

Diagnóstico laboratorial de micoses superficiais e cutâneas: comparação dos métodos do hidróxido de potássio e do *Calcofluor White**

*Laboratory diagnosis of superficial and cutaneous mycosis: a comparison of the potassium hydroxide and Calcofluor White methods**

Keith Werneck Brasil¹Rosângela Lameira Pinheiro²Ida Chapaval Pimentel³

Resumo: FUNDAMENTOS - As micoses superficiais e cutâneas têm surgido com grande prevalência no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

OBJETIVOS - Avaliar o método do *calcofluor white* (CFW) mediante comparação com o método do hidróxido de potássio (KOH).

MÉTODOS - Foram analisadas 74 amostras de raspados de pele, unha, couro cabeludo e cabelo de 62 pacientes de ambos os sexos em diferentes idades. O material foi coletado nos Ambulatórios de Dermatologia, Dermatopediatria e Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, entre outubro de 1995 e março de 1996. Os espécimes foram analisados por ambos os métodos e comparados no presente trabalho. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística do Qui-quadrado.

RESULTADOS - Os resultados obtidos indicaram o CFW tão efetivo quanto o KOH. O hidróxido de potássio apresentou 38 (51%) resultados positivos e 36 (49%) negativos. O *calcofluor white* foi positivo em 35 (47%) amostras e negativo em 39 (53%).

CONCLUSÃO - Os dados revelaram igual eficácia entre os métodos avaliados; no entanto, o método do *calcofluor white* necessita de um laboratório equipado com microscópio de imunofluorescência.

Palavras-chave: corantes fluorescentes; diagnóstico; métodos; micoses; Microscopia de fluorescência.

Summary: BACKGROUND - Superficial and cutaneous mycosis have appeared with great prevalence at the Clinical Hospital of the Parana State Federal University.

OBJECTIVES - To evaluate the *calcofluor white* method (CFW) in comparison with the potassium hydroxide method (KOH).

METHODS - 74 samples of skin, nail, scalp and hair scrapings were analyzed in 62 male and female patients of different ages. The material was collected at the Dermatology, and Dermatopediatric Clinics and Emergency Department of the Federal University of Parana State Clinical Hospital from October 1995 to March 1996. The specimens were analysed by both methods, and compared in this study. The results were submitted to Qui-square statistical analysis.

RESULTS - The results obtained indicated CFW was as effective as KOH. Potassium hydroxide showed 38 (51%) positive and 36 (49%) negative results. *Calcofluor white* showed positive results in 35 (47%) samples and negative results in 39 (53%) samples.

CONCLUSION - The data revealed equal efficiency in the two methods evaluated. On the hand, the *calcofluor white* method requires a laboratory equipped with an immunofluorescence microscope.

Key words: fluorescent dyes; diagnostic; methods; mycoses; Microscopy, fluorescence.

Recebido em 17.01.2003. / Received in January, 17th of 2003.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 04.07.2003. / Approved by the Consultive Council and accepted for publication in July, 04th of 2003.

* Trabalho realizado no Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná. / Work done at "Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná".

¹ Bióloga/UFPR; Micologista pela Universidade de Buenos Aires. / Biologist/UFPR; Mycologist by Buenos Aires University.

² Mestre em Educação e Saúde/UFPR; Bióloga Micologista do Hospital de Clínicas da UFPR. / Master's Degree in Education and Health/UFPR; Mycologist-Biologist at the Hospital de Clínicas, UFPR.

³ Doutora em Processos Biotecnológicos; professora adjunta da UFPR/Departamento de Patologia Básica. / Ph.D. in Biotechnological Processes; Adjunct Professor, UFPR/Department of Basic Pathology

