

Dermatomykologická diagnostika – co lze vyčíst z louhového preparátu?

Skořepová M.

Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha
přednosta prof. MUDr. J. Štork, CSc.

Souhrn

Mykologický mikroskopický preparát je jednou ze standardních vyšetřovacích metod v dermatovenerologii. Spolu s kultivací slouží k potvrzení diagnózy při klinickém podezření na dermatomykózu nebo onychomykózu především před zahájením systémové terapie. Zatímco kultivace je zdlouhavá a musí být provedena v laboratoři, přímou mikroskopií ze šupin nebo vlasů lze mykózu diagnostikovat přímo v ordinaci. Na druhé straně správné odečtení a interpretace louhového preparátu vyžaduje značnou praxi a zkušenosti. Článek ukazuje základní mikroskopické charakteristiky fungálních elementů v dermatologických vzorcích a jejich odlišení od artefaktů. Dále uvádí některé řidčeji se vyskytující mikroskopické obrazy, které umožňují bližší určení nalezených hub. Cílem je jednak napomoci při přípravě k atestační zkoušce z dermatovenerologie, jednak demonstrovat, jaké informace lze z louhového preparátu vyčíst v dermatologické praxi.

Klíčová slova: přímá mikroskopie – louhový preparát – diagnostika dermatomykóz

Summary

Dermatological Diagnostics – What Can Be Read out from a KOH Wet Mount?

Mycological wet mount is one of the routine diagnostic methods in dermatovenerology. Together with cultivation it helps to confirm the diagnosis of dermatomycosis or onychomycosis based on the clinical suspicion especially before systemic treatment. While cultivation takes time and needs to be performed in the laboratory, the direct microscopy from skin scrapings or hair can diagnose the mycosis directly in the office. On the other hand, the proper reading and interpretation of the KOH wet mount requires a considerable practice and experience. The article shows the basic microscopical characteristics of fungal elements in the dermatological specimens and their differentiation from artefacts. Furthermore, it presents some rare microscopical pictures, which enable a closer identification of fungi. The aim is to help in the study for the board examination in dermatovenerology, and also to demonstrate, which information it is possible to read out from the KOH wet mount in the dermatological practice.

Key words: direct microscopy – KOH preparations – diagnostics in dermatomycology

ÚVOD

Nařízením Ministerstva zdravotnictví bylo od 1. 1. 2005 zrušeno preskripční omezení pro terbinafin, vázající předpis tohoto léku na mikroskopický nebo kultivační důkaz skutečné mykotické infekce (pro itraconazol a flukonazol zůstalo z nějakých důvodů zachováno). Na jedné straně je potěšující, že odpadlo ponižující vynucování správné lékařské praxe direktivním nařízením ze strany nelékařského subjektu pod hrozbou sankcí. Na druhé straně je však

třeba mít na paměti, že důvodem tohoto kroku byla především ekonomická situace, nikoli převratná změna v diagnostice mykologických onemocnění (2, 5, 6, 8, 10).

Zatímco k lokální léčbě stačí v mnoha případech stanovení diagnózy klinicky, k systémové léčbě, zejména u mykóz nehtů, v nichž moderní antimykotika přetrvávají řadu měsíců, je radno přistupovat až po laboratorním ověření diagnózy. Případné omyly se totiž dodatečně napravují s obtížemi – stačí se podívat na lžuty, které je potřeba dodržet před mykologickým odběrem, má-li být laboratorní vyšetření směrodatné.

- Ketokonazol 3 měsíce
Flukonazol
- Intrakonazol 6–9 měsíců
Terbinafin

A jaká je pravděpodobnost omylu při stanovení diagnózy pouhou aspexí? Jen asi 50 % případů nehtových onemocnění je skutečně mykotického původu. Část z nich zkušený klinik pozná už při aspexí, část ovšem dokáže klinický obraz onychomykózy imitovat velmi zdařile (7). Není problém naučit se 4 základní klinické obrazy onychomykózy – distální subungvální, proximální subungvální, bílá superficiální a totální dystrofická (4). Problémy (jak vidíme u pacientů přicházejících k nám na konziliární vyšetření) činí odlišit od distální subungvální onychomykózy nehtovou psoriázu či podnehtovou veruku, od totální dystrofické onychomykózy acrodermatitis continua Hallopeau, od proximální onychomykózy nádory a cysty v oblasti matrix, nemluvě o mnoha dalších nemykotických onemocněních nehtového aparátu. Odstrašujícím příkladem budiž obrázek pokročilého spinocelulárního karcinomu pod nehtem palce na noze (obr. 1), který byl 1,5 roku léčen neúspěšně antimykotiky na základě „zcela jednoznačného“ klinického nálezu onycholýzy, hnědavé dyskolorace a podnehtové hyperkeratózy. Teprve když si pacient sám všiml, že mu zpod nehtu vyrůstá stále se zvětšující masitý útvar, rozhodl se nechat si diagnózu ověřit (nyní je po amputaci palce bez známek relapsu).



