REMARQUES SUR LA CULTURE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CHAGAS

Par **Henri GALLIARD**

Depuis que Chagas, en 1909, a découvert et isolé *Trypanosoma cruzi*, nombreux sont les travaux publiés sur la culture de ce flagellé, mais les différents auteurs qui ont étudié la question ne semblent pas d'accord sur un certain nombre de points. Si, par exemple, ils admettent en général avec Chagas que l'isolement à partir du sang du vertébré est facile à faire, pour les uns les subcultures sont pratiquement impossibles à obtenir et d'autres ont pu, au contraire, conserver longtemps leurs souches par repiquages successifs. On a discuté également sur la valeur respective de chaque milieu, la longévité des cultures, la signification des formes rencontrées et surtout sur la présence des formes trypanosomes, les conditions de leur production et la date de leur apparition dans les cultures. Enfin, l'étude du pouvoir infectieux a prêté à certaines controverses.

Nous avons pu obtenir des cultures de quatre souches différentes, provenant de triatomes naturellement infectés, rapportés d'Amérique du Sud par le Prof. Brumpt, et qu'il conserve également sur triatomes et sur *Rhodnius* dans son laboratoire. Ces souches nous ont servi pour des études comparatives de virulence. Ce sont : virus Cabral (*Triatoma chagasi*) (1), virus brésilien donné par le Prof. Chagas (*T. megista*), virus Uruguay (*T. rubrovaria*), virus Paraguay (*T. infestans*).

Au point de vue de la culture, ces diverses souches se comportent absolument de la même façon. Leur isolement à partir du sang du vertébré est aussi facile, la longévité est la même, et la morphologie des formes culturales est identique.

Les auteurs s'accordent pour admettre que l'isolement de *T. cruzi* est assez aisé (Chagas, 1909 ; Delanoë, 1912). Mais par contre, pour certains, les subcultures sont difficiles, sinon impossibles à obtenir (Delanoë, 1912 ; Wenyon, 1926) ; d'autres, au

(1) Espèce découverte et décrite par Brumpt et Florencio Gomez dans la Serra de Cabral (Etat de Minas Geraes). La souche est conservée à Paris depuis 1914.

ANNALES DE PARASITOLOGIE, T. VII, N° 5. — 1er septembre 1929, p. 367-376.

Article available at http://www.parasite-journal.org or https://doi.org/10.1051/parasite/1929075367

contraire, les ont obtenues facilement et ont pu pratiquer un grand nombre de passages.

Les milieux employés jusqu'ici sont des plus variés. Chagas (1909) obtint la première culture dans le liquide de condensation du milieu gélosé NN, Torrès (1922) a utilisé le bouillon de sang peptoné à 5 p. 100, Nöller (1920) les plaques de gélose au sang, Niño (1929) remplace dans le milieu NNN le sang de lapin par du sang humain, Adler (1926) a obtenu de bons résultats avec un milieu gélosé et glycosé semi-fluide, avec sérum de lapin sans hémoglobine.

En principe, tous les milieux sont bons, car *T. cruzi* est un des trypanosomes qui se cultivent le plus facilement. Mais il est nécessaire, en présence de tant de techniques différentes, de faire un choix. A notre avis, les meilleurs milieux d'isolement sont les milieux liquides (NNN, bouillon-sang, etc.). Niño (1926) commence par mélanger le sang du cœur à une solution de citrate, puis ensemence ensuite ce mélange. Cette pratique est excellente et même indispensable si l'on veut isoler le trypanosome en milieu semi-solide, mais elle nous semble inutile pour la culture si le milieu est liquide.

Si ces milieux semi-solides, dont Wenyon (1921) donna la première formule et dont les milieux de Noguchi (1924), Kligler (1924), Adler (1926) sont dérivés, se prêtent mal à l'isolement, ils sont par contre excellents pour les subcultures. Le milieu au sang chauffé de Mathis nous a donné aussi de bons résultats, ainsi que le milieu de Ponselle gélatiné pour culture des trypanosomes pathogènes et le milieu de Ponselle glycosé que nous avons utilisé avec succès (1929) pour *T. inopinatum*, *T. parroti* et *T. lewisi*. Nous parlerons plus loin des résultats que nous avons obtenus avec le milieu hypotonique de Ponselle.

