

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”: funciones y retos

Dr. Carlos Manuel Fernández Andreu,¹ Dr. Gerardo Martínez Machín,² Lic. Mayda R. Perurena Lancha,³ Dra. María Teresa Illnait Zaragoza⁴ y Lic. Ileana Valdés Hernández⁵

RESUMEN

Se hizo una reseña sobre la colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, la cual fue creada en 1980 en respuesta a las crecientes necesidades del entonces recién establecido laboratorio de Micología de esa institución. Las colecciones de cultivos microbianos adquieren cada día mayor importancia como vía para la conservación *ex situ* de la biodiversidad microbiana; son las encargadas de coleccionar, guardar, identificar y preservar aquellas cepas que resulten de interés para las investigaciones biomédicas, la docencia, la industria, la agricultura, etc. En estos momentos la colección del instituto conserva un total de 262 cepas pertenecientes a 81 especies de hongos, actinomicetos y algas, todas de interés para la Micología Médica. Los principales métodos para el mantenimiento de los cultivos han sido la conservación en agua destilada y la liofilización, además de los repiques periódicos en medios agarizados, la refrigeración y la congelación. Entre las principales funciones desarrolladas por esta colección se encuentran: el servicio de referencia y control de calidad, la identificación de cepas, la docencia, los estudios taxonómicos y la custodia, entre otras. En la actualidad las colecciones de cultivos de hongos deben enfrentar el reto que representan los hongos patógenos emergentes, así como también la incorporación de técnicas moleculares que confirmen la calidad de los métodos de preservación de las cepas. Estas colecciones deben desempeñar un importante papel estratégico en la preservación de la biodiversidad teniendo en cuenta, además, aspectos legales y de bioseguridad.

Palabras clave: Colecciones de cultivos microbianos, micotecas, hongos.

El uso de los microorganismos en el enfrentamiento y la solución de los grandes problemas actuales de la humanidad, como son los relacionados con la salud humana y animal, la agricultura y la alimentación, la obtención de formas no convencionales de energía, el saneamiento y conservación del medio ambiente, entre otros, ha alcanzado un incremento considerable en el mundo entero, principalmente en los países desarrollados.¹

Las colecciones de cultivos microbianos adquieren cada vez mayor importancia como mecanismos o vías para la conservación *ex situ* de la biodiversidad y representan un importante elemento estratégico y económico para el desarrollo de las investigaciones científicas, con particularidad en las ramas biotecnológicas y biomédicas. Estas colecciones son las encargadas de coleccionar, identificar, guardar y preservar aquellas cepas aisladas por primera vez, las cepas manipuladas genéticamente, las cepas tipo de

cada especie, mutantes, cepas causantes de epidemias, cepas de importancia industrial y otros microorganismos útiles o perjudiciales, de manera sistemática y organizada.²

En el caso de las colecciones de cultivos de hongos, también llamadas *micotecas*, se cumplen las mismas normas generales de otras colecciones de cultivos.³ La gran diversidad genética en el reino de los hongos ha motivado una justificada preocupación por su conservación desde hace varios años.⁴ Se considera que el número de microorganismos formalmente nombrados y aceptados es de unas 150 000 especies (cifra bastante conservadora según algunos investigadores); de estas, los hongos comprenden alrededor de la mitad, mientras que las algas y los protozoos representan entre 20 y 25 % de las especies. Las bacterias y los virus contribuyen con menos de 5 % cada uno. Estas cifras crecen constantemente: unas 1 700 especies de hongos se describen anualmente, mientras que entre las bacterias este incremento es de aproximadamente 120 cada año.⁵ Otros autores estiman que existen cerca de 1 500 000 especies de hongos, de las cuales solo se ha descrito 5 % y se encuentra depositado en colecciones solo 0,8 % del total estimado.⁶ En el Centro Mundial de Datos de Microorganismos (WDCM, siglas en inglés) existe información de más de un millón de cepas de microorganismos conservados en 471 colecciones distribuidas, de manera muy desigual, en los 5 continentes; de este total, 44 % son hongos, lo que permite inferir acerca de la importancia de este grupo dentro del mundo microbiano.¹

Posiblemente la principal tarea común a todos los laboratorios de micología, independiente de su perfil, sea la conservación adecuada de los cultivos de hongos *ex situ*. En todas, el trabajo debe regirse por ciertas normas o principios básicos: a) todos los cultivos deben conservarse *vivos*; b) deben mantenerse en estado de *pureza*; c) cada cepa debe mantenerse *fiel* a su tipo; d) cada cepa debe conservarse al menos por 2 métodos (uno de ellos debe ser la liofilización) y e) en el caso de los patógenos, debe conservarse también sus *atributos patogénicos*.

