

## Entamoeba moshkovskii Tshalaia, 1941 en Costa Rica

por

Armando Ruiz\*

(Recibido para su publicación el 30 de setiembre de 1960)

La *Entamoeba moshkovskii* es una entameba de quistes tetranucleados, perteneciendo por lo tanto al grupo "histolytica". Es la única especie conocida del género *Entamoeba* que no es parásita; sin embargo, desde el punto de vista morfológico es casi idéntica a la *E. histolytica*.

De una revisión de la literatura existente sobre el tema, se desprende que es muy posible que el primer investigador que observó a esta interesante ameba fuera LACKEY (7) en 1925, quien en un trabajo sobre la fauna de los tanques de digestión en las plantas purificadoras de aguas negras en New Jersey (Estados Unidos), menciona la presencia de pequeñas amebas lobulosas, sin vacuolas pulsátiles. En 1941 TSHALAI (13) aísla una ameba del fango coleccionado de diversas partes de la planta purificadora de aguas negras de Moscú. La autora rusa incluye el rizópodo aislado en el género *Entamoeba* Casagrandi et Barbagallo y lo describe como *E. moshkovskii*. En 1942 WRIGHT y col. (16) notan en aguas negras de California una ameba que los autores consideran muy parecida a *E. histolytica*. Es muy probable que esta ameba fuera *E. moshkovskii*. TSHALAI (14) en 1947 vuelve a aislar en cultivo la *E. moshkovskii* de la misma planta purificadora ya mencionada, además la aísla también de diversas partes de la red de cloacas de Moscú. La autora menciona también el aislamiento de la entameba a partir del material tomado de dos estanques así como también del material coleccionado de un río en Minsk. GNEZDILOV (5) en 1947 la encuentra en aguas negras de Leningrado. En 1949 AMARAL y AZZI-LEAL (1) examinan el lodo digerido tomado de un tanque de digestión de una planta purifi-

---

\* Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica.

cadora de aguas de albañal en São Paulo, Brasil, y observan trofozoitos y quistes de una ameba muy semejante a *E. histolytica*. Puestos los quistes en un medio apropiado previo tratamiento con ácido clorhídrico, dieron origen a trofozoitos indistinguibles de los de *E. histolytica*, diferenciándose de éstos por no requerir una determinada temperatura para crecer, puesto que crecen bien a temperatura ambiente. Los autores brasileños creen que la entameba aislada sea la *E. moshkovskii* descrita en Rusia por Tshalaia. En 1950 AZZI-LEAL y AMARAL (2) no consiguen infectar cobayos ni tampoco logran aislar la entameba de heces humanas. NEAL (9) en 1950 notifica la presencia de *E. moshkovskii* en aguas negras de Londres. En 1953 NEAL (10) publica un extenso estudio sobre la morfología y biología de cuatro cepas de *E. moshkovskii*. PIZZI (11) en 1956 observa que la *E. moshkovskii* fagocita glóbulos rojos de mamíferos, pero no de aves y la considera un parásito potencial de los primeros. En 1958, DE CARNERI (3) prueba la acción de 16 fármacos sobre la *E. moshkovskii* aislada en el Brasil y a la vez indica que no ha podido aislar el rizópodo en cuestión de aguas negras de la región de Milán. En el mismo año, DE CARNERI (4) no logra infectar hamsters ni ratas blancas con la cepa brasileña de *E. moshkovskii*, llegando a la conclusión de que es muy remota la probabilidad de que la ameba en estudio sea una fase de vida libre de un protozooario parásito. En 1958 ROGAVA (12) encuentra *E. moshkovskii* en canales de irrigación y estanques en Tashkent, Rusia. LACHANCE (8) en 1959 aísla una cepa de *E. moshkovskii* de aguas negras de Ste. Anne de Bellevue en la Provincia de Quebec, Canadá. En este mismo año, GOLDMAN (6) encuentra que la *E. moshkovskii* no reacciona con el suero anti-*E. histolytica* marcado con fluoresceína. El autor no menciona el origen de la cepa de *E. moshkovskii*.

A mediados de este año logramos aislar en Cartago, Costa Rica, algunas cepas de *E. moshkovskii*, cuya comunicación es el objeto de la presente nota.

## MATERIAL Y METODOS

En Junio de este año se tomaron dos muestras del material contenido en los tanques de la planta purificadora de aguas negras de la Ciudad de Cartago. Las muestras se centrifugaron y el sedimento se observó a fresco y se cultivó en un medio difásico, usando como sustrato sólido suero humano coagulado y como sobrenadante un extracto de suero según la técnica de Westphal (15) para la preparación del medio de cultivo para *E. gingivalis*. Las entamebas aisladas se mantuvieron durante dos meses en dicho medio haciendo trasplantes cada semana, hasta que accidentalmente se perdieron.

