

REVISTA
DEL
INSTITUTO BACTERIOLÓGICO
DEL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

**Estudios sobre la Tristeza de los bovinos.
Piroplasmosis y Anaplasmosis**

Por JOSÉ GOMES DE FARÍA

Jefe de laboratorio del Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro

Este trabajo ⁽¹⁾ se refiere a una serie de investigaciones realizadas especialmente sobre anaplasmosis. Fueron iniciadas en el Instituto Oswaldo Cruz durante el año 1927 y proseguidas en 1928 en el Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, para donde nos trasladamos con la autorización de nuestro gobierno, y donde la hidalguía del Prof. Alfredo Sordelli puso a nuestra disposición todos los recursos científicos necesarios para trabajos de esta naturaleza. Pudimos efectuar así experimentos sobre bovinos libres de infestación y no inmunes, en un terreno en el cual no existen garrapatas, característica esta última que nos puso enteramente al cubierto de la posibilidad de infestaciones accidentales. En un principio la labor fué exclusivamente orientada hacia la anaplasmosis; pero, como algunas experiencias suministraran resultados interesantes respecto de las piroplasmosis sudamericanas, verificamos además otras pesquisas con el objeto de esclarecer puntos oscuros de la patología y de la veterinaria regionales. Exponemos tales resultados en

(1) Conferencia leída en la *Sociedad Argentina de Biología*, sesión del 4 noviembre 1928.

una primera parte, al tratar de la *Babesia argentina* Lignières (especie dudosa para muchos, no tan solo en el Brasil y en la Argentina), junto con algunas observaciones parasitológicas e inmunológicas diferenciales entre la especie nombrada y el *Piroplasma bigeminum*; mientras en la segunda parte abordamos las relaciones recíprocas de inmunidad entre los virus argentinos y los virus del Brasil y, por último, en otra tercera relatamos las investigaciones realizadas acerca de la anaplasmosis.

Los ensayos aquí referidos deben considerarse como previos, en razón del pequeño plazo de que dispusimos para tratar de un asunto tan complejo y que se relaciona con tantos puntos de la patología animal. De modo, pues, que sus resultados representan, por así decirlo, los primeros pasos en el recorrido de un programa de investigaciones mucho más vasto. Todos estos trabajos se hicieron con la cooperación del doctor Osvaldo Cruz (hijo).

Aquí agradecemos las grandes facilidades que para estas pesquisas nos brindó el Dr. Alfredo Sordelli, director del Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, y el bondadoso auxilio como valiosa cooperación de los doctores F. Jiménez de Asúa, Roberto L. Dios, J. A. Zuccarini, Miguel J. Kuhn y H. Bonacci. Y también queremos hacer llegar la expresión de nuestros mejores sentimientos de gratitud a todo el personal del Instituto de Buenos Aires por las innumerables atenciones recibidas.

CAPITULO I

BABESIA ARGENTINA

(Con las láminas XI, XII, XIII, XIV y XV)

1. Descripción de las infestaciones con *B. argentina*.

En el mes de enero del año 1928 se aplicaron larvas de garrapatas, *Margaropus australis* Füller, a dos toritos de 1 y $\frac{1}{2}$ años de edad, nacidos en la prov. de Buenos Aires, zona indemne de tristeza. Esas larvas provenían de huevos depositados por hembras adultas capturadas en el Brasil, parte en la Estación Zootécnica de Pinheiro (Estado de Río de Janeiro) y parte en el matadero de Santa Cruz (Distrito Federal), am-

bas zonas conocidas como altamente infestadas por la piroplasmosis y la anaplasmosis bovinas. Las hembras, capturadas en diciembre 1927 pocos días antes de nuestra partida, fueron conservadas a la temperatura ambiente durante el viaje de Río de Janeiro a Buenos Aires. Ya en esta ciudad, los huevos se incubaron en la estufa a la temperatura de 32° C., y muchas centenas de larvas, mantenidas a esta temperatura alrededor de 8 días, fueron distribuidas, en dos ocasiones con un intervalo de 4 días, sobre los dos bovinos mencionados, los cuales se hallaban cuidadosamente aislados.

Los animales reaccionaron presentando fiebre de 40°5 y 40°7 C., en el 16° día, que se mantuvo durante 6 a 7 días, para alcanzar, por último, 41° y 41°8 C. Los síntomas observados fueron: disminución del apetito, rumia irregular, gran postración, pulso y respiración aceleradas, anemia leve. No se observó hemoglobinuria. La fiebre continuó siendo muy alta, entre 40° y 41°8 C., por otros cinco días y uno de los dos animales, aquel que presentaba una más profunda postración, sucumbió en el 12° día después de iniciada la infestación. En el otro bovino la fiebre siguió alta durante 8 días y después la temperatura paulatinamente volvió a la normal, reponiéndose el animal muy lentamente.

En uno de los toritos los exámenes microscópicos de sangre, hechos antes y durante los dos primeros días de fiebre, no revelaron babesias. En el otro ya en el 2° día de fiebre encontráronse los primeros parásitos. En el día 3° ambos animales los presentaban en la sangre circulante.

Las babesias se mostraron escasas durante todo el tiempo de la infestación y se caracterizaban sobre todo por la exigüidad de sus dimensiones y por su pequeño número en la sangre periférica. Esto nos hizo pensar de inmediato en una infestación producida por el parásito, tan discutido, que Lignières ha descrito con el nombre de *Piroplasma argentinum*, o por el que describiera Quevedo, en la Argentina, con la denominación de *Babesia minor*.

Del animal que luego sobreviviera, en el 4° día de fiebre se extrajeron 5 cm.³ de sangre que se inyectaron por vía venosa a otro torito de la misma edad. Este último animal reaccionó al 5° día, alcanzando su temperatura los 40°5 C., manteniéndose ésta elevada, entre los 40°5 y 40°9 C., durante otros 5 días. Después de un ligero descenso térmico, a 39°, el bovino murió

en el 10° día, presentando hemoglobinuria poco antes de la muerte.

Los protocolos de la obducción de las dos reses antes mencionadas son los siguientes:

ANIMAL N° 1. Toro 1.309

Infestación experimental por picadura de garrapatas.

Cadáver de un animal enflaquecido; mucosa palpebral pálida y con ligera amarillez. Presenta sangre en la fosa nasal derecha. Mucosa bucal de color blanco amarillento, seca. Tejido celular subcutáneo pobre en grasa. Al practicar la sección, mana poca sangre, la que se presenta fluida y difícilmente cogulable; los músculos conservan una coloración rojo vivo brillante.

CAVIDAD TORÁCICA. *Pulmón derecho* pálido, al corte mana abundante líquido espumoso, amarillo rosado, como pigmentado; crepitación disminuida. *Pulmón izquierdo* con los mismos caracteres, salvo en la base que es de coloración rojo oscuro, con crepitación disminuida, y de donde a la presión mana sangre rojo vivo. De los bronquios sale también un líquido con los caracteres arriba señalados al describirse el pulmón derecho. *Pleuras* de coloración ligeramente amarilla, transparentes y brillantes.

La *cavidad pericárdica* contiene un líquido amarillento, turbio, con floculos de fibrina, en cantidad total de 125 cm.³ (la reacción de Hijmans van den Bergh directa es negativa, pero la indirecta es positiva: +++). *Corazón* de aspecto normal, encierra en sus cavidades coágulos sanguíneo-cruóricos. Miocardio de coloración rojo pálido y consistencia normal. Los *grandes vasos* muestran la túnica interna lisa, brillante y ligeramente amarilla.

CAVIDAD ABDOMINAL. El *peritoneo*, parietal y visceral, es liso, brillante y transparente.

Hígado. Tamaño normal. Coloración muy pálida, presenta debajo de la cápsula gran número de pequeñas manchas de límites netos, de color amarillo ceniciento, cuyo tamaño varía entre una cabeza de alfiler y una lenteja, siendo las manchas más numerosas en la cara superior que en las otras caras. Al corte mana poca sangre, que solo aparece a la presión. Parénquima hepático de coloración amarillo rojizo intenso (color tierra de Siena). Las zonas pericanaliculares presentan coloración amarilla más intensa. Las manchas descritas son subcapsulares. *Vesícula biliar*: contiene gran cantidad de bilis grumosa, color ladrillo.

Bazo. Aspecto exterior, tamaño y cápsula no muestran alteraciones macroscópicas. Al corte el parénquima es de consistencia firme, la pulpa no es difluente.

Riñones. Son de tamaño normal. La cápsula se desprende fácilmente. Al corte, la superficie de sección presenta una coloración uniforme, rojo clara, ligeramente amarilla. *Cápsulas suprarrenales* normales, de color ligeramente amarillado.

Estómago. Muy distendido por gases, conteniendo muy poco alimento y gran cantidad de líquido.

