

Howard University

Digital Howard @ Howard University

Faculty Reprints

9-1-1933

The Puerto Rican Strain of Endameba Histolytica

Hildrus A. Poindexter

Follow this and additional works at: <https://dh.howard.edu/reprints>

Recommended Citation

Poindexter, Hildrus A., "The Puerto Rican Strain of Endameba Histolytica" (1933). *Faculty Reprints*. 161. <https://dh.howard.edu/reprints/161>

This Article is brought to you for free and open access by Digital Howard @ Howard University. It has been accepted for inclusion in Faculty Reprints by an authorized administrator of Digital Howard @ Howard University. For more information, please contact digitalservices@howard.edu.

THE PUERTO RICAN STRAIN OF ENDAMEBA HISTOLYTICA
COMPARISON OF THE DIAGNOSTIC VALUE OF DIRECT SMEAR
EXAMINATION AND CULTIVATION WITH
PATHOGENICITY TEST *

By HILDRUS A. POINDEXTER

From the Department of Bacteriology, Preventive Medicine and Public Health,
 School of Medicine, Howard University, Washington, D. C.

During the summer of 1932 the author, while in Puerto Rico, made the following investigations with the object of ascertaining diagnostic values by means of various test methods on the Puerto Rican strain of *Endameba histolytica*.

Five hundred and sixty-four separate stool examinations were made involving the same number of individuals, each specimen receiving only one examination. This consisted of one complete microscopic examination of a smear, both unstained and stained with iodine solution, and by examination after cultivation for 48 hours at 37.5°C.

Results of pathogenicity tests on the excysted *Endameba histolytica* from some patients are also included.

The medium was essentially the same as that previously used by Poindexter(1): the base consisted of slants of Boeck-Drobohlav egg medium and of liver infusion agar prepared according to the method of Cleveland and Sanders(2). The liquid part of the medium consisted of one part of fresh inactivated serum to 9 parts of Ringer's or Locke's solution. Rabbit serum was chiefly used, although small quantities of human or monkey serum were also utilized from time to time; the results from the three different sera were identical. Ringer's solution was used with the sera much more frequently than Locke's, because it retarded the rapid reproduction of a common contaminant, viz: a form of yeast, and a closely associated fungus of the genus *Monilia*, culturally and morphologically resembling *Monilia sitophila*, the growth of which Locke's solution appeared to encourage to the extent of its obscuring the endamebae and rendering identification difficult.

* This work was done at the School of Tropical Medicine, San Juan, Puerto Rico, under a special grant from the Central Education Board of the Rockefeller Foundation.

Received for publication April, 1933.

Reprinted from

The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine
 Vol. IX, No. 1, September, 1933, pp. 31-43

Endamoeba coli was the most common intestinal protozoan found. Of 564 specimens examined, 215 were identified by microscopic means. By cultural methods, *E. coli* was shown to be present in 45 of the 349 specimens which microscopic examination had declared negative, thus giving a total of 260 positives for *E. coli*. Of the 215 demonstrated by microscopic analysis 52 were found positive by culture.

E. histolytica was found positive in 66 of the 564 specimens examined by smear, four additional being found by culture among those negative by microscopic means. Fifty-three of the 66 positive were also demonstrated by culture.

In only one case—one showing clinical symptoms—submitted by a practicing physician, were active amebae encountered. The amebae were typical representatives of *E. histolytica*, both as to type of locomotion and the presence of red blood corpuscles. This stool was cultivated and the active endamebae were injected into a puppy.

Occasionally a specimen was examined which contained cysts of *Iodameba bütschlii* and *Endolimax nana*, neither of which was cultivated. Many of the fresher specimens contained active *Trichomonas intestinalis*, which grew readily in culture. A few specimens contained the cysts of *Giardia lamblia*, which in two cases excysted in culture and grew for 8 and 10 days respectively. Trophozoites were in one fresh specimen, and cysts of *Chilomastix mesnili* were occasionally seen, which in three cases excysted and grew for 11, 13, and 16 days respectively. *Embadomonas intestinalis* was observed in 2 cultures, but was not observed in the original smear examination before cultivation.

EXPERIMENTAL

Marín(3) reported the results of experiments with the Puerto Rican strain of endamebae which is indistinguishable morphologically from *E. histolytica*. His results seem to show that the endamebae were not pathogenic for kittens. Using the already accepted test animals for the pathogenicity of *E. histolytica*—kittens—and in accordance with the recent results of Faust(4)—puppies—we decided to test the pathogenicity of the vegetative endamebae obtained from cyst-containing specimens.

