

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

В. А. ЦИНЗЕРЛИНГ^{1,2}, М. М. АГАПОВ¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

Приведены характеристики наиболее актуальных методов морфологической диагностики туберкулеза с учетом объективных трудностей, встречающихся практикующим патологам, в том числе нередкого сочетания с ВИЧ-инфекцией, учащением нетуберкулезных микобактериозов и обнаружением микобактерий с атипичными свойствами, представленных кокковидными и ветвящимися формами. Обсуждается обнаружение внеклеточно расположенных возбудителей, а также их потенциальная способность к формированию биопленок.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии, тинкториальные свойства, морфологическая диагностика

CURRENT APPROACHES TO MORPHOLOGIC DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

V. A. TSINZERLING^{1,2}, M. M. AGAPOV¹

¹St. Petersburg University, St. Petersburg, Russia

²St. Petersburg Phthisiopulmonology Research Institute, St. Petersburg, Russia

The article describes the most pertinent techniques for morphologic diagnosis of tuberculosis incorporating the related problems encountered by practicing pathologists including frequently meet co-infection with HIV, increase of non-tuberculous mycobacterioses and detection of mycobacteria possessing atypical properties presented by coccus and branching forms. The detection of causative agents located extracellular is discussed as well as their potential ability to form biofilms.

Key words: tuberculosis, mycobacteria, tinctorial properties, morphologic diagnosis

Несмотря на высокую эффективность микробиологических и иммунологических методов диагностики туберкулеза, которые определены приказом МЗ РФ № 951 от 29.12.2014 г. в качестве основных, и постепенное распространение молекулярно-генетических методов, актуальность морфологической диагностики туберкулеза в клинической практике не вызывает сомнений.

Наибольшее распространение получило выявление кислотоустойчивых бактерий по методу Циля – Нильсена, используемому в разных модификациях в большинстве патолого-анатомических лабораторий. Суть данного метода состоит в том, что толстая клеточная стенка микобактерий, имеющая в своем составе гетерогенную смесь высокомолекулярных липополисахаридов и обеспечивающая возбудителю непревзойденную устойчивость по отношению к разнообразным неблагоприятным факторам окружающей среды, будучи окрашенной, сохраняет краситель после обработки кислотами, благодаря чему микобактерии хорошо визуализируются на обесцвеченном фоне и тем самым отличаются от не обладающих кислотоустойчивостью микроорганизмов, из которых краситель вымывается.

Данный принцип был первоначально предложен немцем Паулем Эрлихом, затем его соотечественник Франц Циль (Franz Ziehl, 1857-1926) в 1882 г. предложил использовать карболовую кислоту для облегчения проникновения красителя через клеточную стенку микобактерии, и, наконец, в 1884 г. уроженец Дании Фридрих Нильсен (Friedrich

Neelsen, 1854-1898) улучшил методику за счет замены метилового фиолетового основным фуксином. В итоговом виде классическая пропись карболового фуксина по Цилю – Нильсену выглядела следующим образом: 1 г основного фуксина, 5 г фенола (карболовой кислоты), 10 мл 96%-ного этилового спирта.

Впоследствии множество авторов предлагали свои изменения данного состава в стремлении усилить окрашивающую способность раствора или, наоборот, сделать окраску более избирательной [19, 22, 25]. В частности, количество основного фуксина варьирует от 0,5 г (Goodpasture) до 10 г (Davalos), а фенола – от 3,75 г (Huntoon) до 25 г (Verhoeff). Встречаются варианты с увеличенным количеством спирта (Albrecht, Muller, Pottenger), а также включающие в состав глицерин. Отдельно следует отметить методы, использующие для окраски исключительно новый фуксин (New fuchsin C. I. 42520) вместо классического основного фуксина (C. I. 42510), представляющего собой смесь нового фуксина с менее метилированными розанилином, парарозанилином и маджентой II. Таким образом производится окраска по Файту (Fite), которая также характеризуется использованием вместо этанола метанола.

В некоторых источниках упоминается окраска по Брауну – Хоппсу (Brown – Hopps) [13], представляющая собой модификацию окраски по Граму, где на заключительных этапах в протокол включен пикроацетон – раствор пикриновой кислоты в ацетоне, обеспечивающий дополнительную дифферен-

цировку и контрокрашивание фона микропрепарата в желтый цвет, а также в зависимости от конкретного источника иногда фигурирует дифференцирующий раствор Галлего, включающий формальдегид и уксусную кислоту. Данный метод окрашивания не демонстрирует более высокой чувствительности по сравнению с классической окраской по Граму, особенно если учесть технические сложности при выполнении данного протокола, связанные с высокой способностью ацетона к быстрому обесцвечиванию микропрепарата даже при минимальном превышении времени экспозиции. Специфичность метода, с учетом слабых грамположительных свойств туберкулезных микобактерий, также далека от идеала.