La micoteca del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) fue creada en 1980 como respuesta a las crecientes y cada vez más complejas tareas de investigación que debía emprender el laboratorio de micología de esta institución como centro nacional de referencia. En un inicio esta colección se nutrió de cepas procedentes de instituciones extranjeras, así como también de aislamientos clínicos y ambientales obtenidos en el país.

En esta colección, el criterio de selección de las cepas se ha basado fundamentalmente en la patogenicidad para el hombre, de ahí que 84,7 % de las cepas procedan de muestras clínicas. Esta colección de cultivos cuenta entre sus fondos con los hongos causantes de las micosis más importantes que afectan al hombre, algunas hasta ahora nunca reportadas en Cuba. Entre los responsables de micosis superficiales se encuentran los agentes de la tiña negra y la piedra blanca; se incluyen diversas especies de dermatofitos causantes de micosis cutáneas como las tiñas en el hombre y los animales. Están representados también los agentes de las micosis subcutáneas (cromomicosis, esporotricosis, micetomas y feohifomicosis), los agentes de las micosis sistémicas (histoplasmosis, blastomicosis, paracoccidioidomicosis) y de las principales micosis oportunistas (candidiasis, criptococosis, aspergilosis y mucormicosis). También forman parte de la colección algunas especies de los llamados “contaminantes”, los cuales pudieran tener alguna potencialidad patogénica, especialmente en la creciente población

de individuos inmunocomprometidos, asociados en su gran mayoría a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.

El objetivo general de esta colección ha sido la conservación, con la adecuada viabilidad, caracterización y pureza, de todos aquellos cultivos que resulten de interés para la Micología Médica, tanto para la referencia y el diagnóstico de las micosis como para la docencia, la investigación y los servicios.

Aunque en Cuba existen otras importantes colecciones de cultivos de microorganismos,^{7,8} la colección de cultivos de hongos del IPK es única en su tipo en el país, porque la integran un total de 262 cepas pertenecientes a 81 especies microbianas, incluida la mayoría de las especies causantes de micosis en el hombre (tabla).

Tabla. Número de especies y cepas depositadas en la Colección de Cultivos de Hongos Patógenos del IPK

Grupos de microorganismos	No. de especies (%)	No. de cepas (%)
Hongos filamentosos	54	141
Levaduras	19	107
Subtotal (hongos)	73 (90,1)	248 (94,6)
Actinomicetos	7 (8,6)	13 (4,9)
Algas	1 (1,2)	1 (0,4)
Total	81	262

Como se observa en la tabla, 94,6 % de las cepas y 90,1 % de las especies conservadas corresponden a hongos filamentosos y levaduras. Sin embargo, resulta también de interés para los laboratorios de micología médica el estudio y por consiguiente la conservación de los actinomicetos aerobios. A pesar de que hoy está bien establecida su ubicación taxonómica entre las bacterias, estos microorganismos son capaces de producir en el hombre cuadros clínicos semejantes a los causados por los hongos verdaderos o eumicetos. Entre estas afecciones, las más frecuentes son los actinomicetomas y las infecciones pulmonares causadas por especies de los géneros *Nocardia*, *Actinomadura* y *Streptomyces*.⁹

Una situación similar se presenta con las algas aclorofiladas del género *Prototheca*, las cuales son causantes de las prototecosis (también llamadas algosis) que clínicamente evolucionan de manera similar a algunas micosis subcutáneas. Se conocen al menos 3 especies patógenas de este género: *P. zopfii*, *P. stagnora* y *P. wickerhamii*.⁹

De las cepas de la colección 50,7 % son autóctonas y 49,3 % son importadas. Entre las primeras, 84 % corresponde a aislamientos clínicos, es decir, procedentes de diferentes procesos patológicos en humanos. El resto, 16 %, pertenece a cepas ambientales, con alguna potencialidad patogénica, en la mayoría de los casos. Los datos referentes a cada una de las cepas se encuentran recogidos en fichas y una base de datos computadorizada de fácil acceso.