Obr. 1. Subungvální spinocelulární karcinom léčený jako klinicky jednoznačná onychomykóza.

Druhou stranou mince je skutečnost, že kterékoli z těchto nehtových onemocnění může být sekundárně mykotickou flórou kolonizováno nebo infikováno. Zatímco primární onychomykóza je z 93 % způsobována dermatofyty, u sekundární infekce se uplatňují jak derma-

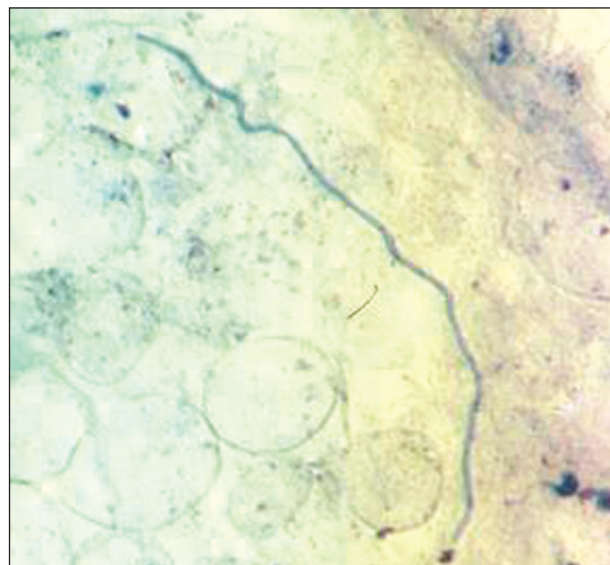
tofyty, tak zejména kvasinky a oportunní hyfomycety. To pak jsou ony případy, kdy laboratorně prokázaná mykóza se po léčbě negativizuje, ale klinický obraz se zlepšil jen nepatrně. Jindy se po jednotlivých léčebných kúrách mikrobiální flóra vystřídá (např. sled: dermatofyt – terbinafin – kvasinka – itrakonazol – mykologická negativizace, ale masivní bakteriální nález, přičemž klinický obraz zůstává stejný).

Mikroskopický preparát ze šupin je prvním krokem k objektivizaci diagnózy. Zatímco kultivace je zdlohouhá a u nehtů je asi ve 40 % falešně negativní, mikroskopické vyšetření lze realizovat hned na místě a jeho senzitivita je poměrně vysoká – 77 % podle našeho výzkumu, 82,5 % podle Grovera (3). Cílem tohoto článku je ukázat, jaké informace lze z louhového preparátu vyčíst.

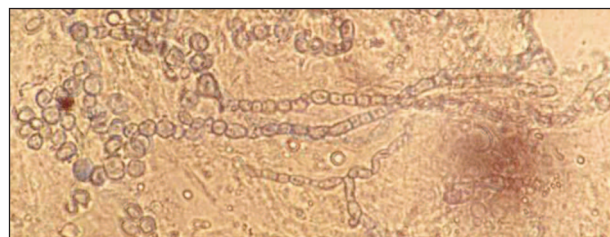
Louhový preparát se prohlíží v orientačním zvětšení 160krát–200krát, na detaily se používá zvětšení 400krát–450krát. Preparát je nutno prohledat meandrovitým pohybem celý, protože houbových elementů bývá často velmi málo, navíc jsou rozloženy nepravidelně – v celém preparátu nic, až v koutku posledního prohlíženého zorného pole se najednou objeví třeba chumáč vláken.

Základní dovedností je rozlišit houbové vlákno od artefaktu.

Hyfa leží zpravidla napříč přes keratinocyty, často



Obr. 2a. Houbové vlákno. KOH + inkoust Parker, orig. zvětšení 200x.

