

# INFECCION EXPERIMENTAL EN EL PERRO CON QUISTES DE ENTAMOEBA COLI ASOCIADOS AL ESTREPTOCOCO HEMOLITICO POR VIA ORAL

VÍCTOR M. AYULO ROBLES

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

Si bien es cierto que la inoculación de formas vegetativas de *Entamoeba coli* asociadas al *Streptococo hemolítico*, por vía ileal previa laparotomía, siguiendo la técnica de MELENEY y FRYE (1) (2), nos permitiera reproducir el cuadro agudo de la disentería amebiana, en el perro y en el gato (3), en disconformidad con los trabajos realizados por otros investigadores como WENYON (4), QUINCKE y ROSS (5), DARLING (5), CRAIG (5), DOBELL (5), SIMIC (5), SELLARDS (20), etc., nos quedaba por demostrar si era posible reproducir, igualmente, el cuadro de la amebiasis en el perro, a partir de formas quísticas de este parásito, suministrados por vía oral.

Jugando la flora microbiana un importante papel en la amebiasis, según lo demuestran los trabajos de CLEVELAND y SANDERS (6), RATCLIFFE (7), FRYE y MELENEY (8), BERTHA K. SPECTOR (9), DESCHIENS (10), (11), (12), etc., y como lo hicieramos en nuestro trabajo anterior (3), asociamos a los quistes de *E. coli*, cultivos en caldo de *Streptococo hemolítico*, reproduciendo así el cuadro agudo de la disentería amebiana en los animales en experiencia.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este trabajo hemos utilizado 21 perros de 2 a 3 meses de edad aproximadamente, los cuales fueron sometidos, antes de ser inoculados, a un severo control parasitológico, con el fin de cerciorarnos de que no fueran portadores de formas vegetativas o quísticas de amebas.

Dos fueron las muestras de heces empleadas en estas experiencias. Una de ellas, la utilizada en la primera serie, proveniente del Sr. N. N. era portadora de gran cantidad de quistes de *Entamoeba coli* y formas vegetativas y quísticas de *Chilomastix Mesnili*. La empleada en la segunda serie, lo era, en cambio, de quistes de *E. coli* y *Blastocystis*, habiéndosela obtenido de la misma persona que para nuestro trabajo anterior (3) nos proporcionara la muestra de donde aislamos la cepa de *E. coli* N- 2557.

A todos los animales, antes de ser inoculados, los dejamos en ayunas durante 24 horas.

Las inoculaciones las hicimos mezclando en la comida de cada uno de ellos, 3 gramos de heces ricas en quistes de *E. coli* y 3 cc. de cultivo en caldo de *Streptococo hemolítico*, poniéndoles inmediatamente después un enema de retención de 3 cc. de una mezcla del cultivo en caldo de *Streptococo hemolítico* con bilis de buey, quedando desde este momento en completo aislamiento cada uno y bajo estricto control hasta que murieron o fueron sacrificados.

La primera serie de animales recibió una alimentación mixta, a base de quáker, leche, camotes y carne (13), mientras que la segunda serie exclusivamente a base de proteínas (pescado) (13) (14).

Los exámenes de heces se practicaron sobre el producto de las deposiciones recién emitidas.

De los animales que murieron o fueron sacrificados se hizo estudio microscópico en fresco y coloraciones, por el método de la hematoxilina férrica de HEIDENHAIN (15) así como cultivos en el medio prescrito por nosotros para *E. coli* (3).

Para hacer el estudio histopatológico, de los perros, se escogieron pequeñas secciones del intestino que fijadas en solución de REGAUD, se colorearon luego por el método de la hematoxilina férrica y el corriente de hematoxilina-eosina.

#### INFECCION EXPERIMENTAL

Nuestra experiencia consta de 2 series de animales, cuya edad como dijimos fluctuó entre 2 y 3 meses aproximadamente.

*Primera Serie.* En esta serie utilizamos 9 perros, a 7 de los cuales (N<sup>os</sup>. 1, 2...7), se les hizo ingerir junto con su alimento (a base de quáker, leche, camotes y carne), una mezcla de 3 grs. de materias fecales conteniendo abundantes quistes de *E. coli*, formas vegetativas y

quisticas de *Chilomastix* y, 3 cc. de un cultivo en caldo corriente de *Es-treptococo hemolítico* de 24 horas de desarrollo, poniéndoseles inmediatamente después, un enema de retención de 3 cc. de una mezcla del cultivo en caldo del *Es-treptococo hemolítico* con bilis de buey.

