

**Министерство здравоохранения и социального развития
Российской Федерации**

Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

**ГИСТОБАКТЕРИОСКОПИЯ
В МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ**

Пособие для врачей

**Екатеринбург
2004**

**Министерство здравоохранения и социального развития
Российской Федерации**

Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

УТВЕРЖДАЮ: _____

Председатель секции № 12 (фтизиатрия)
Ученого совета Минздрава России
Академик РАМН, профессор

М.И.Перельман

Протокол № ____ от ____ ноября 2004 г.

**ГИСТОБАКТЕРИОСКОПИЯ
В МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ**

Пособие для врачей

**Екатеринбург
2004**

АННОТАЦИЯ

Пособие посвящено применению метода гистобактериоскопического выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) в легочной ткани при патоморфологических исследованиях биопсий, операционного материала и аутопсий. Даны рекомендации по методике окраски гистологических срезов по методу Циля-Нильсена и Грама в модификации Броун-Хоппса, разработана методика оценки выявленных изменений. Метод повышает достоверность диагностики и сокращает сроки патоморфологической верификации туберкулеза, расширяет возможности оценки активности специфического воспаления и выявления острых форм туберкулеза с минимальными проявлениями специфической клеточной реакции, что позволяет своевременно оптимизировать лечебную тактику.

Пособие предназначено для фтизиатров, патологоанатомов, судебно-медицинских экспертов и др. специалистов, интересующихся вопросами патоморфологической диагностики туберкулеза.

Авторы: д.м.н. Л.М. Гринберг, врачи Е.Ю. Баранова и Д.Л. Кондрашов

Организации-разработчики:

Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии,
Уральская государственная медицинская академия Минздрава России

Условные обозначения и сокращения

МО - микроорганизмы

МБ - микобактерии – МБ

МБТ - микобактерии туберкулеза

КУМБ - кислотоустойчивые микобактерии

Введение

В последнее десятилетие эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в России оценивается патологоанатомами как эпидемия (И.П.Соловьева, 1999), негативная фаза патоморфоза заболевания (Л.М.Гринберг, 1997, 2004), реверсия туберкулеза (В.В.Серов, 1997), что, однако, не меняет существа происходящих процессов. Все авторы отмечают рост заболеваемости и смертности при туберкулезе с тенденцией к стабилизации ситуации в последние несколько лет, увеличение доли остропрогрессирующих и генерализованных форм заболевания, высокую частоту (10-20% и более) полирезистентных форм туберкулеза.

Эти негативные изменения происходят параллельно с развивающейся в России эпидемией ВИЧ-инфекции, которая в настоящее время уже характеризуется ростом числа не только ВИЧ-инфицированных на ранних стадиях болезни, но и быстрым ростом числа больных ВИЧ-индикаторными заболеваниями, в первую очередь туберкулезом, на поздних стадиях заболевания. Необходимо подчеркнуть, что, учитывая высокую инфицированность и заболеваемость туберкулезом в России, именно микобактериальные инфекции (туберкулез и в меньшей степени микобактериозы), можно полагать, будут наиболее распространенными причинами смерти больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции.

Все вышеперечисленные причины, наряду с социальной дезадаптацией определенной части населения (алкоголизм, наркомания, бродяжничество) и высоким уровнем миграции, создают новую ситуацию, в которой структура смертности при туберкулезе меняется в сторону преобладания остропрогрессирующих и не выявленных при жизни форм заболевания.

Таким образом, постоянно увеличивается число летальных случаев туберкулеза, проходящих через прозекуры неспециализированных медицинских учреждений, патологоанатомических и судебно-медицинских бюро. При этом, отмечается преобладание случаев заболевания с преимущественно экссудативно-некротической тканевой и минимальными специфическими продуктивно-клеточными морфологическими проявлениями. В сложившихся новых условиях особенно актуальным становится вопрос достоверности и объективизации посмертной патологоанатомической диагностики туберкулеза как патологоанатомами так и судебно-медицинскими экспертами.

Не менее существенным представляется вопрос объективизации патоморфологического диагноза в процессе прижизненной диагностики туберкулеза легких. Патологоанатом, исследуя бронхобиоптат при стенозе бронха, нередко наблюдает изменения, которые требуют этиологического уточнения диагноза туберкулеза. При исследовании резектатов легкого (туберкулема, инфильтрат, каверна и пр.) выявление МБ позволяет не только уточнить диагноз туберкулеза, но и правильно оценить фазу активности процесса.

