

Diagnostika dermatomýkóz v laboratoři klinické mykologie: doporučený postup navržený Pracovní skupinou pro mykologii SLM ČLS JEP

K. MENCL¹, V. BUCHTA², N. MALLÁTOVÁ³, I. KOČMANOVÁ⁴, V. HUBKA^{5,6}, P. HAMAL⁷

¹Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice; ²Ústav klinické mikrobiologie, LF UK v Hradci Králové;

³Pracoviště parazitologie a mykologie, Centrální laboratoře Nemocnice České Budějovice, a. s.;

⁴Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno;

⁵Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze;

⁶Laboratoř genetiky a metabolismu hub, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha;

⁷Ústav mikrobiologie, LF Univerzity Palackého v Olomouci a FN Olomouc

SOUHRN

Mencel K., Buchta V., Mallátová N., Kocmanová I., Hubka V., Hamal P.: **Diagnostika dermatomýkóz v laboratoři klinické mykologie: doporučený postup navržený Pracovní skupinou pro mykologii SLM ČLS JEP**

Tento návrh doporučeného postupu laboratorní diagnostiky dermatomýkóz byl vypracován na základě odborné diskuze členů Pracovní skupiny pro mykologii Společnosti pro lékařskou mikrobiologii České lékařské společnosti JEP (PSM SLM ČLS JEP). Vychází z dokumentu „Doporučený postup laboratorní diagnostiky dermatomýkóz“ zveřejněného na webových stránkách SLM ČLS JEP 23. 6. 2020 k všeobecné odborné diskuzi.

Dosud byly pokyny v této oblasti mykologické laboratorní diagnostiky omezeny pouze na informace v příručkách a neexistoval žádný ucelený a systematický dokument na uvedené téma. Tuto mezeru se členové PSM SLM ČLS JEP snažili zaplnit, a vzniklo tak doporučení, pokrývající všechny části dermatomýkologické laboratorní problematiky, od způsobu získání kvalitní anamnézy, správného postupu při odběru vzorků, jejich vyšetřování konvenčními mikroskopickými a kulturačními technikami, až po interpretaci získaných výsledků. Do této základní osnovy byly začleněny informace o diagnostickém potenciálu nových, moderních technologií, zejména molekulárně genetických metod a hmotnostní spektrometrie. Nedávno došlo k vypracování standardní evropské metodiky pro testování citlivosti dermatofytů k antimykotikům, proto byla i tato problematika do doporučení zahrnuta. Je samozřejmě počítáno s budoucí periodickou revizí tohoto dokumentu na základě nových poznatků.

Klíčová slova: dermatomýkózy, laboratorní diagnostika, dermatofyty, mikroskopické metody, kulturační metody, identifikace, citlivost na antimykotika

SUMMARY

Mencel K., Buchta V., Mallátová N., Kocmanová I., Hubka V., Hamal P.: **Diagnosing dermatomycoses in a clinical mycology laboratory: guidelines proposed by the Czech Society for Medical Microbiology Working Group on Mycology**

This draft of guidelines for the laboratory diagnosis of dermatomycoses was developed based on discussion among members of the Czech Society for Medical Microbiology Working Group on Mycology. The document Guidelines for the Laboratory Diagnosis of Dermatomycoses was published for discussion on the Czech Society for Medical Microbiology website on 23 March 2020.

Until recently, recommendations concerning this area of laboratory diagnosis in mycology were only limited to information in manuals and no comprehensive and systematic document concerning these issues was available. In an effort to fill the gap, members of the working group developed recommendations covering various laboratory aspects of mycology, from obtaining a proper history, to adequate sampling techniques, sample analyses using conventional microscopy and culture techniques, to interpretation of results. Additional information was on the diagnostic potential of novel, modern technology, in particular molecular genetic methods and mass spectrometry. The recently developed European standards for testing the susceptibility of dermatophytes to antifungals were also included in the recommendations. The document will be regularly updated based on new findings.

Keywords: dermatomycoses, laboratory diagnosis, dermatophytes, microscopy methods, culture methods, identification, antifungal susceptibility

Klin mikrobiol inf lék 2021;27(1):18–27

Adresa: doc MUDr. Petr Hamal, Ph. D., Ústav mikrobiologie, LF UP v Olomouci, Hněvotínská 976/3, 775 15 Olomouc, e-mail: petr.hamal@fnol.cz

Došlo do redakce: 22. 2. 2021

Schváleno k tisku: 29. 2. 2021

Úvod

V rutinní mykologické laboratoři jsou vyšetřeny kůže a kožních adnex s podezřením na houbovou infekci běžným diagnostickým postupem. Ke zmíněnému účelu postačuje zpravidla pouze část z jejího základního vybavení, specifikovaného v dokumentu „Nepodkročitelné minimum diagnostiky mykóz v laboratoři lékařské mykologie“, především to konzervativní, tedy mikroskop a termostaty [1]. Avšak jsou-li na pracovišti k dispozici moderní technologie typu hmotnostní spektrometrie či molekulární genetiky, doporučuje se je i v této oblasti mikrobiologické diagnostiky využít [2,3].

Z metodického hlediska je i v dermatomykologii základním požadavkem standardizace jednotlivých vyšetřovacích postupů. To se týká zvláště výběru kultivačních půd, teploty a délky inkubace. Většina akreditovaných mykologických laboratoří má za tímto účelem vypracované tzv. standardní operační postupy (SOP). Není na závadu, pokud se metodologicky a technologicky vzájemně mírně liší, pokud jsou pečlivě dodržovány a v rámci mezilaboratorní srovnatelnosti výsledků vedou k stejným nebo velmi podobným závěrům či interpretacím.

Vzhledem k tomu, že se u dermatomykóz jedná téměř výhradně o postižení kůže a jejích adnex, tedy míst většinou dobře viditelných a snadno přístupných a že se nejedná o život ohrožující infekce, je získání vzorků k vyšetření poměrně snadné a nehrozí nebezpečí z prodlení. V případě sporných, nebo raritních nálezů je také většinou možné odběry biologického materiálu a jejich mykologické vyšetření zopakovat.

Původci dermatomykóz bývají nejčastěji dermatofyty, o něco vzácněji kandidy, ale zejména u onychomykóz se můžeme setkat i s méně obvyklými druhy kvasinek (např. z rodů *Trichosporon*, *Geotrichum*, na kůži pak s *Malassezia* spp.) a jinými vláknitými houbami, včetně běžných ubikvitních (většinou označovaných jako „saprofytické plísně“, např. z rodů *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Onychocola*, *Chaetomium*) [4–7].

Rodové a druhové spektrum dermatofytů, se kterými se můžeme setkat v České republice, je přehledně sumarizováno v tab. 1. Jsou v ní uvedeny

i některé starší varianty jejich názvů, které jsou však stále používány [8]. Zmíněný výčet je založen na epidemiologických datech z let 2011–2019, která byla sbírána v rámci multicentrické studie napříč Českou republikou. Některé její průběžné výsledky již byly

publikovány [9,10]. Konečná identifikace izolátů byla vždy provedena sekvencováním oblasti ITS rDNA [3,8]. Rozdělení jednotlivých druhů dermatofytů podle klinických jednotek, které způsobují, včetně jejich četnosti, je demonstrováno v tab. 2.

Tabulka 1
Druhy dermatofytů zachycené v České republice podle ekologie původců
(Řazení ve sloupcích je podle četnosti od nejběžnějších druhů po vzácné, v závorkách jsou uvedena případná běžná synonyma jmen.)

