

Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de *Histoplasma* y *Cryptococcus*

Dr. C. Carlos Manuel Fernández Andreu,¹ MSc. Luis Alberto Díaz Suárez,^{II} Dra. María Teresa Illnait Zaragoz,¹ Ing. Carlos Aragonés López,¹ Dr. Gerardo Martínez Machín,¹ MSc. Mayda R. Perurena Lancha¹

RESUMEN

Introducción: las colecciones de cultivos microbianos son las encargadas de garantizar el material biológico requerido para el desarrollo de las ciencias biológicas. Entre los métodos de conservación de cultivos fúngicos, la inmersión en agua destilada, por su bajo costo y sencillez, constituye una ventajosa alternativa. **Objetivo:** evaluar la utilidad de este método de conservación en los cultivos fúngicos de *Histoplasma* y *Cryptococcus*. **Métodos:** se realizó una evaluación del estado de conservación de las especies de mayor riesgo biológico, pertenecientes a los géneros *Histoplasma* y *Cryptococcus* de la colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Se analizaron 102 cepas conservadas en agua destilada, de las cuales 92 % estaba preservado por más de 10 años. **Resultados:** los porcentajes de recuperación para *H. capsulatum*, *C. neoformans* y *C. gattii* fueron 64,3; 79,1 y 100 %, respectivamente. Se demostró que este método de conservación resulta satisfactorio para cultivos fúngicos en laboratorios de recursos limitados. Se implementó sobre plataforma web una base de datos digital con la información de interés de la colección. Se hizo una valoración de la importancia del estricto cumplimiento de las medidas de bioseguridad para el trabajo de las colecciones, especialmente frente a patógenos de alto riesgo. **Conclusiones:** la conservación de cultivos de hongos en agua destilada es un método de gran utilidad en laboratorios de recursos limitados. El trabajo de las colecciones de cultivos debe considerarse una actividad imprescindible para enfrentar los nuevos retos del desarrollo de las ciencias biomédicas.

Palabras clave: conservación en agua destilada, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, riesgo biológico.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las colecciones de cultivos microbianos han adquirido gran importancia como vía para la conservación *ex situ* de la diversidad microbiana. Tienen la responsabilidad de coleccionar, identificar, guardar y preservar todas aquellas cepas aisladas, de manera sistemática y organizada, con vistas a garantizar el desarrollo de las ciencias biomédicas y biotecnológicas, así como también el de otras esferas de la economía.¹

En el caso de las colecciones de cultivos de hongos, también llamadas micotecas, se cumplen las mismas normas generales de otras colecciones. Su mantenimiento y conservación son elementos esenciales de los estudios de biodiversidad y

sistemática en el reino *Fungi*. Después de los insectos, los hongos constituyen el grupo de organismos más numeroso y diverso, por lo que la labor en este sentido resulta compleja y se requieren diferentes métodos de cultivo y preservación para asegurar la viabilidad, integridad morfológica, fisiológica y genética de los cultivos en el tiempo.¹

La micoteca del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), única de su tipo en el país, conserva los agentes causales de las principales micosis humanas y ha resultado un elemento imprescindible para el desarrollo de las tareas asumidas por el Laboratorio de Micología como centro de referencia nacional, al garantizar todos aquellos procedimientos relacionados con la elaboración y evaluación de medios diagnósticos y medios

¹ Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. La Habana, Cuba.

^{II} Escuela Latinoamericana de Medicina. La Habana, Cuba.

de cultivos, pruebas de susceptibilidad *in vitro*, búsqueda y evaluación de nuevos agentes antifúngicos, así como la actividad docente de pregrado y posgrado.²

Entre los métodos de conservación de cultivos fúngicos, la inmersión en agua destilada estéril ha demostrado ser una técnica que garantiza porcentajes elevados de viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas, lo que unido a su bajo costo y sencillez, la convierten en una ventajosa alternativa para el mantenimiento de estos microorganismos en laboratorios con recursos limitados.³⁻⁷

Un aspecto de vital importancia para el trabajo de las colecciones ha sido el cumplimiento estricto de las normas de bioseguridad. Según los objetivos del Laboratorio de Micología del IPK y de esta colección en particular, en ella se conservan especies responsables de infecciones graves, a veces mortales para el hombre, entre las que se encuentran los agentes de la histoplasmosis y la criptococosis, dos de las micosis sistémicas más importantes en Cuba, por lo que los aspectos relacionados con el riesgo biológico tienen que ser necesariamente tenidos en cuenta.

