

ВЫЯВЛЕНИЕ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В ТКАНЯХ С ПОМОЩЬЮ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙ ИММУНОПЕРОКСИДАЗНОЙ ОКРАСКИ

А. П. ЛЫСЕНКО¹, В. В. ВЛАСЕНКО², А. П. ЛЕМИШ³, Т. П. НОВИК⁴, Е. А. МИХАЛЕВИЧ¹, И. Г. ВЛАСЕНКО⁴

DETECTION OF TISSUE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY DIFFERENTIATING IMMUNOPEROXIDASE STAINING

A. P. LYSSENKO¹, V. V. VLASENKO², A. P. LEMISH³, T. P. NOVIK⁴, E. A. MIKHALEVICH¹, I. G. VLASENKO⁴

¹Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышесесского, г. Минск

²Вишницкий государственный аграрный университет, г. Вишница

³Минский государственный медицинский университет, г. Минск

⁴Вишницкий торгово-экономический институт Киевского национального
торгово-экономического университета, г. Вишница

Окраска мазков-отпечатков органов и тканей конъюгатом пероксидазы с антителами к комплексу антигенов микобактерий туберкулеза с визуализацией диаминобензидином и докраской по Kinyoun обеспечивала окрашивание кислотоустойчивых форм микобактерий туберкулеза в рубиново-красный цвет, неокисляемых форм – в коричневый, клеток тканей и микроорганизмов других родов – в синий цвет. В лимфатических узлах больных и животных с латентной инфекцией отсутствовали типичные палочки, но встречались преимущественно в гранулематозных образованиях, кислотоустойчивые (рубиново-красные) зернистые формы. В значительных количествах обнаружены коричневые клетки, содержащие микобактериальные антигены, а также неокисляемые зернистые, сетевидные, фунгоидные, палочковидные формы.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой, дифференцирующая иммунопероксидазная окраска.

Staining impression smears from organ and tissues with peroxidase conjugated antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* complex antigens, followed by visualization with diaminobenzidine and Kinyoun stains, ensured the painting of acid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* forms to rubin red, acid-susceptible ones to brown, and tissue cells and microorganisms of other species to blue. Typical bacilli were absent in the lymph nodes of patients and animals with latent infection, but acid-resistant (rubin-red) granular forms were encountered in the granulomatous masses. Brown fat cells containing mycobacterial antigens, as well as acid-susceptible granular, reticular, fungoid, and rod-like forms were also found in considerable quantities.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, cell wall-defective *Mycobacterium tuberculosis*, differentiating immunoperoxidase staining.

Окраска мазков-отпечатков и гистологических срезов по Цилю – Нельсону или Kinyoun – основной метод обнаружения микобактерий туберкулеза (МБТ) в тканях. Однако при внелегочном туберкулезе у человека кислотоустойчивые (КУ) микобактерии удается найти не более чем в 44% случаев, а в тканях туберкулиноpositивного крупного рогатого скота – лишь в единичных случаях [7, 10, 11, 13]. Большую чувствительность (69-100%) за счет выявления секретируемых антигенов и измененных неокисляемых (НКУ) форм МБТ дает иммунопероксидазный (ИП) метод окраски с использованием антимикобактериальных антител [9, 10, 13]. Вместе с тем известные варианты метода нечетко выявляют типичные микобактерии из-за их маскировки секретируемыми антигенами, не дифференцируют КУ- и НКУ-формы МБТ [8, 11-13]. При использовании поликлональных антител возможны перекрестные реакции с микроорганизмами других родов [1, 3, 7, 16].

Разработали способ дифференцирующей ИП-окраски с помощью конъюгата пероксидазы с аффинно-очищенными антителами к антиге-

нам МБТ с «проявлением» реакции субстратным раствором диаминобензидина и докраской по Kinyoun, обеспечивающий рубиново-красную окраску КУ-клеток, коричневую (с оттенками) – НКУ-форм и антигенного детрита МБТ. Микроорганизмы других родов, даже обладающие общими антигенами с МБТ, докрашиваются по такому методу в синий цвет.

Цель работы – исследование тканей животных с латентной и активной туберкулезной инфекцией с помощью метода дифференциальной ИП-окраски.