Более чувствительным методом по сравнению с классическими, использующим феномен кислотоустойчивости микобактерий, является флюоресцентное окрашивание с использованием в соотношении 2 : 1 Аурамина О (С. I. 41000), относящегося к классу диарилметанов, и Родамина В (С. I. 45170) из класса родаминов [16, 17], благодаря высокой контрастности позволяет выявлять не только классические палочки Коха с полностью сохраненной клеточной стенкой, но и атипичные формы микобактерий, потерявших часть компонентов клеточной стенки и демонстрирующих очень слабую кислотоустойчивость при окраске по Цилю – Нильсену. Для улучшения проникновения красителя внутрь микобактерий используется тот же комплекс мер, что и при окраске карболовым фуксином, а именно: нагревание и включение в состав красящего раствора карболовой кислоты. С учетом способности некоторых компонентов клеток (каротиноиды, коллаген, эластин и пр.) к аутофлюоресценции производится обесцвечивание фона с использованием перманганата калия. Естественно, для проведения исследования необходим флюоресцентный микроскоп.

Большие надежды связываются с иммуногистохимической диагностикой туберкулеза, однако на данный момент широкого распространения эта методика не имеет [11, 26]. Антитела к туберкулезным микобактериям представлены на рынке в ограниченном количестве и не всегда демонстрируют высокую чувствительность. Еще одной серьезной проблемой является перекрестная чувствительность ряда антител как к микобактериям туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*), так и к нетуберкулезным микобактериям, что, с учетом распространенности последних, вызывает большие трудности в диагностике. Кроме того, нельзя не учитывать, что ни одна из имеющихся в настоящее время на рынке иммуногистохимических систем официально не допущена к использованию с диагностическими целями.

В использовании для диагностики туберкулеза такого чувствительного метода, как ПЦР, наблюдается два направления: первое связано с получением экстракта ДНК из выбранных для исследования

участков парафинового блока/среза посредством удаления парафина ксилолом с дальнейшим центрифугированием, извлечением из ткани ДНК и придания ей пригодного для исследования физического и химического состояния [2]; второе – с использованием в диагностике туберкулеза ПЦР *in situ*, предполагающего в качестве объекта исследования непосредственно гистологические срезы с парафиновых блоков, прошедших спиртовую проводку и фиксацию формалином. Данный метод способен демонстрировать значительную эффективность за счет высокой специфичности, но сопряжен с целым рядом технологических нюансов, так как при взаимодействии с формалином происходит необратимая потеря нуклеиновых кислот (свыше 90% РНК и не менее 75% ДНК), что сопровождается разрывом их цепей, ограничивающим размер пригодных к исследованию последовательностей, и появлением артефициальных мутаций, при этом отмечается большая склонность к повреждению краевых последовательностей, чем центральной части молекулы. Данный процесс в той или иной мере выражен и после заливки в парафин, вследствие чего блоки, находившиеся в архиве больше года, хуже поддаются исследованию, чем свежие. Пригодными для исследования считаются фрагменты нуклеиновых кислот, насчитывающие не менее 100 пар нуклеотидов. В целях увеличения размера амплифицируемых фрагментов нуклеиновых кислот используют различные приемы, такие как инкубация с таq-полимеразами и К-протеиназами, замена формалина жидкостью Карнуа, использование щадящих по отношению к ткани протоколов проводки и депарафинизации и т. д. При этом, например, К-протеиназу после примерно получасовой обработки необходимо в обязательном порядке инактивировать, как и эндогенную щелочную фосфатазу. Используемые для выявления туберкулезных микобактерий праймеры IS6110 имеют последовательности (5'-CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG-3') и (5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3'). После осуществляемых аппаратно в амплификаторе денатурации, отжига и элонгации в течение примерно 35 циклов продукты ПЦР выявляются посредством овечьих антител к антидигоксингенину, сопряженных с щелочной фосфатазой в разведении 1/500. В качестве хромогена используется 5-бromo-4-хлоро-3-3-индолилфосфат толуидиновой соли тетразолиевого нитроглубого, а в качестве контркрасителя – ядерный прочный красный. Правильно проведенная ПЦР зачастую демонстрирует весьма интересные результаты, не только выявляя микобактерии в малом количестве там, где иные методы оказывались бессильны (например, в случаях, трактовавшихся как болезнь Крона), но и демонстрируя локализацию возбудителя внеклеточно за пределами гранулемы [24].