Pour faire des expériences d'inoculation aux animaux, nous avons cherché à obtenir des cultures très riches et persistantes. Nous avons utilisé pour cela un milieu gélosé très simple qui nous a donné d'excellents résultats. Il nous a semblé, en effet, que les milieux de Wenyon et de Noguchi sont trop fluides, et qu'il y avait intérêt à augmenter la teneur en gélose et de diminuer le taux de NaCl. De même, l'addition de glycose (comme dans les milieux d'Adler et de Kligler) favorise la culture (1) et l'utilisation de sang

(1) Nous avons utilisé la formule suivante :

Eau ordinaire	1.000 cm³
Gélose	4 grammes,
Glycose	2 —
NaCl	4 —

On ajoute dans chaque tube, au moment voulu, après fusion du mélange et

de vache au lieu de sang de lapin paraît préférable. Au bout de quelques jours, à la température ordinaire, la culture se développe avec une intensité extraordinaire et le tube présente bientôt un véritable bouchon blanchâtre qui gagne rapidement en profondeur.

Les subcultures s'obtiennent facilement, à condition de ne pas attendre trop longtemps. Lorsque la culture commence à vieillir, au bout de 3 mois environ, les repiquages sont difficiles à faire. Il y a intérêt alors à faire un passage dans un milieu différent, liquide de préférence, comme le milieu NNN par exemple.

La longévité des cultures de *T. cruzi* est également variable suivant les auteurs : Chagas (1909) trouve des formes vivantes au bout de deux mois, Torrès (1922) au bout de 49 jours, Souza Campos (1925) au bout de deux à trois mois, Niño au bout de 75 jours. En réalité, la longévité des cultures de *T. cruzi* est considérable. Avec le milieu semi-solide, nous avons pu obtenir une infection mortelle chez le rat avec une culture vieille de 6 mois.

Le cycle de l'évolution de *T. cruzi* en culture est actuellement classique. On sait que lorsqu'on ensemence du sang de vertébré infecté dans un milieu quelconque, les flagellés passent par les stades *Leishmania, Leptomonas, Crithidia* et trypanosome. Mais il est intéressant de constater qu'il n'en est plus ainsi pour les subcultures et que l'évolution est variable suivant le milieu employé. Ainsi, dans les milieux gélosés semi-solides tel celui que nous employons, on ne trouve jamais de formes *Leishmania* ou *Leptomonas*. Les formes *Crithidia* se multiplient activement aussitôt ensemencées et pullulent déjà au bout de 3 à 4 jours environ. Dans ce milieu, on ne voit jamais non plus se former de rosaces, les flagellés restant toujours libres, contrairement à ce qui se passe en milieu NNN où les rosaces se produisent dès le début et persistent jusqu'à dégénérescence complète de la culture. Il paraît difficile de déterminer les causes de la production des rosaces. Il est facile de constater qu'elles ne se forment pas en tubes NNN quand, pour une raison quelconque, le milieu est défavorable et que la culture reste pauvre. Pour Torrès (1922), la formation des rosaces se produit au contraire dans les milieux défavorables et l'acidité aurait une grande importance à ce point de vue. Mais

refroidissement à 56°, un tiers du volume de sang défibriné de vache. Il est évidemment préférable de se servir de sérum et d'y ajouter une légère quantité de sang laqué comme le préconise Noguchi, mais il faut éviter de trop nombreuses manipulations. Il est certain qu'un excès d'hémoglobine est nuisible aux cultures, mais les hématies de vache sont très résistantes à l'hémolyse et il s'en détruit juste assez pour permettre aux flagellés de se multiplier. Contrairement à Adler nous avons toujours constaté que la présence d'hémoglobine était indispensable.

