

**OBSERVACIONES SOBRE LOS EFECTOS QUE PRODUCEN LOS  
CAMBIOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE LA BIOLOGIA  
DE LA ENDAMOEBA HISTOLYTICA**

Por HILDRUS A. POINDEXTER

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

*Revista bibliográfica y objeto de este artículo:*

La *Endamoeba histolytica* de Losch<sup>1</sup>, 1875, es el agente etiológico de la amebiasis de la especie humana y de algunos animales inferiores. Existe, sin embargo, mucha confusión e ignorancia referente a la causa que determina síntomas graves y complejos de amebiasis disintérica en ciertos sujetos, en tanto que otros pueden albergar el mismo organismo patológico sin que sus síntomas revistan tamaña agudeza y sin que los tejidos experimenten las transformaciones anatómicas que dicha sintomatología apareja.

El año 1932, Poindexter<sup>2</sup> comprobó en Puerto Rico un alto índice de infestación por la *Endamoeba histolytica*, coincidiendo esta observación con la de otros muchos observadores en distintos países tropicales. Entre 564 exámenes coprológicos encontró un 12.4 por ciento de excretas positivas. Si se hubieran repetido los exámenes, seguramente, según Faust<sup>3</sup> ha demostrado, el porcentaje hubiera sido mayor. Entre los casos positivos, solamente uno presentaba síntomas disintéricos agudos y trofozoos en las heces. Achácase principalmente esta frecuencia de infestación amebiásica en los trópicos al bajo nivel higiénico de la vida de sus habitantes. El hecho es que aún no se han explicado convenientemente las disparidades existentes entre el número de casos con historia clínica disintérica evidente y el número de sujetos portadores del organismo específico de la enfermedad, pero sin síntomas definidos de la misma. Entre las hipótesis que tratan de explicar el hecho hay que mencionar la tolerancia natural de los habitantes de esos países o la resistencia global de la población, bien por efecto del clima y los hábitos alimenticios, o la existencia en el medio

\* Recibido en Redacción en el 7 de julio de 1936.

ambiente tropical de algún otro organismo filial de la *Endamoeba histolytica*, más o menos antagónico a ésta.

Hase observado que los puertorriqueños que emigran a la ciudad de Nueva York suelen con frecuencia empezar a padecer de síntomas disentéricos, en ocasiones sin que anteriormente, mientras residían en su país natal, hubieran sufrido de disentería. También se ha observado que los sujetos que han vivido siempre en países de clima templado comienzan a padecer de síntomas disentéricos al llegar al trópico, y ello en proporción mucho mayor que los naturales de estos países que portan habitualmente el organismo disentérico.

Hace notar Poindexter<sup>2</sup> que la alimentación ordinaria de los habitantes más menesterosos de Puerto Rico consiste principalmente de arroz, "habichuelas" y otros productos de gran contenido hidrocarbonado. Como los individuos procedentes de los países templados están acostumbrados a comer carne diariamente y continúan con su costumbre al llegar al trópico, y como los habitantes de Puerto Rico, al trasladarse a vivir a la ciudad de Nueva York, cambian su régimen alimenticio por otro más cargado en carne, hemos pensado que sometiendo los animales de laboratorio a dietas de experimentación aproximadamente semejantes a las que usan los sujetos en las condiciones que arriba hemos apuntado, se podría quizás aclarar algo el problema de las diferencias sintomatológicas entre los casos agudos de disentería y los portadores del microorganismo.

Desde las primeras investigaciones de Kartulis<sup>4</sup> en 1887, Kruse y Pasquale<sup>5</sup> en 1894, Quincke y Ross<sup>6</sup> en 1893, y los más recientes de Dale, Dobell<sup>10</sup> y Faust<sup>11</sup> en 1930 y algunos otros, parece demostrado que los animales de elección para experimentar con la *E. histolytica* son los perrillos jóvenes y los gatitos, estos últimos para la observación de la enfermedad en su período agudo y aquéllos para el subagudo o crónico.

