

# Histokemijske metode bojenja u dijagnostici kroničnih granulomatoznih upalnih bolesti

---

**Biondić, Nina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Applied Health Sciences / Zdravstveno veleučilište**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:139:160489>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Sveznalica](#)



ZDRAVSTVENO VELEUČILIŠTE  
STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

NINA BIONDIĆ

HISTOKEMIJSKE METODE BOJENJA U DIJAGNOSTICI KRONIČNIH  
GRANULOMATOZNIH UPALNIH BOLESTI

ZAVRŠNI RAD



ZAGREB, 2024.

ZDRAVSTVENO VELEUČILIŠTE  
STRUČNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

HISTOKEMIJSKE METODE BOJENJA U DIJAGNOSTICI KRONIČNIH  
GRANULOMATOZNIH UPALNIH BOLESTI

ZAVRŠNI RAD

NINA BIONDIĆ

Dr. sc. IVANA ILIĆ, prof.v.š.

ZAGREB, 2024.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. HISTOKEMIJSKE METODE BOJENJA</b> .....	2
<b>2.1. Giemsa</b> .....	3
<b>2.2. PAS</b> .....	5
<b>2.3. GMS</b> .....	8
<b>2.4. Ziehl Neelsen</b> .....	12
<b>2.5. Warthin – Starry</b> .....	14
<b>2.6. Steiner i Steiner</b> .....	17
<b>3. GRANULOMATOZNE UPALE</b> .....	21
<b>3.1. Tuberkuloza</b> .....	22
<b>3.2. Sarkoidoza</b> .....	24
<b>3.3. Gljivične infekcije</b> .....	26
<b>3.4. Toksoplazmoza</b> .....	29
<b>3.5. Bruceloza</b> .....	30
<b>3.6. Strano tijelo</b> .....	31
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	33
<b>5. LITERATURA</b> .....	34

## SAŽETAK

Granulomatozna upala poseban je oblik kronične upale, a očituje se stvaranjem granuloma sačinjenih od makrofaga i limfocita, no postoje i dodatna obilježja koja su manje ili više karakteristična za određene bolesti. Stvaranje granuloma može biti potaknuto mikroorganizmima kao što su *Mycobacterium tuberculosis*, gljivice, *Toxoplasma gondii*, *Brucella melitensis* kao i neinfektivnim uzrocima poput sarkoidoze i reakcijom na strano tijelo. U granulomatoznoj upali uzrokovanoj *M. tuberculosis* i *H. capsulatum* nalazimo kazeozne granulome. Nekazeozne granulome nalazimo kod sarkoidoze, a supurativne granulome kod nekih bakterijskih infekcija. Zaostane li u organizmu strano tijelo doći će do stvaranja granuloma stranog tijela. S obzirom na to da sama pojava granuloma nije dovoljno specifičan patohistološki nalaz, za identifikaciju uzročnika i postavljanje ispravne dijagnoze u svrhu olakšavanja mikroskopske analize koriste se histokemijske metode bojenja. Prije samog bojenja potrebno je uzeti odgovarajući uzorak tkiva, transportirati ga do histološkog laboratorija, fiksirati ga, a zatim slijedi preuzimanje, prožimanje, uklapanje, rezanje pa bojenje. Nakon bojenja slijedi pokrivanje, pregled s postavljanjem dijagnoze i arhiviranje. Histokemijske metode bojenja upotrebljavaju se za isticanje i razlučivanje pojedinih strukturnih komponenti tkiva i organa, a temelje se na specifičnim kemijskim reakcijama ili na jakom uzajamnom afinitetu za povezivanje među molekulama. Upotrebljavaju se organski spojevi koji mogu biti kiseli ili bazični te imaju afinitet za stvaranje elektrostatskih veza s ioniziranim radikalima u tkivima. U dijagnostici granulomatoznih bolesti koriste se bojenje po Giemsi za prikaz zavojitih bakterija i protozoja kao što je toksoplazma, kombinacija perjodne kiseline i Schiffovog reagensa (PAS) te impregnacija srebra po Gomoryju (GMS) za prikaz gljivica kao što su *Candida* ili *Pneumocystis*, bojenje po Ziehl-Neelsenu za dokaz acidorezistentnih štapićastih bakterija kao *M. tuberculosis*, Warthin-Starry te Steiner i Steiner metoda za prikaz spiroheta i *B. henselae*. Pravilna identifikacija uzročnika granulomatozne upale od izuzetne je važnosti za postavljanje ispravne dijagnoze koja je temelj odabira odgovarajuće terapije, što je ključno za uspješno liječenje pacijenata.

Ključne riječi: histokemijska bojanja, Giemsa, PAS, GMS, granulomatozne upale, granulomi

## 1. UVOD

Granulomatozna upala vrsta je kronične upale koju karakterizira stvaranje granuloma. Granulomi su histološki građeni od makrofaga i limfocita, a ponekad se mogu naći i druge kronične upalne stanice poput plazma stanica (1). Najčešće kronične granulomatozne bolesti su tuberkuloza, sarkoidoza, gljivične infekcije, toksoplazmoza, bruceloza ili reakcija na strano tijelo u organizmu (1,2).

U bolestima kao što je tuberkuloza, gljivične infekcije, toksoplazmoza i bruceloza granulomi su potaknuti mikrobiološkom upalom, odnosno infekcijom. Kod sarkoidoze, Crohnove bolesti i zaostajanja stranog tijela u organizmu nastanak granuloma nije infektivne etiologije iako se zapravo kod sarkoidoze i Crohnove bolesti još ne zna uzrok ili uzročnik koji potiče stvaranje granuloma(1,3). Iako su histološki u svim navedenim bolestima granulomi građeni od histiocita i limfocita, ponekad postoje i dodatna obilježja koja su više ili manje karakteristična za određene bolesti pa tako kazeozne granulome, odnosno granulome s kazeoznom nekrozom u središtu nalazimo kod infekcije *M. tuberculosis* i *H. capsulatum*, dok nekazeozne granulome nalazimo kod sarkoidoze. U granulomima stranog tijela nalazimo multinuklearne orijaške stanice koje u svojim citoplazmama sadrže strano tijelo (1). S obzirom na to da granulom nije dijagnoza niti dovoljno specifičan patohistološki nalaz bitno je utvrditi uzrok nastanka granuloma zbog postavljanja ispravne dijagnoze te izbora pravilnog liječenja.

U svrhu olakšavanja mikroskopske analize koriste se dodatna histokemijska bojenja preparata za isticanje i razlučivanje pojedinih strukturalnih komponenti tkiva i organa. Bojenje se temelji na upotrebi organskih spojeva koji mogu biti kiseli ili bazični i koji imaju afinitet za stvaranje elektrostatskih veza s ioniziranim radikalima u tkivima (4). Bojenja koja se koriste u dijagnostici granulomatoznih bolesti su bojenje po Giemsi, kombinacija perjordne kiseline i Schiffovog reagensa (Periodic Acid Schiff – PAS), impregnacija srebra po Gomoryju (GMS), bojenje po Ziehl-Neelsenu, Warthin-Starry i Steiner i Steiner bojenje.

## 2. HISTOKEMIJSKE METODE BOJENJA

Histokemijske metode bojenja služe kao spona morfologije i funkcije stanica ili tkiva, a koriste se za određivanje i lokalizaciju kemijskih komponenti u stanicama i tkivima na histološkim preparatima (5).

Početak 19. stoljeća u Francuskoj započela su prva histokemijska bojenja u svrhu istraživanja biološke strukture i kemijskih komponenti. Bojenjem biljke otopinom kalijevog jodida, svjetlosnom mikroskopijom, uočeno je da je škrob obojen plavo. Prvotno su histokemiju nazivali mikroskopskom kemijom, a bila je namijenjena promatranju kemijskih reakcija *in situ* pod mikroskopom. Anilinske boje često su se koristile za bojenje tkiva u anatomiji i patologiji početkom 20. stoljeća (5).

Histokemijske analize odvijaju se u histološkom laboratoriju koji je temelj djelovanja u patologiji, koja je u svojoj osnovi morfološka disciplina te analizom uzoraka tkiva i stanica postavlja dijagnoze. Prije samog bojenja uzorka tkiva, bez obzira radi li se o uzorku dobivenom tijekom obdukcije tijela bolesnika umrlih u zdravstvenim ustanovama, bioptičkim ili kirurškim zahvatima na bolesnicima, uzorak tkiva prolazi kroz nekoliko faza. Faze kroz koje uzorak tkiva prolazi su uzimanje uzorka, transport do patologije, fiksacija, preuzimanje, prožimanje, uklapanje, rezanje i bojenje, a nakon bojenja slijedi pokrivanje, pregled s postavljanjem dijagnoze i arhiviranje (1).

Postupci bojenja zasnivaju se na specifičnim kemijskim reakcijama ili na jakom uzajamnom afinitetu za povezivanje među makromolekulama. Smještaj neke tvari unutar stanice ili tkiva može se odrediti elektronskim ili svjetlosnim mikroskopom zahvaljujući histokemijskim metodama čijom primjenom nastaju netopljivi obojeni ili elektronski gusti sastojci (6). Za bojenje se mogu koristiti standardni postupci bojenja i posebni postupci. Osnovno bojenje u patologiji je hematoksilin-eozin (HE), a njime se dobro pokazuju jezgra i citoplazma te međustanična tvar.

U posebne tehnike bojenja spadaju Giemsa (po Giemsi) za prikaz jezgara i nukleola; PAS (Periodic acid Schiff – perijodna kiselina i Schiffov reagens) za prikaz mukopolisaharida, glikogena, proteina; van Gieson (po Van Giesonu) za prikaz kolagena i elastičnih vlakana; Mallory (po Malloryu) za prikaz kolagena, epitela i ostalih potpornih tkiva te eritrocita; Gömöry (po Gömöryu)

za prikaz retikulina; Alcijan plavo za prikaz mukopolisaharida; Berlinsko modrilo (prusko modrilo u anglosaksonskoj literaturi) za hemoglobinski pigment (1).

## 2.1. Giemsa

Bojenje po Giemsi upotrebljava se za bojenje zavojitih bakterija, protozoja, mikoplazma, rikecija i krvnih razmazaka. Koncentrirana mješavina metilenskog modrila, metilen azura i eozina u glicerolu i apsolutnom metilnom alkoholu čini otopinu Giemse (7).

