조갑 진균증의 진단에 있어 KOH 도말검사, 배양검사, KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색법의 비교관찰

부산대학교 의과대학 피부과학교실

권경술 · 임채성 · 장호선 · 오창근 · 정태안

=Abstract=

A Comparative Study for Diagnosing Onychomycosis Using KOH Smear, Fungal Culture, KONCPA and Fungi-Fluor® Stain

Kyung Sool Kwon, Chae Sung Yim, Ho Sun Jang, Chang Keun Oh and Tae Ahn Chung

Department of Dermatology, College of Medicine, Pusan National University, Pusan, Korea

Background: Onychomycosis is common nail problem and requires administration of antifungal agent for long period. But several cutaneous diseases can produce similar nail changes and an inexpensive, quick and sensitive test is essential for screening nail specimens. Recently, there have been several reports of new method for diagnosing onychomycosis and Fungi-Fluor® stain, which had been used to detect fungal elements in the tissue, was not used for diagnosing onychomycosis.

Objective: This study was undertaken to evaluate the usefulness of the new method using Fungi-Fluor® solution for the diagnosis of onychomycosis, and compare with other methods.

Methods: During the study period, nail samples obtained from 72 patients with onychomycosis were tested for Fungi-Fluor® solution and the results of that were compared with those of KOH smear, fungal culure and KONCPA test.

Results: The results of this study are summarized as follows:

1. The positive rates of conventional KOH nail scraping preparation, fungal culture, KONCPA and Fungi-Fluor® staining were 47.2%, 40.3%, 77.8%, and 86.1%, respectively.

2. Fungi-Fluor® staining proved to be less time-consuming than KONCPA test.

3. Compared to KONCPA and Fungi-Fluor® staining, KOH preparation and fungal culture showed high false positive rate.

4. Though both KONCPA and Fungi-Fluor® staining showed higher positive rate in toenail than fingernail, there were no statistic significance.

Conclusion: The Fungi-Fluor® solution staining is rapid, inexpensive, and highly sensitive method to detect fungal elements in the nails. **[Kor J Med Mycol 3(2): 125-131]**

Key Words: Fungi-Fluor® stain, KONCPA, Onychomycosis

---

*본 논문의 요지는 1997년 10월 24일 제49차 대한피부과학회 추계학술대회에서 발표되었음

†별책 요청 저자: 권경술, 602-739 부산 광역시 서구 아미동 1가 10 부산대학교 의과대학 피부과학교실

서 론

조갑 진균증은 비교적 임상에서 흔히 볼 수 있는 질환으로 임상적으로 건선, 편평태선, 습진 등의 질환에서 속발되는 조갑 변화와의 감별이 어려우며, 조갑 진균증의 치료에는 장기간의 항진균제 투여가 요구되므로 치료전에 반드시 정확한 진균학적 검사가 요구된다[1,2].

현재 흔히 사용되는 진균증의 검사 방법으로는 KOH 도말검사와 배양검사가 있으나 이들 검사 방법들은 조갑 진균증에서 다른 부위의 피부 진균증에서 보다 진단적 감수성이 떨어진다. 최근 이러한 낮은 진단적 감수성에 대한 보완적인 방법으로 다른 염색법들이 보고되고 있는데 이 중 Liu 등[3]은 깍아낸 조갑을 KOH로 처리한 후 PAS염색을 하여 관찰하는 새로운 검사방법을 KONCPA로 명명하고 진단적인 감수성이 기존의 KOH 도말검사, 배양검사와 조갑의 조직학적 검사에 비해 높다고 보고하였다. 또한 최근 여러 표재성 및 심재성 진균증에서 Fungi-Fluor® 염색 후 형광현미경으로 관찰하는 방법이 소개되면서 진단적 감수성이 매우 높다고 보고된 바 있으나[4] 아직 조갑 진균증의 진단에 이용된 적은 없었다. 이에 저자 등은 조갑 진균증이 의심되는 환자들에서 KOH 도말검사, 배양검사, KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색법을 시행하여 이의 결과를 비교분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

