

Conservación de cultivos de hongos de importancia médica en agua destilada

Preservation of fungal cultures of medical importance in distilled water

Dr. C. Carlos Manuel Fernández Andreu,¹ MSc. Luis Alberto Díaz Suárez,¹¹
Dra. María Teresa Illnait Zaragoza,¹ MSc. Carlos Aragonés López,¹ Dr.
Gerardo Martínez Machín,¹ MSc. Mayda Rosa Perurena Lancha,¹ Téc. Iraida
Rodríguez Gutiérrez¹

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

¹¹ Escuela Latinoamericana de Medicina. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: en la colección de cultivos de hongos patógenos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", como centro de referencia nacional, se conservan los agentes causales de las principales micosis humanas, con fines de diagnóstico, investigaciones y enseñanza de la microbiología médica. La conservación de cultivos fúngicos en agua destilada estéril o método de Castellani ha sido avalada como un método que garantiza porcentajes elevados de viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas; esto unido a su bajo costo y sencillez, la convierte en una alternativa ventajosa para el mantenimiento de los microorganismos en muchos laboratorios.

Objetivo: mostrar los resultados en la preservación en agua destilada estéril de las principales especies fúngicas que integran esta colección.

Métodos: se evaluó la viabilidad, pureza y estabilidad de las principales características morfológicas y fisiológicas de 240 cepas de diferentes especies fúngicas pertenecientes a la colección, conservadas en agua destilada estéril.

Resultados: de los cultivos, 80 % se conservó en estado viable y sin contaminaciones. Los mejores resultados se obtuvieron en la preservación de los hongos productores de abundantes conidios (97 % de recuperación) y las levaduras (83 %), mientras que con los dermatofitos y hongos dimórficos fue de 69 y 68 %, respectivamente. En 17 géneros, la recuperación de cepas viables fue superior a 60 %, mientras que en 8 resultó de 100 %. El tiempo de conservación fue de 15 a 20

años. Se implementó una base de datos en formato digital de la colección sobre plataforma web.

Conclusiones: el método de Castellani es un método de elección para la conservación de cultivos fúngicos en laboratorios de recursos limitados.

Palabras clave: hongos patógenos, conservación en agua destilada, métodos de preservación de cultivos de hongos, método de Castellani, colecciones de cultivos de hongos.

ABSTRACT

Introduction: causal agents of the main human mycoses have been preserved in the culture collection of pathogenic fungi at "Pedro Kourí" Tropical Medicine Institute, a national reference center, with the purpose of using them for medical microbiology diagnoses, research and teaching. Preservation of fungal cultures in sterile distilled water, or Castellani's method, has been endorsed as a method ensuring high rates of strain viability, purity and stability, low costs and great simplicity. It is therefore an advantageous alternative for the maintenance of microorganisms in many laboratories.

Objective: present the results obtained from the preservation in sterile distilled water of the main fungal species included in the collection.

Methods: an evaluation was conducted of the viability, purity and stability of the main morphological and physiological characteristics of 240 strains of different fungal species from the collection, which had been preserved in sterile distilled water.

Results: 80 % of the cultures had retained their viable status without any contamination. The best results corresponded to the preservation of fungi producing abundant conidia (97 % recovery) and yeasts (83 %), followed by dermatophytes (69 %) and dimorphic fungi (68 %). In 8 genera, recovery of viable strains was 100 %, and in 17 it was above 60%. Preservation time was 15-20 years. A web-based digital database was created for the collection.

Conclusions: Castellani's is the method of choice for the preservation of fungal cultures in resource-limited laboratories.

Key words: pathogenic fungi, preservation in distilled water, fungal culture preservation methods, Castellani's method, fungal culture collections.

INTRODUCCIÓN

Las colecciones de cultivos microbianos resultan imprescindibles para el desarrollo actual de las ciencias biológicas en general y de la microbiología en particular. La preservación de cultivos viables, puros y genéticamente estables son requisitos imprescindibles en todo método de conservación para garantizar la reproducibilidad de las investigaciones microbiológicas básicas o aplicadas.¹

La enorme diversidad genética en el reino Fungi ha generado una lógica preocupación por su adecuada conservación.² De ahí que se hayan ensayado numerosos métodos de preservación, aunque no todos se han aplicado

exitosamente a los diferentes grupos de hongos. Entre los más empleados en la actualidad se pueden mencionar: la liofilización, la criopreservación, la inmersión en aceite mineral y el cultivo en agua destilada o método de Castellani.^{3,4}

