

CENTRO NACIONAL DE REGISTROS
PREMIO INVENTIVA
EL SALVADOR C.A.
2003



ARTICULO DE INVESTIGACION

PREMIO A LA MEJOR INVENCIÓN EN
QUIMICA AÑO 2003.

© Copyright. Puede citar al autor.

Estudio sobre [Indigofera sp \(añil\)](#) como tinción natural para el diagnóstico micológico de enfermedades micóticas de importancia médica. Año 2003.

Dr. Msp Antonio Vásquez Hidalgo¹
Lic. Salvador Castillo.²

R esumen

Objetivos del estudio: Utilizar el método tinción *Indigofera sp* para el estudio micológico en pruebas in vitro de laboratorio.

Metodología: se procedió en cuatro fases, se utilizaron 3 cepas de hongos (*Rhysopus sp*, *Cándida sp*, *M. gypseum*), se hicieron siembras

¹ Docente del Departamento de Microbiología. UES.

² Docente de la Facultad de Química y Farmacia.

Artículo de investigación 1

de cultivos, luego se hicieron frotis (en total 200 frotis) de estos 100 frotis son denominados casos y 100 frotis fueron los controles, luego se hizo tinción por microdilución para obtener la concentración optima del producto natural.

Resultados: Error de estimación entre el método de tinción tradicional y el método natural de 0.01. En el 100 % se observo la morfología estructural del hongo *Cándida sp*, *M. gypseum* y el 97 % *Rhysopus sp*. ($p=0.01$)

Conclusiones: La tinción de *Indigofera sp* colorea las estructuras morfológicas de los hongos.

Palabras clave: *Indigofera sp*, Micosis.

Abstrac

Objectives of the study: to Use the method *Indigofera sp* for the study micologic in tests in laboratory vitro.

Methodology: you proceeded in four phases, 3 stumps of mushrooms were used (*Rhysopus sp*, *Candida sp*, *M. gypsum*), *cultivations will be made, then smear will be made (in total 200 smear) of these 100 smears cases and 100 smear are denominated they were the controls, then tint will be made by microdilution to obtain the good concentration of the natural product.*

Results: estimate Error between the method of traditional and the natural method of 0.01. In 100% one observes the structural morphology of



the mushroom *Candida sp*, *M. gypseum* and 90% *Rhysopus sp*. (p=0.01)

Conclusions: The tintion of *Indigofera sp* colors the structures morphologic of the mushrooms.

Words key: *Indigofera sp*, Micosis.

INTRODUCCION.

La prevalencia e incidencia de morbilidad en los indicadores de salud por infecciones de la piel incluyendo micóticas tiene una tasa de 312,6 x 100,000 hab (MSPAS 1998).

El estudio de los hongos se realiza actualmente por métodos de diagnóstico tradicional, utilizando reactivos como lactofenol azul algodón, que son productos de algo costo y sobre todo son importados de otros países que no son elaborados en nuestro país.

Los hongos se reproducen por esporas y conidias, tienen una estructura que los caracteriza de acuerdo a su género y especie. Existen hongos que se desarrollan en fase micelial, levaduriforme y otros en ambos.

Su identificación en laboratorio se requiere de una precisión adecuada de sus características morfológicas, macroscópicas y microscópicas, lo que permitirá un mejor

diagnostico de laboratorio a priori en un tratamiento adecuado hacia los pacientes.

El Salvador posee la materia prima de la planta natural a investigar, que se produce y se exporta a otros países Europeos , de tal forma que al demostrar su eficacia en pruebas in Vitro se puede comercializar y ser utilizado en los laboratorios clínicos nacionales y exportar la tinción para el diagnóstico micológico.

Objetivos de la investigación:

General: Utilizar el método tinción *Indigofera sp* para el estudio micológico en pruebas *in vitro* de laboratorio.

Específicos: 1. Preparar frotis conteniendo muestras de hongos con el método tradicional utilizando el lactofenol azul algodón. 2. Preparar frotis conteniendo muestras de hongos con el método natural utilizando la planta natural. 3. Comparar ambos métodos de tinción.

