



Comportamiento fisiológico y de sensibilidad *in vitro* de aislamientos de *Sporothrix schenckii* mantenidos 18 años por dos métodos de preservación

Mireya Mendoza, Primavera Alvarado, Elvia Díaz de Torres, Lilianyel Lucena y Maria C. de Albornoz

Resumen

Se compararon dos métodos de preservación de hongos, el de Castellani y el de resiembra en medio Sabouraud-agar en cinco aislamientos de *Sporothrix schenckii* preservados durante 18 años a temperatura ambiente por ambos procesos. Se evaluó la viabilidad de las cepas, velocidad de crecimiento, características morfológicas, fisiológicas y la sensibilidad *in vitro* frente a yoduro, itraconazol, terbinafina y posaconazol. Pudimos apreciar un 100% de viabilidad en todos los aislamientos, con una disminución en la velocidad de crecimiento en los preservados en agua en comparación con los de cultivos periódicos. Por ambos métodos, los cultivos conservaron los caracteres morfológicos típicos del hongo. Sin embargo, en cuanto a la actividad enzimática se observó en ambos grupos actividades ureasa y β glucosidasa, encontrándose sólo en los aislamientos que venían preservados en agua, completa inhibición de la capacidad de hidrólisis del almidón. Este grupo también mostró ser mas sensible al yoduro de potasio a la concentración de 10 μ M en los ensayos de sensibilidad *in vitro*.

Palabras clave

Sporothrix schenckii, Preservación, Características morfológicas, Sensibilidad *in vitro*, Yoduro potásico

Physiological compartment and *in vitro* sensitivity of *Sporothrix schenckii* isolates maintained for 18 years by two preservation methods

Summary

We compared two methods for the preservation of fungi, Castellani's method and repeated passage in Sabouraud medium-agar, on five isolates of *Sporothrix schenckii* that were preserved for 18 years at room temperature by both procedures. They were evaluated for viability of the strains, growth rate, morphological and physiological characteristics, and *in vitro* sensitivity to iodide, itraconazole, terbinafine and posaconazole. 100% viability was observed in all of the isolates, with slower growth rate on strains preserved in water compared to strains periodically re-cultured. The typical morphological feature of these fungi was preserved by both methodologies. With regard to enzymatic activity, both groups gave urease reactions and were β glucosidase-positive. Nevertheless, complete inhibition of the capacity to hydrolyse starch was observed only on the isolates preserved in water. This group also was more sensitive to potassium iodide at a concentration of 10 μ M in the *in vitro* sensitivity tests.

Key words

Sporothrix schenckii, Preservation, Morphological characteristics, *In vitro* susceptibility, Potassium iodide

Dirección para correspondencia:

Dra. Mireya Mendoza
Laboratorio de Micología
Instituto de Biomedicina
Apdo. Postal 4043, San José
Caracas 1010A - Venezuela.
Fax: +58 212 861 9593
Correo electrónico: mmendoz@telcel.net.ve

Aceptado para publicación el 19 de septiembre de 2005

La esporotricosis, causada por el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*, es una micosis de distribución mundial, principalmente tegumentaria con una diversidad de formas clínicas, su diagnóstico se lleva a cabo a través del estudio micológico (examen directo y cultivo), histológico e inmunológico [1].

La preservación de los cultivos de este hongo patógeno, así como de otros, ha sido de interés para colecciones de hongos, estudio e investigación. El primer método de preservación de hongos fue descrito por Sherf [25] en aceite mineral, demostrando ser un procedimiento útil aunque, dependiendo del hongo, puede influir sobre la viabilidad, morfología y dimorfismo [19]. Así, se ha encontrado que *Blastomyces dermatitidis* y *S. schenckii* sobreviven mejor con este método que *Histoplasma capsulatum* [16]. En *Paracoccidioides brasiliensis* se ha observado que la preservación prolongada en aceite mineral puede alterar la patogenicidad del hongo [20].