INTRODUÇÃO

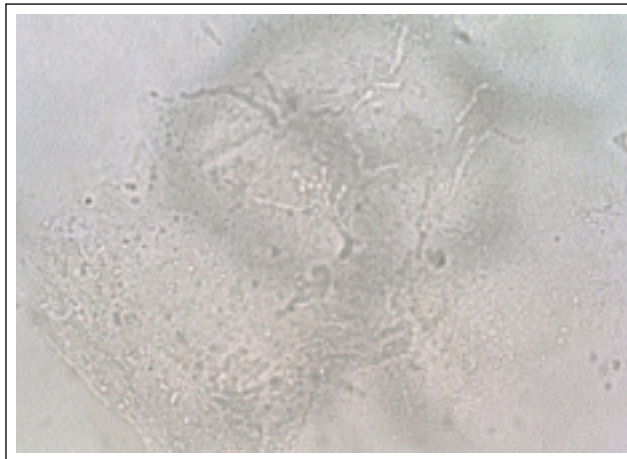
As micoses superficiais e cutâneas têm surgido com grande prevalência nos ambulatórios de Dermatologia, Dermatopediatria e no Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

O exame micológico direto de espécimes com suspeita de micose fornece resultados anteriores às culturas, que podem levar dias ou semanas.¹ Essas informações, em conjunto com a anamnese, auxiliam o clínico a instituir o tratamento adequado e precocemente. O hidróxido de potássio (KOH) é um reativo que clarifica e digere o material clínico; no entanto, a presença de elementos fúngicos requer tempo e experiência,¹ pois não há contraste entre restos celulares e elementos fúngicos (Figura 1). O *calcofluor white* (CFW) é um agente clareador amplamente utilizado nas indústrias têxteis e de papel, que se liga naturalmente à celulose e à quitina.^{1,5} Desde 1984 vem sendo empregado em laboratórios de patologia e microbiologia clínica como uma coloração não específica para fungos em amostras clínicas.⁴ O CFW quando adicionado ao KOH em partes iguais cria uma solução que clarifica debris celulares e cora os elementos fúngicos quando observados em microscópio de fluorescência, facilitando a interpretação dos resultados⁷ (Figura 2). Esse método é considerado rápido, de fácil leitura, e um dos mais específicos e sensíveis.^{1,5} O uso desse fluorocromo não se restringe ao diagnóstico de micoses superficiais e cutâneas; ele vem sendo amplamente utilizado em estudos de micoses sistêmicas e oportunistas,⁸ bem como marcador no estudo de biologia molecular de fungos.⁹

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 74 amostras de raspado de pele, unha, couro cabeludo e cabelo em 62 pacientes de ambos os sexos em diferentes idades. O material foi coletado nos Ambulatórios de Dermatologia, Dermatopediatria e Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. As 74 amostras que foram analisadas no Laboratório de Micologia do referido hospital representaram o número total de espécimes enviados ao Laboratório com suspeita de micoses superficiais e cutâneas no período de outubro de 95 a março de 96. Os pacientes ainda não estavam em tratamento. Pequenas porções de cabelos e ou escamas foram suspensas em uma gota de KOH

Figura 1: Raspado de pele mostrando células leveduriformes agrupadas em "cachos" e hifas (preparação com KOH, fotografada com lentes de 40 vezes)



Small portions of hair and/or scalings were suspen-

Figure 1: Skin scraping shows budding yeast cells and hyphae (KOH preparation, photographed with a x40 lens).

INTRODUCTION

Superficial and cutaneous mycoses have appeared with increasing prevalence in Dermatology and Dermatopediatric clinics, and the Emergency Department at the Federal University of Parana State Clinical Hospital.

The direct microscopic examination of specimens suspected of mycosis can yield rapid diagnostic information ahead of culture results, which may take days or weeks. This information, along with anamnesis, assists the doctor in instituting the appropriate treatment earlier. Potassium hydroxide (KOH) is a useful agent for clarifying the specimen. However, presence of fungal elements requires experience and is time consuming¹ (Figure 1). Calcofluor white (CFW) is a fluorescent brightener that is widely used in the textile and paper industries. It naturally binds to chitin and cellulose.^{1,5} Since 1984 it has been used in clinical microbiology and pathology laboratories as a nonspecific stain for fungal specimens.⁴ CFW added to KOH in equal parts creates a solution that clarifies cellular debris and colors fungal elements when observed with a fluorescent microscope, thus facilitating interpretation of the results⁷ (Figure 2). This method is rapid, easy to read, and one of the most specific and sensitive for fungal detection.^{1,5} Use of this fluorochrome is not limited to the diagnosis of superficial and cutaneous mycoses. It has also been employed thoroughly in studies of systemic and opportunistic mycoses,⁸ and as a marker in the study of molecular biology of fungi.⁹