1996년 7월부터 1997년 6월까지 부산대학교 의과대학 부속병원 피부과 외래를 내원한 환자중 임상적으로 조갑 진균증이 의심되는 72명의 환자(남자: 45, 여자: 27)를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

모든 대상 환자의 조갑 진균증이 의심되는 부위의 조갑판을 가능한 침범부위의 근위부까지 깍아내고 조갑하 조갑 부스러기와 인설을 15번 칼로 긁어내어 모은 다음 인설의 일부로 KOH 도말검사와 배양검사를 시행하였고 나머지 가검물로 KONCPA 및 Fungi-Fluor® 염색법을 시행하여 그 결과를 비교하였다.

1) KOH 도말검사

대상 환자의 검체를 채취하여 20% KOH 용액으로 20분간 녹인 후 광학 현미경하에서 균사를 관찰하였다.

2) 진균배양검사

대상 환자의 검체를 Sabouraud's dextrose agar 사면 배지에 접종하여 배양한 후 배양된 집락의 육안적 및 현미경적 소견으로 균주를 동정하였다.

3) KONCPA

채취한 조갑판을 2~4ml의 20% KOH 용액을 넣은 시험관에 넣고 56℃에서 25분내지 30분간 가열한 후 생리적 식염수로 씻어낸 다음 3,000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻어진 침전물을 두 개의 유리슬라이드 사이에 놓고 으깨어지도록 압력을 가하여 도말하였다. 이를 공기중에 말린 후 5분간 아세톤 용액을 떨어뜨려 고정하고 다시 공기중에 말린 후 PAS염색을 하여 관찰하였다.

4) Fungi-Fluor® 염색

KONCPA 염색과 동일하게 전처치후 Fungi-Fluor® 염색액 1~2방울을 떨어뜨려 1분간 염색한 후 물로 부드럽게 씻어낸 다음 덮개유리로 덮고 250~400nm의 파장을 가진 형광현미경 (Axioskop microscope, Zeiss)으로 관찰하여 청록색의 형광을 띄는 균사 또는 포자의 존재여부를 판독하였다.

5) 통계 처리

KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색시 대상 조갑에 따른 양성률의 차이는 chi-square test로 통계 처리하였다. 통계학적으로 p value가 0.05 이하인 경우에 유의한 차이를 보이는 것으로 판정하였다.

결 과

1. KONCPA 및 Fungi-Fluor® 염색법의 검사 소견

조갑 진균증의 가검물로부터 시행한 KONCPA 검사상 선홍색으로 선명하게 염색되는 균사를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). Fungi-Fluor® 염색법에서는 KONCPA나 KOH 도말검사에 비해 주변과 뚜렷이 구분되는 청록색의 형광을 발하는 균사가 쉽게 관찰되었다 (Fig. 2).

2. 4가지 진단방법의 소요시간 및 양성율의 비교

4가지 진단방법에 소요되는 시간은 짧게는 30분

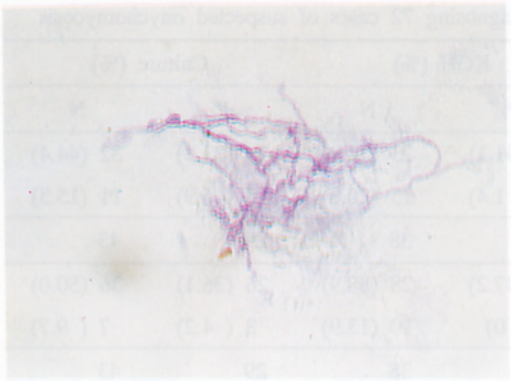

Fig. 1. Scarlet colored fungal elements visualized by KONCPA (×200).