Intestinos. Nada de particular.

Vejiga. Contiene muy poca orina, 175 cm.³ de color amarillo rojizo, ligeramente turbia.

SISTEMA NERVIOSO. *Meninges. Cerebro, cerebelo, bulbo* sin nada de particular.

GANGLIOS LINFÁTICOS. Nada de particular.

DIAGNÓSTICO ANATÓMICO. *Anæmia parva. Icterus. Hydropericardium, hamoglobinuria lævis. Piroplasmosis acuta.*

ANIMAL N° 2, Toro 1311.

Infestación experimental, por inoculación intravenosa de 5 cm.³ de sangre.

Cadáver de un animal en buen estado de nutrición. *Mucosas palpebral y bucal*, ligeramente pálidas; presenta una ligera ulceración circular de bordes lisos con fondo blancuzco, en la región mediana de la encía inferior. *Tejido celular subcutáneo* normal; grasa en cantidad regular. *Músculos* de coloración rojiza; húmedos. En la región trocarteriana derecha obsérvase una colección de líquido rojizo (hemorrágico) del tamaño de la cabeza de un niño.

CAVIDAD TORÁCICA. *Pleuras*: Cavidades pleurales sin líquido, serosas lisas, unidas y brillantes.

Pulmones libres en las cavidades. De coloración rosado pálido; elasticidad normal. Crepitación normal. Al corte mana, mediante presión, una pequeña cantidad de líquido sanguinolento.

Ganglios tráqueo-brónquicos de tamaño y aspecto normales.

Cavidad pericárdica. Contiene un líquido de coloración amarillo rojizo, en cantidad aproximadamente de 100 cm.³, de coagulación lenta. Al seccionarse los *grandes vasos* mana sangre violácea y fluida.

Corazón con grandes focos hemorrágicos subpericárdicos; de consistencia un poco blanda. *Pericardio visceral* de superficie unida y brillante, presentando un puntillado de color rojo oscuro (color del vino Borgoña), principalmente en la cara anterior y posterior del ventrículo izquierdo. Máculas anchas del mismo aspecto y color en la cara anterior del ventrículo derecho. Paredes del ventrículo izquierdo, espesadas. *Miocardio* de coloración rojo vinosa y consistencia un tanto disminuida. *Endocardio* con extensas manchas oscuras (color del vino Borgoña), en toda su extensión, en la punta y en la región de las columnas como también en los tendones valvulares. *Válvulas aórticas* un tanto espesadas. Al nivel del *cayado de la aorta* se encuentra una placa fibrosa. El *ventrículo derecho* presenta las mismas manchas descritas para el ventrículo izquierdo, principalmente en la parte superior.

CAVIDAD ABDOMINAL. *Hígado* de consistencia firme, midiendo 48 cm. de largo x 36 cm. ancho. Al corte mana un líquido amarillo. *Parénquima* de coloración rojo vinosa amarillenta. *Vesícula biliar* sin alteraciones. *Bilis* ligeramente viscosa, sin grumos, ni concreciones, color verde oscuro.

Bazo. Aumentado más o menos un doble en su volumen (48 cm. de largo x 20 cms. de ancho), de superficie irregular, con islotes prominentes. *Pulpa* de color oscuro, rojo violáceo (color de borra de vino), muy rugosa. *Corpúsculos de Malpighi*, difícilmente visibles.

Riñones. Aspecto exterior normal. *Cápsula* bien conservada, que se desprende fácilmente. *Parénquima* de superficie lisa, color rojo oscuro intenso, principalmente en las zonas corticales. *Zonas medulares* de coloración rosada. *Cápsulas suprarrenales* de tamaño normal; zona cortical de coloración roja oscura y zona medular de coloración rosado amarillenta.

Vejiga. Con gran cantidad de orina de color rojo oscuro; aproximadamente 1 y $\frac{1}{2}$ L.

Ganglios mesentéricos no aumentados de volumen.

Aorta abdominal rodeada por una cadena visible de ganglios hemolinfáticos pequeños.

SISTEMA NERVIOSO. *Cerebro, cerebelo y bulbo* no presentan lesiones macroscópicas.

DIAGNÓSTICO ANATÓMICO. *Anæmia acuta parva. Icterus. Hydropericardium; hæmorrhagia supericardiæ et subendocardio. Atheroma aortæ. Hyperplasia lienis. Congestio renis. Hæmoglobinuriæ. Piroplasmosis acuta.*

2. Observaciones parasitológicas.

Pasamos ahora al estudio de los protozoarios hallados en los casos arriba referidos y en los otros que resultaron de las inoculaciones en serie verificadas posteriormente.

Los parásitos son siempre muy poco abundantes en la sangre periférica y para encontrarlos las extensiones de sangre deben ser finas y confeccionadas por medio de un cubre o porta-objeto, con menor anchura que el porta en el que se quiere hacer el extendido, de modo que se tenga una preparación de bordes nítidos y en zona fácilmente accesible para el objetivo del microscopio. En la extremidad final del extendido y sobre todo en sus bordes es donde con mayor facilidad se encuentran estas babesias. En las partes centrales, por el contrario, aún en los preparados muy bien hechos, es muy difícil observarlas y solo se ven por excepción.

Los glóbulos rojos huéspedes no es raro presenten un tinte más cargado que los normales. Los parásitos muestran frecuentemente preferencia por los microcitos, lo cual puede ser una característica para reconocerlos en los casos de infestaciones mixtas. No se observa la preferencia de las babesias para fijarse en los bordes de los hematíes, como ocurre en otras especies de este género.

En los extendidos de sangre, secados al aire, fijados en alcohol y coloreados por el licor de Giemsa, estos protozoos presentan tres formas:

1. Formas ameboideas redondeadas.
2. Formas ameboideas alargadas.
3. Formas bigeminadas.

1. Las formas *redondeadas* de la babesia agente se encuentran más a menudo en el comienzo de la infestación y están constituidas por pequeños anillos o esferillas de 1 a 2.5 μ de diámetro y más raramente 3 μ . Algunas son tan pequeñas (meno-

res de 1μ) que pueden confundirse con los anaplasmas y es con gran dificultad que en ellas se distingue una zona plasmática, con tonalidad azul intensa de contorno ligeramente irregular y otra zona, puntiforme, de tono rojo violeta.

Los aspectos más comunes están representados por pequeños anillos redondos muy finos, de borde irregular, los cuales tienen en su centro un espacio claro. La cromatina puede estar dispuestas bajo forma de un grueso gránulo; sin embargo, la mayor parte de las veces constituye una especie de arco de círculo, espeso, que hace saliencia en el interior de la vacuola central, siempre desprovista de color y a través de la cual no se percibe el tinte del eritrocito. Con esta última disposición la cromatina puede ocupar de $1/3$ a $2/3$ del anillo plasmático. El arco cromatínico puede ser homogéneo o fragmentado y granuloso, mientras en algunos casos presenta figura moniliforme.

El resto del anillo plasmático adquiere con el Giemsa un color azul más o menos cargado. Muchas de estas formas presentan un aspecto muy semejante al de ciertos plasmodios y no es raro se asemejen al *Plasmodium falciparum* del paludismo tropical humano. Las babesias se encuentran en su mayoría aisladas, aunque no son raros los glóbulos con dos parásitos, pero es en verdad excepcional encontrarlos con 4 protozoarios.

En las extremidades de los extendidos, se encuentran algunas veces acúmulos de 3 ó 4 hematíes infestados, los cuales dan la impresión de un glóbulo único conteniendo muchos parásitos; esto puede ser más bien debido a una irregularidad de preparación tal vez favorecida por un estado de viscosidad particular de los eritrocitos huéspedes.

2. Las formas *alargadas* son mucho más raras que las redondeadas. Miden de 1.5 a 3μ de largo por 1 a 1.2μ de ancho. La cromatina se agrupa en un grueso grano o casquete en una de sus extremidades, por lo general la más ancha del parásito.

3. Las formas *bigeminadas*, que resultan de la división de las anteriores, presentan especialmente la tendencia a formar un ángulo de gran abertura. Cada elemento, aislado, alcanza la dimensión de 2 a 2.5μ y se presenta como un corpúsculo piri-forme vacuolado, raramente macizo, en el que se halla un núcleo, ora compacto, ora dispuesto en grueso arco de círculo que muy poco se diferencia del citoplasma, lo que da al conjunto aspecto de lente.

En el momento final de la división los dos elementos se presentan reunidos por un fino filamento, y ocupan en el hematíe una posición meridiana, determinando un ángulo curvilineo que se aproxima a los 180°.

Estas formas se encuentran generalmente en la sangre circulante al final de las infestaciones y, sobre todo, en los casos graves, casi siempre en los días que preceden a la muerte.

