

# Comparación del uso del ácido amsónico y Blanco de Calcofluor para colorear hongos sobre bloques de agar

Comparison between the use of amsonic acid and Calcofluor White for staining fungi on agar blocks

Marcela Gómez G.\*†||, Jeannette León E.‡, Alex Alexis Florez‡, Gina Quiñones V.‡, Katherine Gómez V.‡, Lizeth Espinosa G.§, Claudia Ávila R.§, Paola Fernández M.§

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

El diagnóstico temprano y veraz de las micosis invasivas es fundamental para mejorar la calidad de vida de pacientes inmunocomprometidos al disminuir las complicaciones fatales. Aunque las coloraciones que se están aplicando son útiles, tienen baja especificidad y valor predictivo positivo que disminuyen su eficacia en el diagnóstico. Es por esto que es necesario explorar nuevos colorantes como los derivados del estilbeno que son capaces de emitir fluorescencia al unirse a enlaces presentes en la pared celular fúngica.

### OBJETIVO

Identificar las características operativas de la técnica de coloración ácido amsónico y compararlas con la coloración Blanco de Calcofluor.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de pruebas diagnósticas, en el que se evaluaron 186 láminas parafinadas para cada coloración con hongos o bacterias.

### RESULTADOS

La especificidad de la microscopía fue mayor con ácido amsónico que con Blanco de Calcofluor (100% y 49,4%, respectivamente). La sensibilidad fue del 96,7% con Blanco de Calcofluor y 93,5% con ácido amsónico.

### CONCLUSIONES

El ácido amsónico es una técnica más específica que el Blanco de Calcofluor y las dos coloraciones requieren entrenamiento previo para la detección microscópica de hongos.

### PALABRAS CLAVE

Ácido amsónico, Blanco de Calcofluor, estilbenos.

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

Early and accurate diagnosis of invasive fungal infections is critical to improving the quality of life of

immunocompromised patients and to reduce fatal complications. Although staining procedures that are currently implemented are useful, their low specificity and low positive predictive value diminish their effectiveness in diagnosis. This is why it is necessary to ex-

\*Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia. †Cátedra Micología, Facultad de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia. ‡Facultad de Citobiología, Fundación Universitaria Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia. §Facultad de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia. || Contacto: [mgomez@fucsahd.edu.co](mailto:mgomez@fucsahd.edu.co)  
Recepción: 09-14-2014. Aceptación: 03-02-2015.

plore new staining agents, such as stilbene derivatives that are able to emit fluorescence by joining bonds present in the fungal cell wall.

#### OBJECTIVE

To identify the operational characteristics of the staining technique with amsonic acid and compare them with those of Calcofluor White.

#### MATERIALS AND METHODS

A diagnostic test study was performed, in which 186 paraffin-embedded fungal or bacterial slides were evaluated for each staining.

#### RESULTS

Specificity of the microscopy analysis was higher with Amsonic acid than with Calcofluor White (100% and 49.4% respectively). The sensitivity was 96.7% with Calcofluor White and 93.5% with amsonic acid.

#### CONCLUSIONS

Amsonic acid is a more specific technique than Calcofluor White and both staining procedures require previous training for the microscopic detection of fungi.

#### KEY WORDS

Amsonic acid, Calcofluor White, stilbenes.

## INTRODUCCIÓN

Los blanqueadores ópticos son compuestos químicos no tóxicos derivados en su mayoría de diaminoestilbenos, sustancias que se comenzaron a utilizar en la industria desde 1940 como materia prima en diferentes procesos químicos, se utilizan en la industria textil principalmente en la producción de telas, papel, detergentes, aditivos y productos cosméticos.<sup>1</sup>

