



Toepassingsmogelijkheden en interpretatie van microscopische sneldiagnostiek

A.P.M. Lavrijsen

Het eerste deel van dit artikel *Directe diagnostiek in de dermatologie* is geplaatst in nummer 3 van dit tijdschrift (pagina 33-36), het nummer van de Dermatologendagen.

TOEPASSINGSMOGELIJKHEDEN EN INTERPRETATIE

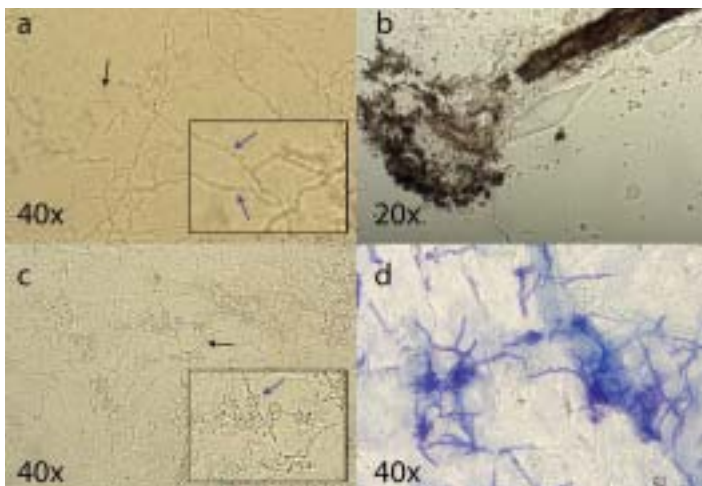
Recente artikelen in de dermatologische vakliteratuur getuigen van een hernieuwde belangstelling voor microscopische sneldiagnostiek. [3-7] In deze literatuur wordt de toepassing van de directe diagnostiek (met name tzanckpreparaten) ook beschreven bij aandoeningen zoals genodermatosen, auto-immunblaarziekten en huidmaligniteiten; aandoeningen waarbij in Nederland primair andere methoden van diagnostiek worden ingezet.

Inzicht in de sensitiviteit en specificiteit van deze technieken bij de specifieke aandoeningen is relevant. Belangrijk is te weten wanneer aanvullend microbiel onderzoek of histologisch onderzoek nodig is.

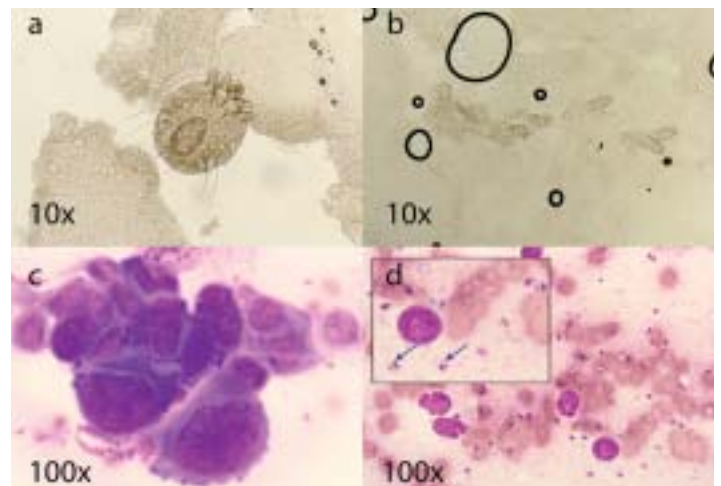
Dermatomyose

Bij een trichofytose ziet men reeds bij kleine vergroting (10x objectief) van het KOH-preparaat het mycelium dat is opgebouwd uit typische lange en wat doorzichtige schimmeldraden (hyfen). Bij gebruik van het 40x objectief worden de septa in de hyfen en de vertakkingen van de hyfen zichtbaar (figuur 1a). Soms zijn de hyfen sterk vertakt en lijken ze op kralenkettingen (figuur 1b).