Перспективным также видится использование конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, когда оптическая система формирует светяще-

еся пятно на заданной глубине микрообъекта, что дает возможность путем сканирования получать послойное изображение препарата с контрастированием внутренних структур. Программное обеспечение КЛСМ обеспечивает визуализацию изображения, трехмерную реконструкцию объекта, различные виды анализа внутриклеточных структур. В конфокальном микроскопе путем послойного просматривания препарата достигнута возможность исследования фрагментов цитоскелета, изучения адгезии и межклеточных взаимодействий, возможность концентрационных измерений в компартментах клетки, измерений проницаемости цитоплазматических и митохондриальных мембран, внутриклеточного pH и потенциалов на клеточных мембранах, возможность осуществления тонких процедур получения трехмерной реконструкции клетки [4].

Хотя большинство классических методов диагностики туберкулеза стали рутинными, практикующие специалисты в современных условиях регулярно сталкиваются с рядом сложностей, влияющих на достоверность и своевременность постановки диагноза. Одной из основных проблем является изменчивость морфологии туберкулеза. Источником трудностей прежде всего является постоянно увеличивающееся число случаев сочетания туберкулеза и ВИЧ-инфекции, что не только приводит к увеличению тяжести и распространенности туберкулезного поражения, но и накладывает отпечаток на морфологическую картину заболевания [1].

Особенностями туберкулеза на фоне ВИЧ-инфекции являются нестандартное строение туберкулезной гранулемы и угнетение гранулематозной реакции тканей на возбудителя с преобладанием альтеративно-экссудативных изменений. При этом наблюдаются большие объемы казеозных масс, сниженное присутствие эпителиоидных клеток и лимфоцитов, а гигантские клетки Лангханса могут не обнаруживаться вовсе или быть атипичными. Все перечисленное является закономерным результатом угнетения клеточного звена иммунитета [5, 6].

Тем не менее было бы несправедливым жестко увязывать размытую морфологическую картину туберкулезного воспаления исключительно с иммуносупрессией. Накопленный опыт и современные данные свидетельствуют о том, что и без сопутствующей патологии выраженные, достоверные признаки классической туберкулезной гранулемы встречаются далеко не всегда, ставя под вопрос сам термин «специфическое воспаление», а отчасти сходная с туберкулезом морфологическая картина может определяться и при патологических процессах иной этиологии, что требует еще большей настороженности в случае обнаружения морфологических признаков гранулематозного поражения [7, 8].

Следующий аспект состоит в возможности одновременного сочетания ВИЧ-инфекции не только с туберкулезом, но и с рядом других инфекций, спо-

собных наслаиваться на морфологическую картину туберкулеза. Такими инфекциями являются аспергиллез, криптококкоз, пневмоцистоз и микоплазмоз. Помимо этого, возможно сочетание туберкулезных микобактерий с нетуберкулезными [9, 20].

Еще одно явление, опять же наблюдаемое как в сочетании с ВИЧ, так и у иммунокомпетентных пациентов, представлено атипичными морфологическими и тинкториальными свойствами микобактерий. Феномен, при котором микобактерии не окрашиваются по Цилю – Нильсену либо окрашиваются крайне слабо, известен многим, но по-прежнему не имеет достоверного объяснения. Предполагается, что в таких случаях может иметь место полная или частичная утрата микобактериями своей клеточной стенки либо ее компонентов с образованием L-форм в ответ на неблагоприятные для возбудителя условия, создаваемые иммунной системой или вследствие химиотерапии (L-трансформирующее действие было обнаружено у большинства используемых в клинике противотуберкулезных препаратов). Принципиально важной особенностью L-форм является их способность к реверсии в исходные бактериальные формы с полным восстановлением вирулентности. Также необходимо отметить сохраняющуюся у них способность к размножению. Иными словами, несмотря на клинически благоприятную динамику, в случае ослабления устойчивости макроорганизма или на фоне прекращения химиотерапии имеется риск мощной эндогенной реинфекции за счет персистировавших L-форм [3].