Se han venido ensayando otros métodos para el mantenimiento de los cultivos fúngicos: el método de Castellani [11], resiembra periódicas, conservación de esporas en tierra, arena o silicagel, liofilización, o congelación en nitrógeno líquido [4,10,13,16], quedando sujeta la elección del método a la disponibilidad de cada laboratorio y a la garantía que el procedimiento pueda brindar en cuanto a preservación de la viabilidad y estabilidad genética. Sin embargo, entre todos estos métodos, el de Castellani ha mostrado ser de gran utilidad por su sencillez y economía. Además, se ha demostrado la viabilidad en un alto porcentaje de los hongos patógenos, independientemente del tiempo de conservación [4,8,27], así como de hongos filamentosos [6], del grupo Basidiomycotina [7] y de otros grupos [3]. Cultivos de *S. schenckii* mantenidos por este método han demostrado un 100% de preservación de la viabilidad y la morfología en aislamientos mantenidos desde 7 meses hasta 23 años [4,27], y estabilidad de la patogenicidad en aislamientos preservados durante 13-16 años [9].

Las características fisiológicas de 49 aislamientos de *S. schenckii* mantenidos por subcultivos fueron descritas por Ghost y col. [14]. Sin embargo, no existen hasta la fecha publicaciones sobre las características fisiológicas y de sensibilidad *in vitro* de este hongo preservado por el método de Castellani. Por tal razón, en el presente estudio se evaluaron, además de la viabilidad, pureza y morfología de los cultivos preservados, las características fisiológicas y de sensibilidad *in vitro* a yoduro, itraconazol, terbinafina y posaconazol de cinco aislamientos de *S. schenckii* mantenidos durante 18 años por el método de Castellani respecto a su conservación mediante resiembra sucesivas cada tres meses en agar glucosado de Sabouraud.

Material y métodos

Organismos. Cinco aislamientos clínicos de *S. schenckii* (cepas: 4526, 5000, 4702, 4513, 2888), fueron mantenidas por 18 años en dos condiciones diferentes: por resiembra trimestrales en agar glucosado de Sabouraud y en agua destilada estéril, en ambos casos a temperatura ambiente. Como control se utilizó un aislamiento clínico más reciente (6 meses) de *S. schenckii* (cepa 9254).

Los aislamientos mantenidos por el método de Castellani se prepararon introduciendo pequeños fragmentos de un cultivo fresco de la cepa a mantener en tubos para serología con 5 ml agua destilada estéril. La tapa se selló con parafilm, realizándose una revisión semestral y reposición de agua estéril en caso de evaporación durante todo el periodo de mantenimiento transcurrido.

Características morfológicas. El aspecto macroscópico se determinó por medio de una evaluación visual directa de los cultivos en sus condiciones iniciales. La evaluación microscópica se llevó a cabo por observación al microscopio óptico del cultivo teñido con azul de lactofenol.

Viabilidad. Los aislamientos de *S. schenckii* preservados por ambos métodos fueron resembrados en agar glucosado de Sabouraud para estimar su supervivencia.

Dimorfismo y termotolerancia. Los aislamientos viables se incubaron en medio Sabouraud Tiamina-Asparagina a 35, 37 y 42 °C con el fin de evaluar su capacidad de reversión y su termotolerancia. Cada 15 días fueron resembrados en el mismo medio y evaluados en sus aspectos macro y microscópico.

Actividad β -glucosidasa. En todos los aislamientos se midió la actividad β -glucosidasa [2]. El ensayo se realizó por duplicado en placas de microtitulación. Las lecturas se efectuaron a través del programa de un analizador de imágenes (FluorS-BioRad, EE.UU.).

Actividad ureasa. Todos los aislamientos fueron inoculados en tubos de ensayo que contenían caldo de urea e incubados a temperatura ambiente durante 48 h. Un aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* se utilizó como control positivo. La producción de ureasa es positiva cuando se observa viraje del medio a color fucsia en los tubos de ensayo.

Hidrólisis del almidón. Los aislamientos se inocularon en placas de Petri conteniendo agar-almidón, incubándose a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, el medio se cubrió con 10 ml de alcohol al 95%. La presencia de un halo hialino alrededor de la colonia fue considerado como resultado positivo [17].

Licuefacción de gelatina. Los aislamientos se sembraron en medio de agar-gelatina, se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente y luego se colocaron durante 15 min a 18 °C. En este caso, se valoró la hidrólisis de la gelatina.