Материалы и методы

Исследовали мазки-отпечатки органов и лимфатических узлов (бронхиальных, средостенных): 4 морских свинок (вакцинированы БЦЖ, 0,5 мг), 4 коров с видимыми туберкулезными изменениями в лимфатических узлах (*M. bovis* в ПЦР real time «Нарвак»), 3 туберкулиноpositивных коров без видимых туберкулезных изменений (ДНК *M. tuberculosis* в ПЦР real time), 24 туберкулино-

зитивных коров (без видимых туберкулезных изменений) из стад, в которых латентная туберкулезная инфекция была подтверждена выделением измененных форм МБТ и ДНК *M. tuberculosis* в ПЦР.

Контролем служили мазки-отпечатки из органов здоровых 4 морских свинок и 4 телят.

Мазки-отпечатки готовили по общепринятой методике и фиксировали 1 ч при 65°C. Для инактивации эндогенной пероксидазы на мазки наносили 3% перекись водорода и охлажденный метанол, а после их испарения промывали дистиллированной водой.

Из каждого материала готовили мазки-отпечатки, которые окрашивали: по Kinyoun, ДАБ (контроль на эндогенную пероксидазу), ДАБ с докраской по Kinyoun (контроль на эндогенную пероксидазу и цвет клеток), конъюгатами пероксидазы с антителами к *M. bovis* (к комплексу антигенов) и *M. tuberculosis* H₃₇Rv (к антигенам, специфичным для комплекса *tuberculosis* – *bovis*).

Конъюгаты пероксидазы с антителами (Px-Ig). Антитела выделяли на аффинном сорбенте (бромцианактивированная сефароза 4В с антигенами МБТ) из антисывороток к соникатам *M. bovis* 8 и *M. tuberculosis* H₃₇Rv (адсорбирована соникатами *M. avium*, *M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *Staph. aureus*, *E. coli*, *Past. multocida*, *Pseud. aeruginosa*, *Salm. enteritidis*, *Str. fecalis*).

Очищенные антитела (Ig) конъюгировали с пероксидазой (Sigma) по Nakane (1977).

ИП-окрашивание. На мазки наносили раствор конъюгата в ЗФР pH 7,4-7,6 с 0,02% твина 20 (1 : 20 – 1 : 60), через 1,2 ч промывали водой и на 20 мин наносили субстратный раствор ДАБ (10 мг 3,3'-диаминобензидина «Fluka» в 2 мл ДМСО, 10 мл дистиллированной воды с 10 мкл 33% H₂O₂). После смывания субстрата мазки докрасивали: 5 мин карболовым фуксином по Kinyoun (через фильтровальную бумагу), 70-90 с обесцвечивали солянокислым спиртом и до 4 мин 0,3% метиленовым синим.

Микроскопия и фиксацию результатов проводили на микроскопе Olympus 56BX (10 × 100).

Результаты и обсуждение

В контрольных мазках-отпечатках тканей здоровых и больных животных, обработанных только ДАБ, специфического коричневого окрашивания не обнаружено, что указывало на полную инактивацию эндогенной пероксидазы.

При ИП-Kinyoun-окраске отпечатков тканей здоровых животных клетки окрашивались только в синий цвет (рис. 1). Радикально отличались отпечатки тканей животных, зараженных *M. bovis*. При окраске конъюгатом Px-Ig *M. bovis* в них просматривались преимущественно коричневые и темно-коричневые клетки, связанные сетевидными структурами, коричневая зернистость (рис. 2). Встречались гранулемоподобные образования с рубиново-красной зернистостью, рубиново-красные палочки находили только в единичных экземплярах (рис. 3).

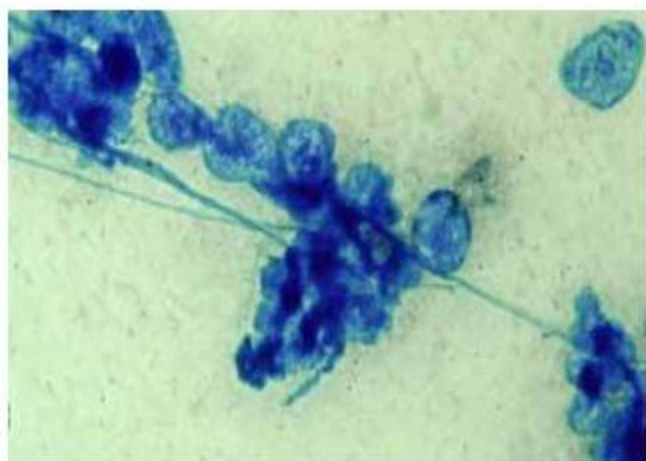


Рис. 1. Лимфатический узел здорового теленка. ИП-окраска Px-Ig *M. bovis* (1 : 20) – Kinyoun