Las observaciones de Baetjer y Sellards<sup>12</sup>, en el año 1914, y las de Chatton<sup>13</sup>, en el 1918, sobre lesiones granulomatosas con aspecto de neoplasmas, aparecidas en el ciego de conejillos de Indias infestados con *E. histolytica*, nos permiten esperar que se puedan estudiar experimentalmente las diferentes clases de reacciones locales que se producen en los tejidos. Estas observaciones todavía no han podido demos-

trarse definitivamente. Los cobayos no se han utilizado aún en gran escala en trabajos de experimentación con la *E. histolytica*. Se ha tratado de experimentar con otras especies de animales. Hegner<sup>14</sup> ha publicado recientemente las observaciones en el mono, y, según parece, este animal puede ser portador de la *E. histolytica* sin sufrir la invasión de los tejidos. Si la ameba puede vivir y proliferar indefinidamente dentro del tracto intestinal sin penetrar en los tejidos, es posible entonces la producción de un estado no sintomático en un sujeto portador. Habría que determinar entonces hasta qué punto la puerta de entrada del microorganismo exalta o deprime su poder de invasión. Esperamos poder aclarar parte de estos problemas con los experimentos que hemos ejecutado con cachorrillos de perros y gatos.

*Material, métodos y resultados obtenidos:*

Nuestros trabajos de investigación tardaron cuatro años. Durante ellos hemos utilizado 49 gatos de 320 a 1,180 gramos de peso en el momento en que verificábamos de la infestación experimental, y de 4 semanas a 8 meses de nacidos. A todos se les infestó por el recto, según el método usado por Faust<sup>15</sup> en los perros. Dividimos el número total de gatos en lotes de 12, más un lote de 13. El trabajo experimental lo efectuamos durante los meses de diciembre, enero y febrero, utilizando el material patológico en la instrucción de las clases de parasitología de la Escuela. Los animales estuvieron en jaulas separadas, alimentando a los animales de peso aproximadamente igual con una (a) dieta cargada de hidrocarbonados compuesta principalmente de pan, arroz, "habichuelas" y agua, alternándola con (b) otra ración alimenticia alta en sustancias protéicas, consistente mayormente de leche, pescado e hígado. La infestación de cada animal se practicó bajo anestesia etérea, inyectándoles por el recto de 5 a 8 cc. de un cultivo de 24 horas de *E. histolytica* crecido en medio sólido de Boeck-Drbohlav en base de huevo coagulado de Locke, que suspendíamos en una cantidad conveniente de una mezcla líquida compuesta de una parte de suero humano, de conejo, de caballo, líquido ascítico o de hidrocele y 6 partes de la solución de Locke. Cuando los cultivos obtenidos con siembras del recto revelaban en los gatos una infección de blastocitos o coccidios utilizábamos alguna que otra vez el medio de cultivo de St. John<sup>22</sup>.

Después de inyectar al animal le ocluíamos el recto con un tapón de algodón amarrado con un hilo para evitar la salida del líquido infectante al pasar el efecto de la anestesia. Observábamos el animal al cabo de varias horas (12-14) y si entonces no había expulsado el tapón le extraíamos nuevamente tirando del hilo.

En los gatos jóvenes de 450 a 800 gramos de peso estas inoculaciones por vía rectal dieron buen resultado. En los gatos más maduros la inoculación no fué tan eficaz y en algunos casos hemos esperado unos 7 ó 10 días sin que apareciera ningún síntoma disentérico ni trofozoos en las heces, teniendo que repetir entonces la operación. En los gatitos muy jóvenes, de 320 a 450 gramos de peso, sobre todo en los que separábamos de las madres y los sometíamos a un régimen alimenticio cargado en hidratos de carbono, y privado de leche, los resultados de la inoculación resultaron medianos. Las infecciones oculares fueron muy corrientes. La neumonía postetérea llegó a ser frecuente y en ocasiones los animalitos dejaban de comer y morían de hambre. En este lote de animales jóvenes, de 320 a 450 gramos de peso, permitíamos a algunos gatitos continuar mamando, suministrándoles al mismo tiempo una comida cargada en sustancias protéicas (picadillo de hígado y pescado, en leche), habiendo observado que las infecciones oculares no eran tan intensas, no adelgazaban, y, al parecer, demostraban mayor resistencia a la enfermedad que los animales de peso intermedio. El lote de gatitos muy jóvenes se componía sólo de 13, a 6 de los cuales se les puso a dieta bien cargada en hidratos de carbono y a los 7 restantes a alimentación de proteídos en gran cantidad. Debido a los motivos que antes hemos expuesto este lote de animales no se presta a deducir ningún dato de interés. Nos ceñiremos, pues, principalmente al lote restante de 36 animales para fundamentar nuestras conclusiones. En el lote de 18 animales sometidos a una alimentación hidrocarbonada, resultó más difícil lograr la inoculación. El período de incubación fué mayor, de 5 a 7 días, contrastando esto con los animales alimentados con proteídos, en los que la incubación duraba de 3 a 5 días. Las lesiones patológicas en el recto y el ciego eran menos pronunciadas en el lote con alimentación hidrocarbonada; la disentería, una vez manifiesta, era menos fulminante, y la duración de la enfermedad