En agosto de este año se tomaron de nuevo cuatro muestras del lugar ya indicado, lográndose aislar cinco cepas de *E. moshkovskii*, marcadas como CA-1, CA-2, CA-3, CA-4 y CA-5. Las entamebas se han mantenido hasta el

presente en el medio mencionado. Además, las hemos cultivado con sumo éxito en un medio elaborado por uno de nuestros asistentes\* para el cultivo de *E. vanarum*. Este medio se prepara como sigue: a 200 ml de solución de Ringer diluida a la mitad con agua destilada desionizada se le agregan 20 gm de intestino posterior (cloaca) de sapo (*Bufo marinus*) fraccionado en pequeños trocitos, o en su defecto 20 gm de ciego de cerdo. El tejido se lava previamente en solución salina para eliminar las heces. Se hierva durante media hora y se filtra luego por algodón de manera que se obtenga un líquido claro y libre de partículas. Se completa el volumen de 200 ml con agua destilada desionizada. Se entuba en cantidades de 6 ml por tubo de ensayo y se esterilizan por tindalización tres veces consecutivas durante una hora, cada vez. Al momento de usarse se agrega un poquito de almidón de arroz estéril y 10 mg de dihidroestreptomicina. Los trasplantes los efectuamos cada 15 días. Las amebas se reproducen abundantemente en cuanto que la flora bacteriana es reducida en comparación de los otros medios empleados. Cuando el almidón desaparece las entamebas enquistan. El medio preparado con cualquiera de los dos tejidos ya mencionados da resultados idénticos.

Para el estudio morfológico de la *E. moskovskii* se emplearon preparaciones teñidas. Es ya conocida la dificultad que existe en fijar el material de cultivos en cubreobjetos por los métodos usuales. Para este objeto hicimos uso de un fijador que hemos venido empleando con éxito en nuestro laboratorio para fijar material difícil de adherirse al cubre o portaobjetos. El fijador es el siguiente: a 100 ml de agua destilada se les agregan 5 gm de alcohol polivinílico. Se agita bien y se calienta a 70° C por algunos minutos hasta obtener una solución transparente u opalescente. Luego se agregan 100 ml de solución de bicloruro de mercurio alcohólica (2 partes de solución saturada de bicloruro de mercurio + 1 parte de alcohol de 95 por ciento). En un cubreobjetos desengrasado se pone una gota de sedimento que contiene las entamebas y luego se agrega una gota del fijador descrito. Se agita bien con un aplicador y luego se extiende formando una capa lo más delgada posible. Se deja secar durante 24 horas a temperatura ambiente y luego se procede de acuerdo con el método de Heidenhain para la tinción con hematoxilina férrica. Las fotografías que acompañan este trabajo están tomadas de preparaciones fijadas por el método descrito.

## RESULTADOS

En las primeras muestras recogidas en los tanques de la planta purificadora de aguas negras de Cartago, se observó en el sedimento obtenido por centrifugación pequeñas y escasas amebas con las características de *E. moskovskii*, junto con una serie más de mastigóforos y ciliados. Los cultivos mostraron amebas en regular cantidad a las 48 horas, siendo numerosísimas a los 8 días.

De las segundas muestras recogidas en el mismo sitio se aislaron cinco cepas con iguales características que las anteriores. De la cepa CA-3 son las fotografías que aparecen en este trabajo.

\* Sr. Edwin Valenciano.

Los trofozoitos observados a fresco muestran un movimiento muy activo y direccional, debido a la emisión de un lobópodo siempre en el mismo punto seguido por una corriente constante de citoplasma. El núcleo no se observa en la entameba viva, salvo en raros casos. Tampoco pudimos observar vacuola pulsátil.

Los trofozoitos de la cepa CA-3 miden de 8 a  $20\mu$  en su mayor diámetro, con un promedio de  $12,1\mu$ . En preparaciones teñidas con hematoxilina de Heidenhain los trofozoitos muestran un núcleo vesiculoso, que mide de  $1,4$  a  $4\mu$  de diámetro, con una capa de cromatina periférica constituida por una serie de gránulos estrechamente dispuestos, dejando a veces algunos espacios claros, tal y como se aprecia en las figs. 1 a 8.

