

EVALUACION ANTIMICOTICA DE LA VIOLETA DE GENCIANA Y DEL MICOSTATIN SOBRE LAS LEVADURAS *

GARDINI TUESTA, W. E.; VELASQUEZ, J. H.; VELAZCO, CORSINA Y
CANALES, NANCY **

En la actualidad el diagnóstico y la terapéutica de las infecciones a hongos levaduriformes patógenos es objeto de mayor atención por los investigadores (1, 6, 7, 9, 10, 16, 17).

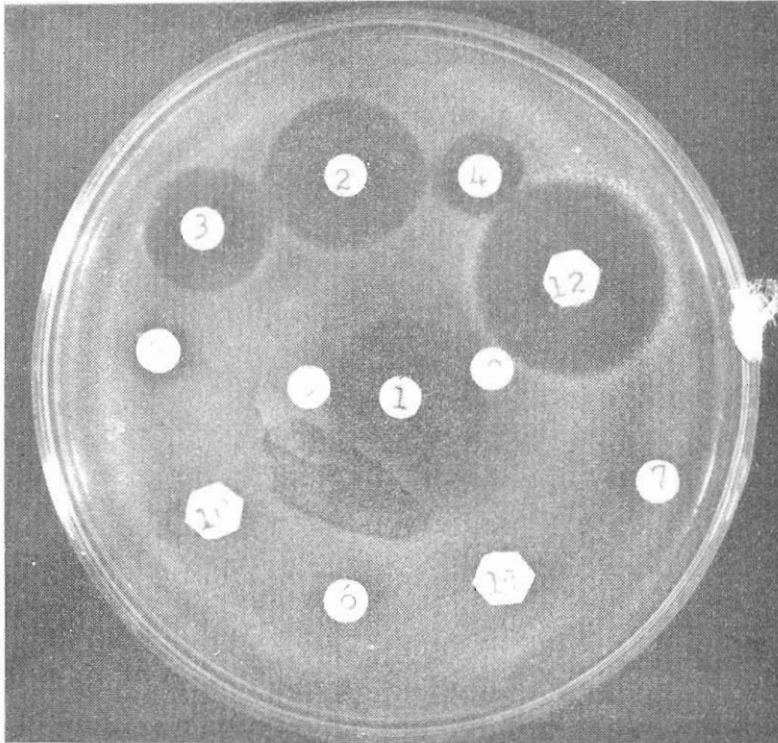
En nuestro medio, las infecciones genitales a levaduras patógenas es frecuente, debida al tratamiento de las infecciones bacterianas con antibióticos de amplio espectro (4, 6, 16). Otros autores han señalado este efecto y las condiciones hormonales como los desencadenantes de la moniliasis (2, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 18, 19, 20).

En los laboratorios de diagnóstico se tiende a poner en práctica el uso del Micostatin en discos para evaluar su sensibilidad en presencia de levaduras procedentes de cada infección; sin embargo, no se conocen referencias similares acerca de la violeta de genciana, a pesar de su uso difundido en la terapéutica.

El objeto del presente trabajo es el de proporcionar al laboratorista un método de valor práctico para determinar la sensibilidad de las levaduras a la violeta de genciana en discos y hacer conocer el efecto antimicótico de las dos sustancias que se estudian frente a levaduras procedentes de infecciones genitales.

* Trabajo presentado al Primer Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología, Fac. Med. de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa (Perú). Oct. 1964.

** Del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U. N. M. S. M.

EFFECTO INHIBITORIO DE LA VIOLETA DE GENCIANA Y DEL MICOSTATIN EN DISCOS, EN LA CEPA N° 1114.

Violeta de Genciana: (1) = 10mcg, (2) = 5mcg, (3) = 2.5mcg, (4) = 1.25mcg, (5) = 0.625 mcg, (6) = 0.3125 mcg, (7) = 0.1562mcg, (8) = 0.0781, (9) = 0.0395mcg.

Micostatin: (12) = 100U, (11) = 50U, (10) = 25U.

MATERIAL Y METODOS

Se estudian 100 casos de hongos levaduriformes, en su mayoría a *Candida albicans*, procedentes de infecciones vaginales en mujeres adultas no tratadas con micostatin ni violeta de genciana. El aislamiento de las levaduras, a partir de las secreciones vaginales, se realizó en agar Sabouraud con 0.2 mg. de cloromicetina por cc. La identificación morfológica de las levaduras se hizo por la observación de clamidosporas y pseudofilamentos y la tipificación serológica por la prueba de

la aglutinación en lámina, usando antisuero *C. albicans*, Difco (15). No se efectuó la prueba de la asimilación del carbono ni la fermentación de los carbohidratos.