Antropofilní ¹	Zoofilní ²	Geofilní ³
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton benhamiae</i> (<i>Arthroderma benhamiae</i>)	<i>Nannizzia persicolor</i> (<i>Microsporium persicolor</i>)
<i>Trichophyton interdigitale</i> ²	<i>Microsporium canis</i>	<i>Nannizzia gypsea</i> (<i>Microsporium gypseum</i>)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ²	<i>Nannizzia fulva</i> (<i>Microsporium fulvum</i>)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>	<i>Arthroderma quadrifidum</i> (<i>Trichophyton terrestris</i> komplex)
<i>Microsporium ferrugineum</i>	<i>Trichophyton quinckeum</i>	<i>Arthroderma onychocola</i> (<i>Trichophyton onychocola</i>)
<i>Trichophyton soudanense</i>	<i>Trichophyton erinacei</i>	<i>Arthroderma crocatum</i>
<i>Trichophyton violaceum</i>	<i>Trichophyton equinum</i>	<i>Nannizzia incurvata</i> (<i>Microsporium incurvatum</i>)
	<i>Trichophyton bulbosum</i>	<i>Nannizzia preacox</i> (<i>Microsporium preacox</i>)
		<i>Nannizzia aenigmatica</i> (<i>Microsporium aenigmaticum</i>)
		<i>Nannizzia perplicata</i>
		<i>Arthroderma insingulare</i> (<i>Trichophyton terrestris</i> komplex)
		<i>Paraphyton mirabile</i> (<i>Microsporium mirabile</i>)
		<i>Paraphyton cutaneum</i>

¹Druhy uvedené pod čarou se dají považovat ze extrémně vzácné v ČR (zachyceno < 5 případů mezi roky 2011–2019).

²Dle současného konceptu (de Hoog et al. 2017) je obtížné rozlišit druhy *T. interdigitale* a *T. mentagrophytes*, a to i pomocí molekulárních metod. Lokální doporučení je používat pro oba druhy název *T. interdigitale*, případně *T. interdigitale/T. mentagrophytes*.

Tabulka 2

Druhy dermatofytů zachycené v České republice podle hlavních klinických jednotek, které způsobují.
V závorce je uvedeno přibližné procentuální zastoupení.

Onychomykóza	Tinea pedis	Tinea capitis	Tinea hladké kůže (corporis, faciei, cruris)
<i>T. rubrum</i> (~93 %)	<i>T. rubrum</i> (~89 %)	<i>M. canis</i> (~41 %)	<i>T. rubrum</i> (~51 %)
<i>T. interdigitale</i> (~6 %)	<i>T. interdigitale</i> (~9 %)	<i>T. benhamiae</i> (~32 %)	<i>T. benhamiae</i> (~24 %)
ostatní druhy ~1 %	<i>E. floccosum</i> (~2 %)	<i>T. rubrum</i> (~15 %)	<i>M. canis</i> (~10 %)
	ostatní druhy < 1 %	<i>T. tonsurans</i> (~6 %)	<i>T. interdigitale/T. mentagrophytes</i> (~8 %)
		<i>T. interdigitale/ /T. mentagrophytes</i> (~3 %)	<i>N. persicolor</i> (~2 %)
		<i>Nannizzia gypsea</i> (~1 %)	<i>N. gypsea</i> (~1 %)
		<i>T. soudanense</i> (~1 %)	<i>T.n verrucosum</i> (~1 %)
		<i>T. verrucosum</i> (~1 %)	<i>N. fulva</i> (~0,5 %)
			<i>Arthroderma</i> spp. (~0,5 %)
			<i>E. floccosum</i> (~0,2 %)
			ostatní druhy < 2 %

Tento text je určen nejen pracovníkům mykologických laboratorí a dermatologům, ale i všem dalším zájemcům o problematiku kožních mykotických infekcí. Měl by sloužit jako doporučení optimálního postupu při průkazu výše uvedených mikromycet v klinických vzorcích, jejich identifikaci a interpretaci nálezů. Jeho základem je dokument „Doporučený postup laboratorní diagnostiky dermatomycóz“, zveřejněný na webových stránkách Společnosti pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP k odborné diskuzi [11]. Metodologicky vychází zejména z klasických tuzemských monografií, resp. manuálů, doplněných o významné a recentní zahraniční publikace na toto téma [4,12–16].

Obecný postup dermatomykologického vyšetření

Rámcově jej lze rozdělit do šesti částí:

- anamnéza
- odběrové techniky
- metody přímé diagnostiky
- kultivační postupy
- identifikace mikromycet
- interpretace nálezů

Pokud není odběrová místnost součástí laboratorního pracoviště, je kvalitní provedení prvních dvou postupů závislé na klinických lékařích a dalších částí pak na laboratorních pracovnících.

1. Anamnéza

Sběr anamnestických dat je vzhledem k epidemiologické charakteristice dermatofytů velmi důležitou částí celého vy-

šetření a jeho provedení musí splňovat několik procesních postupů, přehledně demonstrovaných na obr. 1.

Na základě zhodnocení, zda se primárně jedná o traumatické postižení kůže, nebo jen o prosté ložisko, je třeba získat údaje, které umožní bližší orientaci v případě a co nejkvalitnější provedení laboratorního vyšetření [17]. V případě pozitivní kultivace mohou takové údaje přispět ke správné identifikaci etiologického agens.

V rámci **osobní anamnézy** je zjištění rizikových faktorů směrodatné pro diferenciální diagnostiku mykóz a finální rozhodování o etiologické roli zachycených hub, ale také pro odhad úspěšnosti terapie a možných recidiv infekce. Zvláštní pozornost je třeba věnovat onemocněním, jako je diabetes mellitus, dále poruchám imunity, protinádorové terapii a z hlediska následné antimykotické léčby i poškození funkce jater a ledvin. Mykotické infekce mohou imitovat řadu dermatologických chorob, jejichž odlišení může být při diagnostice klíčové, a může na ně upozornit i negativní mykologický nález, zvláště opakovaný. Patří mezi ně seboroická dermatitida, psoriáza, pyodermie, impetigo contagiosa, pityriasis rosea Gibert, numulární ekzém, erythema multiforme, fixní lékový exantém, pseudotinea amiantacea, folliculitis decalvans, pseudopelade, chronický diskoidní erytematodes, alopecia areata, lichen planus a další.

Profesní anamnéza představuje velmi důležitou část získaných dat, protože s sebou nese forenzní důsledky, prokáže-li se, že postižení kůže je v přímé souvislosti se zaměstnáním [18].

Cestovatelská anamnéza, která bývá často opomíjena, může výrazně ovlivnit spektrum provedených kultivačních metod a v případě podezření na některé endemické mykózy, způsobené např. zástupci rodů *Blastomyces* nebo *Coccidioidi-*

des, je zásadní pro ochranu laboratorních pracovníků při manipulaci s primárním biologickým vzorkem i následném procesu identifikace zachycené dimorfní houby.

Rodinná anamnéza bývá téměř stejně důležitá, zvláště při zjištění styku s domácími mazlíčky [19]. Přitom se může jednat pouze o náhodný kontakt, ke kterému došlo např. při návštěvě, nebo chalupaření. Významný může být i pohyb v oblastech výskytu divoce žijících druhů zvířat [20]. Rizikem se mohou stát také různé sportovní a volnočasové aktivity, zejména návštěva plaveckých a jiných zařízení se společnými sprchami.