Cultures of *E. histolytica* which had excysted in tubes and

133740
H
M378M
P75P

were actively motile were used to infect the animals. When the cultured endamebae were reproducing at the rate of 8 to 10 active trophozoites per high power field in 24 hours subcultures, the contents of several of these tubes were combined and 20 cc. of the suspension, while still at 37.5°C., were injected into the proximal part of the colon and distal part of the ileum. This was done by etherizing each kitten and passing a flexible rubber catheter to a depth of about 6½ inches. This was calculated to reach the cecum. A warm pipette containing 20 cc. of the active trophozoites was then connected with the outside end of the catheter and the animal being suspended by the tail, the material was permitted to run in by gravity. No pressure was used to force it into the colon. The etherized state of the animal and the large amount of the material employed gave us reason to believe that some of the material passed even beyond the ileocecal valve into the ileum. After all of the material had run in, the catheter was withdrawn and the rectum plugged with cotton while the animal was still under ether. The next day (24 hours later), the plug was removed by pulling the string which remained attached to it.

Eleven kittens were similarly infected, each animal receiving the trophozoites cultured from the cyst of a different individual. Three of the animals died, one 9, one 18, and one 21 days after the infection. On the 7th day active trophozoites were found in the stools of 10 kittens, and in 5 of these during the entire period of observation.* Active amebae could be demonstrated in the 3 kittens that died, up to the time of death and in the scrapings from the mucosa of the colon after death. These 3 kittens had a diarrheal, but only an occasionally dysenteric, stool.

Macroscopically only 2 of the 3 kittens that died showed the type of ulcerations usually observed in kittens dying of experimental amebiasis. In those 2, the lesions resembled those described by Rees(5) in kittens that were killed during the early diarrheal stage of the infection before actual dysentery began.

The microscopic sections of the colon, cecum and rectum showed areas of hyperemia, but only in one of the kittens

* The period of observation was interrupted on the 29th day of the experiment.

was definite invasion of the mucosa by the endamebae observed. These lesions were in the cecum.

Five puppies were injected in a similar way, except that they were not etherized. The catheter was gently passed into the rectum while an assistant held them. The rectal plugs were removed after 24 hours. Trophozoites appeared in the stool of numbers 1, 2 and 5 on the 7th, 8th and 13th days, respectively, of the infection, and continued for various lengths of time, later disappearing without causing the death of any one of them. Only one of the animals seemed really ill.

DISCUSSION

One complete stool examination of 564 individuals shows 12.4 per cent positive for *E. histolytica* and 46 per cent positive for *E. coli*. It is believed that the percentage of positives would have been increased by repeated examinations of stools from these same individuals at short intervals.

While the percentage of positives for *E. histolytica* by direct smear examinations alone and by cultivation were essentially the same, the combined methods gave a slightly higher percentage. When only the cysts are present in the stool, it is easier for the less expert laboratorian to make a differential diagnosis of *E. histolytica* from a culture (after excystation) than from the direct smear examination alone. We therefore feel that cultural methods should be more generally used, not as substitutes for the direct method, but as a useful supplement.

Concerning the experimental results: the percentage of infection of the kittens in Puerto Rico with the Puerto Rican strain of *Endameba histolytica* is not significantly different from the percentage of infestation of kittens in various parts of the United States, similarly infected with strains isolated in the United States. However, the percentage of death is less and the lesions of the colon, cecum, and rectum are very much less marked.

We believe that this observation will be a step toward the explanation of the fairly high carrier incidence in the Island, with a relatively low percentage of clinical cases of amebiasis. The explanation seems to lie within one of the three following categories:

- (a) The endamebae of Puerto Rico, though morphologi-

cally and in some respects culturally resembling *E. histolytica*, are not really the pathogenic species that cause acute amebiasis.

(b) The people, being long in contact with the specific protozoa as well as the high percentage of infestation with the closely related protozoa, have developed some degree of specific as well as group immunity, which together with the category given below may offer an explanation, and

(c) The dietary habits of most of the people of the Island, which consist of a high carbohydrate diet (the kittens and puppies used in this experiment were fed on this type of diet) tend to decrease the activity of the endamebae without retarding their rate of development or interfering with the life cycle. The endamebae living in the lumen of the intestinal tract can obtain plenty of readily absorbable carbohydrates. Experimentally Rees (6) observed that the starch-fed *E. histolytica* in culture are more sluggish than those growing in a similar media but free from starch. We used Slade's rice starch or Ralston's whole wheat flour and our experiments coincide with his observation. Rees (6) states that because of this sluggishness of the *E. histolytica*, they may be voided before they can invade the mucosa. This, he thought, accounted for the so-called loss of pathogenicity for kittens of certain starch-fed strains, as well as the apparent lack of pathogenicity of *E. histolytica* from liver abscess, these endamebae having ingested large amounts of glycogen.