MATERIAL AND METHODS

A total of 74 samples of hair, skin, scalp and nail scrapings was analyzed in 62 male and female patients of different ages. The material was collected in the Dermatology and Dermatopediatric Clinics and Emergency Department of the Federal University of Parana State Clinical Hospital. The 74 samples analyzed at the Mycology Laboratory of the aforementioned Hospital consisted of the total number of specimens sent to the laboratory with clinical suspicion of superficial and cutaneous mycoses from October 1995 to March 1996. The patients were not undergoing treatment yet.

Small portions of hair and/or scalings were suspen-

Figura 2: Raspado de pele mostrando células leveduriformes agrupadas em "cachos" e hifas (preparação com KOH 40% e CFW, fotografada com lentes de 40 vezes)

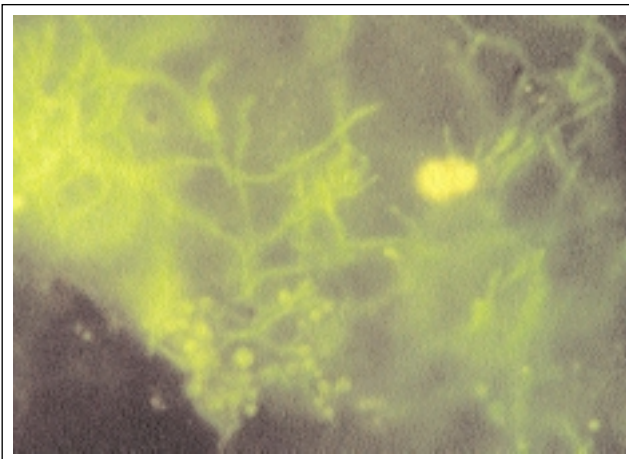


Figure 2: Skin scraping shows budding yeast and hyphae (KOH with CFW preparation, photographed with a x40 lens).

40% em lâmina para microscopia e cobertas por lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio ótico (Olympus CBA, lâmpada alógena 6V e 10W), sob o aumento de 20 e 40 vezes após aproximadamente 15 minutos de seu preparo (tempo necessário para o clareamento dos restos celulares). A solução de *calcofluor white* foi feita com a diluição de 0,1g de CFW M2R (C.I. 40622; Sigma Chemical) e 0,05g de azul de Evans (Sigma) em 100ml de água destilada; o azul de Evans age como um corante de contraste para o CFW. Uma pequena porção da amostra clínica foi misturada a uma gota de KOH 40% e uma gota de CFW em lâmina para microscopia em seguida cobertas com lamínula. Após um período de 10 a 20 minutos as lâminas foram observadas em microscópio de imunofluorescência (Olympus CBA, luz ultravioleta, filtro 490nm, barreira 530). Os resultados positivos foram definidos pela presença de estruturas fúngicas, como células leveduriformes, hifas, pseudo-hifas e arthroconídios. Em microscopia de fluorescência as estruturas fúngicas aparecem em coloração verde-maçã.

Os dados obtidos pelos exames laboratoriais foram quantificados em porcentagem e comparados pelo teste do Qui-quadrado ($\chi^2 = \Sigma (d^2/esp)$; Karl Pearson),¹⁰ estabelecendo um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Entre as 74 amostras analisadas por ambos métodos 38 (51%) apresentaram resultados positivos e 36 (49%) negativos para o KOH; para o CFW 35 (47%) positivos e 39 (53%) negativos.

Não ocorre diferença estatisticamente significativa entre as técnicas comparadas em relação aos resultados positivos ou negativos (Qui-quadrado 0,24, 1gl, $p=0,05$) (Tabela 1), pois o valor do qui-quadrado calculado (0,24) é menor (não significativo) do que o valor do qui-quadrado tabelado (3,84) para o grau de liberdade 1 no nível de probabilidade de 5% (0,05).