Al perro N° 8 se le dió en su dieta alimenticia 3 cc. del cultivo en caldo de *Es-treptococo hemolítico*, aplicándosele como a los perros anteriores un enema de retención de 3 cc. de la mezcla del cultivo de *Es-treptococo* y bilis de buey.

Al perro N° 9, solamente se le dió a comer en su dieta, 3 gramos de la muestra de heces. Al día siguiente se repitió la inoculación en la misma forma (Cuadro N° 1). El segundo día de inoculación comenzaron a hacer cuadro agudo los perros N°s. 2, 4, 6 y 7.

El perrito N° 2, después de la segunda inoculación estuvo muy decaído, presentando tenesmo frecuente y haciendo 7 cámaras muco-sanguinolentas en las que se observaron hasta 2 formas vegetativas de *E. coli* por campo microscópico, muy móviles, quistes de la misma ameba, posiblemente los que se le dieron a ingerir y, abundantes formas vegetativas de *Chilomastix*. Al tercer día, el examen parasitológico de las cámaras muco-sanguinolentas de este perrito reveló un mayor número de formas vegetativas de *E. coli*, muchas de ellas hematófagas. El 4° día sólo hizo una cámara de aspecto normal, observándose una que otra forma vegetativa de *E. coli*, habiendo desaparecido las formas vegetativas de *Chilomastix*. Durante los días siguientes estuvo muy bien, hasta el 7° día en que presentó una cámara muco-sanguinolenta con formas vegetativas de *E. coli*, leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos; cuadro que se intensificó rápidamente al 8° día, teniendo que ser sacrificado al 9° por encontrarse muy decaído y en peligro de que muriera en el curso de la noche.

Los perros N°s. 4 y 6, después de la segunda inoculación hicieron deposiciones de aspecto normal, con una que otra forma vegetativa de *E. coli* y abundantes formas quísticas de la misma. A partir del tercer día, comenzaron las cámaras muco-sanguinolentas, las que al examen parasitológico revelaron gran cantidad de formas vegetativas de *E. coli*, muy móviles, muchas de ellas hematófagas, leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos, muriendo al 8° y 6° día respectivamente, en pleno cuadro agudo.

El perro N° 7, después de la segunda inoculación hizo 2 cámaras ligeramente mucosas portadoras de una que otra forma vegetativa de *E. coli* y quistes de la misma ameba, muriendo al día siguiente.

Los perros N<sup>os.</sup> 1, 3 y 5, al tercer día comenzaron a hacer su cuadro agudo, caracterizado por deposiciones frecuentes y muco-sanguinolentas que, al examen parasitológico revelaron abundantes formas vegetativas de *E. coli*, muy móviles, muchas de ellas hematófagas, leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos; encontrándose además, abundantes formas vegetativas de *Chilomastix* en las cámaras muco-sanguinolentas del perro N<sup>o</sup> 3. El cuadro descrito se intensificó posteriormente muriendo los animales al 6<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> y 8<sup>o</sup> día respectivamente en pleno cuadro agudo.

El perro N<sup>o</sup> 8, a partir del tercer día comenzó a presentar tenesmo frecuente y cámaras muco-sanguinolentas, las que al examen parasitológico solo evidenciaron leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos, muriendo al 5<sup>o</sup> día.

El perro N<sup>o</sup> 9 en ningún momento presentó deposiciones muco-sanguinolentas. Murió al 8<sup>o</sup> día.

A la autopsia constatamos en el perro N<sup>o</sup> 7 la existencia de un intenso proceso congestivo que se extendía desde el ileon hasta el ano, estando circunscrito al ileon en el perro N<sup>o</sup> 8.

En los perros N<sup>os.</sup> 1, 4 y 5 se observó un intenso proceso congestivo con pequeños focos hemorrágicos (como picadura de pulga) en el intestino grueso y el recto.