Cuadro Nº 1 Actividad del Micostatin en discos sobre 100 cepas de levaduras

Conc/Disco de Unidades	I N H I B I C I O N en %			
	Completa + 10mm. Ø	Fuerte 8-9mm. Ø	Débil 6-7mm. Ø	Nula
100	100	0	0	0
50	51.40	40.00	0	8.59
25	4.49	13.61	6.40	75.50

La acción antifúngica de la violeta de genciana fue determinada comparativamente con la del micostatin. Para los ensayos con la violeta de genciana se prepararon 9 series de discos con cantidades decrecientes del colorante: 10 mcg. 5mcg. 2.5 mcg. 1.25 mcg. 0.625 mcg. 0.3125 mcg. 0.1562 mcg. 0.0781 mcg. 0.0395 mcg.; y 6 diluciones en tubos en progresión geométrica de 1:10,000 a 1:320,000, mientras que, para las experiencias con el micostatin se usó únicamente en discos (Difco) de 25, 50 y 100 Unidades.

En la preparación de los discos se empleó papel secante de 1 mm. de espesor y 6 mm. de diámetro cortados con perforador de papel y con capacidad de absorción de 0.2 cc. del colorante. Después que los discos de papel fueron impregnados con cada concentración, se esterilizaron en autoclave a 121°C X 15 minutos y posteriormente fueron desecados a 40°C en estufa. Para la prueba de la sensibilidad, se preparó el inóculo emulsionado en 1 cc. de caldo Sabouraud 3 colonias de levaduras de 7 días de desarrollo a 25°C, el que fue vertido en una placa estéril a la cual se agregó después el agar de Sabouraud licuado. Sobre la superficie solidificada se colocaron los discos de violeta de genciana y del micostatin en forma equidistante presionándolos ligeramente para facilitar su adherencia. La lectura del efecto inhibitorio se hizo después de dejar el cultivo con los discos, 48 horas a 37°C y 72 horas a temperatura del laboratorio, registrándose los resultados en milímetros de diámetro y considerando como completa inhibición a más de

10 mm., como fuerte inhibición de 8 á 9 mm., como débil inhibición de 6 a 7 mm. e inhibición nula cuando se observaba el desarrollo de las levaduras alrededor del disco.

Para las diluciones en tubos se usó el caldo de Sabouraud como solvente del colorante, se repartieron las respectivas concentraciones en cantidades de 1 cc. autoclavándolas a 121°C por 15 minutos. El inóculo se preparó en forma similar a la empleada para la prueba con los discos y la siembra se realizó agregando 0.1 cc. de éste a cada centímetro cúbico de las diferentes diluciones. Los tubos sembrados se llevaron a 37°C por 48 horas y 72 horas 25°C y, posteriormente, se vertieron sobre las placas estériles a las cuales también se agregó el agar de Sabouraud. La acción inhibitoria de la violeta de genciana se apreció por el recuento de las colonias después de incubar la nueva siembra a 37°C por 48 horas y a 25°C por 72 horas, registrándose como completa inhibición cuando no había desarrollo de colonias, como fuerte inhibición al desarrollo de menos de 50 colonias, como débil a más de 100 colonias y como inhibición nula al desarrollo de colonias incontables.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro N° 1, se muestra la actividad del micostatin en discos sobre 100 cepas de levaduras. El efecto se expresa en milímetros y grados de inhibición. Se observa que el 100% de las cepas son sensibles a 100 Unidades de micostatin, el 51.40% a 50 U y sólo el 4.49% a 25 U. El porcentaje de cepas resistentes alcanzó sólo el 8.59% con 50U, mientras que con 25U, las cepas resistentes aumentaron al 75.50%.

En el Cuadro N° 2, la actividad de la violeta de genciana en discos se expresa igualmente en milímetros y grados de inhibición. La inhibición fue completa en el 100% de cepas con 10 mcg. del colorante. Con 5 mcg. la inhibición fue completa en el 96.30%, fuerte en el 3.70% y ausente en la inhibición débil. Con 2.5 mcg., la inhibición completa alcanzó el 75% de las cepas, la fuerte al 17.30% y la débil al 5.77%, pero se empezó a observar la presencia de cepas resistentes en 1.93%. El porcentaje de cepas sensibles a 1.25 mcg. fue todavía del 82.70%, considerando la inhibición completa que alcanzó a 19.26%, la fuerte a 51.90% y la débil a 11.54%. El porcentaje de cepas resistentes aumentó por debajo de 1.25 mcg. hasta alcanzar el 100% con 0.0781 mcg.