En el presente trabajo se exponen los resultados de la evaluación sistemática que se realiza en el Laboratorio de Micología sobre el estado de conservación en agua destilada de los cultivos de mayor riesgo biológico de esta colección y se hacen consideraciones sobre su organización y funcionamiento.

MÉTODOS

Se realizó una revisión y actualización del estado de conservación en agua destilada de las cepas pertenecientes a los géneros *Histoplasma* y *Cryptococcus* que forman parte de la Colección de Cultivos de Hongos del Laboratorio de Micología del IPK, para lo cual se evaluó la viabilidad, pureza y estabilidad de las principales características morfológicas y fisiológicas.

Cada cepa se encontraba conservada por duplicado, en tubos de vidrio con 3 mL de agua destilada estéril, con tapas de rosca, ubicados según el número de registro en la colección, a temperatura ambiente en un área restringida dentro del laboratorio. De los cultivos pertenecientes al género *Histoplasma* se transfirieron fragmentos del

micelio a tubos, que contenían agar glucosa de Sabouraud; para las cepas de *Cryptococcus* se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se inocularon en tubos que contenían el mismo medio. Todos los cultivos se incubaron a 28 °C, por un período de 3 a 30 d según la fisiología del microorganismo. Si en este tiempo la cepa no creció o se contaminó, el proceso fue repetido.

La identificación se confirmó según las características morfológicas, macroscópicas (culturales) y microscópicas (examen directo y microcultivo).⁸ Para las cepas de *Cryptococcus* se realizaron pruebas bioquímicas como la asimilación de carbohidratos, hidrólisis de la urea y producción de pigmento en el medio de agar ácido cafeico. Para *H. capsulatum* se verificó su dimorfismo *in vitro* mediante el subcultivo en agar infusión de cerebro y corazón con cisteína a 37 °C. Una vez confirmada la identidad de los cultivos, se prepararon láminas correspondientes a los exámenes microscópicos directos y microcultivos, las cuales fueron selladas, rotuladas y conservadas.

Solo se incluyeron en el estudio las cepas que se recuperaron en estado puro; todas aquellas donde solo crecieron contaminantes o un cultivo mixto se consideraron cepas contaminadas. Como cepas no viables quedaron incluidas aquellas donde no se obtuvo crecimiento en el medio de cultivo, después de 2 intentos.

Todos los trabajos se realizaron por duplicado en cabina de seguridad biológica clase II, teniendo en cuenta el nivel de riesgo biológico de las especies según la legislación nacional (Resolución 38/06 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, CITMA).

RESULTADOS

En la tabla se presenta el número inicial de cepas de ambos géneros y la cantidad de ellas que pudieron ser recuperadas. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* fue la especie con mayor pérdida numérica (64,3 % de recuperación). Del género *Cryptococcus* se conservaban 4 especies, de las cuales las de mayor importancia, tanto por su interés clínico como por el número de cepas fueron *C. neoformans* y *C. gattii*, cuyos porcentajes de recuperación resultaron 79,1 y 100 %, respectivamente. En el conjunto de cepas de este

Tabla. Cepas de los géneros *Histoplasma* y *Cryptococcus* en cultivos en agua destilada pertenecientes a la colección de cultivos de hongos patógenos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" y tiempo de conservación (años)