Het van huidschilfers gemaakte KOH-preparaat van een huidafwijking verdacht voor een candida-infectie laat bij gebruik van een 40x objectief heldere in 'druiventrosjes' gelegen, oplichtende ronde sporen (gistfase) met kronkelige dunne pseudohyfen (myceliumfase) zien (figuur 1c). Kenmerkend voor het KOH-preparaat van een huidafwijking verdacht voor



Figuur 1. 1a. KOH-preparaat (10x40) van dermatofytose. Bij deze vergroting zijn de septa (blauwe pijltjes) in de hyfen en de vertakkingen (zwart pijltje) van de hyfen duidelijk zichtbaar. 1b. KOH-preparaat (10x20) van trichofytose, waarin duidelijk schimmeldraden met kralenkettingachtige structuur en zeer vele schimmelsporen. 1c. KOH-preparaat (10x40) van candida-infectie waarin pseudohyfen (zwarte pijl) met in 'druiventrosjes' gelegen oplichtende gistsporen (blauwe pijl). 1d. Methyleenblauwpreparaat van plakband van malassezia-infectie (10x40). Mengbeeld van ronde gistsporen met pseudohyfen (gisten in myceliumfase).



Figuur 2. 2a. KOH-preparaat van scabiësmijt (10x10). 2b. KOH-preparaat van demodexmijten (10x10). 2c. Tzanckpreparaat (10x100) van een herpesvirusinfectie, zowel zwelling van keratinocyten ('ballooning') als een meerkernige reuscel zijn zichtbaar. 2d. Tzanckpreparaat (10x100) van een leishmaniasis ulcus: in meerdere amastigoten (blauwe pijl) is de kinetoplast naast de donkerblauwe kern zichtbaar.

Dermatoloog, afdeling Dermatologie, LUMC, Leiden

een malassezia-infectie is het mengbeeld van gisten in de gistfase en in de myceliumfase ook wel *spaghetti and meatballs of penne and peas* genoemd. [4,8] In een KOH-preparaat is het vaak moeilijk onderscheid te maken tussen hyfen, wijzend op een dermatofyteninfectie, en pseudohyfen die bij een gistinfectie worden gezien. [8] De pseudohyfen zijn goed te identificeren in een methyleenblauwpreparaat, ook zijn door het gebruik van het 100x objectief karakteristieke kenmerken van de gistfase te zien. Bij een candida-infectie toont het methyleenblauwpreparaat losse peervormige/ovale gistcellen met een lichte halo. [1] Soms is hierbij de ongeslachtelijke vermeerdering van de gisten, dit wordt knopvorming oftewel 'budding' genoemd, te zien. Een malassezia-infectie toont in het methyleenblauwpreparaat kenmerkende ronde gistcellen met donkere rand en lichter centrum (figuur 1d). Hierbij is regelmatig knopvorming te zien. [1] Als het gaat om het diagnosticeren van een dermatomycose met een KOH-preparaat wordt de sensitiviteit groter naarmate men meer ervaring heeft in het beoordelen van een KOH-preparaat. Er zijn verschillende studies die de diagnostische waarde van een KOH-preparaat hebben vergeleken met andere technieken die worden gebruikt voor het aantonen van dermatomycose, zoals Chlorazol black E en Calcofluor wit, schimmelkweek, PCR en PAS-kleuring van biopten. Tussen het KOH-preparaat, Chlorazol black E en Calcofluor wit worden weinig verschillen gevonden bij oppervlakkige dermatomycosen. De sensitiviteit ligt rond de 90%, de specificiteit rond de 95%, de positieve voorspellende waarde is 73% en er is een negatief voorspellende waarde van 98%. In de literatuur wordt voor onychomycose een sensitiviteit van het KOH-preparaat beschreven die varieert van 80% tot 91%, met in 5% tot 15% van de gevallen vals-negatieve resultaten. Het meest sensitieve diagnostisch onderzoek bij een onychomycose is een PAS-kleuring van de nagelplaat waarvan een sensitiviteit tussen 92% - 99% wordt beschreven. Een schimmelkweek is in het algemeen minder gevoelig met een sensitiviteit variërend tussen 24-79%. [4] De directe diagnostiek is ook van grote waarde bij zeldzame schimmelinfecties die met name voorkomen in tropisch en subtropisch klimaat. De schimmels die subcutane mycosen

veroorzaken zoals chromoblastomycosis, lobomycosis en mycetomas groeien vaak langzaam en zijn moeilijk te kweken. Daarom is directe diagnostiek essentieel bij het stellen van de diagnose. Directe diagnostiek kan ook worden ingezet bij sneldiagnostiek van huidafwijkingen in het kader van systemische mycose zoals cryptococcosis (figuur 3), histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, aspergillosis en mucormycosis.