Lze tedy konstatovat, že získání kvalitních anamnestických údajů je jednou z nejdůležitějších částí procesu dermatomykologického vyšetření. Klinické lékaře, kteří provádějí odběry biologického materiálu sami a vzorek pošlou jen s minimem informací, je nutné edukační činností přesvědčovat o nutnosti poskytnutí co nejkomplexnější anamnézy pro získání kvalitního výsledku, včetně jeho interpretace.

2. Odběrové techniky

Odběry kůže a kožních adnex provádějí většinou dermatologové přímo ve svých ordinacích, obvykle na základě více či méně typického vzhledu lézí [2]. Byla-li však taková místa před návštěvou lékaře ošetřována lokálními antimykotiky, je třeba počkat 10–14 dní, v případě onychomýkóz i několik týdnů. Vlastní odběr je nezbytné zahájit důkladnou dekontaminací infikovaného místa 70% čistým etanolem a počkat až do jeho úplného zaschnutí [12,15]. Pokud takovou očistu nelze provést (např. u malých dětí), je potřeba uvedenou skutečnost zapsat do průvodního listu.

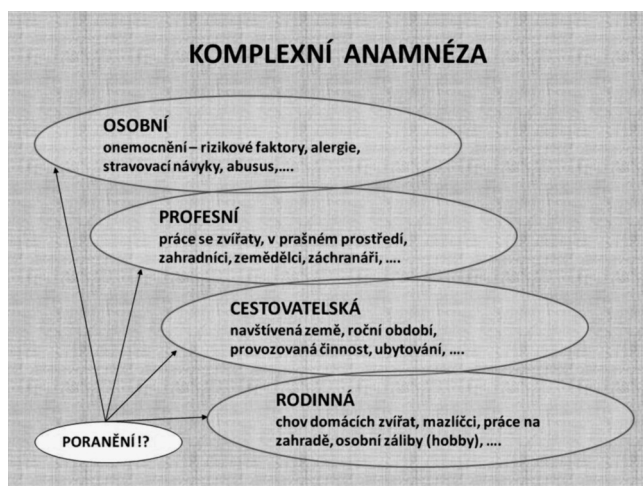
Obecně platí, že materiál je nutné odebrat sterilními nástroji do sterilních odběrových nádobek s dobře těsnícím uzávěrem, obvykle do zkumavek. Důležité je jeho dostatečné množství, které by mělo vystačit na provedení mikroskopického vyšetření a naočkování minimálně čtyř kultivačních půd. Příklady vhodných míst pro získání dermatomykologického materiálu jsou demonstrovány na obr. 2.

Jemné šupinky kůže z okrajů ložisek se odebírají nejlépe tupým skalpelem. Stejný nástroj, případně lancetu s ohnutou špičkou, lze po odstřížení distální části nehtu použít pro odběr podnehtových hyperkeratóz v případě onychomýkózy. Zcela nevhodné je posílat na vyšetření odstřížené nebo celé snesené nehty. Pro odběr vlasů, vousů a chlupů je vhodná epilací pinzeta. Odebírá se zhruba 1–2 cm dlouhý úsek s folikulární částí z okraje léze, přičemž nadbytečnou část lze odstříhnout dekontaminovanými nůžkami. Při výbě-

ru vlasů pomáhá v řadě případů Woodovo světlo [9,12,13,15].

Odběr z mokvajících, případně hnisavých ložisek, kde jsou většinou etiologickým agens kandidy, se obvykle provádí pomocí suchého tampónu na plastové či dřevěné tyčince, dále je vhodné provést ještě roztěr na mikroskopické podložní sklíčko a poté vše zaslat do laboratoře [4,12]. V případě většího množství hnisu lze použít injekční stříkačku. Jedná-li se o akutní dermatofytové léze s tvorbou pustulek,

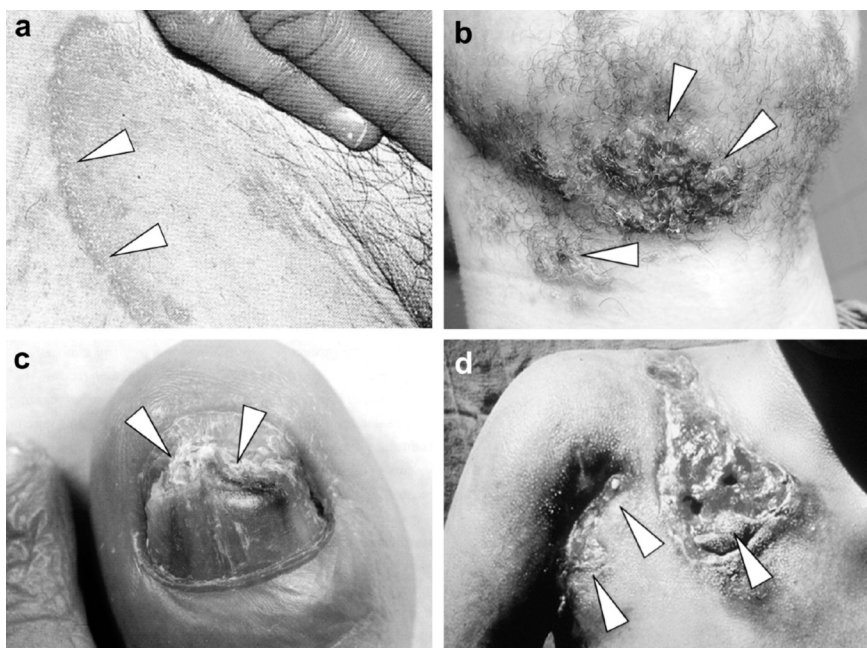
Obrázek 1
Součástí komplexní anamnézy
při dermatomykologickém vyšetření



Obrázek 2

Příklady vhodných míst pro odběr na dermatomykologické vyšetření:

- a) *tinea inguinalis*, b) *tinea barbae*, c) onychomýkóza, d) subkutánní mykóza v okolí ramene



je doporučeno je ostrou očkovací jehlou nabodnout a získanou kapku materiálu okamžitě inokulovat na kultivační půdu, přičemž pravděpodobnost pozitivního nálezu je v tomto případě velmi vysoká [13].

3. Metody přímé diagnostiky

Přímé mikroskopické vyšetření dermatologických vzorků by nemělo být nikdy opomenuto, a to ani v případě, že odbírajícím klinickým lékařem bylo dodáno jen velmi málo materiálu. V případě jeho positivity a typického vzhledu infekčního ložiska může totiž dermatolog zahájit cílenou léčbu antimykotiky podstatně dříve, než je k dispozici výsledek kultivace. To platí zejména u *pityriasis versicolor*, onemocnění způsobeného lipofilními kvasinkami rodu *Malassezia*, kdy jsou kožní projevy a výsledek přímé mikroskopie natolik charakteristické, že obvykle není potřeba potvrzení kultivací.

Laboratorní příprava preparátu pro přímou mikroskopii vzorků je poměrně jednoduchá. Protože se jedná o hodno-

cení materiálu obsahujícího keratin, je potřeba jeho strukturu nejprve rozvolnit. K tomuto účelu se nejčastěji používá 20% roztok hydroxidu draselného (KOH). Lze jej sice v zásadě použít v rozmezí od 5 do 40 %, ale nízká koncentrace pracuje pomalu, vysoká zase příliš rychle, čímž jsou často v krátké době zničeny všechny v preparátu přítomné struktury. KOH se používá v čisté formě, s přidavkem barviva (např. bavlnová modř, chlorazolová čern, Chicago sky blue), nebo fluorochromu (např. Rylux BSU, Blankophor) [4,9,12,13,21]. Výhodou posledně zmíněných dvou variant je lepší viditelnost mikromycet, což zvyšuje pravděpodobnost jejich detekce.