Especies	No. inicial de cepas	No. de cepas		Recuperadas (%)	Tiempo de conservación (años)
		Contaminadas (%)	No viables (%)		
<i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	28	6 (21,4)	4 (14,3)	18 (64,3)	1-17
<i>Cryptococcus neoformans</i>	67	3 (4,5)	11 (16,4)	53 (79,1)	12-17
<i>Cryptococcus gattii</i>	5	-	-	5 (100)	12-14
<i>Cryptococcus humicola</i>	1	-	-	1 (100)	17
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	-	-	1 (100)	17
Total	102	9 (8,8)	15 (14,7)	78 (76,5)	1-17

género el porcentaje de recuperación fue de 81,8 %, mientras que en el conjunto de ambos géneros resultó de 76,5 %.

El tiempo de conservación de las cepas evaluadas fue de 1 a 17 años. Todas pudieron ser reidentificadas mediante los procedimientos establecidos en el laboratorio. No se apreciaron cambios morfológicos ni fisiológicos en comparación con sus características iniciales.

Las contaminaciones de los cultivos se debieron a deficiencias en la hermeticidad de algunos tubos y fueron causadas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*. No se encontró contaminación bacteriana.

En el proceso de reidentificación de los cultivos conservados se preparó un laminario a partir de las láminas portaobjetos selladas y debidamente rotuladas, de los exámenes microscópicos directos de las cepas de mayor interés con fines docentes y de referencia para el diagnóstico.

DISCUSIÓN

La inmersión en agua destilada estéril, cultivo en agua o método de Castellani es quizá la técnica más simple para el mantenimiento de las cepas de hongos; es un método ideal para pequeñas colecciones o laboratorios con pocos recursos, aunque también ha sido empleado por las grandes colecciones del mundo desarrollado.^{7,9} Resulta útil prácticamente para todos los hongos patógenos porque ha logrado mantener la viabilidad, pureza y estabilidad por períodos de más de 20 años.²⁻⁶

Como ventajas del método se pueden mencionar la disminución de la tendencia al pleomorfismo por parte de algunas especies de hongos, evita el

ataque de los ácaros, es un método sencillo y de bajo costo, que no requiere de personal especializado y garantiza en gran medida la viabilidad y las características de los cultivos, lo que lo convierten en un atractivo método para muchos laboratorios.^{2,3,7} Otra ventaja importante es que permite la manipulación de las formas filamentosas de los patógenos dimórficos con un menor riesgo.

Desde su creación, la micoteca del IPK ha contado con cepas de los géneros *Histoplasma* y *Cryptococcus*, vinculadas a las principales líneas de investigación desarrolladas por el laboratorio de Micología, lo que ha permitido profundizar en los estudios relacionados con la histoplasmosis, principal micosis sistémica en Cuba, y la criptococosis, infección oportunista que se presenta con elevada frecuencia en pacientes inmunocomprometidos.

Existen pocos estudios publicados en los que se evalúa la preservación de cultivos de *H. capsulatum* var. *capsulatum*. En uno de los más citados en la literatura, *Hartung* y otros (1989) reportaron la recuperación de 50 % de las cepas (2 de 4) después de 5 a 10 años de conservación.³ Por otra parte, *Diogo* y otros, así como *Borman* y otros obtuvieron 100 % de viabilidad, aunque en ambos casos solo fue evaluado un aislamiento por períodos menores de 2 años.^{6,7} Los datos obtenidos en el presente trabajo, a partir de 28 cepas (64,2 % de supervivencia) difieren de lo planteado por estos autores, aunque como se observa, el número de cepas y el tiempo de conservación fueron superiores (tabla). Otros autores también han encontrado dificultades en la conservación de *H. capsulatum* mediante otras técnicas como la preservación en aceite mineral y en tierra estéril, lo que quedó evidenciado por una muy baja viabilidad (7 y 0 %, respectivamente), pérdida de

la capacidad de esporular y de su dimorfismo térmico.¹⁰ Por otra parte, *Pasarell y McGinnis* en 1992 demostraron que las 4 cepas de esta especie conservadas a -70 °C permanecieron viables durante un período de 1 a 13 años.¹¹