Sensibilidad *in vitro*. Las pruebas se realizaron por el método de microdilución según documento M38-A del NCCLS [21]. Para estos ensayos se emplearon cultivos de 5 días de cada hongo en agar glucosado de Sabouraud a temperatura ambiente. A partir de estos, se preparó un inóculo de trabajo de 3×10^3 conidias/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10 g/l de glucosa tamponado con MOPS a pH 7. Los antifúngicos ensayados fueron: itraconazol (Janssen, Bélgica), terbinafina (Novartis, Australia) y posaconazol (Schering-Research Institute, Alemania), para los cuales se empleó como disolvente dimetil sulfoxido (DMSO); también se ensayó el yoduro de potasio, que se disolvió en agua. Cada fármaco se preparó a una concentración madre de 1 mg/ml con el diluyente respectivo. Posteriormente se prepararon en RPMI 1640 las concentraciones de 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 600 μ M, 1 mM, 3 mM y 5 mM.

Para los ensayos de sensibilidad se colocaron 100 μ l de cada uno de los antifúngicos en cada pozo y 100 μ l del inóculo de trabajo del hongo. Como control se colocó el inóculo sin el fármaco, que fue sustituido por medio RPMI 1640. Las placas fueron incubadas a 28 °C, realizándose las lecturas cada 48 h durante 12 días en un lector de placas de microtitulación (BT 2000 Microkinetics Reader, BioTek Instruments, Inc, EE.UU.) a una densidad óptica (DO) de 490 nm.

En cada grupo de hongos, se estimó la concentración mínima inhibitoria (CMI, concentración a la cual se inhibe el crecimiento visible del hongo) y los porcentajes de inhibición de cada antifúngico, en función del control.

Con los pocillos controles se evaluó la cinética y parámetros de crecimiento [22] de cada uno de los aislamientos del hongo mantenidos por los dos métodos de preservación.

Análisis estadísticos. Para evaluar de forma global el comportamiento de los aislamientos en función de las pruebas realizadas, se empleó un análisis multivariante empleando una matriz de datos binarios basado en presencia o ausencia de caracteres. Se realizó un análisis de *clusters*, mediante el método de Farthest Neighbour y el coeficiente de Jaccard's, utilizando el programa Multi-Variate Statistical package (MVSP).

Los resultados obtenidos con los ensayos de sensibilidad *in vitro* también fueron estudiados por medio de un análisis de varianza de rango.

Resultados

Estudios morfológicos. Al observar la morfología de los aislamientos mantenidos en agua, estos mostraron mayor cantidad de conidias pigmentadas, redondas y escasas hifas, respecto a los aislamientos mantenidos por resiembra trimestrales, en los que hubo predominio de hifas delgadas y hialinas. El aislamiento control (Ss 9254) mostró conidias pigmentadas e hifas (Figura 1).

Una vez resembrados los cultivos provenientes de ambos métodos de preservación, a los 15 días todos mostraron el aspecto característico de *S. schenckii*. Uno de los aislamientos (4513) mantenido en agua presentó escasa contaminación por un moho, pero esto no limitó el reasamiento del mismo.

La cepa control (9254) y cuatro de los cinco aislamientos (4513, 2888, 4526 y 5000) mantenidos en agua estéril, desarrollaron colonias de color oscuro. Los aislamientos 4526 y 4702 preservados por ambos métodos mostraron comportamiento similar. Los cultivos de la cepa 4526 mostraron colonias oscuras y los de la cepa 4702 colonias de color claro.

Microscópicamente se observó, por conteo por campo, que los aislamientos preservados en agua y agar glucosado de Sabouraud mostraron entre 75% a 100% de hifas delgadas, y un 50% de conidias en forma de gota y redondas en los aislamientos mantenidos por resiembra trimestral.

Crecimiento y dimorfismo. El crecimiento a 35 y 37 °C no mostró diferencias significativas en los cultivos provenientes de agua o cultivos trimestrales, observándose a la segunda y tercera resiembra colonias similares al aislamiento control. Sin embargo, se observó al microscopio una mayor proporción de formas de levadura en los aislamientos mantenidos en agua (60%), en relación con los cultivos mantenidos por resiembra trimestral (40%). Ningún aislamiento, incluyendo el control, tuvo reversión total a levadura, ni creció a 42 °C.