Таким образом, мы полагаем, что наиболее доступным и достоверным методом объективизации патоморфологического диагноза при туберкулезе легких является гистобактериоскопическое выявление МБ. Однако, если методика гистобактериоскопического исследования мокроты и оценки его результатов разработана и описана исчерпывающе (приказ №109 Минздрава

России), то методика выявления МБ в тканях в современной литературе практически не освещена. При этом, необходимо подчеркнуть, что методики бактериоскопии мазков мокроты и гистобактериоскопии образцов ткани при определенной схожести (в основе методика окраски по Цилю-Нильсену) существенно отличаются.

Показания к применению метода

Гистобактериоскопию с окраской по Цилю-Нильсену (Ziehl-Neelsen), необходимо проводить во всех случаях патоморфологической диагностики туберкулеза легких. Гистобактериоскопия с использованием метода Грама в модификации Броун-Хоппс (Brown-Hopps) следует проводить дополнительно при необходимости выявления смешанной микрофлоры, а также при отрицательных результатах окрасок по Цилю-Нильсену и наличии неуточненных микробоподобных микроструктур.

Противопоказаний к применению метода нет.

Материально-техническое обеспечение метода

- Стандартное оборудование патоморфологических лабораторий и реактивы для гистологических исследований тканей.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Гистобактериоскопия — метод микроскопического выявления микроорганизмов в тканях. Метод может проводиться без применения селективных окрасок (окраска гематоксилином и эозином) и с применением таковых (окраски по Цилю-Нильсену, Броун-Хоппсу и др.).

МБ входят в состав рода *Mycobacterium* семейства *Mycobacteriaceae*, являются кислото- и спиртоустойчивыми аэробными неподвижными грамположительными палочковидными микроорганизмами.

К патогенным МБ относят *M. tuberculosis* (включая *M. bovis*), вызывающие туберкулез, *M. leprae*, вызывающие проказу, и условно-патогенные или атипичные МБ (более 20 видов, включая наиболее значимый *M. avium-intracellulare* complex – MAIC), вызывающие микобактериозы у иммуносупрессивных больных, прежде всего при СПИДе.

МБТ представляют собой тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1-4 мкм. и шириной около 0.3 мкм. Они, как и другие МБ, не выявляются при окраске Г+Э. Способы избирательной окраски основаны на так называемой «кислотоустойчивости» МБ и включают 2 основных этапа. Сначала повышают проницаемость клеточной стенки для насыщенного раствора красителя (расплавление восковидного слоя стенки МБ путем прогревания или протравливания детергентами), а затем окрашенный препарат промывают разведенными кислотами. Обесцвечивая большинство бактерий, этот способ сохраняет окраску микобактериальных клеток.

Наиболее распространена методика Циля-Нильсена, при которой используют карболовый фуксин Циля. Препараты промывают закисленным этанолом и докрашивают метиленовым синим. Несмотря на то, что многие авторы отмечают слабое прокрашивание МБ по методу Грама, этот метод в модификации Броун-Хоппс позволяет получить хорошее окрашивание КУМБ в гистологических препаратах. При этом, наряду с МБ могут быть выявлены и другие грам-положительные и грам-отрицательные МО.

Для успешного проведения указанных селективных окрасок МО должны быть соблюдены следующие основные правила забора и фиксации материала, а также приготовления гистологических срезов:

- Ткани не должны быть в состоянии выраженного аутолиза
- Можно использовать нефиксированный, а также фиксированный в 10% нейтральном формалине или 96° этаноле материал.

- Для исследования берут не менее 3 кусочков ткани желательно из наиболее измененных участков легкого (стенка каверна, зона распада казеозных масс в туберкулемах и пр.).
- Толщина гистологических срезов не должна превышать 5-7 мкм.

Методика окраски гистологических препаратов по Цилю-Нильсену

1. Приготовить карболовый фуксин Циля и оставить его для «созревания» при комнатной температуре на 10 дней.
2. Гистологические срезы на предметном стекле покрыть фильтровальной бумагой, не выходящей за пределы предметного стекла.
3. Стекло осторожно подогреть над пламенем спиртовки до появления паров, поддерживая температуру 1-2 минуты. Можно повторить процедуру 2-3 раза с интервалом 5-10 минут, что даст более интенсивное прокрашивание КУМБ.
4. Оставить краску на стекле еще на 20-25 минут без подогрева.
5. Промыть стекло в воде, осторожно сняв фильтровальную бумагу.
6. Дифференцировать в 1-3% растворе солянокислого спирта до розового цвета среза.
7. Промыть в воде, высушить.
8. Подкрасить метиленовым синим или гематоксилином.
9. Промыть в воде, подсушить, заключить срезы.