Este último ha sido avalado como una técnica que garantiza porcentajes elevados de viabilidad, pureza y estabilidad fenotípica de las cepas, lo que unido a su bajo costo y sencillez lo convierten en una alternativa ventajosa para laboratorios de recursos limitados, aunque también ha sido empleado por las grandes colecciones del mundo desarrollado.³⁻⁶

En la Colección de Cultivos de Hongos Patógenos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK) se conservan los agentes causales de las principales micosis humanas, lo que ha sido imprescindible para el desarrollo de las funciones inherentes al Laboratorio de Micología de esa institución, como centro de referencia nacional para el diagnóstico, las investigaciones y la enseñanza de la microbiología médica. El objetivo del presente trabajo es mostrar los resultados de la preservación en agua destilada estéril, de las principales especies fúngicas que integran esta colección.

MÉTODOS

Se realizó una revisión del estado de conservación en agua destilada de 240 cepas de diferentes especies fúngicas, pertenecientes a la Colección de Cultivos de Hongos Patógenos del Laboratorio de Micología del IPK, para lo cual se evaluó la viabilidad, pureza y estabilidad de las principales características morfológicas y fisiológicas.

Las cepas, preservadas en agua destilada a temperatura ambiente, se transfirieron a placas de agar glucosa de Sabouraud y se incubaron a 28-30 °C durante 3 a 30 días, en dependencia de la especie. Si en este tiempo la cepa no creció o creció contaminada, el proceso fue repetido. La identificación se confirmó por métodos convencionales de acuerdo a las características morfológicas y bioquímicas.⁷ En aquellos casos en que solo crecieron contaminantes o un cultivo mixto, se consideraron como cepas contaminadas y fueron descartadas. Como cepas no viables quedaron incluidas aquellas donde no se obtuvo crecimiento, después de dos intentos.

Como parte de la organización y sistematización del trabajo de la colección, se implementó una base de datos en formato digital sobre plataforma web.

RESULTADOS

En la tabla 1 se presenta el número de cepas recuperadas según el género y el tiempo de conservación, agrupadas con fines prácticos en hongos productores de abundantes conidios, dermatofitos, dematiáceos, dimórficos y levaduras.

Tabla 1. Géneros y tiempo de conservación (años) de hongos de importancia médica preservados en agua destilada pertenecientes a la colección de cultivos de hongos patógenos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

Tipo morfológico del hongo	Géneros	No. de especies	No. de cepas	Cepas recuperadas No. (%)	Tiempo de conservación (años)
Productores de abundantes conidios	<i>Aspergillus</i>	10	23	23 (100)	15-20
	<i>Fusarium</i>	2	2	2 (100)	15-16
	<i>Geotrichum</i>	1	2	2 (100)	15-16
	<i>Penicillium</i>	2	2	2 (100)	15
	<i>Scedosporium</i>	1	2	1 (50)	20
	<i>Scopulariopsis</i>	1	1	1 (100)	15
	Sub-total (6 géneros)	17	32	31 (97)	15-20
Dermatofitos	<i>Epidermophyton</i>	1	5	0	-
	<i>Microsporum</i>	4	8	6 (75)	15-16
	<i>Trichophyton</i>	5	13	12 (92,3)	15-17
	Sub-total (3 géneros)	10	26	18 (69)	15-17
Dematiaceos	<i>Exophiala</i>	2	6	6 (100)	15-20
	<i>Fonsecaea</i>	2	9	5 (55,6)	15-20
	<i>Phialophora</i>	2	5	5 (100)	15-20
	<i>Hortaea</i>	1	3	1 (33,3)	18
	Sub-total (4 géneros)	7	23	17 (74)	15-20
Dimórficos	<i>Blastomyces</i>	1	2	2 (100)	15
	<i>Histoplasma</i>	1	28	18 (64,2)	15-20
	<i>Paracoccidioides</i>	1	2	1 (50)	15
	<i>Sporothrix</i>	1	9	7 (77,8)	18-20
	Sub-total (4 géneros)	4	41	28 (68)	15-20
	Total filamentosos (17 géneros)	38	122	94 (77)	15-20
Levaduras	<i>Candida</i>	10	35	32 (91,4)	15-20
	<i>Cryptococcus</i>	4	74	60 (81)	15-20
	<i>Rhodotorula</i>	1	3	2 (66,6)	15-20
	<i>Saccharomyces</i>	1	3	2 (66,6)	15-17
	<i>Trichosporon</i>	2	3	2 (66,6)	17-20
	Sub-total (5 géneros)	18	118	98 (83)	15-20
Total	22 géneros	56	240	192 (80)	15-20

Los mejores resultados se obtuvieron entre los hongos productores de abundantes conidios, donde en 5 de los 6 géneros incluidos se obtuvo una recuperación de 100 %. Solo una cepa del género *Scedosporium* resultó contaminada y no pudo ser reaislada.