Uno de los problemas que más se presenta en el funcionamiento de una micoteca es precisamente el de la conservación adecuada de los cultivos de hongos con sus

características fenotípicas y genotípicas originales. En la actualidad se utilizan diversos métodos de conservación, los cuales dependen por una parte de las especies que se desean mantener y por otra, de los recursos disponibles. No todos los métodos son igualmente exitosos para las distintas especies, por lo que se recomienda emplear en cada caso los métodos que hayan probado ser los más adecuados de acuerdo con las características de cada especie.¹⁰

Los métodos empleados para la conservación de las cepas en esta colección han sido: repiques o pases periódicos en medios agarizados, la refrigeración, la congelación (-20 y -70 °C), el cultivo en agua destilada esterilizada y la liofilización. Los que mejores resultado han mostrado han sido los 2 últimos.

El término "cultivo en agua" fue propuesto por Castellani hace más de 4 décadas y se considera válido porque se ha comprobado que realmente existe cierto crecimiento del hongo, aunque muy restringido, en estas condiciones. En el laboratorio del IPK, este ha sido el método más empleado para la conservación del cepario. Desde hace 25 años se conservan en agua destilada los cultivos de las primeras cepas, pertenecientes a diferentes especies de dermatofitos, los cuales han mantenido su viabilidad y pureza. Entre las ventajas de este método está su bajo costo, simplicidad y eficiencia, además de evitar el ataque de los ácaros.^{11,12}

La liofilización se considera el mejor método para la conservación de cultivos con sus características originales, al menos teóricamente. Ha sido empleado en nuestra colección para el mantenimiento tanto de levaduras como de hongos filamentosos. Hoy día, este es el método más empleado por las grandes colecciones debido a sus reconocidas ventajas. Por ejemplo, la colección del *International Mycological Institute*, del Reino Unido, posee unas 8 000 especies liofilizadas en más de 120 000 bulbos.¹⁰ Su principal inconveniente es que requiere de un equipamiento especial y es un proceso más complejo que los anteriores. Sin embargo, en nuestras condiciones, la liofilización no ha mostrado ser igualmente satisfactoria para todas las especies de hongos; los que producen grandes conidios o no producen ninguno son los menos favorecidos por este método. Por otra parte, en el caso particular de los agentes de micosis sistémicas (*Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Penicillium marneffei*), se requieren precauciones adicionales debido al riesgo biológico que representa la posible formación de aerosoles durante el proceso.¹³

Entre las ventajas de este método se pueden señalar: a) los hongos pueden conservarse durante años, b) se conservan en bulbos de vidrio resistente, pequeños, fáciles de almacenar, transportar y distribuir, c) se evita la contaminación, d) se conservan las propiedades morfológicas y bioquímicas originales y e) es un método muy exitoso en levaduras y en hongos filamentosos con abundante esporulación.

Para los hongos patógenos también han sido empleados otros métodos como son la conservación en sílica gel, en tierra estéril, en aceite mineral y en nitrógeno líquido.¹⁴⁻¹⁶ Sin embargo, recién *Ferreti de Lima* y *Borba* encontraron que la conservación en tierra y en aceite mineral podía afectar la viabilidad, la capacidad de esporulación y el dimorfismo en *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* y *Sporothrix schenckii*.¹⁷

Durante todos estos años, la Colección de Cultivos de Hongos Patógenos del IPK ha realizado las funciones siguientes:

- Referencia para el diagnóstico de las micosis y control de calidad.
- Docencia de micología médica, tanto de pregrado como de posgrado.
- Investigaciones.
- Estudio de cepas de importancia epidemiológica, en particular de *H. capsulatum*, responsable de brotes de histoplasmosis en diferentes regiones del país.
- Estudios taxonómicos. La conservación adecuada de la colección ha permitido emprender estudios taxonómicos más profundos, particularmente entre las levaduras de los géneros *Candida* y *Cryptococcus*.
- Montaje de técnicas serológicas.
- Servicio de identificación de cepas a solicitud de otras instituciones.
- La micoteca ha sido fuente de información acerca de amplios y diversos aspectos como son métodos de conservación, medios de cultivo, taxonomía e identificación de hongos entre otros.
- Custodia de cepas de interés de otras instituciones.