Отдельного упоминания требует вопрос локализации микобактерий в ткани. В большинстве источников таковой «по умолчанию» считается внутриклеточная, этот феномен лежит в основе доминирующих взглядов на патогенез туберкулеза. Однако его полной характеристики *in vivo* с выявлением частоты при использовании различных методов в доступной литературе обнаружить не удалось. Практика показывает большую значимость внеклеточного расположения возбудителя, что позволяет вывести на новый уровень дискуссию о морфологии туберкулеза, так как в данном случае может иметь место образование возбудителем биопленок, особенно актуальное в связи с формированием лекарственной устойчивости. Микробные биопленки при туберкулезе затрагиваются вскользь лишь в единичных публикациях [21].

Большой интерес представляет присутствие в туберкулезном очаге атипичных форм микобактерий. Наряду с классическими палочками Коха, могут встречаться кокковидные (от 20 до 90% всех микобактерий), ветвящиеся (от 1 до 10%) и различные другие формы (удлиненные, булавовидные и пр.), на которые также может приходиться до 10% микобактерий, обнаруживаемых с помощью ИГХ, флюоресцентных методов или окраски по Цилю – Нильсену.

Существует несколько вариантов происхождения атипичных микобактерий [10, 12, 15]:

1) попадание в организм извне сапрофитов, родственных туберкулезным микобактериям, имеющих с ними схожие тинкториальные и антигенные свойства;

2) атипичные формы микобактерий могут быть переходными этапами между обычными микобактериями и их L-формами;

3) при активном размножении микобактерий, особенно почкованием, молодые микроорганизмы первоначально приобретают именно атипичную форму: почки образуются чаще на конце клетки или на боковой поверхности, сначала появляется маленький бугорок, который увеличивается, округляется, затем отделяется или, оставаясь соединенным с материнской клеткой, развивается дальше. Почки, часто вытягиваясь в длину, превращаются в палочковидные ветки. Трудно в таких случаях установить, что считать почкой, а что – веткой, так как и почкование, и ветвление представляют в сущности один и тот же процесс. Различие заключается лишь в том, что при настоящем ветвлении ветки не отделяются и не могут существовать самостоятельно. В дальнейшем бугорок увеличивается в размерах и отпочковывается от материнской клетки в виде образования кокковидной формы. Весь цикл размножения и воспроизводства продолжается примерно 7-9 сут. Вновь появившиеся молодые палочки до окончательного формирования могут приобретать ветвящуюся форму, напоминающую мицелий плесневых грибов;

4) возможен обратный процесс: превращение обычных форм в кокковидные в конце жизненного цикла, когда клетки укорачиваются и принимают кокковидную форму. Кокковидные клетки имеют такой же диаметр, как и палочки, или несколько больший; одиночные, или соединены в пары, или короткие кривые цепочки, или механически сцеплены в пучки. Кокковидные клетки некоторое время продолжают размножаться, а затем переходят в состояние покоя. Таким образом, микобактерии в своем развитии проходят цикл превращений из палочковидных форм в кокковидные.

Хотя феномен образования L-форм (L – от названия Листеровского института в Великобритании, где данное явление на примере *Streptobacillus moniliformis* было впервые описано в 1935 г.) характерен для многих прокариот, применительно к микобактериям это свойство имеет особый интерес, так как именно пространственная структура и химический состав клеточной стенки обеспечивают их уникальные свойства: начиная от тинкториальных и заканчивая иммуносупрессивными.

Повышенный интерес к образованию L-форм туберкулезными микобактериями наблюдался в середине XX в., когда уже был накоплен значительный материал, касавшийся наблюдений фильтрующихся форм возбудителя, имеющих атипичную морфо-

логию и нестабильные тинкториальные свойства, и именно открытие процесса утраты бактериями клеточной стенки помогло продвинуться в данном направлении. Однако ближе к 80-м годам внимание к этой проблеме пошло на спад несмотря на остающиеся нерешенными вопросы. Принципиальным моментом в исследованиях L-форм микобактерий стало открытие и повсеместное внедрение химиотерапевтических методов лечения туберкулеза, ознаменовавшее новый этап в изучении микобактерий с атипичной морфологией, когда стало ясно, что L-трансформация вызвана непосредственно антибактериальными средствами [18, 23].