Entre los dermatofitos, los porcentajes de recuperación se presentaron altos para *Microsporum* y *Trichophyton*, no así para las cepas del género *Epidermophyton*, ninguna de las cuales pudo ser reaislada. Las cepas pertenecientes a 2 de los géneros de hongos dematiáceos (*Exophiala* y *Phialophora*) se recuperaron totalmente, mientras que en *Fonsecaea* y *Hortae* los porcentajes resultaron de 55,6 y 33,3 %, respectivamente. Entre los dimórficos, *Histoplasma* fue el género más representado y su recuperación de 64,2 %. En este grupo el porcentaje general resultó de 68 %.

De las 118 cepas de levaduras, se recuperaron 98 (83 %); los géneros *Candida* y *Cryptococcus* fueron los más favorecidos con 91,4 y 81 % de recuperación, respectivamente. Para los restantes géneros, solo representados por 3 cepas cada uno, la recuperación fue de 66,6 %.

De manera general, en 17 géneros, la recuperación de cepas viables fue superior a 60 %, mientras que en 8 resultó de 100 %. El único género no recuperado fue *Epidermophyton*, ninguna de cuyas cepas resultó viable.

El tiempo de conservación para el total de cepas evaluadas fue de 15 a 20 años. Todas pudieron ser reidentificadas mediante los procedimientos establecidos en el laboratorio. No se apreciaron cambios morfológicos ni fisiológicos en las cepas en comparación con sus características iniciales.

En la tabla 2 se muestra el estado de conservación de los cultivos evaluados, teniendo en cuenta aquellos que resultaron no viables y contaminados según el tipo morfológico; 80 % se obtuvo en estado viable y sin contaminaciones. Los mejores resultados se alcanzaron en la preservación de los hongos productores de abundantes conidios (97 % de recuperación) y las levaduras (83 %), mientras que con los dermatofitos y hongos dimórficos fue de 69 y 68 %, respectivamente.

Tabla 2. Resultados del estado de conservación del total de cepas según el tipo morfológico del hongo

Tipo morfológico del hongo	Cepas viables y puras (%)	Cepas contaminadas (%)	Cepas no viables (%)	Total
Productores de abundantes conidios	31 (97)	1 (3,1)	0	32
Dermatofitos	18 (69)	4 (15,3)	4 (15,3)	26
Dematiáceos	17 (74)	3 (13)	3 (13)	23
Dimórficos	28 (68)	8 (19,5)	5 (12)	41
Levaduras	98 (83)	7 (5,9)	13 (11)	118
Total	192 (80)	23 (9,6 %)	25 (10,4 %)	240

Las contaminaciones de los cultivos transferidos se debieron en su totalidad a especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*. No se detectó contaminación bacteriana. Las contaminaciones más frecuentes se encontraron

entre los dimórficos (19,5 %) y los dermatofitos (15,3 %). Los menos contaminados fueron los cultivos de hongos productores de abundantes conidios y las levaduras (3,1 y 5,9 %, respectivamente).

Con excepción del primer grupo, los porcentajes de cultivos no viables oscilaron entre 11 y 15,3 %, que corresponden a las levaduras y a los dermatofitos, respectivamente. Este último estuvo representado mayormente por cultivos de *Epidermophyton floccosum*, ninguno de los cuales fue recuperado.

DISCUSIÓN

La inmersión en agua destilada estéril, cultivo en agua o método de Castellani es quizá la técnica más simple para el mantenimiento de los cultivos de hongos y resulta un método ideal para pequeñas colecciones o laboratorios con pocos recursos; aunque también ha sido empleado en las grandes colecciones de países del primer mundo.^{6,8,9} Como ventajas del método se puede mencionar que disminuye la tendencia al pleomorfismo por parte de algunas especies de hongos, evita el ataque de los ácaros, además de ser 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; es útil prácticamente con todos los hongos patógenos porque ha logrado mantener la viabilidad, pureza y estabilidad por períodos de más de 20 años, lo cual lo convierte en un método muy ventajoso para muchos laboratorios.^{4,8,9}

Al evaluar el estado de supervivencia en agua destilada estéril de las cepas de hongos pertenecientes a la micoteca del IPK, se pudo comprobar la eficacia de este método para asegurar su viabilidad y pureza. Como se aprecia en la tabla 1 pudieron recuperarse 192 cepas de las 240 evaluadas, lo que equivale a una viabilidad de 80 %, cifra superior a la encontrada por *Hartung* y otros, quienes reportaron que 62 % de los cultivos de hongos sobrevivieron en agua destilada estéril por un período de 1 a 20 años.⁴

