TECNICAS DE LABORATORIO

NUEVO METODO PARA OBTENER CULTIVOS DE AMEBAS A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES QUE CONTENGAN QUISTES Y ESTEN CONTAMINADAS POR BLASTOCYSTIS HOMINIS

Por VÍCTOR M. AYULO ROBLES

*Departamento de Bacteriología e Inmunología.
Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública.*

La obtención de cultivos puros de *Entamoeba histolytica* o *Entamoeba coli*, a partir de muestras de heces que contengan quistes de esos parásitos, es muy difícil cuando en ellas se encuentran también *Blastocystis hominis*, porque éstos desarrollando rápidamente en los medios de cultivo, modifican el Ph, haciéndolo impropio para el desarrollo de las amebas.

Por otra parte, si tenemos presente que el 75.39% de las muestras de heces en nuestro país son portadoras de *Blastocystis*, fácil será darse cuenta de las dificultades con que se tropieza para la obtención de cultivos puros de amebas. Dificultades con las que no solo nosotros hemos tropezado, sino también, todos aquellos que trabajan en el cultivo de amebas. De allí que, muchos investigadores hayan propuesto diferentes métodos para la obtención de cultivos de amebas a partir de muestras con quistes de *E. histolytica* y *Blastocystis*.

DOBELL demostró que, cuando las formas vegetativas de *E. histolytica* son expuestas a la acción del ácido clorhídrico N/20, de media a una hora, a temperatura del laboratorio, mueren; mientras los quistes soportan esta concentración por varias horas. Esta resistencia de las formas quísticas a la acción del HCl N/20 la aprovechó DOBELL para obtener cultivos a partir de muestras de heces con formas quísticas que estuvieran contaminadas por *Blastocystis*, ya que estos últimos no soportan la acción del HCl a esa concentración 30 minutos.

Nosotros empleamos una solución de ácido clorhídrico al 20 %, la cual mezclada con las heces que contengan los quistes y *Blastocystis*, se

filtra a través de una gasa para separar las partículas grandes; el filtrado se lo deja reposar 20 minutos, al cabo de los cuales se centrifuga, se decanta el sobrenadante y el sedimento se lava dos veces con agua destilada. El sedimento resultante del segundo lavado se siembra en los medios especiales de cultivo: el medio de CLEVELAND (1), el medio de DOBELL (2), etc., para *E. histolytica* o el medio que prescribimos cuando se trata de *E. coli* (3), colocándose a la estufa a 37°C.

Los tubos de medio sembrados deben ser revisados diariamente, y si a las 24 ó 48 horas no hay desarrollo, deben dejarse en la estufa 72 ó 96 horas, a fin de percatarse con toda seguridad, de si hay o no desarrollo; así, mientras las cepas Nos. 1150 y 1181 fueron positivas a las 72 hs., las Nos. 35.2 y U. 121 lo fueron a las 96 hs.

Este procedimiento lo empleamos por primera vez con la muestra de heces N° 1150 que presentaba gran cantidad de quistes de *E. histolytica* y *Blastocystis*, obteniendo el primer cultivo puro de amebas por este método. Aplicado nuestro procedimiento a la muestra N° 1181 que tenía muy pocos quistes de *E. histolytica* y gran cantidad de *Blastocystis*, obtuvimos el segundo cultivo puro de amebas.

Con este procedimiento hemos conseguido 100 % de positividad en la obtención de cultivos de *E. histolytica*.

Ahora bien aplicando el mismo método a las muestras portadoras de quistes de *E. coli* contaminadas con *Blastocystis*, nos dió tan buenos resultados como cuando fué aplicada a las que tenían quistes de *E. histolytica*, consiguiendo 93.3 % de positividad, como puede verse en el cuadro N° 1.

Con el objeto de determinar el tiempo que necesita una muestra de heces estar sometida a la acción del HCl al 20 % para destruir a los *Blastocystis* sin que se afecten los quistes de *E. histolytica* o de *E. coli*, hicimos una serie de pruebas con la muestra N° 35.2, portadora de quistes de *E. histolytica* y de *Blastocystis*, dejando actuar al HCl al 20 % por espacio de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente; al cabo de este tiempo se centrifugó, y el sedimento lavado 2 veces con agua destilada se sembró en 2 tubos del medio de Cleveland modificado por nosotros (4). Como control de las pruebas antes mencionadas se sembró la misma muestra que no había sufrido la acción del HCl en un tubo del mismo medio. Los 9 tubos fueron puestos a la estufa a 37°C. A las 24 hs. el tubo control presentaba abundante desarrollo de *Blastocystis*, mientras los tubos de las pruebas de 5, 10, 15 y 20 minutos respectivamente no lo presentaban.

A las 48 hs., mientras los tubos correspondientes a las 4 pruebas seguían negativos, el tubo control presentaba gran cantidad de *Blastocystis*. A las 72 hs., comenzaron a aparecer formas vegetativas de *E. histolytica* en los tubos correspondientes a las 4 pruebas sin *Blastocystis*, en tanto que el tubo control solo presentaba *Blastocystis*.