### Fiksacija:

Zenkerov fiksativ

### Otopine:

Giemsin otopina

Giemsin prah	1.0 mg
Glicerol	66.0 ml
Alkohol, metilni	66.0 ml

Pomiješati giemsin prah i glicerol te ostaviti na 60°C, nakon dva sata dodati metilni alkohol.

Giemsin radna otopina

Giemsin otopina	1.25 ml
Metilni alkohol	1.5 ml
Destilirana voda	50.0 ml

Rosin alkoholna otopina

Rosin, bijela	10.0 mg
Alkohol, 100%-tni	100.0 ml



Rosin radna alkoholna otopina

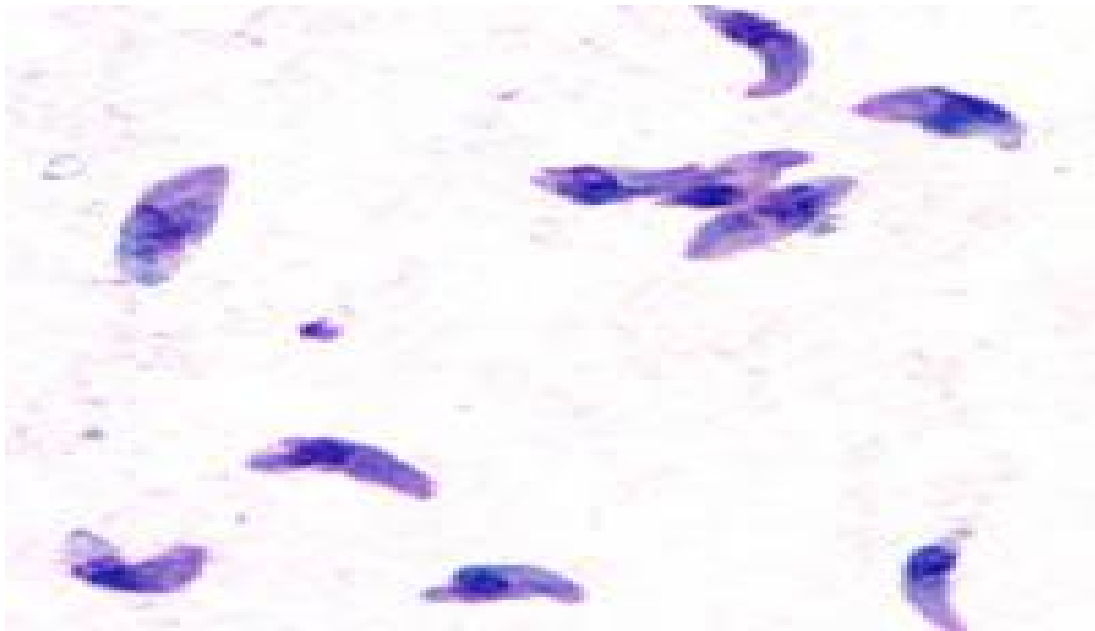
Rosin otopina	5.0 ml
Alkohol, 95%-tni	40.0 ml

Postupak bojanja:

1. Deparafinirati i hidratizirati u destiliranoj vodi
2. Jodom ukloniti kristale živinog klorida, izbistriti natrijevim tiosulfatom
3. Ispirati tekućom vodom 15 minuta
4. Isprati destiliranom vodom
5. Ostaviti u radnoj otopini Giemse tijekom noći
6. Diferencirati u radnoj Rosin alkoholnoj otopini dok sekcije ne dobiju ljubičasto rozu boju. Pregledati pod mikroskopom
7. Dehidrirati u apsolutnom alkoholu pa izbistriti u ksilenu. Svaki po dvije izmjene
8. Fiksirati permountom ili histocladom

Rezultati:

Jezgra se oboji plavo, kolagen i ostali tkivni elementi rozo, rikacije ljubičasto, a bakterije plavo (8).



Slika 1 Prikaz tahizoita *Toxoplasme gondii*, obojeno po Giemsi

Izvor: [https://www.cych.org.tw/lab/12%E6%95%99%E5%AD%B8/autorunDPDx/DPDx/HTML/Frames/S-Z/Toxoplasmosis/body\\_Toxoplasmosis\\_mic1.htm](https://www.cych.org.tw/lab/12%E6%95%99%E5%AD%B8/autorunDPDx/DPDx/HTML/Frames/S-Z/Toxoplasmosis/body_Toxoplasmosis_mic1.htm)

## 2.2. PAS

Perjodna kiselina i Schiffov reagens (*Periodic acid Schiff*) služi za prikaz mukopolisaharida, glikogena i proteina (1). Može se koristiti i za otkrivanje mikroorganizama kao što su *Candida* ili *Pneumocystis* (9).

### Fiksacija:

10%-tni puferirani neutralni formalin

Otopine:

Natrijev acetat, 0,200M (M/5)

Natrijev acetat	13.6 mg
Destilirana voda	500.0 ml

Otopina periodne kiseline

Periodna kiselina	0.8 mg
Destilirana voda	20.0 ml

Otopiti, zatim dodati:

Natrijev acetat, 0,200M (M/5)	10.0 ml
Alkohol, 95%-tni	70.0 ml

Prije svake upotrebe potrebno je pripremiti svježu otopinu.

Reducirajuća otopina za ispiranje

Kalijev jodid	2.0 mg
Natrijev tiosulfat	2.0 mg
Destilirana voda	40.0 ml

Otopiti, zatim dodati:

Alkohol, 95%-tni	60.0 ml
2N klorovodična kiselina (2 mol/L)	1.0 ml

Prije svake upotrebe potrebno je pripremiti svježu otopinu.

#### Otopina Schiffovog leukofuksin reagensa

Otopiti 1 mg bazičnog fuksina u 200 ml vruće destilirane vode. Zagrijavati do vrenja. Ohladiti na 50°C. Filtrirati te dodati 20 ml klorovodične kiseline. Nakon hlađenja dodati 1 mg natrijevog bisulfita (bezvodni) ili natrijev metabisulfit. Čuvati na tamnom mjestu 48 sati sve dok otopina ne postane svijetlo žuta. Držati u hladnjaku.

#### Otopina Mayerovog hematoksilina

Hematoksilin, kristali	1.0 mg
Destilirana voda	1000.0 ml
Natrijev jodat	0.2 mg
Amonijak	50.0 mg
Limunska kiselina	1.0 mg
Koral hidrat	50.0 mg

Otopiti amonijak u vodi, bez zagrijavanja, zatim dodati i otopiti hematoksilin. Otopini dodati natrijev jodat, limunsku kiselinu i kloral hidrat te miješati do sjedinjenja. Otopina je crvenkasto ljubičaste boje.

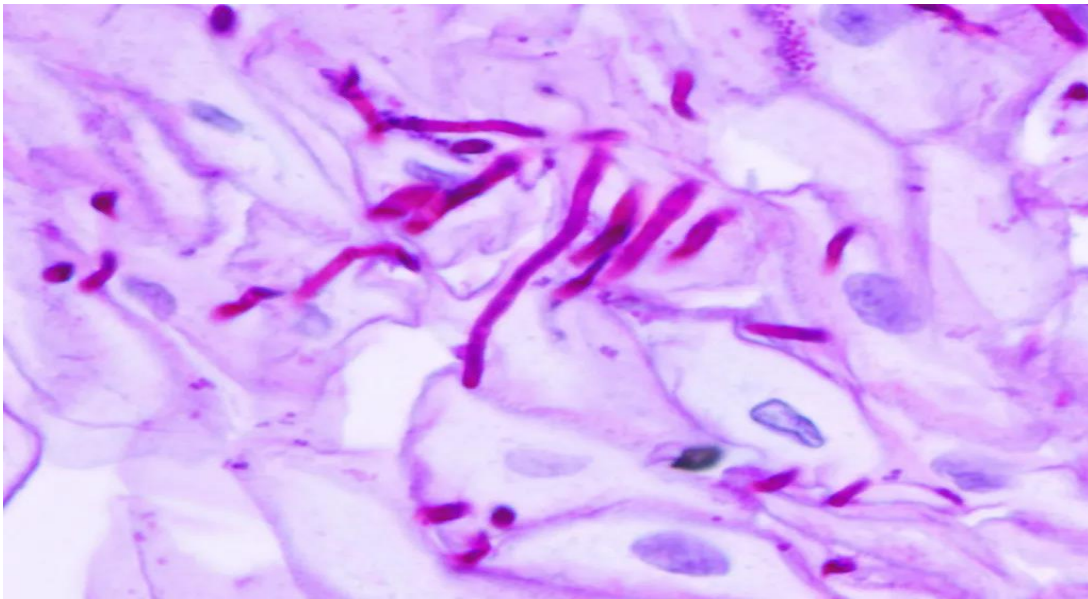
#### Postupak bojanja:

1. 70%-tni alkohol, 5 minuta
2. Oksidirati u otopini perjodne kiseline 5 minuta
3. 70%-tni alkohol, nekoliko izmjena, 2 minuta svaka
4. Reducirajuća otopina za ispiranje, 5 minuta
5. 70%-tni alkohol, nekoliko izmjena, 2 minuta svaka
6. Isprati u destiliranoj vodi
7. Otopina Schiffovog leukofuksin reagensa, 35-60 minuta
8. Držati pod tekućom vodom 10 minuta
9. Otopina Mayerovog hematoksilina, 10 minuta

10. Ispirati tekućom vodom 15 minuta
11. Dehidrirati u 95%-tnom alkoholu, apsolutnom alkoholu, izbistriti u ksilenu. Svaki po dvije izmjene
12. Fiksirati permountom ili histocladom

Rezultati:

Stijenka krvne žile oboji se purpurnocrveno, a jezgre plavo (8). Gljivice se oboje svijetlo ružičasto ili crveno (9).



Slika 2 Prikaz ezofagealne kandidijaze, obojeno po PAS-u

Izvor: <https://aladdincreations.com/periodic-acid-schiff-pas-staining/>

### 2.3. GMS

Bojenje po GMS-u, odnosno impregnacija srebra po Gomoryju, koristi se za bojenje gljivica u uzorku tkiva i nekih bakterija kao što su Actinomyces bovis te Nocardia asteroides.