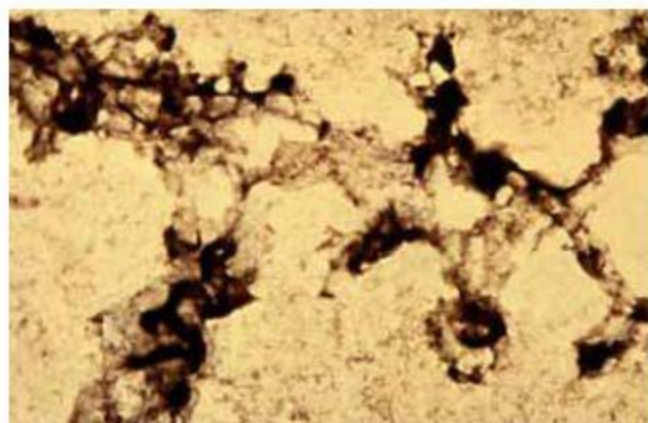


Рис. 2. Лимфатический узел коровы с туберкулезными изменениями (*M. bovis*). Коричневые клетки, соединенные сетевидной структурой. ИП окраска Px-Ig *M. bovis* (1 : 40) – Kinyoun

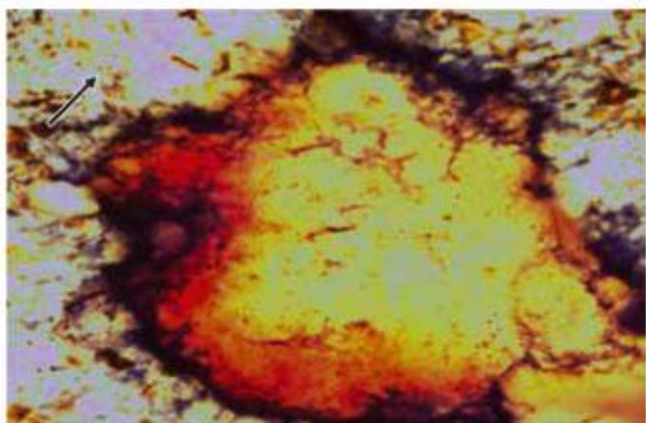


Рис. 3. Лимфатический узел коровы с туберкулезными изменениями (*M. bovis*). Гранулема с рубиново-красной зернистостью, рубиново-красная палочка (стрелка). ИП-окраска Px-Ig *M. bovis* (1 : 40) – Kinyoun

При исследовании лимфатических узлов коров, инфицированных *M. tuberculosis*, интенсивность специфической окраски тканей была несколько меньшей, чем при заражении *M. bovis*, реже встречались гранулемоподобные образования с рубиново-красной зернистостью, но чаще выявлялись НКУ палочковидные формы МБТ (рис. 4).

Окрашивание туберкулезных лимфатических узлов моноспецифическим конъюгатом ПХ + Ig *M. tuberculosis* давало менее интенсивную коричневую окраску, вероятно, из-за малой концентрации видоспецифических антигенов МБТ в тканях.

В лимфатических узлах туберкулинположительных коров (без видимых туберкулезных изменений) обнаружены специфически окрашенные элементы: коричневая зернистость, клетки с темно-коричневой цитоплазмой и фунгоидными структурами (рис. 5), гранулематозные образования с рубиново-красной зернистостью и коричневой периферией (рис. 6), сетевидные структуры, которые опутывали и соединяли клетки (рис. 7, 8).

Ранее сообщалось, что в гистологических срезах туберкулезных тканей встречаются гранулы и детрит внутри клеток [11, 12], реже – пылевидные скопления между клетками [10, 16], поэтому неожиданным оказалось присутствие в лимфатических узлах больных животных огромного количества специфически окрашенных в коричневый цвет (т. е. реагировавших с антителами к антигенам МБТ) клеток тканей (рис. 2, 5), зернистых (рис. 4), сетевидных (симпласт) (рис. 2, 7, 8), палочковидных (рис. 4) форм, которые можно отнести к cell wall deficient (клетки с дефектной клеточной стенкой) формам МБТ.

