

УДК 57.083.1:57.086.2

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ *Mycobacterium tuberculosis* В ТКАНИ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

© 2016 г. М. В. Ерохина*, **, Л. П. Незлин***, В. Г. Авдиенко*,
Е. Е. Воронежская***, Л. Н. Лепеха*

*Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564 Москва, Яузская аллея, 2

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Ленинские горы, 1

***Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: nezlinl@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2015 г.

Предложен простой и надежный метод выявления *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в гистологических препаратах легочной ткани больных туберкулезом с использованием полученных нами поликлональных антител против МБТ и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. С помощью этого метода выявлены как колонии, так и одиночные МБТ, локализованные внутри- и внеклеточно в очагах казеозного некроза и в перифокальной области. Отмечено, что автоматический захват изображений больших объемов ткани (до $2 \times 2 \times 0.1$ мм) с последующей шивкой в одно трехмерное изображение предоставляет возможность провести автоматизированный поиск и подсчет МБТ в ткани. Установлено, что регистрация спектров испускания позволяет отфильтровать специфический сигнал от неспецифической флуоресценции в препаратах.

DOI: 10.7868/S0002332916010057

Среди современных методов, применяемых для изучения клеток и тканей под микроскопом, иммуногистохимическое окрашивание с помощью флуоресцентных маркеров – один из наиболее популярных, чувствительных и надежных. При этом использование лазерных сканирующих конфокальных микроскопов (ЛСКМ) позволяет увеличить разрешение, исследовать препараты толщиной до 200 мкм, провести трехмерную реконструкцию объектов исследования (Pawley, 2006; Штейн, 2007). Важная особенность ЛСКМ – возможность зарегистрировать спектры испускания в маркированных структурах и, сравнив их со спектрами испускания используемого флуоресцентного маркера, исключить все структуры с неспецифическим свечением (Matsumoto, 2002; Pawley, 2006). В настоящее время с помощью ЛСКМ в клинической практике выявляют отдельных инфекционных возбудителей (Hau *et al.*, 2010; Fritzsche *et al.*, 2012). Ранее метод ЛСКМ использовался для анализа *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в слюне и в исследованиях *in vitro* (Patino *et al.*, 2008; Deb *et al.*, 2009). В фтизиатрической практике иммунофлуоресцентное окрашивание МБТ на гистологических срезах в сочетании с ЛСКМ до настоящего времени не применялось.

Цель исследования – разработать методические подходы и апробировать возможности при-

менения ЛСКМ для иммуногистохимического выявления МБТ в легочной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал легкого был получен от девяти пациентов с туберкуломами, диагноз был подтвержден бактериологическими методами (окрашивание мазков методом Циля–Нильсена и Вастес-анализ). Кусочки ткани фиксировали в 4%-ном параформальдегиде (Sigma, США) в 10 мМ солевом фосфатном буфере (PBS), pH 7.4, в течение 1 сут при 10°C, промывали 3 раза по 30 мин в PBS, пропитывали 2 ч в 30%-ном растворе сахарозы для криопротекции, заключали в среду “Jung tissue-freezing medium” и получали срезы толщиной 50–60 мкм на криостате CM1900 (Leica, Германия). Далее обрабатывали свободноплавающие срезы.

Для получения поликлональных антител кролика иммунизировали суспензией облученных *M. tuberculosis* штамма H37Rv в адьюванте Фрейнда. Полученную сыворотку аффинно очищали хроматографией на сорбенте Separose CL6B с ковалентно-связанными антигенами подвергнувшись ультразвуковой обработке *M. tuberculosis* H37Rv. Кроссреакцию аффинно-изолированных иммуноглобулинов подавляли адсорбцией на аналогичном сорбенте с антигенами *Mycobacterium fortuitum*. Иммуноглобулины концентрировали ультрафильтрацией и хранили при –20°C.