Fiksacija:

10%-tni puferirani neutralni formalin.

Otopine:

4%-tna otopina kromne kiseline

Kromna kiselina	4.0 mg
Destilirana voda	100.0 ml

5%-tna otopina srebrovog nitrata

Srebro-nitrat	5.0 mg
Destilirana voda	100.0 ml

3%-tna otopina metenamina

Heksametilentetramin (metenamin)	3.0 mg
Destilirana voda	100.0 ml

5%-tna otopina boraksa

Boraks	5.0 mg
Destilirana voda	100.0 ml

Otopina metenamin – srebrovog nitrata

Srebrov nitrat, 5%-tna otopina	5.0 ml
Metenamin, 3%-tna otopina	100.0 ml

Nakon miješanja otopina dolazi do stvaranja bijelih precipitata koji nestaju nakon protresanja. Bistra otopina ostaje upotrebljiva mjesecima. Pohraniti u hladnjaku.

Radna otopina metenamin – srebrovog nitrata

Otopina metenamin – srebrovog nitrata	25.0 ml
Destilirana voda	25.0 ml
Boraks, 5%-tna otopina	2.0 ml

1%-tna otopina natrij-bisulfita

Natrij-bisulfit	1.0 mg
Destilirana voda	100.0 ml

0.1%-tna otopina zlatovog klorida

Zlatov klorid, 1%-tna otopina	10.0 ml
Destilirana voda	90.0 ml

Otopina se može koristiti više puta.

2%-tna otopina natrij-tiosulfata

Natrij-tiosulfat	2.0 mg
Destilirana voda	100.0 ml

0.2%-tna otopina *Light Green SF Yellowish*

<i>Light Green, SF Yellowish</i>	0.2 mg
Destilirana voda	100.0 ml
Ledena octena kiselina	0.2 ml

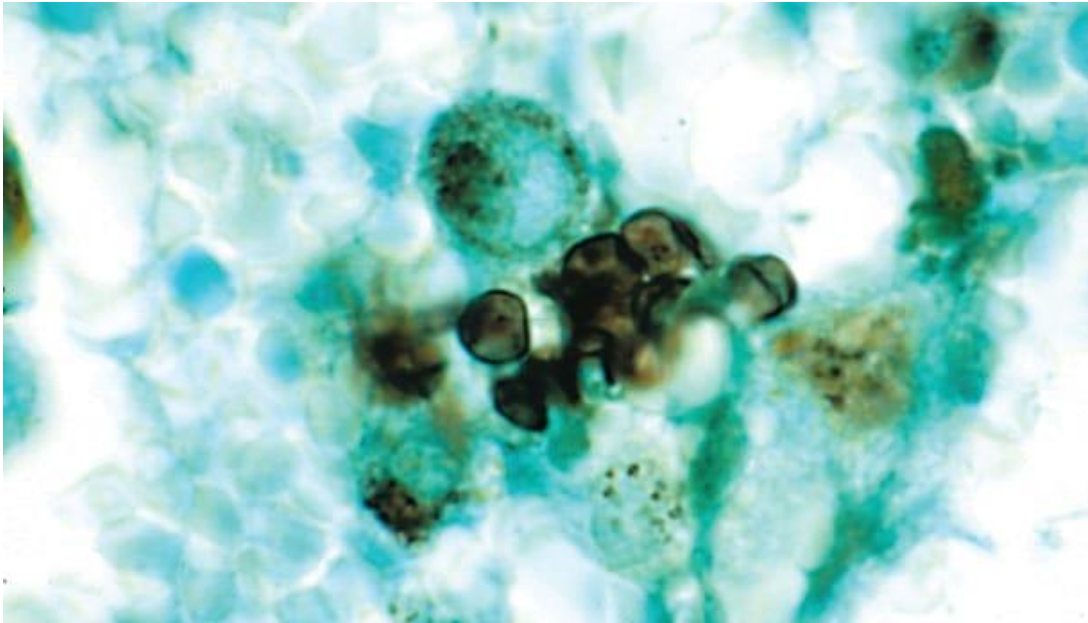
Postupak bojanja:

1. Deparafinirati i hidratizirati u destiliranoj vodi
2. Oksidirati u 4%-tnoj otopini kromne kiseline
3. Ispirati vodom iz slavine nekoliko sekundi
4. Otopina natrij-bisulfita, 1 minuta, za uklanjanje ostataka kromne kiseline
5. Ispirati tekućom vodom 5 do 10 minuta
6. Tri do četiri ispiranja u destiliranoj vodi
7. Uroniti u svježe pripremljenu radnu otopinu metenamin – srebrovog nitrata na 58-60°C, 60 minuta ili do pojave žućkasto smeđe boje
8. Isprati u destiliranoj vodi, šest izmjena

9. Nijansirati u otopini zlatovog klorida 2 do 5 minuta
10. Isprati u destiliranoj vodi
11. Ukloniti nereducirano srebro otopinom natrijevog tiosulfata, 2 do 5 minuta
12. Temeljito isprati u vodi iz slavine
13. Kontrastirati radnom otopinom *light green* 30 do 45 sekundi
14. Dehidrirati u 95%-tnom alkoholu, apsolutnom alkoholu, izbistriti u ksilenu. Svaki po dvije izmjene
15. Fiksirati permountom ili histocladom

Rezultati:

Gljivice su oštro ocrtane crnom bojom, mucin je obojen svijetlo do tamno sivo, unutrašnjost micelija i hifa je ružičasta, a pozadina svijetlo zelene boje (8).



Slika 3 Prikaz cisti *Pneumocystis jirovecii*, obojeno po GMS-u

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7152079/>



## 2.4. Ziehl Neelsen

Metoda bojenja za acidorezistentne štapićaste bakterije, gljivice i inkluzijska tjelešca.

### Fiksacija:

Svako adekvatno fiksirano tkivo.

### Otopine:

Otopina karbol fuksin

Otopljeni kristali fenola	2.5 ml
Alkohol, 100%-tni	5.0 ml
Bazični fuksin	0.5 mg
Destilirana voda	50.0 ml

Filtrirati prije upotrebe.

1%-tna otopina kiselog alkohola

Alkohol, 70%-tni	1000.0 ml
Klorovodična kiselina, koncentrirana	10.0 ml

1%-tna otopina sumporne (sulfatne) kiseline

Sumporna kiselina, koncentrirana	1.0 ml
Destilirana voda	100.0 ml

Otopina metilenskog modrila

Metilensko modrilo	1.4 mg
Alkohol, 95%-tni	100.0 ml

### Radna otopina metilenskog modrila

Otopina metilenskog modrila	10.0 ml
Voda iz slavine	90.0 ml

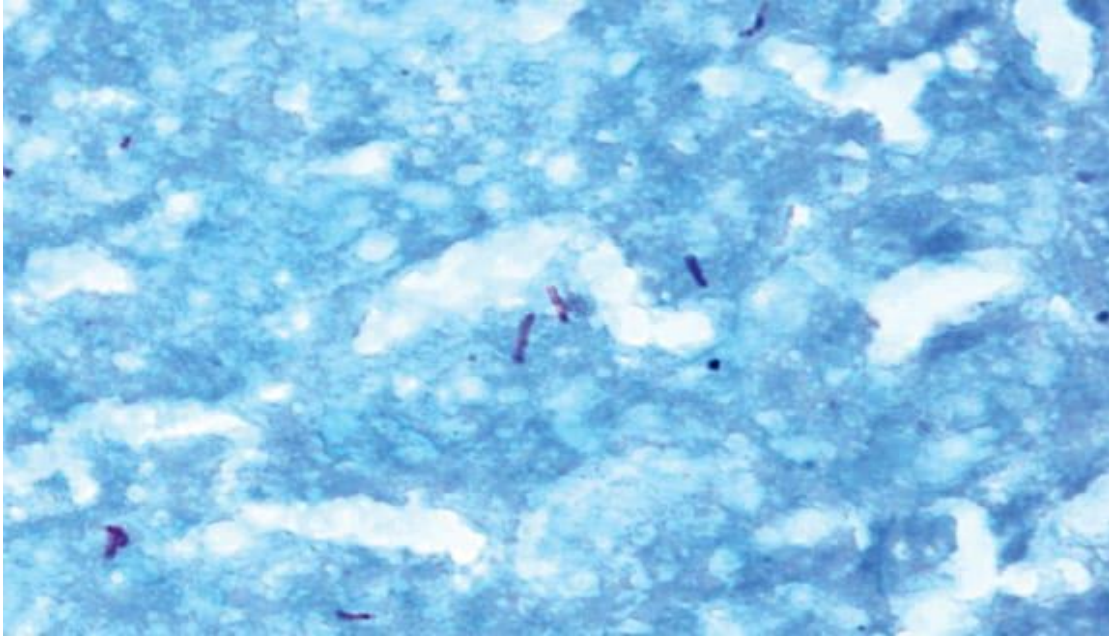
#### Postupak bojanja:

Koristiti kontrolno stakalce.

1. Deparafinirati i hidratizirati u destiliranoj vodi
2. Otopina karbol fuksina, 30 minuta
3. Dobro isprati pod tekućom vodom
4. Odbojati upotrebom otopine kiselog alkohola ili otopinom sumporne kiseline do pojave blijedo ružičaste boje
5. Temeljito ispirati pod tekućom vodom, 8 minuta
6. Kontrastirati umakanjem stakalca u radnu otopinu metilenskog modrila. Stakalce po stakalce. Pojavljuje se svijetlo plava boja
7. Oprati vodom iz slavine, a nakon toga isprati destiliranom vodom
8. Dehidrirati u 95%-tnom alkoholu, apsolutnom alkoholu, izbistriti u ksilenu. Svaki po dvije izmjene
9. Fiksirati permountom ili histocladom

#### Rezultati:

Acidorezistentni bacili oboje se svijetlo crveno, eritrociti žućkastonarančasto, a ostali tkivni elementi svijetlo plavo (8).



Slika 4 Prikaz *Mycobacterium tuberculosis*, obojeno po Ziehl-Neelsenu

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7152079/>

## 2.5. Warthin – Starry

Bojenje po Warthin Starry-u koristi se za prikaz spiroheta, Donovanovih tjelešaca, legionele, nokardije, klebsiele i *Bartonella henselae* (10).