Table 1. Comparison of spending time and positive rate between 4 different methods

Diagnostic method	Time	Positive rate (%)
KOH smear	about 30 minutes	47.2
Culture	about 2-3 weeks	40.3
KONCPA	about 3 hours	77.8
Fungi-Fluor®	about 1 hour	86.1

에서 길게는 2~3주가 소요되었고 KOH 도말검사, 진균배양검사, KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색법에서 양성을 보인 경우는 각각 34예 (47.2%), 29예 (40.3%), 56예 (77.8%), 62예 (86.1%)로 Fungi-Fluor® 염색법에서 가장 높은 양성율을 보였다 (Table 1). 한편 KONCPA에서 양성을 보인 56예 중 KOH 도말검사에서는 23예에서 음성소견을 보였으며 진균배양검사에서는 32예에서 음성소견을 보였다. 또한 Fungi-Fluor® 염색법에서 양성을 보인 62예중 KOH 도말검사에서는 28예에서, 진균배양검사에서는 36예에서 음성소견을 보여 KOH 도말검사나 진균배양검사가 KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색법에 비해 위음성율이 높았다 (Table 2).

3. 배양 균주에 따른 양성율의 비교

배양검사상 총 72예중 29예 (40.3%)에서 진균 집락이 관찰되었다. 진균종별로는 dermatophytes가 21예, candida가 4예, mould가 4예에서 배양되었다. Dermatophytes의 경우 KOH 도말검사상 21예

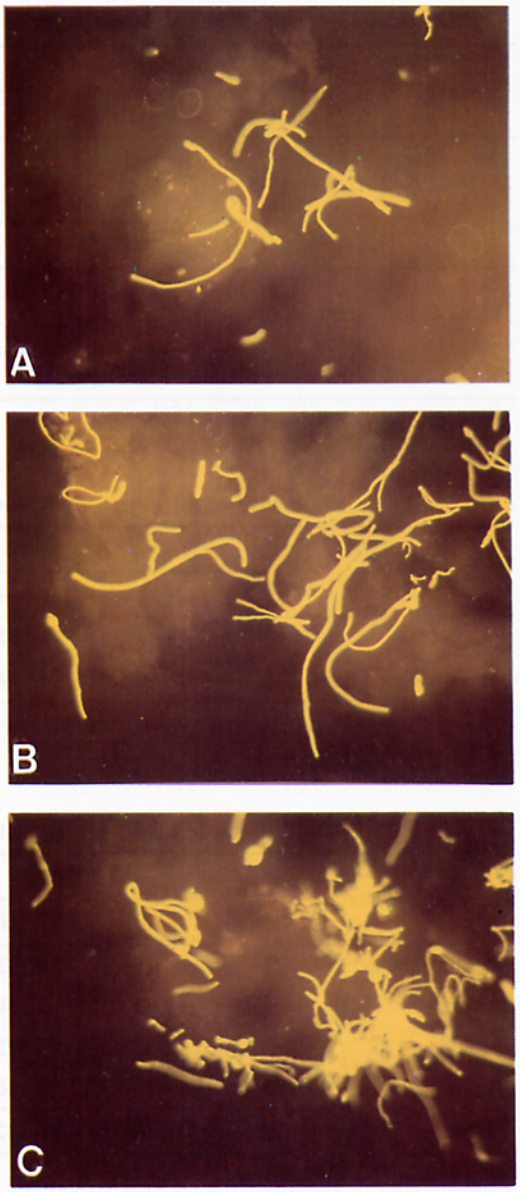

Fig. 2. Degree of positivity for fungal elements by Fungi-Fluor® stain. **(a)** Few scattered fungal elements showing green-colored fluorescence (Fungi-Fluor® stain, ×200). **(b)** Moderate number of fungal elements showing green-colored fluorescence (Fungi-Fluor® stain, ×200). **(c)** Large number of fungal elements grouped together showing green-colored fluorescence (Fungi-Fluor® stain, ×200).

중 14예 (66.7%)에서 양성을 보여 KONCPA법 (95.2%)이나 Fungi-Fluor® 염색법 (100%)에 비해 가장 검출율이 낮았다 (Table 4).

