методу забарвлення гістологічних зрізів.

Діагностика туберкульозу в резектатах легень. З вітчизняних публікацій щодо ефективності та доцільності хірургічного лікування ТБ легень відомо, що такому виду лікування підлягають хворі переважно з фіброзно-кавернозним туберкульозом (ФКТ) та туберкульомами (Т), тобто з тривало існуючим хронічним запальним процесом. Зокрема, наводяться дані, що переважна кількість (57,6 % випадків) оперативних втручань виконується з приводу Т та дещо менше (32,0 % випадків) — з приводу ФКТ легень [7]. У хворих на ТБ органів дихання з медикаментозно резистентними штамми мікобактерій переважають оперативні втручання у хворих із ФКТ — від 57,1 % до 70,1 %, а з Т — від 9,4 % до 18,5 % випадків [11, 13]. Слід нагадати, що така форма вторинного ТБ легень, як ФКТ, коли вона ускладнена розвитком вогнищ типу казеозної пневмонії, чітко окреслена у якості варіанту гостро-прогресуючого ТБ легень. Т легень при прогресуванні специфічного запалення може трансформуватися в казеозну пневмонію або ж спочатку в інфільтративну форму ТБ та при подальшому прогресуванні — також у казеозну пневмонію. Згідно з результатами недавніх досліджень, встановлено, що у середньому при хірургічному лікуванні Т легень у 19,7 % випадків, а при ФКТ легень у 47,5 %

випадків оперативних втручань морфологічно визначається високий ступінь активності специфічного процесу [7]. Цей факт свідчить про значну питому вагу випадків легеневого ТБ з тривалим прогресуючим розвитком, незважаючи на інтенсивні курси протитуберкульозної хіміотерапії, які зазвичай отримують хворі до призначення їм хірургічного лікування.

При проведенні мікробіологічного дослідження харкотиння та/чи операційного матеріалу серед пацієнтів з Т легень МБТ були виявлені у 22,8 % випадків, а при наявності розпаду в Т частота виявлення МБТ зростає до 34,2 % випадків. Також було встановлено, що при морфологічно низькому ступені активності специфічного запалення частота виявлення МБТ достовірно нижча, ніж при високому і помірному ступенях активності запального процесу [6]. За результатами дослідження мазків мокротиння, у пацієнтів з медикаментозно резистентними штамми МБТ та ТБ легень у формі Т та ФКТ частота бактеріовиділення на момент оперативного втручання сягала 70,1 % випадків [13].

Окрім того було встановлено, що за результатами мікробіологічного дослідження харкотиння та операційного матеріалу, МБТ вірогідно частіше виявлялись у випадках ФКТ легень — $(83,0 \pm 5,5) \%$ — порівняно з Т легень — $(28,6 \pm 7,6) \%$ [7].

Перспективи імуногістохімічного виявлення мікобактерій в тканинах. Незважаючи на повсюдне застосування класичних гістохімічних методів виявлення МБТ, які були розроблені досить давно, постійно проводиться наукова робота щодо удосконалення діагностичних методик, у тому числі гістологічних. Зокрема, наявне сучасне дослідження щодо застосування та порівняння результативності трьох різних гістологічних методів виявлення МБТ з метою діагностики ТБ в легеневій тканині великої рогатої худоби: забарвлення за Цілем — Нільсеном, аурамін/родаміновий флуоресцентний метод та імуногістохімічний (ІГХ) метод з використанням поліклональних антитіл до *M. bovis*. В результаті було встановлено, що ІГХ метод є найбільш чутливим та результативним і дає змогу виявити найбільшу кількість випадків МБТ-позитивних тварин [39].

При вивченні екстрапульмонального ТБ *M. M. Goel* та співавт. [21] показали, що у 100 % випробувань зразки уражених тканин мали позитивну реакцію на ТБ при ІГХ фарбуванні; *A. T. Ince* та співавт. [28] показали, що метод ІГХ при діагностиці інтестинального ТБ має показник діагностичної чутливості на рівні 73 % та специфічності — 93 %. Інші дослідники при застосуванні ІГХ методу отримали позитивний результат у 100 %

випадків, причому ІГХ забарвлення було у вигляді гранул, тому що забарвлювалися і фрагменти та уламки бацил, тоді як паралельне забарвлення серійних зрізів цих же зразків за методом Ціля — Нільсена показало негативний результат, що, як вважають дослідники, пов'язано з тим, що при застосуванні останнього метода забарвлюються тільки неушкоджені, інтактні бацили [27].