### Fiksacija:

10%-tni puferirani neutralni formalin.

### Otopine:

Za pripremu otopina potrebno je koristiti kemijski čisto stakleno posuđe.

Zakiseljena voda

U 1000 ml trostruko destilirane vode dodavati 1%-tnu limunsku kiselinu dok otopina ne postigne pH vrijednost 4.0

1%-tna otopina srebrovog nitrata (za impregnaciju)

Srebrov nitrat, kristali (C.P.)	1.0 mg
Zakiseljena voda	100.0 ml

2%-tna otopina srebrovog nitrata (za razvijanje)

Srebrov nitrat, kristali (C.P.)	2.0 mg
Zakiseljena voda	100.0 ml

5%-tna otopina želatine

Listići želatine, visokog stupnja	10.0 mg
Zakiseljena voda	200.0 ml

0.15%-tna otopina hidrokinona

Hidrokinon, kristali	0.15 mg
Zakiseljena voda	100.0 ml

2%-tnu otopinu srebrovog nitrata, 5%-tnu otopinu želatine, 0.15%-tnu otopinu hidrokinona držati u Erlenmeyerovoj tikvici od 50 ml u vodenoj kupelji na 54°C dok se ne pripremi otopina za razvijanje.

Otopina za razvijanje

Otopina srebrovog nitrata, 2%-tna	1.5 ml
Otopina želatine, 5%-tna	3.75 ml
Otopina hidrokinona, 0.15%-tna	2.0 ml

Pripremiti prije upotrebe.

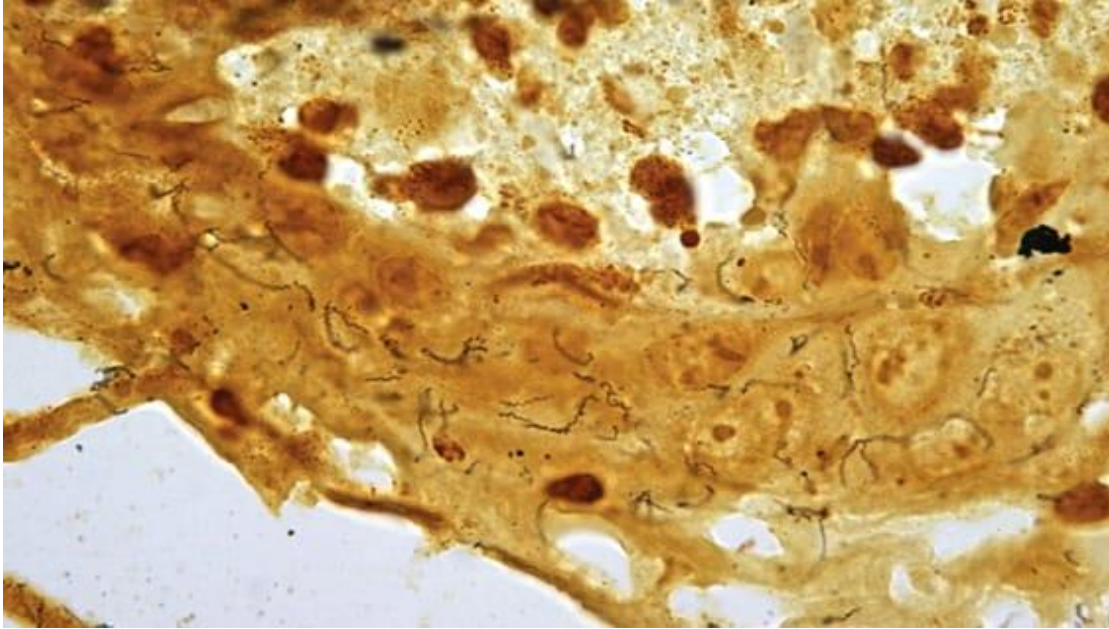
Postupak bojanja:

Koristiti kontrolno stakalce.

1. Deparafinirati i hidratizirati u trostruko destiliranoj vodi
2. Impregnirati otopinom srebrovog nitrata u vodenoj kupelji zagrijanoj na 43°C, 30 minuta. Pripremiti otopinu za razvijanje. Koristiti pincetu obloženu parafinom.
3. Prekriti stakalca neposredno napravljenom otopinom za razvijanje, ostaviti stakalca prekrivena otopinom do razvitka svijetlo smeđe ili žute boje. Pregledati kontrolno stakalce pod mikroskopom. Spirohete trebaju biti obojene crno, a pozadina svijetlo smeđe ili žute boje. Koristiti pincetu obloženu parafinom.
4. Brzo i temeljito isprati toplom vodom iz slavine, zagrijanom na 56°C
5. Isprati destiliranom vodom
6. Dehidrirati u 95%-tnom alkoholu, apsolutnom alkoholu, izbistriti u ksilenu. Svaki po dvije izmjene
7. Fiksirati permountom ili histocladom

Rezultati:

Spirohete i Donovanova tjelešca oboje se crno, a pozadina blijedo žuto do svijetlo smeđe boje (8).



Slika 5 Prikaz *Treponema pallidum*, Warthin-Starry bojenje

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7152079/>

## 2.6. Steiner i Steiner

Steiner i Steiner metoda koristi se za prikaz spiroheta, *Legionella pneumophila* i *Bartonella henselae*.

### Fiksacija:

10%-tni formalin

### Otopine:

Za pripremu otopina potrebno je koristiti kemijski čisto stakleno posuđe, temeljito isprano destiliranom vodom.

0.5%-tna otopina uranil nitrata

Uranil nitrat	0.5 mg
Destilirana voda	100.0 ml

Dobro promiješana otopina, pohranjena u kemijski čistoj staklenoj posudi ostaje stabilna godinu dana.

2%-tna otopina hidrokinona

Hidrokinon	0.5 mg
Destilirana voda	25.0 ml

Pripremiti prije upotrebe

0.5%-tna otopina srebrovog nitrata

Srebrov nitrat	0.5 mg
Destilirana voda	100.0 ml

Dobro promiješana otopina, pohranjena u kemijski čistoj staklenoj posudi u hladnjaku ostaje stabilna godinu dana.

10%-tna otopina biljne smole

Biljna smola	10.0 ml
Apsolutni alkohol	100.0 ml

Ostaviti tijekom noći da se otopi, filtrirati kroz filter papir (#1) u hermetički zatvorenu bocu.

2.5%-tna otopina biljne smole

10%-tna otopina biljne smole	15.0 ml
Apsolutni alkohol	75.0 ml

Otopinu filtrirati kroz filter papir (Whatman #4). Otopina ostaje stabilna šest mjeseci.

### Reducirajuća otopina

2.5%-tna otopina biljne smole	15.0 ml
2%-tna otopina hidrokinona	25.0 ml
0.5%-tna otopina srebrovog nitrata	0.6 ml

Otopinu biljne smole dodati otopini hidrokinona, a zatim dodati otopinu srebrovog nitrata.  
Pripremiti prije upotrebe.

### Postupak bojanja:

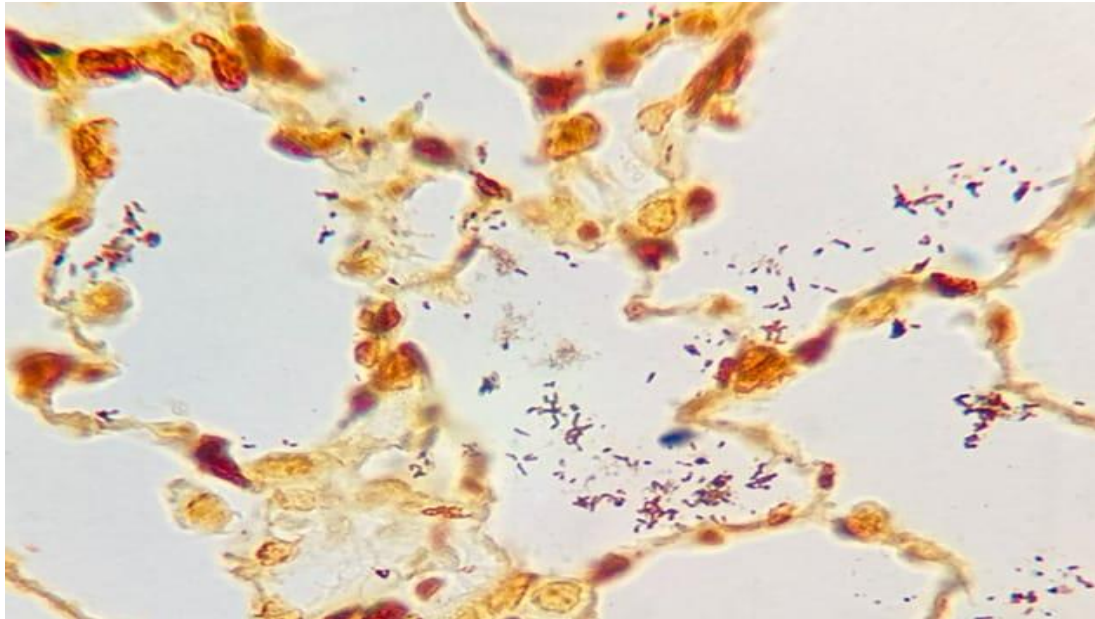
Koristiti kontrolno stakalce.

1. Deparafinirati i hidratizirati u destiliranoj vodi
2. 0.5 postotnu otopinu uranil nitrata zagrijati u mikrovalnoj pećnici, 30 sekundi na 70W
3. Isprati u toploj destiliranoj vodi, nekoliko izmjena. Destiliranu vodu zagrijati u mikrovalnoj pećnici, na najvišem stupnju zagrijavanja, 5 minuta
4. 0.5 postotnu otopinu srebrovog nitrata zagrijati u mikrovalnoj pećnici, 40 sekundi na 70W. Ostaviti stakalce u otopini 90 sekundi uz lagano miješanje
5. Isprati u toploj destiliranoj vodi, nekoliko izmjena. Destiliranu vodu zagrijati u mikrovalnoj pećnici, na najvišem stupnju zagrijavanja, 5 minuta
6. 95%-tni alkohol, 2 izmjene
7. 100%-tni alkohol, 2 izmjene
8. 2.5%-tna otopina biljne smole, 1 minuta
9. Reducirajuća otopina, zagrijati u mikrovalnoj pećnici, 30 sekundi na 40W. Lagano miješati stakalca. Zagrijati u mikrovalnoj pećnici, 30 sekundi na 40W. Ostaviti stakalce u otopini 2 minute ili do pojave žute ili žutosmeđe boje.
10. Isprati u destiliranoj vodi, 3 izmjene
11. Dehidrirati, izbistriti te staviti pokrivalo



Rezultati:

Spirohete i legionela oboje se crno, a pozadina žuto (11).