El cariosoma es pequeño y central, a veces ligeramente excéntrico. En el espacio intranuclear no se observó gránulo alguno. El citoplasma contiene bacterias en pequeñas vacuolas alimenticias o gránulos de almidón.

Cuando se agota el almidón de arroz agregado a los medios de cultivo la entameba enquistada, dando quistes tetranucleados cuando maduros. Los quistes de nuestra cepa (CA-3) son pequeños, miden de  $5,3$  a  $10,6\mu$  de diámetro con un promedio de  $8,0\mu$ . Llama la atención la presencia de numerosos corpúsculos cromatoidales, aun desde la formación del quiste uninucleado; a veces son verdaderas masas como se puede apreciar en las figs. 11 y 12, que oscurecen los núcleos. Estos conservan las características del núcleo del trofozoito.

Nuestras cepas crecen tanto a  $37^{\circ}\text{C}$  como a temperatura ambiente, siendo ésta en la que se observa mayor desarrollo.

## DISCUSION

El hallazgo de *E. mosbkovskii* en Costa Rica amplía la distribución geográfica de esta curiosa entameba. La distribución geográfica pareciera ser universal, como se puede deducir de la revisión de la literatura existente (*vide supra*).

Se ha pensado que la *E. mosbkovskii* represente una fase de vida libre de alguna de las entamebas parásitas de quistes tetranucleados.

Por el hecho de encontrarse en cloacas y en los tanques de digestión de las plantas purificadoras se ha especulado que bien podría ser esta entameba la fase de vida libre de la *E. histolytica*, máxime que la entameba es capaz de fagocitar glóbulos rojos de mamíferos, inclusive los humanos (11); sin embargo, hasta el presente no se ha podido aportar evidencias para establecer la identidad de esta entameba con la *E. histolytica*. Por el contrario, las pocas investigaciones realizadas al respecto conducen a considerar a la *E. mosbkovskii* como una buena especie. Así, el intento de implantar *E. mosbkovskii* en diversos animales de laboratorio, algunos de ellos donde la *E. histolytica* evoluciona con facilidad, ha resultado infructuoso.

TSHALAI (13) no logra infectar gatos con trofozoitos ni quistes de esta ameba. La inoculación intracecal en ratas blancas jóvenes ha dado resultados negativos (4, 10). DE CARNERI (4), basándose en el hecho de que cepas de *E.*

*histolytica* de difícil implantación en el ciego de ratas adquieren mayor infectividad y aún virulenta cuando se les inocula previamente en hígado de hamster, inyecta estos animales intrahepáticamente con *E. moshkovskii* obteniendo resultados negativos, puesto que la ameba no sobrevive más de tres o cuatro días en este habitat. Tampoco se ha podido obtener infecciones en cobayos (2). Nosotros hemos hecho numerosas tentativas de obtener *E. moshkovskii* directamente de heces humanas, cultivando éstas en las condiciones apropiadas y siempre hemos obtenido resultados negativos, hecho ya indicado por AZZI-LEAL y AMARAL (2) en Brasil. Desde el punto de vista serológico se aparta la *E. moshkovskii* de la *E. histolytica*, puesto que GOLDMAN (6) obtiene resultados negativos al poner trofozoitos de *E. moshkovskii* en presencia de suero anti-*E. histolytica* marcado con fluoresceína. Todo esto nos conduce a pensar en la remota posibilidad de que la *E. moshkovskii* sea una fase de vida libre de *E. histolytica*.

La *E. moshkovskii* se ha aislado también de estanques (12, 14), ríos (14) y canales de irrigación (12), suceso que ha permitido pensar en la posibilidad de que esta entameba constituya una fase de vida libre de *E. ranarum*. TSHALAIA (14) trató de infectar renacuajos de rana (no se indica la especie) sin ningún éxito. NEAL (10) tampoco consigue infectar renacuajos de *Rana temporaria* ni larvas de *Salamandra maculosa*. Pareciera entonces que la *E. moshkovskii* no tiene nada que ver con la *E. ranarum*.

Concluyendo, podemos decir que la *E. moshkovskii* pareciera no corresponder a ninguna fase evolutiva de las entamebas parásitas y que debemos considerarla como una buena especie.

## AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer aquí al Sr. José Rafael Brenes por las tomas de las muestras.

## RESUMEN

Se menciona el hallazgo de *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941 en los tanques de digestión de la planta purificadora de aguas de albañal de la Ciudad de Cartago, Costa Rica.

Se describen los medios de cultivo empleados y la técnica de fijación usada para la observación de preparaciones teñidas.

Se hace una breve descripción de la cepa costarricense de *E. moshkovskii*, acompañándola de algunas fotomicrografías.