Изначально подбирали наилучший способ демаскирования антигена. Тестировали следующие растворы для демаскирования: 1%-ный sodium dodecyl sulfate (SDS), смесь 1%-ного SDS и 50%-ного метанола, 50%-ный метанол, 70%-ный метанол в PBS. Срезы инкубировались 1 ч при комнатной температуре, затем отмывались в PBS. Наилучшие результаты были получены после обработки метанолом: срезы инкубировали в растворе метанола в PBS, сначала повышая, а затем понижая концентрацию метанола (30–50–70–50–30%), по 10 мин при комнатной температуре и отмывали в PBS 3 раза по 10 мин. Срезы инкубировали в растворе первичных антител (разведенных 1 : 200 от изначальной концентрации в PBS с 1%-ным Triton X-100 (PBS-TX) и 0.25%-ным bovine serum albumin (BSA)) в течение 1 сут при 10°C, отмывали в PBS-TX 3 раза по 10 мин и инкубировали в растворе goat-anti-rabbit-Alexa-488 или goat anti-rabbit-Alexa-555 IgG (каталожные номера A-11008 и A-21428 соответственно) (Molecular Probes, США). Затем срезы промывали 3 раза по 10 мин в PBS и заключали в 80%-ный глицерин или TDE (1,1-Dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane) (Sigma). В ряде случаев в заливающую среду добавляли 3 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; D-1306) (Molecular Probes) для маркирования клеточных ядер. Контроль включал в себя приготовление препаратов по вышеописанной схеме, но без первичных антител, которые заменяли на соответствующее количество нормальной кроличьей сыворотки. При этом полностью исчезало специфическое свечение. Использование двух разных вторичных антител, конъюгированных Alexa-488 и Alexa-555, давало идентичные результаты.

Препараты изучали под лазерным сканирующим микроскопом TCS SPE (Leica), оборудованным соответствующим набором возбуждающих лазеров и фильтров. Полученные стопки оптических срезов записывали в компьютер и строили трехмерные изображения, которые анализировали с помощью программных пакетов Leica LAS AF и Imaris (Bitplane, Швейцария). Для иллюстраций создавали плоскую проекцию с увеличенной глубиной фокуса (full focus), после чего импортировали это изображение в программу Adobe PhotoShop (США). В полученных изображениях модифицировали только яркость и контраст. Все флуоресцентные изображения были представлены в виде негативов. Спектры флуоресценции объектов анализа сравнивали со спектром флуорохрома Alexa-488 (<https://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное иммуногистохимическое исследование с использованием поликлональных антител и ЛСКМ выявило колонии МБТ во всех изученных образцах, полученных от больных туберкулезом легких. После иммуногистохимического окрашивания каждый образец был проанализирован по схеме, позволившей максимально задействовать возможности современной конфокальной микроскопии для выявления и характеристики колоний МБТ. Для этого сначала при среднем увеличении микроскопа с использованием техники автоматической сшивки соседних изображений получали обзорный снимок большого участка ткани площадью до 50 мм². После этого определяли на нем различные зоны туберкулезного воспаления (область казеозного некроза и перифокальную область) (рис. 1а). Затем микроскопическое исследование при максимально возможном оптическом разрешении проводили в обеих зонах. В обеих этих областях были выявлены как одиночные бактерии, так и колонии МБТ (рис. 1б, в).

Двухмерный анализ в проекции *x_y* показал, что в зоне казеозного некроза МБТ выявляются в виде фрагментов, одиночных бактерий, их скоплений и сформированных колоний. Наиболее часто выявляются фрагменты МБТ размером до 0.5 мкм и одиночные бактерии палочковидной формы без формирования крупных скоплений или колоний (рис. 1б).

В перифокальной области преобладают относительно крупные скопления МБТ, в которых бактерии сохраняют палочковидную форму и имеют размеры до 1 мкм. Среди скоплений также выявляются характерные колонии в виде цепочек (рис. 1в).

Трехмерная реконструкция скоплений МБТ показала, что в составе скоплений бактерии округлые или палочковидные и формируют цепочки, располагающиеся по отношению одна к другой под разными углами (рис. 2а–в).

Спектры испускания структур, морфологически схожих с одиночными МБТ и их колониями, полностью соответствовали спектрам испускания флуорохрома, использованного для иммунофлуоресцентного окрашивания (рис. 2г), что также подтверждает специфичность иммуногистохимического маркирования МБТ.