Los cinco aislamientos mantenidos por resiembra trimestral mostraron una cinética de crecimiento representado con un valor medio de $\mu_{max} = 0,025 h^{-1}$, y un tiempo generacional (T_g) de 29,67 h, mientras que los aislamientos mantenidos en agua mostraron un valor menor medio de μ_{max} ($0,024 h^{-1}$) y un T_g de 34,04 h. Se pudo apreciar que los cultivos preservados en agar glucosado de Sabouraud tuvieron un T_g menor que los mantenidos en agua, valor que fue más cercano al obtenido con el aislamiento control (Tabla 1).

Ensayos bioquímicos. Con respecto a las pruebas bioquímicas, todos los aislamientos de *S. schenckii* presentaron actividad β -glucosidasa y ureasa. En cuanto a la licuefacción de gelatina, dos aislamientos (25%) mante-

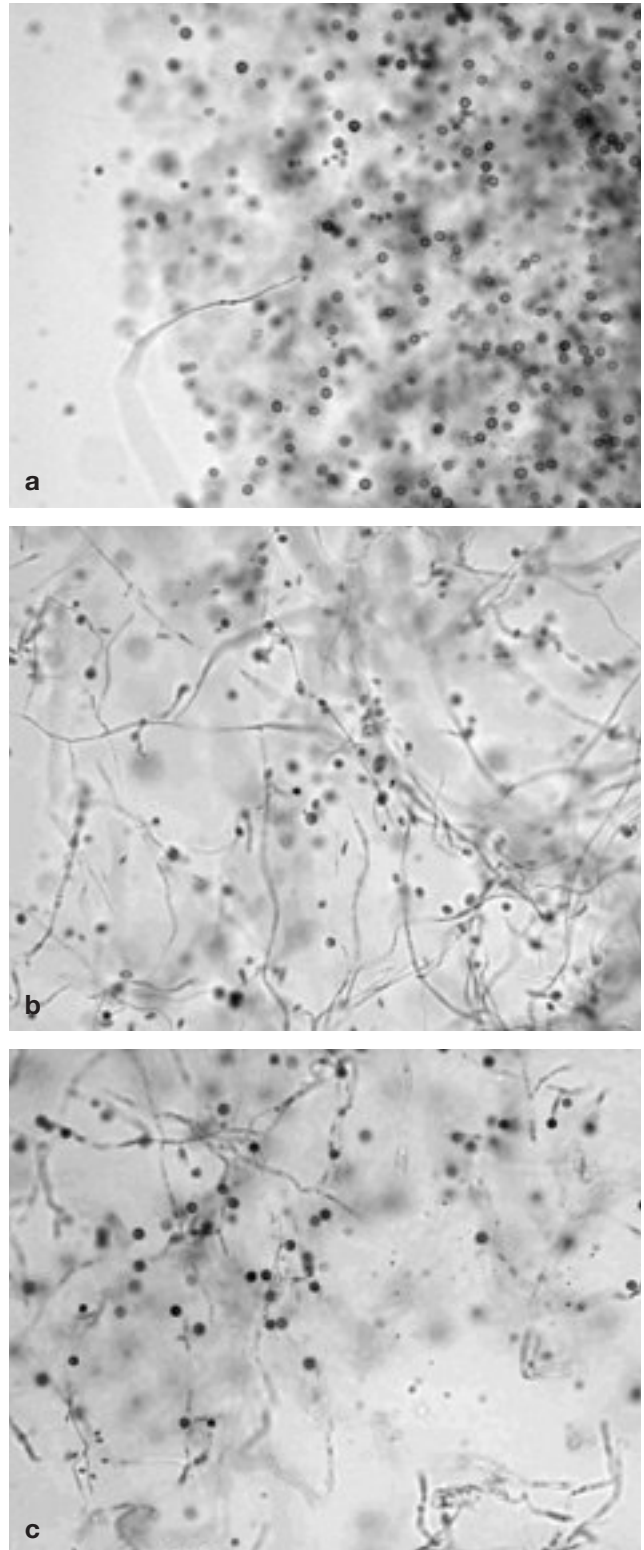


Figura 1. Tinción con azul lactofenol de los aislamientos de *S. schenckii* conservados durante 18 años: (a) 4513 mantenido en agua, (b) 2888 mantenido por resiembra trimestral y (c) 9254 aislamiento control (x400).

nidos en agua y por cultivo periódico (4702 y 4526) fueron positivos, siendo el resto de los cultivos (75%) negativos en esta prueba. Los aislamientos mantenidos por resiembra trimestral mostraron capacidad de degradar almidón, actividad que no se detectó en los preservados en agua.