Diseño Metodológico.

Tipo de estudio: Experimental con un nivel de confianza del 99 % y un valor alfa de 0.01.

Población de estudio: se procesaron 200 muestras aisladas de cepas conteniendo





Cándida sp, *Rhysopus sp*, *M. gypseum*, luego se hicieron tinciones con la planta natural y el reactivo tradicional.

Criterios de exclusión:

1. Muestras contaminadas
2. Otro tipo de agente micológico
3. Mal control de calidad.

Variables del estudio:

1. hongos: ***Cándida sp*, *Rhysopus sp*, *M. gypseum*.**
2. Planta natural: *Indigofera sp*.

Área de estudio:

Las pruebas se realizaron en laboratorios de microbiología de la Facultad de Medicina y Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Selección de Muestra:

Se utilizaron 3 cepas micóticas obtenidas de laboratorio, procesando en total 200 muestras. Se prepararon con los reactivos de lactofenol azul algodón en 100 frotis llamados controles y 100 frotis conteniendo el extracto de la planta natural.

Criterios de inclusión:

1. Agentes micológicos a estudiar.
2. Planta natural la de investigación.
3. Concentración óptima de tinción

Control de sesgos:

1. Muestra contaminada: su control es por estudio de laboratorio para descartar otras cepas.
2. Planta natural sea de otro género y especie: su control es por estudio taxonómico y bromatológico.
3. Concentración inadecuada: su control es por método de dilución Standard.
4. Preparación inadecuada del cultivo y frotis: su control es por control de calidad y Standard de los medios.
5. Cepas inadecuadas: su control será por clasificación morfológica.

Consideraciones éticas:

En la investigación no se utilizaron a sujetos humanos, las pruebas se hicieron primariamente in Vitro. La manipulación de las cepas se realizó bajo estrictas normas Internacionales de bioseguridad.

Procedimiento metodológico:

El estudio se hizo en cuatro fases:



PRIMERA FASE: Se hizo la búsqueda de *Indigofora sp* así como las cepas micóticas del estudio.

SEGUNDA FASE: Se hicieron micro diluciones 1:100 para obtener una concentración óptima de la planta natural por el método de sulfonación, luego se realizaron la tinción de los frotis.

TERCERA FASE: Se hicieron siembras en 40 tubos de vidrio con tapón de gasa 125 x 15 mm con agar glucosado de savoraud e inoculadas con las cepas micóticas de *Cándida sp*, *M. gypseum* y *Rhysopus sp*.

CUARTA FASE: Se hicieron frotis en una lamina portaobjetos de 3x1 limpias y desengrasadas (200 laminas) con asa estéril en L se obtendrán fragmentos de la colonia a estudiar, se colocó una gota de la Planta Natural a 100 frotis en el centro de la lamina a cada frotis y a los controles se colocó una gota de lactofenol azul algodón a cada frotis, luego se esterilizo una de las agujas de disección, se desmenuza el fragmento del hongo se cubre con una laminilla, se esteriliza el asa y la aguja de disección y se examina al microscopio la preparación, y se observa con los objetivos 10x y 40x. Se hizo la identificación por clasificación taxonómica de los hongos aislados.

Se procesaron con la tinción un total de 100 frotis obtenidas del preparado, luego 100 frotis con el método tradicional, la relación fue de 1:1. Se hicieron cultivos, descarte de probables muestras contaminadas e identificación de estructuras entre otros.

Análisis de la información:

Se utilizaron métodos estadísticos inferencia les así como descriptivos, como: histogramas, polígono de frecuencias etc. Tablas 2x2. Se utilizaran procesadores de texto, Microsoft Office , Epidat. Excel. SPSS 10.0.

Diagrama diseño Metodológico.

N + P = T	
N-----P-----	Na=100----
T1.....T200	
n=200	Po 0x000000
	Nb=100-----oX 00000
N: número de casos	
P1:planta natural	
Po: No planta (control)	Chi= ($\frac{0-E}{E}$) 2
Na: casos	
Nb: controles	
0; observación	S= a/a+c
T: tinción x microdilución	
X: intervención	E= d/b+d

Hipótesis de Investigación: La tinción natural es igual de eficaz que la tinción

tradicional en la identificación de estructuras morfológicas de los hongos.