nous estimons qu'il n'y a aucun rapport entre les belles rosaces régulières et typiques, et les agglutinations, les amas informes de flagellés dégénérés tels qu'on les rencontre dans les cultures se développant mal, mais qui peuvent y persister pendant des mois. Le déterminisme de la production des rosaces est donc autre car, dans le milieu semi-solide, il ne s'en produit pas davantage quand la réaction est acide. A ce propos, nous avons constamment noté que, au point de vue de la réaction et en ce qui concerne particulièrement *T. cruzi*, il fallait avant tout éviter l'alcalinité du milieu.

Mais une question particulièrement intéressante est celle des conditions de production des formes trypanosomes et du moment de leur apparition dans les cultures. Certains auteurs n'en ont jamais trouvé (Delanoë, 1912). Muniz, 1927, en a trouvé au bout de 15 jours, d'autres les ont vues apparaître au bout de 76 jours seulement (Niño, 1929). Pour M. Torrès (1922), la présence des trypanosomes est inconstante et ne peut être prise comme critérium de l'excellence du milieu. Pour Nöller, enfin, la température exerce une action prépondérante sur la production de ces formes qui apparaissent surtout après un séjour à 30°. Nous avons toujours constaté que *T. cruzi* est, avec *T. inopinatum*, un de ceux qui donne le plus facilement la forme trypanosome en culture. L'apparition de ces formes est extrêmement précoce à la température ordinaire et quel que soit le milieu employé. En milieu NNN, nous en avons trouvé en assez grand nombre à partir du neuvième jour. En milieu gélosé sucré, l'apparition est plus précoce encore (5 jours), mais il faut tenir compte d'une survivance possible, bien invraisemblable d'ailleurs, des formes ensemencées. D'autre part, la température n'a pas l'importance qu'on lui attribue. Dans tous les cas, il est préférable de ne pas dépasser 25°.

Cette question de la production des formes trypanosomes est particulièrement intéressante au point de vue du pouvoir infectieux des cultures. Pour Nöller, et son opinion est admise par la majorité des auteurs, seule la forme trypanosome est infectieuse en culture. M. Torrès (1922), se basant sur le fait que l'on peut infecter des animaux avec des cultures très récentes, prétend que la présence de cette forme n'est pas indispensable. Mais, d'après ce que nous avons observé sur la précocité d'apparition des trypanosomes, il nous semble que cet argument est sans valeur. Il est impossible d'affirmer en outre que des formes n'existent pas, même en faible quantité, dans une culture, et l'hypothèse de Nöller ne peut être infirmée par ces seuls faits. D'après ce que nous avons observé nous-même, les cultures de *T. cruzi*, du moins aux premiers passages, sont très virulentes dès le début et le demeurent indéfiniment.

Nous avons pu obtenir des infections mortelles chez le rat et la souris, en 16 et 21 jours, avec une trace de culture vieille de 6 mois et contenant de rares formes trypanosomes. Nöller (1920), après quinze passages pendant un an, réussit à infecter des souris dans les délais normaux. Mais cette question de la virulence des cultures dépasse le cadre de cette étude.

Dans les cultures, on a décrit et figuré de nombreuses formes, mais leur intérêt n'est pas considérable car, surtout en ce qui concerne les premiers stades, *Leptomonas* et *Crithidia*, on peut trouver dans les cultures récentes, et à plus forte raison dans les cultures âgées, les formes les plus variées, parfois monstrueuses, et il semble inutile de s'y arrêter: seules les formes définitives, c'est-à-dire les trypanosomes métacycliques, sont intéressantes à considérer. L'exa-