Los perros N<sup>os.</sup> 2, 3 y 6, presentaban también un proceso congestivo intenso con puntillado hemorrágico en el intestino grueso y recto, los perros N<sup>os.</sup> 2 y 6 una pequeña ulceración a 1 cm. por encima del ano, y una gran úlcera en las vecindades del mismo, en el perro N<sup>o</sup> 3.

El examen parasitológico del muco-pus sanguinolento que cubría la mucosa en los perros N<sup>os.</sup> 1, 2, 3, 4, 5 y 6, reveló la existencia de gran cantidad de formas vegetativas de *E. coli* muy móviles, muchas hematófagas, en tanto que, en el perro N<sup>o</sup> 7 sólo observamos una que otra forma vegetativa de amebas y gran cantidad de quistes.

En el perro N<sup>o</sup> 8 abundancia de leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos.

*Segunda Serie.* En esta serie utilizamos 12 perritos, a 9 de los cuales (N<sup>os.</sup> 10, 11, ... 19) les dimos en su dieta alimenticia, a base de pescado, una mezcla de 3 grs. de materias fecales con gran cantidad de quistes de *E. coli* y *Blastocystis* y, 3 cc. de un cultivo en caldo corriente de *Streptococo hemolítico* de 24 horas de desarrollo, poniéndoseles inmediatamente después un enema de retención de 3 cc. de una mezcla del cultivo en caldo de *Streptococo hemolítico* con bilis de buey.

Al perrito N° 20 se le dió en cambio en la dieta alimenticia 3 cc. del cultivo en caldo de *Streptococco hemolitico*, poniéndosele a continuación un enema de retención de 3 cc. de la mezcla de *Streptococo* y bilis de buey.

Al perrito N° 21, se le hizo ingerir en su comida únicamente 3 grs. de la muestra de heces.

CUADRO N° 1

PERRO N°	INOCULO					EVOLUCION										LESION ANATOMO PATOLOGICA					
	FECHA DE INOCULACION	FECHA DE REINOCULACION	QUISTES DE ENTAMOEBIA COLI	CULTIVO EN CALDO DE STREPTOCOCCO HEMOLITICO	ENEMA DE RETENCION	N° DE DIAS DE SUPERVIVENCIA Y N° DE CAMARAS										ILEON	CIEGO	INTESTINO GRUESO	RECTO	PRESENCIA DE AMEBAS	
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10						
1	10-3-43	11-3-43	3 amf	3 cc.	3 cc.	⊕	⊕	2+	4+	6+	3M						-	-	+	+	+++
2	10-3-43	11-3-43	3 amf	3 cc.	3 cc.	⊕	7+	3+	1+	⊕	⊕	1+	15+	10S			-	-	+	+	+++
3	10-3-43	11-3-43	3 amf	3 cc.	3 cc.	⊕	⊕	1+	2+	5+	6+	2+	10+	12+	3M		-	-	+	+	+++
4	7-3-43	13-3-43	3 amf	3 cc.	3 cc.	⊕	1+	3+	4+	4+	5+	5+	M				-	-	+	+	+++
5	12-3-43	13-3-43	3 amf	3 cc.	3 cc.	⊕	⊕	3+	3+	6+	4+	3+	M				-	-	+	+	+
6	11-3-43	13-3-43	3 amf	3 cc.	3 cc.	⊕	2+	2+	3+	6+	3M						-	-	+	+	+++
7	12-3-43	13-3-43	3 amf	3 cc.	3 cc.	⊕	2+	M									+	+	+	+	++
8	11-3-43	13-3-43	—	3 cc.	3 cc.	⊕	1-	4-	3-	M							+	-	-	-	---
9	12-3-43	13-3-43	3 amf	—	—	⊕	⊕	1-	1-	1-	1-	1-	1-	⊕	M		-	-	-	-	---

⊕ = NINGUNA CAMARA      1+ = 1 CAMARA POSITIVA      M = MURIÓ  
 1- = 1 CAMARA NEGATIVA      2+ = 2 CAMARAS POSITIVAS      S = SACRIFICADO

Al día siguiente se repitió la inoculación en la misma forma. (Cuadro N° 2).