Los blanqueadores ópticos tienen utilidad en la identificación de estructuras de los microorganismos debido a su unión no covalente a la pared celular, característica conocida en 1962 y publicada por Holländer en 1984.<sup>2,3</sup> Se unen a polisacáridos ligados por enlaces glucosídicos que se encuentran ubicados en la pared celular fúngica, especialmente a los enlaces  $\beta$ -1,3-glucano y  $\beta$ -1,4-glucano presentes en la quitina de los hongos y a la celulosa en plantas. Esta unión permite visualizar la morfolo-

gía de las estructuras al usar microscopía de fluorescencia.<sup>2</sup>

Los compuestos diaminoestilbenos tienen la capacidad de emitir fluorescencia conferida por la absorción de luz ultravioleta emitida al ocurrir un estímulo, que en este caso es luz ultravioleta cuya longitud de onda es de aproximadamente 347 nm, permitiendo a su vez la emisión de una longitud de onda de 450 nm, evidenciándose un alto contraste.<sup>4</sup>

Para diagnosticar micosis oportunistas se requieren muestras invasivas tipo biopsias, que son evaluadas bajo coloraciones especiales, útiles especialmente en aquellos casos en que el paciente está recibiendo terapia antifúngica y por lo tanto no crecerán los hongos en los medios de cultivo debido a inhibición directa.<sup>5</sup> Evidenciar la presencia de una micosis invasiva en muestras histológicas se realiza convencionalmente con la coloración de hematoxilina y eosina, pero esta técnica de coloración requiere mucho tiempo en el montaje y experiencia en su lectura. Las dificultades se incrementan si la muestra presenta pocas estructuras fúngicas, porque el patólogo necesitará revisar un mayor número de láminas para llegar al diagnóstico. Algunos laboratorios de patología realizan la coloración de Grocott, técnica más específica, pero que requiere mayor tiempo y las soluciones de trabajo deben estar recién preparadas para lograr buenos resultados.<sup>6</sup>

Los procedimientos de diagnóstico de laboratorio de micología se basan en la microscopía directa y el cultivo del material clínico. El método más utilizado implica una preparación húmeda con hidróxido de potasio al 10% (KOH) para disolver los compuestos celulares más fácilmente, sin afectar a la pared celular de los hongos.<sup>7</sup> Sin embargo, en las preparaciones de KOH a menudo se generan artefactos que son difíciles de distinguir de los elementos fúngicos, limitando así su interpretación.

Las tinciones fluorescentes, como Blankophor y Blanco de Calcofluor, han sido utilizadas por su baja toxicidad, se genera una tinción fluorescente rápida y útil en todo tipo de muestras, incluyendo escamas y tejidos.<sup>8</sup>

La coloración ácido amsonico puede ser una alternativa económica para el diagnóstico presuntivo y oportuno de la presencia de hongos en muestras parafinadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo y comparativo.

### ORGANISMOS

Se utilizaron los hongos *Fusarium* sp., *Candida albicans*, *Mucor* sp., *Epicoccum* sp. y las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Se sembró cada microorganismo en medio RMPI -1640 suplementado con 2% de glucosa. Las muestras se incubaron a 37°C durante 7 días. Los cultivos fueron mezclados con vortex y divididos en 2 tubos cónicos de 10 mL para centrifugar 10 minutos a 5000 rpm, el sedimento se mezcló en vortex con el objetivo de liberar las estructuras fúngicas.

Con cada microorganismo se crearon bloques de agarosa y se realizó inclusión en parafina.<sup>9</sup> Se colorearon 186 láminas con el colorante ácido amsónico y con Blanco de Calcofluor, de las cuales 93 correspondían a hongos y 93 a bacterias como controles negativos. Se agregó el colorante y se dejó actuar por seis minutos a temperatura ambiente. Se lavaron los portaobjetos con agua y se dejaron secar al aire.

Las láminas fueron evaluadas por el lector experto y un microscopio Leica filtro UV (Exc: 340-380/ EspDic: 400/Bar: 430) en aumento de 20X, el lector determinó la presencia de hifas septadas, hifas cenocíticas y levaduras o la ausencia de estructuras fúngicas.