Ensayos de sensibilidad in vitro. En relación a las pruebas de sensibilidad, todos los aislamientos mostraron porcentajes entre 95 y 100% de inhibición con terbinafina, itraconazol y posaconazol, encontrándose en su mayoría un valor de CMI de 10 μ M. Con el yoduro de potasio se observó efectos dosis-dependiente (Figura 3).

Por medio de la prueba de varianza de rango se demostraron efectos significativos con la concentración de 10 μ M de yoduro de potasio, a la cual los aislamientos preservados en agua fueron más sensibles que los aislamientos mantenidos por repique trimestral, obteniéndose un valor de Chi cuadrado de 0,02 con una probabilidad de 0,89.

El análisis de *clusters* (Figura 4) permitió agrupar a los aislamientos en dos grandes grupos, el primero constituido sólo por las muestras mantenidas en agua (4513, 4526, 5000 y 2888) y el segundo grupo por una muestra de agua (4702) y todas las muestras mantenidas por resiembra trimestrales (4513, 4526, 5000, 2888, 4702). Esto permitió evidenciar diferencias en la respuesta de los aislamientos frente a los dos métodos de preservación. Se observó que todas las réplicas de los aislamientos presentaron el mismo comportamiento funcional entre sí y, a la vez, cierto grado de disimilitud entre todas las muestras con excepción de 4513 y 5000 (mantenidas por resiembra trimestral) que mostraron un comportamiento idéntico, formando un grupo de identidad que puede observarse en el *cluster* como la zona punteada (Figura 4). Ambos aislamientos tuvieron la capacidad de hidrolizar almidón y presentar una baja respuesta al exponerlos a concentraciones de yoduro de potasio de 10 μ M para inhibir su crecimiento.

De los aislamientos en agua, el 5000 reversionó a 35 °C y presentó mayor inhibición a la concentración de 10 μ M de yoduro de potasio, a diferencia de los aislamientos provenientes de resiembra trimestral. La cepa 4513, preservada por ambas vías se diferenció en cuanto a que mantenida en agua perdió la capacidad de hidrolizar el almidón e inhibió su crecimiento con yoduro de potasio a la concentración de 5 μ M. El aislamiento 4526 mantenido en agua mostró reversión a 37 °C e inhibición de su desarrollo con yoduro de potasio a 10 μ M, lo contrario de lo observado con la 4526 de resiembra trimestral. Los aislamientos 4702 y 2888 mantenidos en agua y en resiembra trimestral, se diferenciaron entre sí por la deficiencia que presentó la mantenida en agua para hidrolizar el almidón.

Discusión

Varios métodos de preservación de hongos han sido evaluados y discutidos en la literatura [16,19,23]. El método de Castellani [11], sigue siendo uno de los más prácticos, sencillo y económico, que ha mostrado en muchos casos entre un 90 y 100% de viabilidad en levaduras y hongos filamentosos del ambiente [9,18,24], así como la preservación de las características del cultivo y patogenicidad de las cepas [5,6].

En nuestro estudio evaluamos el efecto que tuvieron dos métodos de preservación, el de Castellani y el de resiembra trimestral en medio de Sabouraud agar, sobre la viabilidad, características morfológicas, fisiológicas y la sensibilidad *in vitro* de cinco aislamientos de *S. schenckii* mantenidos durante 18 años por ambos métodos.

Hemos observado el 100% de supervivencia de los aislamientos mantenidos en agua estéril durante 18 años. Resultados similares han sido descritos en diferentes especies de hongos preservados en agua durante 2 a 20 años [6,8]. Un porcentaje bajo (20%) de contaminación fue encontrado con este método, lo que no supuso un impedimento para el reasamiento de la colonia.