después del período de lactancia, en los casos que terminaban fatalmente, era más prolongada. Uno de los animales inoculado 3 veces sucesivas, tuvo diarrea y más tarde disentería, pudiéndose entonces demostrar en dos ocasiones la presencia de trofozoos en las heces fecales; pero habiendo transcurrido 7 meses todavía está vivo. Todos los síntomas disentéricos han desaparecido y no hemos podido comprobar la presencia de amibas en la excreta. Le hemos cambiado el régimen alimenticio, dándole ahora una alimentación cargada en proteídos para observar si reaparecen los síntomas, pero hasta la fecha no ha vuelto a aparecer la enfermedad.

Nuestra experimentación con perros jóvenes comprende un lote de 15 animales, habiendo seguido el mismo procedimiento de alimentación hidrocarbonada y protéica alternadamente. En los sometidos a esta última, los síntomas fueron más numerosos y más pronunciadas las lesiones. La enfermedad, generalmente, suele tener un curso más crónico en los perros que en los gatos, pero no hemos podido provocar la formación de quistes, ni en unos ni en otros, que puedan compararse con los observados en la disentería crónica de la especie humana. En las deyecciones de los perros aparecían a veces unos organismos que se asemejaban morfológicamente a los quistes de *E. histolytica*, pero no presentaban ciertos caracteres biológicos de los quistes amíbcos verdaderos. Si administrábamos en la ingesta una emulsión preparada con los quistes expulsados por los perros a otros, éstos no contraían la enfermedad. Estos quistes pseudohistolíticos, cuando se les lava y se les pone en suspensión en una solución salina isotónica, perecían a la temperatura de 47°C. al cabo de 5 minutos; en cambio, la temperatura letal para los quistes de *E. histolytica*, tratados de igual modo y en el mismo tiempo, es de 68°C. Perecen también los quistes expulsados por los perros, a los 12 minutos, en una solución de cloro, en la proporción de uno de cloro libre por un millón de galones de agua. Esta es la proporción en que se utiliza en las piscinas de natación. Los quistes amebiásicos de la disentería crónica humana no hemos logrado aniquilarlos en esta misma forma, ni aún después de transcurridos 30 minutos. Al verificar estas observaciones hemos contrastado siempre la viabilidad del organismo, tratando de comprobar si podría enquistarse y crecer después de

lavado en solución salina y sembrado en un medio de cultivo apropiado.

Tras observar que estos quistes producidos en la inoculación experimental, a pesar de su aspecto morfológico, no se comportaban igual que los procedentes de casos disentéricos humanos, decidimos contrastar nuestras observaciones con las de otros observadores sobre las formas quísticas producidas en un cultivo. Desde que Boeck<sup>16</sup> y Drbohlav (en 1924) descubrieron el medio de cultivo conveniente para la *E. histolytica*, han venido apareciendo de tarde en tarde algunas comunicaciones de diversos investigadores sobre esta propiedad que tiene la *endamoeba* de transformarse en quiste en los mismos cultivos cuando se altera la composición de éstos. En una comunicación del año 1932 asegura Poin-dexter<sup>17</sup> que cuando se tapa con parafina un tubo de cultivo de *endamoeba* se produce la transformación quística de este organismo, lo que se debe a la alteración de la concentración del ion-hidrógeno, pues el tapado del tubo no sólo hace aumentar la acidez del medio y la tensión del dióxido de carbono sino que el cultivo se torna parcialmente anaeróbico. En vista de la observación antes citada sobre las formas quísticas obtenidas en las inoculaciones experimentales en los perros, sometimos los quistes producidos en los cultivos a un contraste riguroso, tal como hicimos con los anteriores, pudiendo entonces comprobar que su comportamiento tampoco es semejante, en lo que a resistencia se refiere, al de los quistes de las deyecciones en la disentería humana, sino a los quistes de la disentería experimental en los perros. Tratamos de hacer llegar desde Washington a Nueva York, a manos del Dr. A. Packchianian, algún número de quistes obtenidos en cultivos; pero, según nos dijo éste, después de recibidos habían perdido su vitalidad. Los quistes obtenidos de casos humanos portadores pueden conservar su vitalidad después de dos o más meses, siempre y cuando se les mantenga en humedad. Podemos, pues, obtener a voluntad y de manera constante formas quísticas *in vitro*, utilizando ciertos medios preservativos para enviarlos a otros laboratorios distantes sin que pierdan su vitalidad. Estas observaciones debidas a Stone<sup>18</sup> son de un gran valor.