Příprava klasického louhového preparátu:

Na střed mikroskopického podložního sklíčka se kápne roztok KOH (buď čistý, nebo s přidavkem barviva) a do něj se umístí částičky biologického materiálu. Tekutina se roztáhne hranou krycího sklíčka, které se pak opatrně přiklopí (aby se nevytvořily bubliny) a případně se přes jeho hranu doplní KOH tak, aby byly kousky vzorku zcela smočeny. Následně se materiál nechá 30–60 minut louhovat (doba macerace je závislá na velikosti částiček), nebo se preparát umístí do vlhké komůrky a mikroskopické vyšetření se provede následující den [12,13]. Posledně zmíněný postup lze doporučit zvláště v případě, že byl k maceraci použit louh s barvivem, neboť přítomné houbové struktury tím nabývají na kontrastu. Pozitivní výsledky jsou demonstrovány na obr. 3.

Příprava louhového preparátu pro fluorescenční mikroskopii:

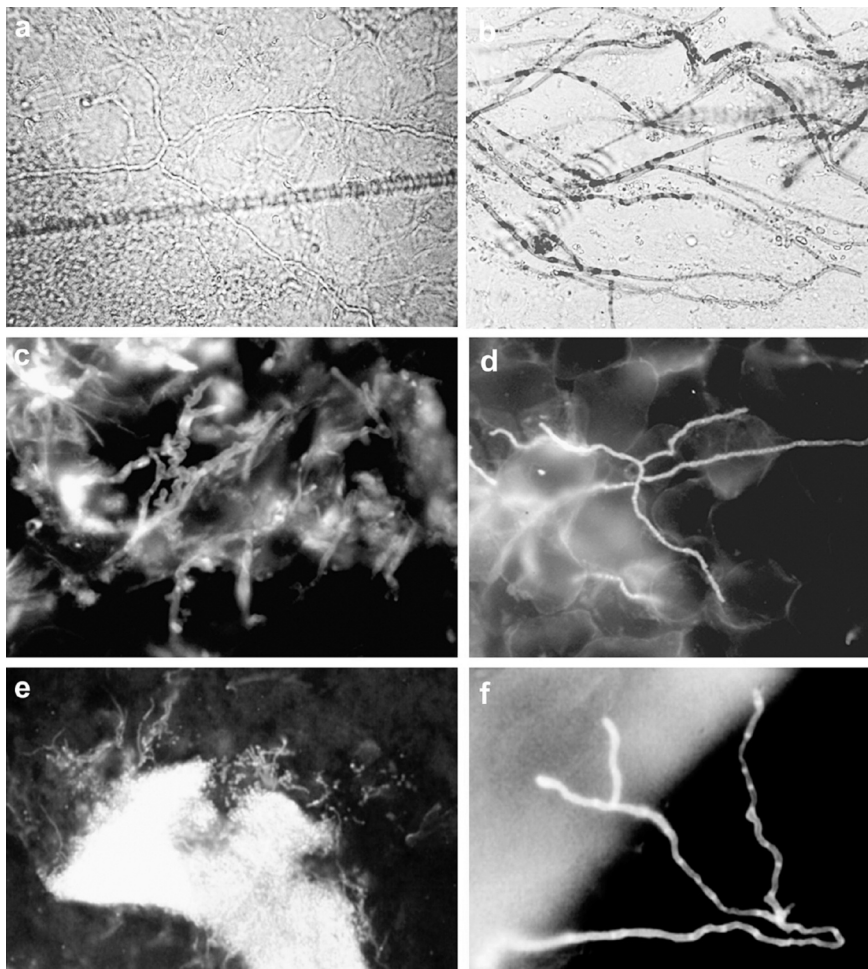
Na střed mikroskopického podložního sklíčka se kápne roztok KOH s fluorochromem (např. Rylux BSU v 0,2% koncentraci) a do něj umístí částičky materiálu. Také v tomto případě je třeba, aby byly zcela smočeny. V odkryté podobě se louhuje minimálně 1 hodinu. Dochází-li k vysychání preparátu, přidává se čistý KOH, nebo se preparát umístí do vlhké komůrky. Po uplynutí doby macerace se doporučuje přebytečný louh s fluorochromem opatrně odsát a nahradit čistým. Na preparát se následně umístí krycí sklíčko a mírným tlakem na něj se pak provede rozvolnění částíček (tlakový preparát). V případě potřeby se přes jeho hranu doplňuje roztok KOH [12,13]. Pozitivní výsledky jsou demonstrovány na obr. 3.

Rychlou, přesnou a citlivou alternativu přímé mikroskopie, umožňující většinou také identifikaci houbového agens v dermatologickém materiálu, představují molekulárně genetické techniky, nejčastěji na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR) [2,15,16]. Jejich vý-

Obrázek 3

Ukázky pozitivních výsledků přímé mikroskopie v kožních šupinách:

a) preparát s čistým KOH, b) KOH s bavlnovou modří, c)–f) louhový preparát s fluorochromem Rylux BSU



sledky je však třeba zodpovědně interpretovat v kontextu vývoje stavu infikovaných ložisek, neboť fungální DNA z neviabilního patogenu v nich může být zjištěna i po úspěšném vyléčení, zejména v případech onychomikóz [9].

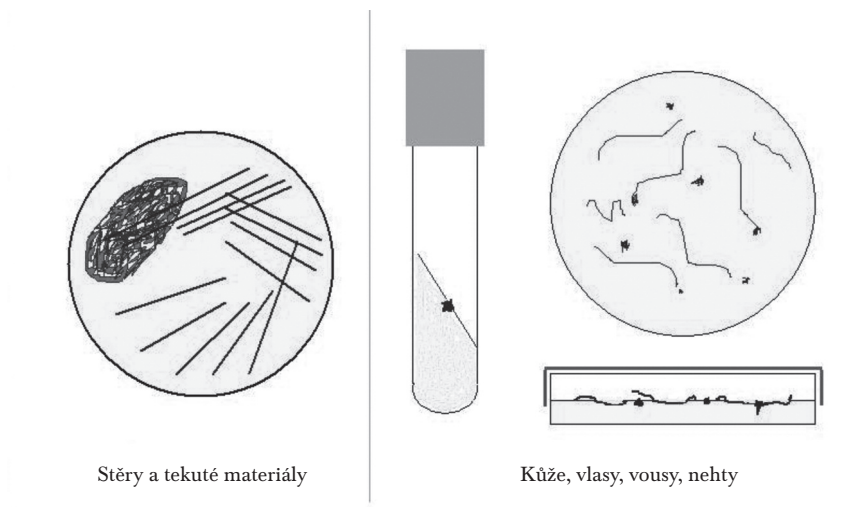
4. Kultivační postupy

Pro primární kultivaci mikroskopických hub z kůže a kožních adnex je nejvhodnější Sabouraudův agar (SA), nejčastěji v podobě selektivních půd obsahujících antibiotika (obvykle chloramfenikol) a antimykotikum cykloheximid [4,12,13]. Pro kvasinkovité mikroorganismy lze využít chromogenní půdy, jež u některých druhů na základě typického zbarvení, resp. morfologie kolonií poskytují i předběžnou identifikaci [22].