DISCUSSÃO

A identificação de estruturas fúngicas em amostras com suspeita de micose é técnica que requer considerável experiência.⁵ O exame micológico direto é comumente realizado com hidróxido de potássio. Lamentavelmente resultados falso-negativos podem ocorrer.^{3,4} Não há contraste

ded in a drop of KOH 40% on a microscope slide, overlain with a coverslip. The slides were viewed under a light microscope (Olympus CBA, 6V and 10W). They were scanned at a magnification of 20 and 40 times after approximately 15 minutes of preparation (i.e., the time necessary to clarify cellular materials). Calcofluor white solution was prepared with 0.1g CFW M2R (C.I. 40622; Sigma Chemical) and 0.05g Evans blue (Sigma) in 100 ml distilled water, the Evans blue serving as a counterstain to calcofluor white. A small portion of the clinical sample was suspended in a drop of KOH 40% and another drop of CFW on a microscope slide, overlain with a coverslip and left to clear for 10 to 20 minutes. The slides were then viewed under an immunofluorescent microscope (Olympus CBA, ultraviolet light, 490nm filter, 530nm barrier filter). A positive microscopy result was defined as the presence of fungal elements, such as yeasts, hyphae, pseudohyphae and arthroconidia. With fluorescence microscopy fungal structures appear in an apple-green color.

The results were quantified in percentages and submitted to Qui-square statistical analysis ($\chi^2 = \Sigma (d^2/esp)$; Karl Pearson),¹⁰ which established a *p* level of 5%.

RESULTS

In a total of 74 samples analysed by both methods, potassium hydroxide presented 38 (51%) positive results and 36 (49%) negative results. Calcofluor white presented 35 (47%) positive results and 39 (53%) negative results.

There was no significant statistical difference between the two techniques in relation to the positive or negative results (Qui-square 0.24, 1gl, $p=0.05$) (Table 1), because the Qui-square value (0.24) is less (no significance) than the Qui-square tabled value to 1 degree of freedom at a 5% significance level (0.05).

DISCUSSION

The identification of fungal elements in samples suspected of mycosis is a technique that requires considerable experience and expertise.⁵ Direct microscopy is currently applied with the potassium hydroxide method. Unfortunately, many false-negative results can occur.^{3,4}

Tabela 1: Comparação dos resultados obtidos pelos métodos do KOH e do CFW entre as amostras com resultados positivos e negativos. / *Table 1: Comparison of results obtained by KOH and CFW methods from samples showing positive and negative results.*

Método / Method	Resultados / Results				Total	χ^2
	+		-			
	obs.	esp. / exp.	obs.	esp. / exp.		
KOH	38	36,5	36	37,5	74	
CFW	35	36,5	39	37,5	74	
Total	73	73	75	75	148	0.24ns

ns: Não significativo / *Not significant*

obs: observados / *observed*

esp: esperados / *expected*

χ^2 : Qui-quadrado / *Qui-square*

entre o fungo e debris celulares.² As amostras podem conter uma quantidade pequena de estruturas fúngicas, fato esse que dificulta ao examinador observar essas estruturas e distingui-las dos artefatos⁴ produzidos pela ação do KOH em materiais proteináceos.¹ Honig⁴ reporta que ocorre uma diminuição de resultados falso-negativos quando o exame de KOH é realizado por um profissional com experiência.

O *calcofluor white* vem sendo estudado no diagnóstico laboratorial de micoses e considerado método simples, rápido, altamente sensível e específico. As preparações são lidas mais rapidamente e com baixo risco de erro.^{1,2,5-6} O CFW facilita a identificação de estruturas fúngicas, mesmo quando em pequenas quantidades,^{11,12} e exige menos experiência do observador.^{1,4}

Em 1984 Hageage e Harrington desenvolveram estudo sobre o uso do CFW em micologia clínica. Adicionaram CFW ao KOH 10% em exames *a fresco* e em exames histopatológicos de amostras com suspeita de micose. Concluíram que o *calcofluor white* é o método mais simples e rápido para detecção de fungos em espécimes clínicos.