Al segundo día de la inoculación, los perros N° 14 y 18 comenzaron a hacer un cuadro agudo caracterizado por cámaras muco-sanguinolentas, que al examen microscópico revelaron la presencia de regular cantidad de formas vegetativas de *E. coli* muy móviles, algunas de las cuales contenían glóbulos rojos; se observó también quistes de la misma ameba, leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos. El examen parasito-

lógico de las muestras de heces de los perros N<sup>os.</sup> 11 y 13 de aspecto normal, nos permitió ver una que otra forma vegetativa de *E. coli* y abundantes quistes.

El tercer día los perros N<sup>os.</sup> 11, 13, 14, 15, 16, 18 y 19 estuvieron en pleno cuadro agudo cuyos caracteres como hemos dicho eran, en todos, la frecuencia de cámaras muco-sanguinolentas constatando en el examen parasitológico de éstas abundantes formas vegetativas de *E. coli*, muy móviles, muchas hematófagas, así como leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos. El cuadro persistió en todos los animales con igual intensidad hasta que les sobrevino la muerte, al 5<sup>o</sup> día en el perro N<sup>o</sup> 18, al 6<sup>o</sup> en el perro N<sup>o</sup> 16, al 7<sup>o</sup> en los perros N<sup>os.</sup> 13 y 19 y al 9<sup>o</sup> día en el perro N<sup>o</sup> 14. Los perros N<sup>os.</sup> 11 y 15 tuvieron que ser sacrificados en pleno cuadro agudo al 6<sup>o</sup> y 9<sup>o</sup> día respectivamente, por encontrarse en muy mal estado y en peligro de que murieran en el curso de la noche.

Los perros N<sup>os.</sup> 10 y 12 comenzaron a hacer su cuadro agudo al 4<sup>o</sup> día, cuadro que se intensificó rápidamente en el perro N<sup>o</sup> 10, muriendo al 7<sup>o</sup> día, mientras el perro N<sup>o</sup> 12 presentó en las deposiciones una que otra forma vegetativa de amebas en las heces hasta que fué sacrificado al 9<sup>o</sup> día.

El perro N<sup>o</sup> 17 en ningún momento tuvo deposiciones muco-sanguinolentas y el examen parasitológico de las muestras de heces, así como el cultivo de las mismas, fueron negativos, siendo sacrificado al 15<sup>o</sup> día.

El perro N<sup>o</sup> 20 al tercer día comenzó a presentar tenesmo frecuente y deposiciones muco-sanguinolentas con gran cantidad de leucocitos, macrófagos y glóbulos rojos vistos en el examen parasitológico que se hizo de ellas. En los días posteriores las cámaras se hicieron más frecuentes hasta la muerte del animal que ocurrió al 10<sup>o</sup> día de inoculado.

El perro N<sup>o</sup> 21 no presentó transtorno alguno, siendo sacrificado al 15<sup>o</sup> día.

Practicadas las autopsias, en ninguno de ellos se encontró lesión anátomo-patológica del ileon. Empero, en los perros N<sup>os.</sup> 14, 15 y 18 observamos un intenso proceso congestivo desde la válvula ileo-cecal hasta el ano, con grandes focos hemorrágicos en el recto del perro N<sup>o</sup> 14 y, un foco ulceroso a 1 cm. por encima del ano en el perro N<sup>o</sup> 15.

En los perros N<sup>os.</sup> 10 y 11 notamos una intensa congestión del intestino grueso con un puntillado hemorrágico en la última porción de éste y del recto en el perro N<sup>o</sup> 11, y focos hemorrágicos a nivel del recto en el perro N<sup>o</sup> 10. En el perro N<sup>o</sup> 12 solamente se observó una intensa congestión del intestino grueso, estando el recto indemne.



## DISCUSION

La reproducción experimental del cuadro agudo de la disentería amebiana en el perro y en el gato, utilizando formas vegetativas de *Entamoeba coli*, provenientes de cultivos, nos fué posible al asociar a esta ameba, el *Streptococo hemolítico*, practicando las inoculaciones conforme a las técnicas de MELENEY y FRYE (1) (2).

En estas condiciones, tratamos de ver la posibilidad de reproducir el mismo cuadro en el perro, a partir de formas quísticas de *E. coli*, mezclados con cultivos en caldo de *Streptococo hemolítico*, a la vez que se les ponía un enema de retención de una mezcla de cultivo en caldo de *Streptococo hemolítico* y bilis de buey.