Cada coloración se valoró por tres tipos de lectores: lector medio definido como estudiante de bacteriología que había realizado el curso de micología y conocían la técnica de fluorescencia, por un lector inexperto definido como estudiante de citohistología, sin conocimientos de micología y lector experto definido como profesor de micología clínica.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos por el lector experto se incorporaron a una hoja de Excel 2010. Se utilizó Stata10 pa-

raz determinar las características operativas (sensibilidad, especificidad, eficiencia y valores predictivos) y se calculó el grado de concordancia entre los diferentes tipos de lectores para cada coloración.

## RESULTADOS

Se determinaron las características operativas de la coloración ácido amsónico con una sensibilidad de 93,5% (87/93) y especificidad de 100% (93/93), el valor predictivo positivo fue de 100% (87/87), el valor predictivo negativo del 93,9% (93/99) y la eficiencia del 96,7%.

Para Blanco de Calcofluor la sensibilidad fue de 96,7% (90/93) y la especificidad de 49,4% (46/93), el valor predictivo positivo es en este caso del 65,6% (90/137), el valor predictivo negativo del 93,8% (46/49) y la eficiencia del 73,1%.

Se observa que existe diferencia estadísticamente significativa en los valores de especificidad al comparar las dos coloraciones ácido amsónico y Blanco de Calcofluor ( $p=0,0000$ ). No se observa significancia estadística en los valores de sensibilidad al presentar un valor de  $p=0,8355$  lo que nos indica que la diferencia encontrada es producto del azar.

La concordancia entre las lecturas de los tres lectores es presentada en la **Tabla 1**.

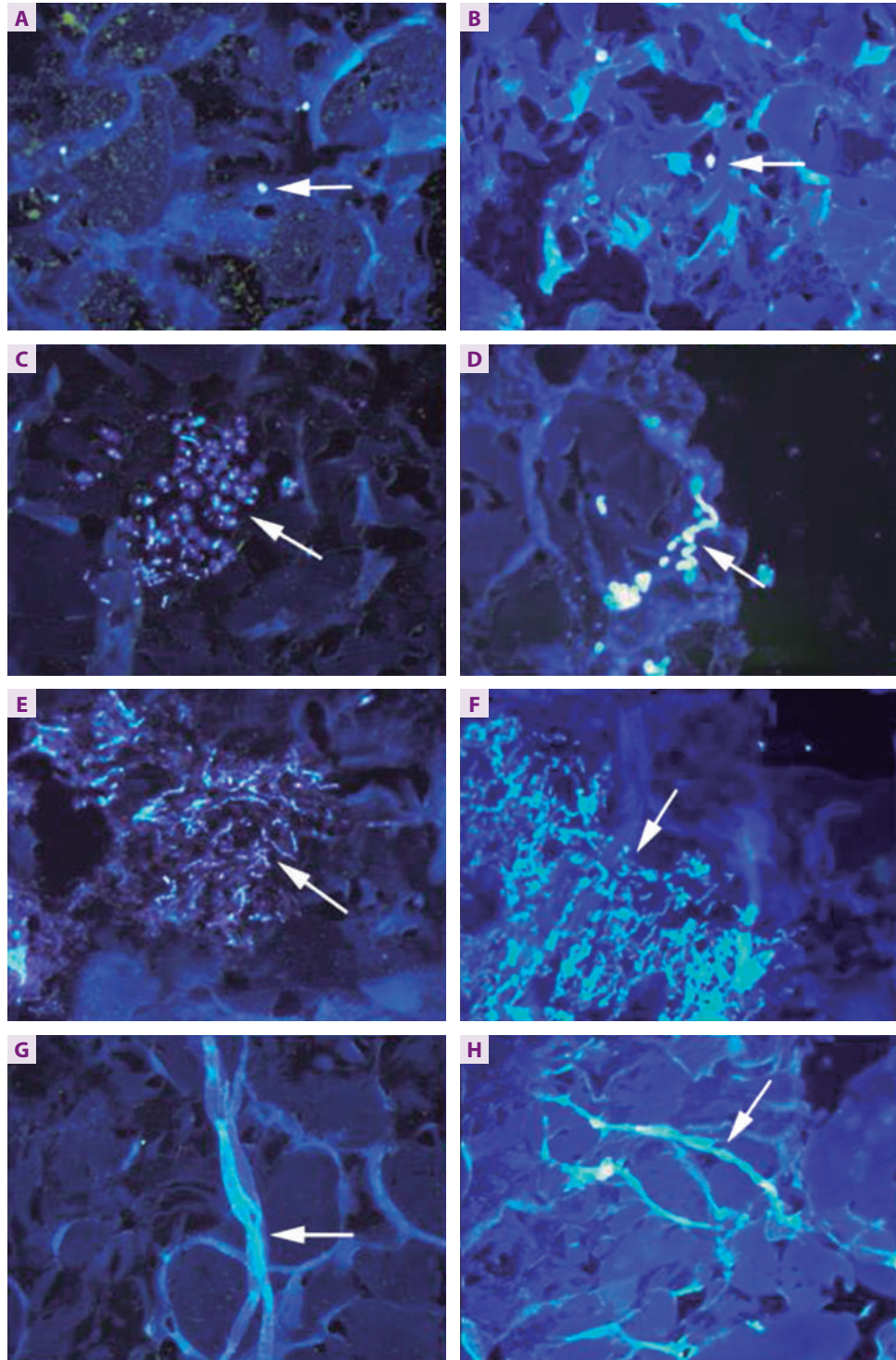
La calidad de la fluorescencia fue adecuada para las dos coloraciones y permitió fácilmente la visualización de los elementos fúngicos en los cortes de los bloques de agarosa (**Figura 1**). Se observó fluorescencia en las láminas de *Staphylococcus aureus* para las dos coloraciones que generó falsos positivos en las lecturas (**Figura 2**).