Table 2. Comparison of four different methods for diagnosing 72 cases of suspected onychomycosis

Method		Number (%)	KOH (%)		Culture (%)	
			P	N	P	N
KONCPA	P	56 (77.8)	33 (41.1)	23 (31.9)	24 (33.3)	32 (44.4)
	N	16 (22.2)	1 (1.4)	15 (20.8)	5 (6.9)	11 (15.3)
	Total	72 (100)	34	38	29	43
Fungi-Fluor® stain	P	62 (86.1)	34 (47.2)	28 (38.9)	26 (36.1)	36 (50.0)
	N	10 (13.9)	0 (0)	10 (13.9)	3 (4.2)	7 (9.7)
	Total	72 (100)	34	38	29	43

P: positive; N: negative

Table 3. Comparison of degree of positivity between KONCPA and Fungi-Fluor® stain

Method	Degree of positivity			Negative	Total
	+++	++	+		
KONCPA	13	17	26	16	72
Fungi-Fluor® stain	16	19	27	10	72

+++: many long hyphaes grouped together; ++: moderate number of hyphaes; +: few scattered short to medium-sized hyphaes

Table 4. Comparison of positive rate according to the isolated fungal species

Isolated species	Isolated number (n)	KOH (%)		KONCPA (%)		Fungi-Fluor® (%)	
		P	N	P	N	P	N
Dermatophytes	21	14 (66.7)	7 (33.3)	20 (95.2)	1 (4.8)	21 (100)	0 (0)
Candida	4	2 (50.0)	2 (50.0)	3 (75.0)	1 (25.0)	4 (50.0)	0 (0)
Mould	4	1 (25.0)	3 (75.0)	3 (75.0)	1 (25.0)	3 (75.0)	1 (25.0)
No growth	43	17 (39.5)	26 (60.5)	30 (69.8)	13 (30.2)	34 (79.1)	9 (20.9)
Total	72	34 (47.2)	38 (52.8)	56 (77.8)	16 (22.2)	62 (86.1)	10 (13.9)

P: positive; N: negative

4. 대상 조갑에 따른 KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색법의 양성률 비교

72명의 대상 환자중 대상 조갑이 수지 조갑인 예가 15예였고 족지 조갑은 57예였다. 수지 조갑에서는 KONCPA법에서 66.7%, Fungi-Fluor® 염색법에서 80%에서 양성으로 나타났으며, 족지 조갑의 경우에는 KONCPA법에서 80.7%, Fungi-Fluor® 염색법에서는 87.7%에서 양성으로 나타나 두 염색법 모두에서 족지 조갑에서 감수성이 더 높게 나타났다 (Table 5).

5. KONCPA와 Fungi-Fluor® 염색법의 양성 정도 비교

양성 정도는 균사가 군집을 이룬 경우를 (+++) (Fig. 2a), 여러개의 균사가 모여서 관찰되는 경우를 (++) (Fig. 2b), 소수의 균사가 독립적으로 관찰되는 것을 (+) (Fig. 2c)로 판정하였는데 KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색법 모두에서 (+)가 가장 많았으며 Fungi-Fluor® 염색법에서

Table 5. Positivity of KONCPA & Fungi-Fluor® staining according to target nail

Target nail	Samples tested (n)	KONCPA (%)		Fungi-Fluor® stain (%)	
		P	N	P	N
Finger nail	15	10 (66.7)	5 (33.3)	12 (80.0)	3 (20.0)
Toe nail	57	46 (80.7)	11 (19.3)	50 (87.7)	7 (12.3)
Total	72	56 (77.8)	16 (22.2)	62 (86.1)	10 (13.9)

P: positive ; N: negative

(++) 또는 (+++)가 약간 높은 빈도를 보였다 (Table 3).

