

DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA

de la

Universidad de Chile

Director: Prof. Dr. J. Noé.

## Sobre Cultivos de las Amibas y Diagnóstico de Laboratorio de la Amebiasis

por

**Amador Neghme R.**

(Recibido por la Redacción el 18—VI—36)

Gracias a la gentileza de mis distinguidos compañeros estudiantes de Medicina, puedo llegar hasta este centro científico de Concepción, para dar a conocer directamente uno de los progresos más valiosos de la técnica microbiológica en lo que respecta al estudio de la amebiasis.

Desde su llegada a Chile, el Prof. Noé se viene preocupando del estudio de la amebiasis en nuestro país, lo mismo que en el de las otras enteroparasitosis. Fruto de su activa labor son los trabajos sobre la anquilostomiasis, realizados primero de Enero a Julio de 1920 en colaboración con los Doctores **Walter Fernández** y **Ottmar Wilhelm**, estudios hechos entonces por primera vez en forma científica, y continuados después en 1920 con **Wilhelm, Viñals** y **Páez**. Podemos afirmar que la anquilostomiasis en campo abierto no ha sido demostrada aun en nuestro país.

En 1931, en la tercera reunión anual de medicina efectuada en Santiago, se trató extensamente sobre la frecuencia de la amebiasis. Los clínicos (Drs. **Cruz Coke, Lira, Alessandri, etc.**), sostuvieron en esa oportunidad que la práctica diaria y la Anatomía Patológica, les daban argumentos suficientes para afirmar que la disentería amibiana era con mucho, más frecuente que la bacilar, en Chile, de la que negaban la existencia de casos en el adulto. Los laboratoristas y, en especial la escuela del Prof. Noé (**Yáñez, Páez**) basados en los resultados obtenidos por los exámenes de deposición afirmaron que la amebiasis no era tan frecuente como los clínicos creían y que a menudo se diagnosticaron como dis. am. cuadros que no eran tales, por el sólo hecho de responder a la prueba terapéutica con la emetina. Da-

ban un porcentaje para la amebiasis que oscilaba entre 5 y 9%. De aquí que dicha reunión anual de medicina recomendaba especialmente la dilucidación de este tema.

Desde hace ya más que 2 años, hemos estado trabajando en este problema en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Prof. Noé y en el Servicio de Medicina Interna del Prof. Hernán Alessandri del Hospital Salvador de Santiago. Ultimamente hemos contado también con los enfermos de los Policlínicos del Seguro Obrero. Nos ha preocupado su estudio tanto del punto de vista estadístico como del apasionante aspecto del diagnóstico de laboratorio de las amebiasis que tantas dificultades ofrecen en la práctica diaria.

La exposición que hoy haremos tiene sólo el carácter de una comunicación preliminar y su alcance es casi más didáctico que científico.

### ALGUNOS DATOS HISTORICOS

Aún hoy, no se ha podido obtener cultivos puros de amibas. Las bacterias asociadas son el rompecabezas contra el que se han estrellado los esfuerzos de los investigadores. Pero es que las amibas son protozoos que exigen condiciones muy especiales de ambiente para prosperar y, si bien es cierto, que una de las cualidades de los seres vivos es su capacidad de regular sus actividades en armonía con las variaciones del mundo exterior, de adaptarse al ambiente, también es cierto que los animales son más exigentes con su ambiente, máxime aún los parásitos, debido a la degradación que afecta a su organización y a la especificidad a veces estricta de su mesonero.

De ahí que la base de todos, (o casi todos), los medios artificiales de cultivo de las amibas, traten de reproducir o imitar las condiciones naturales de existencia de dichos organismos: **Tienen un soporte sólido**, constituido, por lo general, por huevo coagulado, sangre calentada o agar inclinado; **una parte líquida**, por líquido de Locke o Ringer adicionados o de suero de distintos animales o de albúmina de huevo; **como alimento figurado** se coloca almidón de arroz.

Debido a esta misma causa se explican las dificultades en que tropezaron los primeros autores que intentaron este difícil estudio. Todo lo hecho hasta 1924, se limitó a ensayar los múltiples medios usados corrientemente en Bacteriología, haciéndoseles escasas modificaciones, fracasando como siempre que se pretende considerar con criterio bacteriológico a los parásitos animales, olvidándose que éstos son seres mucho más complejos y más exigentes que las bacterias.