У всех больных и инфицированных особей обнаружены гранулематозные образования с рубиново-красной зернистостью, окруженные клеточным валом со специфической коричневой

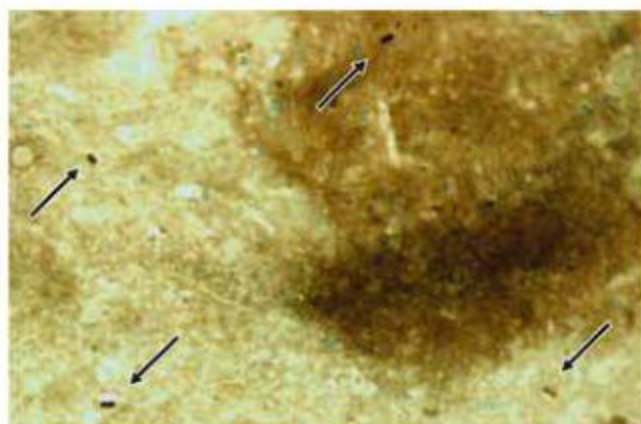


Рис. 4. Лимфатический узел коровы (*M. tuberculosis*). Коричневая зернистость и палочки (помечены стрелками). ИП-окраска Пх-Ig *M. bovis* (1:40) – Kinyoun

окраской (рис. 3, 6), что указывало на продукцию зернистыми формами микобактериальных антигенов. Картина похожих образований выявлялась при ИП окраске туберкулезных срезов антителами к resuscitation-promoting factors, которые в пикомолярных концентрациях стимулируют рост дормантных форм МБТ [6]. Также известно, что КУ зернистые формы МБТ обладают инфекционностью [5].

У реагировавших на туберкулин коров из стад с латентной туберкулезной инфекцией наблюдалась такая же картина, как и у больных животных, хотя и менее выраженная. В отпечатках встречалась коричневая и красная зернистость, в том числе и в гранулах, клетки с темно-коричневой цитоплазмой (содержащие антигены МБТ), фунгоидные формы (рис. 5, 6). Подобные фунгоидные формы (рис. 5) обнаружены и в крови больных животных. Ранее о них сообщалось в научной литературе, но достоверное подтверждение их существования было получено с помощью сканирующей

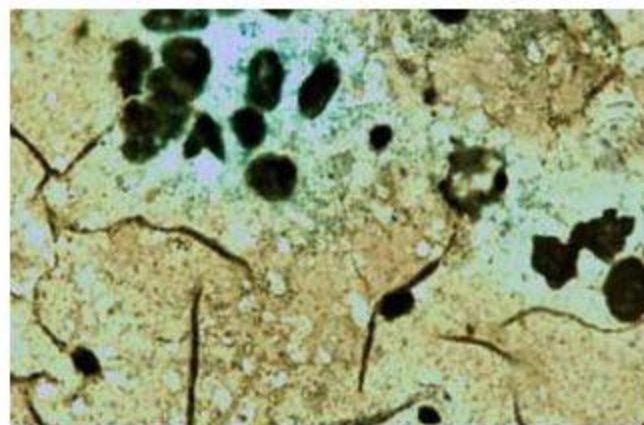


Рис. 5. Лимфатический узел туберкулинположительной коровы. Коричневая зернистость, клетки с темно-коричневой цитоплазмой, фунгоидные формы. ИП окраска Пх-Ig *M. bovis* (1:50) – Kinyoun

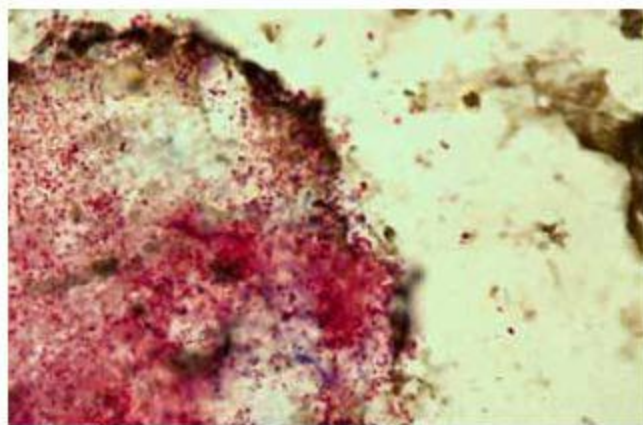


Рис. 6. Лимфатический узел туберкулинположительной коровы. Гранулематозное образование с рубиново-красной зернистостью и темно-коричневым валом. ИП окраска Пх-Ig *M. bovis* (1:50) – Kinyoun