CUADRO Nº 1

Muestra Nº	Examen parasitológico	Cultivo	Tiempo
1150	Quistes de <i>E. histol.</i> y <i>Blastocystis</i> .	+++	72 hrs.
1181	" " " " " "	+++	72 hrs.
35.2	" " " " " "	+++	96 hrs.
45.2	" " " " " "	+++	72 hrs.
1208	" " " " " "	+++	72 hrs.
1216	" " " " " "	+++	72 hrs.
1248	" " " " " "	+++	48 hrs.
1249	" " " " " "	+++	48 hrs.
U121	" " " " " "	+++	96 hrs.
U137	" " " " " "	+++	48 hrs.
1233	Quistes de <i>E. Coli</i> y <i>Blastocystis</i>	+++	72 hrs.
1221	" " " " " "	+++	72 hrs.
1323	" " " " " "	+++	96 hrs.
100.2	" " " " " "	---	96 hrs.
2557	" " " " " "	+++	72 hrs.
2558	" " " " " "	+++	48 hrs.
2610	" " " " " "	+++	72 hrs.
2612	" " " " " "	+++	48 hrs.
P.3	" " " " " "	+++	72 hrs.
EM41	" " " " " "	+++	72 hrs.
EM48	" " " " " "	+++	96 hrs.
EM51	" " " " " "	+++	72 hrs.
EM58	" " " " " "	+++	72 hrs.
2851	" " " " " "	+++	72 hrs.
2862	" " " " " "	+++	96 hrs.

A las 96 hs. se pudo apreciar un abundante desarrollo de formas vegetativas de amebas en los tubos de las 4 pruebas, mientras en el tubo control solo se apreciaban *Blastocystis*. (Cuadro Nº 2).

Como en las pruebas antes citadas, la solución de HCl al 20 % dejara una muestra libre de *Blastocystis* a los 5 minutos, quisimos determinar el menor tiempo de exposición de las muestras de heces frente al

HCl al 20 % y con tal objeto utilizamos una nueva muestra del caso 35.2 portadora de gran cantidad de quistes de *E. histolytica* y de *Blastocystis*.

Con esta nueva muestra se repitieron las pruebas anteriores, dejando actuar la solución de HCl al 20 %: 1, 2, 3, 4 y 5 minutos, observándose que a las 24 hs., los tubos sembrados con la muestra que había sufrido la acción del HCl, 1 y 2 minutos, presentaban uno que otro *Blastocystis*, mientras que los tubos correspondientes a las pruebas de 3, 4 y 5

CUADRO No 2

Nº de tubos	Tiempo	Muestra No 35.2	HCl al 20 %	Resultado							
				24 hs.		48 hs.		72 hs.		96 hs.	
				Amebas	Blastocystis	Amebas	Blastocystis	Amebas	Blastocystis	Amebas	Blastocystis
2	5 m.	+	+	-	-	-	-	+	-	+++	-
2	10 m.	+	+	-	-	-	-	+	-	+++	-
2	15 m.	+	+	-	-	-	-	+	-	+++	-
2	20 m.	+	+	-	-	-	-	+	-	+++	-
1	-	+	-	-	++	-	+++	-	+++	-	+++

minutos no lo presentaban, en cambio, el control tenía gran cantidad de *Blastocystis*. A las 48 hs., mientras los tubos de las pruebas de 3, 4 y 5 minutos, seguían libres de *Blastocystis*, los correspondientes a las pruebas de 1 y 2 minutos y el control, presentaban gran cantidad de *Blastocystis*. A las 72 hs. se observó lo mismo que a las 48 hs., en lo que respecta a los *Blastocystis*, notándose la presencia de formas vegetativas de amebas en los tubos de 3, 4 y 5 minutos. A las 96 hs. se podía apreciar gran cantidad de amebas en los tubos de 3, 4 y 5 minutos. (Cuadro No 3).

En esta forma se puede obtener cultivos puros de *E. histolytica* o de *E. coli*; ya que la solución de ácido clorhídrico al 20 % destruye rápidamente a los *Blastocystis*, no así a los quistes de las amebas, los que resisten admirablemente la acción del HCl a la concentración que nosotros utilizamos.

CUADRO Nº 3

Nº de tubos	Tiempo	Muestra Nº 35.2	HCl al 20 %	Resultado							
				24 hs.		48 hs.		72 hs.		96 hs.	
				Amebas	Blastocystis	Amebas	Blastocystis	Amebas	Blastocystis	Amebas	Blastocystis
2	1 m.	+	+	-	+	-	+++	-	+++	-	+++
2	2 m.	+	+	-	+	-	+++	-	+++	-	+++
2	3 m.	+	+	-	-	-	-	+	-	+++	-
2	4 m.	+	+	-	-	-	-	+	-	+++	-
2	5 m.	+	+	-	-	-	-	+	-	+++	-
1	-	+	-	-	++	-	+++	-	+++	-	+++

CONCLUSIONES

1. Exponemos una nueva técnica para la obtención de cultivos de amebas: *histolytica* o *coli*, a partir de formas quísticas contaminadas por *Blastocystis*.

2. La solución de ácido clorhídrico al 20 % destruye rápidamente a los *Blastocystis* sin afectar la vitalidad de los quistes.

BIBLIOGRAFIA

1. CLEVELAND, L. R. y COLLIER JANE : *American Journal of Hygiene*, v. 12, p. 606, 1930.
2. DOBELL y LAIDLAW, P. : *Parasitology*, v. 18, p. 283, 1926.
3. VÍCTOR M. AYULO ROBLES : Por publicarse.
4. VÍCTOR M. AYULO ROBLES : Tesis para optar el grado de Bachiller en Medicina. 1941.