Важливе значення у диференційній діагностиці *M. tuberculosis*, особливо з нетуберкульозними мікобактеріями в тканинах, отримало ІГХ дослідження з використанням антитіл до антигену МРТ64, присутнього лише в *M. tuberculosis*. Використання високоспецифічних моноклональних антитіл до МРТ64 антигену МБТ робить цей метод надійним і швидким для діагностики, зокрема екстрапульмонального ТБ [34]. Доведено, що імуногістохімічне вивчення тканин з використанням поліклональних антитіл до МБТ з метою постановки діагнозу ТБ може призводити до хибно-позитивних результатів, тоді як більша точність може бути отримана при використанні видоспецифічних моноклональних антитіл до 38-кДа комплексу антигенів *M. tuberculosis* [27]. В останньому цитованому дослідженні також було показано, що антигени МБТ виявляються в цитоплазмі $CD68^+$ макрофагів; у тканині можна визначити не тільки інтактні бацили, але і їх фрагменти або навіть найдрібніші часточки (клітинний детрит) мікобактерій.

Таким чином, при дослідженні особливостей КСБ у легеневій тканині безумовно перспективним є застосування імуногістохімічного методу ідентифікації мікобактеріальних антигенів, оскільки він дає змогу детально та об'єктивно виявити їх у різних клітинах (ендотеліальні клітини, фібробласти, плазматичні клітини, лімфоцити і макрофаги) уражених ТБ тканин [31].

Наразі встановлено, що при первинному інфікуванні та розвитку специфічної реакції в легенях в перший тиждень біля 50 % альвеолярних макрофагів містять МБТ, тоді як при вторинному інфікуванні більшість бактерій швидко руйнується сенсibiliзованими тканинними імуноцитами, а інтактні мікобактерії містять лише 3 % альвеолярних макрофагів [35]. Застосування нових методів дослідження при вивченні інфікованих макрофагів (у тому числі наявності в них структур МБТ) поглибило знання щодо ролі цих клітин легеневої тканини у розвитку мікобактеріальної інфекції. Було встановлено, що апоптоз пінистих макрофагів, що містять фаголізосоми з МБТ, призводить до одночасної загибелі мікобактерій, тоді як некроз макрофагів вивільняє життєздатні МБТ, сприяє руйнуванню тканин і розповсюдженню інфекції [33]. Також було показано, що частина пінистих

макрофагів, які входять до складу гранульоми, втрачає свою фагоцитарну та бактерицидну активність, що дозволяє присутнім в них МБТ персистувати у дормантному стані, а ліпідні включення цих клітин слугують джерелом живлення МБТ [19].

Вищенаведені відомості стали передумовою щодо подальшого вивчення локалізації та кількості інфікованих макрофагів у легеневої тканині при вторинному ТБ, в тому числі у формах ФКТ та Т легень.

Метою нашого дослідження було визначення ефективності гістобактеріоскопії при Т і ФКТ легень з морфологічними ознаками прогресування специфічного запалення.

Матеріал та методи. Досліджували резектати легень з наявністю Т (25 випадків), ФКТ (25 випадків) та з морфологічно визначеним високим ступенем активності туберкульозного запалення. Пряме виявлення *M. tuberculosis* та особливості локалізації збудника в легеневої тканині проводили, застосовуючи два гістохімічні методи: метод Ціля — Нільсена для гістологічних зрізів [5] та флуоресцентний (аураміні-родаміновий) метод виявлення МБТ у зразках тканини з використанням набору реагентів *kit "Tb-fluor"* (MERCK, Німеччина) [22]. Дослідження проводили на серійних зрізах окремих ділянок легеневої тканини. Вивчали ділянки внутрішнього вмісту хронічної каверни та капсули Т, перифокальні ділянки до каверни чи Т та на віддалені від каверни чи Т, тобто зони візуально незміненої легеневої тканини.

Мікроскопічне дослідження зразків, забарвлених за Цілем — Нільсеном, проводили на світловому мікроскопі *Olympus BX51* з люмінесцентною приставкою *U-RFL-T* при збільшенні $\times 1000$, а зразки, оброблені аураміні-родаміном — у світлі лю-

мінесценції із застосуванням синього фільтру та збільшенні $\times 400$. У кожному зрізі тканини в середньому вивчали 15-20 полів зору, більше полів зору досліджувалося при збільшенні $\times 1000$.