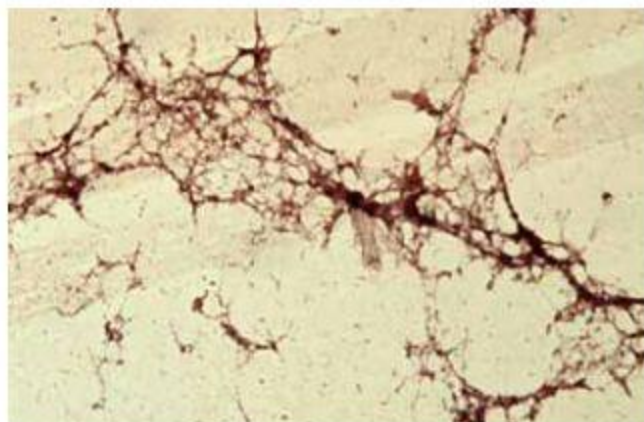


Рис. 7. Лимфатический узел туберкулинпозитивной коровы. Коричневая сетевидная структура. ИП-окраска Пх-Ig M. bovis (1 : 50) - Kinyoun

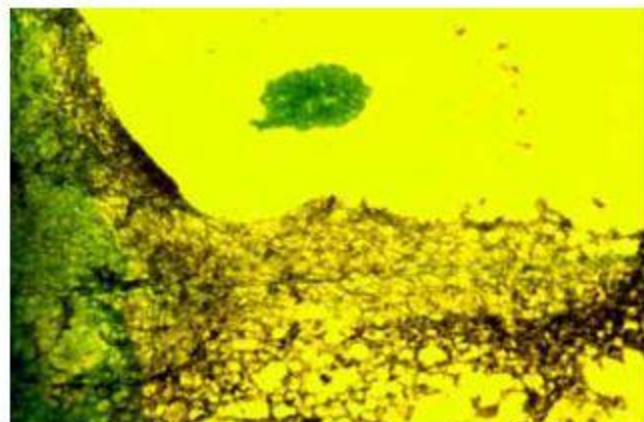


Рис. 8. Лимфатический узел туберкулинпозитивной коровы. Коричневая сетевидная структура, опутывающая клетки. ИП-окраска Пх-Ig M. bovis (1 : 50) - Kinyoun

электронной микроскопии при экспериментальной L-трансформации *M. bovis* [15].

Интерес представляют выявленные сетевидные структуры (симпласт) [2], пронизывавшие ткани и опутывавшие клетки. Такая форма обнаружена в посевах трансформированных МБТ (сообщения I, II). Подобные «multicellular tissue-like sheets, capillary-like network» могут образовывать плеоморфные CWD-микроорганизмы – изоляты из опухолей животных. Предполагается, что такие тканеподобные многоклеточные образования вступают в симбиоз с клетками макроорганизма и играют роль в канцерогенезе [14].

Разработанный метод окраски позволил взглянуть на процессы при заражении МБТ с позиций наличия в тканях микобактериальных антигенов и оценить соотношения КУ- и НКУ-форм. Оказалось, что даже при явном заболевании в основном встречаются КУ-зернистые формы и очень редко типичные палочки, при превашировании НКУ форм МБТ (и их антигены), которые пронизывают и заполняют всю ткань и клетки.

На трансформацию КУ МБТ при попадании в организм в НКУ-формы указывают и другие исследователи [9]. Можно предположить, что типичные КУ-палочки являются инвазивной формой, обеспечивающей распространение возбудителя и начало патологического процесса.

Метод дифференциальной окраски, позволяющий выявлять типичные и измененные формы МБТ, может быть использован не только для диагностики туберкулеза, но и для изучения роли возбудителя в этиологии других заболеваний [4, 17].

Выводы

1. Окраска мазков-отпечатков конъюгатом пероксидазы с антителами к комплексу антигенов

МБТ с визуализацией реакции диаминобензидином и докраской по Kinyoun четко выявляет типичные и измененные формы возбудителя болезни в тканях, позволяет повысить чувствительность диагностики и глубже изучить процессы персистенции возбудителя в организме.