El medio utilizado por Stone para lograr las formaciones quísticas es una solución de distintas sales cuya fórmula es la siguiente:

Cloruro sódico-----	8.	gms.
Cloruro cálcico } aa-----	0. 20	gm.
Cloruro potásico }		
Cloruro magnésico-----	0. 01	gm.
Fosfato sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )-----	2.	gms.
Bicarbonato sódico-----	0. 40	gm.
Fosfato potásico monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )-----	0. 30	gm.
Agua destilada-----	1000	gms.

Con esta solución asegura Stone haber obtenido la producción de quistes de manera constante. Nosotros no hemos sometido aún a comprobación la vitalidad morfológica de estas formaciones quísticas producidas con la fórmula de Stone. Gladys M. Craig<sup>19</sup> aprovecha la "acción *puffer*" de las dos sales potásicas y sódicas ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) en la solución de Stone para mantener la constancia del pH., habiendo podido comprobar que, cuando el pH. se mantiene entre 6.8 y 8.3, el crecimiento de la endameba y su transformación quística aumentan a compás de la alcalinidad del medio en un período de 24 a 48 horas, y el momento más favorable para las formaciones quísticas tiene lugar cuando el pH. alcanza de 7.4 a 7.6.

Durante los dos últimos años, en vez de suero humano, de conejo o de caballo, que eran los que utilizábamos en nuestras primeras experiencias, empezamos a emplear líquido hidrocélico o ascético, del último de los cuales pudimos obtener en todo momento la cantidad que necesitábamos en los servicios del *Freedmen's Hospital*. La substitución resultó muy satisfactoria, pudiendo obtener buenos crecimientos de endamebas, algunos de los cuales llegaban a alcanzar de 35 a 40 micras de diámetro. Hemos tratado también de emplear líquido pleurítico obtenido de pleuresías tuberculosas, pero no nos dió buen resultado. La multiplicación de la *E. histolytica* es muy lenta, el tamaño suele ser muy pequeño, de unas 21 micras de diámetro, y fenece fácilmente después de varios pases. Los gatitos inoculados con cultivos mezclados con líquido hidrocélico, tienen un período de incubación de igual duración que los inoculados con cultivos crecidos en suero caballar, humano o de conejo. Con cultivos mezclados con líquido pleurítico se necesita inocularlos más de una vez

y el período de incubación es más largo. El número de organismos contenidos en cada cc. de la emulsión inoculante es, por supuesto, mucho menor.

Como los gatitos mamoncillos aún y los perritos muy jóvenes alimentados con una dieta cargada en hidratos de carbono presentaban mayor resistencia a la infestación endémica que los que se alimentaban con gran cantidad de sustancias protéicas, decidimos comprobar *in vitro* la vitalidad de la *E. histolytica*, verificando ciertos cambios en la concentración de los carbohidratos de los medios de cultivo.

Desde hace mucho tiempo han venido empleándose arroz y harina de trigo para el crecimiento de la *E. histolytica* en los medios de cultivo, aunque ello no es imprescindible. Nosotros hemos utilizado cultivos con harina de arroz habiendo logrado contar hasta 32 partículas de almidón en el interior de una amiba después de 24 horas de incubación. Las amibas contenían también muchas más bacterias en el endoplasma que lo que suele generalmente observarse en los ejemplares no degenerados de *E. histolytica* obtenidos en cultivos. Los gránulos de almidón aparecían digeridos diversamente. Las amibas obtenidas en estos cultivos, aunque muy numerosas la mayoría de las veces, se movían muy perezosamente, permaneciendo detenidas en un sitio de 4 a 6 minutos, frecuentemente se hinchaban hasta convertirse en un glóbulo grueso y en ocasiones emitían un pseudópodo en algún que otro sitio y lo retiraban poco después. Esta falta de impulso progresivo en determinada dirección difiere algo del comportamiento del organismo de la misma raza crecido en medios no feculentos, que aunque también lento en sus movimientos, menos numeroso y de menor tamaño, suele avanzar y recorrer la duodécima parte del diámetro del campo microscópico a gran aumento, en ese mismo tiempo.