En la fotografía se muestran los grados de inhibición de las diferentes concentraciones de la violeta de genciana y del micostatin en discos, frente a una cepa sensible. Los discos del 1 al 9 corresponden a concentraciones de violeta de genciana donde puede apreciarse que

Cuadro N° 2 Actividad de la Violeta de Genciana en discos sobre 100 cepas de levaduras

Conc/Disco en mi- crogramos	INHIBICION en %			
	Completa + 10mm. Ø	Fuerte 8-9mm. Ø	Débil 6-7mm. Ø	Nula
10	100	0	0	0
5	96.30	3.70	0	0
2.5	75.00	17.30	5.77	1.93
1.25	19.26	51.90	11.54	17.30
0.625	1.92	22.78	29.85	45.45
0.3128	0	5.77	26.80	67.43
0.1562	0	0	5.67	94.43
0.0781	0	0	0	100
0.0390	0	0	0	100

la inhibición completa se produce en los discos 1 y 2, la inhibición fuerte con el disco 3 y la débil con los discos 4 y 5 equivalentes éstos a la concentración de 1.25 y 0.625 mcg. respectivamente. Los discos 10, 11 y 12 corresponden a concentraciones diferentes del micostatin, habiendo presentado inhibición completa sólo el disco 12 equivalente a 100 unidades de micostatin, mientras que, los de 25 y 50 unidades no presentaron inhibición alguna.

Cuadro N° 3 Actividad de la Violeta de Genciana en diluciones sobre 100 cepas de levaduras

Conc/tubo	INHIBICION en %			
	Completa 0—colonias	Fuerte —50 colo- nias	Débil +100 co- lonias	Nula colonias incontables
1/10,000	100	0	0	0
1/20,000	88.14	8.48	1.69	1.69
1/40,000	59.33	23.73	1.69	15.25
1/80,000	13.59	33.96	18.66	33.79
1/160,000	1.69	13.56	6.75	78.00
1/320,000	0	11.86	5.09	83.05

En el Cuadro Nº 3, se muestra la actividad de la violeta de genciana por el método de la dilución en tubos a partir de 1:10,000, que es la concentración terapéutica recomendada. Los grados de inhibición se aprecian por la ausencia o por el desarrollo de las colonias resistentes a cada dilución y en los resultados se consigna el número de cepas afectadas por la acción del colorante en porcentaje. Se observa que a la dilución de 1:10,000 el efecto inhibitorio es completo o máximo en el 100% de las cepas; a partir de la dilución de 1:20,000 la actividad del colorante va disminuyendo hasta que, a una dilución de 1:160,000 la inhibición es completa o máxima sólo en el 1.69%, la inhibición es fuerte en el 13.56%, la inhibición es débil en el 6.75% y es nula en el 78%. Por debajo de la dilución de 1:160,000 la actividad del colorante es insignificante.

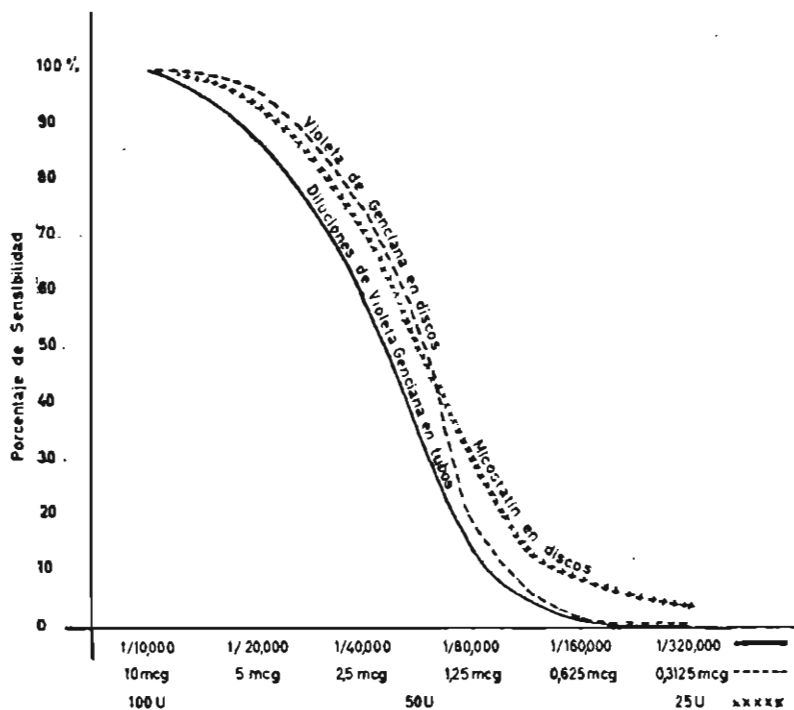
En el Gráfico Nº 1, se representa la inhibición máxima comparativa del micostatin y de la violeta de genciana por el método de discos y diluciones en tubo, basado en los resultados de la inhibición completa de los mismos (Cuadros Nº 1, 2 y 3). Puede apreciarse que éstos antimicrobóticos en las concentraciones indicadas en nuestro trabajo, se comportan similarmente en cuanto a su actividad inhibitoria.