Desde finales del siglo pasado se han reportado, cada vez con más frecuencia, casos de infecciones causadas por los llamados *hongos patógenos oportunistas emergentes*, que son aquellas especies hasta ahora no reconocidas como patógenas o cuya significación patogénica no había sido probada.¹⁸⁻²⁰ Estas nuevas especies ya suman más de 300, situación que se convierte en un verdadero reto para los laboratorios de micología en general, y para las colecciones en particular, y obliga a un esfuerzo adicional, tanto en la capacitación del personal como en la búsqueda de recursos materiales y financieros.¹⁸ Entre estos nuevos patógenos se encuentran hongos muy diversos: especies ambientales, especies empleadas en el control biológico de plagas agrícolas, basidiomicetos para los cuales no se conocen las condiciones óptimas para su cultivo *in vitro* e incluso especies como *Pneumocystis jiroveci* (*P. carini.*), de reciente incorporación en el reino de los hongos.^{9,21-24}

Por otra parte, cada día se hace más evidente la necesidad de incorporar técnicas moleculares que confirmen la preservación de la identidad de las cepas conservadas como uno de los principios básicos de las colecciones microbianas.^{1,19,25}

En aspectos legales y de bioseguridad relacionados con la adquisición, utilización y traslado de cepas entre colecciones o entre diferentes instituciones, en un mismo país o en diferentes países también se ha avanzado recién, aunque aún quedan muchos aspectos sobre los cuales no existe aceptación unánime y resulta necesario consolidar y unificar criterios.^{8,26}

En los últimos años a las colecciones *ex situ* de cultivos microbianos también se les ha dado una responsabilidad adicional. De acuerdo con la Convención sobre Biodiversidad (CBD), adoptada en 1992 y firmada por más de 170 estados, estas colecciones deben desempeñar un importante papel en la preservación, comprensión y utilización de la biodiversidad microbiana del planeta.^{1,26} Teniendo en cuenta la enorme biodiversidad en el reino de los hongos,⁶ es evidente que para aquellas colecciones que conservan estos microorganismos el reto es mucho mayor y requerirá de esfuerzos mancomunados de todas las partes involucradas.

The collection of fungi cultures of “Pedro Kouri” Institute of Tropical Medicine

SUMMARY

A review was made on the collection of fungi cultures of “Pedro Kouri” Institute of Tropical Medicine” that was created in 1980 to give an answer to the increasing needs of the newly established laboratory of Mycology of that institution at that time. The collections of microbial cultures are more important every day as a way for the *ex situ* conservation of the microbial biodiversity. They are in charge of collecting, saving, identifying and preserving those strains of interest for biomedical research, teaching, industry, agriculture, etc. At present, the collection of the institute has a total of 262 strains from 81 species of fungi, actinomycetes and algae, all of them of interest for Medical Mycology. The main methods for the maintenance of the cultures have been the conservation in distilled water and freeze-drying, in additions to the periodical mincing in agar media, refrigeration and freezing: The service of reference and control of quality, the identification of strains, teaching, the taxonomic studies, and the safeguard, among others, are some of the main functions developed by this collection. Nowadays, the collections of fungus cultures must face the challenges represented by the emerging pathogenic fungi, as well as the incorporation of molecular techniques confirming the quality of the strain preservation methods. These collections should play an important strategic role in the preservation of the biodiversity, taking into account legal and biosafety aspects, too.