In the light of these observations we believe that the endamebae multiply in the proximal part of the lumen of the colon, without invading the mucosa. They encyst as they pass down and appear in the stools chiefly as cysts.

The high percentage of infection is related to the sanitary practices and personal hygiene of the locality.

Our experimental technique with puppies was not identical with that of Faust(4). The preliminary preparation of his dogs as well as his method of observation were different.

SUMMARY AND CONCLUSION

Cultural and microscopic examination of Puerto Rican strains of *E. histolytica* reveal a high positive correlation, yet we believe the cultural method as described to be superior in the interests of accurate diagnosis, because in doubtful cases

E. histolytica may be more easily differentiated from *E. coli* in the vegetative stage than in the encysted stage.

The Puerto Rican strain of the vegetative *E. histolytica* shows less pathogenicity for kittens fed on a high carbohydrate diet, than the United States strain injected into the kittens of the same age fed on a high protein diet.

Puppies fed on a high carbohydrate diet appeared to tolerate the infection, even though some of them showed active trophozoites in the stools for several days.

I wish to express my appreciation to Doctor George W. Bachman, Director of the School of Tropical Medicine, his Faculty and Technical Staff; to the various members of the Department of Sanitation; to the University Hospital, the Presbyterian Hospital and the Clínica Miramar, for their valuable assistance in providing me with the necessary apparatus and material for this study.

BIBLIOGRAPHY

1. POINDEXTER, H. A. The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine, 7: 417. 1932.
2. CLEVELAND, L. R. and SANDERS, E. P. Arche F. Protistenk. 70: 223. 1930.
3. MARIN, R. A. The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine. 6: 429. 1931.
4. FAUST, E. C. The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine. 6: 391. 1931.
5. REES, C. W. Arch. Path. 7: 1. 1929.
6. REES, C. W. Journal of Parasitology. 15: 131. 1928.

LA ENTAMEBA HISTOLYTICA DE PUERTO RICO

COMPARACION DEL VALOR DIAGNOSTICO DE SU CULTIVO Y EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO CON LA PRUEBA PATOGENICA *

Por HILDRUS A. POINDEXTER

Del Departamento de Bacteriología, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Escuela de Medicina de la Universidad de Howard, Washington, D. C.

La comunicación que aquí presentamos es el resultado obtenido en 564 exámenes de heces fecales distintas y del estudio patogénico de la *Entameba histolytica* existente en algunas de ellas, que practicamos en Puerto Rico durante el verano de 1932. Con cada una de las muestras se hacía un examen microscópico completo, antes y después de teñirlas con la solución yodada, y, por último, a las 48 horas de siembra y permanencia en la estufa, a la temperatura de 37.5°C.

Utilizamos casi el mismo medio de cultivo que utilizó Poindexter(1) en 1932. El medio básico consistía de agar e infusión de hígado preparado por el método de Cleveland y Sanders(2) y medio inclinado de huevo de Boeck-Drobohlav. La porción líquida del medio estaba formada de una parte de suero fresco inactivado y 9 de la solución de Ringer o de Locke. Utilizamos casi siempre suero de conejo, aunque alguna vez lo sustituimos por suero humano o de mono. Los resultados fueron los mismos con los tres. La solución de Ringer adicionada de suero fué utilizada con más frecuencia que la de Locke, porque con ella lográbamos retardar la rápida reproducción de los contaminantes más vulgares; por ejemplo: alguna levadura común y un hongo, pariente próximo del género *Monilia*, que en los cultivos y en su morfología se parece mucho a la *M. sitophila*. Cuando usábamos la solución de Locke el rápido crecimiento de los contaminantes entorpecía el de la entameba y dificultaba su identificación.

El protozooario encontrado con mas frecuencia fué el *Entamoeba coli*. De 564 muestras examinadas se encontró por el método directo en 215 muestras y por cultivo se demostró

* Esta labor se llevó a cabo merced a una subvención especial de la Junta de Educación General de la Fundación Rockefeller.

Recibido para publicarse abril, 1933.

la presencia del *E. coli* en 45 de las 349 muestras que habían resultado negativas en el examen microscópico directo, lo que hace un total de 260 muestras positivas de *E. coli*. De las 215 muestras examinadas microscópicamente, 52 resultaron positivas en los cultivos.