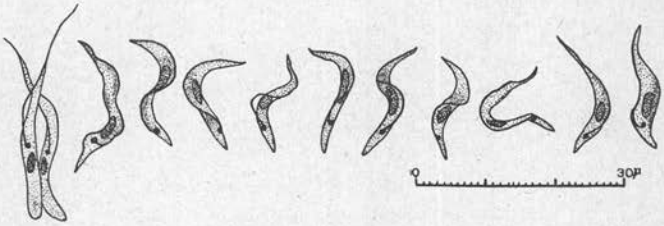

FIG. 1. — Formes métacycliques dans une culture jeune (15 jours à 18°), en milieu semi-solide.

men de cultures récentes (fig. 1), en pleine période de développement et de vitalité (15 jours à 2 mois), nous a, dans tous les cas, montré que les trypanosomes présentaient une morphologie remarquablement uniforme. Ils mesurent de 20 à 23 μ depuis l'extrémité postérieure jusqu'au bout du flagelle ; ce flagelle ne présente jamais d'extrémité libre, mais la largeur du corps et les dimensions du noyau peuvent varier suivant les spécimens. Il ne s'agit pas de polymorphisme, mais la variation est due à la technique employée, à la fixation plus ou moins rapide et parfaite. Dans un même frottis on constate, en effet, dans les parties épaisses la présence de trypanosomes étroits, filiformes, et de formes normales dans les parties minces, mieux fixées et colorées. De même le noyau qui est normalement ovale, peut dans ces formes s'étirer indéfiniment, se bilober sans que l'on puisse voir là autre chose qu'un artifice de préparation, ou une forme de dégénérescence.

Au contraire, dans les cultures très âgées (3, 4 ou 6 mois), le polymorphisme est la règle (fig. 2). A côté de *Crithidia* monstrueux, de trypanosomes normaux assez rares, on trouve des formes beau-

coup plus volumineuses, plus longues et plus larges, mesurant de 38 à 42 μ, ou bien extrêmement petites et grêles. De plus, on voit apparaître quelques rares formes avec l'extrémité du flagelle libre. C'est à ce stade de dégénérescence ou plutôt de vieillissement que l'on peut comparer le tube de culture à l'intestin postérieur du triatome. C'est à ce stade également que l'on trouve des formes particulières qui ont pu être interprétées de diverses façons : formes mâles ou femelles, formes de fécondation, etc... Il faut se défier des assimilations et des interprétations trop ingénieuses, car, dans les cultures âgées, on trouve toutes les formes imaginables si l'on se donne la peine de les chercher. Il est donc exagéré de leur attribuer une signification quelconque, autre que celle de vieillis-

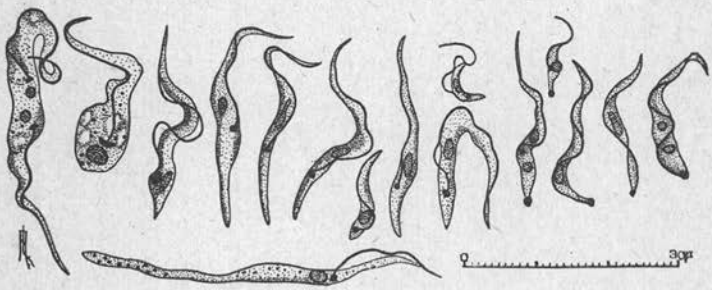

Fig. 2. — Culture âgée (6 mois). Milieu semi-solide. Formes *Crithidia* monstrueuses. Grandes formes trypanosomes ; deux formes très petites avec l'extrémité du flagelle libre.

sement, et de les considérer comme l'aboutissement d'un cycle normal.

Il semble assez difficile de suivre l'évolution complète de ces formes *Trypanosoma* dans les milieux usuels et de savoir si l'on a affaire à des formes de passages ou s'il y a vraiment polymorphisme. Les cultures durent trop longtemps, même à température élevée, ce qui permet le développement de formes de dégénérescence, ou plutôt de vieillissement ; l'évolution est trop lente, le pourcentage des formes trypanosomes n'augmente guère depuis le début de la culture et à la fin ces formes deviennent très rares. Si l'on élève la température (25° à 30°), les trypanosomes ne se produisent pas en plus grand nombre et la culture dégénère rapidement.