В зависимости от степени утраты клеточной стенки принято выделять протопласты и сферопласты. Протопласты полностью лишены клеточной стенки подобно микоплазмам. Сферопласты находятся в промежуточном положении ввиду неполной утраты клеточной стенки, следовательно, их физиологические и тинкториальные свойства также имеют черты как обычных кислотоустойчивых микобактерий, так и настоящих L-форм.

Ведущим элементом процесса исчезновения бактериальной клеточной стенки с дальнейшей утратой формы клетки (ввиду отсутствия жесткого каркаса) является потеря пептидогликанов, несущих опорную функцию, угнетение биосинтеза которых является одним из основных направлений L-трансформирующего действия противотуберкулезных препаратов [12, 14].

В различных источниках атипичные формы микобактерий имеют различные названия: микококки, амeboподобные клетки, почкующиеся дрожжеподобные структуры, элементарные тельца, нитчатые структуры, эндоспоры, овоидные клетки. Это в очередной раз подтверждает высокую степень полиморфизма, вызванного различными сочетаниями таких процессов, как неравномерное деление, почкование, протрузия-экструзия элементарных телец и гранул, внутриклеточная фрагментация цитоплазмы и т. д. Описаны так называемые материнские клетки – своеобразные симпласты, при распаде дающие множество гранулярных структур.

Непосредственные механизмы утраты клеточной стенки еще предстоит изучить. В частности, существует вариант, при котором синтез компонентов клеточной стенки не прекращается и они продолжают через мембранные поры выходить на наружную поверхность клетки, однако в дальнейшем не соединяются в единую структуру.

С образованием L-форм связывают и феномен дормантности – перехода микобактерий в покоящееся состояние в виде цистоподобных или спороподобных форм (в том числе внутри макрофагов при незавершенном фагоцитозе), позволяющее избегать взаимодействия с иммунной системой макроорганизма, но значительно снижающее потенциал к росту и делению (либо полностью исключающее эту возможность). Одним из примеров длительного су-

ществования микобактерий в дормантном виде на фоне сниженного иммунного статуса является прививка БЦЖ у пациентов с ВИЧ-инфекцией, у которых даже через много лет после вакцинации находят персистирующие микобактерии именно того штамма, который использовался во введенном препарате [10].

В отсутствие мощной клеточной стенки, затрудняющей обмен веществами с окружающей средой, L-формы микобактерий демонстрируют способность к ускоренному, а по сравнению с обычным медленным метаболизмом микобактерий – бурно, особенно в виде кокковидных и вегетирующих форм. Об активном метаболизме L-форм также сви-

детельствуют увеличенные в размерах митохондрии и эндоплазматическая сеть.