Отримані кількісні показники дослідження обробляли статистичними методами з використанням програми *Excel* (Z-критерій).

Результати та їх обговорення. Проведений порівняльний аналіз частоти виявлення КСБ за результатами мікробіологічного дослідження харкотиння та/або операційного матеріалу (фрагментів легень), а також за результатами комплексної гістобактеріоскопії легеневої тканини прооперованих хворих на ТБ легень у формі Т та ФКТ (таблиця). Враховували результати мікробіологічного дослідження, яке проводили напередодні оперативного втручання.

Як видно з таблиці, при комплексному гістобактеріоскопічному дослідженні легеневої тканини з Т КСБ були виявлені у (76,0 \pm 8,5) % випадків, тоді як при мікробіологічному дослідженні у цих же хворих мікобактерії були визначені тільки у (44,0 \pm 9,9) % випадків, за винятком 1 випадку, коли мікробіологічне дослідження не проводилося. Такий високий відсоток частоти виявлення КСБ у легеневої тканині при гістобактеріоскопії узгоджується з результатами Є. Ю. Баранової та Л. М. Грінберга [1], які показали, що в активних Т КСБ були виявлені в 69,2 % випадків. У (24,0 \pm 8,5) % випадків результат гістобактеріоскопії був негативний, із цих випадків у (12,0 \pm 6,5) % цей висновок співпадає з мікробіологічним, а ще у (12,0 \pm 6,5) % випадків мікобактерії були виявлені у пацієнтів тільки при мікробіологічному дослідженні.

Діагностична результативність застосування методу забарвлення зрізів тканини за Цілем — Нільсеном при Т легень становила (60,0 \pm 9,8) %,

Результативність виявлення кислотостійких бактерій при мікробіологічному та гістобактеріоскопічному дослідженні у хворих з різними формами туберкульозу легень, % (M \pm m)

Метод дослідження	Фіброзно-кавернозний туберкульоз		Туберкульоз легень		
	Результат		Результат		
	позитивний	негативний	позитивний	негативний	дослідження не проводилося
Мікробіологічне дослідження харкотиння або операційного матеріалу	64,0 \pm 9,6 (16)	36,0 \pm 9,6 (9)	44,0 \pm 9,9 (11)	52,0 \pm 10,0 (13)	4,0 \pm 3,9 (1)
Гістобактеріоскопія, метод Ціля — Нільсена	96,0 \pm 3,9* (24)	4,0 \pm 3,9* (1)	60,0 \pm 9,8 (15)	40,0 \pm 9,8 (10)	—
Гістобактеріоскопія, флуоресцентний метод	100,0** (25)	—	72,0 \pm 9,0* (18)	28,0 \pm 9,0 (7)	—
Гістобактеріоскопія, обидва методи	100,0** (25)	—	76,0 \pm 8,5* (19)	24,0 \pm 8,5* (6)	—

Примітки: * — $P < 0,05$, ** — $P < 0,001$ у порівнянні з мікробіологічним дослідженням; в дужках — кількість спостережень.

флуоресцентного методу — $(72,0 \pm 9,0)$ %. Загальна ж ефективність гістобактеріоскопії з використанням двох методів гістохімічної обробки зрізів тканини легень становила $(76,0 \pm 8,5)$ %, тобто майже вдвічі перевищила рівень ефективності мікробіологічного дослідження щодо виявлення КСБ при цій формі ТБ легень — $(44,0 \pm 9,9)$ %.

Наразі існує практична необхідність уточнення вибору ділянок легеневої тканини, що видаляється, з найбільшою скупченістю МБТ для подальшого мікробіологічного дослідження у випадках хірургічного лікування хворих із хронічним ТБ легень. Актуальність проблеми зумовлена тим, що легенева тканина у таких пацієнтів переважно олігобацилярна, оскільки хворі до оперативного втручання зазвичай отримують кілька курсів протитуберкульозної хіміотерапії.