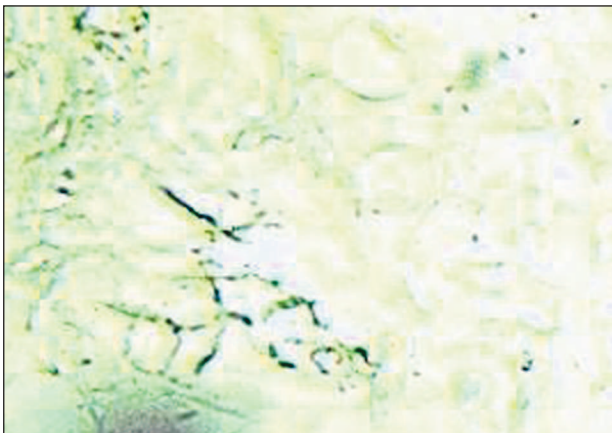


Obr. 2b. Houbové vlákno. KOH, orig. zvětšení 400x.

i v trochu jiné optické rovině, má výrazné, hladké kontury a ostře useknuté konce (obr. 2a). Při větším zvětšení jsou uvnitř hyfy vidět septa, jádra, vakuoly a granulovaná cytoplazma. V místech sept se vlákno rozpadá v soudkovité artrospóry, které se po oddělení zakulacují (obr. 2b).

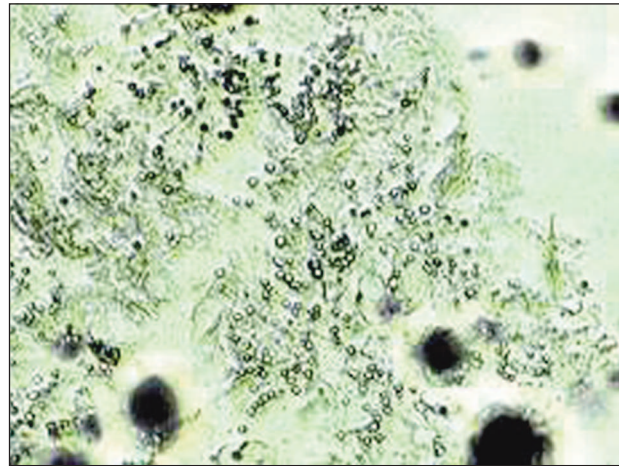


Obr. 3a. Vlákenný artefakt. KOH + inkoust Parker, orig. zvětšení 200x.



Obr. 3b. Tzv. mozaiková „houba“. KOH, orig. zvětšení 200x.

Artefakt (většinou textilní vlákno) má nerovné kontury, rozřepené konce a neobsahuje žádné orgány. Barvení Parkerovým inkoustem ani fluorescence nejsou pro odlišení směrodatné, protože mají afinitu jak k polysacharidům v buněčné stěně hub, tak k celulóze v rostlinných vláknech (obr. 3a). Tzv. „mozaiková houba“ je snad nejzákladnější artefakt vůbec. Dlouhá léta se v odborné literatuře vedly spory, zda jde o houbové struktury či nikoli. Dnes víme, že jde o mikroskopické kapičky mazu, seřazené po obvodu keratinocytů. Právě důsledné obkružování kožních buněk by mělo vzbudit podezření, které se potom potvrdí při větším zvětšení nepřítomností organel (obr. 3b).

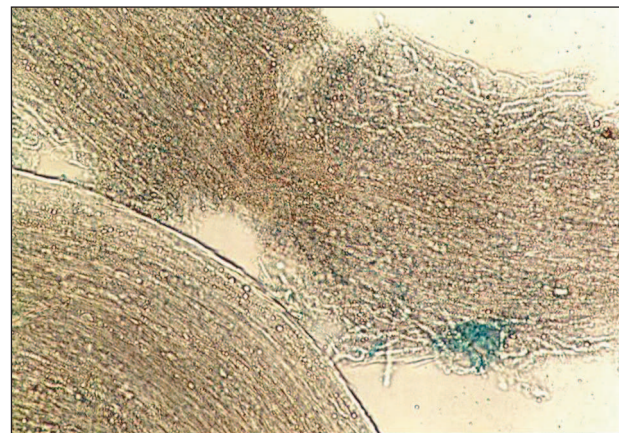


Obr. 4. Artefakty. KOH, orig. zvětšení 160x.

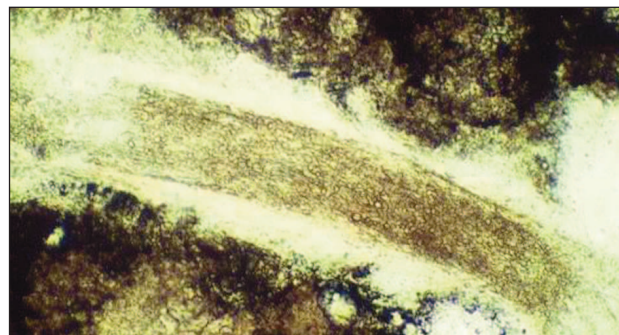
Izolované kulovité elementy se hodnotí velmi těžko. Může jít o sraženiny, kapky mazu, drobné bubliny, krystaly, stejně jako o spóry. Proto v preparátu hodnotíme především přítomnost vláken (obr. 4).