Одна из важнейших задач фтизиатрии – надежная идентификация МБТ у больных с подозрением на туберкулез и при проведении дифференциальной диагностики. Между тем основная методика окраски МБТ для их микроскопического выявления не изменилась с того времени, когда Ф. Цилем и Ф.К.А. Нильсеном был разработан метод окраски микроорганизмов для выявления кислотоустойчивых микобактерий (Marks,

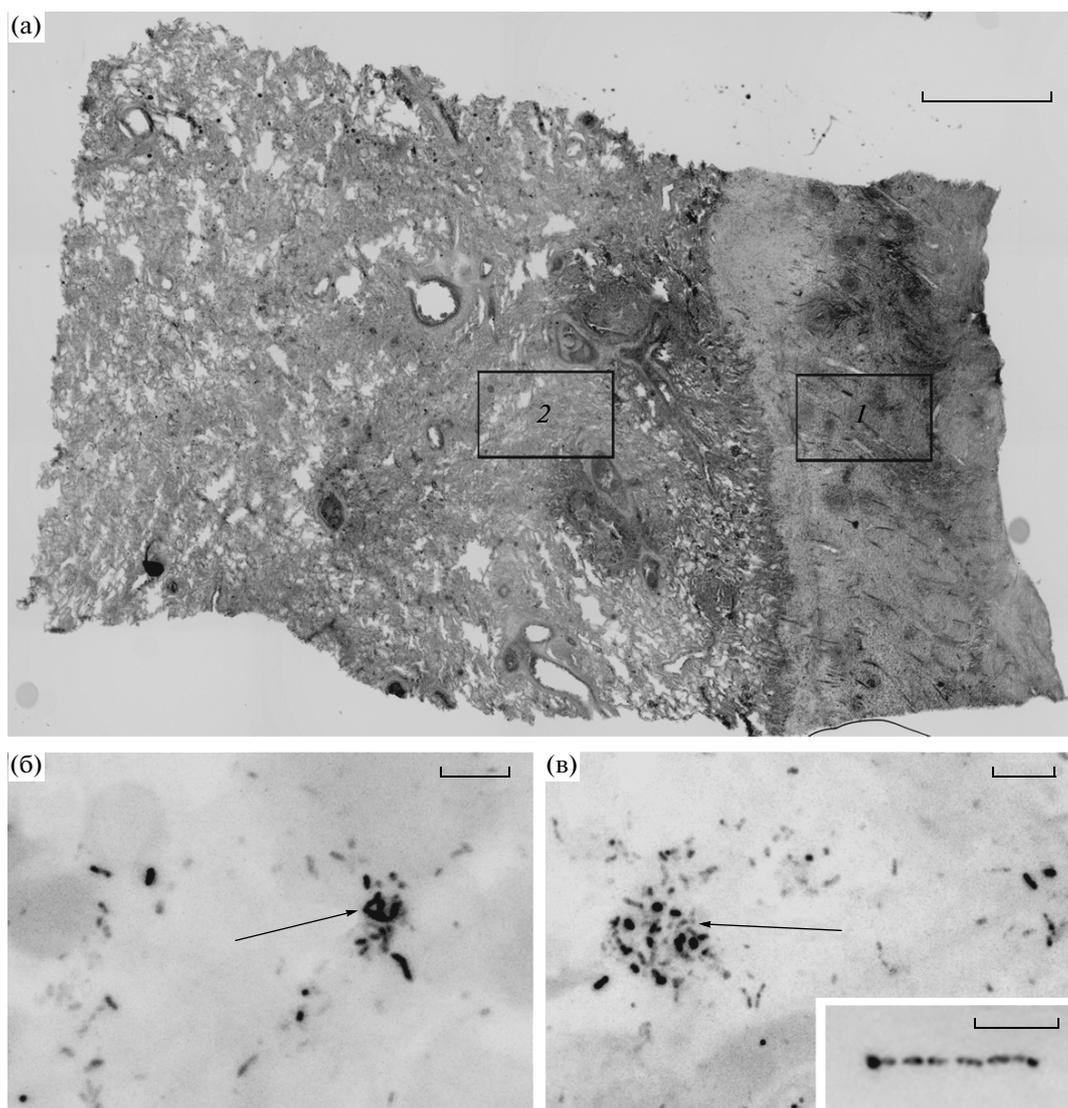


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в ткани легкого у больных туберкулезом. а – обзорный снимок среза легочной ткани (объектив 4×, сшивка 20 промежуточных изображений). 1 и 2 – соответственно участки казеозного некроза и перифокальной области, в которых проводился дальнейший поиск и анализ МБТ. б – участок казеозного некроза (объектив 60×, проекция из 12 оптических срезов) с фрагментами, одиночными МБТ и их отдельным скоплением (стрелка). в – перифокальная область (объектив 60×, проекция из 14 оптических срезов) с фрагментами, одиночными МБТ и их скоплениями в виде цепочек и большой колонией (стрелка). На врезке показана характерная колония в виде цепочки. Масштабные линейки: а – 1 мм; б, в – 5 мкм.

1974; Fodor, 1984). Однако окраска методом Циля–Нильсена не специфична для туберкулезных микобактерий и вызывает окрашивание и других кислотоустойчивых микроорганизмов (Muller, Taylor, 1972; Henriksen, Pohlenz, 1981). С учетом того что размеры одиночных микобактерий находятся на пределе оптического разрешения микроскопа, велика вероятность не идентифицировать их в ткани при низкой плотности распределения.

В последнее десятилетие разрабатываются иммуногистохимические подходы для выявления МБТ в легочной ткани как для проведения дифференциальной диагностики, так и для научных

исследований. Наиболее часто используется парафиновая заливка материала, получают гистологические срезы стандартной толщины и проводится гистохимическое маркирование вторых антител (Ulrichs *et al.*, 2005; Эллиниди и др., 2007; Двораковская и др., 2014; Karimi *et al.*, 2014).

Нами предложен методический подход, позволяющий достаточно быстро и с высокой степенью чувствительности выявить возбудитель в операционном материале ткани легких, полученном от больных туберкулезом. Использованный метод фиксации и иммуногистохимического окрашивания позволяет провести анализ опера-