고 찰

조갑 진균증은 손톱이나 발톱에 피부사상균, 칸디다 및 mold 등의 진균이 감염되어 발생하는 흔한 질환으로 최근 노령인구의 증가, 스포츠 레저 활동 등의 확대로 인해 빈도가 크게 증가하고 있으며, 임상적으로 건선, 편평태선, 습진 등의 질환에서 속발되는 조갑 변화와의 감별을 요한다. 본 증의 진단 방법에는 KOH 도말검사, 진균배양검사, 병리조직 검사 등이 있는데 이중 배양검사는 원인 균주의 동정을 위해서는 필수적인 검사이나 소요 시간이 1~3주 정도로 긴 편이며 검사자에 따라 다소 차이는 있으나 위음성률이 KOH 도말검사에 비해서도 30% 가량 많은 것으로 보고되고 있다[5]. 또한 배양검사 과정중 오염 등에 의해 위양성의 결과도 나올 수 있기 때문에 조갑 진균증의 진단을 위해서는 KOH 도말검사가 훨씬 유용성이 큰 것으로 알려져 있다. 하지만 KOH 도말검사의 경우 매우 신속하고 간편한 방법이긴 하지만 가검물에 균사가 희소할 경우에는 특히 조갑 진균증에서 감수성이 많이 저하되는 단점이 있어 균사를 보다 용이하게 검출할 수 있는 여러 다른 방법들이 제시된 바 있다.

Suarez 등[6]은 임상적으로 조갑 진균증이 강력히 의심되나 KOH 도말과 진균배양의 결과가 계속 음성으로 나오는 경우 병변조갑을 채취후 병리조직 검사를 시행하여 조갑판에서 균사나 아포 등 진균의 존재와 함께 침범한 정도와 배열을 알 수 있고 진균의 형태를 관찰함으로써 원인균의 군간 구별이 가능하며 유사한 조갑증상을 보이는 다른 질환과의 감별이 가능하여 진단율을 높일 수 있다고 하였으나 일반적인 검사법에 비해 조직 표본의 제작에 많은 시간과 비용이 들어 아직 보편화되지는 못하고 있다. Liu 등[3]은 병변 조갑에서 채취한 가검물을 20% KOH 용액에 넣고 30분간 가열하여 용해시킨후 PAS에 반응시켜 관찰하고 이러한 방법을 KONCPA로 명명하였으며 KOH 도말검사, 진균배양검사 및 병리조직검사보다 높은 양성율을 보이면서도 비교적 신속하고 용이하게 시행할 수 있고 표본을 영구적으로 보존할 수 있는 검사라고 하였으며 국내에서도 이 등[7]과 권 등[8]이 기존의 다른 검사법에 비해 감수성이 높은 진단법이라고 보고한 바 있다. 최근 여러 저자[9~17]들에 의해 소개된 Fungi-Fluor® 염색액은 파라핀포매조직절편이나 냉동조직절편 및 객담과 같은 가검물 등에 존재하는 진균성분을 증명하는데 이용되고 있으며, Fungi-Fluor® 염색액으로 염색한 후 형광현미경으로 관찰시 진균성분은 분명한 청록색의 형광을 띄게 된다. 이러한 염색액의 주된 성분인 calcofluor white는 대부분의 진균에 비교적 균등하게 염색되며 이의 작용부위는 진균 세포벽의 chitin이나 cellulose와 같이 β configuration으로 연결된 다당류이며 α configuration의 다당류에는 calcofluor white가 결합하지 않는다. 이와같이 결합된 calcofluor white-cellulose 복합체는 250~400nm 파장대의 형광현미경하에서 특이한 청록색의 형광을 발하게 된다[9]. 이러한 염색법은 비록 형광현미경이 구비되어야 하지만 염색방법이 간단하며 다른 면역형광검사법과는 달리 염색후 슬라이드를 synthetic medium에 봉인하여 암실에서 보관할 경우에는 적어도 수개월간은 안정적으로 형광이 보존되는 장점이 있다.