Al evaluar el estado de conservación del género *Cryptococcus* se encontró que 81,8 % estaba viable, mientras que para *C. neoformans* fue 79,1 % después de 12 a 17 años, lo que se puede considerar satisfactorio si se compara con los resultados de otros autores. *Hartung* y otros reportaron 50 % de viabilidad para *C. neoformans*, porcentaje inferior al nuestro, y con un número menor de cepas evaluadas.³ Sin embargo, *Rodrigues* y otros obtuvieron la recuperación de 100 % de las 5 cepas de esta especie después de 1 año de conservación.⁴ En 2003, *Pérez* y otros reportaron que de 26 cepas de *C. neoformans* evaluadas después de un período de preservación que osciló entre 1 y 40 años, 100 % mantuvo su viabilidad y sus principales características fenotípicas y genotípicas, aunque en 4 de ellas (15 %) se evidenció la pérdida de la capacidad de producir pigmento marrón en el medio de Staib modificado.⁵

Entre los diversos factores que pudieron afectar la conservación de las cepas, se pueden mencionar los errores en la preparación del inóculo inicial; la mayoría de los autores coinciden en señalar la importancia de partir de un cultivo fresco, bien esporulado, aunque no se ha precisado la cuantía o concentración de este inóculo.^{3,4,6,7} En el presente trabajo la principal fuente de contaminación de los cultivos fue la deficiente hermeticidad de las tapas de baquelita de los tubos, lo cual pudo haber contribuido a la disminución de volumen de líquido por evaporación, con la consiguiente concentración y posible pérdida de viabilidad y contaminación.²

Entre las infecciones adquiridas en el laboratorio la infección fúngica representa 9 %, en su mayoría debida a hongos dimórficos, entre ellos *H. capsulatum* var. *capsulatum*, cifra que no se considera despreciable teniendo en cuenta la baja frecuencia de aislamiento de estos microorganismos, por lo que indiscutiblemente constituye un riesgo ocupacional para los micólogos.¹² Está bien documentado el riesgo de infección pulmonar e infección cutánea debido a la inhalación de

partículas infectantes, al manipular cultivos en fase filamentosa y a la inoculación accidental con agujas u otros objetos contaminados, respectivamente.¹⁷ El trabajo de colecta y procesamiento de muestras de tierra para estudios ambientales en áreas endémicas también ha sido causa de infecciones pulmonares en personal de laboratorio.^{13,14} Según la legislación laboral vigente en Cuba, la histoplasmosis está considerada una enfermedad profesional (Resolución Conjunta No. 2 de 1996 de los ministerios de Salud Pública y de Trabajo y Seguridad Social).

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* produce macroconidios tuberculados y gran cantidad de microconidios redondos y lisos, que por su pequeño tamaño (1-2 µm) e hidrofobicidad son fácilmente dispersados por vía aérea, lo cual se convierte en un importante atributo de patogenicidad, valorado con potencialidades de arma biológica.¹⁵

En una revisión publicada por *Sewell* (1995) se citan 2 series de casos de histoplasmosis adquirida en el laboratorio: una de 81 casos en los EE. UU. y otra de 71 casos en los EE. UU. y otros países.¹⁶ La inmensa mayoría se trataba de infecciones pulmonares o cutáneas relacionadas con diferentes procedimientos comunes del laboratorio de microbiología, como son la manipulación de cultivos filamentosos, flamear y enfriar el asa de inoculación, pipetear, uso de bisturíes, jeringuillas y agujas, centrifugación, uso de agitadores, sonicadores, morteros, liofilización y filtración al vacío, entre otros. En países europeos, donde esta micosis se ha convertido en los últimos años en una reconocida micosis importada, también se han reportado casos de histoplasmosis cutánea por implantación traumática del agente.¹⁷

Aunque no han encontrado informes de infecciones respiratorias como consecuencia de una exposición a *Cryptococcus* en el laboratorio, existen reportes de infecciones relacionadas con la inoculación con agujas u objetos punzantes contaminados. También representan riesgos potenciales para el personal del laboratorio la manipulación de ratones inoculados y de material de origen ambiental contaminado (por ejemplo, muestras de palomares y detritos vegetales).^{13,18,19} En el Laboratorio de Micología del IPK no se han producido infecciones accidentales por ninguno de estos agentes.