El año 1924 marca una época en el estudio de la amebiasis: ese año, **Drbohlav** y **Boeck**, consiguen cultivar *Entamoeba dysenteriae* en el medio de Dorset modificado por la adición de lí-

quido de Ringer; es así que de Marzo a Octubre de 1924, logran hacer 160 repiques.

En 1926, **Brumpt** añade una modificación sumamente importante, como es la adición del almidón de arroz que, impidiendo el desarrollo de hongos como el *Blastocystes*, (verdadera plaga de los cultivos), permite obtener una mayor riqueza en amibas.

Ese mismo año, **Kofoid** y **Wagener**, llevados en el afán de eliminar en lo posible las bacterias que infectan los cultivos introducen el uso de la acriflavina, con buenos resultados, pero sin lograr su objetivo.

**Saint John**, **Yorke** y **Adams**, en 1926, obtienen el cultivo de amibas a partir de los quistes tetrágenos, usando el procedimiento de concentración que lleva sus nombres.

**Tanabe** y **Chiba**, japoneses, en 1928, describen un medio de fácil preparación y que al parecer, es el que ha dado más brillantes resultados. Está compuesto de agar al 1% y asparragina al 0,1%, como soporte sólido inclinado; como parte líquida, solución de Ringer, adicionado de suero de conejo o de caballo al 5%; agregándosele al usarlo, 0.05 gr. de almidón de arroz esterilizado.

Otros autores han ideado muchas otras variaciones, tales como agar al 3%, extracto de hígado inclinado, suero de Loeffler oblicuo, etc., pero que no alteran la base fundamental en que descansan los cultivos de amibas.

Por último, **Craig**, en 1927, trata de aplicar a la amebiasis la reacción de fijación del complemento y con ese objeto, emplea como antígeno extractos alcohólicos de *E. dysenteriae*, desarrolladas en los medios de cultivos. Después de 3 años de trabajo, llega a afirmar en 1930, "que la reacción de fijación del complemento es un test seguro para el diagnóstico de la *E. dysenteriae*".

## TECNICA GENERAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

No nos detendremos en detalles técnicos que sólo servirían para cansar.

La siembra se hace o partiendo de mucosidades ricas en amibas, o con quistes tetrágenos tratados previamente por el método de concentración de **Yorke** y **Adams**.

El éxito del cultivo depende de las precauciones que se tomen:

1).—La muestra que se siembra debe ser lo más fresca posible.

2).—Los tubos con medios de cultivos que se van a sembrar, deben colocarse con 24 horas de anticipación en la estufa a 37°, para probar su esterilidad y para mantenerlos a una temperatura apropiada en el momento de efectuar la siembra.

3).—El almidón de arroz debe ser de buena calidad y esterilizado al calor seco de 180° durante una hora.

4).—Debe seguirse escrupulosamente la técnica bacteriológica de siembra, esterilidad, asepsia, etc.

En los primeros cuatro días, los repiques se hacen cada 24 horas y después cada 48 o 72 horas.

El pH inicial de los medios de cultivo, fluctúa entre 6,8, y 7,6; como se ve, bordea los límites de la neutralidad. Este pH se hace al tercer día de 6,6, óptimo para el desarrollo de los parásitos.

## NUESTRA LABOR

Múltiples han sido los escollos que hemos tenido que vencer para lograr el cultivo de las amibas. Las dificultades de carácter técnico y la pobreza de medios con que contábamos hace un año en nuestro laboratorio fueron más de una vez capaces de desalentarnos. Pero el entusiasmo de mis maestros los profesores Noé y Alessandri, nos hizo perseverar con más ahínco. Los cultivos que hoy tenemos el honor de mostrar prácticamente aquí, son el resultado de nuestra labor.

Hemos ensayado varios medios:

a).—El de Locke-huevo-suero.

b).—El de Tanabe y Chiba.

c).—El de Simich, a base de suero coagulado.

El medio que nos ha dado mejores resultados es el de Tanabe y Chiba, adicionada la parte líquida de suero humano.

Hemos estudiado detenidamente las variaciones que experimenta el pH: en las primeras 24 horas es ligeramente alcalino, oscilando entre 7,2 y 7,8. Ya al tercer día es de 7 a 6,8 para alcanzar al cuarto día, el pH óptimo de 6,6, lo que se demuestra por la exuberante riqueza de amibas que presentan los cultivos de esa edad. En los días siguientes, el pH vuelve a hacerse alcalino, comenzando entonces, a disminuir la cantidad de amibas hasta desaparecer casi totalmente entre el octavo y décimo día.