Občas lze z mikroskopického obrazu činit přesnější závěry, vzácně lze už přímou mikroskopií určit původce až na úroveň rodu.

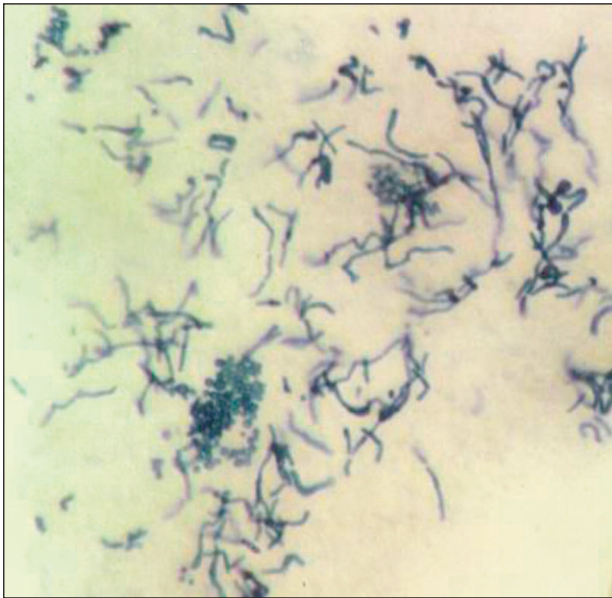
Napadení vlasu typu ektothrix je charakteristické pro *Microsporum sp.* a zoofilní zástupce rodu *Trichophyton*. V levém dolní rohu obr. 5a je zdravý úsek vlasu se zachovalou kutikulou, nad ním je vlas obklopený manžetou



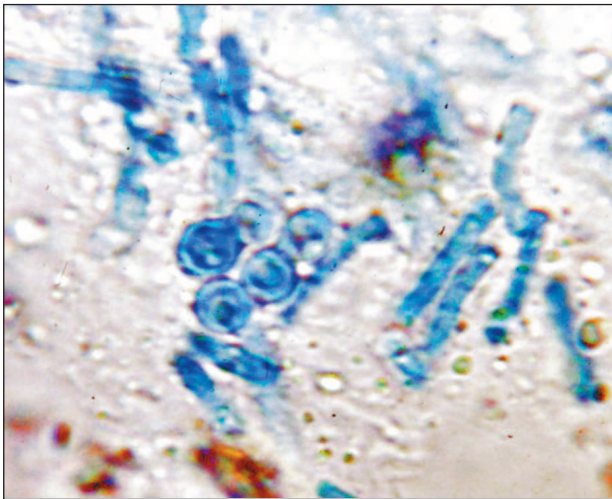
Obr. 5a. Ektothrix. KOH, orig. zvětšení 200x.



Obr. 5b. Endothrix. KOH, orig. zvětšení 100x.



Obr. 6a. Pityriasis versicolor, KOH + inkoust Parker, orig. zvětšení 160x.

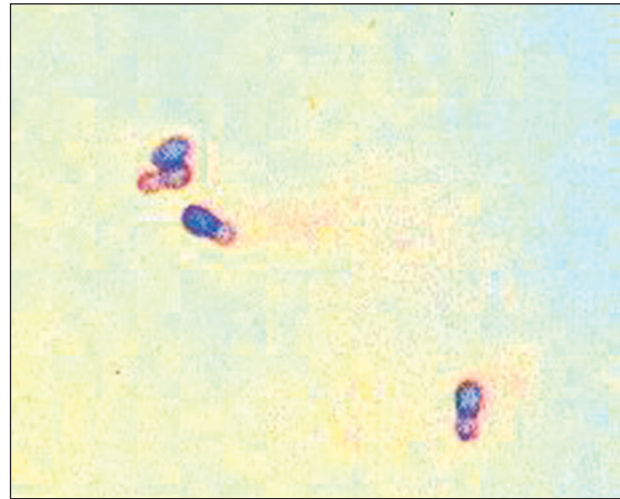


Obr. 6b. Pityriasis versicolor, KOH + inkoust Parker, orig. zvětšení 1000x.

mycelia (kultivačně *Microsporum canis*). Napadení vlasu typu endothrix svědčí pro antropofilní *Trichophyton*. Kutikula je zachována, spóry leží uvnitř vlasového stvolu (kultivačně *Trichophyton violaceum*) (obr. 5b).