Результат: КУМБ окрашиваются в карминово-красный цвет, другие микроорганизмы - в темно-синий, фон препарата голубоватый.

Следует подчеркнуть, что несмотря на кажущуюся простоту окраски, методика весьма капризна и требует тщательной проработки всех этапов.

Поэтому необходимым условием является наличие положительного и отрицательного контроля.

Окраска по методу Броун-Хоппс (Brown-Hopps) - модифицированная методика окраски по Граму

ПРИНЦИП: Кристалл-виолет в сочетании с препаратами йода образуют основной краситель. Грам-положительная и грам-отрицательная флора окрашивается в темно-синий, почти черный цвет. Затем производится обесцвечивание, при котором грам-отрицательные бактерии теряют окраску. Последующие окрашивание основным фуксином придает им розовато-красный цвет.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ:

1. 1% р-р кристалл-виолета.

а) Кристалл-виолет 1,0 г

Дистиллированная вода 100 мл

Хранить в темной посуде при комнатной температуре. Срок хранения 3 месяца.

2. Р-р йода по Граму.

Йод 1,0 г

Иодид калия 2,0 г

В мерном градуированном цилиндре добавить дистиллированной воды до 300 мл. Хранить в темной посуде при комнатной температуре. Срок хранения 1 год.

3. 1% р-р основного фуксина.

Основной фуксин	1,0 г
Дистиллированная вода	100 мл

Фильтруют перед использованием. Хранить в темной посуде при комнатной температуре. Срок хранения 3 месяца.

4. Р-р Галлего.

Смешать дистиллированной воды	50 мл
формальдегид (37-40%)	1 мл
ледяной уксусной кислоты	0,5 мл

Хранить в темной посуде при комнатной температуре неограниченное время.

5. Р-р ацетон-пикриновой кислоты.

Пикриновая кислота	0,25 г
Ацетон	500 мл

Хранить в темной посуде при комнатной температуре неограниченное время.

6. Р-р ацетона-ксилола.

Ацетон	50 мл
Ксилол	50 мл

Хранить в темной посуде при комнатной температуре неограниченное время.

ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ:

1. Депарафинирование в ксилоле - 2 раза по 5 мин.
2. Срезы проводят по спиртам до дистиллированной воды.
3. В 1-ом р-ре - 1 мин.
4. Промывка в проточной воде.

5. Во 2-ом р-ре - 1 мин.
6. Промывка в проточной воде.
7. Обесцвечивание в ацетоне, пока общий фон препарата не станет почти бесцветным.
8. Немедленно хорошо промыть.
9. Погружение в р-р N 3 на 5 мин.
10. Промывка в проточной воде.
11. Р-р N 4 - 2 раза по 5 мин.
12. Промыть.
13. В течение 30 секунд обрабатывается ацетоном.
14. Р-р N 5 - 2-3 мин.
15. Р-р N 6 - 2 раза.
16. Промыть в ксилоле и заключить в бальзам.

РЕЗУЛЬТАТЫ: грам-пол. микроорганизмы - сине-черные, грам-отр. микроорганизмы - красные, фон - желтый.

Основные особенности методики гистобактериоскопии

Гистобактериоскопические окраски необходимо проводить с положительным и отрицательным контролем. Положительным контролем является гистологический срез, окрашиваемый параллельно исследуемому и заведомо содержащий большое количество КУМБ (при окраске по Цилю-Нильсену) или других МО (при окраске по методу Броун-Хоппс). Отрицательным контролем является гистологический срез, не содержащий МО. Наличие контрольных срезов позволяет избежать ложноположительных и ложноотрицательных заключений.

Микроскопию следует начинать с малого увеличения ($\times 80$), при котором в части случаев уже можно увидеть крупные скопления бактерий.

Далее можно переходить на большее увеличение ($\times 200$, $\times 400$, редко $\times 900$). Только просмотрев все поля зрения в срезе на разных увеличениях, можно сделать вывод об отсутствии МО в исследуемом срезе.

Гистобактериоскопия позволяет судить о распределении МО в клетках и тканях, сопоставлять их с имеющимися морфологическими изменениями. Соответственно и поиск МО следует соотносить с имеющейся морфологической картиной, т.е. искать там, где МБ должны быть (внутренний слой каверны, участки лейкоцитарной инфильтрации и распада в казеозных массах и пр., см. рис. 1).