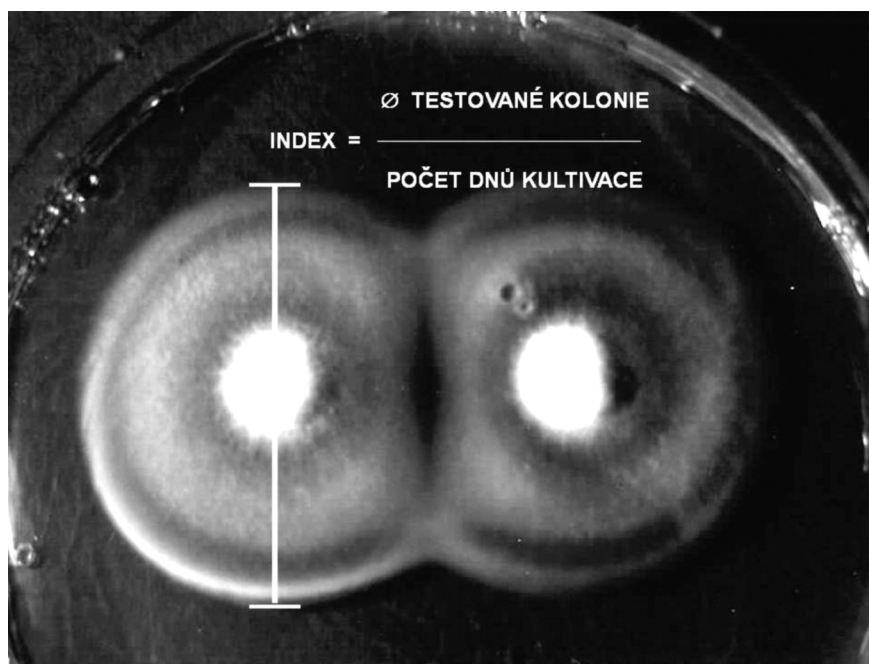
Pro inokulaci tekutých biologických vzorků a stěrů se doporučuje použití minimálně tří agarových půd v Petriho miskách, přičemž se materiál nanáší obdobným způsobem jako v bakteriologii, včetně ředícího typu rozočkování po povrchu kultivačního média, jak je demonstrováno na obr. 4.

Pro kožní šupiny a úlomky nehtů je preferováno umísťování menších částek materiálu na větší počet kultivačních půd. Technologicky se jako nejvhodnější jeví vpich šupin pod povrch šikmo vylitého SA ve zkumavce, přičemž vzorek z jedné lokality by měl být inokulován minimálně na čtyři takové půdy. Doporučuje se použití buď čtyř SA pouze s chloramfenikolem, nebo jen dvou takových půd a dalších dvou s chloramfenikolem a cykloheximidem. Použití uvedeného počtu médií snižuje riziko nesprávné interpretace nálezu v souvislosti s případnou kontaminací vzorku mikroflórou ze vzduchu, resp. přímo z kožních šupin při zachování vysoké pravděpodobnosti zachytu etiologického agens. V případě, že není možné použít SA ve zkumavkách, lze akceptovat i kultivaci v Petriho miskách. Ty je naopak nejvhodnější použít v případě inokulace vlasů, vousů a chlupů, přičemž se materiál rozmístí po povrchu média a sterilní očkovací jehlou se lehce zatlačí pod jeho povrch [4,13]. Způsoby inokulace vzorků kožních šupin a adnex pro mykologickou kultivaci jsou souborně demonstrovány na obr. 4. V případě podezření na etiologickou roli lipofilních kvasinek rodu *Malassezia*, je třeba, s výjimkou druhu *M. pachydermatis*, použít SA s přídatkem olivového oleje.

Obrázek 4
Způsob inokulace dermatologických vzorků na kultivační půdy



Obrázek 5
Stanovení růstového indexu



Stanovení teploty inkubace u dermatologických vzorků vychází ze skutečnosti, že na povrchu lidské pokožky je přibližně $25 \pm 2^\circ\text{C}$. V tomto rozmezí roste většina mikromycet v morfologicky typických koloniích, což usnadňuje jejich správnou identifikaci. Určitou výjimku představuje *Trichophyton verrucosum*, které údajně roste lépe při 37°C [9]. Přitom je třeba důrazně doporučit, aby kultivace probíhala výhradně v termostatu a nikoli volně v prostorách laboratoře, neboť v takovém případě dochází ke kolísání výše teploty během inkubace, což má na růst mikromycet nepříznivý vliv [4,13].

Časový interval od zahájení do ukončení kultivace není pevně stanoven a liší se hlavně v závislosti na očekávaném houbovém agens. Obecně se doporučuje sledovat růst mykoorganismů od 6. dne inkubace a následně jej kontrolovat vždy po čtyřech dnech. V případě dermatofytů bez znalosti epidemiologických souvislostí je doporučeno materiál kultivovat zhruba 2 týdny. Studie na 5 459 izolátech zmíněných mikromycet ukázala, že v průběhu 17denní inkubace vyrostle téměř 99 % kmenů [9]. Vyplývá-li však z anamnézy podezření na přítomnost velmi pomalu rostoucích druhů (např. *Trichophyton violaceum* a *T. verrucosum*), měl by se interval prodloužit na 3–4 týdny. Jedná-li se o kožní kandidózu nebo dermatomykózu, vyvolanou ubikvitními druhy vláknitých hub (aspergily, fuzaria apod.), postačí k typickému vzhledu kolonií 3–6 dnů. Vzhledem k tomu, že se jedná o mladé kultury, je možná jejich bližší identifikace již při zhotovení mikroskopického preparátu přímo ze zkumavky [4,12].

5. Identifikace mikromycet

V případě kultivačního záchyty houbových kolonií je potřeba provést jejich rodovou a nejlépe i druhovou identifikaci. Při sledování morfologických znaků se kombinuje hodnocení makroskopického (zejména barva kolonie, včetně spodiny a textura povrchu) a mikroskopického vzhledu (hlavně tvar, velikost a uspořádání reprodukčních útvarů). Při orientačním mikroskopickém vyšetření kultury lze pro

dermatofyty a kvasinky jako médium doporučit Lugolův roztok, nebo laktofenol s barvivem (bavlnová modř), který má delší trvanlivost [12]. Čistý laktofenol lze využít pro ostatní vláknité mikromycety, neboť zůstane zachována případná barevnost jejich mikroskopických struktur důležitých pro identifikaci, a navíc dojde i k určitému projasnění preparátu.

K předběžné orientační identifikaci nejčastějších druhů kvasinkovitých mikroorganismů je možné využít již zmíněné chromogenní agary. Klasickým postupem je pak kromě zhodnocení vzhledu kolonií na takové kultivační půdě i kombinace mikromorfologických znaků na nutričně chudých médiích (mycelium, pseudomycelium, chlamydozspory na rýžovém či kukuřičném agaru) a biochemických testů na principu asimilace (tzv. auxanogramy) a fermentace (tzv. zymogramy) zdrojů uhlíku, případně dusíku [12]. V současné době je ale nejrychlejší a nejpresnější metodou identifikace kvasinek v rutinní mykologické laboratoři využití hmotnostní spektrometrie typu MALDI-TOF. Ve specializovaných laboratořích je možné využít i molekulární genetické metody.