Pour obtenir une évolution plus rapide, nous avons utilisé un milieu liquide d'une tonicité très inférieure à celle des milieux usuels, le milieu de Ponselle qui a servi à cet auteur pour la cul-

ture de *T. inopinatum* et qui est composé d'un mélange à parties égales d'eau bidistillée et de sang défibriné de lapin. Nous avons obtenu ainsi à la température ordinaire des cultures à marche rapide où le cycle d'évoluion de *T. cruzi* est pour ainsi dire schématisé. Ces cultures sont naturellement peu abondantes, mais la nature du milieu permet une fixation des préparations plus parfaite et une coloration plus facile.

Le début de la culture est assez long ; 15 jours environ après l'ensemencement, on voit apparaître des rosaces de *Crithidia*. Ces formes, très rarement libres, sont trapues, courtes, et donnent

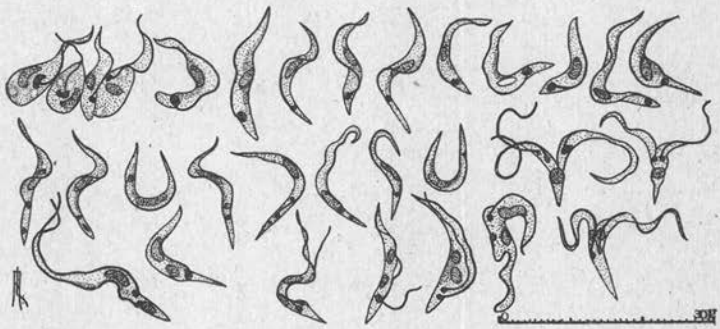

FIG. 3. — Culture en milieu hypotonique (Ponselle). Sur la première rangée : cycle de début avec formes *Crithidia* arrondies et trypanosomes normaux ; sur la deuxième rangée, culture plus âgée : trypanosomes minces et allongés présentant de volumineux grains chromatiques à l'extrémité postérieure, deux formes *Crithidia* anormales en voie de division ; sur la troisième rangée : formes trypanosomes en voie de division, à la période de dégénérescence finale de la culture.

naissance sur place à des formes de passage puis aux formes trypanosomes. Les trypanosomes qui viennent de se former sont également courts, larges, à noyau arrondi, mesurant 13 à 15 μ, mais ils font rapidement place à des formes plus effilées, plus minces, à noyau allongé, identiques d'ailleurs aux formes adultes observées au début dans les autres cultures. Bientôt, toutes les rosaces de *Crithidia* disparaissent, et l'on ne trouve plus que des formes trypanosomes ; parfois il existe encore quelques groupes de *Crithidia*, mais composés de formes plus minces et allongées, qui finissent par disparaître à leur tour, après avoir présenté des formes de division multiples (fig. 3).

Au bout de six jours environ, les trypanosomes vont dégénérer, mais le polymorphisme que l'on constate dans les cultures âgées n'existe plus ici. Ils s'amincissent considérablement, leur noyau

s'étire, et l'on voit apparaître à la partie postérieure, en arrière du blépharoplaste, un, deux ou plusieurs volumineux grains de chromatine (1). De plus, nous avons trouvé dans les derniers jours de l'évolution culturale quelques formes ressemblant à des trypanosomes en voie de division, mais il convient d'être prudent, étant donné ce que l'on sait de *T. cruzi,* qui ne se divise jamais sous la forme trypanosome. Autant que nous avons pu nous en convaincre, ce ne sont pas des artifices de préparation ou de superposition. Peut-être, étant donnée la rapidité de l'évolution en milieu hypotonique, s'agit-il de *Crithidia* ayant subi un début de division et donné naissance hâtivement, sur place, à des formes trypanosomes avant la scission complète. Quoi qu'il en soit, cette division hâtive, anarchique si l'on peut dire, sous la forme trypanosome, est le dernier terme de la dégénérescence. Quelques heures après, aucune forme culturale n'existe plus, on ne trouve plus rien. Cette évolution rapide, par le fait même de sa courte durée, permet donc d'éliminer toutes les formes de vieillissement et de suivre tous les stades normaux, si l'on peut dire, ainsi que les formes de dégénérescence finale.