Con los cultivos no feculentos conseguimos aumentar el volumen del organismo y pudimos entonces administrar a los gatos enemas inoculantes que contuviesen el mismo número de trofozoos. Con las amibas gruesas y perezosas crecidas en medios feculentos no se obtiene el mismo porcentaje de infestaciones que con las amibas activas cultivadas en medios no feculentos. No obstante, si se pudiese ocluir completamente el recto para evitar la expulsión del líquido infestante, los resultados serían los mismo, poco más o menos, con el uso de otro organismo.

Hase observado que los trofozoos procedentes de los abscesos hepáticos, la mayor parte de las veces están repletos de partículas de glicógeno, son muy lentos en sus movimientos y no se consigue con ellos inocular a los perros con la misma facilidad que con los trofozoos activos y no tan gruesos, tales como los procedentes de las disenterías agudas.

#### *Discusión:*

Por lo que se refiere al organismo en sí y a su facultad penetrante en la mucosa, nosotros creemos que la acción mecánica de los seudópodos tiene la misma importancia que la acción citolítica del organismo descrito por Craig<sup>20</sup>. Si la actividad de los seudópodos disminuye por cualquier circunstancia, aún cuando existan en los tejidos ligeras transformaciones necróticas provocadas por sustancias citolíticas, el poder de invasión de la *E. histolytica* decrece también. Esta debilidad del poder agresivo de las amibas puede, no obstante, quedar contrarrestado por la acción de las toxinas segregadas por las bacterias de las infecciones asociadas, por la irritación que provocan las sustancias químicas (medicamentos), por el efecto debilitante sobre la mucosa intestinal del agua caliente sobre el colon (enemas), o por el éstasis intestinal (estreñimiento), permitiendo a estas razas de amibas poco movibles penetrar la mucosa. Quizás a éste último pueden achacarse las ulceraciones que se observan en el recto, ciego y colon ascendente, más numerosas que en el resto del tubo intestinal.

Nuestra opinión es que la aparente tolerancia de los habitantes de Puerto Rico frente a las amebiasis, se debe en cierto modo el régimen alimenticio más corriente en este país, pues la alimentación rica en hidratos de carbono aminora la vitalidad de la *E. histolytica*, produciéndole un estado letárgico que no la estimula a penetrar en la mucosa. Ciertas observaciones *in vitro* y algunos trabajos de experimentación animal parecen apoyar esta hipótesis. La debilidad de penetración y la multiplicación de la *E. histolytica* en el tracto intestinal repleto de sustancias hidrocarbonadas pueden explicar la falta de síntomas disentéricos de los sujetos portadores. Craig<sup>21</sup> no admite que la amiba puede multiplicarse sin previa penetración en la mucosa. El hecho es que no sabemos cuál es el mecanismo de defensa orgánica contra la invasión amibiana. La reacción más generalmente obser-

vada en las ulceraciones del colon es la infiltración leucocitaria y la proliferación del tejido conjuntivo, ambas moderadas. Alguna vez se observan amibas, sin bacterias que las acompañen, localizadas por debajo o entre las fibras musculares de la mucosa, en pequeños espacios libres sin signos marcados de infiltración celular.

La infestación amibiana no suele ser muy violenta en sus comienzos. Los casos fulminantes generalmente se deben a invasiones combinadas con el estreptococo hemolítico o con ciertos microorganismos del género *Shigella*. El estreptococo produce una toxina acidógena que inhibe el crecimiento del *Escherichia coli*, cuyo antagonismo, al privar al colon de su flora protectora, quizás favorezca la proliferación de la *E. histolytica*. Pero para resolver este problema necesitamos conocer más profundamente no solamente el efecto del clima sobre la biología humana sino las variaciones de la flora intestinal en los diferentes climas.

#### *Resumen y conclusiones:*

Según observaciones practicadas, los trofozoos de la *Entamoeba histolytica* obtenidos en cultivo, cuando están repletos de gránulos de almidón de arroz, se tornan menos móviles que los procedentes de medios de cultivos no feculentos. Esta escasa movilidad de los trofozoos puede ser la causa de su menor poder de invasión cuando se trata de contaminar experimentalmente ciertos animales.