¿A qué se deben estas variaciones de la reacción química de los medios? Es aquí donde desempeña su papel la flora bacteriana asociada.

Deschiens, (1929-1935), ha estudiado este punto, y ha llegado a la conclusión que esta flora asociada determina a la vez fenómenos de fermentación butírica del almidón y fenómenos de putrefacción de las substancias albuminoideas. Al tercer día predominarían las fermentaciones, alcanzándose entonces el pH óptimo de 6,6: a la inversa, cuando predominan las putrefacciones, (pH alcalino), las amibas empiezan a degenerar y desaparecer de los medios. No necesitamos insistir en el alcance clínico y terapéutico de estas consideraciones.

El estudio bacteriológico de la flora asociada de nuestros cultivos, hecho por la Dra. Pérez, del Laboratorio de Bacteriología de la Facultad, reveló un franco predominio del Colibacilo, existiendo además otros gérmenes; esta muestra es de un cul-

tivo del 3.º día. Seguimos estudiando más detenidamente este aspecto.

En algunos tubos hemos visto aparecer una vez, formas prequísticas de amibas. Este mismo hecho ha sido observado también por otros autores, como **Cleveland** y **Collier**, sin que hasta ahora haya podido precisarse el determinismo del enquistamiento. La inoculación experimental en el gato joven de las amibas de nuestros cultivos ha determinado en ellos las lesiones características de la disentería.

## VALOR E IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS DE AMIBAS

Es indudable que el perfeccionamiento de los medios de cultivos, facilitará enormemente el estudio de la amebiasis.

A menudo el clínico ante cuadros intestinales en que sospecha una disentería crónica rebelde, poco o mucho a la terapéutica emetínica, queda en la duda ante la negatividad de los exámenes de deposiciones.

Otras veces dicho examen revela la presencia de quistes tetrágenos, es decir, quistes con cuatro núcleos en su interior y todos sabemos que no es sólo *Entamoeba dysenteriae* la que puede darlos, sino que también otras amibas no patógenas o de patogenidad dudosa, tales como *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* y otras, como además las formas prequísticas de *Entamoeba coli*. Es aquí en donde los cultivos tienen su más alto interés: permiten el desenquistamiento de las amibas, facilitando así el diagnóstico. No negamos el que el estudio citológico, después, de tinciones y coloraciones delicadas, de los quistes, puede dilucidar el asunto; pero es más demoroso y no está al alcance de ninguno de los laboratoristas, distando sus resultados de ser tan exactos como la observación de las formas vegetativas con su típica movilidad.

Nosotros hemos logrado desenquistar las amibas en tres oportunidades en que sólo habíamos conseguido encontrar quistes tetrágenos en las deposiciones; sin embargo, hemos fracasado en otras tantas tentativas. La experiencia que diariamente vemos aumentando, formará nuestro criterio en este punto. Los medios de cultivo nos han dado el diagnóstico en un caso en que minuciosos exámenes de las deposiciones eran negativos.

**Craig, Saint John, Bundesen, Tsuchiga**, dicen haber diagnosticado con los medios de cultivo, el doble de casos de amebiasis que con los frotis. Empero, otros autores, como **Ward, Miller** y **Magath** afirman lo contrario. Es un punto que aún se discute.

Del mayor interés es el empleo del **test de fijación del complemento** para el diagnóstico de la amebiasis. Este método fué descrito por primera vez por **Craig** y no ha salido todavía del campo de los laboratorios de investigación científica. Se usa co-

mo antígeno, extracto de amibas obtenidas de cultivos muy ricos en ellas. En manos de **Tsuchiga** da el siguiente resultado: de 17 reacciones positivas, 4 fueron en casos en que el laboratorio no había podido evidenciar las amibas y clínicamente se consideraban como colitis crónicas ulcerosas. En un caso con amibas en las deposiciones el test serológico fué negativo. En manos de **Craig** la reacción da resultados brillantes. De 67 casos serológicamente positivos, 61 tenían en sus heces *E. dysenteriae*, o sea el 91%. De éstos, el 60% tenía signos clínicos de amebiasis y el resto, no tenía ninguna molestia. Eran, pues, de los llamados portadores sanos, o, como llaman acertadamente **Castex** y **Greenway**, "portadores latentes" ya que la amebiasis, enfermedad parasitaria, es de carácter crónico, con pousées agudas en su evolución.