Исходя из вышесказанного ясно, что в прямой зависимости от состояния клеточной стенки микобактерий находятся и их тинкториальные свойства, особенно на примере классической окраски по Цилю – Нильсену. Приходится констатировать, что надежных методов выявления атипичных форм микобактерий туберкулеза в тканях морфологическими методами в настоящее время не существует, что закреплено консенсусом круглого стола конгресса НАФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринберг Л. М., Баранова Е. Ю., Вибе А. О. и др. Актуальные вопросы патологии и патоморфоза микобактериальных инфекций // Урал. мед. ж. – 2005. – С. 44-48.
2. Долгова Е. А., Альварес Фигероа М. В., Шахгильдян В. И. и др. Применение полимеразной цепной реакции для ранней диагностики туберкулеза у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции // Инфекц. болезни. – 2014. – № 4. – С.11-17.
3. Дорожкова И. Р., Карачунский М. А., Абдуллаева Э. Т. и др. Выявление L-форм микобактерий туберкулеза как прогностический критерий рецидивов и обострений туберкулеза у больных с большими остаточными туберкулезными изменениями в легких // Пробл. туб. – 1989. – № 3. – С. 14-17.
4. Ерохина М. В., Незлин Л. П., Авдиенко В. Г. и др. Иммуногистохимическое выявление *Mycobacterium tuberculosis* в ткани легких у больных туберкулезом с использованием лазерной сканирующей микроскопии // Известия РАН. Серия биологическая. – 2016. – № 1. – С. 1-5.
5. Попова А. А., Кравченко А. В., Серебровская Л. В. Изменения системы иммунитета у больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом // Эпидемиол. и инфекц. болезни. – 2008. – № 4. – С. 54.
6. Перельман М. И. Фтизиатрия. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.
7. Цинзерлинг В. А. ВИЧ-инфекция и туберкулез. Проблемы клинко-морфологических сопоставлений // Мед. академ. журнал. – 2013. – № 13 (4). – С. 87-91.
8. Цинзерлинг В. А., Карев В. Е., Аветисян А. О. и др. К вопросу об этиологии макрофагальных гранулем в органах дыхания и лимфатических узлах: наблюдения из практики // Журнал инфектологии. – 2013. – № 5 (3). – С. 67-70.
9. Цинзерлинг В. А., Комарова Д. В., Рахманова А. Г. и др. Актуальные проблемы морфологической диагностики и патоморфоз ВИЧ-инфекции // Архив патологии. – 2010. – № 2. – С. 26-30.
10. Шлеева М. О., Салина Е. Г., Капрельянц А. С. Покоящиеся формы микобактерий: обзор // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 1. – С. 3-15.
11. Эллиниди В. Н., Ариэль Б. М., Самусенко И. А., Туголукова Л. В. Иммуногистохимический метод в диагностике туберкулеза // Арх. патологии. – 2007. – № 5. – С. 36-37.
12. Beran V., Havelkova M., Kaustova J. et al. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review // Veterinarni Medicina. – 2006. – № 7 (51). – P. 365-389.
13. Brown J. H., Brenn L. A method for the differential staining of Gram positive and Gram negative bacteria in tissue sections // Bull. John Hopkins Hosp. – 1931. – Vol. 48. – P. 69.
14. Cardona P., Ruiz-Manzano J. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis* – latent bacilli // Europ. Respir. J. – 2004. – Vol. 24, № 6. – P. 1044-1051.
15. Chandrasekhar S., Ratnam, S. Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of *Mycobacterium tuberculosis* // Tub. Lung Diseases. – 1992. – Vol. 73, № 5. – P. 273-279.
16. Culling C. F. A., Alison R. T., Barr W. T. Cellular Pathology Technique, 4th ed. Butterworths, London, UK, 1985.
17. Drury R. A. B., Wallington E. A. Carleton's histological technique Ed. 5. Oxford University Press, Oxford, UK, 1980.

REFERENCES

1. Grinberg L.M., Baranova E.Yu., Vibe A.O. et al. Current questions of pathology and pathomorphism of mycobacterial infections. *Ural. Med. J.*, 2005, pp. 44-48. (In Russ.)
2. Dolgova E.A., Alvares Figeroa M.V., Shakhgildyan V.I. et al. Use of polymerase chain reaction for early diagnosis of tuberculosis in the patients with advanced stage of HIV infection. *Infekts. Bolezni*, 2014, no. 4. pp. 11-17. (In Russ.)
3. Dorozhkova I.R., Karachunskiy M.A., Abdullaeva E.T. et al. Detection of L-form of tuberculous mycobacteria as prognostic criterion of tuberculosis relapses and exacerbations in those with significant residual tuberculous changes in the lungs. *Probl. Tub.*, 1989, no. 3, pp. 14-17. (In Russ.)
4. Erokhina M.V., Nezlin L.P., Avdienko V.G. et al. Immunohistochemical detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the lung tissue of tuberculosis patients with the use of scanning laser microscopy. *Izvestiya RAN. Seriya Biologicheskaya*, 2016, no. 1. pp. 1-5. (In Russ.)
5. Popova A.A., Kravchenko A.V., Serebrovskaya L.V. Changes in the immunity system of HIV/TB patients. *Epidemiol. i Infekts. Bolezni*, 2008, no. 4. pp. 54. (In Russ.)
6. Perelman M.I. *Ftiziatriya. Natsionalnoye rukovodstvo*. [Phthisiology. National guidelines]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2007.
7. Tsinzerling V.A. HIV infection and tuberculosis. Problems of clinical and morphologic comparison. *Med. Akadem. Journal*, 2013, no. 13 (4), pp. 87-91. (In Russ.)
8. Tsinzerling V.A., Karev V.E., Avetisyan A.O. et al. On the issue of nosetiology of macrophagal granulomas in respiratory organs and lymph nodes: clinical cases. *Journal Infektologii*, 2013, no. 5 (3), pp. 67-70. (In Russ.)
9. Tsinzerling V.A., Komarova D.V., Rakhmanova A.G. et al. Actual problems of morphological diagnostics and pathomorphism of HIV infection. *Arkhiv Patologii*, 2010, no. 2. pp. 26-30. (In Russ.)
10. Shleeve M.O., Salina E.G., Kaprelyants A.S. Dormant forms of mycobacteria: review. *Mikrobiologiya*, 2010, vol. 79, no. 1, pp. 3-15. (In Russ.)
11. Ellinidi V.N., Ariel B.M., Samusenko I.A., Tugolukova L.V. Immunocytochemistry technique for diagnostics of tuberculosis. *Arkh. Patologii*, 2007, no. 5. pp. 36-37. (In Russ.)
12. Beran V., Havelkova M., Kaustova J. et al. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 2006, no. 7 (51), pp. 365-389.
13. Brown J.H., Brenn L. A method for the differential staining of Gram positive and Gram negative bacteria in tissue sections. *Bull. John Hopkins Hosp.*, 1931, vol. 48, pp. 69.
14. Cardona P., Ruiz-Manzano J. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. *Europ. Respir. J.*, 2004, vol. 24, no. 6, pp. 1044-1051.
15. Chandrasekhar S., Ratnam, S. Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tub. Lung Diseases*, 1992, vol. 73, no. 5, pp. 273-279.
16. Culling C.F.A., Alison R.T., Barr W.T. Cellular Pathology Technique, 4th ed., Butterworths, London, UK, 1985.
17. Drury R.A.B., Wallington E.A. Carleton's histological technique Ed. 5. Oxford University Press, Oxford, UK, 1980.