U vláknitých mikromycet bývá postup složitější. Při identifikaci dermatofytů klasickou cestou je po zjištění anamnestických údajů a korelace s výsledkem přímé mikroskopie vhodné jako první krok zhodnotit tzv. růstový index, jak je demonstrováno na obr. 5 [13]. Následuje popis morfologie kolonií, tj. barva a textura povrchu, produkce pigmentů a charakter spodiny a okrajů. Neméně významné je hodnocení mikroskopických znaků, především produkce mikro- a/nebo

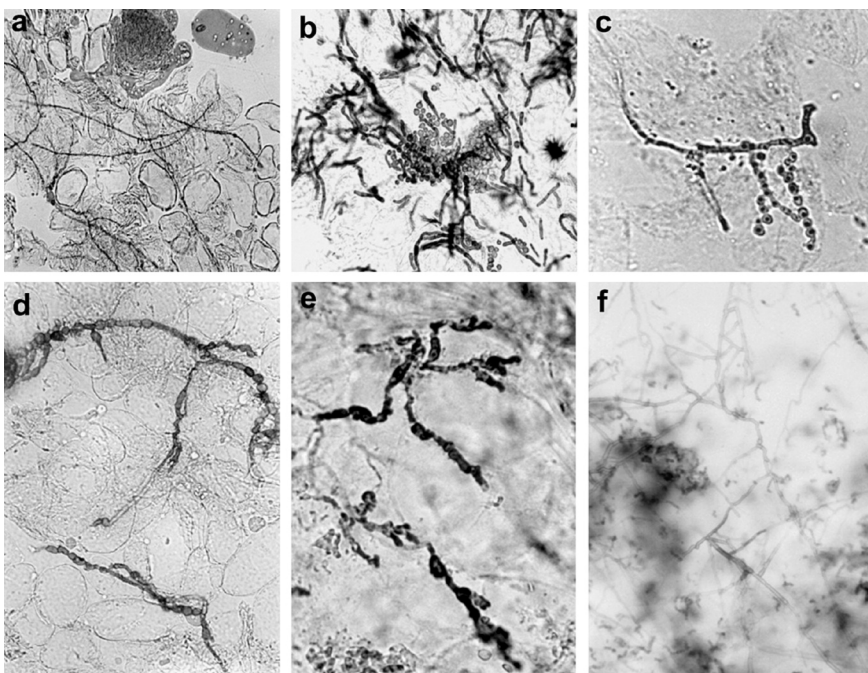
makrokonidií. Posledně zmíněné charakteristiky mikroskopických hub se nejlépe pozorují v tzv. mikrokultu-
rách, které navíc umožňují postupně (v časové ose) sledovat růst mycelia a tvorbu reprodukčních útvarů. Bylo popsáno několik metodických variant. Často používaný jednoduchý postup je následující: sterilním nástrojem (skalpel, zkumavka) se vykrojí bloček SA o průměru 1 cm, umístí se na podložní sklíčko, na čtyřech protilehlých místech se naočkuje zkoumaným kmenem, překryje krycím sklíčkem a obvykle na 3–7 dní (u pomalu rostoucích hub i na delší dobu) se umístí do vlhké komůrky [12,13]. V některých laboratořích se k identifikaci určitých druhů dermatofytů používají komerční *Trichophyton* agary, ureázový test či perforace vlasu *in vitro*, názory na jejich spolehlivost se však různí [23].

Morfologické (konvenční) určování vláknitých hub je založeno na porovnávání výše uvedených znaků kultury s popisy jednotlivých druhů v mykologických příručkách, resp. odborné literatuře [13,24–26]. Lze využít i identifikačních klíčů, jsou-li dostupné [13]. Obecně však platí, že zmíněný přístup vyžaduje od hodnotitele pod-

Obrázek 6

Vzhled mycelií v přímé mikroskopii u různých agens dermatomykóz:

a) dermatofyt, b) *Malassezia* sp., c) *Candida* sp.,
d) *Scopulariopsis brevicaulis*, e) *Aspergillus* sp., f) *Acremonium* sp.



statně větší odborné zkušenosti, než je tomu v případě kvasinkovitých mikroorganismů.

Z novějších identifikačních postupů je možné, podobně jako u kvasinkovitých mikroorganismů, využít metodu MALDI-TOF [15]. Určování dermatofytů a dalších vláknitých hub je však v tomto případě komplikováno složitějším postupem přípravy vzorku a omezeným druhovým spektrem vláknitých hub v mykologické databázi přístroje [2]. Proto se doporučuje nespolehat se výhradně na uvedenou techniku, ale je vhodné ji kombinovat s klasickou morfologickou diagnostikou. Z hlediska identifikace jsou za nejpřesnější považovány metody molekulární genetiky, především na principu PCR. Při využití sekvenace DNA je nutné porovnávat získané sekvence (nejčastěji oblast ITS rDNA) s referenčními, které jsou k dispozici v databázi GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), pomocí volně přístupného nástroje BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dále lze využít spravované databáze, které obsahují jen sekvence, které prošly kontrolou kurátora, například ISHAM ITS Database (<http://its.mycologylab.org>) nebo Dermato-phytes Species Database na Westerdijk Fungal Biodiversity Institutut (www.westerdijkinstitut.nl/Dermatophytes). Některé molekulárně genetické techniky slouží nejen k určování izolátů na úroveň druhu, ale i při jejich epidemiologické typizaci [3,15,16]. Technologicky se jedná o celou řadu přístupů, jako je konvenční, real-time, nested a multiplex PCR, kombinace PCR s ELISA či restrikční analýzou a sekvenování DNA [15]. Širšímu využití těchto postupů v přímé diagnostice i při určování houbových kultur na rutinních mykologických pracovištích zatím brání především nutnost speciálního laboratorního vybavení a prostorové nároky.

6. Interpretace nálezů

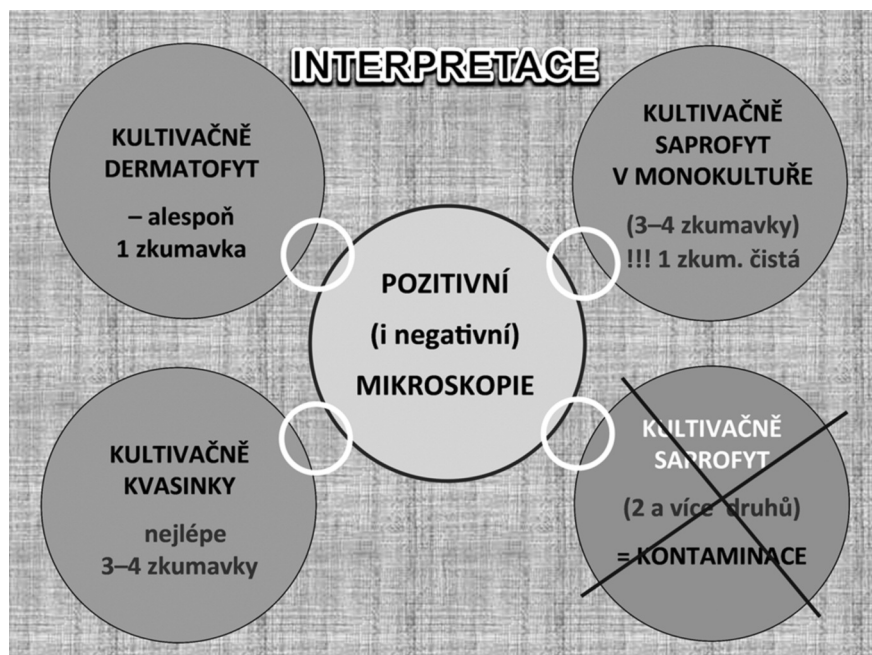
Tato část diagnostického procesu je velmi zodpovědnou činností, protože poskytuje klinickému lékaři informace, podle nichž stanoví diagnózu a terapii pacienta. Jak již bylo zmíněno, velmi důležitá je přímá mikroskopie vzorku, neboť, je-li pozitivní, je jednoznačně prokázána fyzická přítomnost houby ve tkáni. Navíc, jak je demonstrováno na *obr. 6*, může poskytnout i mikromorfologii, charakteristickou pro některá mykotická agens. Je-li výsledek přímé mikroskopie negativní, nejdůležitějším kritériem se stává kultivace. Při ní mohou být zachyceny nejen dermatofyty, ale i kvasinky nebo ubikvitní vláknité houby.