En la sangre de los animales estudiados por nosotros nunca hemos encontrado los aspectos de trébol descritos para otras especies del mismo género.

Los protozoarios encontrados en los órganos internos se asemejan en un todo a los que acabamos de describir en la sangre periférica. En las vísceras se ven sobre todo formas pequeñas, redondeadas, dispuestas por pares y que, examinadas con pequeño aumento, cobran el aspecto de un diplococo intraglobular.

En los "frottis" y en los cortes de órganos pueden también encontrarse el tipo bigeminado con la disposición y los caracteres ya señalados.

Según ya lo habían apuntado Smith y Kilborne para la *Babesia bigemina*, y posteriormente como fuera verificado por Lignières, los piroplasmas, bien en la sangre retirada del animal vivo, bien después de su muerte, transfórmanse rápidamente perdiendo el aspecto de peras ovals o elípticas, formas tan características en la sangre del animal con vida, para ofrecer el de pequeñas masas retraídas, esféricas, casi cocciformes. La diferenciación colorante antes nítida entre la cromatina y el citoplasma también va desapareciendo y los parásitos cambian notablemente de estructura, quedando en un principio reducidos a esférulas en las cuales se ve una pequeña masa cromática rodeada por leve aureola de citoplasma fuertemente basófilo, para más tarde, en un período más adelantado, transformarse en un corpúsculo que se colorea casi uniformemente de *azul violeta* y en el que ya no es posible distinguir los componentes somáticos. Este hecho es naturalmente muy importante y debe tenerse en cuenta en el diagnóstico *post-mortem* de las diferentes piroplasmosis, para evitar errores de diagnóstico.

Estudiando los "frottis" de órganos de las dos obducciones mencionadas, como también de otros casos, en que se verificó la existencia de una infestación mixta por el *Piroplasma bigeminum* y *Babesia argentina*, pudimos comprobar las localizaciones viscerales de este último parásito, ya señaladas por Lig-

nières y otros. Las babesias hállanse en gran número en los "frottis" de riñón, miocardio, cerebro y cerebelo. El bazo, el hígado y los ganglios linfáticos contienen pocos parásitos. Lignières señaló, como localizaciones principales, el riñón y el corazón. La localización en el cerebro y el cerebelo nos parece una comprobación nueva para *B. argentina*.

Los "frottis" de cerebro deben ser preparados de modo que se obtenga una distensión de los capilares tan perfecta como sea posible, lo que se consigue apretando un pequeño fragmento del órgano entre las extremidades de dos porta-objetos, procediéndose a la extensión del material en sentido contrario al que generalmente se usa para las preparaciones de sangre. Fijando los "frottis" en alcohol éter, una vez coloreados con el Giemsa, puede verificarse que la gran mayoría de los capilares están repletos de glóbulos con parásitos de iguales características morfológicas. Los protozoarios se localizan principalmente en la sustancia gris de la corteza del cerebro y del cerebelo.

Los grandes vasos no contienen babesias o éstas allí se encuentran en muy pequeño número. En los otros órganos, riñón y corazón, la localización es idéntica; los parásitos llenan los capilares y dejan casi libres las arterias y las venas. Sobre todo en los capilares de pequeño calibre del corazón, vecinos a los pequeños focos hemorrágicos subpericárdicos y subendocárdicos ya mencionados en los protocolos de obducción, es donde se encuentran en mayor número.

Al realizar el estudio del material en cortes, pudimos verificar que los microorganismos hállanse casi exclusivamente en los capilares y vasos de pequeño calibre, formando verdaderas embolias parasitarias.

No nos fué posible comprobar alteraciones en las paredes de estos vasos, como tampoco en los tejidos circundantes.

El aspecto de los "frottis" y de los cortes de cerebro y cerebelo recuerdo lo que ocurre en la malaria tropical humana, en la que los capilares se encuentran ingurgitados de esquizontes de *P. falciparum*.

Las embolias parasitarias en el cerebro de los animales atacados de piroplasmosis fueron señalados por Brumpt en la piroplasmosis canina; Clark ya también los había señalado en los bovinos de Panamá y también en los cérvidos (*Odocoileu chiriquensis*) de esa zona.

Clark considera el parásito por él observado como *B. bigemina*. Brumpt (1920) adelanta la hipótesis de que el agente

observado por Clark sea *B. argentina*; señala además haber observado protozoos morfológicamente semejantes a esta última en los cérvidos del Brasil, *Cariacus rufus* Illiger.

Muy importante sería asegurar de que los cérvidos fueran los portadores habituales de estos parásitos, desde los cuales serían transmitidos a los bovinos por las garrapatas. Sobre este punto, entretanto, no existen investigaciones y sería de desear que se realizasen, no solo desde el punto de vista científico, sino también por el interés práctico de la cuestión.

El acúmulo de las babesias en los órganos internos ha sido considerado por algunos como la expresión de un tropismo especial de los parásitos para las vísceras (esplacnotaxia); a nosotros nos parece por el momento que ese hecho se debe a una condición biológica intrínseca del esporozoario, el cual solo se multiplica en los órganos internos y en determinadas redes capilares. La variedad de figuras de multiplicación en la sangre periférica (formas bigeminadas) es otro argumento en favor de esta afirmación nuestra.

En las pocas obducciones que pudimos practicar, correspondientes a los casos en los que el agente de la infestación era el *P. bigeminum*, no nos fué posible encontrar esas grandes acumulaciones de los microorganismos en los órganos internos. El número de los parásitos contenidos en las vísceras es directamente proporcional al existente en la sangre circulante; además esta especie no evidencia ninguna particular predilección para alojarse en los riñones, corazón, cerebro y cerebelo. El mayor número de los piroplasmas hállase siempre en el bazo, mientras que los protozoarios encontrados en los "frottis" de los otros órganos están en estrecho paralelismo con los esporozoos contenidos en la sangre periférica.

Los vasos del cerebro, en los casos de infestación mortal por *P. bigeminum*, están siempre o sin sangre o conteniendo muy pocos individuos de esta especie.

3. Diagnóstico morfológico diferencial de los parásitos.

El diagnóstico diferencial entre la babesia estudiada y el *P. bigeminum*, es relativamente fácil, teniéndose en cuenta las mayores dimensiones de este último (2 a 2 y $\frac{1}{2}$ veces) y también que las formas alargadas y ovoides alcanzan los extremos opuestos del hematíe.

Los parásitos piriformes de esta última especie son en general muy alargados y ventrudos, al paso que en la especie en cuestión, *B. argentina*, las formas en pera, grandes, tienen un contorno globuloso casi esférico y presentan siempre la tendencia a formar un ángulo de gran abertura. Más difícil es sin duda el diagnóstico diferencial entre esta última babesia y las otras especies del mismo género. Así es que presenta una gran semejanza con la *Babesia bovis*, Babés. Las diferencias principales para nosotros consisten en la extremada finura de este último parásito, en la ausencia de formas en trébol, y en la tendencia, que en él siempre se observa, a ocupar el borde de los hematíes a modo de una cofia.

Grandes semejanzas también presentan las formas bigeminadas. Las partes afiladas de las peras se aproximan o se tocan de modo que los dos individuos se hallan en la misma línea recta, con las dos extremidades anchas en dirección diametralmente opuesta (*B. divergens* de Mac Fayden y Stockmann). El parecido es tan grande que Vryburgs, en Holanda, quiso identificar las dos especies; señalaremos, sin embargo, más adelante que Brumpt por experimentos biológicos consiguió contradecir esta opinión.

Morfológicamente, también, no se distingue de la *B. berbera* Sergent, parásito de los bovinos de Argelia, si se exceptúa la presencia de las citadas formas en trébol que no pudimos comprobar en la sangre de nuestros animales.

4. Posición sistemática.

Aún no se halla bien establecida la posición sistemática de los piroplasmídeos y al respecto son bastante discordes las opiniones de los autores, sobre todo por lo que se refiere al establecimiento de géneros y subgéneros. Según Wenyon las especies pequeñas de la familia *Babesidae* entrarían en el género *Babesia* Starcovici subgénero *Babesia*, cuyo tipo es la *Babesia bovis*.

En 1919 Mesnil propuso la creación del género *Babesiella* para estos parásitos y, anteriormente, Sohns (1918) ya había creado el género *Microbabesia* para estas formas. Según las reglas de nomenclatura zoológica debería prevalecer el género *Microbabesia* de Sohns. La única objeción en contra sería aquella de que la especie descrita está imperfectamente identificada, como ya lo indicara Brumpt.