En este como en nuestro trabajo anterior, (3) le dimos gran importancia a la dieta alimenticia, la que fué a base de quáker, leche, camotes y carne en la primera serie, y, exclusivamente a base de pescado en la segunda.

Las inoculaciones realizadas en la forma que hemos descrito, nos permitieron reproducir el cuadro agudo de la disentería amebiana en el 94.1 % de los animales sometidos a experiencia, lo cual, una vez más, nos permite afirmar que, en la amebiasis, son las bacterias las que juegan el papel más importante, actuando primero y determinando luego condiciones tales en el intestino de los animales en experiencia, que permiten a las amebas, *E. coli*, en nuestro caso, no solo su supervivencia y multiplicación, sino también su invasión a los tejidos.

De los 17 animales a los que les dimos a ingerir quistes de *E. coli*, mezclados con cultivos de *Streptococo hemolítico* y que les pusimos un enema de retención de la mezcla de cultivos en caldo de *Streptococo hemolítico* con bilis de buey, 12 murieron en pleno cuadro agudo, 4 tuvieron que ser sacrificados, también, en pleno cuadro agudo, por encontrarse en malas condiciones y en peligro de que murieran en el curso de la noche; sólo uno, en ningún momento presentó cuadro agudo, siendo sacrificado al 15º día, en que dimos por terminada la experiencia.

Los 2 animales a los que se les dió a ingerir cultivos de *Streptococo hemolítico* y se les puso el enema de retención de la mezcla de cultivos en caldo de *Streptococo* y bilis de buey, hicieron un cuadro disenteriforme caracterizado por la presencia de cámaras muco-sanguinolentas, muriendo al 5º y 10º día de la inoculación.

Los otros 2 perritos que ingirieron solamente quistes de *E. coli* no hicieron cuadro agudo en el curso de la experiencia, habiendo sido todos los exámenes parasitológicos negativos.



A la autopsia en ninguno de los animales pudimos encontrar la típica "úlceras en botón de camisa" clásica de la disenteria amebiana en el hombre, debido a que los animales inculados murieron en pleno cuadro agudo, sin dar tiempo a la formación de dichas úlceras. (7) (11) (16).

Los cambios histológicos que constatamos fueron los siguientes: anormal producción de mucus, dilatación de los capilares sanguíneos y linfáticos, infiltración difusa de la mucosa, edema de la pared intestinal, tumefacción y congestión de los ganglios linfáticos mesentéricos, en los animales que murieron a poco de inoculados, mientras que, en los que el cuadro duró varios días, encontramos necrosis de la superficie del epitelio, en algunos muy intensa, pero, sin compromiso de la sub-mucosa, encontrándose abundantes formas vegetativas de amebas en el mucus que cubría la superficie epitelial necrosada o en la capa necrosada.

La luz de las glándulas de LIEBERKÜHN fueron invadidas primero por las bacterias y, luego, por las amebas. Las células epiteliales de estas glándulas, desprendidas de su membrana basal, fueron reemplazadas por las amebas (18).

En los animales a los que se les dió en su alimentación únicamente *Streptococo hemolítico* y que se les puso un enema de retención de la mezcla de cultivos de *Streptococo hemolítico* y bilis de buey, encontramos cuadros histo-patológicos semejantes a los descritos. En cambio, en los que sólo ingirieron en su dieta alimenticia quistes de *E. coli* no se registró ninguna lesión anátomo-patológica ni histológica del intestino.

#### RESUMEN

El 94.1 % de los animales a los que les dimos en su alimentación quistes de *Entamoeba coli*, mezclados con cultivos de *Streptococo hemolítico* y que recibieron un enema de retención, de la mezcla de cultivos en caldo de *Streptococo hemolítico* más, bilis de buey, reprodujeron el cuadro agudo de la disenteria amebiana, siendo las lesiones anátomo-patológicas e histológicas, semejantes a las obtenidas por otros autores, empleando para sus experiencias *E. histolytica*.

El 100 % de los controles a los que se incluyó en su alimentación, solo cultivos de *Streptococo hemolítico* y que recibieron un enema de retención de la mezcla de cultivo de *Streptococo* y bilis de buey, hicieron un síndrome disenteriforme con un cuadro anátomo-patológico e histológico semejante a los que se les dió la mezcla de quistes de *E. coli*

más *Estreptococo hemolítico*. En tanto que el 100 % de los que solamente recibieron en su dieta alimenticia quistes de *E. coli*, no presentaron en ningún momento, formas vegetativas de *E. coli* (en las heces) y, a la autopsia, no revelaron lesión anátomo-patológica alguna.