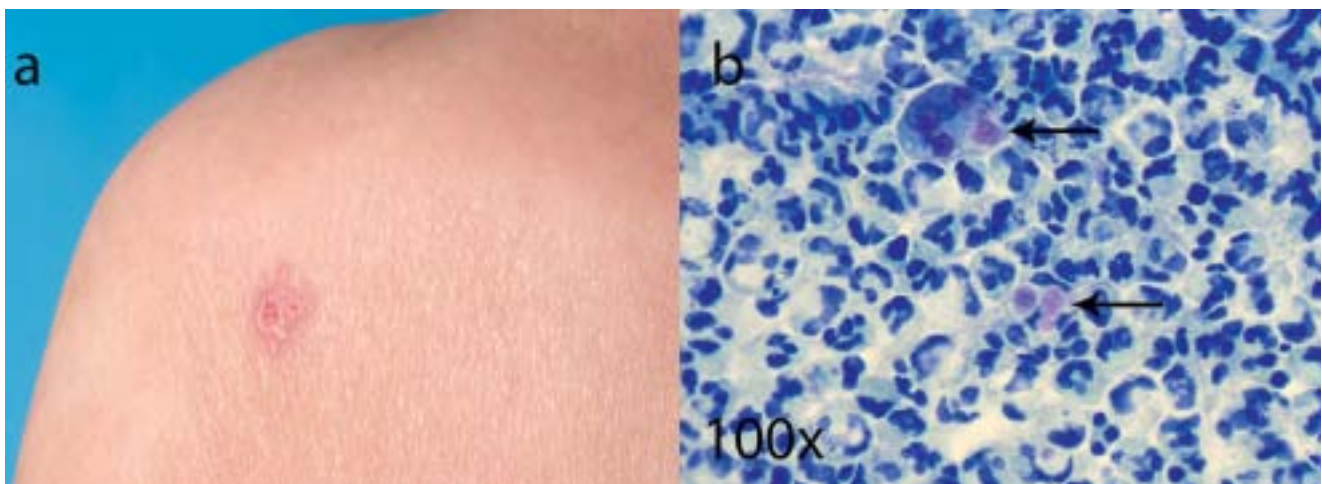
Bacteriële infecties

Een folliculitis wordt meestal veroorzaakt door een infectie met bacteriën, schimmels, virussen of parasieten, maar kan ook een reactie zijn op schade. De belangrijkste veroorzaker van folliculitis is *S. aureus*. [4] Met behulp van een methyleenblauwpreparaat kan snel de aanwezigheid van bacteriën of gisten worden aangetoond. Een methyleenblauwpreparaat kan geen onderscheid maken tussen gramnegatieve en grampositieve bacteriën, hiervoor is een gramkleuring nodig. Veroorzakers van non-bulleuze impetigo zijn *S. aureus* en streptokokkenspecies. Impetigo bullosa wordt veroorzaakt door bepaalde stammen van *S. aureus* die exfoliatieve toxine A en B produceren.

Deze toxines veroorzaken eveneens de karakteristieke huidafwijkingen bij *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS). Met behulp van een tzanckpreparaat dat is afgenomen van de bodem van een bulla kan onderscheid worden gemaakt tussen impetigo, een herpesinfectie en zelfs pemfigus. Bij een impetigo bullosa worden in het tzanckpreparaat acantholytische cellen met neutrofielen en daartussen af en toe groepjes kokken gezien. Durdu en collega's toonden aan dat de sensitiviteit en specificiteit van een tzanckpreparaat bij impetigo bullosa respectievelijk 92% en 100% is. [5] Ook het methyleenblauwpreparaat van impetigo bullosa laat groepjes kokken zien met neutrofiële granulocyten. [1,9]

Virale infecties

Het klinisch beeld van een herpessimplex-zostervirusinfectie is meestal zo duidelijk dat aanvullend onderzoek niet nodig is hoewel bij atypische presentaties, zoals bij immuungecompromitteerde patiënten, twijfel over de diagnose kan voorkomen.



Figuur 3: Cryptococcosis. 3a. Klinisch beeld. 3b. Methyleenblauwpreparaat (10x100) waarin gisten zichtbaar zonder de karakteristieke kenmerken van candida- of malasseziagisten.

In deze situaties is een tzanckpreparaat gemaakt van schraapsel van de bodem van een vesikel die recent ontstaan is een betrouwbaar diagnosticum. Het cytologisch beeld van een herpessimplexvirus of varicellazostervirusinfectie toont karakteristieke kenmerken zoals zwelling (*ballooning*) van keratinocyten tot wel een 80 µm grote, meerkernige reuscellen en acantholyse en dit beeld is pathognomonisch (figuur 2c). [3-5] Intra-nucleaire inclusielichaampjes met subtiele halo (cowdry A-lichaampje) zijn zeer karakteristiek voor een herpesinfectie maar moeilijk te vinden in een tzanckpreparaat. Het tzanckpreparaat maakt geen onderscheid tussen infecties met het herpessimplexvirus 1 en 2 en het varicellazostervirus. Meerdere studies hebben aangetoond dat dermatologen als zij de juiste instructies en trainingen krijgen in staat zijn om met deze methode nauwkeurig en betrouwbaar diagnoses zoals een herpesinfectie te stellen. [4] Afhankelijk van hoelang de afwijking bestaat, het stadium waarin de infectie zich bevindt en de ervaring van degene die de techniek toepast varieert de sensitiviteit van 40% tot 77% en de specificiteit tot 100%. Tzanckpreparaten van één tot drie dagen oude vesikels hebben een sensitiviteit van 79% tot 100% in vergelijking met 27% tot 60% voor oudere, crusteuze laesies. De sensitiviteit van een tzanckpreparaat is beter dan van een directe fluorescerende antilichaamtest (sensitiviteit, 52-93%; specificiteit, 100%), maar niet zo sensitief en specifiek als van een PCR (sensitiviteit 93% tot 100% voor verse laesies en voor oudere laesies 81%). [4,5] Andere virale infecties die met behulp van directe diagnostiek kunnen worden aangetoond zijn mollusca contagiosa (tzanck- en KOH-preparaat), orf en hand-voet-mondziekte (HFMD).

Parasitaire infecties

Met een KOH-preparaat kunnen infestaties met scabiësmijten en demodexmijten op een snelle eenvoudige manier worden aangetoond (figuur 2a en b). Demodexmijten kunnen ook in gekleurde preparaten worden aangetoond. Men spreekt van

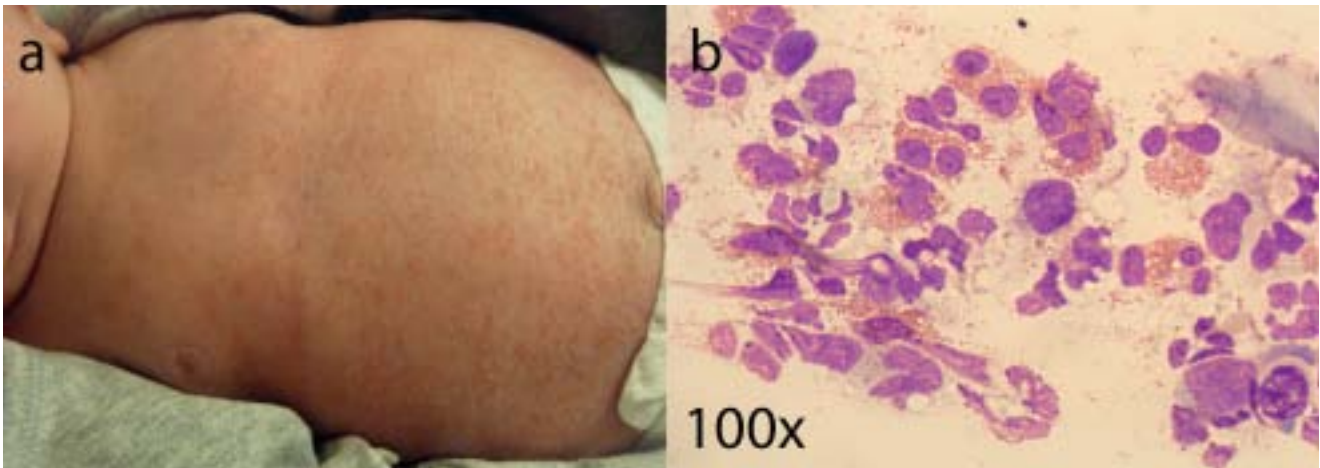
een infestatie als er twee tot zes demodexmijten per follikel worden aangetoond of > 5 demodexmijten per cm². [10] De sensitiviteit van scabië-KOH-preparaten varieert van 46% tot 90% met een negatieve voorspellende waarde van 77%. De specificiteit is per definitie 100% [7]. Door het combineren van traditionele scabië-KOH-preparaten met dermatoscopische beoordeling van de huid om zo de mijten te identificeren wordt de tijd om materiaal af te nemen korter en de sensitiviteit van het klassieke KOH-preparaat groter. [2] Voor de gevorderde gebruiker kan het een uitdaging zijn om een diagnose als leishmaniasis aan te tonen met een tzanckpreparaat. In het tzanckpreparaat zijn lichtblauwe ronde tot ovale, 2-4 µm grote parasieten (amastigoten) zichtbaar met een donkerblauwe kern met daarnaast een kinetoplast (*Leishmania bodies*) (figuur 2d). De amastigoten kunnen gegroepeerd als een 'zwerm bijen' in het cytoplasma van grote macrofagen liggen, maar ze worden ook buiten de cellen gevonden. [3] De kinetoplasten zijn beter te zien bij losliggende amastigoten. De sensitiviteit en specificiteit van de *Leishmania bodies* voor leishmaniasis is respectievelijk 77% en 100%. [6]