Il semble donc que l'hypotonie ait, bien plus que la température, une influence sur la production des formes trypanosomes, car dans des cultures en milieu NNN, par exemple, à aucun moment nous n'avons constaté la disparition des formes *Crithidia,* et le pourcentage des formes trypanosomes est, à la période de dégénérescence finale, nul ou sensiblement inférieur à ce qu'il était à la période d'état.

Résumé

Nous avons pu isoler en culture quatre souches différentes de *T. cruzi* (deux du Brésil, une d'Uruguay, une du Paraguay). Au point de vue cultural, elles se comportent de façon identique. Pour obtenir des cultures abondantes et d'une grande longévité (6 mois), nous avons utilisé un milieu semi-solide, type Wenyon, additionné de sucre et de sang total de vache, et constaté l'importance de la consistance du milieu (4 gr. de gélose pour 1.000), et de la diminution du taux des chlorures (4 pour 1.000), pour obtenir un développement intense et rapide de la culture.

Les formes trypanosomes se produisent de façon tout à fait constante et précoce, au neuvième jour, à la température ordinaire,

(1) Nieschultz a constaté, au contraire, dans des cultures de trypanosomes d'oiseaux, que les formes à grosses granulations donnaient naissance aux trypanosomes définitifs par élimination de leur extrémité postérieure.

parfois plus tôt quand la culture se développe rapidement dans un milieu particulièrement favorable. La température n'a pas une grande action sur la production des formes trypanosomes et ne doit en aucun cas dépasser 25°. L'évolution des formes culturales est variable suivant le milieu. Dans le milieu semi-solide que nous utilisons, les formes *Crithidia* ensemencées au cours des subcultures se divisent activement, sans jamais subir de régression aux formes *Leishmania* et *Leptomonas* et sans jamais former de rosaces, contrairement à ce qui se passe dans les milieux liquides (NNN, bouillon, sang, etc.). Dans les cultures récentes (15 jours à 2 mois) les trypanosomes présentent une morphologie singulièrement uniforme, les formes anormales que l'on a décrites provenant souvent d'artifices de préparation. Par contre dans les cultures âgées, le polymorphisme est la règle.

En utilisant des milieux hypotoniques (milieu de Ponselle), on peut obtenir, à la température ordinaire, des cultures évoluant rapidement et permettant d'observer plus nettement, par élimination des formes de vieillissement, les différents stades de l'évolution des trypanosomes métacycliques et les formes de dégénérescence, en particulier des formes de division à la période terminale. Il semble que, plus que la température, l'hypotonie du milieu de culture ait une action favorable sur la production des formes trypanosomes.

Bibliographie

Adler (S.) et Theodor (O.). — The identity of *Leishmania tropica* Wright, 1903 and *Herpetomonas papatasii* Adler, 1925. *Ann. trop. med. parasit.*, XX, 1926, p. 355.

Brumpt (E.). — Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti*, et *Ornithodorus moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. de Path. exot.*, V, 1912, p. 360.

— *Précis de Parasitologie*, 4e édition, Paris, 1927, p. 236.

Brumpt (E.) et Gomez (F.). — Description d'une nouvelle espèce de Triatome (*T. chagasi*) hôte primitif de *Trypanosoma cruzi* Chagas. *Ann. Paulistas de Med. e. Cir.*, II, 1914, p. 1.

Campos (E. de Souza). — Sur la paralysie des animaux (chiens, souris) infectés expérimentalement avec des cultures de *T. cruzi*. *C. R. Soc. de biol.*, LXXXIII, 1925, p. 40.