Způsob interpretace kultivačních nálezů v kontextu výsledku přímé mikroskopie je schematicky uveden na *obr. 7*.

Záchyt dermatofyta jako etiologického agens může být i ojedinělý (růst jen v jedné zkumavce), protože takový nález

Obrázek 7

Interpretace dermatomykologických nálezů

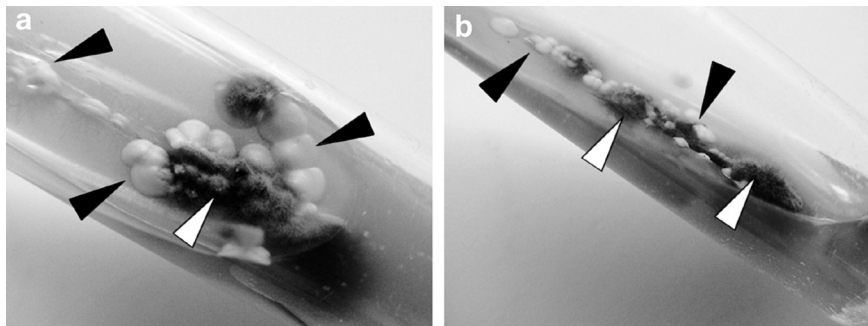


svědčí o jeho vztahu k poškození tkáně, a to rovněž v případě negativní přímé mikroskopie. Při hodnocení role kvasinek v souvislosti s jejich pozitivním nálezem v preparátu je třeba vzít v úvahu, zda byly kultivačně prokázány masivně, tj. alespoň ve třech ze čtyř zkumavek. Vzhledem k tomu, že bývají často součástí kožního mikrobiomu, jejich ojedinělý nález by měl být hodnocen pouze jako kolonizace. Nejsou-li kvasinkové elementy přímou mikroskopií v materiálu nalezeny, interpretuje se jejich kultivační záchyt analogicky, navíc lze doporučit zhotovení nového (kontrolního) preparátu z případného zbytku biologického vzorku.

Nejobtížnější je interpretace kultivačního nálezu ubikvitních vláknitých hub (tzv. saprofytických plísní), a to při pozitivní i negativní přímé mikroskopii. V prvním případě je pro vyhodnocení etiologické role takové mikromycety nutné, aby byla zachycena v čisté kultuře a masivně, tj. ve 3–4 zkumavkách. Při kvantitativně nižším nálezem by se spíše jednalo o kontaminaci vzorku při odběru nebo zpracování v laboratoři. Pokud by bylo nutné kauzální roli takového agens potvrdit, bylo by třeba verifikovat nález opakováním celého mykologického vyšetření včetně odběru. V té souvislosti je však třeba zmínit, že klinickému lékaři postačuje k rozhodnutí o zahájení antifungální systémové léčby pouze pozitivita přímé mikroskopie. V případě její negativity a kultivačního záchytu většího počtu kolonií ubikvitní vláknité houby v čisté kultuře je interpretace ještě složitější. Může se totiž jednat o etiologické agens, ale také o masivní kontaminaci vzorku, což bývá pozorováno zvláště u vyšetření nehtů dolních končetin, kde bývá dekontaminace etanolem nespolehlivá. Za této situace lze tedy doporučit provést znova přímou mikroskopii (je-li ještě k dispozici zbytek

Obrázek 8

Smíšená mykóza *Candida parapsilosis* (černé šipky)
a *Cladosporium sphaerospermum* (bílé šipky)



materiálu), výhodnější je však dohodnout s dermatologem nový odběr vzorku z příslušné lokality a zopakovat celé mykologické vyšetření. Při kultivačním nálezu dvou, případně i více druhů ubikvitních vláknitých mikromycet v jednom vzorku současně se obvykle jedná o kontaminaci.

Záchyt dvou mikromycet v jednom vyšetřovaném vzorku však může být také projevem smíšené mykózy, kdy se uplatňují dva houbové druhy současně. I když je uvedená situace poměrně vzácná, je třeba interpretaci takového kultivačního nálezu pečlivě zvážit, protože na ní závisí rozhodnutí o zahájení léčby. Nejčastěji přichází do úvahy kombinace dvou dermatofytů, nebo kombinace těchto houbových agens s kvasinkami. Dále je možné se setkat s konkurencí kvasinkovitých mikroorganismů a ubikvitních vláknitých mikromycet, jak je demonstrováno na obr. 8. Naopak etiologický souběh posledně zmíněných hub s dermatofyty je naprostou raritou. V kterémkoli případě tohoto typu mykózy je vždy doporučena verifikace nálezu novým odběrem s kompletním mykologickým vyšetřením.

Stanovení citlivosti k antimykotikům

Obecně se testování citlivosti k systémovým antimykotikům využívá zejména v případech invazivních houbových infekcí, nereagujících na dosavadní léčbu, při podezření na získanou rezistenci, v rámci epidemiologických studií při monitorování citlivosti mikromycet na antifungální léčiva a experimentálně při hodnocení účinnosti nově vyvíjených látek. V případě dermatomykóz má terapie obvykle empirický charakter a zahajuje se většinou lokálně lékovými formami typu masť, roztoků, emulzí či laků na nehty. V takových případech nemá testování citlivosti vzhledem k nestandardnímu množství aplikovaného antimykotika smysl. Avšak zejména v případech recidivujících onychomýkóz, extenzivních kožních lézí, ale i *tinea capitis*, je indikována systémová léčba, zejména terbinafinem, případně azoly (fluconazol, itraconazol). V současnosti je dokumentován nárůst rezistence na terbinafin v důsledku mutace genu pro skvalen epoxidázu u zástupců rodu *Trichophyton*. U nejvýznamnějšího humánního druhu, *T. rubrum*, byla popsána

i rezistence k azolům na základě nové varianty ABC transportního proteinu [27–29]. Z těchto důvodů začalo testování citlivosti dermatofytů k antimykotikům *in vitro* nabývat na významu a pro mezilaboratorní porovnávání výsledků bylo třeba standardizovat technologický postup. To se podařilo Podvýboru pro testování antifungální citlivosti (AFST) Evropského výboru pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST) přípravou referenční metody, obsažené v dokumentu E. Def 11.0 a vycházející z předchozích metodických standardů E. Def 7.3.2 pro kvasinkovité mikroorganismy a E. Def. 9.3.2 pro vláknité mikromycety [30]. Popsaný postup byl verifikován rozsáhlou mezinárodní studií [31].

