UNE NOUVELLE PREUVE DE LA POSSIBILITÉ DE CULTIVER *ENTAMÆBA DYSENTERIÆ* TYPE *HISTOLYTICA* ⁽¹⁾

Par Jaroslav J. DRBOHLAV, M. D., P. H. D.
de l'Institut d'Hygiène d'Etat, Prague (Tchécoslovaquie)

L'année dernière, travaillant au laboratoire de Pathologie Comparée, dirigé par le professeur E.-E. Tyzzer, de l'Université de Harvard, Boston, U. S. A., le D^r W.-C. Boeck et moi sommes arrivés par hasard à démontrer qu'il est possible de cultiver *E. dysenteriae*, contrairement à l'opinion généralement admise jusque-là. Deux souches d'origine différente ont été isolées à ce moment.

Retournant à Prague après un voyage d'études aux Etats-Unis, je n'ai pu transporter les subcultures au-delà des mers, étant données les difficultés techniques de conservation sur les navires et en voyage. Mais, en arrivant à Londres, l'hospitalité me fut donnée au Wellcome Bureau of Scientific Research par le D^r Wenyon et le 3 novembre une troisième souche fut isolée d'un cas fourni par le professeur Manson-Bahr. Le 7 novembre, nouveau cas et nouvelle culture. Je sais que la première souche de Londres est conservée encore à l'heure actuelle. Un chat fut inoculé avec la huitième subculture et l'infection fut évidente neuf jours après. Deux fois on essaya de cultiver les amibes provenant des matières de ce chat, et deux fois on y réussit sans difficulté.

La méthode fut exposée à la réunion de la Société Royale de médecine tropicale et d'hygiène de Londres, le 20 novembre 1924.

En arrivant à Paris, je reçus l'hospitalité du professeur Brumpt, au Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de médecine et, après avoir préparé les milieux nécessaires, une nouvelle souche fut obtenue le 22 janvier, en partant d'un cas de dysenterie amibienne contractée en France. C'est la cinquième souche obtenue directement en partant de l'homme, chacun de ces 5 cas ayant une origine différente. Je désire exprimer mes remerciements au D^r Goiffon qui a eu l'amabilité de m'adresser les selles d'un malade soigné par lui.

Deux jeunes chats inoculés le 12 et le 14 mars avec des amibes de la 33^e génération, tombèrent malade et moururent de dysenterie

(1) Traduit du manuscrit original par le D^r Henri GALLIARD.

amibienne typique. La démonstration de la méthode fut faite à la réunion de la Société de pathologie exotique du 11 février 1925.

Jusqu'à ce moment le milieu original de W.-C. Boeck et la gélose-sang furent seuls utilisés. Ayant la possibilité de continuer mes recherches au Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Paris, grâce à la générosité de l'« International Health board » qui prolongea la durée de ma bourse, je me suis appliqué surtout à simplifier la méthode de culture. Sur le milieu original de Boeck, les amibes vivaient de 3 à 6 jours et les repiquages devaient être faits tous les 3 ou 4 jours.

Le milieu de gélose-sang, utilisé pour démontrer la phagocytose des hématies par *E. dysenteriae in vitro*, ne donne pas non plus des résultats très satisfaisants, ni constants, car, étant très nutritif, les bactéries s'y multiplient d'une façon intense et élaborent probablement des produits toxiques qui tuent rapidement les amibes. Pour cela, je décidai d'étudier séparément toutes les substances composant la gélose-sang pour découvrir celles qui étaient indispensables à la culture. Ces substances étaient : la gélose, les sels, le sang, le liquide ovomucoïde destiné à couvrir les milieux.

Les résultats furent les suivants : gélose à 1,4 p. cent avec 0,5 p. cent de chlorure de sodium.

On prépara d'abord des tubes de gélose N.N.N., c'est-à-dire 1,4 p. cent de gélose dans l'eau distillée, 0,5 p. cent de NaCl, remplis de liquide ovomucoïde après inclinaison et solidification. Dans ce milieu, des amibes de culture, ensemencées, se multiplièrent bien, la culture étant plus riche qu'avec le milieu à l'œuf. Les bactéries étaient peu nombreuses étant donné la faible valeur nutritive du milieu, mais elles étaient en nombre suffisant pour servir de nourriture aux amibes. Pour la même raison, la réaction du milieu ne changea pas très vite, ce qui explique peut-être ce fait que les amibes vécurent bien, sans repiquage, de 10 à 24 jours.