Hipótesis nula: no existe diferencias entre La tinción natural sea diferente a la tinción tradicional en la identificación de estructuras morfológicas de los hongos.

Resultados



Fig 2. *Cándida sp.* 40 x

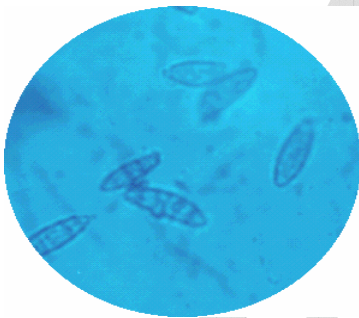


Fig.1. *M. gypseum.* 40 x

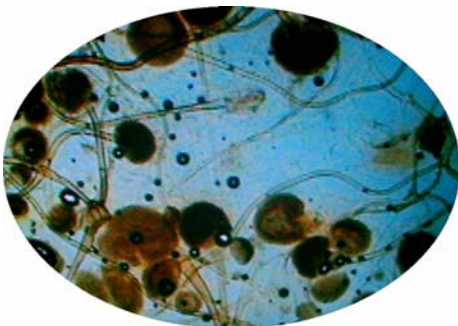


Fig. 3. *Rhizopus sp.* 40 x

En las figuras 1,2 y 3 se observan las cepas de hongos que se estudiaron con la tinción natural.

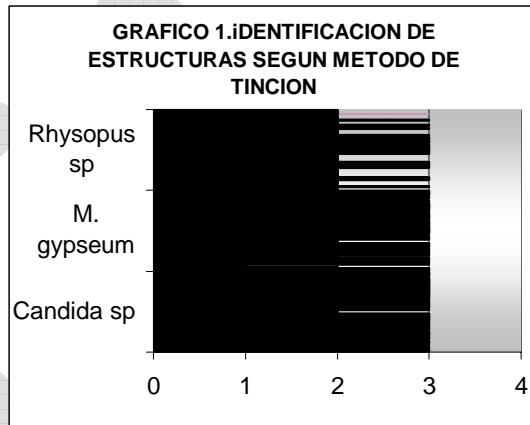
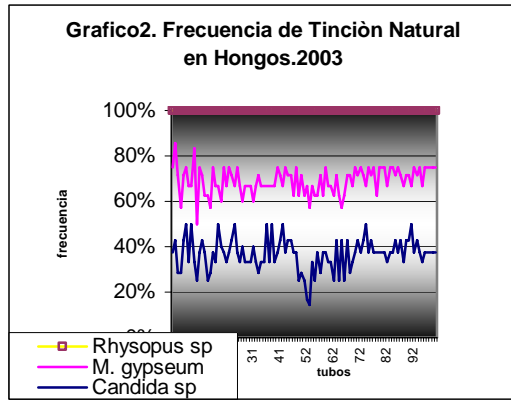


Grafico 1. Identificación de estructuras morfológicas por método natural y tradicional.

En el grafico 1 se observa la identificación de las estructuras morfológicas de las tres cepas, según método tradicional y natural es similar su identificación. (P=0.01)



En el grafico No 2 se observa que las tres cepas *Rhysopus sp*, *M. gypseum* y *Cándida sp*. Su identificación esta en los rango de estimación del 0.01 .

Cuadro 1
Diferencias entre la tinción
tradicional y tinción natural de micosis.
2003. n=200.

Tinción	Rhyso	Cándida	Gypseu	+	-
Tradici	98	100	100	98	2
Natural	97	100	100	97	3
Diferen	1	-	-	-	-
Tradici	-	-	-	-	-
Natural	1	-	-	-	1

En el cuadro No 1 se tiene que de las 200 muestras no hay mucha diferencia entre el método tradicional y el método de tinción natural. Se tiene que de las 100 muestras positivas las micosis de *Rhysopus sp* el 97 % se identifica su morfología microconidias e hifas. El resto *Cándida sp* y *M. gypseum* si lo tiñe en un 100 %.