Monheit 등[10]은 수술중 폐 및 연부조직의 냉동절편에서 진균증을 진단하는데 calcofluor white를 사용하였으며 이러한 염색법이 매우 간단하고 빠르며 민감한 진단법이라고 보고한 바 있다. 또한 피부, 조갑, 모발 및 체액 등에서 진균성분의 증

명을 위한 우수한 염색법으로 이용되었고[11~13] 최근에는 호흡기계 분비물에서 Pneumocystis carinii의 신속한 증명을 위한 염색법으로도 쓰이고 있다[14~16]. 이와 같이 calcofluor white 염색은 여러 표재성 및 심재성 진균증의 진단법으로 쓰이고 있으나 아직까지 조갑 진균증의 진단에 이용된 적은 없었다. 이에 저자들은 현재까지 국내 문헌상 조갑 진균증의 진단에 가장 감수성이 높았다고 보고된 KONCPA법과 calcofluor white액을 이용한 염색법을 기존의 검사법들과 비교해 보았는데, 먼저 진단에 소요되는 시간 및 양성율을 보면 KOH 도말검사가 30분으로 가장 소요시간이 짧았으나 양성율은 47.2%로 비교적 낮았다. 배양검사의 경우에는 소요시간이 가장 긴 반면 양성율도 가장 낮게 나타났다. 반면에 KONCPA법과 Fungi-Fluor® 염색법의 경우 양성율이 각각 77.8% 및 86.1%로 높았으며 특히 Fungi-Fluor® 염색법의 경우 소요시간도 1시간 정도로 KONCPA법에 비해 매우 짧았다. 4가지 진단법을 함께 비교해 보았을 때에는 KOH 도말검사나 진균배양검사에서 음성을 보인 다수의 예에서 KONCPA 검사나 Fungi-Fluor® 염색법에서 양성을 보였는데 특히 Fungi-Fluor® 염색법에서 더 높은 양성율을 보였다. 배양검사에서 동정된 균주에 대한 양성율 비교에서도 역시 KOH 도말검사에 비해 KONCPA법과 Fungi-Fluor® 염색법에서 우수한 결과를 보였으며, mould가 배양된 4예중 3예에서는 KONCPA법이나 Fungi-Fluor® 염색에서 음성으로 나타났는데 이는 배양검사 과정중 오염에 의한 배양검사의 위양성 결과의 가능성을 생각할 수 있겠다. 한편 대상 조갑에 따른 양성율은 KONCPA법과 Fungi-Fluor® 염색법 모두에서 수지 조갑에 비해 족지 조갑에서 감수성이 더 높게 나타났는데 이러한 결과는 수지 조갑에 비해 족지 조갑에서 보다 광범위하고 심한 감염이 있었기 때문으로 추측된다.

저자들은 본 실험도중에 조갑 진균증의 진단에 있어 감수성이 매우 높은 Fungi-Fluor® 염색액이 진균의 생육성을 평가하는데 유용성이 있는지의 여부를 알아보기 위해 Sabouraud 포도당 배지에서 배양된 Trichophyton rubrum 집락에서 균사를 채취하여 이것을 2개의 군으로 나누고, 한 군은 가압 멸균기 (120℃, 60min)로 열처리를 한 후, 다른 한군은 직접 Fungi-Fluor® 염색을 하여 살아있는 균사에만 염색이 되는지의 여부를 관찰해 보았으나 두 군 모두에서 염색이 되어 균사의 생육성 평가를 위한 방법으로는 적절치 않을 것으로 사료된다.

결 론

저자들은 조갑 진균증으로 진단된 72명의 환자를 대상으로 KOH 도말검사, 진균배양검사, KONCPA 검사 및 Fungi-Fluor® 염색법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. KONCPA와 Fungi-Fluor® 염색법에서 KOH 도말검사와 배양검사에 비해 진균 검출률이 높았다.

2. Fungi-Fluor® 염색법에서 KONCPA에 비해 소요시간이 보다 적었으며 진균성분의 관찰을 위한 시야가 더 좋아 쉽게 진단할 수 있었다.

3. KOH 도말검사나 진균배양검사가 KONCPA법 및 Fungi-Fluor® 염색법에 비해 위음성율이 높았다.

4. 진균배양검사에서 dermatophytes로 동정된 경우 KOH 도말검사에서는 21예중 14예 (66.7%)에서 양성을 보여 KONCPA법 (95.2%)이나 Fungi-Fluor® 염색법 (100%)에 비해 가장 검출율이 낮았다.