## DISCUSIÓN

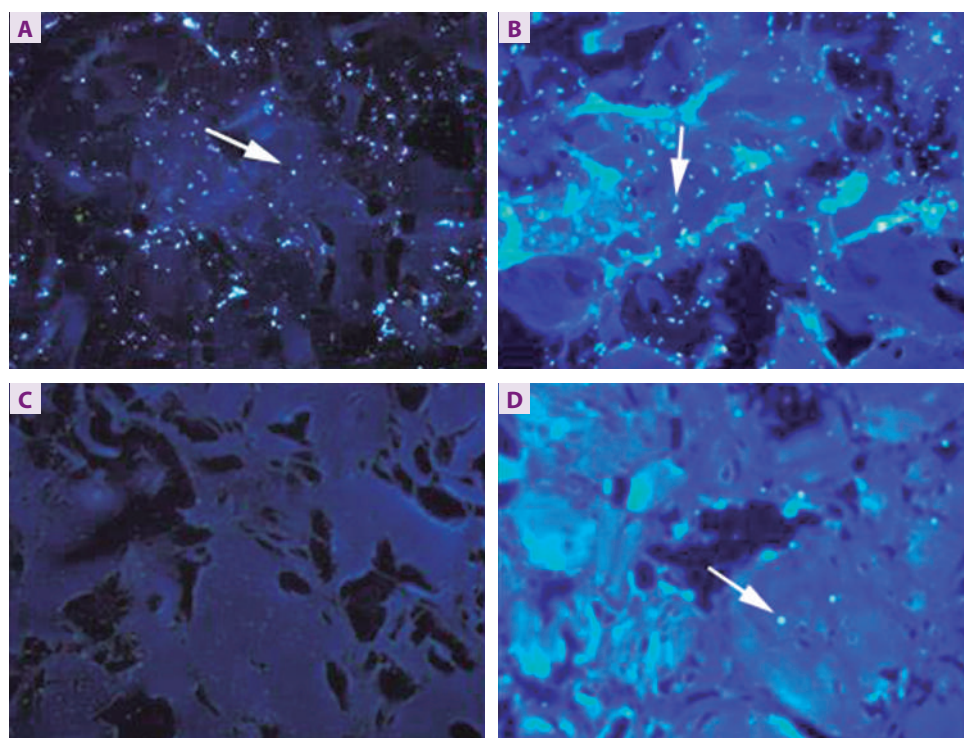
La coloración de Blanco de Calcofluor ha sido reportada en varios estudios en que evalúan su papel en el