Otros autores como *Rodrigues* y otros, encontraron que la supervivencia de los hongos filamentosos preservados por el método de Castellani fue de 91 a 98 %, después de un tiempo máximo de 24 meses.¹⁰ Resultados superiores han sido informados por *Bueno* y *Gallardo*, quienes plantearon que 100 % de las 16 cepas de hongos filamentosos analizadas sobrevivió a la conservación en agua destilada por 2 años;¹¹ los hallazgos anteriores concuerdan con lo publicado más recientemente por *Diogo* y otros, al evaluar 43 cepas después de 1 año de conservación por este método.⁵ Aunque el porcentaje de supervivencia obtenido en el presente trabajo fue inferior a los alcanzados por estos autores, es necesario destacar que el número de cepas y el tiempo de conservación analizados por ellos resultaron en todos los casos inferiores a los mostrados en el presente estudio.

Entre los hongos productores de abundantes conidios quedaron incluidos las especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Scopulariopsis*, todos ellos de creciente importancia en la actualidad, algunas de cuyas especies son reconocidos patógenos oportunistas y emergentes^{7,12} y su supervivencia fue de 100 %; similares resultados se obtuvieron también por *Hartung* y otros para *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.⁴

Al analizar la viabilidad de las cepas pertenecientes al grupo de los dermatofitos, se obtuvieron buenos resultados en los géneros *Trichophyton* y *Microsporum* (92,3 y 66,7 %, respectivamente), mientras que *Hartung* y otros obtuvieron 65,5 y 67,6 %, respectivamente.⁴ Por otra parte, *Rodrigues* y otros después de 2 años de conservación solo pudieron recuperar menos de 50 % de las cepas de estos géneros.¹⁰ Sin embargo, con el género *Epidermophyton* los resultados fueron totalmente negativos, al no poderse recuperar ninguna de las cepas conservadas; también *Hartung* y otros obtuvieron resultados inferiores en comparación con los otros géneros de dermatofitos.⁴ Los otros autores mencionados no evaluaron ninguna cepa de este género. Es conocido que los microconidios son estructuras más resistentes a las distintas condiciones de estrés que los macroconidios, por lo que es de esperar que aquellas especies productoras de abundantes microconidios (*Aspergillus*, *Penicillium*, entre otros) puedan conservarse mejor que las que no los producen o lo hacen en cantidades inferiores.¹³ Esto pudiera ser una explicación para los pobres resultados en la conservación por diferentes métodos de las cepas de *Epidermophyton floccosum*, especie que solo produce macroconidios.

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* ha sido una especie que ha mostrado un buen estado de conservación por el método de Castellani, lo que ha sido corroborado por *Rodrigues* y otros,¹⁰ así como *Diogo* y otros,⁵ quienes obtuvieron una recuperación de 100 %. Los datos obtenidos en el presente estudio, a partir de 28 cepas, difieren de lo planteado por estos autores, aunque tanto el número de cepas como el tiempo de conservación aquí fue muy superior (tabla 1). *Lima* y *Borba* también han encontrado dificultades en la conservación de *H. capsulatum* mediante otros métodos como la preservación de cultivos en aceite mineral y en tierra estéril, lo que quedó manifestado por una muy baja viabilidad y pérdida de la capacidad de esporular y del dimorfismo térmico.¹⁴ Contrario a esto, *Pasarell* y *McGinnis* demostraron que 100 % de las cepas de esta especie conservadas a -70 °C en un rango de tiempo de 1 a 13 años, permanecían viables.¹⁵

Se hizo evidente que el método de Castellani es eficaz para la conservación de hongos levaduriformes, al lograrse la recuperación de 83 % de las cepas pertenecientes a 5 géneros. Al evaluar el estado de conservación de los géneros de mayor relevancia clínica, se encontró que 91,4 % de las cepas de *Candida* y 81 % de las de *Cryptococcus* estaban viables, lo que se puede considerar como muy satisfactorio. *Hartung* y otros reportaron porcentajes de viabilidad inferiores (60 y 50 %, respectivamente) con menor número de cepas.⁴ Sin embargo, *Rodrigues* y otros obtuvieron la recuperación de 100 % de las cepas pertenecientes a estos géneros.⁵