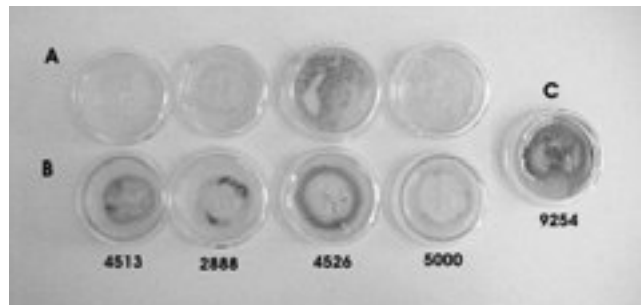


Figura 2. Cultivos de *S. schenckii* preservados durante 18 años en medio glucosado de Sabouraud a temperatura ambiente a) provenientes de agua b) resiembra trimestral y c) aislamiento control.

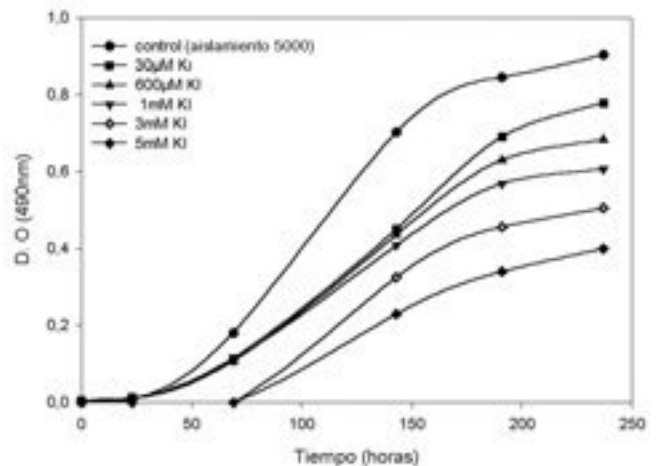


Figura 3. Efecto dosis dependiente del yoduro de potasio sobre el aislamiento 5000 de *S. schenckii* mantenido en agua.

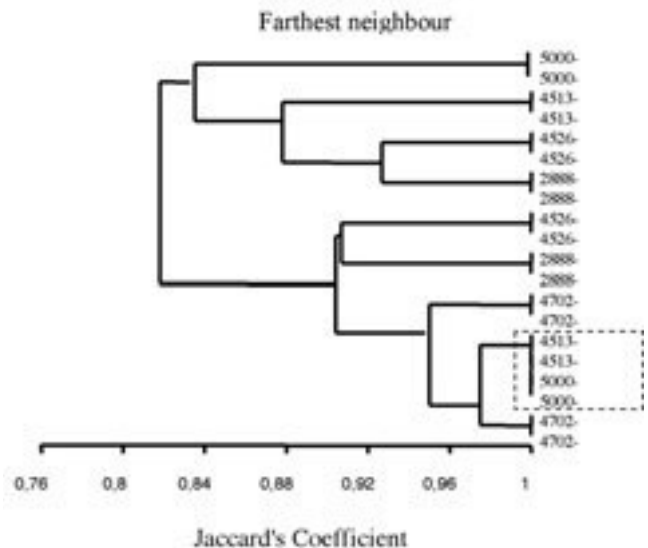


Figura 4. Análisis de *clusters* para comparar el comportamiento de los aislamientos mantenidos en agua y resiembra trimestral, empleando el método de Farthest Neighbour y el coeficiente de Jaccard.

En cuanto a la morfología, al igual que otros autores [6,27], no se observaron cambios significativos en el aspecto macro y microscópico del cultivo a temperatura ambiente y 35 °C, sin embargo se encontró mas heterogeneidad en las formas de las conidias (redondas, ovales,

Tabla 1. Parámetros cinéticos de los cultivos de *S. schenckii* mantenidos durante 18 años en agua, resiembra trimestral y aislamiento control.

Aislamiento	Aislamientos mantenidos en agar glucosado de Sabouraud		Aislamientos mantenidos en agua	
	μ_{max} (h ⁻¹)	Tg (h)	μ_{max} (h ⁻¹)	Tg (h)
4526	0,014	49,50	0,014	49,50
5000	0,031	22,35	0,016	43,31
2888	0,026	26,65	0,048	14,43
4513	0,033	21,00	0,022	31,50
4702	0,024	28,87	0,022	31,50
Valor medio	0,025	29,67	0,024	34,04
Control 9254	0,033	21,00	-	-

mixtas) en los cultivos que venían mantenidos en agua. La presencia de esporas pigmentadas y la degeneración de las hifas fue un carácter típico de los aislamientos de *S. schenckii* preservados en agua durante un periodo largo.