V principu se jedná o kvantitativní mikrodiluční bujónovou metodu, kultivační médium však obsahuje navíc chloramfenikol a cykloheximid a výsledky jsou vyhodnocovány pomocí spektrofotometru. Vzhledem k tomu, že příprava destiček je technologicky a časově náročná a zatím není vyvinuta komerční alternativa, bylo by složité touto metodou testovat citlivost izolátů v běžné laboratorní praxi. Její potenciál spočívá ve využití na specializovaném pracovišti pro konfirmaci výsledků získaných jednoduššími difuzními technikami. Z nich lze z hlediska standardizace doporučit především komerčně dostupné tablety Neo-Sensitabs [32].

Závěr

Jako nepodkročitelné minimum pro laboratorní diagnostiku dermatomykóz je doporučeno:

1. Splnit všechna výše uvedená kritéria obecného postupu dermatomykologického vyšetření s důrazem na komplexní anamnézu.
2. Důsledně provádět dekontaminaci infikovaného ložiska 70% etanolem vždy před odběrem vzorku.
3. Provádět vždy přímé mikroskopické vyšetření dermatomykologického materiálu. Při malém množství vzorku má tato metoda přednost před kultivací.
4. Při kultivaci inokulovat malé částičky materiálu na větší počet kultivačních půd a inkubovat je ve stabilní teplotě (v termostatu).
5. Při interpretaci nálezu zachycených a identifikovaných mykotických agens pečlivě zvážit klinický kontext, tj. jejich možnou účast na infekčním procesu. Při pochybnostech konzultovat situaci s klinickým lékařem a na základě společného vyhodnocení informací se v odůvodněných případech dohodnout na opakování odběru a následně celého mykologického vyšetření.

Podpořeno grantem AZV MZ ČR č. 17-31269A.

Literatura

- Buchta V, Hamal P, Kocmanová I, Mallátová N, Mencl K., Pracovní skupina pro lékařskou mykologii SLM ČLS JEP. Nepodkročitelné minimum diagnostiky mykóz v laboratorní lékařské mykologii. Dokument SLM ČLS JEP č. NMM20110218v.1, 2011, dostupný na adrese www.splm.cz/_download/0000016e-92e9-df8d-abee-fefb6e240000
- L'Ollivier C, Ranque S. MALDI-TOF-based dermatophyte identification. *Mycopathologia*. 2017;182(1–2):183–192.
- Čmuková A, Hamal P, Svobodová L, Hubka V. Detekce, identifikace a typizace dermatofytů molekulárně genetickými metodami. *Čes-slov Derm*. 2014;89(4):175–186.
- Vosmik F, Skořepová M. Dermatomykózy: Diagnostika a terapie dermatologických mykotických infekcí. 1. vyd. Praha: Galén, 1995.
- Skořepová M. Dermatomykologie v obrazech. 1. vyd. Praha: Galén; 2008.
- Stuchlik D, Mencl K, Hubka V, Skořepová M. Fungal melanonychia caused by *Onychocola canadensis*: first records of nail infections due to *Onychocola* in the Czech Republic. *Czech Mycol*. 2011;63(1):83–91.
- Hubka V, Mencl K, Skořepová M, Lysková P, Zalabská E. Phaeohyphomycosis and onychomycosis due to *Chaetomium* spp., including the first report of *Chaetomium brasiliense* infection. *Med Mycol*. 2011;49(7):724–733.
- de Hoog GS, Dukik K, Monod M, et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia* 2017; 182:5–31.
- Hubka V, Větrovský T, Dobíášová S, et al. Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie. *Čes-slov Derm*. 2014;89(4):167–174.
- Hubka V, Čmuková A, Peano A, et al. Zoonotické dermatofytózy: klinický obraz, diagnostika, etiologie, léčba, epidemiologická situace u nás. *Čes-slov Derm*. 2018;93(6):205–292.
- Mencl K, Buchta V, Mallátová N, Hamal P, Kocmanová I, Hubka V, Pracovní skupina pro lékařskou mykologii SLM ČLS JEP. Doporučený postup laboratorní diagnostiky u dermatomykóz. Dokument SLM ČLS JEP, verze 00 k oponentuře, 2020, dostupný na adrese www.splm.cz/_download/00000172-e0c9-d3b6-a7fe-f5fb46b80000
- Otčenášek M. a kol. Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních. In: Schindler J, Ticháček B, Potužník V. (eds.) Mikrobiologické vyšetřovací metody, Praha: Avicenum; 1990. sv. 12.
- Fragner P, Hejtmánek M. Určování dermatofytů. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci; 1990.
- Mycology and antifungal susceptibility testing. In: Leber AL. (ed.) Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th ed., vol. 2. Washington DC: ASM Press; 2016.
- Rudramurthy SM, Shaw D. Overview and update on the laboratory diagnosis of dermatophytosis. *Clin Dermatol Rev*. 2017;1:S3–S11.
- Begum J, Mir NA, Lingaraju MC, Buyamayum B, Dev K. Recent advances in diagnosis of dermatophytosis. *J Basic Microbiol*. 2020; 60:293–303.
- Skořepová M. Dermatomykózy – etiologie a diagnostika. *Interní Med*. 2003;5(10):6–7.
- Janatová H. Trichophytia profunda jako onemocnění z povolání u imunosuprimovaného pacienta. *Čes-slov Derm*. 2016;91(3):129–131.
- Paryuni AD, Indarjulianto S, Widyarini S. Dermatophytosis in companion animals: A review. *Vet World*. 2020;13(6):1174–1181.
- Chermette R, Ferreira L, Guillot J. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia*. 2008;166:385–405.
- Baddireddy K, Poojary S. A novel contrast stain for the rapid diagnosis of dermatophytoses: a cross-sectional comparative study of Chicago Sky Blue 6B stain, potassium hydroxide mount and culture. *Indian J Dermatol*. 2019;64(4):311–314.
- Ghelardi E, Pichierri G, Castagna B, et al. Efficacy of Chromogenic Candida Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(2):141–147.
- Carter GR. 29 – Dermatophytes and dermatophytoses. In: Carter GR, Cole JR (eds.) Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology, 5th ed., Cambridge (MA): Academic Press; 1990. pp. 381–404.
- Larone DH. Medically important fungi: A guide to identification. 6th ed. Washington DC: ASM Press; 2018.
- Campbell CK, Johnson EM, Warnock DW (ed.) Identification of Pathogenic Fungi. 2nd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2013.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ, Vitale RG. Atlas of Clinical Fungi. 3rd ed. Utrecht/Reus: Stichting Foundation Atlas of Clinical Fungi; 2019.
- Monod M. Antifungal resistance in dermatophytes: emerging problem and challenge for medical community. *J Mycol Med*. 2019;29:283–284.
- Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, et al. Terbinafine resistance in *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61:1–13.
- Monod M, Feuermann M, Salamin K, et al. *Trichophyton rubrum* azole resistance mediated by a new ABC transporter, TruMDR3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:1–19.
- Arendrup MC, Kahlmeter G, Guinea J, et al. How to perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(1):55–60.
- Arendrup MC, Jørgensen KM, Guinea J, et al. Multicentre validation of a EUCAST method for the antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(7): 1807–1819.
- Esteban A, Abarca ML, Cabañes FJ. Comparison of disk diffusion method and broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med Mycol*. 2005;43(1):61–66.