Las normas de bioseguridad para los laboratorios de microbiología deben ser conocidas por todo el personal que trabaja de manera directa e indirectamente en la colección.¹⁵ Además, se debe tener conocimiento de las características de las especies fúngicas con las que se trabaja, así como de las disposiciones legales, tanto nacionales como internacionales, sobre seguridad biológica.²⁰

Según la *Lista oficial de agentes biológicos que afectan al hombre, los animales y las plantas* de la Resolución No. 38/06 del CITMA, *H. capsulatum* var. *capsulatum* y *C. neoformans* se encuentran ubicados en el grupo de riesgo II, es decir, que “presentan un riesgo individual moderado y comunitario limitado; pueden causar enfermedades pero normalmente no constituyen un riesgo serio para el trabajador saludable, la comunidad y el medio ambiente”.

En muchos otros países, endémicos o no, están considerados dentro del grupo III. Otros autores recomiendan establecer diferentes niveles de riesgo para *H. capsulatum* var. *capsulatum*: grupo II para la forma levaduriforme y grupo III para la forma filamentosa.^{8,13,20} Esta propuesta parece razonable, teniendo en cuenta que las partículas infectantes del hongo son los microconidios y fragmentos cortos de hifas producidos en la fase filamentosa. De esta forma, para los laboratorios de diagnóstico, que deben procesar muestras clínicas (donde el hongo se encuentra en fase levaduriforme), el nivel de riesgo sería diferente a los laboratorios que deben trabajar o manipular las formas filamentosas del hongo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que muchos laboratorios de diagnóstico realizan el cultivo e identificación de la forma filamentosa del hongo, por lo que siempre se deben extremar todas las medidas de bioseguridad, porque *H. capsulatum* ocupa el segundo lugar entre las especies fúngicas causantes de infecciones en el laboratorio.²⁰

Una situación similar se presenta con *C. neoformans*, aunque las infecciones adquiridas en el laboratorio son menos frecuentes. Para la fase levaduriforme del hongo, que es la predominante, se recomienda un nivel de riesgo II; sin embargo, para aquellos laboratorios que realizan investigaciones relacionadas con las basidiosporas, el nivel de riesgo recomendado es III.^{13,20}

Está bien reconocido que la liofilización y la criopreservación en nitrógeno líquido son los métodos con los que mejor se logra reducir al mínimo las alteraciones genéticas durante la conservación por largos períodos. Sin embargo, estos no están disponibles en todos los laboratorios ni tampoco se recomiendan para los hongos patógenos del grupo de riesgo biológico III.⁷

La evaluación de la colección de hongos del IPK permitió la revisión del estado de viabilidad y pureza de los cultivos de hongos de los géneros *Histoplasma* y *Cryptococcus* conservados, lo que se evidencia en una elevada recuperación de las cepas preservadas por más de 10 años en agua destilada estéril y demuestra su utilidad como método de conservación a largo plazo de los cultivos de hongos.