En muchos estudios realizados sobre este tema se ha venido evaluando la viabilidad, la tasa de crecimiento, contaminación y supervivencia del hongo preservado [22] sin embargo, poco se ha considerado la cinética de crecimiento que estos hongos presentan después de cortos o largos periodos de preservación. En este estudio pudimos constatar que los aislamientos de *S. schenckii* preservados en agua presentaron un mayor tiempo de generación que los de resiembra trimestral, posiblemente debido al largo período de latencia al cual estuvieron sometidos. Sin embargo, esto no pareció alterar su capacidad de reversión a 35 y 37 °C, ya que el 60% de los aislamientos mostró las formas de tabaco (levaduras). La patogenicidad de los aislamientos mantenidos en agua tampoco se vio alterada, ya que fueron capaces de producir orquitis en ratones NMRI que fueron inoculados con estos cultivos (datos no mostrados).

Otras propiedades bioquímicas como la presencia de β -galactosidasa, ureasa y la producción de enzimas de tipo proteolítico, no parecieron sufrir alteraciones en los dos grupos evaluados de *S. schenckii*. Sin embargo, la capacidad de degradar almidón se vio completamente inhibida en los aislamientos preservados en agua, posiblemente como un mecanismo de reserva energética por el tiempo prolongado sin ningún tipo de sustrato policarbonado. Resiembras sucesivas en medio de cultivos e inoculación en animales de experimentación, podrían aclarar si este efecto observado por el método de preservación es reversible. La actividad proteolítica de los aislamientos no fue alterada por ninguno de los dos métodos.

Un aspecto, hasta ahora no evaluado en los cultivos preservados tanto por el método de Castellani como por otros, es la sensibilidad *in vitro*. En nuestro estudio pudimos apreciar que los aislamientos preservados por los dos métodos aquí evaluados fueron sensibles a los fármacos ensayados. Sólo la respuesta a yoduro de potasio fue diferente, siendo los aislamientos preservados en agua más sensibles a la concentración de 10 μ M.

Es bien conocida la eficacia del yoduro de potasio en el tratamiento de la esporotricosis. La literatura refiere que éste contribuye a reforzar la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares, disminuida en pacientes con esporotricosis [15] mas no en individuos sanos [12]. Sin embargo, el efecto directo del yoduro sobre el hongo se cree que es nulo [26], lo que nos hace sugerir que la sensibilidad *in vitro* mostrada en este trabajo por los aislamientos preservados en agua podría estar asociada más bien a alguna alteración inducida por la forma de preservación del hongo.

Con respecto al ordenamiento del *cluster* se puede establecer que las muestras mantenidas en agua presentan un mayor porcentaje de disimilitud que las mantenidas bajo resiembra trimestral, básicamente por dos aspectos: las muestras de agua se distribuyen en dos grupos y, a su vez, las distancias de agrupamiento entre las muestras son mayores que para las de resiembra trimestral.

Por orden correlativo de mayor a menor se puede establecer el grado de similitud entre las muestras de agua con la siguiente secuencia: 2888, 4526, 4513, 5000 y 4702, y, para las mantenidas por resiembra trimestral: 4513, 5000, 4702, 2888 y 4526, observándose que no se mantiene el mismo perfil de diferenciación entre el comportamiento de los aislamientos bajo los dos métodos de preservación. Esto permite sugerir que la viabilidad y comportamiento de un aislamiento no va a depender únicamente del método por el cual se mantiene, sino también del origen del mismo.

En este trabajo se demuestra una vez más la eficacia del método de Castellani para la preservación de la viabilidad de cultivos de *S. schenckii* durante 18 años, así como la estabilidad de muchas de sus características morfológicas, fisiológicas y de sensibilidad *in vitro*. Sin embargo, algunas de sus propiedades pueden verse alteradas, lo cual nos sugiere la importancia de realizar estudios que nos permitan un seguimiento y evaluación del efecto de los métodos de preservación, así como de las alteraciones fisiológicas u otras introducidas por el método, las cuales podrían atenuarse a través del tiempo, ya sea por resiembra sucesivas o por inoculación en animales de experimentación. Estudios de biología molecular podrían ser en un futuro de gran valor para evaluar la estabilidad genética de los aislamientos mantenidos durante años. Consideramos que este estudio representa una aportación útil y una alerta en cuanto al efecto que podrían tener las diversas técnicas de mantenimiento en la preservación de las cultivos durante largos periodos de tiempo sobre las cepas que se emplean como referencia en investigación.