Pour savoir quelles étaient les substances pouvant améliorer ce milieu si simple, on sema des tubes de gélose à la glycérine, de gélose ascite, de gélose peptonée, recouverts de liquide ovomucoïde. Des cultures furent obtenues, mais ces milieux étaient très inférieurs, toujours pour les mêmes raisons : multiplication des bactéries, élaboration de produits toxiques et acidification rapide du milieu. Les amibes ainsi obtenues étaient d'un type plus petit et dégénéraient rapidement en quelques jours.

De même l'utilité du sel fut recherchée ; la gélose N.N.N. fut préparée avec de l'eau distillée. Il n'y eut pas de culture, malgré la présence de bactéries pouvant servir de nourriture aux amibes. De même un milieu hypertonique, avec 0,6 p. cent de NaCl, ne fut pas favorable.

Pour donner la possibilité aux amibes de phagocyter des hématies, le milieu fut additionné de quantités variables de sang de lapin, de chat et d'homme. Aucun résultat satisfaisant ne fut obtenu, en raison de la multiplication intense des bactéries. Il en fut de même avec du sang inactivé à 56° pendant une demi-heure.

La gélose N.N.N. fut additionnée ensuite d'hémoglobine en poudre (0,5 p. cent à 5 p. cent). Les tubes furent passés à l'autoclave, inclinés, puis on y ajouta du liquide à l'œuf. Là encore les bactéries pullulaient et les amibes étaient peu nombreuses. Les résultats obtenus furent encore plus mauvais avec de l'hémoglobine sèche, à froid, dans le liquide de Ringer et après filtration au filtre Berkefeld. L'hémoglobine n'était donc pas nécessaire à la culture des amibes.

La gélose-sang, coagulée à 100° pendant 30 minutes (chocolate medium) et recouverte ensuite de liquide ovomucoïde, donna de très bons résultats. Les amibes étaient très nombreuses et de grande taille, les bactéries assez rares. Les amibes vécurent sans repiquage de 8 à 12 jours. Ce milieu parut excellent pour isoler les amibes en partant du chat, mais non de l'homme et pour conserver les souches au laboratoire.

De plus, quand ces amibes sont conservées longtemps sur leur milieu peu nutritif, comme la gélose pour milieu N.N.N., un simple passage sur ce milieu leur rend leur vitalité.

M'inspirant des expériences de culture d'*Histomonas meleagridis*, parasite du blackhead, qui paraît choisir électivement les granules d'amidon, j'ai préparé deux milieux : l'un composé d'une solution de Ringer, avec un régulateur et 1 p. cent d'amidon, répartie dans des tubes de gélose ordinaire ; l'autre formé de gélose, avec 1 p. cent d'amidon, dissoute dans la solution de Ringer avec régulateur, solidifiée et recouverte de liquide ovomucoïde. Dans le premier cas, les résultats furent satisfaisants ; ils furent meilleurs encore dans le second. Ce milieu était de plus préférable à la gélose ordinaire. Une culture d'*E. dysenteriae* était encore vivante et donna une subculture positive au bout de 27 jours. La virulence en était conservée ainsi que le prouvèrent les inoculations au chat.

La gélose à l'amidon doit être préparée avec le liquide de Ringer et un produit régulateur, car les bactéries se multipliant, le plan solide est morcelé, le milieu devient rapidement acide et les amibes ne se développent plus.

Après cette étude de la base solide du milieu, j'ai étudié la partie liquide. Comme je l'ai décrit en détail dans mon premier article sur la culture d'*E. dysenteriae*, la solution de Locke, avec 1/8 ou 1/10 de sérum d'homme ou de cheval, fut employée pour recouvrir les

milieux solides à l'œuf ou à la gélose. En raison de la multiplication des bactéries, j'ai eu recours à la solution de Locke avec albumine d'œuf, à cause de son léger pouvoir bactéricide. Mais plus tard on nota que la fermentation du glycose de la solution de Locke, due aux bactéries, acidifiait rapidement le milieu. La solution de Ringer fut alors utilisée pour la préparation du liquide ovomucoïde.

J'ai supprimé la filtration du liquide au Berkefeld et simplifié la méthode en ajoutant un ou deux blancs d'œuf à un litre de solution de Ringer dans un flacon à billes de verre et en agitant fortement pour dissoudre et homogénéiser ; les impuretés se déposent rapidement et le liquide surnageant est réparti dans les différents tubes. En manipulant les œufs avec soin, on ne risque aucune contamination nuisible.