Preservation of high risk fungal cultures of *Histoplasma* and *Cryptococcus*

ABSTRACT

Introduction: culture collections are responsible for providing the microbial resources for development of biological sciences. Storage in distilled water is one of the easiest and least expensive method for long-term fungal preservation. **Objective:** to evaluate the usefulness of this preservation method in fungal culture of *Histoplasma* and *Cryptococcus*. **Methods:** the preservation condition of the highest biological risk species from *Histoplasma* y *Cryptococcus* genera, included in the fungal culture collection of “Pedro Kouri” Institute of Tropical Medicine in Havana, was evaluated in this study. One hundred and two strains stored in distilled water, 92 % of which had been preserved for more than 10 years, were analyzed. **Results:** the percentages of recovered strains from *H. capsulatum*, *C. neoformans* and *C. gattii* were 64.3 %, 79.1 % and 100 % respectively. This method of preservation proved to be satisfactory for fungal culture in labs with limited financial resources. A web-based database with interesting information about the collection was made. The importance of strict compliance with the biosafety measures in these collections, particularly with high risk pathogens. **Conclusions:** preservation of fungal cultures in distilled water is a very useful method for laboratories with limited resources. Culture collections should be assumed as an essential activity in order to solve increasing challenges in the development of biomedical sciences.

Key words: preservation in distilled water, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, biological risk.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith D. Culture collections over the world. *Int Microbiol.* 2003;6 (2):95-100.
2. Fernández Andreu CM, Martínez Machín G, Perurena Lancha MR, Illnait Zaragoza MT, Valdés Hernández I. La colección

- de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri": funciones y retos. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57(3):214-8.
3. Hartung de Capriles C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia.* 1989;106 (2):73-9.
 4. Rodrigues EG, Lirio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1992;34 (2):159-65.
 5. Pérez C, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Roselló A, Colella MT, Olaizola C, et al. Mantenimiento de *Cryptococcus* sp. con el método de Castellani. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2003;23 (2):153-7.
 6. Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol.* 2005;80 (6):591-4.
 7. Borman AM, Szekeley A, Campbell CK, Johnson EM. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia.* 2006;161 (6):361-8.
 8. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 3rd ed (version piloto in CD Rom). Utrech-/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili; 2009. p. 10-1.
 9. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS, editors. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004. p. 37-47.
 10. Lima RF, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol.* 2001;18 (4):191-6.
 11. Pasarell L, Mc Ginnis MR. Viability of fungal cultures maintained at -70 °C. *J Clin Microbiol.* 1992;30 (4):1000-4.
 12. Borrell N, Mesquida X, Alomar P. Normas de seguridad. En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio-Calvo MC, editores. Guía práctica en identificación y diagnóstico en micología clínica. Valencia: Ed. Revista Iberoamericana de Micología; 2001. p. 17.1-13. ISBN: 84-607-3050-6
 13. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories (BMBL). 5th ed. Washington: US Government Printing Office; 2007 [cited Aug 3 2011]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>
 14. Fernández Llanes R, Fernández Andreu CM, Fuentes González O. Riesgo biológico asociado con trabajos de campo: informe de dos casos de histoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop.* 1987;39(1):61-7.
 15. Casadevall A, Pirofski LA. The weapon potencial of human pathogenic fungi. *Med Mycol.* 2006;44 (8):689-96.
 16. Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8 (3):389-405.
 17. Buitrago MJ, Gonzalo-Jiménez N, Navarro M, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. A case of primary cutaneous histoplasmosis in the laboratory. *Mycoses.* 2011, doi:10.1111/j.1439-0507.2010.02003.x
 18. Glaser JB, Gordon A. Inoculation of *Cryptococcus* without transmission of acquired immune deficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1985;313 (4):266.
 19. Casadevall A, Mukherjee J, Yuan R, Perfect J. Management of injuries caused by *Cryptococcus neoformans*-contaminated needles. *Clin Infect Dis.* 1994;19 (5):951-3.
 20. Padhye AA, Bennett JE, McGinnis MR, Sigler L, Flisa A, Salkin IF. Biosafety considerations in handling medically important fungi. *Med Mycol.* 1998;36(Suppl. 1):258-65.
- Recibido: 26 de septiembre de 2011. Aprobado: 28 de octubre de 2011.
- Carlos M. Fernández. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Autopista Novia del Mediodía km 6½; Lisa, La Habana, Cuba. Correo electrónico: cfandreu@ipk.sld.cu