Al tratar de revisar esta cuestión hemos llegado al convencimiento de que la creación de estos géneros y subgéneros no está justificada. Según Sergent y sus colaboradores, Mesnil⁽¹⁾ substituyó el género *Babesia*, por *Babesiella*, pues aquel ya había sido empleado para bacterias. Naturalmente quiso referirse al género *Babesia* creado por Trevisan, en 1889, para ciertas formas de *Streptococcus*. Ahora bien, las bacterias son universalmente reconocidas como vegetales y, siendo las nomenclaturas zoológica y botánica completamente independientes, no hay razón para cambiar de nombre al género.

No obstante el término *Babesiella* ha sido muy ampliamente usado en trabajos modernos, sobre todo por los investigadores franceses y rusos.

El parásito que venimos estudiando aproximase mucho a la *Babesia bovis* Starcovici, especie tipo del subgénero *Babesia* y, por tanto, debe ser designada *Babesia argentina* (Lignières 1903).

El otro protozoo, el *P. bigeminum*, constituye el tipo del subgénero *Piroplasma* (Patton, 1895) y debe ser conservada la denominación *Piroplasma bigeminum* (Smith y Kilborne, 1893).

Quédanos por estudiar la especie descrita aquí en la Argentina por el Prof. Quevedo en 1919, en un estudio titulado: "Sobre una variedad de tristeza causada por *piroplasmas pequeños*", quien la designó *Babesia minor*.

Por la descripción y por los dibujos, aunque esquemáticos, dados por nuestro ilustre colega, creemos poder identificar esta especie con la *B. argentina* Lignières.

Wenyon en su tratado de Protozoología incluye la *M. argentina* y la *B. berbera* en la lista de las especies que pueden ser tan sólo razas de la *B. bovis*. Los caracteres morfológicos ya señalados, nos parecen suficientes para no aceptar este punto de vista, agregando además que la *B. bovis* es un parásito frecuente en la sangre periférica de los casos de hemoglobinuria, y también que Brumpt pudo comprobar que el *Ixodes ricinus*, transmisor habitual de la *B. bovis*, en Europa, no transmite la *B. argentina*, lo mismo que el *Margaropus australis*, transmisor sudamericano, no transmite la *B. bovis*. Por otra parte, este mismo autor pudo verificar también que un animal inmunizado

(1) Mesnil en la crítica del trabajo de Du Toit propone simplemente el término *Babesiella*, sin justificar la creación del nuevo género.

con *B. bovis* (virus de Normandía) permanecía sensible a la *B. argentina*.

5. *Pasajes en serie de la B. argentina.*

Con la sangre del toro 1.311 (véase págs. 431 - 432 - 433) se hicieron 4 pasajes en serie, en períodos de tiempo variables entre 13 ó 61 días después de cada infestación.

Posteriormente se hizo una nueva inoculación con sangre del animal sometido a la picadura de las garrapatas, más precisamente a los 7 meses (206 días) después de la infestación por el invertebrado y, del animal así inoculado, 71 días más tarde se verificó un nuevo pasaje a otro bovino. Empleamos siempre novillos de 18 a 24 meses de edad mestizos e indemnes, procedentes de la Prov. de Buenos Aires.

Como resultaría muy largo y fastidioso reproducir minuciosamente los protocolos de todas estas observaciones, daremos una noticia de conjunto sobre la marcha clínica de los casos, acompañándola con el resumen del estudio parasitológico.

El período de incubación varía entre 5 y 15 días. Los períodos cortos parecen estar en relación con la proximidad de los pasajes. El tiempo de incubación más largo fué observado exactamente con la inyección de sangre efectuada 206 días después de la infestación.

La marcha clínica de los casos fué en general benigna, a pesar de las temperaturas muy elevadas observadas en los animales inoculados (40° - 41° C.) Sus síntomas principales: melancolía, debilidad, disminución del apetito y de la rumia, constipación, palidez de las mucosas. Ninguna vez se observó hemoglobinuria. El pasaje del virus en serie no parece haber aumentado su virulencia.

El examen hematológico ⁽¹⁾ en uno de los casos en que los síntomas eran acentuados en el 7° día del ataque febril, revela:

BOVINO N° 1.318. Exámen hematológico (vena de la oreja)

SERIE ROJA. Numeración globular: 2.900.000 x mm.³. Hemoglobina 21 (Sahli-Leitz, patrón humano).

Sustancias gránulo-filamentosa y metacromática ausentes. Alteraciones cualitativas: ligera anisocitosis. Parásitos: raros individuos de *B. argentina*.

(1) Este examen hematológico así como los otros que figuran en el trabajo fueron hechos gentilmente por J. A. Zuccarini.

SERIE LEUCOCITARIA. Numeración globular: 5.100 x mm.³.

Fórmula leucocitaria	c. r.	c. a.
Granulocitos polinucleares	30.0 %	1.530
» eosinófilos	1.0 %	51
Linfocitos	64.5 %	3.289
Monocitos	4.5 %	230
	100.0 %	5.100

Notable anisocitosis, sobre todo de los granulocitos polinucleares. Formas dismorfocariocíticas (células de Rieder) de linfocitos y monocitos. Monocitos con protoplasma vacuolado. Figuras de eritrofagocitosis en células de la serie monocítica.

PLAQUETAS. A juzgar por las extensiones de sangre periférica son normales en número. Encuéntrase plaquetas de gran tamaño.

Las alteraciones de la sangre coinciden, por tanto, con las descritas en la enfermedad causada por el *Piroplasma bigeminum*.

No se observaron recidivas.

En todos los pasajes los protozoos conservaron los caracteres anteriormente descritos. El número de glóbulos parasitados no excedió, mediante un cálculo aproximado, al 2/1000 y en muchos casos la proporción fué inferior a esta cifra.

6. Pruebas de inmunidad cruzada.

Con los animales sobrevivientes de las infestaciones con *B. argentina* se hicieron ensayos de inmunidad cruzada con el *Piroplasma bigeminum*.

Las experiencias se practicaron empleando el virus puro ⁽¹⁾ de *P. bigeminum* que nos fué gentilmente cedido por el Prof. J. Lignières.

En estos ensayos empleamos 4 animales. El primero fué inoculado con *B. argentina* y 98 días después de estar completamente curado de la infestación, recibió, por vía venosa, 20 cm.³ de sangre conteniendo *P. bigeminum*. Reaccionó el animal al 4° día, elevándose la temperatura a 39° C. Al 5° día la temperatura alcanzó a 40°.8 C. y encontrándose numerosos *P. bigeminum* en la sangre circulante, los cuales se observaron continuamente por muchos días.

(1) Este virus, previamente, fué pasado en serie a varios animales, con el objeto de comprobar de modo riguroso si contenía *P. bigeminum* exento de *Anaplasma*.

El 2º animal fué inoculado 80 días antes con la *B. argentina*. Completamente curado de la infestación primitiva, recibe 20 cm.³ de sangre con *P. bigeminum* por vía venosa. En el 6º día presenta *P. bigeminum* en la sangre periférica; a los 8º y 9º días, la temperatura se eleva a los 40º y 41º.1 C. Los numerosos piroplasmas, que entonces se observaron, permanecieron en la sangre circulante por un tiempo de varios días.

El tercer animal es inoculado 90 días después de la infestación de *B. argentina*, con el mismo material. Al 5º día reacciona con temperatura de 39º C.; al 6º día la temperatura es de 40º.1 C. y hay piroplasmas en la sangre periférica; al 7º día 40º.5 C. y parásitos, los que persisten por muchos días.

El 4º animal, 31 días después de la infestación con *B. argentina*, recibe 20 cm.³ de sangre con un virus mixto (*P. bigeminum* y *B. argentina*) procedente de la prov. de Santa Fé. Al 4º día presenta los primeros *P. bigeminum* en la sangre circulante. Al 6º día la temperatura se eleva a 40º.3 C. y se observan numerosos parásitos; al 7º día, 40º.6 C. y piroplasmas abundantísimos, y en el 8º día muerte con violenta hemoglobinuria.

Para verificar la inmunidad cruzada entre el *P. bigeminum* y la *B. argentina* fueron inmunizados 4 novillos mestizos de 2 años con el mismo virus del *P. bigeminum*, ya estudiado anteriormente.

Después de 27 días de la infestación y ya perfectamente curados, los antedichos bovinos se inoculan por vía venosa con 25 cm.³ de sangre conteniendo la *B. argentina* pura.

El primer animal reacciona con temperatura de 39º C. al 10º día; al 11º día observáanse raras *B. argentina* en la sangre periférica; en los días siguientes la temperatura es de 39º.7 C. y también son raros los parásitos en la sangre circulante.

El 2º animal reacciona igualmente en el 10º día con una temperatura de 39º.4 C. y babesias en la sangre que se mantienen durante 3 días. La temperatura oscila entre 39º y 39º.4 C. y cae a la normal en el 14º día.