18. Flynn J., Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation // *Infect. Immunity*. – 2001. – Vol. 69, № 7. – P. 4195-4201.
19. Gray P. The Microtome's Formulary and Guide, 1954.
20. Hwang S.M., Lim M.S., Hong Y.J. Simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens // *Tuberculosis (Edinb.)*. – 2013. – Vol. 93, № 6. – P. 642-646.
21. Ian M. Orme. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis // *Tuberculosis*. – 2014. – № 94. – P. 8-14.
22. Lillie R. D. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York, USA.
23. Markova N., Michailova L., Jourdanova M. et al. Exhibition of persistent and drug-tolerant L-form habit of *Mycobacterium tuberculosis* during infection in rats // *Central Eur. J. Biology*. – 2008. – Vol. 3, № 4. – P. 407-416.
24. Pulimood A., Shajan P., Rook G., Donoghue H. In situ PCR for *Mycobacterium tuberculosis* in endoscopic mucosal biopsy specimens of intestinal tuberculosis and crohn disease // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2008. – № 129. – P. 846-851.
25. Putt F. A. Manual of histopathological staining methods. New York, NY, USA, 1972.
26. 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.
18. Flynn J., Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immunity*, 2001, vol. 69, no. 7, pp. 4195-4201.
19. Gray P. The Microtome's Formulary and Guide, 1954.
20. Hwang S.M., Lim M.S., Hong Y.J. Simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2013, vol. 93, no. 6, pp. 642-646.
21. Ian M. Orme. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2014, no. 94, pp. 8-14.
22. Lillie R.D. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York, USA.
23. Markova N., Michailova L., Jourdanova M. et al. Exhibition of persistent and drug-tolerant L-form habit of *Mycobacterium tuberculosis* during infection in rats. *Central Eur. J. Biology*, 2008, vol. 3, no. 4, pp. 407-416.
24. Pulimood A., Shajan P., Rook G., Donoghue H. In situ PCR for *Mycobacterium tuberculosis* in endoscopic mucosal biopsy specimens of intestinal tuberculosis and crohn disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2008, no. 129, pp. 846-851.
25. Putt F.A. Manual of histopathological staining methods. New York, NY, USA, 1972.
26. 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, pp. 633-640.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург,
Университетская наб., д. 7-9.

Цинзерлинг Всеволод Александрович
профессор кафедры патологии, ведущий научный
сотрудник СПбНИИ фтизиопульмонологии.
E-mail: zinserling@yandex.ru

Агапов Михаил Михайлович
аспирант.
E-mail: m.agapov@mail.ru

FOR CORRESPONDENCE:

St. Petersburg University, St. Petersburg, Russia
7-9, Universitetskaya Nab., St. Petersburg, 199034

Vsevolod A. Tsinzerling
Professor of Pathology Department,
Leading Researcher of St. Petersburg Phthisiopulmonology
Research Institute.
E-mail: zinserling@yandex.ru

Mikhail M. Agapov
Post-Graduate Student.
E-mail: m.agapov@mail.ru

Поступила 19.10.2016

Submitted as of 19.10.2016