— Estudios sobre una neurotropica raça de *Tryp. cruzi*. *Ann. Fac. de med. S. Paulo*, XII, 1927, p. 197.

Chagas (C.). — Nova especie de morbida de homen produzida por un trypanosoma (*T. cruzi*). *Brasil medico*, XXIII, 1909, p. 161.

— Nova tripanosomiase humana. *Mem. Inst. O. Cruz*, I, 1909, p. 159.

— Le cycle de *Schizotrypanum cruzi* chez l'homme et les animaux de laboratoire. *Bull. Soc. Path. exot.*, IV, 1911, p. 467.

— Quelques aspects évolutifs du *T. cruzi* dans l'insecte transmetteur. *C. R. Soc. de biol.*, XCVII, 1927, p. 829.

DELANOE. — A propos du *Schizotrypanum cruzi*. *Bull. Soc. de path. exot.*, VI, 1912, p. 599.

FRANCHINI (C.). — Sur des cultures très anciennes de flagellés. *Bull. Soc. de path. exot.*, XVII, 1924, p. 32.

GALLIARD (H.). — Culture des trypanosomes et en particulier *T. inopinatum* en milieu liquide sucré. *Annales de parasitologie*, VII, 1929, p. 248.

KLIGLER. — On the cultivation and biological characters of *Leishmania tropica*. *Amer. Journ. of trop. med.*, IV, 1924, p. 69.

LAVERAN ET MESNIL. — *Trypanosomes et trypanosomiases*, Paris, 1912, p. 808.

MAGGIO (C.) et ROSENBUSCH (F.). — Studien über die Chagas Krankheit in Argentinien und die Trypanosomen der Vinchucas. *Centralbl. f. Bakt. Orig.*, LXXVII, 1915, p. 40.

MATHIS (L.). — Sur une modification au milieu de Novy-Mac Neal pour la culture des trypanosomes. *C. R. Soc. biol.*, LXI, 1906, p. 550.

MEYER (M.) et da ROCHA LIMA (H.). — Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmblüten und Arthropoden. *Arch. f. Schiffs. und Trop. Hyg.*, XVIII, 1914, p. 101.

MUNIZ (J.). — Quelques formes intéressantes trouvées dans les cultures de *T. cruzi*. *C. R. Soc. de biol.*, XCVII, 1927, p. 821.

NIESCHULZ (O.). — Zur Kenntnis einiger Vögeltrypanosomen. *Arch. f. Protistenk.*, XLV, 1922, p. 241.

NINO (F.-L.). — Formas culturales de *Schizotrypanum cruzi*. *Bol. Inst. clin. quir.*, Buenos-Aires, 1926, p. 290.

— *Contribucion al estudio de la enfermedad de Chagas en la Republica Argentina*, Buenos Aires, 1929, 239 p.

NOGUCHI (H.). — Isolation of *Leptospira icteroides* from cases of yellow fever in the interior of Bahia. *Monograph. of Rockefeller Inst. Med. Res.*, XX, 1924, p. 9.

NÖLLER (W.). — Neuere Forschungen auf dem Gebiete der Trypanosomenzüchtung. *Arch. f. Schiffs. und Trop. Hyg.*, XXIV, 1920, p. 168.

— Die Züchtung der parasitischen Protozoen. *Handb. Path. Protoz.*, III, 1928. p. 1906.

PONSELLE (A.). — La culture de *Trypanosoma inopinatum*, trypanosome pathogène de la grenouille. *Ann. de parasit.*, I, 1923, p. 155.

TORRES (C.-M.). — Cultura do *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1920 en meio liquido. Influencia da concentraçao dos ions de hydrogenio sobre a cultura. Verificaçao precoce do *Schizotrypanum* no sangue. *Brasil medico*, 1922. p. 317.

WENYON (C.-M.) — *Protozoology*. London, 1926, cf. I, p. 493.

— *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.*, XV, 1921, p. 153.

Laboratoire de parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris.