

Onikomikoz Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Comparison of the Methods for the Diagnosis of Onychomycosis

Eylem Ceren, Tuğba Rezan Ekmekci, Damlanur Sakız*, Adem Köşlü, Banu Bayraktar**

Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dermatoloji, *Patoloji ve **Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Özet

Amaç: Onikomikoz tanısında sıklıkla kullanılan yöntemler; potasyum hidroksit (KOH) ile direk mikroskopik inceleme, PAS boyası ile histopatolojik değerlendirme ve fungal kültürdür. Amacımız onikomikoz tanısında kullanılan bu üç yöntemi karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Ayak tırnaklarında klinik olarak onikomikoz düşünölen 100 olgu çalışmaya alındı. Üç tanı testi her olguya yapıldı. Klinik şüph ve en az bir testin pozitif olması halinde onikomikoz tanısı kondu. Buna göre; tanı testlerinin herbiri için; duyarlılık ve negatif prediktif değer hesaplandı.

Bulgular: Olguların 92 sinde (%92) en az bir test pozitif. Metodların duyarlılığı sırasıyla, KOH ile direk mikroskopik incelemede %92, PAS boyası ile histopatolojik değerlendirmede %80 ve kültürde %20 idi. Negatif prediktif değerler ise sırasıyla %53, %42 ve %10 idi.

Sonuç: KOH ile direk mikroskopik inceleme onikomikoz tanısında en duyarlı testtir. Yüksek negatif prediktif değer ile de bunu destekler. (*Turkderm 2008; 42: 91-3*)

Anahtar Kelimeler: Onikomikoz, tanı, tanı yöntemleri

Summary

Background and Design: A potassium hydroxide (KOH) direct microscopic examination, histopathological investigation with periodic acid-Schiff (PAS) stain and fungal culture are common diagnostic methods in the diagnosis of onychomycosis. The purpose of this study was to compare these three methods for the diagnosis of onychomycosis.

Material and Method: A total of 100 patients who were suspected clinically of having onychomycosis on their toenails were included in this study. Three diagnostic tests were performed for each patients. In addition to clinical suspicion when one of the diagnostic tests was positive the diagnosis of onychomycosis was made. Accordingly, the sensitivity and the negative predictive value were calculated for each diagnostic test.

Results: In 92 (92%) of the patients, at least one of the three diagnostic methods was positive. The sensitivities of these methods were as follows: KOH direct microscopic examination, 92%; histopathological investigation with PAS stain, 80%; and culture, 20%. Their negative predictive values were also 53%, 42%, and 10% respectively.

Conclusion: KOH direct microscopic examination is the most sensitive method for the diagnosis of onychomycosis. Its high negative predictive value supports this finding. (*Turkderm 2008; 42: 91-3*)

Key Words: Onychomycosis, diagnosis, diagnostic methods

Giriş

Onikomikoz (OM) onikodistrofilerin en sık sebebidir. Onikomikoz prevalansı genel toplumda %2-13 iken, 70 yaş üzerinde %48'e kadar çıkmaktadır^{1,2}. Klinik olarak OM düşünölen tırnaklarda tanıyı doğrulamak için patojen mikroorganizmayı saptama yoluna gidilir. Bunun için kültür, potasyum hidroksit (KOH) ile direk mikrosko-

bik inceleme, periyodik asid-Schiff (PAS) boyası ile histopatolojik değerlendirme, calcoflour white (CW) boyası ile immunfloresan inceleme, enzim analizleri, PCR gibi birçok test kullanılabilir^{3,5}. Bunlardan geleneksel olanları; sabouraud dekstroza agarda kültür ve KOH ile direk mikroskopik incelemedir⁴. PAS boyası ile histopatolojik değerlendirme en sık kullanılan üçüncü metoddur⁴. Birçok ötre göre OM tanısı; klinik şüph ve en az bir labo-

ratuar testin pozitif olması ile konur^{3,4,6-8}. Amacımız klinik olarak onikomikoz şüphesi olan tırnakların tanısında KOH ile direk mikroskopik inceleme, PAS boyası ile histopatolojik değerlendirme ve kültürün tanısal değerini karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Ayak tırnaklarında OM düşünülen 100 olgu (44 erkek, 56 kadın, yaş aralığı: 22-88) çalışmaya alındı. Tırnağın en az 1/3'ünde, kalınlaşma, renk değişikliği, subungual hiperkeratoz ve debris saptanması halinde klinik olarak OM düşünüldü. Birden fazla tırnağın etkilendiği olgularda; klinik olarak en fazla tutulum olan ve travmaya en az maruz kalan tırnaklar (birinci ve beşinci hariç) seçildi. Son iki aydır oral veya topikal antifungal tedavi görenler ile psoriasis, liken, ekzema gibi tırnak tutulumuyla seyreden bir hastalığı olanlar çalışmaya alınmadı. Etkilenen tırnaktan KOH ile direk mikroskopik inceleme, PAS boyası ile histopatolojik değerlendirme ve mantar kültürü için üç örnek alındı.

KOH ile direk mikroskopik inceleme için; tırnaklar alkol ile temizlendi ve standart tırnak makası veya no:15 bistüri ile kesildi, subungual debrisi kazındı. Örnekler kuru şişeye alındı, üzerine %20 KOH solüsyonu (0.5-1 ml kadar) konuldu. Eriyene kadar (3-24 saat) muamele edildikten sonra, lam-lamel arasına yayılarak, direk ışık mikroskobu altında fungal elemanların varlığı araştırıldı. Işık mikroskobunda incelenirken x10 ve x40 büyütmeleler kullanıldı. Hif varlığı halinde pozitif, seri halde yapılan en az üç yaymada hif görülmediğinde; negatif olarak kabul edildi.

PAS boyası ile histopatolojik inceleme için; tırnak örneği %5 trichloroacetic acid solüsyonu içinde kapalı biyopsi şişeleriyle Patoloji Kliniği'ne gönderildi. Materyal kasetlere yerleştirildi, formaldehitte fikse edilerek 24 saat boyunca doku takip cihazında (sırasıyla formol/ alkol/ ksilen/ parafin) takibe alındı. Parafine gömüldü ve tırnak doku yüzeyi açığa çıkıncaya kadar traşlandı. Doku yüzeyi açığa çıktıktan sonra sodyum tiyoglukolat ile 24 saat muamele edildi. Üç mikron kalınlığında kesitler alındı; PAS ile boyanarak direkt mikroskop altında incelendi. Mantar hif ve sporlarının keratin doku üzerinde koyu pembe boyanmış şekilde görülmesi durumunda; pozitif olarak kabul edildi.

Fungal kültür için; steril bistüri ucu yardımıyla alınan tırnak örneği, steril boş petri kutusunda biriktirildi. Steril öze yardımıyla alınarak sabouraud agar ve dermosel besiyerlerine batırıldı. Ekim yapılan petrilerin kapakları kapatılarak etrafı parafilm ile kaplandı. 30°C havalı etüvde inkübasyona bırakıldı. 21 günlük inkübasyon periyodundan sonra üreyen örneklerdeki koloni yapısı makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilerek fungal organizmanın cinsi Trikofiton spp veya Kandida spp olarak not edildi.

Klinik şüphe ve en az bir test pozitifliği halinde olgu, onikomikoz olarak kabul edildi. Buna göre; tanı testlerinin herbiri için; duyarlılık (pozitif olgular içinde testin pozitifleri yakalama oranı) ve negatif prediktif değer (negatif olgular içinde testin negatifleri yakalama oranı) hesaplandı.

Bulgular

Hastaların 92'sinde (%92) en az bir tetkik pozitifliği. Sekizinde (%8) her üç tetkik de negatif iken, 18'inde (%18) her üç tetkik de pozitifliği. Olguların 85'inde (%85) KOH ile direk mikroskopik inceleme, 81'inde (%81) PAS boyası ile histopatolojik inceleme ve 19'unda (%19) kültür pozitifliği. Yetmiş dört (%74) ol-

guda KOH ile direk mikroskopik inceleme ve PAS boyası ile histopatolojik değerlendirme, on dokuz (%19) olguda KOH ile direk mikroskopik inceleme ve kültür beraber pozitifliği. PAS boyası ile histopatolojik inceleme ve kültürün sadece ikisinin beraber pozitif olduğu olgu yoktu. Onunda (%10) sadece KOH ile direk mikroskopik inceleme; yedisinde (%7) ise sadece PAS ile histopatolojik inceleme pozitifliği (Şekil 1).

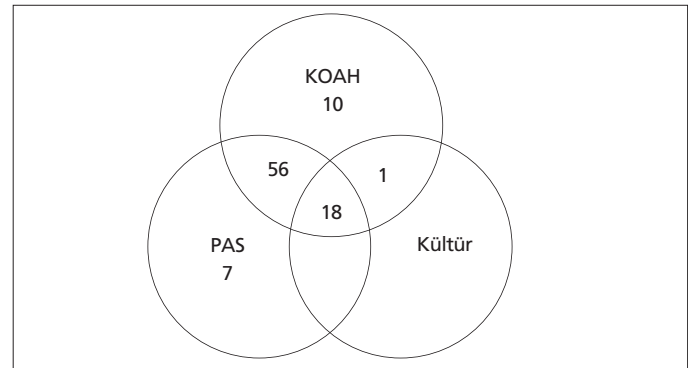
Kültür pozitif olan 19 olgunun 18'inde Trikofiton spp (%94.7); birinde Kandida spp (%5.3) üredi.

Duyarlılığı en yüksek tetkik (%92) KOH ile direk mikroskopik incelemeydi. PAS ile histopatolojik değerlendirmenin duyarlılığı %80, kültürün ise %20 idi. Negatif prediktif değerler KOH ile direk mikroskopik incelemede %53, PAS ile histopatolojik değerlendirmede %42 ve kültürde %10 idi (Tablo 1).

Tartışma

KOH ile direk mikroskopik inceleme, OM tanısında genellikle ilk basamaktır. Basit, hızlı, ucuz ve güvenilir bir yöntem olmakla beraber; yetersiz materyal alınması, kristallenmiş KOH kullanılması, materyalin yeteri kadar eritilmemesi veya çok fazla eritilmesi, uygun yayılmaması, mikroskopta tüm alanların aranmaması ve negatif sonuçlarda yaymanın tekrarlanmaması gibi problemler yanlış negatif sonuçlara yol açarken; sekonder kontaminasyon ve ayrıca değişik iplikler, hava kabarcıkları ve damlacıkların fungal yapıları taklit etmesi yanlış pozitif sonuçlara yol açmaktadır^{6,18}. İncelemenin etkene dair bilgi vermemesi ve organizmanın penetran özelliğinin gösterilmemesi diğer dezavantajlardır. KOH ile direk mikroskopik incelemede duyarlılığı; Aydingöz ve ark.¹ %96, Hsiao ve ark.³ %87, Gianni ve ark.¹⁹ %59.3, Karimzadegan-Nia ve ark.²⁰ %80.8 olarak bildirmiştir. Çalışmamızda KOH ile direk mikroskopik inceleme %92 duyarlılık ve %53 negatif prediktif değer ile OM tanısında en duyarlı yöntem olarak tespit edildi.

Son yıllarda PAS boyası ile histopatolojik inceleme, OM tanısında en duyarlı yöntem olarak önerilmektedir⁶. Bu tetkikte materyal, tırnak plağından biyopsi, tırnağın kesilmesi veya subun-



Şekil 1. Tanı testlerinin pozitiflik ilişkileri

Tablo 1. Tanı testlerinin duyarlılık ve negatif prediktif değerleri

| Test | Pozitif sonuç sayısı (n=100) | Duyarlılık % | Negatif prediktif değer (NPD) % |
|--------|------------------------------|--------------|---------------------------------|
| KOH | 85 | 92 (85/92) | 53 (8/15) |
| PAS | 81 | 80 (81/92) | 42 (8/19) |
| Kültür | 19 | 20 (19/92) | 10 (8/81) |

gual debrisin kazınması şeklinde üç farklı yöntemle alınabilir¹³. Materyalin alım kolaylığı, çabuk sonuçlanabilmesi, preparatların saklanarak geriye yönelik tanı olanağı sağlaması PAS boyası ile histopatolojik incelemeyi değerli bir yöntem yapar¹⁴. Nitekim Jeffrey ve ark.⁴ 105 olguda KOH ile direk mikroskopik inceleme, kültür ve PAS boyasıyla histopatolojik inceleme yapmışlar; sırasıyla %80, %59 ve %92 oranında duyarlılık saptamışlar ve %77 gibi yüksek negatif prediktif değerle PAS boyasıyla histopatolojik incelemenin OM tanısında diğer metodlara üstünlüğünü vurgulamışlardır. PAS boyasıyla histopatolojik değerlendirme ile çalışan Reisberg ve ark.⁶ %47; Grover ve ark.¹⁴ %93.3; Walling ve ark.¹⁵ %48.2 oranında duyarlılık bildirmişlerdir. Ayrıca tırnağın PAS boyasıyla histopatolojik değerlendirmesi, psoriasis gibi onikodistrofiye yol açan hastalıklarda da tanı koydurabilir. Nitekim, Machler ve ark.¹⁶ 12 onikodistrofik tırnağı PAS boyasıyla histopatolojik olarak değerlendirmişler; sekizine psoriasis dördüne ise OM tanısı koymuşlardır. Buna karşın; etken organizmanın cinsinin belirlenememesi bu yöntemi kültürün gölgesine iter¹⁷. Aynı zamanda kontaminasyon riski, görünen hif ve sporların saprofit, cansız olabilmesi dolayısıyla yanlış pozitiflik de mümkündür¹⁴. Ülkemizde PAS boyası ile histopatolojik inceleme OM tanısında rutinde kullanılan bir yöntem değildir. Şimdiye kadar Türkiye'den yalnızca bir çalışma yapılmıştır. Aydıngöz ve ark.¹'nin yaptığı 50 olguluk çalışmada PAS boyası ile histopatolojik inceleme %90 duyarlılık oranıyla değerli bulunmuş; ancak yine de KOH ile direk mikroskopik incelemeye üstünlük sağlayamadığı belirlenmiştir. Biz de çalışmamızda bu testin duyarlılığını %80, negatif prediktif değerini %42 bulduk.

Onikomikoz tanısında altın standart olarak kabul edilen kültürde; yanlış negatif sonuçlara yüksek oranda rastlanmaktadır⁷. Diğer yöntemlerle OM tanısı konan olguların ancak %43-50'sinde kültürde üreme elde edilmektedir^{6,9,10}. Yapılan araştırmalarda kültürün %25-80 arasında değişen oranlarda duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu geniş aralık, kültüre olan güvenilirliği azaltır⁶. Kültür işleminde, yeterli miktarda ve doğru şekilde örnek alınmaması, transport sırasında mantarların canlılığı ve kültürde üretilebilirliğinde azalma olması, ekim işlemleri sırasında sterilite koşullarına titizlikle uyulmaması, bekleme süresinin uzun olması, kontaminasyon veya sekonder patojenlerin üremesi gibi teknik problemler oldukça sıkıntı yaratmaktadır¹¹. Kültür; düşük duyarlılık oranı, sonuç için uzun süre gerektirmesi ve yüksek maliyeti dolayısıyla OM tanısında iyi bir tarama yöntemi değildir. Buna karşılık etkeni belirleme açısından oldukça üstün bir testtir ve özgüllüğü yüksektir. Ancak, kültürde üreyen nondermatofit organizma ise; bunun yüksek olasılıkla saprofit veya kontaminasyon olabileceği bilinmektedir. Bu yanlış pozitiflik durumu, kültürün özgüllüğüne gölge düşürür^{3,12}. Klinik olarak OM şüphesi olan tırnaklardan çoklu seri kültür yapılmasının yanlış negatif sonuçları azaltabileceğini gösteren çalışmalar da vardır. Nitekim Gupta'nın¹² yaptığı çalışmada kültür pozitifliği bir kez yapıldığında %44.5 iken; dört kez yapıldığında %63.7'e çıkmıştır. Tüm bu literatürlerle kıyasladığımızda çalışmamızda; %20 gibi düşük kültür pozitifliği oranı saptadık. Ancak kültür pozitif saptadığımız tüm olgularda en az bir testin de pozitif olması; kültürün özgüllüğünü göstermekteydi.