Key words: Collections of microbial cultures, fungi culture collections, fungi.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith D. Culture collections over the world. *Int Microbiol* 2003;6:95-100.
2. Sly LI. Culture Collections World-wide. En: *The biodiversity of microorganisms and the role of Microbial Resource Centres*. Kirshop B, Hawksworth DL ed. Surrey: World Federation for Culture Collections Biodiversity Committee;1994. p. 29-35.
3. Salas J. Micoteca: Conservación en agua. *Acta Med Venezolana* 1968;14:416-7.
4. Hawksworth DL, Sastramihardja I, Kokke R, Stevenson R. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. Kew:World Federation of Culture Collections (WFCC), Simworth Press; 1990.
5. Stackebrandt E. The uncertainties of microbial diversity. En: *The Biodiversity of Microorganisms and the role of Microbial Resource Centres*. Kirshop B, Hawksworth DL ed. Surrey:World Federation for Culture Collections Biodiversity Committee;1994.p. 59-64.
6. Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 2001;105:1422-32.
7. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada. *Rev Iberoam Micol* 1998;15:166-8.
8. Weng Alemán Z, Junco Díaz R, Díaz Rosas OE. Colección de cultivos microbianos. Apuntes sobre su desarrollo. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2003;41. ISSN 0253-1751.
9. Bonifaz A. *Micología Médica Básica*. 2ª. ed., México DF:Méndez ed.; 2000.

10. Smith D, Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. 2nd ed. Surrey: CAB International. IMI Technical Handbook No. 2, 1994.
11. Castellani A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches J Trop Med Hyg 1967;70:181-4.
12. Hartung de Carriles C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. Mycopathologia 1989;106:73-9.
13. De Hoog GS. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. Mycoses 1996;39:407-17.
14. Butterfield W, Jong SC, Alexander MT. Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. Can J Microbiol 1974;20:1665-73.
15. Gentles JC, Scott E. The preservation of medically important fungi. Sabouraudia 1979;17:415-8.
16. Smith D, Onions AHS. A comparison of some preservation techniques for fungi. Trans Br Mycol Soc 1983;81:535-40.
17. Ferreti de Lima R, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. Rev Iberoam Micol 2001;18:191-6.
18. Chabasse D. Les nouveaux champignons opportunistes apparus en Médecine. J Mycol Méd 1994;4:9-28.
19. Murphy A, Kavanagh K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as human pathogen. Implications for biotechnology. Enz Microbiol Technol 1999;25:551-7.
20. Morris-Jones R, Youngchim S, Hextal JM, Gómez BL, Morris-Jones SD, Hay RJ *et al.* *Scytalidium dimidiatum* causing recalcitrant subcutaneous lesions produces melanin. J Clin Microbiol 2004;42:3789-94.
21. Lacaz CS, Heins-Vaccari EM, Takahashi de Melo N, Hernández-Arriagada GL. Basidiomycosis: a review of the literature. Rev Inst Med Trop São Paulo 1996;38:379-90.
22. Kanj SS, Amr SS, Roberts GD. *Ramichloridium mackenziei* brain abscess: report of two cases and review of the literature. Med Mycol 2001;39:97-102.
23. Llovo J, Prieto E, Vazquez H, Muñoz A. Onychomycosis due to *Onychocola canadensis*: report of the first two Spanish cases. Med Mycol 2002;40:209-12.
24. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis 2002;8(9):891-6.
25. Martins- Nishikawa M, Trielles L, Symoens F, Swinne D, Nolard N. Prevalence of *Candida dubliniensis* in the BCCM/IHEM Biomedical Fungi/Yeasts Culture Collection (isolates before 1990). Med Mycol 2002;40:443-5.
26. Symoens F, Nolard N. Biodiversité des microorganismes: aspects legaux et rôle des collections. J Mycol Méd 1999;9:49-51.

Recibido: 15 de julio de 2005. Aprobado: 5 de septiembre de 2005.

Dr. *Carlos M. Fernández Andreu*. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, AP 601, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: cfandreu@ipk.sld.cu

¹ Doctor en Ciencias. Investigador Auxiliar.

² Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

³ Máster en Ciencias. Investigadora Agregada.

⁴ Máster en Ciencias. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Auxiliar.

⁵ Máster en Ciencias. Aspirante a Investigadora.