Este medio diagnóstico debe ser más detenidamente estudiado, para poder aceptarlo. Sin embargo, no podemos "a priori" negar el valor de este medio de estudio. Dentro de poco, estaremos en condiciones de empezar su ensayo, que por sus dificultades, está todavía lejos de poder ser utilizado en el laboratorio clínico y como método diagnóstico hay que aceptarlo con las reservas de todo medio en estudio.

## CONSIDERACIONES ACERCA DEL DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA AMEBIASIS

Indudablemente que el diagnóstico de laboratorio de la amebiasis es difícil; requiere larga práctica y experiencia. El examen directo debe ser hecho sin apartarse de las normas establecidas desde antiguo para ello: temperatura de 37°, muestra recién emitida, etc.

El método de tinción de los frotis no es muy complicado, siempre que se haya practicado varias veces y se conozca bien la morfología de las amibas para no confundirlas con otros elementos de las deposiciones (macrófagos, células descamativas, restos alimenticios, etc.).

En los casos crónicos o sub-agudos, la búsqueda de los quistes tetrágenos constituye uno de los secollos más difíciles en que tropiezan los laboratoristas. El cultivo de las amibas, quizás, si el método de la fijación del complemento y la inoculación experimental en el gato, son los más valiosos auxiliares de que disponemos para su estudio. Nosotros, siguiendo rigurosamente la técnica, hemos logrado dilucidar en varias oportunidades numerosos casos. Así, en el servicio de medicina interna del Hospital Salvador dirigido por el Prof. **Alessandri**, donde tenemos el honor de tener a nuestro cargo las secciones de Coprología Clínica y Parasitología, en un 36,3% de colitis clínicamente amebianas, hemos logrado en un 21,1% evidenciar la presencia de *E. histolytica*. Conste que las muestras examinadas provenían en su mayor parte de mucosidades tomadas directamente del recto, pre-

via rectoscopía practicada por el especialista, Dr. Lerner. En tres meses de trabajo en la Sección Gastro-enterológica del Seguro Obrero, hemos tenido 71 casos de colitis crónica reagudizada, de los cuales el 27,3% era clínicamente sospechoso de amebiasis. Pues bien; en el 20% de ellos las investigaciones fueron positivas, poniendo en evidencia el parásito. El 7,3% restante no nos fué posible confirmarlo, o porque ya se les había colocado varias dosis de Emetina, o porque no concurrieron al examen.

**Se comprende, pues, que el resultado del examen depende más que nada, de las condiciones en que se le haga.**

Visto todo lo anterior, se comprende también, la dificultad que existe de poder obtener una estadística más o menos exacta de las diferentes amebiasis existentes en nuestro país. Todavía más: sin el ánimo de ofender a nadie, debemos confesar que todas las estadísticas hechas hasta hoy, adolecen de graves deficiencias en su investigación, debido a las causas antedichas: por esto es que distan mucho de ser exactas.

### ALGUNOS DATOS TERAPEUTICOS

Tratamiento seguido en el Servicio del Prof. Alessandri, después de confirmado el diagnóstico de amebiasis: dosis alta de Emetina subcutánea. Régimen blando, albuminoso. Cura "d'entretien" con arsenicales "per os".

### CONCLUSIONES

Debemos reconocer que la clínica estaba en lo cierto al afirmar que la amebiasis en nuestro país es frecuente; sin embargo, la experiencia recogida por el Prof. Noé, desde su llegada a Chile hace ya 24 años, le induce a reconocer cierta disminución en la morbilidad, quizás si por el uso muy difundido de la Emetina, que se administra precozmente. No obstante, hay que averiguar si esta causa ha determinado realmente una disminución de la morbilidad general, o bien, solamente una disminución de casos de laboratorio, o sea, los diagnosticados microscópicamente.

Esto, junto con el estudio prolijo de las diferentes especies de amibas descritas en el hombre, formará el objeto de nuestra investigación, la cual, disponiendo ya de una técnica adecuada y de suficiente organización, podrá aportar una doble ventaja a la clínica y a la medicina práctica en general.