Результати гістобактеріоскопії також дозволили уточнити ділянки чи структури легеневої тканини, де переважно локалізуються найбільші скупчення (кластери) мікобактерій. А саме, проведене гістобактеріологічне дослідження випадків ТБ легень дозволило з'ясувати, що найбільша кількість КСБ локалізується в казеозному вмісті Т, на межі казеозу та грануляційного шару капсули Т, а також значна кількість КСБ виявлялася у ділянках, віддалених від Т, де візуально спостерігається мало змінена легенева тканина [8].

При ФКТ з морфологічними ознаками прогресування комплексне гістобактеріоскопічне дослідження легеневої тканини дозволило виявити паличковидні та/або кокові форми КСБ у всіх

випадках, тоді як рівень мікробіологічної діагностики дослідження харкотиння і/або операційного матеріалу щодо МБТ становив лише $(64,0 \pm 9,6)$ % випадків; причому виявлена різниця діагностичної результативності була статистично достовірною ($P < 0,001$). Найбільш масивні скупчення КСБ були виявлені в казеозному та грануляційному шарах каверни. Отримані результати узгоджуються з дослідженням, проведеним *G. Kaplan* та співавт. [30], яке показало неоднорідність морфологічного розподілу КСБ в легеневій тканині, ураженій ТБ. Автори показали, що паличковидні мікобактерії знаходилися у великій кількості в макрофагах, розташованих на поверхні порожнин розпаду, в меншій кількості — у безклітинному некротичному матеріалі та були зовсім відсутні в шарі грануляцій, багатому на макрофаги та гігантські багатоядерні клітини, та у фіброзному шарі каверни [30].

Порівняльний аналіз результатів виявлення КСБ із застосуванням двох гістохімічних методів при гістобактеріоскопії та мікробіологічного дослідження (бактеріоскопії та посіву) харкотиння та/або операційного матеріалу показав, що у вірогідно більшому відсотку випадків при Т ($P < 0,05$) та ФКТ легень ($P < 0,001$) КСБ виявлялися саме при гістобактеріоскопічному дослідженні. Таким чином, можна зробити висновок, що поєднане застосування двох гістохімічних методів забарвлення з метою прямого гістологічного виявлення КСБ забезпечує отримання найбільш повної та достовірної інформації щодо локалізації та кількісної представленості збудника в легеневій тканині.

Список використаної літератури

1. Баранова Е. Ю., Гринберг Л. М. Методика гістобактеріоскопії в морфологічній діагностиці туберкульозу легких // Уральський мед. журн. — 2007. — № 8. — С. 55-57.
2. Диагностика и химиотерапия туберкулеза органов дыхания: Пособие для врачей. — М.: Медицина и жизнь, 2003. — 48 с.
3. Елисеєв П. И., Никишова Е. И., Горина Г. П., Марьяндышев А. О. Результаты применения методов GenoType MTBDRplus и VASTEC MGIT для определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. — 2012. — № 10. — С. 31-34.
4. Журило О. А., Барбова А. І., Глушкевич Т. Г., Третьякова Л. В. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України. — Кіровоград: Поліум, 2012. — 190 с.
5. Коржевський Д. Э., Гиляров А. В. Основы гистологической техники. — СПб.: СпецЛит., 2010. — 96 с.
6. Лискина И. В., Кузовкова С. Д., Загаба Л. М., Песковец Л. И. Частота выявления микобактерий туберкулеза при туберкулезе легкого и вероятные причины невисокого уровня лабораторной диагностики // Укр. хіміотерапевт. журн. — 2012. — № 1-2. — С. 51-55.
7. Лискіна І. В., Загаба Л. М. Аналіз клініко-анатомічних показників хворих на туберкульоз легень із морфологічними ознаками прогресування (за операційним матеріалом) // Туберкульоз. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. — 2014. — № 2. — С. 18-23.
8. Лискіна І. В., Кузовкова С. Д., Загаба Л. М., Олексинська О. О. Особливості виявлення збудника туберкульозу в легеневій тканині при активних туберкульозах легень та застосуванні різних гістохімічних методів // Мат-ли міжнарод. наук.-практ. конф. "Проблеми та стан розвитку медичної науки та практики в Україні" (Дніпропетровськ, 11-12 липня 2014 р.). — Дніпропетровськ, 2014. — С. 22-25.
9. Лобзин Ю. В., Цинзерлинг В. А. Инфекционные заболевания человека: некоторые нерешенные вопросы терминологии, диагностики и патоморфологии // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. — 2009. — № 2. — С. 3-9.
10. Наказ МОЗ України від 04.09.14 № 620 "Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізова-