El tercer animal reacciona en el 9º día con una temperatura de 40º.4 C.; al día siguiente se ven las primeras babesias que se mantienen durante 4 días consecutivos; la temperatura varía entre 39º.6 y 40º.7 C.

El 4º animal no presentó reacción de temperatura, ni fué posible encontrar babesias en la sangre periférica. 30 días después se le reinoculó con el mismo virus puro, con material de

un pasaje reciente, inoculación que soportó nuevamente sin reacción de temperatura ni parásitos en la sangre circulante.

Estas experiencias permiten llegar a la conclusión de que la *B. argentina* no confiere inmunidad para el *P. bigeminum*. Los animales vacunados con la primera reaccionan prontamente a las inoculaciones del segundo protozooario, en el plazo habitual de incubación, con temperatura elevada y parásitos abundantes en la sangre periférica; habiéndose en un caso producido hemoglobinuria y muerte.

Procediendo a la prueba inversa, se verificó también que el *P. bigeminum* no protege contra la *B. argentina*. En estas experiencias comprobóse igualmente un plazo de incubación habitual, aunque se observó una reacción térmica débil y breve, conservando las babesias su característica escasez en la sangre circulante. De los 4 animales preparados, uno no reaccionó, caso para el cual no podemos dar una explicación. (¿Inmunidad natural? ¿Infestación levísima con reacción imperceptible? ¿Infestación inaparente?).

Estos resultados están en completo desacuerdo con las observaciones de Lignières, quien afirma que la *B. argentina* vacuna contra el *P. bigeminum* y que este último confiere una cierta resistencia contra la *B. argentina*, tanto que de esta inmunidad relativa trata de sacar partido para su método de vacunación.

Los experimentos nuestros son todavía muy poco numerosos. Fueron realizados con un virus único que parece bastante atenuado. Por tanto, no nos sentimos autorizados para emitir una conclusión definitiva. Consignamos, por el momento, nuestro desacuerdo. Se hacen, pues, necesarias otras experiencias para llegar a conclusiones seguras sobre este tópico. Y es de esperar que estas experiencias se hagan con larvas portadoras de infestaciones puras, lo cual no es muy difícil de obtener y realizar de acuerdo con las indicaciones sugeridas por Brumpt.

7. *B. berbera* Sergent y col. *B. argentina* (Lignières).

Morfológicamente parece difícil establecer un diagnóstico diferencial entre estas dos especies. Sergent y sus colaboradores señalan varias características para separarlas, pero, después de nuestras verificaciones, tales razones nos aparecen muy poco consistentes. Sus argumentos son:

a. Benignidad constante de la enfermedad experimental.

- b. Anemia que se determina después de los accesos agudos.
- c. Ineficacia constante del azul tripán.
- d. La ausencia del poder inmunizante contra el *P. bigeminum*.

Las comprobaciones nuestras, expuestas con anterioridad, muestran que estos caracteres no pueden servir para distinguir las dos especies. Porque, aun cuando no hayamos ensayado el tripán contra este virus experimental, las observaciones realizadas por nosotros en el Brasil, principalmente en animales de Sobragy, y las observaciones anteriores de Dupont, en la por él llamada forma visceral de la piroplasmosis, permiten establecer la ineficacia del medicamento, lo cual también está de acuerdo con la experimentación de Lignières. Las experiencias de Sergent sobre inmunidad cruzada son infelizmente poco claras, en razón de haber sido hechas con un virus mixto (*P. bigeminum* y *B. argentina*) procedente del Brasil, no siendo posible excluir la hipótesis de que en este caso se tratara de una acción sinérgica de los dos protozoarios.

Brumpt, estudiando un parásito vecino de este género, lo identifica con la *B. argentina* (Lignières). En el momento actual, sin nuevos experimentos, es imposible resolver la cuestión.

8. *B. argentina* en el Brasil.

La *B. argentina* es por cierto un parásito de amplia diseminación en el Brasil, donde creo lo mencionó por primera vez Carini, en San Pablo, y después Brumpt, que también lo estudió en Europa, en infestaciones experimentales obtenidas con *Margaropus australis* llevados del Brasil. Este autor obtuvo infestaciones mixtas de *P. bigeminum* y *B. argentina*, obteniendo de esta última especie asimismo una infestación pura.

Tuvimos ocasión de estudiar, en el Brasil, una docena de casos de infestaciones mixtas en una "fazenda" del Estado de Minas Geraes, pueblo de Sobragy, donde se había introducido un gran número de bovinos importados de Inglaterra.

Esta forma de tristeza asumió allí un carácter sumamente grave, matando a todos los animales atacados, a pesar de las innumerables tentativas medicamentosas. El azul tripán, que en esta ocasión fué ampliamente usado, mostróse enteramente inactivo contra el parásito, que ahora podemos identificar con el estudiado por nosotros en Buenos Aires.

También nos fué posible estudiar la enfermedad producida por esta babesia en las "fazendas" donde se procura aclimatar toros extranjeros aunque deficientemente inmunizados.

Un estudio clínico de esta forma de tristeza fué realizado en el Brasil por el Prof. Octavio Dupont, quien la designó, como ya se ha dicho, con el nombre de forma visceral de la piroplasmosis, señalando entonces la presencia de parásitos en los becerros nacidos en los mismos campos infestados.

9. Aislamiento de la *B. argentina*.

Hasta ahora no existe ningún método que permita obtener infestaciones puras de *B. argentina*, esto es exentas de *P. bigeminum* y de *Anaplasma*.

El método que se ha propuesto para el aislamiento del *P. bigeminum* mediante pasajes sucesivos apenas surgen los parásitos de esta especie en la sangre circulante, debe ser aquí completamente ineficaz por cuanto la incubación de la *B. argentina* es siempre más larga (10 a 12 días) que la de aquél parásito.

Tal vez, las infestaciones con larvas de *Margaropus* o la inyección de un pequeño fragmento de cerebro en bovinos normales sean los métodos que ofrezcan la posibilidad de conseguir una infestación pura.

De un animal muerto, recientemente, a consecuencia de una infestación mixta retiróse lo más asépticamente posible un pedazo de corteza cerebral, de más o menos 2 mm., que se trituró en suero de bovino normal y se inyectó por vía venosa a un bovino nuevo. Desgraciadamente como la obducción se realizó lejos del Instituto y en hora impropia, medió un espacio de 10 horas entre la extracción del material y la inoculación al vacuno.

Exámenes sucesivos de la sangre de este animal durante más de un mes, no revelaron la presencia de babesias, ni tampoco se observaron alteraciones de temperatura. Posteriormente el doctor Roberto L. Dios inoculó a otro vacuno con corteza cerebral de un nuevo caso; pero el animal sucumbió por embolia. Pese a estos resultados afirmamos que por este método es posible obtener infestaciones puras. Quizás se consigan buenos éxitos inoculando algunas gotas de sangre de la cortical del riñón, cuando se note una fuerte infestación de este órgano.

CAPITULO II

ENSAYOS SOBRE LAS RELACIONES RECÍPROCAS DE INMUNIDAD
ENTRE LOS VIRUS DE ARGENTINA Y DE BRASIL

Los trabajos anteriores de Rosenbusch y de Rosenbusch y González procuran demostrar la gran variabilidad de los piroplasmídeos respecto del problema de la inmunidad. Laveran y Nattan-Larrier pretenden haber verificado que el virus francés de *Babesia canis* no inmuniza contra un virus norteafricano de la misma especie y morfológicamente idéntico. Ciuca afirma haber observado igual cosa inoculando un virus de Tonkín y posteriormente un virus norteafricano. Miranda y Horta, en el Brasil, también observaron que animales inmunizados por Lignières en la Argentina, contra *P. bigeminum* y *B. argentina*, contraían piroplasmosis en el Brasil y sucumbían a consecuencia de ella. Lo mismo se observó con animales de la zona infestada de Texas importados al Brasil, por el señor Mackenzie, los cuales murieron en gran número en los campos del Estado de Paraná, de acuerdo con las comprobaciones de los dos últimos autores brasileiros nombrados.

Tratamos también nosotros de abordar este importantísimo tópico del problema de la tristeza. Desgraciadamente solo pudimos realizar ensayos con un número muy limitado de animales y pocos virus, empleando sangre virulenta.

Las primeras experiencias fueron realizadas con animales de 3 años, mestizos, que habían sido inyectados en febrero 1926 con virus mixtos argentinos, procedentes de Las Moscas (Entre Ríos).

Estos animales, así como los que se mencionan a continuación, habían servido para el importante trabajo de Jiménez de Asúa, Dios, Zuccarini y Kuhn sobre hematología y anatomía patológica de la tristeza y fueron puestos a nuestra disposición por estos distinguidos colegas.