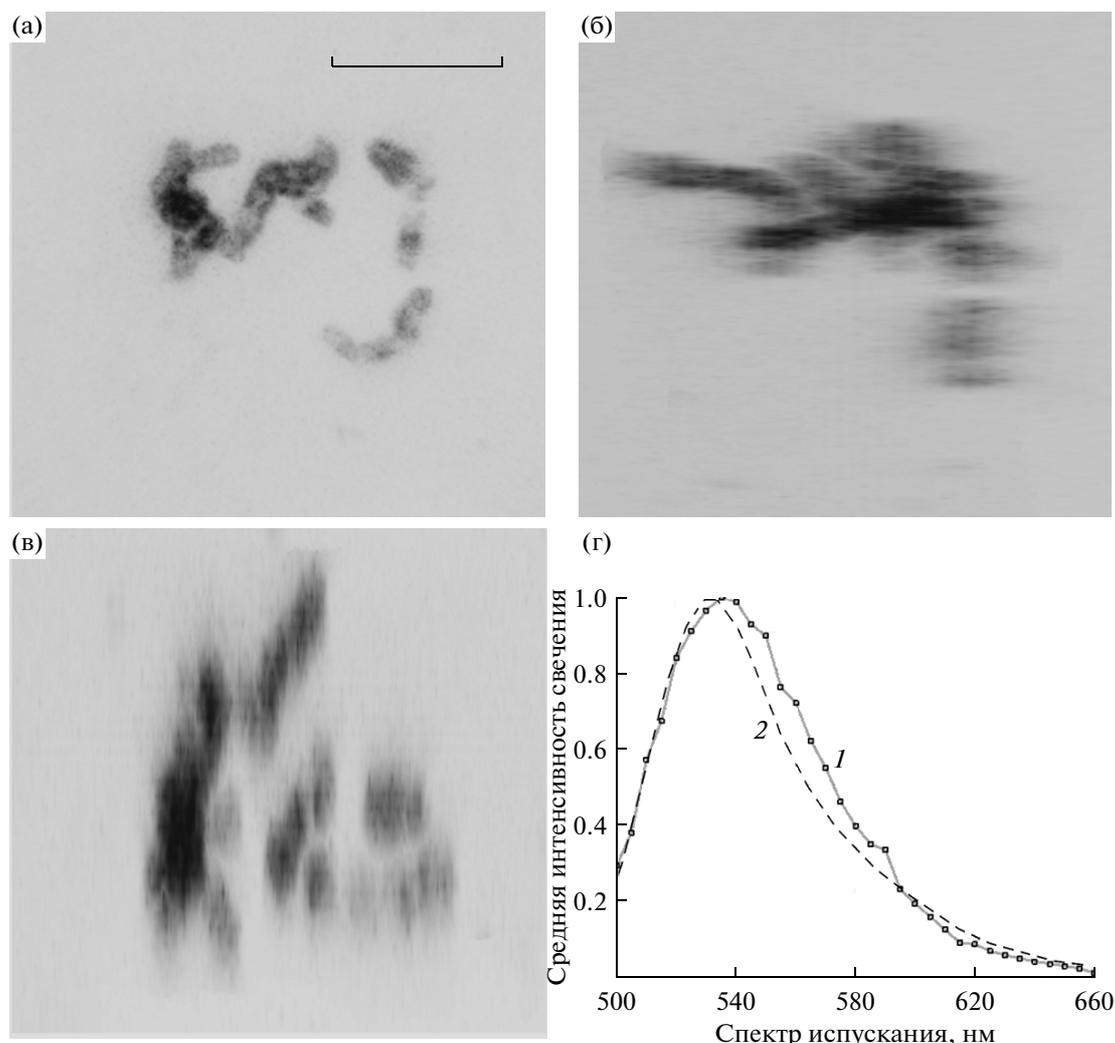


Рис. 2. Иммуногистохимическое выявление *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в ткани легкого у больных туберкулезом, окрашивание с использованием флуоресцентного маркера Alexa-488. а–в – скопление МБТ, три ортогональные проекции (xy , yz , xz соответственно) после трехмерной реконструкции (объектив 60 \times , 24 оптических среза), масштабная линейка – 5 мкм. Хорошо различимы отдельные бактерии, их форма и размеры. г – спектр испускания данной колонии (1), точно соответствующий спектру испускания использованного флуоресцентного маркера Alexa-488 (2).

ционного материала в течение нескольких часов, а также допускает длительную криоконсервацию биологического материала.

Возможности ЛСКМ позволяют получить обзорную топографию всего среза и прицельно задать область дальнейшего анализа для выявления МБТ. Использование значительно более толстых (50–200 мкм), чем для стандартной иммуногистохимии (3–5 мкм), гистологических срезов в сочетании с высокой разрешающей способностью микроскопа позволяет выявить не только крупные скопления МБТ, но и одиночные бактерии, а также их фрагменты.

Проведение трехмерной реконструкции предоставляет дополнительную информацию о топографии, размерах и структуре колоний и одиночных скоплений МБТ в различных зонах туберкулезно-

го воспаления. Преимущество ЛСКМ перед широкопольной иммунофлуоресцентной микроскопией – возможность подтвердить специфичность выявления МБТ на гистологических срезах по спектрам флуоресценции вторичных антител и исключить из анализа неспецифическую аутофлуоресценцию, что значительно повышает точность диагностики.