J'ai recherché un liquide pouvant être stérilisé à l'autoclave. Les substances suivantes dissoutes dans la solution de Ringer, dans la proportion de 1 p. cent à 5 p. cent, furent essayées : nucléine, créatine, inuline, amidon, dextrine, glycose, caséine et levure. Les amibes se multiplièrent seulement dans les solutions suivantes : 1 p. cent de nucléine, 1 p. cent de dextrine, 1 p. cent d'amidon, 1 et 5 p. cent de caséine, mais mal et insuffisamment pour que l'on pût employer ces solutions pour la culture courante.

Au cours de recherches sur l'enkystement, j'ai remarqué que la quantité de liquide joue un rôle important. Les expériences furent faites avec les milieux à la gélose et à la gélose-sang, en faisant varier la quantité du liquide ovomucoïde de 1/2 cc. à 8 cc.

Sur le milieu solide sec, aucun développement. A partir de 1/2 cc., la culture est positive, elle est abondante quand le liquide atteint 3 à 4 cc. et diminue ensuite ; de 6 à 8 cc., la culture est nulle. Ceci s'accorde avec le fait que la culture sous une couche d'huile ou par la méthode de Buchner est impossible. *E. dysenteriae* semble être partiellement aérobie.

La question du pH du milieu est également d'une importance vitale et fut déjà mentionnée dans le premier travail original. Le mucus sanglant des selles humaines et des selles de chats inoculés est neutre ou légèrement alcalin (pH 7-7,2). Au contraire, les selles de chats infectés, avant la période des mucosités sanglantes, est fortement acide (pH 5,4-6,4), mais cependant on y voit souvent de nombreuses amibes. Des séries de tubes furent donc préparées d'une acidité variant de 5,0 à 8,2. Aucune culture ne fut observée de 5,2 à 6,2. Les cultures débutèrent à 6,4, étaient très abondantes à 7,4 et continuaient à 8,2. Il en fut de même quand la variation d'acidité était produite par les bactéries. Aussitôt que la réaction devient acide, plus bas que pH 6, le nombre des amibes diminue ;

elles dégénèrent et meurent. Exceptionnellement on en trouva un nombre considérable dans des tubes pH 5,4, mais elles moururent rapidement. Dans les tubes de gélose, quand la réaction d'une culture dégénérée est ramenée à pH 7,4 par addition de NaOH ou KOH dans la solution de Ringer, les amibes se multiplient de nouveau et retrouvent leur apparence normale et leur vitalité.

Cette importance vitale de la réaction du milieu me conduisit à rechercher les substances susceptibles d'empêcher l'acidification. En premier lieu, l'addition de 0,5 p. cent de phosphate monopotassique fut essayée en raison des propriétés empêchantes de ce corps.

D'autre part, le carbonate de calcium qui absorbe l'excès d'acide fut essayé mais avec résultat partiel dans les deux cas. On ne put trouver le moyen d'empêcher le changement lent de la réaction du milieu et, aussi longtemps que nous aurons des cultures contenant des bactéries variées, les chances de succès seront douteuses.

En partant de ce principe, des essais furent tentés de nourrir les amibes avec des bactéries tuées ou d'obtenir une culture pure avec une seule espèce de bactérie, parmi celles qui produisent peu d'acidité (*typhosus*, *fæcalis alcaligenes*, etc.), mais sans succès apparent.

J'ai essayé également de résoudre ou d'élucider la question de l'enkystement. L'action du scatol fut essayée, d'après le rapport de Cutler. Différentes solutions de scatol dissoutes dans la solution de Ringer furent ajoutées au liquide ovomucoïde des tubes de cultures de façon à obtenir des dilutions de 0,5 à 25 p. cent, mais sans résultat. Les amibes vivaient ou mouraient dans ces tubes sans enkystement. D'autres substances, telles que la bile, l'urine, la créatine, la nucléine, l'inuline, la caséine, la dextrine, l'amidon, donnèrent le même résultat. Pensant que la dessiccation lente du contenu du gros intestin pouvait provoquer la formation de kystes, le liquide de tubes de cultures positives était retiré peu à peu jusqu'à dessiccation complète ; jusqu'à 1/2 cc. les amibes vivaient, puis ensuite dégénéraient et mouraient.