- ної) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги дорослим "ТУБЕРКУЛЬОЗ". — К., 2014. — 75 с.
11. *Отс О. Н., Азказев Т. В., Перельман М. И.* Хирургическое лечение туберкулеза легких при устойчивости микобактерий к химиопрепаратам // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2009. — № 2. — С. 42-49.
 12. *Петренко В. І.* Методи виявлення туберкульозу: минуле та сучасне. До 130-річчя від дня відкриття збудника туберкульозу Робертом Кохом // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. — 2012. — № 1. — С. 18-26.
 13. *Репин Ю. М.* Тактика хирургического лечения больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. — 2001. — № 1. — С. 46-51.
 14. *Фещенко Ю. І., Мельник В. М.* Контроль за туберкульозом в умовах адаптованої ДОТС-стратегії. — К.: Медицина, 2007. — 478 с.
 15. *Фещенко Ю. І., Мельник В. М.* Організація лікування хворих на туберкульоз. — К.: Здоров'я, 2009. — 488 с.
 16. *Цинзерлинг А. В.* Обработка и окраска мазков и срезов для выявления микроорганизмов // Архив патологии. — 1992. — 54, № 5. — С. 35-40.
 17. *Va F., Rieder H. L.* A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli // Int. J. Tuberc. Lung Dis. — 1999. — 3, № 12. — P. 1101-1105.
 18. *Bodmer, T., Ströhle A.* Diagnosing pulmonary tuberculosis with the Xpert MTB/RIF test // J. Vis. Exp. — 2012. — 62. — doi: 10.3791/3547.
 19. *Dedieu L., Serveau-Avesque C., Kremer L., Cnaan S.* Mycobacterial lipolytic enzymes: a gold mine for tuberculosis research // Biochimie. — 2013. — 95, № 1. — P. 66-73.
 20. *Global tuberculosis report 2014.* World Health Organization. — Geneva: WHO Press, 2014. — 118 p.
 21. *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 extrapulmonary tuberculosis // Indian J. Tuberc. — 2007. — 54, № 1. — P. 24-29.
 22. *Greenwood N., Fox H.* A comparison of methods for staining tubercle bacilli in histological sections // J. Clin. Pathol. — 1973. — 26, № 4. — P. 253-257.
 23. *Gupta S., Shenoy V. P., Bairy I., Muralidharan S.* Comparison among three cold staining methods in the primary diagnosis of tuberculosis: a pilot study // J. Bras. Pneumol. — 2010. — 36, № 5. — P. 612-616.
 24. *Hoff D. R., Ryan G. J., Driver E. R.* et al. Location of intra- and extracellular M. tuberculosis populations in lungs of mice and guinea pigs during disease progression and after drug treatment // PLoS ONE. — 2011. — 6, № 3. — doi: 10.1371/journal.pone.0017550.
 25. *Horsburgh C. R.* Tuberculosis // Eur. Respir. Rev. — 2014. — 23. — P. 36-39.
 26. *Hur Y.-G., Crampin A. C., Chisambo C.* et al. Identification of Immunological biomarkers which may differentiate latent tuberculosis from exposure to environmental nontuberculous mycobacteria in children // Clin. Vaccine Immunol. — 2014. — 21, № 2. — P. 133-142.
 27. *Ihama Y., Hokama A., Hibiya K., Kishimoto K.* et al. Diagnosis of intestinal tuberculosis using a monoclonal antibody to Mycobacterium tuberculosis // World J. Gastroenterol. — 2012. — 18, № 47. — P. 6974-6980.
 28. *Ince A. T., Güneş P., Senateş E.* et al. Can an immunohistochemistry method differentiate intestinal tuberculosis from Crohn's disease in biopsy specimens? // Dig. Dis. Sci. — 2011. — 56, № 4. — P. 1165-1170.
 29. *Jain A., Bhargava A., Agarwal S. K.* A comparative study of two commonly used staining techniques for acid fast bacilli in clinical specimens // Indian J. Tuberc. — 2002. — 49, № 3. — P. 161-162.
 30. *Kaplan G., Post F. A., Moreira A. L.* et al. Mycobacterium tuberculosis Growth at the Cavity Surface: a Micro-environment with Failed Immunity // Infection and Immunity. — 2003. — 71, № 12. — P. 7099-7108.
 31. *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. — 2014. [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/858396>
 32. *Lawn S. D., Mwaba P., Bates M.* et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test // Lancet. Infect. Dis. — 2013. — 13, № 4. — P. 349-361.
 33. *Philips J. A., Ernst J. D.* Tuberculosis pathogenesis and immunity // Ann. Rev. Pathol. — 2012. — 7. — P. 353-384.
 34. *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. — 2. — doi: 10.1186/1746-1596-2-36.
 35. *Ramakrishnan L.* Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Review // Nature Reviews Immunology. — 2012. — 12. — doi: 10.1038/nri3211.
 36. *Steingart K. R., Henry M., Hopewell P. C.* et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review // Lancet Infect. Dis. — 2006. — 6, № 9. — P. 570-581.
 37. *Taylor N., Gaur R. L., Baron L. J., Banaei N.* Can a simple flotation method lower the limit of detection of mycobacterium tuberculosis in extrapulmonary samples analyzed by the geneXpert MTB/RIF Assay? // J. Clin. Microbiol. — 2012. — 50, № 7. — P. 2272-2276.
 38. *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. — 205, № 5. — P. 633-640.
 39. *Watrelet-Virieux D., Drevon-Gaillot E., Toussaint Y., Belli P.* Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. — 2006. — 53, № 7. — P. 321-325.
 40. *Ziaee M., Namaei M., Khazae M., Azarkar G.* Comparison of the value of two different sputum staining for diagnosis of acid fast bacilli // Iranian J. Clin. Infect. Dis. — 2008. — 3, № 2. — P. 99-102.