Slika 6 Prikaz *Bartonelle henselae*, Steiner i Steiner bojenje

Izvor: <https://www.newcomersupply.com/product/cat-scratch-bartonella-henselae-control-slides/>

### 3. GRANULOMATOZNE UPALE

Upala je proces u živom organizmu, a nastaje kao odgovor na razne egzogene ili endogene uzroke. Osim etiološke podjele upala kojom se opisuju uzroci odgovora živog organizma, upalu još možemo podijeliti prema morfologiji, odnosno na temelju makroskopskih i mikroskopskih promjena tkiva, anatomske i to prema organu u kojem se upala odvija te vremenski prema duljini trajanja upale na akutnu i kroničnu (1). Kronična upala, za razliku od akutne, nema uočljiv početak ni predvidiv kraj te traje dulje od akutne upale. Patohistološka je razlika jasnija zbog specifičnih promjena koje objektivno možemo mikroskopski dokazati (2).

Kao poseban oblik kronične upale javlja se granulomatozna upala, a očituje se stvaranjem granuloma (2). Izraz granulom potječe od latinske riječi granula – zrnca, jer se ti granulomi mogu vidjeti i golim okom kao bijela ili siva zrnca u tkivu (1).

Granulomi su sačinjeni od nakupina modificiranih makrofaga i limfocita T. Jezgre makrofaga u granulomima izduljene su ili bubrežastog oblika s fino raspršenim kromatinom, a citoplazma im je eozinofilna i obilna te se gotovo stapa s citoplazmama susjednih makrofaga stoga čitavi granulom djeluje kao struktura građena od epitelnih stanica. Takve makrofage nazivamo epiteloidnim stanicama, a ako se epiteloidni makrofagi međusobno stope oblikovat će orijaške sincicijske stanice čije je glavno obilježje mnoštvo jezgara unutar zajedničke citoplazme (1).

Neki od uzroka kroničnih granulomatoznih upala mogu biti *Mycobacterium tuberculosis* i *Histoplasma capsulatum* pa tada uočavamo kazeozne granulome koji se sastoje od limfocita, epiteloidnih i orijaških stanica dok im se u središtu nalazi kazeozna nekroza koja makroskopski podsjeća na kravlji sir. Mikroskopski ju opisujemo kao područje bez vidljive strukture, eozinofilnog, homogenog ili fino zrnatog područja.

Osim kazeoznih postoje i nekazeozni granulomi, a njih nalazimo u limfnim čvorovima i u unutrašnjim organima osoba oboljelih od sarkoidoze kao i u limfnim čvorovima koji dreniraju tumorske limfne žile. S obzirom na pretpostavku da se takvi granulomi pojavljuju kao posljedica imunoreakcije organizma na tumorske antigene, pojavu nekazeoznih granuloma mogu izazvati mnoge druge imunoreakcije (1). Za pojavu sarkoidoze pojedini stručnjaci navodili su mnoge moguće uzroke, no nema dokaza da je ijedan specifični agens odgovoran za njenu pojavu što ju

čini bolesti nepoznatog uzroka (12). Crohnova bolest je upalna bolest probavnog sustava karakterizirana nepredvidivim relapsno-remitirajućim tijekom bolesti. Etiologija i patogeneza Crohnove bolesti još nisu u potpunosti razjašnjene no uzrokom se smatra kombinacija okolišnih čimbenika, genetske predispozicije i crijevnog mikrobioma, a kao karakterističan histološki nalaz pojavljuju se nekazeozni granulomi čiji značaj u prognozi i težini bolesti još nije razjašnjeni (3). Nekazeozni su granulomi, kao i kazeozni, građeni od epiteloidnih i orijaških stanica s uskom zonom limfocita na periferiji, a glavnu razliku čini nepostojanje kazeozne nekroze u središtu, već se čitav granulom sastoji od nakupine gusto smještenih epiteloidnih stanica.

Kod supurativnih granuloma, čiji uzročnici mogu biti *Bartonellae*, *Pasteurellae* i druge bakterije koje aktiviraju neutrofile i makrofage, u središtu nalazimo gnoj uzrokovan nekrozom neutrofila.

Tercijarni sifilis ima specifičan oblik granuloma kojeg nazivamo guma, a u njegovom središtu nalazimo obrise nekrotičnih stanica zbog čijeg se nepotpunog raspadanja gubi izgled amornog eozinofilnog područja dok se oko središnje zone nekroze nalaze epiteloidni makrofagi, orijaške i plazma stanice te limfociti.

Dođe li do zaostajanja stranog tijela u organizmu makrofagi, čija je uloga fagocitoza, zadržat će se na mjestu upale, stapat će se sa susjednim makrofagima i tako oblikovati multinuklearne orijaške stanice u čijim citoplazmama uočavamo strana tijela pa tako takve granulome nazivamo granulomima stranog tijela (1).

### **3.1. Tuberkuloza**

Tuberkuloza je kronična granulomatozna zarazna bolest uzrokovana mikroorganizmima iz kompleksa *Mycobacterium tuberculosis*, a obilježava ju formiranje tuberkuloma u različitim dijelovima tijela, najčešće plućima (13). Prema izvješćima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO; engl. *World Health Organization*, WHO) svake godine od tuberkuloze oboli oko 10 milijuna ljudi, a oko 1,5 milijuna ljudi od nje i umre, unatoč tomu što se radi o bolesti koja se može spriječiti i izliječiti, što tuberkulozu svrstava u zarazne bolesti s najvećom smrtnošću. U 19. stoljeću tuberkuloza je, uz koleru i infekcije rana, bila najčešći uzrok smrtnosti u svijetu. 1882. godine

Robert Koch dokazao je da je uzrok bolesti infekcija specifičnim mikroorganizmom kojeg je uspio izdvojiti, a u svrhu liječenja izdvojio je supstanciju iz uzročnika tuberkuloze te ju nazvao tuberkulinom. Iako je tuberkulin zbog uzrokovanja ozbiljnih imunoreakcija odbačen kao lijek, postao je važno dijagnostičko sredstvo za dokazivanje tuberkuloze. U dijagnostici tuberkuloze koristio se rendgen kao i invazivne kirurške tehnike. Albert Calmette i Camille Guerin potragu za cjepivom protiv tuberkuloze započeli su 1904. godine, a prvi su ga put primijenili 1921. godine. Prvi antituberkulotici otkriveni su tek 1943. i 1944. godine (14).

Uzročnik tuberkuloze je acidorezistentni, aeroban, asporogen, nepokretan, najčešće pravilan bacil koji se prenosi kapljičnim putem iz iskašljaja osobe oboljele od tuberkuloze (13). Rast uzročnika tuberkuloze u alveolarnim makrofagima uzrokovat će primarne lezije u plućima koje se obično pojavljuju ispod pleure gornjih režnjeva pluća. Do bronhopulmonalnog limfnog čvora bakterije dolaze putem limfnih žila i uzrokuju limfadenopatiju (15).

Udisanjem sitnih kapljica s 1 – 3 bakterije u donje dišne puteve sve do alveola nastat će primoinfekcija. Bacili tuberkuloze umnažat će se u makrofagima nakon što ih makrofagi privučeni fenolnim glikolipidom na površini bacila fagocitiraju. Makrofag se može riješiti bacila samo aktivacijom stečene imunosti pomoćničkih T-limfocita (Th-limfociti) u regionalnim limfnim čvorovima. Antigen bacila tuberkuloze predočava se makrofagima u regionalnim limfnim čvorovima, a makrofagi lučenjem interleukina-12 (IL12) potiču Th1-limfocite. Specifični Th1-limfociti luče interferon gama (IFN- $\gamma$ ) koji djeluje na aktivaciju makrofaga, što omogućuje sazrijevanje fagolizosoma, sintezu reaktivnih spojeva i dušikova oksida, autofagiju te lizu bakterija. Nakon što makrofagi poprime epiteloidni oblik njihovi će kemokini, defenzini i faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) okupiti druge makrofage i senzibilizirane Th1-limfocite u granulome (tuberkulome) sa stvaranjem centralne kazeozne nekroze. Manjak faktora tumorske nekroze alfa ubrzava nekrozu i rast bakterija u nekrotičnom okruženju. Drugi će se makrofagi, zbog kemotaktičnog djelovanja tuberkuloma, inficirati refagocitozom apoptotičnih zaraženih makrofaga (13). Oko 90 % tuberkuloznih limfadenitisa pojavljuju se u cervikalnim limfnim čvorovima, a ostali u mediastinalnim limfnim čvorovima (15).

Ghonov primarni tuberkulozni kompleks sastoji se od granuloma promjera 1-2 cm u plućima i povećanog kalcificiranog hilarnog limfnog čvora. U histopatološkom nalazu primarnog žarišta i

limfnog čvora nalazimo nekrotizirajući imunosni granulom, građen od epiteloidnih stanica i multinuklearnih orijaških stanica tipa Langhans radijarno poredanih oko centra, a na periferiji granuloma koncentrični bedem pomoćničkih T-limfocita (13).