Nález krátkých pokroucených vláken spolu se shluky kulatých spór („spaghetti with meatballs“) je charakteristický pro *Malassezia sp.* u pityriasis versicolor. Je spolehlivější než fluorescence ve Woodově světle, která u pityriasis versicolor alba může být jen velmi slabá – zdrojem fluorescence je totiž červenohnědý pigment, produkovaný malasezií (9) (obr. 6a, b).

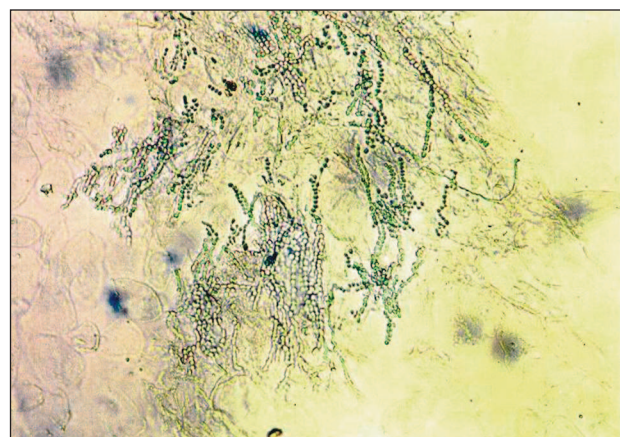
Obr. 7 znázorňuje malasezie v kvasinkové fázi v šupinách ze kštice při dermatitis seborrhoica capillitii. Malasezie tvoří pupeny vždy na jednom místě mateřské buňky.



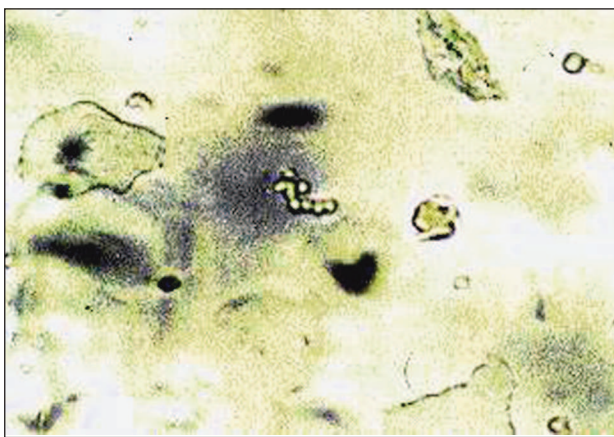
Obr. 7. Malassezia furfur. KOH + inkoust Parker, orig. zvětšení 400x.

V tomto místě se na těle mateřské buňky vytváří cirkulární jizva, patrná při pohledu v mikroskopu jako „límeček“ (collerette). Charakteristickým mikroskopickým znakem malasezií je tedy tvar připomínající čturu, podle druhu malasezie buď kulatou, či oválnou, s úzkým či širokým hrdlem. K pozorování těchto detailů je potřeba zvětšení 1000krát. Parkerovým inkoustem se malasezie barví sytější než jiné kvasinky. Dají se dobře barvit i metylenovou modří. Optimální pro mikroskopickou diagnostiku malasezií je fluorescenční mikroskop. V poslední době se objevila doporučení systémové léčby některých onemocnění souvisejících s malaseziemi (malaseziová folikulitida, dermatitis perioralis), léčba se však osvědčila jen v těch případech, kdy byly malasezie mikroskopicky prokazatelné (1).

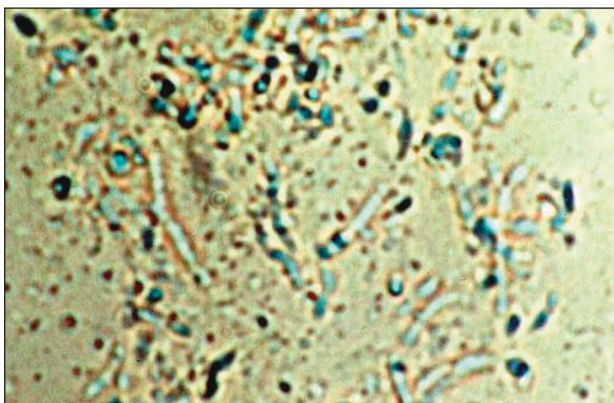
Dlouhá, četná vlákna s korálkovitými řetízky artrospór lze hodnotit jako nález dermatofyta (obr. 8). Takto masivní nález dlouhých vláken navíc signalizuje, že dermatofyt je právě ve fázi aktivního růstu, kdy je vůči systémovým antimykotikům nejzranitelnější. Šance na léčebný úspěch je tedy velmi vysoká.