5. 수지 조갑에서는 KONCPA법에서 66.7%, Fungi-Fluor® 염색법에서 80%에서 양성으로 나타났으며, 족지 조갑의 경우에는 KONCPA법에서 80.7%, Fungi-Fluor® 염색법에서는 87.7%에서 양성으로 나타나 두 염색법 모두에서 족지 조갑에서 감수성이 더 높게 나타났으나 두 염색법 모두에서 통계학적 유의성은 없었다.

이상의 결과로 기존의 KOH 도말검사나 진균배양검사 등에 비해 KONCPA나 Fungi-Fluor® 염색법이 조갑 진균증의 진단 감수성이 높으며 그 중 특히 Fungi-Fluor® 염색법은 다른 염색법에 비해 소요되는 시간이 적으며, 관찰을 위한 시야가 보다 좋아 빠른 시간내에 쉽게 진균 성분을 증명할 수 있어 조갑 진균증과 유사한 임상양상을 보이는 여러 다른 비진균성 조갑 질환과의 감별에 유용할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Haneke E. Fungal infections of the nail. Semin Dermatol 1991; 10: 41-53

2. Midgley G, Moore MK, Cook JC, et al. Mycol-

ogy of nail disorders. J Am Acad Dermatol 1994; 31: S68-74
3. Liu HN, Lee DD, Wong CK. KONCPA: A new method for diagnosing tinea ungium. Dermatol 1993; 187: 166-168
4. 권경술, 임채성, 장호선, 정태안, 오창근. 표재성 및 심재성 진균증의 진단에 있어 Fungi-Fluor solution의 유용성에 대한 연구. 대피지 1997; 35(3): 467-473
5. Gentles JC. Laboratory investigations of dermatophyte infections of nails. Sabouraudia 1971; 9: 149-152
6. Suarez SM, Silvers DN, Scher RK, et al. Histologic evaluation of nail clippings for diagnosing onychomycosis. Arch Dermatol 1991; 127: 1517-1519
7. 이종서, 이광훈. 조갑 진균증의 진단 방법에 관한 비교 연구. 대피지 1995; 33: 467-473
8. 권윤희, 조백기. 조갑 진균증의 진단에 있어 KONCPA 검사의 임상적 의의. 대피지 1996; 34: 527-537
9. Maeda H, Ishida N. Specificity of binding hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brighteners. J Biochem 1967; 62: 267-278
10. Monheit JG, Brown GK, Kott MM, et al. Calcofluor white detection of fungi in cytopathology. Am J Clin Pathol 1986; 85: 222-225
11. Rüchel R, Margraf S. Rapid microscopical diagnosis of deep-seated mycoses following maceration of fresh specimens and staining with optical brighteners. Mycoses 1992; 36: 239-242
12. Hollander H, Keilig W, Bauer J, et al. A reliable fluorescent stain for fungi in tissue sections and clinical specimens. Mycopathologica 1984; 88: 131-134
13. Hageage GJ, Harrington BJ. Use of Calcofluor white in clinical mycology. Lab Med. 1984; 15: 109-112
14. Stager CE, Fraire AE, Kim HS, et al. Modification of the Fungi-Fluor® and the Genetic systems fluorescent antibody methods for detection of Pneumocystis carinii in bronchoalveolar lavage specimens. Arch Pathol Lab Med 1995; 119: 142-147
15. Baselski VS, Robison MK, Pifer LW, et al. Rapid detection of Pneumocystis carinii in bronchoalveolar lavage samples by using Cellufluor staining. J Clin Microbiol 1990; 28: 393-394
16. Kim YK, Parulekar S, Yu PKW, et al. Evaluation of calcofluor white stain for detection of Pneumocystis carinii. Diagn Microbiol Infect Dis 1990: 13: 307-310
17. Chander J, Chakrabarti A, Sharma A. Evaluation of Calcofluor staining in the diagnosis of fungal corneal ulcer. Mycoses 1993; 36: 243-245