**Tabla 1.** Concordancia de resultados de los lectores.

Lectores	Ácido amsónico		Blanco de Calcofluor	
	Intermedio	Inexperto	Intermedio	Inexperto
Experto	-0,036 (p= 0,5314)	0,0856 (p= 0,0822)	-0,0418 (p= 0,2666)	-0,3129 (p= 1,000)
Intermedio		0,1786 (p= 0,0037)		0,1747 (p= 0,0081)



**Figura 1.** Comparación de las coloraciones ácido amsonico y Blanco de Calcofluor. Las flechas indican las estructuras fúngicas. **A.** Ácido amsonico levadura *Candida albicans*. **B.** Blanco de Calcofluor levadura *Candida albicans*. **C.** Ácido amsonico micelio septado *Epicoccum* sp. **D.** Blanco de Calcofluor micelio septado *Epicoccum* sp. **E.** Ácido amsonico micelio septado *Fusarium* sp. **F.** Blanco de Calcofluor micelio septado *Fusarium* sp. **G.** Ácido amsonico micelio cenocítico *Mucor* sp. **H.** Blanco de Calcofluor micelio cenocítico *Mucor* sp.



**Figura 2.** Comparación de las coloraciones ácido amsonico y Blanco de Calcofluor. Las flechas indican fluorescencia generada por bacterias. **A.** *Staphylococcus aureus* con ácido amsonico. **B.** *Staphylococcus aureus* con Blanco de Calcofluor. **C.** *Escherichia coli* con ácido amsonico. **D.** *Escherichia coli* con Blanco de Calcofluor.

diagnóstico de onicomicosis, presentando el estudio de *Haldane y col.* una sensibilidad del 92% y especificidad del 95% que contrasta con la positividad determinada por *Gupta y col.* del 31,3% o *Bonifaz y col.* con un 57%.<sup>8,10,11</sup> Los dos agentes blanqueadores ópticos probados en el estudio presentaron alta sensibilidad, 93,5% para ácido amsonico y 96,7% para Blanco de Calcofluor, pero la especificidad fue mejor para ácido amsonico (100%) que para Blanco de Calcofluor (49,4%), debido a que las láminas de bacterias también generaron patrones de fluorescencia similares a los observados en las láminas de *Candida albicans* (Figura 2).

*Kumar y col.* realizaron la comparación de dos métodos de coloración diagnóstica, Blanco de Calcofluor (derivado de diaminoestilbenos) frente a la tinción especial (PAS) para la detección de *Candida*,<sup>12</sup> ellos estudiaron tejidos que fueron incluidos en parafina, cortados a 5 µm de grosor, y finalmente se desparafinaron. Las características operativas mostraron que la sensibilidad era menor y la especificidad mayor en PAS, con respecto a las de

Blanco de Calcofluor, similar a los resultados obtenidos en este trabajo, donde solo la sensibilidad de Blanco de Calcofluor fue superior a la coloración ácido amsonico.

Son pocos los estudios en que se han evaluado colorantes ópticos sobre tejidos, *Rachel y col.* aplicaron Blankophor sobre secciones de tejido antes de aplicar inmunofluorescencia, observando elementos fúngicos fáciles de identificar.<sup>13</sup> Nosotros logramos distinguir rápidamente los diferentes elementos fúngicos como los micelios septados y cenocíticos, las macroconidias y las levaduras.