Sonuç olarak, poliklinik şartlarında yapılabilecek kolay, hızlı, ucuz ve güvenilir bir test olan KOH ile direk mikroskopik inceleme, onikomikoz tanısını doğrulamada ilk basamak metodu ola-

rak önerilebilir. KOH ile direk mikroskopik incelemenin negatif olduğu olgularda, özel teknik donanım gerektirmeyen PAS boyası ile histopatolojik inceleme Patoloji Laboratuvarlarında kolaylıkla yapılabilir. Kültür ise klasik antifungal tedavilere cevap vermeyen olgularda fungal patojeni tespit etme avantajı sağlaması açısından tercih edilebilir.

Kaynaklar

1. Aydıngöz IE, Akkaya AD, Aker F, Adaleti R: Elli olguluk bir seride onikomikoz tanısında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. *Türkderm* 2006;40:20-2.
2. Helfand AE: Foot problems in older patients: a focused podogeriatric assesment study in ambulatory care. *J Am Podiatr Med Assoc* 2004;94:293-304.
3. Hsiao YP, Lin HS, Wu TW, Shih HC, We SJ, Wang YL, Lin KL, Chiou HL, Yang JH: A comparative study of KOH test, PAS staining and fungal culture in diagnosis of onychomycosis in Taiwan. *J Dermatol Sci* 2007;45:138-40.
4. Jeffrey M, Weinberg, Evelyn K, Koestenblatt, William D, Tutrone, Hillarie R, Tishler and Lily Najarian: Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:193-7.
5. Liu HN, Lee DD, Wong CK: KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium. *Dermatology* 1993;187:166-8.
6. Reisberger EM, Abels C, Landthaler M, Szeimies RM: Histopathological diagnosis of onychomycosis by periodic acid-Schiff-stained nail clippings. *Br J Dermatol* 2003;148:749-54.
7. Monica A, Lawry, Eckart Haneke, Katherine Strobeck, Sandra Martin, Barbara Zimmer, Patrick S. Romano: Methods for Diagnosing Onychomycosis. *Arch Dermatol* 2000;136:1112-16.
8. Epstein E: How often does oral treatment of toenail onychomycosis produce a disease-free nail? *Arch Dermatol* 1998;134:1551-4.
9. Daniel CR: The diagnosis of nail fungus infection revisited. *Arch Dermatol* 2000;136:1162-4.
10. Borkowski P, Williams M, Holeywinski J, Bakotic B: Onychomycosis: An analysis of 50 cases and a comparison of diagnostic techniques. *J Am Podiatr Med Assoc* 2001;91:351-5.
11. Tanuma H: Current topics in diagnosis and treatment of tinea unguium in Japan. *J Dermatol* 1999;26:87-9.
12. Gupta A: The incremental diagnostic yield of successive re-cultures in patients with a clinical diagnosis of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2005; P1832:129.
13. Chang A, Wharton J, Tam S, Kovich OI, Kamino H: A modified approach to the histologic diagnosis of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:849-53.
14. Grover C, Reddy BS, Chaturvedi KU: Onychomycosis and the diagnostic significance of nail biopsy. *J Dermatol* 2003;30:116-22.
15. Walling HW and Sniezek PJ: Distribution of toenail dystrophy predicts histologic diagnosis of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 2007;56:945-8.
16. Machler BC, Kirsner RS, Elgart GW: Routine histologic examination for the diagnosis of onychomycosis. *Cutis* 1998;61:217-09.
17. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Jennings MB: Utility of histopathologic analysis in the evaluation of onychomycosis. *J Am Podiatr Med Assoc* 2005;95:258-63.
18. Shemer A, Trau H, Davidovici B, Grunwald MH, Amichai B: Collection of fungi samples from nails: comparative study of curettage and drilling techniques. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22:182-5.
19. Gianni C, Morelli V, Cerri A, Greco C, Rossini P, Guiducci A, Braidotti P, Calcaterra R, Papini M: Usefulness of histological examination for the diagnosis of onychomycosis. *Dermatology* 2001;202:283-8.
20. Karimzadegan-Nia M, Mir-Amin-Mohammadi A, Bouzari N, Firooz A: Comparison of direct smear, culture and histology for the diagnosis of onychomycosis. *Australas J Dermatol* 2007;48:18-21.