A los bachilleres Miguel Torres, José Maldonado, Romel Aponte y Carola Hernández, estudiantes del Colegio Unidad Educativa Nacional "Juan Escalona" Caracas-Venezuela, por la valiosa colaboración que brindaron en este estudio.

Bibliografía

1. Albornoz MC de. Sporotrichosis. En: Hay RJ (Ed.) Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. London, Baillière Tindall, 1989: 71-96.
2. Boerlin P, Boertin PF, Durussel C, Addo M, Pagani J, Chave J, Bille J. Cluster of oral atypical *Candida albicans*. Isolates in a group of human immunodeficiency virus-positives drug users. J Clin Microbiol 1995; 33: 1129-1135.
3. Boesewinkel HJ. Storage of fungal cultures in water. Trans Brit Mycol Soc 1976; 66: 183-185.
4. Borba CM, Mendes da Silva AM, Oliveira PC. Long-time survival and morphological stability of preserved *Sporothrix schenckii* strains. Mycoses 1992; 35: 185-188.
5. Brummer E, Restrepo A, Hanson LH, Stevens DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of *in vitro* passage and storage. Mycopathologia 1990; 109:13-17.
6. Bueno L, Gallardo R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Rev Iberoam Micol 1998; 15: 166-168.
7. Burdsall HH Jr, Dorworth EB. Preserving cultures of wood-decaying *Basidiomycotina* using sterile distilled water in cryovials. Mycologia 1994; 86: 275-280.
8. Capriles CH de, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. Mycopathologia 1989; 106: 73-79.
9. Capriles CH de, Mata ES, Lander A, Camacho R. Experimental pathogenicity of *Sporothrix schenckii* preserved in water (Castellani). Mycopathologia 1993; 122: 129-133.
10. Carmichael JW. Viability of mold cultures stored at -20°C. Mycologia 1962; 4: 432-436.
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: 181-184.
12. Cunningham K. Phagocytosis and intracellular fate of *Sporothrix schenckii*. J Infect Dis 1979; 140: 815-817.
13. Gentles JC, Scott E. The preservation of medically important fungi. Sabouraudia 1979; 17: 415-418.
14. Ghosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. Mycoses 2001; 45: 449-454.
15. Gonzalez-Mendoza A, Melendez Ruiz CE, Ramos Zepeda R. Phagocytic activity of polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Sporothrix schenckii* in patients with sporotrichosis. Washington DC, Pan American Health Organization (Sc Publ No. 396) 1980: 308-311.
16. Lima RF, Borba CM. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 191-196.
17. Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Panamericana 1980.
18. Mc Ginnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. Appl Microbiol 1974; 28: 218-222.
19. Mendes da Silva AM, Borba CM, Oliveira PC. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. Mycoses 1994; 37: 165-169.
20. Mendes da Silva AM, Borda CM, de Oliveira PC. Inoculation of experimental animals with *Paracoccidioides brasiliensis* strains: An attempt to reestablish the dimorphic process and variation in pathogenicity as a function of time of preservation under mineral oil. Mycopathologia 1996; 133: 135-138.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002.
22. Pirt SJ. Parameters of growth and analysis of growth data. Chapter 2. In: Pirt SJ (Ed.) Principles of Microbe and Cell Cultivation. New York, John Wiley & Sons 1975.
23. Qiangqiang Z, Jiajun W, Li L. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: Comparison after 12 years. Mycoses 1998; 41: 255-257.
24. Rodriguez EG, Lirio VS, Lacaz CS. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse medico em agua destilada. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34: 159-165.
25. Sherf AF. A method for maintaining *Phytomonas sepedonica* in culture for long periods without transfer. Phytopathology 1943; 33: 330-332.
26. Torres-Mendoza BM, Vazquez-Valls E, Gonzalez-Mendoza A. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotrichosis. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 98-100.
27. Urdaneta MS, Silva Lacaz C. Preservation of fungi in distilled water. Preliminary results. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1965; 7: 24-26.