No existió concordancia entre los tres tipos de lectores, evidenciando que se requiere entrenamiento previo para evitar falsos positivos y la necesidad de usar controles para conocer y comparar los patrones de fluorescencia.

Si bien las dos coloraciones poseen el mismo principio activo por ser compuestos 4,4'-diaminoestilbeno, la utilización del ácido amsonico es más económico para el laboratorio, al calcular el costo de 1 mL necesario para la coloración de los cortes, se determinó en

\$24 pesos colombianos para ácido amsónico frente a \$1700 pesos para la coloración Blanco de Calcofluor.

Muchos consideran que una desventaja del uso de blanqueadores ópticos es la pérdida de la fluorescencia que no permitiría revisiones posteriores. Las láminas que se evaluaron han conservado su fluorescencia constante durante 6 meses al ser almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente.

## CONCLUSIONES

La implementación de la coloración ácido amsónico es una alternativa interesante, fácil y rápida para el diagnóstico microscópico de micosis invasivas. Puede utilizarse en conjunto con otras metodologías que permitan realizar un diagnóstico multidisciplinar, con el fin de detectar el agente causal del paciente.

En este estudio se demostró una eficiencia mayor con la coloración ácido amsónico frente al Blanco de Calcofluor, mostrando una mayor probabilidad de acertar en un diagnóstico con ácido amsónico que con Blanco de Calcofluor, para la detección microscópica de hongos en cortes incluidos en parafina.

## FINANCIACIÓN

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto DI-I-0476-12 financiado por Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Colombia.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses o responsabilidades compartidas.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a los integrantes de los grupos GRIMIC y C&T por sus valiosos consejos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Riva A, Algaba I, Prieto R.** Influencia de la estructura química y concentración de dos blanqueadores ópticos en la mejora del UPF de tejidos de algodón. Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial, 2008.
2. **Schroeder J, Schaffrinski M, Ruchel R.** [Optical brighteners in fungal diagnostics]. *Mycoses*. 2006;49 Suppl 2:14-7. Epub 2006/10/07. *Optische Aufheller in der Pilzdiagnostik*.
3. **Holländer H, Keilig W, Bauer J, Rothmund E.** A reliable fluorescent stain for fungi in tissue sections and clinical specimens. *Mycopathologia*. 1984;88(2-3):131-4.
4. **Hoch HC, Galvani CD, Szarowski DH, Turner JN.** Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*. 2005;97(3):580-8. Epub 2006/01/06.
5. **Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García R, Julio, et al.** Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011;29(01):39.
6. **Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L.** Epidemiology and Outcome of Mould Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(7):909-17.
7. **Chamilos G, Kontoyiannis DP.** Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Medical Mycology*. 2006;44(s1):163-72.
8. **Bonifaz A, Rios-Yuil JM, Arenas R, Araiza J, Fernández R, Mercadillo-Pérez P, et al.** Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(2):109-11. Epub 2012/07/24.
9. **Gómez M, Munar T, Suárez C, León J, Flórez A.** Producción de bloques de agarosa para visualización de hongos. *Repertmedcir*. 2014;23(1):42-6.
10. **Haldane DJ, Robart E.** A comparison of Calcofluor White, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1990;13(4):337-9. Epub 1990/07/01.
11. **Gupta AK, Zaman M, Singh J.** Diagnosis of *Trichophyton rubrum* from onychomycotic nail samples using polymerase chain reaction and calcofluor white microscopy. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. 2008;98(3):224-8. Epub 2008/05/20.
12. **Kumar RS, Ganvir S, Hazarey V.** *Candida* and Calcofluor White: Study in precancer and cancer. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*. 2009;13(1):2-8. Epub 2009/01/01.
13. **Ruchel R, Schaffrinski M.** Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(8):2694-6. Epub 1999/07/16.