Sekundarna tuberkuloza nastaje u prethodno senzibiliziranom domaćinu reinfekcijom odnosno inokulacijom velike količine vrlo virulentnih bacila tuberkuloze iz okoliša ili reaktivacijom primarnog žarišta u imunokompetentnih odraslih osoba, a očituje se kao kronična granulomska upala s većim područjima kazeozne nekroze i sklonošću kavitaciji u bronh, fibrozi i retrakciji parenhima. Lokalizirana je u vršku gornjih režnjeva pluća. Granulomska žarišta, u povoljnom slučaju, s vremenom, spontano ili nakon terapije postanu kalcificirani ožiljci. U nepovoljnom slučaju granulomska žarišta se šire, nekrotiziraju i prazne kroz erodirani bronh. Limfnom diseminacijom ili prodorom bacila u plućne septalne krvne žile nastat će milijarna plućna bolest, odnosno diseminacija i u druge organe. Bakterije mogu i hematogeno diseminirati i tako uzrokovati sistemsku milijarnu tuberkulozu. Najčešće ekstrapulmonalno sjelo su limfni čvorovi na vratu s jedne strane (13).

U početnoj fazi tuberkuloznog limfadenitisa primjećuje se povećanje limfnih čvorova koji su tvrdi i elastični, a upućuju na nespecifični limfadenitis, no kako dolazi do postepene infiltracije upalnih stanica s vremenom nastupa periadenitis. Limfni čvorovi se povećavaju nakon stvaranja apscesa, postupno dolazi do kazeozne nekroze te njihovog omekšavanja (15).

Histološki je tuberkulozni limfadenitis obilježen centralnom kazeoznom nekrozom okruženom slojem epiteloidnih stanica i ponekom orijaškom stanicom tipa Langhans dok se na periferiji primjećuju limfociti i fibroblasti (15). Nalaz nekrotizirajućih granuloma upućuju na tuberkulozu, a bojenjem po Ziehl-Neelsenu izravno se mogu dokazati bakterije *M. tuberculosis* što je dovoljno za potvrdu dijagnoze (13).

### **3.2. Sarkoidoza**

Sarkoidoza je bolest nepoznatog uzroka koja najčešće zahvaća pluća, kožu i oči, a simptomi ovise o zahvaćenim organima. Zahvaća i pulmonalne hilarne, cervikalne, aksilarne i ingvinalne limfne čvorove uzrokujući limfadenopatiju. Pojavljuje se širom svijeta, a najčešće obolijevaju

osobe u dobi između 20. i 40. godine života te je učestalija u žena (15). U Londonu je 1869. godine J. Hutchinson sarkoidozu nazvao lividnom papilarnom psorijazom opisujući kožne lezije na prstima ruku 58-godišnjeg pacijenta. Pariški je dermatolog E. H. Besnier 1889. godine prikazao slučaj 34-godišnje bolesnice čiji su simptomi uključivali promjene poput smrzotina na licu, osobito na čelu, nosu, uškama te vretenasto izobličenje prstiju ruku pa je bolest nazvao *lupus pernio*. Norveški dermatovenerolog je 1897. godine histološkom obradom uzorka kože dokazao sarkoidozu u pacijenta koji je osim kožnih promjena imao i limfadenopatiju. U opisivanju navedenih simptoma upotrijebio je izraz sarkoid misleći na kožnu formu sarkoma pa je tako bolest po njemu nazvana Böckovom sarkoidozom. S obzirom na to da se radi o multisistemskoj bolesti koja se manifestira na različite načine mnogi su ju stručnjaci kroz godine opisivali, no tek je 1914. godine švedski dermatolog J. N. Schaumann ustvrdio kako se radi o istoj bolesti (12).

Uzrok sarkoidoze i dalje nije poznat, no pojedini stručnjaci kao moguće uzroke navodili su tuberkulozu i to zbog histološke sličnosti građe granuloma u sarkoidoze i tuberkuloze, zbog pojave tuberkuloze prije, za vrijeme ili nakon sarkoidoze te povremene izolacije *Mycobacterium tuberculosis* ili atipičnih mikobakterija iz granuloma nekih pacijenata oboljelih od sarkoidoze. Od ostalih uzroka navodili su atipične mikobakterije, propionibakterije, viruse influence, mumpsa, newcastleske bolesti, ospica ili infektivne mononukleoze, mikoplazme i rikcije. Istraživanja pokazuju da se bolest pojavljuje sezonski ovisno o geografskoj lokaciji, no nema dokaza da je ijedan specifični agens odgovoran za pojavu sarkoidoze. Pretpostavka da se radi o autoimunoj bolesti temelji se na povezanosti s glavnim kompleksom histokompatibilnosti, izmijenjenoj distribuciji receptora T stanica i oligoklonalnosti T stanica na mjestu formiranja granuloma. Sarkoidoza se često pojavljuje među srodnicima, a genska sklonost određena je različitim djelovanjem nekoliko gena što ju čini genetički vrlo složenom bolesti. HLA (*Human Leukocyte Antigens*) geni imaju važnu ulogu u imunološkom odgovoru. Na kratkom odsječku kromosoma 6 nalazi se HLA regija, a unutar te regije nalaze se vrlo polimorfni geni HLA klase I i HLA klase II. Neki od HLA gena povezani su s povećanom sklonošću obolijevanja od sarkoidoze, dok su drugi zaštitni. Unatoč istraživanjima drugih lokusa, u sarkoidozi nema važnijeg lokusa od HLA regije (12).

Inicijalni granulomatozni odgovor vodi u stvaranje granuloma, a započinje kada T-pomagačke stanice prepoznaju proteinske peptide koje im prezentiraju makrofagi, zatim dolazi do

nakupljanja aktiviranih limfocita T uz porast broja alveolarnih makrofaga u zahvaćenom organu. Dolazi do spontanog oslobađanja INF- $\gamma$ , IL-2 i drugih citokina iz T-stanica, a makrofagi luče različite citokine i razne faktore rasta. Za stvaranje granuloma potrebno je nakupljanje imunokompetentnih stanica redistribucijom iz periferne krvi u zahvaćeni organ uz pomoć kemotaktičnih citokina i *in situ* proliferacija uz pomoć IL-2 koji je lokalni faktor rasta za limfocite T. Znak aktivne bolesti jesu nakupljeni limfociti T, mononuklearni fagociti i granulomi. Drugi aspekt granulomatoznog odgovora u sarkoidozi jest evolucija granuloma prema rezoluciji ili kroničnoj bolesti. Rezolucija počinje pritjecanjem CD8<sup>+</sup> limfocita T i IL-10 koji suprimira upalni odgovor. S kroničnom bolešću povezani su citokini IL-8, IL-12 i TNF- $\alpha$  (12).

U granulomima kod sarkoidoze najčešće ne nalazimo nekrozu, a kako bolest napreduje uočavaju se dobro ograničeni granulomi sačinjeni od epitelioidnih stanica s razbacanim multinuklearnim orijaškim stanicama tipa Langhans kroz cijeli limfni čvor. Patohistološki se u limfnom čvoru u ranom stadiju bolesti folikularna hiperplazija i sinusna histiocitoza manifestiraju kao nespecifični limfadenitis. Nakon smanjenja histiocita u korteksu se pojavljuju mali čvorići epitelioidnih stanica. Ponekad može doći i do međusobnog spajanja granuloma. U kasnijem stadiju bolesti nakupljanje kolagenih vlakana rezultirat će fibrozom i hijalinizacijom (15). Ako je prisutna nekroza, specijalnim bojenjima kao što je bojenje po Ziehl-Neelsenu može se isključiti prisutnost uzročnika tuberkuloze, a GMS ili PAS bojenjem može se isključiti prisutnost gljivica (12).

### 3.3. Gljivične infekcije

Gljivice su sveprisutni eukariotski organizmi koji mogu biti jednostanični i višestanični, a za metabolizam koriste gotove organske spojeve iz mrtvih ili živih organizama. Osim u zraku, zemlji, vodi, biljkama i životinjama neke vrste nalazimo na koži i sluznicama zdravih osoba gdje se smatraju fiziološkom mikrobnom florom. Gljivice mogu biti saprofiti, mutualisti ili paraziti (16). Znanost koja se bavi proučavanjem gljivica zove se mikologija, a gljivicama koje su uzrok bolesti kod ljudi bavi se medicinska mikologija. Početkom specijalne medicinske mikologije mnogi smatraju opis gljivice vrste *Beauveria bassiana*, otkrivene sredinom devetnaestog stoljeća, koja je skoro uništila uzgoje dudova svilca i proizvodnju svile u Kini (17).

Rastom i razmnožavanjem gljiva u makroorganizmu nastaju bolesti koje nazivamo mikoza (16). Patogene gljivice su uglavnom uvjetno patogeni mikrobi, a razvoju gljivične infekcije i pojavi patoloških promjena pogoduju dugotrajno liječenje antibioticima, mješovite infekcije drugim mikrobima, ozljede kože i sluznica i imunodeficijencije (17).

Infekcije gljivicama čest su uzrok granuloma, a mogu se manifestirati lokalnim promjenama ili sustavnim bolestima (18). Neki od uzročnika mikoza koji uzrokuju granulome su *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus spp*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* i *Pneumocystis jirovecii* (18,19).

Način prijenosa gljivičnih patogena u makroorganizam može biti direktnim kontaktom i/ili inhalacijom. Do infekcije uzrokovane uzročnicima *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Coccidioides immitis* i *Cryptococcus neoformans* uglavnom dolazi inhalacijom spora ili konidija u plućne alveole. Nakon inhalacije obrana počinje u alveolarnim makrofagima imunokompetentnih domaćina gdje nakon fagocitoze dolazi do stvaranja granuloma i humoralne i celularne imunosti. U granulomima može doći do zaostajanja uspavanih oblika uzročnika koji kod imunokompromitiranih domaćina mogu reaktivirati infekciju. *Candida spp*, od čega najčešće *Candida albicans* smatra se fiziološkom mikrobiotom u čovjeka, tako da do sluznične i kožne kandidijaze dolazi povećanjem broja prisutnih mikroorganizama i oštećenjem kože ili epitela koji omogućuju lokalnu invaziju kvasaca i pseudohifa, a lezije variraju od apscesa do kroničnih granuloma. Sustavna kandidijaza nastaje nakon ulaska kandidate u krvotok, a fagocitna obrana domaćina nije adekvatna da zadrži njihov porast i diseminaciju (19,20).