De même l'ensemencement sur un milieu semi-solide de gélose, avec 1,5 p. cent d'amidon, liquéfié et refroidi, juste avant solidification, ne donna aucun résultat. Le refroidissement des cultures positives au-dessous de 30° fit mourir les amibes sans faire paraître les kystes. Les variations du pH furent essayées sans plus de résultat.

Après avoir réussi la culture et conservé les amibes pendant longtemps dans un même tube, je me suis demandé si ces amibes ne perdaient pas leur vitalité et leur pouvoir infectant pour le chat. Huit petits chats de 400 à 700 grammes furent inoculés à différents intervalles avec des amibes de la 45° à la 51° génération, après une

culture de 4 à 5 mois, provenant du milieu gélose simple et gélose-sang chauffé. Tous les chats, sauf un, moururent et montrèrent des lésions typiques de dysenterie, 4, 5, 9, 13 et 15 jours après l'inoculation. L'insuccès s'explique par le fait que le chat rendit le liquide peu de temps après l'inoculation. C'est donc une preuve que les amibes, même après une culture prolongée, ne perdent pas leur pouvoir infectant. La durée de l'incubation n'était pas plus longue que lorsque l'on inocule des matières humaines, ou par passage de chat à chat. La quantité d'amibes inoculée semble être en rapport avec la durée de l'incubation.

Il semble donc important d'attirer l'attention sur notre technique d'inoculation qui a été décrite dans le premier article mais auquel on doit ajouter quelques observations. Le chat est endormi à l'éther ce qui supprime son tonus intestinal. On peut masser l'intestin pour en exprimer auparavant l'excès des matières, et même lui laver l'intestin avec une solution physiologique. Puis 5 à 10 cc. de la culture diluée sont inoculés au moyen d'une longue canule introduite dans le rectum aussi loin que possible. Puis la canule est retirée, l'anus est nettoyé à l'éther, puis recouvert d'une couche de collodion et d'un morceau impalpable de coton hydrophile. La narcose est maintenue jusqu'à dessiccation complète du collodion. Le chat est ensuite remis dans sa cage et nourri au lait. Après 36 à 48 heures, on ramollit le bouchon anal avec de l'éther et on le retire avec des pinces. D'habitude dans les matières émises alors on trouve déjà des amibes en nombre considérable, ce qui prouve que l'infection a déjà débuté. Quand le bouchon est laissé plus de 2 jours, le chat peut mourir d'intoxication, parfois le chat en présente les symptômes plus tôt. Mais en général cette période de 36 à 48 heures est suffisante pour obtenir 100 p. cent de succès. Quand les chats sont plus âgés, il est prudent de leur mettre un collier spécial qui les empêche d'arracher le bouchon avec leurs dents.

PRESRIPTIONS POUR LA PRÉPARATION DES MILIEUX :

Solution de Ringer :

Eau distillée	1.000 cc.
Chlorure de sodium	6 gr.
Chlorure de potassium	0 gr. 10
Chlorure de calcium	0 gr. 10
Bicarbonate de sodium	0 gr. 10

Quand on veut « amortir » la solution, on ajoute 0,5 p. cent, c'est-à-

dire 5 gr. par litre, de phosphate monopotassique. La réaction du milieu doit être ramenée à pH 7,4 avec KOH ou NaOH.

Liquide ovomucoïde :

Un flacon à billes de verre de un litre, stérile, est rempli à moitié avec la solution stérile de Ringer. Nettoyer un œuf avec de l'alcool, le laisser sécher dans une boîte de Pétri stérile et se désinfecter les mains aussi bien que possible, briser la coquille et verser le blanc d'œuf dans la solution. Eviter surtout d'ajouter des traces de jaune. La bouteille est bouchée et secouée pendant plusieurs minutes pour dissoudre. Si la solution de Ringer présente un pH 7,2 à 7,4 la réaction du produit obtenu est identique. La solution peut alors être répartie dans les tubes, sans filtration.

Base solide de gélose N.N.N. :

Solution de Ringer avec régulateur pH 7,4.....	1 litre
Gélose pour milieu N.N.N.	14 gr.

Dissoudre à l'autoclave, stériliser 30 minutes, répartir en tubes, incliner. Après solidification, recouvrir de liquide ovomucoïde.

Milieu à l'amidon :

Solution de Ringer avec régulateur pH 7,4	1 litre
Gélose	14 gr.
Amidon	10 gr.

Dissoudre et stériliser à l'autoclave 30 minutes, répartir en tube, incliner, recouvrir de liquide albumineux après refroidissement. Ne jamais dissoudre la gélose dans un milieu acide, ce qui l'empêche de se solidifier.