Demostramos la presencia de *E. histolytica* en 66 de las 564 muestras examinadas directamente, de las cuales 4 de las negativas resultaron después positivas en los cultivos y 53 de las 66 positivas resultaron serlo igualmente en los cultivos.

En una sola de las muestras pudimos observar la forma vegetativa de la amiba en actividad. Se trataba de una excreta fresca que nos envió un médico, procedente de un enfermo con síntomas clínicos agudos de amibiasis, y en ella determinamos la *E. histolytica* típica, con su motilidad característica, conteniendo corpúsculos rojos ya ingeridos. Hicimos cultivos con este espécimen e inyectamos a un perrillo amibas activas.

Alguna que otra vez encontrábamos en las excretas quistes de *Iodameba bütschlii* y *Endolimax nana*, pero no hemos cultivado ninguna de ellas.

Muchas excretas, sobre todo las más recientes, contenían *Trichomonas intestinalis* activas que crecían rápidamente en los cultivos. Unas pocas contenían quistes de *Giardia lamblia*; de ellas, dos escindieron el ectoplasma durante el cultivo y crecieron durante 8 y 10 días respectivamente. La forma vegetativa de la *Giardia* se pudo observar en un espécimen reciente. La especie *Chilomastix mesnili* se la observó ocasionalmente en forma quística; en 3 casos maduraron y crecieron por espacio de 11, 13 y 16 días cada una. Determinamos asimismo dos cultivos con *Embadomonas intestinalis* pero nunca pudimos comprobar su presencia en las preparaciones antes del cultivo.

EXPERIMENTACION

En el año 1931 comunicó Marín(3) sus experiencias llevadas a cabo en Puerto Rico con una familia de entamebas que no se distinguía morfológicamente de la *E. histolytica*. Los resultados por él obtenidos parecen demostrar que las entamebas no ejercían ninguna acción patógena sobre los gatos jóvenes. Para determinar esta acción utilizamos estos animales aceptados por todos como animales de prueba; pero

la presencia del *E. coli* en 45 de las 349 muestras que habían resultado negativas en el examen microscópico directo, lo que hace un total de 260 muestras positivas de *E. coli*. De las 215 muestras examinadas microscópicamente, 52 resultaron positivas en los cultivos.

Demostramos la presencia de *E. histolytica* en 66 de las 564 muestras examinadas directamente, de las cuales 4 de las negativas resultaron después positivas en los cultivos y 53 de las 66 positivas resultaron serlo igualmente en los cultivos.

En una sola de las muestras pudimos observar la forma vegetativa de la amiba en actividad. Se trataba de una excreta fresca que nos envió un médico, procedente de un enfermo con síntomas clínicos agudos de amibiasis, y en ella determinamos la *E. histolytica* típica, con su motilidad característica, conteniendo corpúsculos rojos ya ingeridos. Hicimos cultivos con este espécimen e inyectamos a un perrillo amibas activas.

Alguna que otra vez encontrábamos en las excretas quistes de *Iodameba bütschlii* y *Endolimax nana*, pero no hemos cultivado ninguna de ellas.

Muchas excretas, sobre todo las más recientes, contenían *Trichomonas intestinalis* activas que crecían rápidamente en los cultivos. Unas pocas contenían quistes de *Giardia lamblia*; de ellas, dos escindieron el ectoplasma durante el cultivo y crecieron durante 8 y 10 días respectivamente. La forma vegetativa de la *Giardia* se pudo observar en un espécimen reciente. La especie *Chilomastix mesnili* se la observó ocasionalmente en forma quística; en 3 casos maduraron y crecieron por espacio de 11, 13 y 16 días cada una. Determinamos asimismo dos cultivos con *Embdomonas intestinalis* pero nunca pudimos comprobar su presencia en las preparaciones antes del cultivo.

EXPERIMENTACION

En el año 1931 comunicó Marín(3) sus experiencias llevadas a cabo en Puerto Rico con una familia de entamebas que no se distinguía morfológicamente de la *E. histolytica*. Los resultados por él obtenidos parecen demostrar que las entamebas no ejercían ninguna acción patógena sobre los gatos jóvenes. Para determinar esta acción utilizamos estos animales aceptados por todos como animales de prueba; pero

quisimos también comprobar los resultados recientes obtenidos por Faust (4) en los perritos jóvenes, y empezamos a probar sobre ellos la acción patógena de la forma vegetativa de las entamebas tomadas de diferentes excretas.