Оценка гистотопографического распределения КУМБ в тканях при туберкулезе легких

Проведенное исследование позволило выделить варианты гистотопографического распределения КУМБ в тканях при туберкулезе легких: макроколонии, микроколонии, группы, диффузный вариант, одиночные и единичные КУМБ (рис. 2). Предлагаемая группировка позволяет проводить качественно-количественный анализ распределения КУМБ (и других МО) в тканях при гистобактериоскопии (см. табл. 1).

Следует подчеркнуть, что почти в половине случаев сочетается несколько вариантов распределения КУМБ. Например, наряду с диффузной формой распределения могут встретиться КУМБ в виде макроколоний, микроколоний или групп. Наличие очаговых вариантов распределения КУМБ подтверждает необходимость исследования нескольких кусочков ткани легкого, желательно не менее трех.

При нахождении единичных палочек всегда возникает вопрос о достоверности выявления КУМБ.

Исследование более 1000 аутопсийных наблюдений туберкулеза легких (материалы централизованного ПАО и судебно-медицинского бюро г. Екатеринбурга за последние 10 лет) показало, что в современных

условиях в структуре смертности при туберкулезе преобладают остропрогрессирующие формы заболевания. В этих случаях практически в 100% удается выявить КУМБ при гистобактериоскопии. Однако, такой результат может быть получен только при тщательно соблюдении рекомендаций по забору, фиксации материала, проведению окраски и гистобактериоскопии.

Окраска по Цилю-Нильсену является обязательной при проведении морфологического исследования резектатов легкого у больных туберкулезом. Многолетний опыт показывает, что при туберкулезных инфильтратах, туберкулемах и кавернах частота выявления КУМБ зависит от фазы активности процесса (неактивная и малоактивная, активная и прогрессирующая). Так при малоактивных и неактивных туберкулемах КУМБ практически не выявляются. При активных туберкулемах КУМБ определяются в 50-70% случаев преимущественно в виде одиночных палочек, групп и микроколоний, как правило, в зоне распада казеозных масс. В стенках активных каверн трехслойного строения удается выявить КУМБ в 70-80% случаев обычно в пределах внутреннего некротического слоя.

Таблица 1

Группировка вариантов распределения КУМБ в тканях

Вариант распределения КУМБ	Без микроскопа	×40-80	×200	×400-900
Макроколонии	Видны в окрашенном срезе, 1-5 мм	Занимает все поле зрения	Занимает все поле зрения	Занимает все поле зрения
Микроколонии	-	Крупные скопления до 1/2 поля	Все поле зрения	Все поле зрения

		зрения		
Диффузно-рассеянный вариант	-	-	Большое к-во палочек, лежащих отдельно и хаотично	Хорошо различимы, от 10 до 100 в поле зрения
Группа	-	-	Одиночные или множественные небольшие скопления	Группа КУМБ, обычно 5-20
Одиночные КУМБ	-	-	Видны не четко	Одиночные палочки, обычно 1-2 в поле зрения
Единичные КУМБ	-	-	-	1-3 КУМБ во всех полях зрения

Эффективность использования метода гистобактериоскопии при окраске по Цилю-Нильсену при различных формах туберкулеза легких по данным аутопсий, резекций и биопсий показана в таблице 2.

Таблица 2

Эффективность гистобактериоскопии при туберкулезе легких

Форма туберкулеза легких	Характер материала	% выявления КУМБ в тканях
Прогрессирующий фиброзно-кавернозный туберкулез легких	аутопсии	90%-95% в кавернах, до 80% в фокусах отсева
Туберкулезная «казеозная» пневмония	аутопсии	80%-90%
Милиарный туберкулез	аутопсии	70%-80%
Туберкулемы	резектаты	50%-70% (в зависимости от

		активности процесса)
Туберкулез бронха	биоптаты	70%-80%

Таким образом, гистобактериоскопия является эффективным методом, расширяющим возможности морфологической диагностики туберкулеза. Гистобактериоскопию с окраской по Цилю-Нильсену необходимо использовать во всех случаях патоморфологической верификации диагноза туберкулеза легких. Окраска по Броун-Хоппсу может использоваться в качестве высокоинформативного дополнительного метода исследования, позволяющего выявлять гистобактериоскопически грам-положительные и грам-отрицательные МО.