#### CONCLUSIONES

1. Experimentalmente se puede reproducir el cuadro agudo de la disentería amebiana en el perro, con quistes de *Entamoeba coli* suministrados por vía oral, cuando se los asocia con cultivos en caldo de *Estreptococo hemolítico*, y se les pone un enema de retención de una mezcla de cultivos en caldo de *Estreptococo hemolítico* y bilis de buey.

2. Las lesiones anátomo-patológicas e histológicas constatadas por nosotros a la autopsia, fueron semejantes a las obtenidas por otros investigadores con el empleo de la *E. histolytica*.

3. Las lesiones provocadas por el *Estreptococo hemolítico* son de tal magnitud que permiten no solo el desarrollo de la *E. coli*, sino también su invasión a los tejidos.

4. Con quistes de *E. coli* suministrados por vía oral, sin la asociación del *Estreptococo hemolítico*, no obtuvimos el cuadro agudo de la disentería.

#### BIBLIOGRAFIA

1. HENRY E. MELENEY, WILLIAM W. FRYE : *Proc. Soc. Experim. Biol. and Med.*, v. 30, p. 277, 1932. Citado en *Tropical Diseases Bulletin*, v. 30, p. 387, 1933.
2. R. DESCHIENS, A. PROVOST : *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, v. 30, p. 648, 1937.
3. VÍCTOR M. AYULO R. : *Revista de Medicina Experimental*, v. 2, p. 320, 1943.
4. C. M. WENYON : *Jl. London School Trop. Med.*, v. 2, p. 27, 1912. Citado en *Tropical Diseases Bulletin*, v. 1, p. 457, 1912-13.
5. TSH SIMIC : *Annales de Parasitologie*, v. 2, p. 329, 1933.
6. L. R. CLEVELAND, ELIZABETH P. SANDERS : *American Journal of Hygiene*, v. 12, p. 569, 1930.
7. HERBERT L. RATCLIFFE : *American Journal of Hygiene*, v. 14, p. 337, 1931.

8. WILLIAM W. FRYE, HENRY E. MELENEY : *American Journal of Hygiene*, v. 28, p. 543, 1933.
9. BERTHA KAPLAN SPECTOR : *American Journal of Hygiene*, v. 22, p. 366, 1935.
10. R. DESCHIENS : *C. R. Société de Biologie*, v. 125 B, p. 1017, 1937.
11. R. DESCHIENS : *C. R. Société de Biologie*, v. 127 A, p. 1076, 1938.
12. R. DESCHIENS : *Annales de L'Institut Pasteur*, v. 61, p. 5, 1938.
13. HILDRUS A. POINDEXTER : *The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine*, v. 12, p. 324, 1937.
14. JOHN CLYDE SWARTZWELDER : *Public Health Reports*, v. 52, N° 2, p. 1447, 1937.
15. VÍCTOR M. AYULO R. : *Revista de Medicina Experimental*, v. 1, p. 177, 1942.
16. ERNEST FAUST, EDWIN S. KAGY : *Amer. Jl. Trop. Med.*, v. 14, p. 221, 1934. Citado en *Tropical Diseases Bulletin*, v. 32, p. 190, 1935.
17. JOHN CLYDE SWARTZWELDER : *American Journal of Hygiene*, v. 29, p. 89, 1939.
18. HIYEDA KENTARO : *American Journal of Hygiene*, v. 12, p. 401, 1930.
19. KUBO MICHIO : *Jl. Oriental Med.*, v. 24, p. 739, 1936. Citado en *Tropical Diseases Bulletin*, v. 33, p. 704, 1936.
20. CRAIG, FAUST : *Clinical Parasitology*, Filadelfia, 1940.
21. E. BRUMPT : *Précis de Parasitologie*, Paris, 5ª edición, 1936.
22. M. LANGERON : *Précis de microscopie*, Paris, 5ª edición, 1934.
23. C. WENYON : *Protozoology*, Londres, 1926.