En el Gráfico Nº 2, se muestra la inhibición media de los mismos antimicrobóticos, dada por la suma de la acción inhibitoria fuerte y completa. Por los resultados, se observa que hay también un paralelismo en cuanto a sus efectos sobre las levaduras.

Un hecho a señalar en este trabajo es el de haber encontrado una equivalencia de efectos inhibitorios entre el micostatin y la violeta de genciana sobre las levaduras, con las concentraciones señaladas en los Cuadros Nº 1, 2 y 3. Asimismo, se ha podido establecer, con cierta exactitud una concentración inhibitoria máxima de 10 mcg. y otra mínima de 0.625 mcg. de violeta de genciana por disco, que corresponden a los efectos de 100 y 25 Unidades de micostatin por disco, respectivamente.

No obstante que las cepas estudiadas no representan un número suficiente para una mejor evaluación de la actividad de los dos antimicrobóticos, puede recomendarse la concentración máxima y mínima de la violeta de genciana por disco para su uso en la práctica de las pruebas de susceptibilidad antifúngica.

GRAFICO N° 1



INHIBICION MAXIMA DEL MYCOSTATIN Y DE LA VIOLETA DE GENCIANA
SOBRE 100 CEPAS DE LEVADURA.

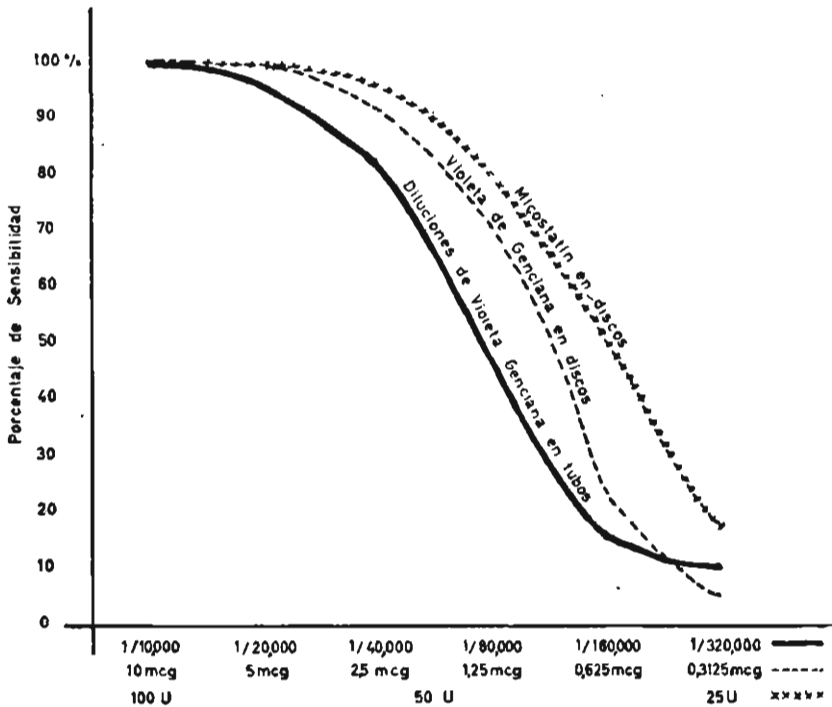
CONCLUSIONES

Se ha encontrado equivalencia de los efectos de inhibición máxima y media "in vitro" sobre las levaduras, principalmente entre las concentraciones de 100 y 25 Unidades de micostatin con las de 10 mcg. y 0.625 mcg. de violeta de genciana, empleando discos.

Todas las cepas procedentes de infecciones vaginales no tratadas fueron sensibles a 100 U de micostatin y a 5 y 10 mcg. de violeta de genciana,

Las cepas resistentes se presentaron en las concentraciones bajas, a partir de 50 U de micostatin (8.59%) y 2.5 mcg. de violeta de genciana (1.93%).