Иллюстрации

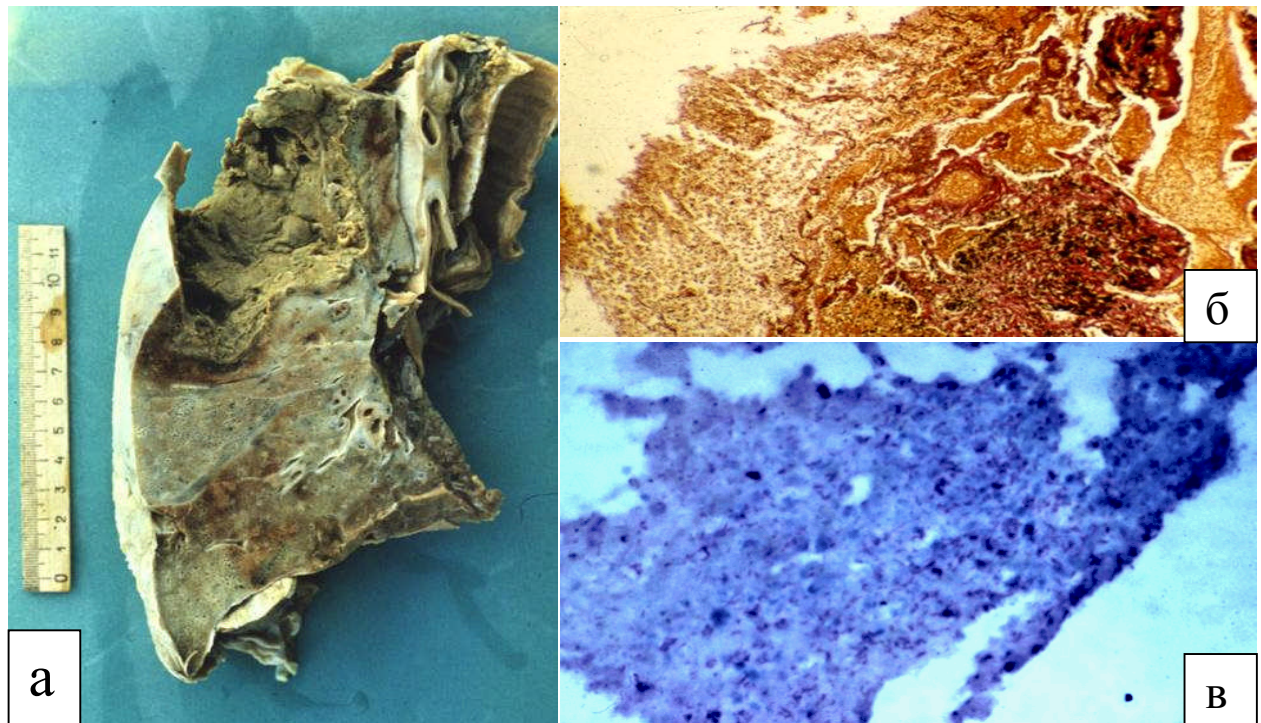


Рис.1 Секционное наблюдение. а) Макропрепарат. Тотальная «пневмония» с гигантским абсцессом в верхней доли. б) стенка полости – отсутствии специфической клеточной реакции. Окраска Г+Э. Ув.×80. в) Гистобактериоскопия - множественные КУМБ, рассеянные и группы, в зоне некротических масс в стенке полости. Окраска по Цилю-Нильсену. Ув.×400.