Obr. 8. Vlákna a spóry dermatofyta. KOH, orig. zvětšení 200x.



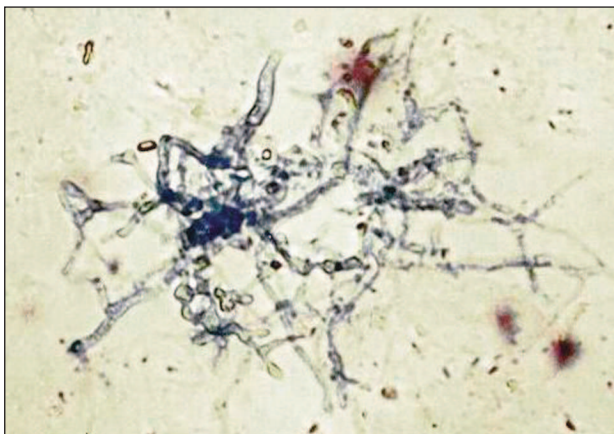
Obr. 9a. Řetízek kvasinek. KOH, orig. zvětšení 200x.



Obr. 9b. Krátké pseudohyfy a spóry kvasinek. KOH, orig. zvětšení 200x.

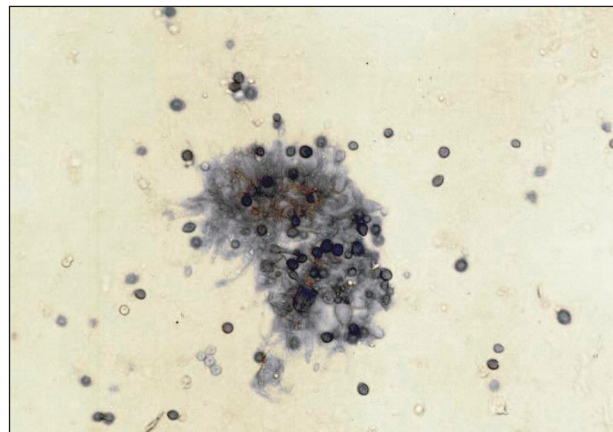
Kvasinky tvoří krátké řetízky z drobných, oválných pučících blastospór, popř. krátké pseudohyfy se zaoblenými konci (připomínají párky) (obr. 9a, b). Je však nutné zdůraznit, že řada kvasinek vytváří i pravá vlákna, v preparátu nerozlišitelná od vláknitých hub.

Vlákna nápadně tenká, nápadně tlustá, s nestejným průměrem bývají připisována saprofytům (obr. 10). Ale předchozí aplikace antimykotik či kortikoidů dokáže vyvolat i u dermatofytů hrubé deformace vláken s různý-



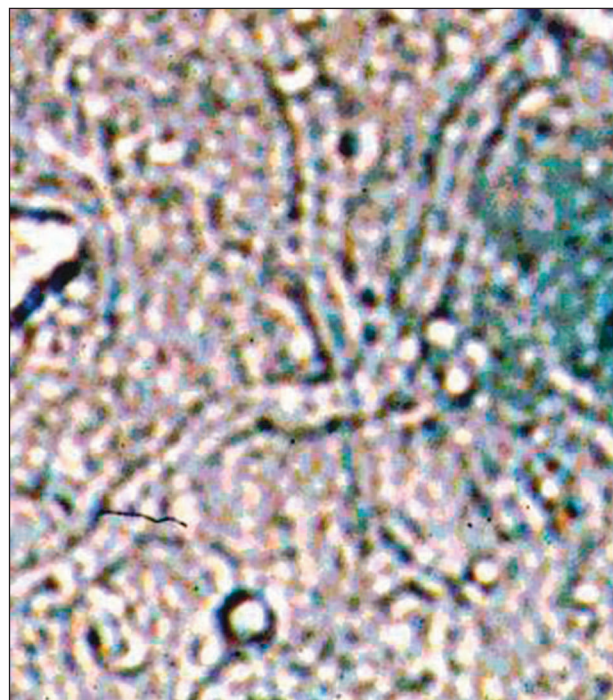
Obr. 10. Vlákna saprofyta. KOH, orig. zvětšení 200x.

mi výdutěmi, uzly a „favickými svícny“. Navíc takto postižené dermatofyty rostou pak i v kultuře atypicky a vytvářejí bizarní, těžko určitelné kolonie. Teprve po několika přeočkováních se vrátí k normální morfologii. Tím se ovšem čekání na kultivační výsledek značně prodlouží.