Un año y dos meses después de la primera infestación nosotros los reinoculamos con el virus puro de *P. bigeminum*, oriundo de Concordia (Entre Ríos), inyectando a cada animal 25 cm.³ de sangre por vía venosa.

El primero de estos animales presentó reacción térmica en el 5 día (40° C.), sin parásitos; en el 6° día temperatura

normal y raros piroplasmas (*P. bigeminum*), que se mantuvieron por otros 2 días, durante los cuales se observaron ligeras elevaciones térmicas (39°.8 y 39°.5), desapareciendo enseguida. Sucesivos exámenes realizados diariamente fueron negativos. Aparte la pequeña reacción térmica no se observó ningún síntoma clínico. Procedióse 34 días después a inoculársele 25 cm.³ de sangre de un animal que sirvió para efectuar un pasaje del virus de Brasil (*P. bigeminum*, *B. argentina* y *Anaplasma*), proveniente del Estado de Río. Al tercer día se notó una ligera elevación térmica de 39°3 C., sin parásitos. Exámenes repetidos durante varios días consecutivos no revelaron esporozoos, ni tampoco se observaron síntomas clínicos. En revisiones posteriores no se encontraron *Anaplasmas* en la sangre circulante.

El 2º animal después de la 1ª inoculación (virus de Concordia), presentó en el 5º día una pequeña reacción térmica de 39°.6 C., sin parásitos. En el 6º día, 39°.5 C. y raros piroplasmas en la sangre circulante que se mantuvieron en el 7º y 8º días y luego desaparecieron. Ningún síntoma clínico. 34 días más tarde es reinoculado, como el animal anterior con el virus mixto del Brasil. Al tercer día ligera elevación térmica, 39° C., acompañada de raras babesias en la sangre periférica. No se observa ningún síntoma clínico. Exámenes sucesivos en días posteriores son negativos. No aparecen anaplasmas en la sangre circulante.

También fué hecha otra serie de experiencias con 2 toros de 3 años, mestizos, previamente inyectados con el virus mixto procedente de Las Moscas (Prov. de Entre Ríos), que presentaron 2 fuertes infestaciones mixtas (*P. bigeminum* y *Anaplasma*). Después de 18 meses de la primera infestación, se les inoculó con el virus mixto del Brasil, el mismo que se utilizara en la serie anterior de estos experimentos. El 1º de estos animales, en el 7º día presentó raros piroplasmas en la sangre circulante y así se mantuvo durante 3 días seguidos. Los parásitos desaparecieron en ese plazo. Exámenes posteriores no revelaron *Anaplasma*. No se observó ningún síntoma clínico.

El 2º animal presentó una ligera reacción térmica en el 7º día, (39°.2 C.) En el 8º y 9º día se ve raros piroplasmas en la sangre circulante, que luego desaparecen. Ningún síntoma clínico. Repetidos exámenes posteriores no muestran anaplasmas.

Otros 3 de los animales usados para verificación de la inmunidad entre *B. argentina* y *P. bigeminum* recibieron en un

primer tiempo *B. argentina*, virus del Brasil, y posteriormente, como ya se dijera, *P. bigeminum* (virus argentino de Concordia), siendo por último inoculados con un virus mixto de *P. bigeminum* y *B. argentina*, fuertemente virulento, en plena fase aguda y procedente de la Prov. de Santa Fé, República Argentina. Esta prueba fué practicada 25 días después de la segunda inoculación, esto es cuando los animales ya estaban repuestos de la última infestación. Empleáronse 25 cm.³ de sangre por vía venosa.

El primero de estos bovinos no presentó reacción febril; pero al tercer día aparecieron raros *P. bigeminum* en la sangre circulante, los que se mantuvieron en escaso número por otros 7 días. En el 7° y 10° día comprobáronse formas muy pequeñas y raras de *B. argentina*. Ningún signo clínico. Los exámenes que se prolongaron por más de 40 días fueron siempre negativos. No se observaron anaplasmas.

El 2° bovino presentó raros piroplasmas en el 3° día y los otros 10 siguientes. Ligera elevación térmica de 39° C. en el 6° día. Fuera de esto ningún otro signo clínico. Exámenes posteriores no revelaron anaplasmas.

El tercer animal no presentó ninguna reacción térmica. En el 4° día se observaron raros piroplasmas, que se mantuvieron durante 9 días más o menos, aunque siempre raros en la sangre circulante.

El Dr. Roberto L. Dios, inoculó con el virus mixto del Brasil a otro toro, inyectado por él 2 y ½ años antes con virus argentinos, obteniendo un resultado perfectamente concorde con los nuestros.

No nos fué posible realizar un mayor número de ensayos con virus de diversas procedencias y, sobre todo, con larvas de garrapatas infestadas, lo cual talvez hubiera permitido llegar a una conclusión definitiva. Por ahora, los hechos arriba relatados están en completo desacuerdo con los ensayos anteriores realizados por otros investigadores. En los casos nuestros no se observa una reinfestación verdadera. Sólo hay, a veces, una pequeña elevación térmica y un acceso parasitario de reinoculación, para servirnos de la denominación propuesta por Sergent y sus colaboradores. Los virus de la Argentina y del Brasil, que han sido estudiados por nosotros, ya sea de *P. bigeminum* o de *B. argentina*, confieren una inmunidad relativa de los unos contra los otros. Es posible que la prolongada conserva-

ción de los virus puros en los vertebrados, al abrigo de reinfecciones, ocasionen alteraciones de la virulencia, de modo que los elementos infestantes, procedentes del artrópodo transmisor, u originados recientemente en éste, puedan romper el estado de equilibrio inestable entre parásito y huésped. Por tanto, acerca de este punto son necesarios otros experimentos en los cuales deberán emplearse larvas de garrapatas infestadas de procedencia y virulencia conocidas.

CAPITULO III

TRABAJOS SOBRE ANAPLASMA

(Con las láminas XVI, XVII, XVIII, XIX, XX y XXI)

Como ya dijimos, uno de los objetivos que nos trajo al Instituto de Buenos Aires fué el estudio de la anaplasmosis y, sobre todo, la posibilidad de cultivar los elementos, anaplasmas, que se encuentran en los hematíes y cuya naturaleza parasitaria es muy discutida.

Para tal fin tratamos, en primer lugar, de estudiar los diversos métodos propuestos para la obtención de infecciones puras de *Anaplasma*, esto es, libres de piroplasmas y babesias. Las primeras infecciones puras de *Anaplasma* parecen haber sido obtenidas por Theiler, en el Africa del Sur, partiendo de infestaciones con garrapatas. Las infecciones puras espontáneas pudieron también ser observadas en ese continente por el mismo investigador y en la Argentina por Lignières. En un viaje que tuvimos oportunidad de realizar al Nordeste del Brasil, en 1912, pudimos observar una gran epidemia de anaplasmosis pura que atacó cerca de 50.000 bovinos nativos en el pueblo de Quixaramobim y sus alrededores. Debido a las grandes dificultades ambientales, no nos fué posible estudiar ese valiosísimo material por medio de inoculaciones y tuvimos que limitarnos al estudio microscópico de la sangre, que en aquel momento solo presentaba anaplasmas. En esas zonas semiáridas, donde transcurren 2 ó 3 años sin lluvias, es fácil comprender como enormes extensiones de campo quedan completamente libres de garrapatas, las cuales pululan otra vez en los años favorables de lluvias debido a que vuelven con animales traídos de otras regio-

nes. Así se comprende también cómo los animales nativos estén desprovistos de inmunidad contra la tristeza y como esta enfermedad puede allí determinar grandes brotes epidémicos. Infecciones puras y naturales de anaplasmosis fueron últimamente mencionadas por Descaseaux en Chile, donde no existe el transmisor habitual de la América del Sur, el *Margaropus australis* Fuller, y donde la transmisión se hace por medios mecánicos, tales como el empleo de la picana o de las agujas que allí se usan en la práctica de las vacunaciones anticarbunclosas. Las verificaciones de estas epidemias, aun cuando constituyan argumento muy valioso para el establecimiento de la anaplasmosis como entidad mórbida perfectamente distinta, definida y autónoma, no es suficiente para evitar los ataques de los contradictores impenitentes, los cuales tratan de ver en esos casos, secuelas de piroplasmosis pasadas desapercibidas, ya al examen de la sangre circulante, ya por la localización de los parásitos en los órganos internos. No obstante, las recientes observaciones de Descaseaux en Chile nos parecen, por el momento, las de mayor brillo, por tratarse de un país donde no existen ni las piroplasmosis ni el huésped intermediario de los países vecinos. Por tanto, se infiere que solo la experimentación de laboratorio, debidamente confirmada, puede suministrar la prueba segura de la autonomía de esta infección. De no haberse olvidado aquel viejo principio de Claudio Bernard que reza: "Un medecin ne connaitra les maladies que lorsqu'il pourra agir rationnellement et experimentellement sur elles", habríase ahorrado mucho de la tinta gastada por quienes no conociendo la enfermedad natural ni la experimental, ensayaron y ensayan, sin embargo, la postulación de juicios sobre la naturaleza etiológica de la infección.