Overige toepassingsmogelijkheden

De mogelijkheden en brede toepasbaarheid van het tzanckpreparaat wordt duidelijker als dit preparaat wordt ingezet bij het klinisch beeld van vesiculopustulaire huidafwijkingen bij pasgeborenen. De differentiële diagnose hiervan is omvangrijk. Een tzanckpreparaat in combinatie met een methyleenblauwpreparaat en een KOH-preparaat kan deze differentiële diagnose smaller maken en geeft mogelijkheden om vluchtige goedaardige huidafwijkingen te onderscheiden van alarmerende vaak infectieuze aandoeningen die tijdig behandeld moeten worden. In tabel 1 wordt de differentiële diagnose van vesiculopustulaire afwijkingen bij de neonaat uitgewerkt en onderverdeeld in non-infectieuze en infectieuze oorzaken met

Tabel 1: Bevindingen directe diagnostiek bij vesiculopustulaire huidafwijkingen bij pasgeborenen (gebaseerd op referentie 9).

Non-infectieuze oorzaken	Preparaat	Bevindingen
Erythema toxicum neonatorum	Tzanck	Eosinofiele granulocyten
Transiënte neonatale pustulaire melanose	Tzanck / methyleenblauw	Met name neutrofielen granulocyten, zonder bacteriën
Incontinentia pigmenti	Tzanck	Eosinofiele granulocyten
Infantiele acropustulose	Tzanck / methyleenblauw	Met name neutrofielen granulocyten, zonder bacteriën
Eosinofiele folliculitis van infancy	Tzanck	Puur eosinofiel infiltraat
Neonatale acne	methyleenblauw	Coryne bacterien, <i>Malassezia</i> gisten
Miliaria	Tzanck	Voornamelijk lymfocyten
Infectieuze oorzaken		
Bacterieel: Impetigo bullosa	Tzanck / methyleenblauw	Groepjes kokken met neutrofielen granulocyten
Viraal: Neonatale herpes simplex Varicellazostervirus infectie	Tzanck	Meerkernige reuscellen, zwelling ('ballooning') van keratinocyten en acantholyse
Mycose: Neonatale candidiasis Congenitale candidiasis Malassezia-infectie	Tzanck / methyleenblauw	Pseudohyfen en gistsporen
Parasitair: Scabië	KOH	Scabiësmijten en eieren



Figuur 4: Erythema toxicum neonatorum. 4a. Klinisch beeld met op de romp pustels op een erythemateuze huid. 4b. Tzanckpreparaat (10x100) waarin eosinofiele granulocyten te zien zijn.