Para infectar los animales de experimentación empleamos cultivos de *E. histolytica*, ya desenquistada en los tubos de cultivos y en plena motilidad. Esperábamos a que el crecimiento fuera suficientemente rápido que nos permitiese observar en un segundo cultivo, al cabo de 24 horas, 8 ó 10 trofozoos activos por campo, bajo gran aumento. Mezclábamos entonces varios tubos y tomábamos 20 cc. de la suspensión líquida a 37.5°C y la inyectábamos en la parte baja del colon y en la porción distante del íleo. Procedimos a anestesiarnos primeramente al gatito con éter y le introducíamos un catéter blando de goma hasta unas 6 pulgadas y media, que consideramos lo suficiente para llegar hasta el ciego. Conectamos al extremo del catéter una pipeta ligeramente tibia, con 20 cc. de la suspensión de trofozoos activos, que dejábamos caer por gravedad mientras el animal colgaba de las patas traseras. En ningún momento tratamos de forzar su introducción en el colon. La anestesia del animal y la gran cantidad del líquido empleado nos hacen suponer que algo de él debió pasar más allá de la válvula ileocecal y llegar al íleo. Después que todo el contenido de la pipeta había penetrado retirábamos el catéter y taponábamos el recto con algodón, estando todavía el animal bajo la acción del éter. Al día siguiente (24 horas después) sacábamos el tapón, tirando del hilo que habíamos dejado fuera.

Con este mismo procedimiento infectamos 11 gatitos; cada uno de ellos con cultivos de trofozoos procedentes de quistes de un sujeto diferente.

Resultado:

Muertos -----3	{	9 días después de infectados
		18 días después de infectados
		21 días después de infectados

Diez de los 11 animales tuvieron trofozoos activos hasta los 7 días de la infección; 5 de éstos durante todo el período de observación (29 días después de haberles inyectado). En los 3 gatitos muertos encontramos la forma vegetativa de la entameba desde el mismo día de la inyección hasta el de la

y harina integral de trigo, de Ralston. Asegura Rees que a causa de esa debilidad de la *E. histolytica* puede ser eliminada antes de que invada la mucosa. Esto es lo que influye—dice Rees—en la pérdida del poder patógeno con los gatos, según se ha observado en ciertas familias de *E. histolytica* que han vivido en medios feculentos, así como también la aparente inocuidad de la *E. histolytica* procedente de los abscesos del hígado, pues en él las amibas han subsistido a pesar de haberse alimentado con grandes cantidades del glicógeno hepático.

En vista de los hechos observados tenemos la creencia de que las entamebas se multiplican en la proximidad de la entrada del colon, sin invadir la mucosa, enquistándose según descenden, para aparecer más tarde ya enquistadas en los excrementos.

El alto porcentaje de infestación amibica está en relación con las prácticas sanitarias y de higiene personal de los habitantes de un país.

La técnica que aplicamos en nuestros experimentos en los perros no fué la misma que la seguida por Faust(4). Difiere la nuestra en el método de observación y en la preparación preliminar de los animales.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La relación evidente que tienen entre sí el número de casos positivos obtenidos en los cultivos, con el número de los que se obtienen por examen microscópico directo, y la mayor facilidad para diferenciar las formas vegetativas de la *E. histolytica* y *E. coli*, de sus quistes respectivos, nos inclina a creer que el método de cultivo que hemos descrito puede emplearse como procedimiento diagnóstico; sobre todo, asociado a otros.

La forma vegetativa de *E. histolytica* puertorriqueña es menos patógena para los gatos alimentados con hidratos de carbono que las de la misma amiba procedentes de excretas de enfermos amibiásicos en distintos Estados norteamericanos, e inyectados a gatitos de la misma edad alimentados principalmente con leche, carne y pescado.

Ninguno de los perros alimentados con hidratos de carbono murió de la enfermedad, aunque algunos tuvieron trofozoos activos en la excreta durante varios días. No hemos

practicado ningún ensayo de amibiasis experimental con perros sometidos a una dieta cargada de proteínas.

Deseo expresar mi profundo reconocimiento al doctor George W. Bachman, director de la Escuela de Medicina Tropical, a su cuerpo facultativo y personal técnico, así como a los miembros del Departamento de Sanidad, del Hospital de la Universidad, del Hospital Presbiteriano y de la Clínica Miramar por la valiosa ayuda que todos me prestaron, proveyéndome del material y de los aparatos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

R. L. trad.