El autor considera a la *E. moshkovskii* como una buena especie y no cree que se trate de una fase de vida libre de alguna de las entamebas parásitas de quistes tetranucleados.

## SUMMARY

The finding of *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941 in the sewage digestion tanks of the City of Cartago, Costa Rica is mentioned.

A description of the culture media and the fixation technique employed in the observation of stained preparations is given.

A brief description of the strain of *E. moshkovskii* isolated in Costa Rica, together with some photomicrographs, is presented by the author.

*E. moshkovskii* is considered as a good species by the author, not believing that this is a case of a free-living phase of some parasitic entamoeba with tetranucleate cysts.

## BIBLIOGRAFIA

1. AMARAL, A. D. & R. AZZI-LEAL  
1949. Sôbre uma *Entamoeba* semelhante a *E. histolytica* encontrada em material de esgoto. *Rev. Paulista Med.*, 34:173-176.
2. AZZI-LEAL, R. & A. D. AMARAL  
1950. Novos estudos sôbre amebas encontradas em esgoto com referencia especial a uma endamoeba (*E. moshkovskii*) semelhante a *Endamoeba histolytica*. *Arq. Fac. Hig. Saude Publ. Univ. S. Paulo*, 4: 125-134.
3. CARNERI, I. DE  
1958. Studi su *Entamoeba moshkovskii*. I. Velocità d'azione di 16 farmaci sui trofozoiti di *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941 a 3 diverse temperature. *Riv. Parasit.*, 19:81-89.
4. CARNERI, I. DE  
1958. Studi su *Entamoeba moshkovskii*. II. *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941, come potenziale parassita: sua sopravvivenza nelle infezioni sperimentali intrapatiche dell'hamster e indociecali del ratto albino. *Riv. Parasit.*, 19: 161-168.
5. GNEZDILOV, V. G.  
1947. La distribución geográfica, epidemiología y profilaxis de la amibiasis (en ruso). *Med. Parazitol. Parasitar. Bolezni*, 16: 13-32.
6. GOLDMAN, M.  
1959. Microfluorimetric evidence of antigenic difference between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba bartmanni*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102: 189-191.
7. LACKEY, J. B.  
1925. Studies on the biology of sewage disposal. The fauna of Imhoff tanks. *Bull. N. I. Agric. Exp. Sta.*, N° 417, 39 pp.
8. LACHANCE, P. J.  
1959. A canadian strain of *Entamoeba moshkovskii* Chalaia, 1941. *Can. J. Zool.*, 37: 415-417.
9. NEAL, R. A.  
1950. A species of *Entamoeba* from sewage. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 44: 9.

10. NEAL, R. A.  
1953. Studies on the morphology and biology of *Entamoeba mosbkovskii* Tshalaia, 1941. *Parasitology*, 43: 253-268.
11. PIZZI, T.  
1956. Observaciones sobre fagocitosis de eritrocitos por *Entamoeba mosbkovskii* Tshalaia, 1941, *Bol. Chileno Parasit.*, 11: 7-9.
12. ROGAVA, L. I.  
1958. Sobre *Entamoeba mosbkovskii* (en ruso). *Med. Parazitol. Parazitar. Bolezni*, 27: 330-334.
13. TSHALAIA, L. E.  
1941. Sobre una especie de *Entamoeba* hallada en aguas de albañal (en ruso). *Med. Parazitol. Parazitar. Bolezni*, 10: 224-252.
14. TSHALAIA, L. E.  
1947. Contribución al estudio de *Entamoeba mosbkovskii* (en ruso). *Med. Parazitol. Parazitar. Bolezni*, 16: 66-69.
15. WESTPHAL, A.  
1941. Ein Kulturverfahren für *Entamoeba gingivalis* und dessen Anwendung für die Differentialdiagnose von *E. gingivalis* und *E. histolytica*. *Dtsch. tropenmed. Ztschr.* 45: 685.
16. WRIGHT, W. H., E. B. CRAM & M. O. NOLAN  
1942. Preliminary observations on the effect of sewage treatment processes on the ova and cysts of intestinal parasites. *Sewage Works*, 14: 1274-1280.

Fig. 1 a 12: *Entamoeba moskovskii*. Col. hematoxilina férrica de Heidenhain, ca. 1800  $\times$ .

Fig. 1 a 9: Diversas formas de trofozoitos.

Fig. 10: Trofozoito binucleado.

Fig. 11: Quiste uninucleado.

Fig. 12: Quiste con numerosos corpúsculos cromatoidales que cubren a los núcleos.