Lignières parece haber sido el primero que ha encontrado un método para obtener infestaciones puras de anaplasmosis, mediante la congelación de la sangre. Posteriormente Quevedo publica su método con el empleo del azul tripán; Rosenbusch y González señalan la ligera contaminación o la prolongada conservación de la sangre virulenta y, todavía más tarde, Lignières encuentra el método biológico de la inoculación de la sangre a la oveja, método luego confirmado por Kraus, Dios y Oyarzábal y por Sergent y sus colaboradores. Para obtener virus anaplasmático empleamos 3 de los métodos mencionados.

2. *Métodos de aislamiento del virus anaplasma.*

Pocos días antes de nuestra salida de Río, sangramos varios animales con anaplasmosis en evolución, en la estación experimental del Ministerio de Agricultura, gentilmente puestos a nuestra disposición por el Prof. Parreiras Horta, actual director general de la Industria Pastoril. La sangre fué obtenida asépticamente, cerrada en ampollas y conservada a la temperatura ambiente, habiéndose tomado durante las diversas etapas del transporte las precauciones para que no sufriesen insolación directa o calentamiento, de donde pudiera resultar una destrucción del virus. El transporte se hizo durante el mes de Diciembre, reinando una temperatura que debió oscilar entre 24° y 32° C.

La sangre fué inoculada a 3 animales, pocos días después de la llegada a Buenos Aires.

El primer animal recibió 15 cm.³ de sangre con 17 días de conservación. Examinado durante 78 días no presentó anaplasmas en la sangre; ni tampoco durante varias elevaciones térmicas ocurridas en ese tiempo. La inoculación de la sangre a otro bovino normal, produjo, sin embargo, una anaplasmosis pura, de evolución medianamente benigna. El 2° animal, inyectado con 20 cm.³ de sangre conservada durante 23 días, presentó una anaplasmosis típica, a los 80 días de inoculación, de evolución medianamente benigna, pero con anaplasmas muy abundantes en la sangre periférica. Es de notar que en el 2° experimento el período de incubación fué sumamente largo, 80 días, lo cual probablemente debió depender de la cantidad bastante pequeña de virus sobreviviente (al 23° día), resultado muy semejante al obtenido por Sergent con la inyección de dosis muy pequeñas de virus (1/5 de cm.³).

El tercer animal no presentó ningún signo clínico durante 100 días, desde la inoculación. Posteriormente reaccionó de modo violento a la inyección de un virus puro de anaplasma, comprobándose acentuada elevación de temperatura y abundante corpúsculos en la sangre circulante. Repetidos exámenes de sangre de estos animales no revelaron la presencia de piroplasmas o babesias en ningún período.

Otro método de aislamiento que ensayamos fué la destrucción de los piroplasmas y babesias por la acción química del azul tripán. En ese sentido aunque proyectamos varios ensayos, sólo de uno de todos ellos podemos sacar una conclusión segura.

Empleóse para tal fin un animal en plena evolución anaplasmiática con numerosos corpúsculos, habiendo presentado este bovino anteriormente también *P. bigeminum* y *B. argentina*. La sangre se mezcló en partes iguales con una solución al 1/125 de azul tripán (Hoechst) en suero fisiológico, dejándola así en contacto durante 5 horas a 32° C., y luego se inyectó, por vía venosa a la dosis de 25 cm.³, en un bovino normal. A los 17 días el animal presentó una pequeña elevación térmica de 39°7 C. y aparecieron en la sangre los primeros corpúsculos, siguiendo varios días de temperatura elevada, en los cuales se comprobaron numerosos anaplasmas en la sangre circulante. Observáronse signos de anemia intensa, pero el animal acabó por restablecerse lentamente. La reinoculación de sangre de este animal a otros produjo una anaplasmosis típica y a veces mortal. Los exámenes de sangre de estos bovinos, repetidos casi diariamente, no revelaron babesias ni piroplasmas. Esta experiencia demuestra también que el azul tripán, completamente inactivo *in vivo* contra la *B. argentina*, destruye a este parásito *in vitro*.

Enseguida pasamos al método propuesto por el Prof. Lignières, por medio del pasaje del virus anaplasmiático al carnero. La primera inoculación fué hecha con sangre de carnero inoculado con anaplasma que nos fuera suministrado por un distinguido colega. Inoculamos a un bovino 20 cm.³ por vía venosa. El animal fué observado durante 90 días, en los cuales no presentó reacción febril ni anaplasmas en la sangre circulante. Reinoculado más tarde con un virus anaplasmiático puro, sufre un ataque de anaplasmosis típico, medianamente grave. Citamos esta experiencia para mostrar que la inoculación al carnero puede fallar.

Recomenzamos una nueva serie de experiencias, inoculando 3 ovejas sanas, de la prov. de Buenos Aires, con 25 cm.³ a cada una de sangre de un bovino en plena evolución anaplasmiática febril y conteniendo numerosos corpúsculos. A los 36 días sangráronse las 3 ovejas y a un bovino se inocularon 200 cm.³ de la mezcla de las sangres, por vía venosa. 24 días después de la inoculación observáronse anaplasmas en la sangre circulante, que se volvieron más abundantes en los días consecutivos, persistiendo por un tiempo de 30 días. Durante el curso de la experiencia presentó el animal una pequeña elevación térmica (39°3 C.) a los 21 días de inyectado, sin parásitos. Posteriormente, el 33° y 34° días, ligeras elevaciones térmica de 39°1 a

39.6 C.; y desde entonces la infección transcurrió apirética. Los únicos signos clínicos fueron enflaquecimiento y ligera anemia. De no haberse examinado la sangre la infección hubiera pasado desapercibida. El examen hematológico reveló:

SERIE ROJA. Numeración globular: 3.100.000 x mm.³.

Hemoglobina: 33 (Sahli-Leitz), patrón humano.

Son poco numerosos los hematíes con substancias gránulo-filamentosa y metacromática.

Alteraciones cualitativas: anisocitosis, policromatofilia, cuerpo de Jolly y hematíes, granuloso. Raros eritroblastos policromatófilos con núcleo picnótico o en cariorrexis. Los glóbulos rojos con anaplasmas son numerosos.

SERIE LEUCOCITARIA. Numeración globular: 14.000 x mm.³.

Fórmula leucocitaria	c. r.	c. a.
Granulocitos polinucleares	22.5 %	3.150
Linfocitos	70.0 %	9.800
Monocitos	7.5 %	1.050
	100.0 %	14.000

Formas dismorfocariocíticas de monocitos y linfocitos.

PLAQUETAS, nada de particular.

La inoculación de la sangre de este bovino a un vacuno normal, hecha 4 meses después, reproduce una anaplasmosis de incubación corta y de grave evolución, con temperatura muy elevada y gran número de anaplasmas en la sangre circulante (80 % de glóbulos parasitados).

Las ovejas inoculadas con sangre de los animales atacados de anaplasmosis no presentaron ningún signo clínico de enfermedad. Lignières había señalado que la infección anaplasmaica en el carnero transcurre sin aparición de anaplasmas en la sangre de estos animales. Cuando intentamos estudiar esta cuestión, quedamos sorprendidos al verificar que en la sangre de las ovejas normales, criadas en la provincia de Buenos Aires, preséntanse corpúsculos intraglobulares coloreables por el Giemsa, ora marginales, ora centrales, que no se pueden distinguir de los verdaderos anaplasmas. Bien es verdad que en la ocasión no habíamos aún encontrado las reacciones colorantes que permiten diferenciar los corpúsculos de Jolly y otros restos nucleares de los anaplasmas verdaderos. Como puede verse en la literatura, han sido descritos anaplasmas de ovejas en varios países, aunque no es posible saber con seguridad si muchos de estos autores encontraron verdaderos anaplasmas o cuerpos de Jolly. El asunto merece atención, principalmente después

de los trabajos de Lestoquard, en Argelia, en los cuales este autor mediante inoculación de sangre reproduce una enfermedad semejante a la de los bovinos, y desde que Koch y Kinlan, en el Africa del Sur, al practicar esplenotomías en los bovinos, obtuvieron infección aguda febril con ictericia y anaplasmas en la sangre circulante. La presencia de estos corpúsculos en los hematíes de las ovejas de Buenos Aires, por tanto, impide resolver si la anaplasmosis evoluciona en los ovinos con los corpúsculos característicos de la sangre de los vacunos. Son, pues, necesarias nuevas búsquedas para definir este importantísimo punto.