Imunološki sustav domaćina sadrži receptore za prepoznavanje komponenti stanične stijenke gljivica kao što su hitin i  $\beta$ -1,3-glukan, čime se pokreću putevi prijenosa signala koji dovode do imunološkog odgovora koji uključuje fagocitozu, nakupljanje reaktivnih kisikovih spojeva i reaktivnih dušikovih spojeva, proizvodnju citokina i kemokina koji izazivaju snažan upalni odgovor u svrhu neutralizacije gljivičnih patogena. Kao prva linija obrane u imunološkom odgovoru djeluju monociti, makrofagi, dendritičke stanice i neutrofilni. Gljivice mogu biti eliminirane fagolizosomom, a mogu se i zadržati kao granulomi okruženi makrofagima. Monociti,



osim što izlučuju kemokine i citokine, predstavljaju antigen T-stanicama i time izazivaju adaptivni imunološki odgovor u svrhu eliminacije gljivica (19).

Gljivice se koriste raznim mehanizmima kako bi izbjegle imunološki sustav domaćina. Imaju sposobnost mijenjati svoje površinske slojeve kako bi izbjegle prepoznavanje od strane receptora domaćina. Površinski segmenti  $\beta$ -1,3-glukana *H. capsulatum* izmjenjeni su endo  $\beta$ -1,3-glukanazom uzrokujući otežano prepoznavanje patogena kao i smanjenu stimulaciju proupalnih citokina. *P. jirovecii* posjeduje veliki površinski glikoprotein koji prikriva  $\beta$ -1,3-glukan, a u staničnoj stijenci nema hitina. Kod roda *Aspergillus* slojevi gljivičnog manana, melanina,  $\alpha$ -1,3-glukana i hidrofobina oblažu površinske polisaharide koje bi receptori domaćina prepoznali i izazvali imunološki odgovor. *C. neoformans* sadrži kapsularni polisaharid koji osim površinske zaštite povećava virulentnost te ima negativan utjecaj na aktivaciju T-limfocita i privlačenje neutrofila (19). Vrste iz rodova *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* termički su dimorfne, dok vrste *Candida*, osim *C. glabrata*, stvaraju i prave hife i pseudohife, a taj je dimorfizam značajan činitelj virulencije (20).

Granulomi kod gljivičnih infekcija mogu biti nekrotizirajući i nenekrotizirajući, ali je češći nalaz nekrotizirajućih, pravilnih granuloma unutar kojih nalazimo gljivice. S obzirom na infektivnu etiologiju, granulomi uzrokovani gljivičnim infekcijama mogu biti supurativni ili nesupurativni. Nesupurativne granulome nalazimo u infekcijama uzrokovanim *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* i kod kokcidiomikoze (21,15). Od histokemijskih metoda bojenja koriste se GMS bojenje kojim se mogu dokazati stanične stijenske živih i mrtvih gljivica, dok se PAS bojenjem mogu dokazati stanične stijenske mrtvih gljivica (21). GMS bojenjem gljivice su oštro ocrtane crnom bojom, mucin je obojan svijetlo do tamno sivo, unutrašnjost micelija i hifa je ružičasta, a pozadina je svijetlo zelene boje (8). PAS bojenjem gljivice se boje svijetlo ružičasto do crveno (9). Histološki se u limfnom čvoru kod zahvaćenosti gljivičnim infekcijama nalaze pokazatelji akutne upale i brojni histiociti koji u citoplazmi sadrže fagocitirane uzročnike (22).

Za dokaz vrsti iz rodova *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* koriste se metode bojenja po Giemsa-Romanovskom, Gömöriju i Schiffu. Kod kandidijaze potrebno je napraviti biopsiju promjena te preparate obojiti metenamin-srebrom po Gömöriju ili drugim bojenjem specifičnim za gljive (20).

### 3.4. Toksoplazmoza

Toksoplazmoza je zoonoza uzrokovana parazitom *Toxoplasma gondii* čiji su konačni nositelji mačke i druge životinje iz porodice mačaka dok su čovjek i ostale životinje prijelazni nositelji. Način zaraze je konzumacija cisti, bilo kontaminacijom ruku izmetom mačke ili psa ili konzumacijom nedovoljno termički obrađenog mesa, a vrlo rijetko parenteralno. Tijekom akutne infekcije moguće je transplacentarni prijenos na plod. U svrhu prevencije toksoplazmoze potrebno je higijensko uklanjanje mačjeg fecesa, pranje voća i povrća koje se konzumira sirovo te ispravna termička obrada mesa (20).

Parazit se razmnožava u crijevnom epitelu mačke shizogonijom i gamagonijom, a stvorena oocista mačjim fecesom odlazi u vanjsku sredinu. U vanjskoj sredini sazrijevanjem oociste nastaju u njoj dvije sporociste s po četiri sporozoita. Ako zrelu oocistu pojede mačka, u njezinom će se crijevu proces ponoviti. Pojede li oocistu čovjek ili bilo koja druga životinja, sporozoiti koji izlaze iz oociste u dvanesniku, probit će se kroz crijevnu stijenku te ući u krvotok i u različite stanice, pretežno u fagocite i u druge stanice retikuloendotelnog sustava u limfnim čvorovima gdje se počinju brzo razmnožavati te poprimaju oblik tahizoita. Tahizoiti su duguljastog oblika sa zašiljenim krajevima, poput kriške naranče, s jezgrom u sredini. Nakon raspadanje stanice, tahizoiti će invadirati druge stanice te se na taj način razmnože vrlo brzo i u velikom broju. Pod utjecajem imunskog odgovora domaćina, brzina razmnožavanja se smanji, a toksoplazma ulazi u fazu bradizoita koji je zašiljeniji na jednom kraju. Oko bradizoita se stvara tkivna cista u kojoj se može nalaziti nekoliko desetaka ili stotina bradizoita. Tkivne ciste najčešće se nalaze u živčanome tkivu, srčanom mišiću, skeletnim i glatkim mišićima. U latentnom obliku tkivne ciste mogu perzistirati doživotno. Ako mačka pojede životinju u kojoj su tkivne ciste, u epitelu njezina crijeva ponoviti će se shizogonija i gamagonija te će nastati oocista, a ako hranu u kojoj su prisutne tkivne ciste pojede čovjek ili bilo koja druga životinja iz njih će u crijevu izaći bradizoiti, proći će kroz crijevnu sluznicu, širit će se krvlju i ući u različite stanice te će se pretvoriti u tahizoite te će se na taj način ciklus nastaviti (20).

Značajan klinički znak stečene primarne toksoplazmoze u imunokompetentnih osoba je limfadenitis, a najčešće ga nalazimo na vratu, zatim aksilama i preponama. Liječenje limfadenitisa

u imunokompetentnih osoba nije potrebno jer tijekom dva do tri mjeseca spontano regredira. Ostali znakovi bolesti uključuju vrućicu, glavobolju, grlobolju i hepatosplenomegaliju zbog kojih toksoplazmoza može sličiti infektivnoj mononuklezi. U osobe ugrožene toksoplazmozom spadaju trudnice zbog mogućnosti nastanka intrauterine infekcije i konatalne toksoplazmoze, osobe oboljele od HIV-a te bolesnici s transplantiranim organima zbog mogućnosti diseminacije infekcije (23).

Granulomi su nekazeozni, u njima ne nalazimo neutrofile, eozinofile ni fibrozu i nepravilnog su oblika. Patohistološki nalaz limfnih čvorova prikazuje floridnu reaktivnu folikularnu hiperplaziju, sitne, nejasno oblikovane, solidne granulome koji predstavljaju nakupinu epiteloidnih stanica te ograničeno područje proliferacije monocitoidnih B limfocita. Folikuli su povećani zbog intenzivno reaktivnih germinalnih centara s povećanim brojem centroblasta, mitozama te makrofaga koji sadrže mnoge fagocitirane, apoptotične stanice. U proširenim limfnim sinusima i oko krvnih žila nalaze se monocitoidni B limfociti svijetle citoplazme i tamne jezgre bojeno po Giemsi. Nakupine slabo diferenciranih epiteloidnih stanica nalaze se razasute kroz korteks, parakorteks te povremeno i u germinalnim centrima (15). U histološkom preparatu ponekad je moguće vizualizirati tahizoite, koji su prisutni u akutnoj infekciji, bojenjem po Giemsi ili Wrightu, ali ih je teško vizualizirati na rutinskim rezovima (24).

### 3.5. Bruceloza

Bruceloza (malteška groznica) je zoonoza koja kod ljudi uzrokuje sustavnu bolest kod koje svaki organ ili organski sustav može biti zahvaćen (25). Očituje se kao septična febrilna bolest ili kao lokalizirana infekcija kostiju, tkiva ili organskih sustava. U koštanoj srži mogu se pronaći granulomi, a u polovice bolesnika se uz splenomegaliju i hepatomegaliju pojavljuje i povećanje limfnih čvorova. Uzročnici bruceloze su vrste iz roda *Brucella*, gram-negativni, nepokretni, asporogeni koki ili kratki štapići bez kapsule. U čovjeka infekciju uzrokuju *B. suis*, *B. abortus* i rijetko *B. canis*, a najčešća, najpatogenija i najinvasivnija je *B. melitensis* (20,25).

*B. melitensis* izdvojio je David Bruce 1887. godine iz slezene ljudi umrlih od malteške groznice, a da su koze rezervoar bruceloze za ljude Zammit je dokazao kada je 1905. godine

izdvojio bakteriju iz krvi i mlijeka koza. *B. abortus* izdvojili su Möhler i Traum 1911. godine iz tkiva čovjeka koji se zarazio pijućim mlijeko bruceloznih krava, a Keefer je 1924. godine izdvojio *B. suis* iz bolesnika koji se inficirao skupljajući svinjske plodove iz klaonice (25).

Infekcija u čovjeka može nastati izravnim dodiranjem s inficiranim životinjama, pobačenim plodovima ili njihovim sekretima, putem spojne sluznice, ozljeda na koži, onečišćenom prašinom u klaonicama putem aerosola. Bruceloza zbog niske infektivne doze od 10 ili manje stanica spada u najčešće infekcije laboratorijskih radnika u svijetu. Najčešći izvor infekcije je konzumacija mlijeka inficiranih životinja, kozjeg i ovčjeg sira, a meso je rijetko izvor infekcije jer je količina brucela u mišićima manja kao i zbog termičke obrade mesa. Prijenos među ljudima je iznimno rijedak, no postoji mogućnost prijenosa spolnim putem, transfuzijom krvi, transplantacijom tkiva, dojenjem i intrauterino (20,25).