GRAFICO N° 2



INHIBICION MEDIA DEL MYCOSTATIN Y DE LA VIOLETA DE GENCIANA SOBRE 100 CEPAS DE LEVADURA.

Se recomienda la concentración máxima de 10 mcg. y la mínima de 0.625 mcg. de violeta de genciana en disco para la prueba de susceptibilidad antifúngica.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguero, O. y Feo, M.: Candidiasis vaginal y embarazo (200 casos). Rev. Obst. Gin. (Venezuela), 23: 95-117. 1963.
2. Bernard, J.; Chavelet, F. y Mathe, G.: Recherche des facteurs étiologiques favorisant la surinfection a *Candida albicans* dans les hémopathies malignes. Etude portant sur vingt-deux observations. Journées de Mycologie Médicale (14-15 Déc. 1956). Paris, Ed. L'Expansion Scientifique Française.
3. Brown, C.; Propp, S.; Guest, C. M.; Beebe, R. T. y Early, L.: Fatal fungus infections complicating antibiotic therapy. J. A. M. A., 152: 206-207. 1953.
4. Burstein de Herrera, Sonia y Domínguez Navarrete, N.: Estudios en 3000 urocultivos. Primer Congreso Nacional de Microbiol. y Parasitol., Fac. Med., U. N. San Agustín (Arequipa). Oct. 1964.
5. Caplan, H.: Monilial (*Candida*) endocarditis following treatment with antibiotics. Lancet, 269: 957-958. 1955.
6. Castilla Espinoza, R. F.: Estudio clínico, bacteriológico, parasitológico del flujo vaginal en la post-menopausia. Tesis Bach, Fac. Med., U. N. M. S. M. (Lima). 1963.
7. Daftary, S. N.; Daftary, V. G.; Purandare, B. N. y Masani, K. M.: Vulvovaginal moniliasis (*Candidiasis*) in pregnancy. Obstet, Gynec., 21: 206-209. 1963.
8. Drouhet, E.: Biologie des infections a *Candida*. 2. Sur les manifestations pathologiques et les conditions etiologiques et pathogéniques de 175 cas de Candidose. Journées de Mycologie Médicale (14-15 Déc. 1956). Paris, Ed. L'Expansion Scientifique Française.
9. Drouhet, E.: Traitement des infections mycosiques a *Candida albicans* par un nouvel antibiotique antifongique: la Nystatine. Presse Médicale (Paris), 63 (30): 620-623. 1955.
10. Dubos, R. J.: Bacterial and Mycotic of man. 3ª ed., J. B. Lippincott Co. (Philadelphia). 1958.
11. Harrell, E. R. y Thompson G. R.: Systemic candidiasis (Moniliasis) complicating treatment of bacterial endocarditis. Ann. intern. Med., 48: 207-215. 1958.
12. Justin-Besançon, L.; Cornet, A.; Barbier, P. y Meurgue, G.: Manifestations digestives a *Candida* après antibiothérapie. Journées de Mycologie Médicale (14-15 Déc. 1956). Paris, Ed. L'Expansion Scientifique Française.
13. Krylov, L. M.: Experimental Moniliasis of Digestive Mucosa. Jurnal Mikrobiologii, Epidemiologii e Immunologii (Moscú), 12: 89-93. 1964.
14. Kubista, R. A. y Derse, P. H.: A comparison of triacetin and nystatin with respect to their stability and effect on *Candida albicans*. Antib. & Chemo. 9: 546-549. 1959.
15. Manual Difco, 9a ed. Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan. 1953.
16. Quiroz Battistini, M. A.: Moniliasis vulvovaginal. Estudio clínico basado en la observación de 543 casos. Tesis Bach., Fac. Med., U. N. M. S. M. (Lima). 1952.

17. Segretain, G.; Drouhet, E. y Mariat, F.: *Diagnostic de Laboratoire en Mycologie Médicale*. Editions de la Tourelle, St- Mandé (Seine), Paris. 1958.
18. Seligman, E.: Virulence enhancement of *Candida albicans* by antibiotics and cortisone. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 83: 778-781. 1953.
19. Sharp, J. L.: The growth of *Candida albicans* during antibiotic therapy. *Lancet*, 266: 393-395. 1954.
20. Woods, J. W.; Manning, I. H. y Patterson, C. N.: Monilial infections complicating the therapeutic use of antibiotics. *J. A. M. A.*, 145: 207-211. 1951.