2. В тканях лимфатических узлов больных и животных с латентной инфекцией обнаружено огромное количество реагирующих с анти-микобактериальными антителами клеток, неокисляющихся зернистых, сетевидных, фунгоидных, палочковидных форм, а также окисляющихся зернистых форм, находившиеся преимущественно в гранулематозных образованиях при отсутствии типичных окисляющихся микобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеев В. Г., Бабаян С. С., Гусева А. Н. и др. Количественные, спектральные и серодиагностические характеристики антимикобактериальных IgG-, IgM- и IgA-антител у больных туберкулезом легких // Пробл. туб. – 2006. – 10. – С. 47-55.
2. Бондарев И. М., Гулевская С. А., Немсадзе М. Н. и др. Морфология начальных этапов L-трансформации микобактерий туберкулеза при сканирующей электронной микроскопии // Пробл. туб. – 1976. – № 12. – С. 55-61.
3. Лысенко А. П., Архипов И. Н., Лемин А. П. и др. Особенности антигенного состава измененных форм микобактерий туберкулеза // Пробл. туб. – 2010. – № 10. – С. 54-58.
4. Alavi H., Moscovici E. Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sarcoidosis and in sinus histiocytosis of lymph nodes draining carcinoma // Histol. Histopathol. – 1996. – Vol. 11, № 3. – P. 683-694.
5. Brieger E., Miles J., Cosslett V. Nature and infectivity of granular forms of the bovine tubercle bacillus // Nature. – 1951. – Vol. 168. – P. 96-100.
6. Davies A., Dhillon A., Young M. et al. Resuscitation-promoting factors are expressed in *Mycobacterium tuberculosis*-infected human tissue // Tuberculosis. – 2008. – Vol. 88, № 5. – P. 462-468.

7. Geisel O., Netter E., Hermanns W. Specificity of the immunohistochemical demonstration of Mycobacterial antigens // J. Vet. Med. Series B. – 1994. – Vol. 41. – P. 548-553.
8. Goel 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. – Vol. 54. – P. 24-29.
9. Marcova N., Michailova L., Kussovski V., Jourdanova M. Formation of persisting cell wall deficient forms of *M. bovis* BCG during interaction with peritoneal macrophages in guinea pigs // Electronic J. Biol. – 2008. – Vol. 4, № 1. – P. 1-10.
10. Mukherjee A., Kalra N., Beena K. Immuno-histochemical detection of mycobacterial antigen in tuberculous lymphadenitis // Indian J. Tuberc. – 2002. – Vol. 49. – P. 213-216.
11. Orrell J., Brett J., Ivanyi J. et al. Measurement of the tissue distribution of immunoperoxidase staining with polyclonal anti-BCG serum in lung granulomata of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* // J. Pathol. – 1991. – Vol. 164, № 1. – P. 41-45.
12. Padmavathy L., Rao L., Ramanadhan Sh. Mycobacterial antigen in tissues in diagnosis of cutaneous tuberculosis // Indian J. Tuberc. – 2005. – Vol. 52. – P. 31-35.
13. Radhakrishnan V., Mathai A., Radhakrishnan N. et al. Immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens in intracranial tuberculoma // Indian J. Exp. Biol. – 1991. – Vol. 29, № 7. – P. 641-644.
14. Robinson D. Pleomorphic mammalian tumor-derived bacteria self-organize as multicellular mammalian eucaryotic-like organisms: morphogenetic properties in vitro, possible origin, and possible roles in mammalian «tumor ecologies» // Med. Hypothesis. – 2005. – Vol. 64, № 1. – P. 177-185.
15. Slavchev G., Michailova L., Markova N. Stress-induced L-forms of *Mycobacterium bovis*: challenge to survivability // New Microbiologica. – 2013. – Vol. 36. – P. 157-166.
16. Wiley E., Mulholland T., Beck B. et al. Polyclonal antibodies raised against BCG, *M. duvalii*, and *M. paratuberculosis* used to detect mycobacteria in tissue with the use of immunohistochemical techniques // Am. J. Clin. Pathol. – 1990. – Vol. 94, № 3. – P. 307-312.
17. Zhu Mingli, Zhang Yuanhe, Li Mingjun et al. Comparison of five methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and their L-forms in peripheral blood of pulmonary tuberculosis and lung cancer patients // J. Bengbu Med. College. – 2001. – 01.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

Лысенко Александр Павлович

Институт экспериментальной

ветеринарии им. С. Н. Выхлебского,

доктор ветеринарных наук, профессор,

заведующий лабораторией зоонозов.

220003, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Брикета, д. 28.

Тел.: +375 029 447691333.

E-mail: lyse nkoap@tut by

Поступила 12.01.2014