Kada brucele uđu u organizam čovjeka makrofagi i monociti ih fagocitiraju. U fagocitima brucela preživljava i replicira se, a zatim odlazi u jetru, slezenu, koštano srž, limfne čvorove i bubrege gdje se nastavlja razmnožavati te oslobađa endotoksin koji je odgovoran za dio kliničke slike (20).

Histološki nalazimo velike nekazeozne granulome sastavljene od nakupina epiteloidnih histiocita, eozinofile, plazma stanice, imunoblaste i folikularnu hiperplaziju, (26).

### **3.6. Strano tijelo**

Stranim tijelom smatraju se tvari koje organizam prepoznaje kao tuđe što dovodi do imunološkog odgovora. Granulomi stranog tijela nastaju kao reakcija organizma na egzogene ili modificirane endogene tvari koje organizam prepoznaje kao strane (27).

Tvari kao što su silikon, parafin, kolagen i hijaluronska kiselina, a koje mogu izazvati granulome stranog tijela, u organizam mogu dospjeti kozmetičkim zahvatima. Nakon kirurških zahvata može doći do zaostajanja gaze, kirurškog konca te talka koji u organizam, kao i cink i aluminij, može biti injektiran lijekom. Tetoviranjem se unose razni pigmenti i aluminij. Nakon ozljeda može doći do zaostajanja komadića stakla, špranja ili bodlji kaktusa. Izloženost beriliju u raznim industrijama također može izazvati granulome stranog tijela (27, 28).

U svrhu eliminacije stranog tijela započinje upalna reakcija pri čemu dolazi do nakupljanja neutrofila koji će ga pokušati fagocitirati. Ako neutrofil ne uspije, doći će do aktivacije monocita i makrofaga lokalnog tkiva koji će ga ukloniti iz tkiva ako je strano tijelo dovoljno malo. Do stvaranja granuloma dolazi ako imunološki sustav ne ukloni strano tijelo (27). Stvaranje granuloma počinje migracijom monocita u zahvaćeno tkivo i njihovim preoblikovanjem u makrofage nakon čega mobiliziraju druge stanice imunološkog sustava. Makrofagi proizvode IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 i TNF- $\alpha$  i time potiču infiltraciju leukocita i aktivaciju T-stanica. Pod utjecajem aktivacije *Toll-like* receptora i IFN- $\gamma$  iz Th1 stanica makrofagi diferenciraju u proupalne makrofage. Može doći do nakupljanja epiteloidnih histiocita i formiranja multinuklearnih orijaških stanica (28).

Histološki izgled granuloma stranog tijela ovisit će o specifičnom odgovoru, no uglavnom se nalaze nekazeozni sitni granulomi bez apscesa. Moguć je prijenos mikroorganizama putem stranog tijela što može potaknuti stvaranje apscesa. Uočavaju se nepovezane nakupine epiteloidnih histiocita i multinuklearnih orijaških stanica tipa Langhans ili stranog tijela koje su oskudno obrubljene limfocitima i plazma stanicama (28). U citoplazmama multinuklearnih orijaških stanica uočavamo strana tijela (1). Diferencijalna dijagnoza, između ostalih, uključuje kutanu sarkoidozu, *Granuloma annulare*, *Granuloma inguinale* i Majocchi granulom tako da se od histokemijskih bojenja mogu koristiti bojenje po Ziehl-Neelsenu, GMS, PAS, bojenje po Giemsi i Warthin-Starry (27).

## 4. ZAKLJUČAK

Uzroci i uzročnici granulomatoznih upala su brojni, no među najčešće granulomatozne upale ubrajamo tuberkulozu, sarkoidozu, granulomatoznu upalu uzrokovanu gljivičnim infekcijama i zaostajanjem stranog tijela. Kod osoba oboljelih od toksoplazmoze i bruceloze također se mogu pojaviti granulomi.

Kod sumnje na granulomatoznu bolest nužno je napraviti biopsiju. Kako se na rutinskom bojenju hemalaun eozinom ne mogu utvrditi uzroci i uzročnici granuloma upotreba histokemijskih metoda bojenja je od velike pomoći. Uloga histokemijskih metoda je u tome što pomoću njih možemo dokazati ili isključiti pojedine uzročnike. Primjerice, u kazeoznim granulomima postoji sumnja da su uzrokovani *M. tuberculosis* i *H. capsulatum*, stoga koristeći bojenje po Ziehl Neelsenu dokazujemo acidorezistente bacile koji uzrokuju tuberkulozu. U granulomima kod sarkoidoze najčešće nema nekroze, no ako se ona pojavi, bojenjem po Ziehl Neelsenu isključuje se tuberkuloza ili bojenjem po PAS gljivična infekcija. Za dokaz gljivica u granulomima najčešće se koriste GMS i PAS bojenja, a za dokaz toksoplazme koristi se bojenje po Giemsi. Warthin-Starry i Steiner i Steiner bojenja koriste se za identifikaciju *Bartonella henselae*, *Legionella pneumophila* i spiroheta.

Histokemijske metode imaju, uz biopsiju, veliku ulogu u postavljanju dijagnoze i identifikaciji uzročnika budući da sama pojava granuloma nije specifičan nalaz određene bolesti i može se naći kod infektivnih bolesti te kod bolesti kojima ne znamo uzrok kao što su sarkoidoza ili Crohnova bolest. Određivanje uzroka, odnosno uzročnika granulomatozne upale nužno je za određivanje terapije.

## 5. LITERATURA

- (1) Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, ur. Patologija. Peto, prerađeno i dopunjeno izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
- (2) Jakić-Razumović J, ur. Patologija. Zagreb: Zdravstveno veleučilište; 2020.
- (3) Saade M.C, Wehbe H, Mourad F.H, Hosni M, Francis F.F, Makki M, Binion D.G, Tamim H, Farraye F.A, Malik T, Hashash J.G. Significance of granulomas in the outcomes of Crohn's disease patients. 2022. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9399581/>, pristupljeno: 08.07.2024.
- (4) Šarčević B. Histologija. Zagreb: Zdravstveno veleučilište; 2020.
- (5) Tetsuji N. Histochemistry, General and Special. Annual Review of Biomedical Sciences. 2008; 10:105-159. Dostupno na: <https://doi.org/10.5016/1806-8774.2008.v10p105>, pristupljeno: 16.02.2024.
- (6) Bradamante Ž, Kostović-Knežević Lj, ur. Osnove histologije. Prema desetome američkom izdanju. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
- (7) Hajsig D, Delaš F, ur. Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo; 2016.
- (8) Luna G. L, ur. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Treće izdanje.
- (9) My Pathology report.ca. Dostupno na: <https://www.mypathologyreport.ca/hr/pathology-dictionary/periodic-acid-schiff-pas/>, pristupljeno: 08.07.2024.
- (10) Czubek A. Warthin-Starry Stain for Spirochetes in Tissue. Dostupno na: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/B078419B0304A7E0990DAF3C0F1ABC1B/S1551929500060570a.pdf/warthin-starry-stain-for-spirochetes-in-tissue.pdf>, pristupljeno: 11.05.2024.
- (11) WebPath: Internet Pathology Laboratory. Surgical Pathology – Histology, Staining Manual – Microorganisms. Dostupno na: <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/STEINER.PDF>, pristupljeno: 11.05.2024.
- (12) Peroš-Golubičić. Sarkoidoza/Bolesti plućnog intersticija. Zagreb: Medicinska naklada; 2005.

- (13) Jurčev-Savičević A, Miše K i sur. Tuberkuloza – stara dama u novom ruhu. Zagreb: Medicinska naklada; 2022.
- (14) Cvetnić Ž. Povijest tuberkuloze s osvrtom na asanaciju i tuberkulozu u Mraclinu. Zagreb – Velika Gorica: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti; 2022.
- (15) Asano S. Granulomatous Lymphadenitis. 2012; Vol.52, No. 1. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22706525/>, pristupljeno: 12.05.2023.
- (16) Volner Ž, Batinić D i sur. Opća medicinska mikrobiologija i imunologija. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
- (17) Naglič T, Hajsig D, Madić J, Pinter Lj. Veterinarska mikrobiologija : specijalna bakteriologija i mikologija. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatsko mikrobiološko društvo; 2005.
- (18) Zumla A, James D. G. Granulomatous Infections: Etiology and Classification. Dostupno na: <https://academic.oup.com/cid/article/23/1/146/592418>, pristupljeno: 07.07.2024.
- (19) Reddy G.K.K, Padmavathi A.R, Nancharaiah Y.V. Fungal infections: Pathogenesis, antifungals and alternate treatment approaches. Current Research in Microbial Sciences. 2022; Volume 3, 100137. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517422000347>, pristupljeno: 08.07.2024.
- (20) Kalenić S. i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
- (21) Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, Bonella F. Differential diagnosis of granulomatous lung disease: clues and pitfalls. Eur Respir rev 2017;26:170012. Dostupno na: <https://err.ersjournals.com/content/26/145/170012>, pristupljeno: 08.07.2024.
- (22) Smojver-Ježek S, Ramljak V, Ries S, Gjadrov Kuveždić K, Harabajsja S. Citologija. Zagreb: Zdravstveno veleučilište; 2021.
- (23) Lepur D. i sur. Infektologija. Zagreb: Naklada slap; 2019.
- (24) Pearson R.D, Toksoplazmoza. Hemed.hr. Dostupno na: <https://hemed.hr/Default.aspx?sid=13520>, pristupljeno: 08.07.2024.



(25) Cvetnić Ž. Bakterijske i gljivične zoonoze. Zagreb: Medicinska naklada, Hrvatski veterinarski institut; 2013

(26) DePond D. W, Kuty V. M. S, Pernick N. Other infections. Dostupno na: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/lymphnodesotherinfections.html>, pristupljeno: 23.06.2024.

(27) Winders J. Foreign body granuloma. DermNet. 2017. Dostupno na: <https://dermnetnz.org/topics/foreign-body-granuloma>, pristupljeno: 23.06.2024.

(28) Franklin M, Somach S. Foreign body reaction. PathologyOutlines.com. Dostupno na: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/skinnontumorforeignbodyreaction.html>, pristupljeno: 08.07.2024.