Одержано 23.11.2014

ГИСТОБАКТЕРИОСКОПИЯ РЕЗЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА В МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

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

Государственное учреждение “Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии
им. Ф. Г. Яновского НАМН Украины”, 03680 Киев

Рассмотрены значение и место гистобактериоскопии резекционного материала, а также перспективы иммуногистохимического исследования в диагностике туберкулезного процесса. Приведены собственные результаты гистобактериоскопического исследования по выявлению микобактерий туберкулеза в резекционном материале легочной ткани на базе 50 случаев с наличием туберкулемы и с фиброзно-кавернозным туберкулезом. Использование при гистобактериоскопии двух гистохимических методов окраски — традиционного по Цилю — Нильсену и флуоресцентного с применением *Kit “Tb-fluor”* — повысило уровень выявления микобактерий в легочной ткани при туберкулемах до 76,0 %, а при фиброзно-кавернозном туберкулезе — до 100 % случаев. Показано достоверно большую эффективность комплексной гистобактериоскопии по сравнению с традиционным микробиологическим исследованием мокроты и операционного материала. Сочетанное применение двух методов окраски для прямого гистологического выявления кислотоустойчивых бактерий обеспечило получение дополнительной информации о локализации и количестве возбудителя в легочной ткани.

HISTOBACTERIOSCOPY OF RESECTION MATERIAL IN MORPHOLOGICAL DIAGNOSTIC OF PULMONARY TUBERCULOSIS

I. V. Liskina, S. D. Kuzovkova, L. M. Zagaba, O. A. Melnik

State Institution “F. G. Yanovsky National Institute of Phthisiology and Pulmonology NAMS Ukraine”,
03680 Kyiv

Reviewed are the significance and place of histobacterioscopy of resection material, as well as prospects of immunohistochemical study for diagnosing tuberculosis process. Presented are the results of own histobacterioscopic research aimed at identifying of *Mycobacterium tuberculosis* in the resection material of lung tissue of 50 patients of tuberculoma and fibro-cavernous tuberculosis. Using for histobacterioscopy of two histochemical staining methods (traditional Ziehl-Neelsen staining and fluorescence with using Kit “Tb-fluor”) improved detection of mycobacteria in the lung tissue with tuberculoma up to 76.0 %, and with fibro-cavernous tuberculosis — up to 100 % of cases. The results obtained showed significantly greater efficacy of complex histobacterioscopy compared to conventional microbiological examination of sputum and surgical material. A combined use of the two staining histological methods for direct detection of acid-fast bacilli helped obtain additional information on the location and volume of pathogen in the lung tissue.