aanvullend de microscopische bevindingen van de directe preparaten. Het kan lastig zijn onderscheid te maken tussen erythema toxicum neonatorum (ETN) en transiënte neonatale pustulaire melanosis (TNPM) (figuur 4). In beide gevallen gaat het om veelvoorkomend goedaardige huidafwijkingen die zelflimiterend zijn. [9] ETN komt ongeveer bij een derde van de pasgeborenen voor. Binnen enkele dagen na de geboorte ontstaan vooral op de romp en in het gelaat erythemateuze maculae met centraal pustels, die binnen 1-2 weken spontaan verdwijnen. De pustelinhoud bij ETN is steriel en bestaat voornamelijk uit eosinofiele granulocyten (figuur 4). [9] TNPM komt vaker bij gepigmenteerde (5%) dan bij blanke (1%) pas-geborenen voor. Bij de geboorte of direct daarna ontstaan er vesiculopustels zonder erytheem op voorhoofd, rug en extremiteiten. De pustels bevatten met name neutrofiële granulocyten. Typisch voor TNPM is dat de pustels na 1-2 dagen spontaan ruptureren en overgaan in gepigmenteerde maculae die na enkele weken vervagen. [9]

De meest voorkomende oorzaak van infectieuze vesiculopustulaire huidafwijkingen bij pasgeborenen is een bacteriële infectie, zoals impetigo bullosa. Af en toe kunnen infecties met andere bacteriën zoals groep B-streptokokken en *Listeria monocytogenes* naast algemene symptomen van een sepsis ook pustels en vesikels geven bij de neonaat. [11] De meest gevreesde infectieuze oorzaak van vesiculopustulaire huidafwijkingen bij neonaten is een infectie met het herpes simplexvirus. Dit is een ziekte met een hoge morbiditeit en sterfte waarvan twee derde van de kinderen huidafwijkingen heeft. [9,11] De diagnose kan bevestigd worden door middel van een tzanckpreparaat. Ook een varicellazostervirusinfectie kan voorkomen bij de pasgeborene als de moeder in de periode vanaf vijf dagen voor de geboorte tot en met twee dagen na de geboorte varicella krijgt [9] Een congenitale cytomegalovirusinfectie kan ook vesikels en pustels geven, echter deze infectie is zeer zeldzaam. [9] Lokale neonatale en congenitale infecties met candidaspecies kunnen vesikels en pustels geven en zijn makkelijk aan te tonen of in een methyleenblauwpreparaat of in een tzanckpreparaat. [9] Hetzelfde geldt voor infecties van de huid met malasseziaspecies die mogelijk ook een rol spelen bij neonatale cefale pustulose. [12]

Zowel bij pasgeborene als volwassenen kan bij verdenking op een eosinofiele pustuleuze folliculitis (Ofuji) een aanvullend tzanckpreparaat uitsluitel geven wanneer er in dit preparaat eosinofiele granulocyten te zien zijn. Bij ervaring kan het tzanckpreparaat worden ingezet om onderscheid te maken tussen SSSS en stevens-johnsonsyndroom (SJS)/toxische epidermale necrolyse (TEN). Het beeld van een tzanckpreparaat van een SSSS is hetzelfde als bij een impetigo alleen zijn er weinig tot geen bacteriën en weinig inflammatoire cellen te zien. [4] Bij een SJS/TEN zijn necrotische kubische basale keratinocyten te zien. [4] Natuurlijk is de directe diagnostiek bij veel van deze aandoeningen slechts een hulpmiddel en dient verder aanvullend microbiel onderzoek en/of histologisch onderzoek plaats te vinden.

De samenvatting en summary van dit artikel zijn geplaatst in nummer 3 van dit tijdschrift, het nummer van de Dermatologendagen.

LITERATUUR

1. van der Raaij-Helmer L, Lavrijsen S. Microscopie van directe preparaten voor de dermatologische praktijk. Leiden: LUMC; 2014. <http://www.nvdv.nl/wp-content/uploads/2015/02/2014-12-30-Microscopie-van-directe-preparaten-voor-de-dermatologische-praktijk.pdf>
2. Park JH, Kim CW, Kim SS. The diagnostic accuracy of dermoscopy for scabies. *Ann Dermatol* 2012;24(2):194-9.
3. Ruocco E, Brunetti G, Del Vecchio M, Ruocco V. The practical use of cytology for diagnosis in dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25(2):125-9.
4. Wanat KA, Dominguez AR, Carter Z, Legua P, Bustamante B, Micheletti RG. Bedside diagnostics in dermatology: Viral, bacterial, and fungal infections. *J Am Acad Dermatol* 2017;77(2):197-218.

De complete literatuurlijst is, vanaf drie weken na publicatie in dit tijdschrift, te vinden op www.nvdv.nl.

CORRESPONDENTIEADRES

Sjan Lavrijsen

E-mail: a.p.m.lavrijsen@lumc.nl