Monheit,⁸ em pesquisa realizada sobre a detecção de fungos em tecidos usando *calcofluor white* e microscópio de fluorescência, conclui que o *calcofluor* é tão efetivo quanto os outros métodos comumente utilizados, tais como *Gomori Methenamine Silver* (GMS), *Periodic Acid-Schiff* (PAS) e *Hematoxilin-Eosin* (HE).

Haldane e Robart¹ em 1990 analisaram 207 amostras de micoses superficiais. Nesse trabalho para dermatófitos, o *calcofluor* teve sensibilidade de 92% e especificidade de 95%. O hidróxido de potássio teve sensibilidade de 88% e especificidade de 95%. Os autores concluem que o CFW e o KOH são igualmente efetivos na detecção de dermatófitos com valores preditivos similares de positividade e negatividade. Os autores sugerem que sejam realizadas mais investigações sobre a identificação de leveduras com o CFW, pois ocorreram casos de resultados falso-positivos. Esses resultados de microscopia falso-positivos podem ocorrer pela presença de artefatos, pela distribuição desigual de fungos na amostra ou se o fungo presente não for viável ou cultivável. A aplicação do *calcofluor white* seria vantajosa em laboratórios com rotatividade de profissionais, onde não há possibilidade de se

For example, there is no contrast between the fungi and cellular debris and samples may contain a small amount of fungal structures. This makes detection of fungal elements more difficult by not allowing a clear distinction from the artifact⁴ produced by the action of KOH on proteinaceous material.¹ Honig⁴ reports a decrease of false-negative results when the KOH is performed by a dermatologist.

Calcofluor white stain has been studied in laboratory diagnoses of mycoses as a simple, rapid and highly specific and sensitive method. Preparations are therefore screened more rapidly with a lower risk of missing fungi.^{1,2,5-6} CFW facilitates the identification of fungal structures, even in small quantities,^{11,12} and less experience is required on behalf of the observer.^{1,4}

In 1984 Hageage and Harrington² reported the use of CFW in clinical mycology. They added CFW to KOH 10% in fresh and histopathologic exams of samples suspected of mycosis. They concluded that *calcofluor white* is a simpler and more rapid method by which to detect fungi in clinical specimens and tissue sections.

Monheit,⁸ in a survey of fungus detection in tissues using *calcofluor white* and a fluorescence microscope, concluded that *calcofluor* is as effective as other commonly used methods, such as *Gomori's Methenamine Silver* (GMS), *Periodic Acid-Schiff* (PAS) and *Hematoxylin-Eosin* (HE).

Haldane and Robart¹ in 1990 analyzed 207 samples of superficial mycoses. In their study of dermatophytes, *calcofluor* had 92% sensibility and 95% specificity. Potassium hydroxide had 88% sensibility and 95% specificity. The authors concluded that CFW and KOH are equally effective in the detection of dermatophytes with similar positive and negative predictive values. The authors suggested further investigation into yeast identification using CFW, because of false-positive results. These results may occur if artifacts are misidentified, that is, if there is uneven distribution of fungi in a speci-

adquirir e manter experiência com o hidróxido de potássio. Os autores sugerem que para micoses superficiais o *calcofluor white* seja reservado para fungos filamentosos ou fungos que possam ser identificados morfológicamente. Honig⁴ confirma os resultados de Haldane e Robart em estudo com *calcofluor white* no diagnóstico de *tinea capitis*, obtendo como resultados positivos 76% e negativos 10% para o teste do CFW em culturas positivas. O autor conclui que a técnica do *calcofluor white* exige um laboratório equipado com microscópio de fluorescência, equipamento que normalmente não consta em laboratórios de microbiologia.

Em recente pesquisa bibliográfica pode-se verificar que o *calcofluor white* continua a ser estudado, porém com enfoque em infecções fúngicas sistêmicas e oportunistas. Outros trabalhos vêm sendo realizados com o CFW como marcador molecular, no estudo da estrutura de parede dos fungos.⁹

Essas pesquisas encorajaram a realização do presente trabalho a fim de avaliar o uso do *calcofluor white* no diagnóstico laboratorial de micoses superficiais e cutâneas no referido laboratório.