Метод иммуногистохимического выявления МБТ с использованием поликлональных антител против МБТ в сочетании с флуоресцентными маркерами и ЛСКМ значительно повышает возможности для выявления и изучения МБТ в легочной ткани. Мы считаем, что этот метод наиболее адекватен при проведении дифференциальной диагностики туберкулеза органов дыхания на гистологических срезах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Двораковская И.В., Майская М.Ю., Насыров Р.А., Баранова О.П., Ариэль Б.М. Морфологическое исследование в дифференциальной диагностике туберкулеза и саркоидоза // Арх. патологии. 2014. № 1. С. 27–31.
- Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии. СПб.: ИНЦ РАН, 2007. 77 с.
- Эллиниди В.Н., Ариэль Б.М., Самусенко И.А., Туголукова Л.В. Иммуногистохимический метод в диагностике туберкулеза // Арх. патологии. 2007. № 5. С. 36–37.
- Deb C., Lee C.M., Dubey V.S., Daniel J., Abomoelak B., Sirakova T., Pawar S., Rogers L., Kolattukudy P. A novel *in vitro* multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen // PLoS One. 2009. V. 4 (6). P. e6077.
- Fodor T. Bulk staining of sputum by the Ziehl–Neelsen method // Tubercle. 1984. V. 65 (2). P. 123–125.
- Fritzsche C., Stachs O., Holtfreter M.C., Nohr-Łuczak C., Guthoff R.F., Reisinger E.C. Confocal laser scanning microscopy, a new *in vivo* diagnostic tool for schistosomiasis // PLoS One. 2012. V. 7 (4). P. e34869. doi:10.1371/journal.pone.0034869.
- Hau S.C., Dart J.K.G., Vesaluoma M., Parmar D.N., Claerhout I., Bibi K., Larkin D.F. Diagnostic accuracy of microbial keratitis with *in vivo* scanning laser confocal microscopy // Br. J. Ophthalmol. 2010. V. 94. P. 982–987.
- Henriksen S.A., Pohlenz J.F. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl–Neelsen technique // Acta Vet. Scand. 1981. V. 22 (3–4). P. 594–596.
- Karimi S., Shamaei M., Pourabdollah M., Sadr M., Karbasi M., Kiani A., Bahadori M. Histopathological findings in immunohistological staining of the granulomatous tissue reaction associated with tuberculosis // Tuberculosis Res. Treat. 2014. V. 2014. Art. ID 858396. 6 p., <http://dx.doi.org/10.1155/2014/858396>.
- Marks J. Notes on the Ziehl–Neelsen staining of sputum // Tubercle. 1974. V. 55 (3). P. 241–244.
- Matsumoto B. Cell biological applications of confocal microscopy (Methods in cell biology). 2nd ed. N.Y.: Acad. Press, 2002. 507 p.
- Muller R.L., Taylor M.G. The specific differentiation of schistosome eggs by the Ziehl–Neelsen technique // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1972. V. 66 (1). P. 18–19.
- Patino S., Alamo L., Cimino M., Casart Y., Bartoli F., Garcia M.J., Salazar L. Autofluorescence of mycobacteria as a tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. 2008. V. 46 (10). P. 3296–3302.
- Pawley J. Handbook of biological confocal microscopy. 3th ed. N.Y.: Springer, 2006. 985 p.
- Ulrichs T., Lefmann M., Reich M., Morawietz L., Roth A., Brinkmann V., Kosmiadi G., Seiler P., Aichele P., Hahn H., Krenn V., Göbel U., Kaufmann S. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl–Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue // J. Pathol. 2005. V. 205. P. 633–640.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В ТКАНИ ЛЕГКИХ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

© 2016 г. М. В. Ерохина*, **, Л. П. Незлин***, В. Г. Авдиенко*,
Е. Е. Воронежская***, Л. Н. Лепеха*

*Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, 107564 Москва, Яузская аллея, 2

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Ленинские горы, 1

***Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

E-mail: nezlinl@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2015 г.

Предложен простой и надежный метод выявления *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) в гистологических препаратах легочной ткани больных туберкулезом с использованием полученных нами поликлональных антител против МБТ и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. С помощью этого метода выявлены как колонии, так и одиночные МБТ, локализованные внутри- и внеклеточно в очагах казеозного некроза и в перифокальной области. Отмечено, что автоматический захват изображений больших объемов ткани (до $2 \times 2 \times 0.1$ мм) с последующей шивкой в одно трехмерное изображение предоставляет возможность провести автоматизированный поиск и подсчет МБТ в ткани. Установлено, что регистрация спектров испускания позволяет отфильтровать специфический сигнал от неспецифической флуоресценции в препаратах.