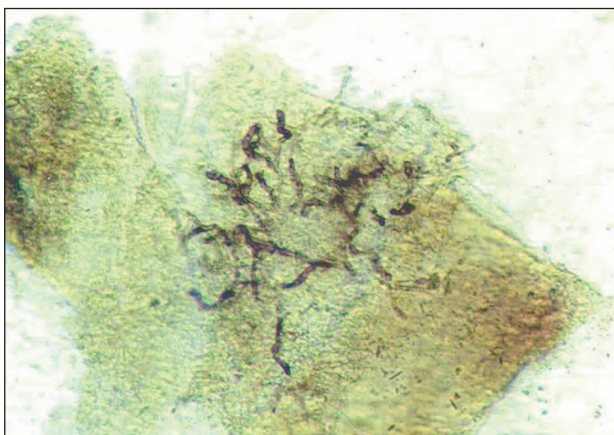
Obr. 11. Scopulariopsis sporulující v nehtu. KOH, orig. zvětšení 200x.

Scopulariopsis sp., pokud v nehtu sporuluje, dá se identifikovat podle silnostěnných kulatých až kapkovitých konidií s dvojitou konturou (obr. 11). Parkerovým inkoustem se barví nápadně intenzivněji než artrospóry dermatofytů. *Scopulariopsis* patří mezi tzv. nedermatofytické patogeny, většinou však napadá nehty již narušené buď dermatofytickou infekcí, nebo jinou (často traumatickou) onychopatií. Při léčbě je třeba počítat s obtížemi.



Obr. 12. Aspergillus – dichotomické větvení. KOH, orig. zvětšení 400x.

Nápadně široká, septovaná vlákna, která se místy dichotomicky (vidličnatě) větví, jsou charakteristická pro rod *Aspergillus* (obr. 12). V tomto případě byl z nehtu vykultivován *A. fumigatus*. Aspergily se zařadily na druhé místo po *Scopulariopsis* jako vyvolavatelé oportunních onychomykóz. S nárůstem počtu imunosuprimovaných osob v populaci jejich četnost roste.



Obr. 13. *Alternaria* v nehtu. KOH, orig. zvětšení 100x.

Silná tmavohnědě pigmentovaná vlákna s hojnými septy jsou znakem *Alternaria* sp. (obr. 13). Vedle nich však alternarie tvoří i necharakteristická tenká vlákna bez pigmentu. Nehtová alternarióza se někdy prozradí i černým proužkem v nehtu.

Ve většině případů se však v preparátu najdou jen ojedinelá houbová vlákna bez výrazných charakteristických znaků. Proto mikroskopie nemůže nahradit kultivaci při rutinním vyšetřování, je to však rychlá, diagnosticky přínosná pomůcka použitelná v první linii, která může zabránit neúčelné aplikaci antimykotik.

LITERATURA

1. CAPUTO, R. Itraconazole (Sporanox) in superficial and systemic fungal infections. *Exper Rev Anti Infect Ther*, 2003, 1, p. 531–542.
2. ELEWSKI, BE., LEYDEN, J., RINALDI, MG., ATILLASOY, E. Office practice-based confirmation of onychomycosis: a US nationwide prospective survey. *Arch Intern Med*, 2002, 162(18), p. 2133–2138.
3. GROVER, C., REDDY, BS., CHATURVEDI, KU. Onychomycosis and the diagnostic significance of nail biopsy. *J Dermatol*, 2003, 30(2), p. 116–122.
4. GUPTA, AK., RYDER, JE., SUMMERBELL, RC. Onychomycosis: classification and diagnosis. *J Drugs Dermatol*, 2004, 3(1), p. 51–56.
5. HAINER, BL. Dermatophyte infections. *Am Fam Physician*, 2003, 67(1), p. 101–108.
6. JENNINGS, MB., RINALDI, MG. Confirmation of dermatophytes in nail specimens using in-office dermatophyte test medium culture. Insights from a multispecialty survey. *J Am Podiatr Med Assoc*, 2003, 93(3), p. 195–202.
7. LAWRY, MA., HANEKE, E., STROBECK, K., MARTIN, S., ZIMMER, B., ROMANO, PS. Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature. *Arch Dermatol*, 2000, 136(9), p. 1162–1164.
8. MAHONEY, JM., BENNET, J., OLSEN, B. The diagnosis of onychomycosis. *Dermatol Clin*, 2003, 21(3), s. 463–467.
9. MAYSER, P., STAPELKAMP, H., KRAMER, HJ., PODOBINSKA, M., WALLBOTT, W., IRLINGER, B., STEGLICH, W. Pityrialactone – a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 84(3), p. 185–191.
10. WEINBERG, JM., KOESTENBLATT, EK., TUTRONE, WD., TISHLER, HR., NAJARIAN, L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*, 2003, 49(2), p. 193–197.