Cuadro No 2
Comparación estadística entre ambos
métodos: tradicional y Natural. N=200
2003.

Método	Positivas	Negativas	Total
			+
Tradicional	98	2	98
Natural	97	3	97

En el cuadro No 2 la diferencia es mínima entre la comparación de ambos métodos. Por la prueba de **t-student** se tiene que las diferencias no son significativas (**P=0.029**), por el Chi 2 es 1.05 (**P=0.001**) con 9 grados de libertad. Se puede decir que el 100 por ciento de los frotis se puede identificar la morfología estructural del genero y especie. Ver figuras 1,2,3.

Discusión

En la revisión de la literatura a nivel Nacional e Internacional, no se ha encontrado ningún documento relacionado con la utilización de la planta natural *Indigofera sp* (añil) como reactivo para la tinción de pruebas de laboratorio en micología medica , en las principales enfermedades producidas por hongos en tiña corporis, tiña pedís, tiña capitis, tiña cruris entre otros y candidiasis vaginal u oral.

El nuevo método de tinción se puede producir y comercializar a un costo bajo en



el mercado nacional e internacional, además de que por su importancia y relevancia a nivel macro en los aspectos relativos de beneficio a la población, salud, económico y práctico.

Si comparamos los precios del mercado competitivo, los reactivos son importados de otros países a costos económicos elevados, en comparación a la tinción natural resulta económico y de igual calidad. La nueva tinción crea efecto de película negativo en el caso de *Rhizopus sp*, a bajas concentraciones de igual manera tiñe las estructuras de los hongos, tales como: **cándida sp, y M. gypseum.**

Al comparar la tinción tradicional con el lactofenol azul algodón y la tinción *Indigofera tinctoria*, se tiene que el margen de error es del 0.01 %, lo cual es significativo.

Su importancia médica y de laboratorio se considera que es única y trascendental, porque las enfermedades causadas por hongos son de consulta diaria a nivel hospitalario y de Unidades de Salud, así como en la consulta privada; al tener muestras de lesiones de piel y cultivarlas, se puede realizar un diagnóstico rápido de laboratorio sobre el género y especie en término de 5 minutos. El paciente puede ver

su beneficio al prescribirlas un buen tratamiento antimicótico.

El añil desde la colonia ha sido muy utilizado en la Industria química, para tejidos, tintes entre otros, pero dado las características de ser natural, permite que en condiciones naturales el hongo pueda ser coloreado con facilidad y evidenciar su morfología de levaduras, hifas, macroconidias, microconidias según sea su género y especie a estudiar. La sensibilidad del método es alta, su significancia estadística es mayor por lo que se acepta la hipótesis de investigación y rechaza la hipótesis nula.

Conclusiones

Al utilizar el método de tinción natural el 100 % de las estructuras morfológicas del hongo se colorean. ($p=0.01$).

Las cepas de hongos, como ***Rhizopus sp*, *Cándida sp* y *M. gypseum*** permite la coloración en condiciones naturales, ya que no se utiliza producto sintético.

Al comparar ambos métodos se considera que tiene alta significancia estadística, con un margen de error de 0.01 entre el método tradicional y el método natural.



Agradecimientos al Centro Nacional de Registros por permitirnos participar en el concurso, así como el apoyo de docentes y estudiantes de la Universidad de El Salvador.

Referencia Bibliográfica.

1. Basualdo, J.A. et al. Microbiología médica. Edit. Atlante. Buenos aires. 1996.
2. Rippon. J. W. Micología Médica. 16 edic. Manual Moderno. 1999.
3. 1998. MSPAS. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
4. leuny A. Encyclopedia of common Natural Ingredient Used in food, drugs and cosmetic New Cork. 1980
5. Stanley C. Lista preliminar de la plantas en el Salvador. Labor. De agricultura. El Salvador.1989
6. German. J. Farmacotecnia Teoria y Practica. Tomo VII . edit. Continental.1999