Los gatos jóvenes, de 450 a 1,180 gramos de peso, sometidos a una alimentación abundante en hidratos de carbono—trigo, pan, arroz, judías y agua, principalmente—manifiestan mayor resistencia a la inoculación con la *E. histolytica* que los gatos de igual peso alimentados principalmente con un picadillo de hígado y pescado en leche.

Los resultados obtenidos con los perros puestos a una dieta semejante corresponden a los resultados obtenidos con los gatos, aunque aquellos animales presentan una resistencia natural mayor que éstos. Los quistes amibiásicos obtenidos en las deyecciones de los perros, aunque morfológicamente semejantes, difieren de los que aparecen en la excreta humana de los casos disentéricos crónicos. Son menos resistentes ante las soluciones de cloro, perecen a una temperatura más baja, no son capaces de contaminar a los perros ni a los gatos que los ingieren, y no se les puede cultivar después de algún

tiempo (después de un viaje de Washington a Nueva York, por ejemplo). Los quistes obtenidos en cultivos convenientemente alterados corresponden biológicamente a los procedentes de la excreta de los perros contaminados experimentalmente que antes hemos mencionado. Para cultivar la *E. histolytica* hemos usado un medio que contenía líquido ascítico e hidrocélico en lugar de suero humano, caballar o de conejo. El líquido pleurítico tuberculoso no nos dió tan buen resultado como las anteriores. Los gatitos que pesaban menos de 450 gms. no se prestaban muy bien a la experimentación con la *E. histolytica* cuando había que darles una dieta especial.

Deseo expresar mi agradecimiento al Capitán William S. Stone de la Escuela Médica del Ejército en Washington, por haberme proporcionado las razas de *E. histolytica* que necesité en mis experimentos, al personal del *Freedmen's Hospital* que me proveyó de líquido ascítico, hidrocélico o pleurítico, y, al cuerpo facultativo del Departamento de Anatomía Patológica por la ayuda prestada en mis trabajos ejecutando los cortes histológicos del colon y del hígado de los animales que disecamos.

(*R. L. trad.*)

#### BIBLIOGRAFIA

1. LOSCH, F.: Arch. F. Path. Anat., 65: 196. 1875.
2. POINDEXTER, HILDRUS: Puerto Rico Journ. Pub. Health and Trop. Med., 9: 31. 1933.
3. FAUST, E. C.: Amer. Journ. Trop. Med., 11: 231. 1931.
4. KARTULIS, S.: Centralbl. F. Bakt., 2: 745. 1887.
5. KRUSE, W. y PASQUALE: Zeitschr. f. Hyg., 16: 1. 1894.
6. QUINCKE, H. y ROSS: Berl. Klin. Wochenschr. 30: 1089. 1893.
7. HARRIS, H. F.: Hatfield Prize Essay, Phil. Arch. F. Path. Anat., 166: 67. 1901.
8. HUBER: Deutsch. Med., Wochenschr., 29: 3267. 1903.
9. CRAIG, C. F.: American Medicine, Phil., 9: 854, 897, 936. 1905.
10. DALE, H. H. y DOBELL: Journ. Pharmacology and Experimental Therapeutics, 10: 399. 1917.
11. FAUST, E. C.: Proc. Soc., Exper. Biol. and Med., 27: 908. 1930.
12. BAETJER, W. A. y SELLARDS: Bull. John Hopkins Hospital, 25: 237. 1914.
13. CHATTON, E.: Arch. Inst. Pasteur, 10: 138. 1918.
14. HEGNER, ROBERT: Amer. Journ. Trop. Med., 15: 41. 1935.
15. FAUST, ERNEST CARROLL: Puerto Rico Journ. Pub. Health and Trop. Med., 6: 391. 1931.

16. BOECK, W. C. y DRBOHLAV: Proc. Natl. Acad. Sci., 11: 235 y Amer. Journ. Hyg., 5: 371. 1925.
17. POINDEXTER, HILDRUS A.: Puerto Rico Journ. Pub. Health and Trop. Med., 7: 417. 1932.
18. STONE, WILLIAM S.: Amer. Journ. Trop. Med., 15: 681. 1935.
19. CRAIG, GLADYS M.: Amer. Journ. of Hyg. 23: 114. 1936.
20. CRAIG, C. F.: Amer. Journ. Trop. Med., 7: 225. 1927.
21. CRAIG, C. F.: Parasitic Protozoa of Man, Philadelphia and London. 1926.
22. ST. JOHN, J. H.: Amer. Journ. Trop. Med., 12: 301. 1932.