Milieu gélose-sang chauffé :

Préparer le milieu N.N.N. ordinaire avec un sang quelconque, chauffer les tubes inclinés à 100° pendant 30 minutes. Le milieu prend une couleur chocolat. Refroidir et recouvrir de liquide ovomucoïde.

RÉSUMÉ

J'ai donné une nouvelle preuve de la possibilité de cultiver *E. dysenteriae*. Deux souches provenant de l'homme ont été isolées en Angleterre, et une troisième, provenant d'un cas autochtone de dysenterie, a été isolée à Paris.

La souche française, actuellement au 65^e passage, est conservée depuis 6 mois, en bonne condition. A l'heure où j'écris cet article, les amibes ont gardé toutes leurs propriétés morphologiques et biologiques. Les essais de culture à partir de chats infectés furent nombreux et toujours aisés.

Une étude détaillée des conditions de culture a été faite et plusieurs milieux ont été proposés. La gélose ordinaire préparée avec une solution de Ringer, la gélose avec amidon préparée avec la même solution, mais amortie, les deux milieux étant recouverts de liquide albumineux, peuvent servir de bons milieux de conservation. Les amibes ont vécu parfois de 24 à 27 jours dans un même tube quand la réaction du milieu ne changeait pas.

Le milieu N.N.N. chauffé est en réalité une amélioration du milieu au sang ordinaire que nous avons utilisé au début. Il peut être utilisé aussi bien pour isoler une souche que pour la conserver.

Les amibes se multiplient rapidement et vivent de 8 à 12 jours. Ce milieu est commode à employer dans les laboratoires de protozoologie où il est d'un usage courant et on peut également utiliser les tubes de rebut. Ce même milieu convient également bien aux divers flagellés intestinaux, *Trichomonas*, *Blastocystis*, etc.

La préparation du liquide ovomucoïde a été simplifiée par suppression de la filtration.

Par hasard j'ai observé qu'en ajoutant 1 p. cent de dextrine à la solution de Ringer servant à préparer le liquide ovomucoïde que l'on ajoute aux divers milieux solides, on évite la multiplication des *Blastocystis*; les amibes sont indemnes du moins pendant un certain temps. Après quelques repiquages sur ce milieu spécial, il faut revenir au milieu ordinaire. Cette découverte m'a beaucoup servi, car souvent les *Blastocystis* m'ont considérablement gêné: les cultures contaminées étaient toujours perdues.

D'autres détails concernent l'importance du pH du milieu, de la température et de la quantité de liquide. La question de l'enkystement n'est pas résolue.

Pour réussir la culture des amibes, il faut observer strictement certaines prescriptions: les matières doivent être fraîchement émises et tièdes, les milieux doivent être à 37° au moment de l'ensemencement. Pour l'examen des amibes de tout genre, le microscope en chambre chaude est indispensable. Cet appareil a été décrit dans le dernier numéro de ce journal.

Les détails de l'inoculation aux animaux ont été également donnés.

Je désire exprimer ma reconnaissance au professeur Brumpt pour l'hospitalité qu'il m'a donnée dans son laboratoire, pour

toutes ses suggestions et pour l'aide qu'il m'a apportée dans mon travail, ainsi qu'au D^r Langeron, chef de laboratoire, qui m'a aimablement fourni tous les documents qui m'étaient nécessaires.

BIBLIOGRAPHIE

- BOECK (W.-C.) et DRBOHLAV (J.). — *American Journal of Hygiene*, 1925.
- BRUMPT (E.). — L'étuve à microscope de N. Foot. *Ann. de Parasitologie*, III, N° 3, juillet 1925, p. 252.
- CUTLER. — Observations on *Entamœba histolytica*. *Parasitology*, XI, N° 2, février 1919, p. 127.
- DRBOHLAV (J.). — Démonstration and explanations of the method for cultivation of *Entamœba histolytica*. *Transactions of the Royal Soc. of Trop. Medic. and Hyg.*, XVIII, 20 novembre 1924, p. 238-240.
- Présentation d'amibes dysenteriques en culture. *Bull. Soc. pathol. exot.*, XVIII, 11 février 1925, p. 121.
- Cultivation of *Histomonas meleagridis*, parasite of blackhead. *Report given on the meeting of the Assoc. of Americ. bacter. and pathol. at Buffalo*, april 1924. *Amer. Jour. of pathology*, 1924.

Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de médecine de Paris.