Došlo do redakce: 9. 2. 2005

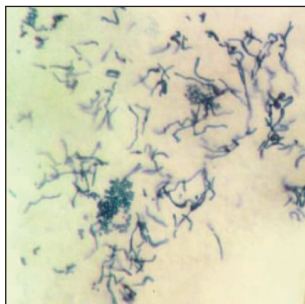
MUDr. Magdalena Skořepová
Dermatovenerologická klinika I. LF UK a VFN
U nemocnice 2
128 08 Praha 2

DOŠKOLOVÁNÍ LÉKAŘŮ – KONTROLNÍ TEST

„DERMATOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA“

Otázky:

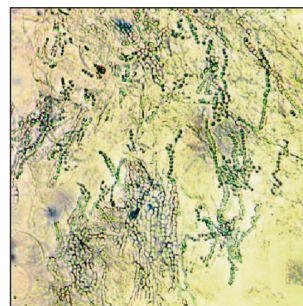
1. Tento mikroskopický obraz je charakteristický pro:
- dermatofytózy,
 - kandidózy,
 - pityriasis versicolor,
 - aspergilózy.



2. Způsob napadení vlasu dermatofytem *Microsporum canis* se označuje jako:
- ektothrix,
 - endothrix,
 - trichomycosis palmellina,
 - trichorrhaxis nodosa.
3. Spóry v mikroskopickém preparátu ze šupin mohou patřit:
- pouze dermatofytu,
 - pouze kvasince,
 - pouze oportunním hyfomycetům,
 - kterémukoli z výše uvedených.
4. Tzv. „mozaiková houba“:
- je dermatofyt,
 - je kvasinka,
 - je artefakt,
 - je oportunní hyfomycet.
5. Kvasinky v mikroskopickém preparátu:
- nikdy netvoří vlákna,
 - tvoří pučící buňky a krátká vlákna,
 - tvoří makrokonidie a mikrokonidie,
 - tvoří spirální vlákna.
6. Dichotomické větvení znamená:
- vidličnaté větvení,
 - přeslenité větvení,
 - zpeřené větvení,
 - odstup postranních větví v pravém úhlu.

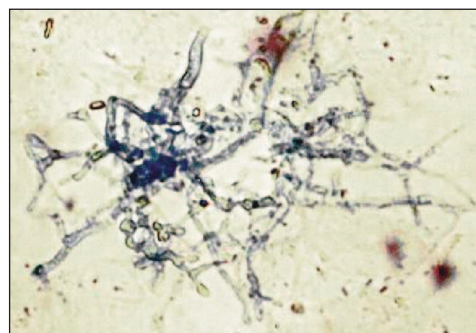
7. Pro kvasinky rodu *Malassezia* je charakteristické:
- multipolární pučení,
 - bipolární pučení,
 - unipolární pučení,
 - pučení v řetězcích.

8. Dlouhá, větvená, septovaná vlákna s pravidelnými řetězky spór (viz obr.) patří nejspíše:
- malasezii,
 - kandidě,
 - dermatofytu,
 - saprofytu.



9. Artrospóry jsou typ spór vznikající:
- pučením řetězku kvasinek,
 - rozčlankováním houbového vlákna v místě sept,
 - obalením výtrusů silnou, odolnou stěnou,
 - splynutím dvou haploidních buněk.

10. Vlákna s nápadně nepravidelou šířkou, střídavě tlustá a tenká, deformovaná, septovaná či neseptovaná (viz obr.) mohou patřit:



- malaseziím,
- kvasinkám,
- oportunním hyfomycetům,
- pouze zoofilním dermatofytům.

Pozn. Správné odpovědi na otázky kontrolního testu budou uveřejněny v příštím čísle časopisu. Ti z vás, kteří chtějí být zařazeni do slosování o ceny 81. ročníku časopisu roku 2006, nechtě zašlou správné odpovědi na kontrolní test na adresu redakce vždy nejpozději do jednoho měsíce od vydání daného čísla.

Správné odpovědi na otázky kontrolního testu k článku:

Hercogová J. et al. „Lymeská borrelióza“, publikovaném v č. 6/2005:

1a), 2b), 3a), 4b), 5b), 6d), 7b), 8b), 6b), 10d)