Nesta pesquisa o CFW mostrou-se igualmente efetivo ao KOH com valores positivos e negativos muito próximos. Esse resultado corrobora os trabalhos referidos.

CONCLUSÃO

Os autores concluem que os métodos avaliados são igualmente efetivos. A experiência do observador com o método do hidróxido de potássio fez com que o *calcofluor* se mostrasse igual ao KOH, não havendo vantagens em se adotar essa técnica na rotina do laboratório.

Adicionalmente, para a maioria dos laboratórios de micologia do país, a implantação do método do CFW seria desvantajosa devido à necessidade da obtenção de um microscópio de fluorescência. □

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Haldane DJM, Robart E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990; 13(4): 337-40.
2. Hageage GJ, Harrington BJ. Use of calcofluor white in clinical Mycology. *Lab Med* 1984; 15 (2): 109-12.
3. Sparks AQH, Werret GF, Stokes CR, Gruffydd-Jones TJ. Improved sensitivity in the diagnosis of dermatophytosis by fluorescence microscopy with calcofluor white. *Vet Rec* 1994; 134: 307-8.
4. Honig PJ, Sullivan K, McGowan KL. The rapid diagnosis of tinea capitis using calcofluor white. *Pediatr Emerg Care* 1996; 12(5): 333-5.
5. Ellis DH. Diagnosis of onychomycosis made simple. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40(6): 3-8.
6. Weinberg JM, Koestenblatt EK. Comparison of diagnostic methods in evaluation of onychomycosis. *Dermatol Online J* 2001; 7(1): 23G.
7. Tradução de: *Fundamental of Diagnostic Mycology*. Original em inglês. Fisher F, Cook NB. *Micologia Fundamentos e Diagnósticos*. Tradução por Irma Fioravanti. Rio de Janeiro: Revinter, 2001: 318-19.
8. Monheit JE, Cowan DF, Moore DG. Rapid detection of fungi in

men, or if the fungi present are not viable or culturable. It may be advantageous for laboratories at which personnel turnover is high, since laboratory technicians do not have the time to develop and maintain expertise with KOH. The authors suggested that CFW can be reserved for filamentous fungi or fungi that can reliably be morphologically identified. Honig⁴ confirms Haldane and Robart's results in a study on calcofluor white stain in the diagnosis of tinea capitis, which obtained 76% positive results and 10% negative results for the CFW test in positive cultures.

In recent bibliographical research calcofluor white can be verified to have been studied in opportunistic and systemic fungal infections. Many studies are still being performed with CFW as a molecular marker in fungal cell walls.⁹

These studies have encouraged the present work, the aim of which was to evaluate the use of calcofluor white in laboratory diagnoses of superficial and cutaneous mycoses.

In this paper CFW was as effective as KOH with similar positive and negative values. This result confirms those reached in the aforementioned studies.

CONCLUSION

The authors conclude that both methods appraised are equally effective. The observer's ability to use KOH preparations made CFW accuracy equal to KOH, meaning: there was no advantage in adopting this technique in our laboratory routine.

On the other hand, for the overwhelming majority of mycology laboratories in the country, implementation of the CFW method would be disadvantageous owing to the need to obtain a fluorescence microscope. □

tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 616-618.

9. Fichtner L, Frohloff F, Burkner K, Larsen M, Breuning KD, Schaffath R. Molecular analysis of KTI12/TOT4, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for *Kluyveromyces lactis* zymocin action. *Mol Microbiol* 2002; 43(3): 783-91.
10. Beiguelman B. Curso prático de bioestatística. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de genética, 1988: 231p.
11. Evans EGV, Richardson MD. *Medical Mycology: A practical approach*. Oxford: IRL Press, 1989: 17-20.
12. Thomsom JR, Robertson N. Calcofluor white as an aid to diagnosing fungal conditions. *Vet Rec* 1989; 124(9): 227-8.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: / MAILING ADDRESS:

Keith Werneck Brasil

Rua Casimiro José Marques de Abreu, 319 A
Curitiba PR 82200-130

Tel/Fax: (41) 253-5949

E-mail: wlachica@brturbo.com