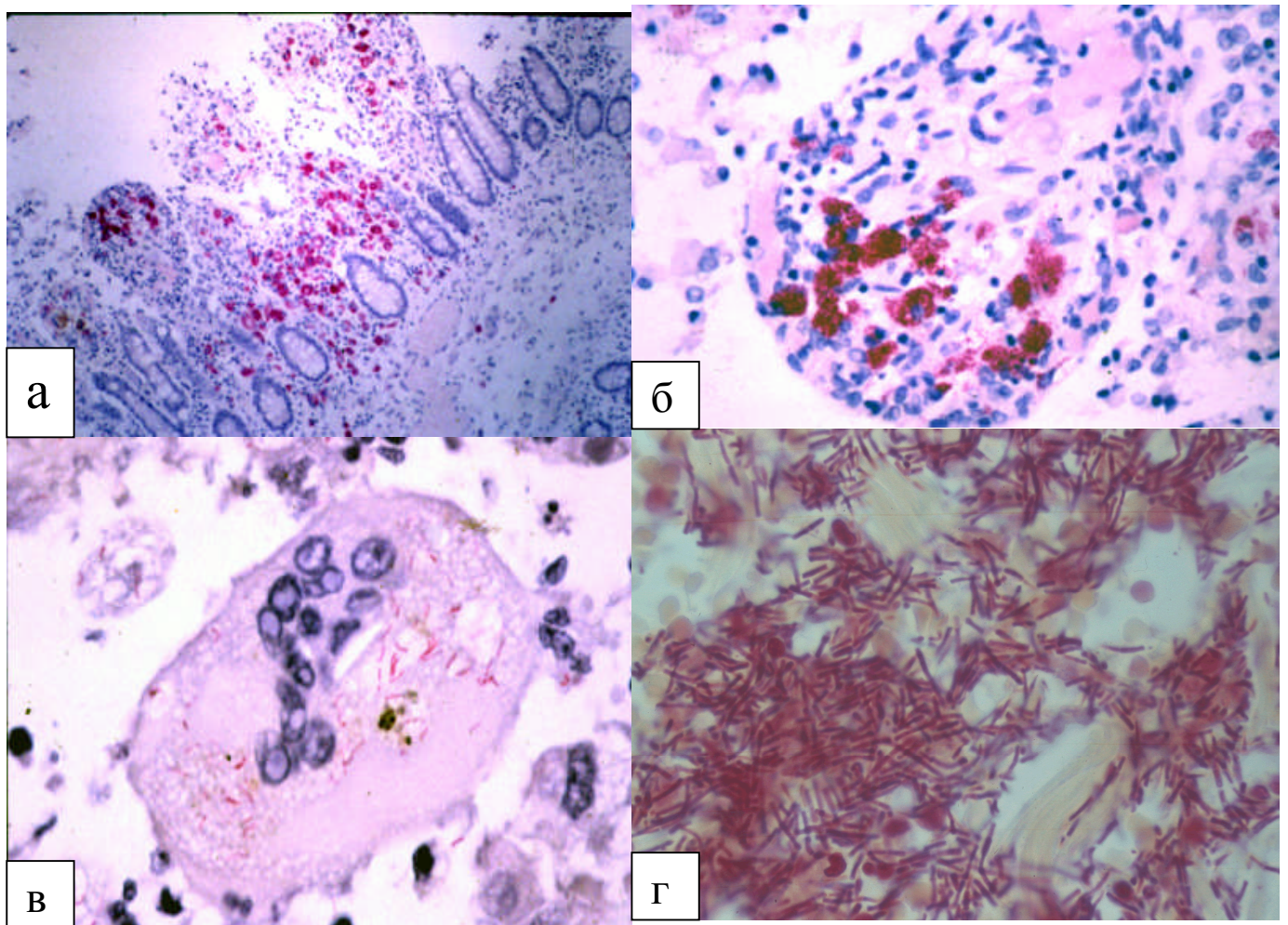


Рис.2 Варианты распределения КУМБ в тканях.

а) Множественные группы. Окр. по Цилю-Нильсену. Ув.×200.

б) ЭК-гранулема с множеством КУМБ в эпителиоидных клетках. Окр. по Цилю-Нильсену. Ув.× 400.

в) Множественные КУМБ в гигантской многоядерной клетке Лангханса. Окр. по Цилю-Нильсену. Ув.× 600.

г) Микроколония. Окр. по Броун-Хоппс. Ув.×900.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринберг Л.М. Патологическая анатомия и современные аспекты патоморфоза туберкулеза //Оптимизация работы фтизиатрической службы в новых социально-этиологических условиях промышленного региона.-Екатеринбург, 1996.-С.29.
2. Гринберг Л.М. Актуальные вопросы патологии и патоморфоза микобактериальных инфекций //Актуальные вопросы организации патологоанатомической службы. -Магнитогорск, 2004.- С.278-281.
3. Серов В.В. Учение о патоморфозе: прошлое и настоящее // Арх.патол., 1997.-№4.- С.3-6.
4. Соловьева И.П. О необходимости унификации клинικο-анатомической классификации туберкулеза // Арх.патол., 1997.-№4.- С.7-9.
5. Хмельницкий О.К., Беянин В.Л. Выявление возбудителей инфекционных болезней при морфологическом исследовании: Пособие для врачей.- СПб.: СПбМАПО, 1996.- С.62.
6. Цинзерлинг А.В. Обработка и окраска мазков и срезов для выявления микроорганизмов // Арх.патол.-1992.- № 5.-с.35-40.
7. Brown R.C., Hopps H.C. // Am. J. Clin. Pathol.-1973.-Vol.60.- P.234-240.