Pérez y otros reportaron que de 26 cepas de *Cryptococcus neoformans* evaluadas para un período de preservación que osciló entre 1 y 40 años, 100 % mantuvo su viabilidad y sus características tanto fenotípicas como genotípicas.¹⁶

El 9,6 % de las cepas presentaban algún tipo de contaminación con especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*. Otros autores también reportan estos 3 géneros como los más frecuentes contaminantes de las colecciones de cultivos.⁴

Entre los diversos factores que pudieron haber afectado la viabilidad en el presente estudio, se pueden mencionar los posibles 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 su cuantía o concentración.^{4-6,10} La principal fuente de contaminación de los cultivos pudo haber sido la deficiente hermeticidad de las tapas de baquelita de algunos de los tubos, lo

cual pudiera haber contribuido a la disminución de volumen de líquido por evaporación, con la consiguiente concentración y posible pérdida de viabilidad y contaminación.

Aunque se consideran como los métodos que mejor garantizan la estabilidad genética, los hongos patógenos del grupo de riesgo biológico III (entre ellos *H. capsulatum*), no deben conservarse mediante la liofilización y la criopreservación en nitrógeno líquido,^{6,8,17,18} por lo que la conservación en agua destilada se convierte, en estos casos, en una herramienta de gran valor.

Algunos autores han planteado que el método de Castellani pudiera considerarse un método de conservación a mediano plazo (2-5 años) o método alternativo;¹⁹ sin embargo, los resultados del presente trabajo muestran que 80 % de los cultivos habían permanecido preservados por un período superior a 15 años y, al menos, 17 géneros mostraron una supervivencia superior a 60 %, lo cual lo convertiría en un método de conservación a largo plazo o método de elección; aunque nunca debe tenerse como método único y esto coincide con los resultados de otros autores.^{4,9,16}

Toda la información relacionada con esta colección se encuentra disponible en una base de datos en formato digital, implementada según la guía disponible en los sitios electrónicos de la Red europea de información microbiana. Esto la convierte en una herramienta de gran utilidad.²⁰

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith D. Culture collections over the world. *Int Microbiol.* 2003;6:95-100.
2. Hawksworth DL. Fungal diversity and its implications for genetic resources collections. *Stud Mycol.* 2004;50:9-18.
3. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. En: Mueller GM, Bills GF, Foster MS, editors. *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods.* Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004. p. 37-47.
4. Hartung de Capriles C, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia.* 1989;106:73-9.
5. Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol.* 2005;80:591-4.
6. Borman AM, Szekely 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;161:361-8.
7. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of clinical fungi.* 3rd ed (versión piloto in CD Rom). Utrecht-/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili; 2009. p. 10-1.
8. Mendoza M, Alvarado P, Díaz de Torres E, Lucena L, Albornoz MC. Comportamiento fisiológico y de sensibilidad in vitro de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:151-6.

9. Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilisation: comparison after 12 years. *Mycoses*. 1998;41:255-7.
10. Rodrigues EG, Lírio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1992;34:159-65.
11. Bueno L, Gallardo R. preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*. 1998;15:166-8.
12. Stevens D. Clinical aspergillosis for basic scientists. *Med Mycol*. 2009;47(Suppl. 1):1-4.
13. Smith D, Onions AH. The preservation and maintenance of living fungi. 2nd ed. Walling Ford: CAB International; 1994.
14. Lima RF, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Micol*. 2001;18:191-6.
15. Pasarell L, Mc Ginnis MR. Viability of fungal cultures maintained at 70 °C. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1000-4.
16. 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;23:153-7.
17. Fernández Andreu CM, Díaz Suárez LA, Illnait Zaragoza MT, Aragonés López C, Martínez Machín G, Perurena Lancha MR. Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de *Histoplasma* y *Cryptococcus*. *Rev Cubana Med Trop*. 2012;64(1):49-54.
18. Freitas RS, Dantas KC, Pereira CN, Levi JE, Costa Martins JE. Preservation methods of fungi in 35 years old stock culture storages: a comparative study. *Afr J Microbiol Res*. 2011;5(5):555-61.
19. García MD, Uruburu F. La conservación de cepas microbianas. *Actual Sem*. 2000;30:12-6.
20. Laboratory Procedures for Microorganisms. Establishment and operation of culture collections. Documentation, catalogues and on-line information [citado 12 Nov 2009]. Disponible en: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M101.html>

Recibido: 17 de enero de 2013.

Aprobado: 28 de febrero de 2013.

Carlos M. Fernández Andreu. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía km 6 ½. AP 601. Marianao 13. La Habana, Cuba. Correo electrónico: cfandreu@ipk.sld.cu