Las experiencias nuestras confirman, pues, en todas las líneas, que es perfectamente posible obtener infecciones puras de anaplasmosis y que esta infección del bovino constituye una zoonosis diferente y autónoma, enteramente diversa de las piroplasmosis.

3. *Tentativas de transmisión de anaplasmosis con garrapatas.*

Las tentativas para transmitir la anaplasmosis con garrapatas fueson apenas dos, ambas negativas. Uno de los animales murió de una infestación de *B. argentina* demasiado pronto para que se revelara la otra infección (12 días) y el otro bovino sobrevivió durante muchos meses, no presentando el acceso febril anaplasmático y sin que en su sangre aparecieran tampoco los corpúsculos característicos. Los diversos pasajes de sangre de este animal no provocaron anaplasmosis. No obstante, las garrapatas provenían de campos del Estado de Río, altamente infestados, y donde cualquier animal no inmune contrae inmediatamente la enfermedad. En los cortes de larvas de *Margaropus australis* de la misma procedencia, fijados en Zenker y Gilson, fueron encontrados corpúsculos que se colorean por el método de Giemsa de azul pálido o de azul violeta, se presentan bajo forma de minúsculos cocos o de cocobacilos y en algunas de estas formas ofrecen una coloración polar. Estas estructuras son Gram negativos y difícilmente coloreables por el azul de Löffler y por la tionina. Además tales elementos, que por muchos aspectos se aproximan a las Rickettsias (parásitos de los artrópodos), encuéntranse principalmente en las células epiteliales del *caecum* y a veces en otros tejidos (músculos) de las larvas de *Margaropus*. Tienen cierta semejanza y, sobre to-

do, igual localización que la *Rickettsia bovis*, descrita por Cowdry, como agente etiológico de la *Heart-water*, enfermedad de los bovinos de Africa, que es transmitida por el *Amblyoma hæbreum*. La sospecha de que estos corpúsculos pudieran representar formas evolutivas del anaplasma en los Ixodídeos, nos condujo a inocular en un bovino, por vía venosa, una trituración de muchos centenares de larvas de *Margaropus*, que contenían a dichos corpúsculos en gran número. Esta inoculación resultó negativa. Posteriormente se verificó además que el animal permanecía sensible al *Anaplasma*.

Todos los investigadores que se han ocupado de la transmisión natural de la anaplasmosis han encontrado gran dificultad en realizarla experimentalmente. Como la mayor parte de las veces no se consigue obtenerla, esto hizo que Lignières pensara en otro transmisor que no fuera el *Margaropus australis*. Los trabajos de Rosenbusch y González trataron de demostrar la influencia de las temperaturas elevadas para que se realice la transmisión. La frecuencia de la enfermedad en zonas relativamente templadas, como en los campos montañosos de los Estados de Minas y de Paraná, nos inclinan a creer que hay otros factores que es necesario conocer.

4. Estudios sobre la morfología de los anaplasmas.

Con el propósito de prepararnos para las investigaciones de cultivos, tratamos de hacer una revisión de los conocimientos morfológicos adquiridos acerca de los anaplasmas.

El examen de sangre en fresco, entre porta y cubre, con la iluminación común, no permite reconocer la existencia de estos corpúsculos.

El estudio del material en fondo oscuro tampoco los revela. En este sentido se hicieron minuciosas observaciones, empleándose los más fuertes objetivos (Zeiss 2 mm.a., abertura 1.4 y Zeiss 1.5 mm.a. abertura 1.3; oculares compensadores 6 y 10) y usándose para el cotejo "frottis" de la misma sangre, coloreados con Giemsa. Los aparatos de fondo oscuro usados fueron el condensador paraboloide de Zeiss y el condensador alternativo de Siedentopf. Como fuente de luz se usó una lámpara de arco Liliput de Leitz, de 4 amperios. La sangre se desfibrinaba y citrataba previamente. Los "frottis" coloreados por el Giemsa evidencian muy nítidamente los anaplasmas, cuando son examinados en fondo oscuro, y presentan en esas condi-

ciones una coloración roja con reflejos amarillo verdosos. En fresco y con fondo oscuro se ven a veces algunos corpúsculos intraglobulares, sin embargo, cuando son comparados cuantitativamente con las preparaciones coloreadas, se comprueba que tales formaciones visibles son muy poco numerosas y están en disparidad completa con la proporción corpuscular en los hematíes. Llegamos, por tanto, a la conclusión de que los anaplasmas son invisibles en campos claro y oscuro. Algunos autores mencionan, entretanto, la visibilidad de los anaplasmas en fresco, sin embargo, es más probable que los hayan confundido con otras estructuras o alteraciones globulares.

En los preparados fijados en seco y coloreados con el método de Giemsa, los anaplasmas están constituidos por corpúsculos redondeados u ovoides de 0.1 a 0.5 μ de diámetro, que toman el color rojo violeta de la cromatina y se presentan marginales en la mayoría de las veces y más raramente ocupan el centro o cualquier otra posición dentro del hematíe. La existencia del halo claro entre el elemento y el eritrocito no es constante; en los preparados desecados rápidamente al aire y fijados este halo no aparece. Lo mismo ocurre con las preparaciones fijadas húmedas. Su aparición se debe más bien a un efecto mecánico dependiente de la fijación.

Frecuentemente y sobre todo en el inicio de la infección, encontramos formas sumamente pequeñas, con la aparición de puntos minúsculos intracorpúsculares, con dimensiones tal vez inferiores a 0.1 μ y que están en el límite de la visibilidad microscópica. Estas formas parecen haber sido vistas anteriormente por Lignières, como podemos ahora confirmar. Otro aspecto, que creemos no ha sido descrito hasta ahora, es el de pequeñas formas en bastoncito, de contorno regular en unos, irregular en otros, generalmente macizas, presentando algunas de ellas, aunque muy raramente, el fenómeno de la coloración bipolar; formas en bastoncito que muestran una cierta semejanza con la *Bartonella bacilliformis*, descrita como agente de la fiebre de Oroya, y con la *Bartonella muris* de las ratas esplenectomizadas. Estas formas que miden de 0.3 a 0.4 μ de largo por 0.1 a 0.15 μ de ancho, fueron vistas en mayor número en la sangre circulante al iniciarse las infecciones y, además, pudieron ser encontradas también en "frottis" de órganos, principalmente del bazo donde eran bastante frecuentes en algunos casos. Además de las formas de bastoncitos regulares, se vieron

individuos que presentaban un aspecto de vírgula, esto es una porción esférica más espesa, condensada, y una parte filamentososa que a veces era doble. Estas formas deben corresponder a las vistas por Quevedo y Descaseaux. Quevedo, en uno de sus trabajos, considera estos aspectos debidos a la emisión de prolongaciones finas, en forma de flagelos, y Descaseaux menciona la existencia de anaplasmas en forma de vírgula en los "frottis" de órganos de animales muertos de anaplasmosis en Chile. No es posible, por el momento, en nuestro entender, dar a esa forma alguna explicación lógica o fisiológica.

Los anaplasmas son en su mayoría macizos; cuando se presentan vacuolados tratase casi siempre de accidentes de fijación. Debemos mencionar con todo que, en preparaciones bien fijadas, ya nos fué posible encontrar un número no pequeño de formas de contornos curvilíneo, triangular o cuadrangular, fuertemente vacuoladas y con una condensación cromática marginal y más raramente central. Este aspecto morfológico fué también encontrado en preparaciones fijadas húmedas y coloreadas con la hematoxilina férrica.

Quizás sea este aspecto el que indujera a Siebert a describir la existencia de un "Centralkörper" rodeado por un manto. Sin embargo esa disposición está muy lejos de ser un carácter constante de los anaplasmas y en la mayor parte de las preparaciones, aún en las fijadas húmedas, es imposible reconocer una estructura especial constante y característica. Son muy frecuentes, como es sabido, la presencia de formas de diplococo en que los elementos conservan un puente de unión, lo cual les confiere un aspecto halteriforme; pero una investigación minuciosa de estas figuras no nos autoriza por lo pronto a inclinarnos por la división binaria de estos elementos. También se encuentran algunas veces en el interior de los hematíes formas estreptocóccicas, de 3 a 4 elementos.

Entre las propiedades colorantes de los anaplasmas hallanse algunas de gran utilidad para distinguir éstos de otros corpúsculos semejantes, principalmente de los llamados cuerpos de Jolly. Los anaplasmas se colorean de rojo violeta por el Giemsa, tanto en los preparados secos como en los húmedos, de modo que éste es el colorante electivo para estos parásitos. Ellos no se colorean con las soluciones simples, recientes, de azul de metileno, pero se tiñen muy bien por el azul de Manson

o de Löffler, cuando se deja actuar suficientemente el colorante. Ciertos colores de anilina como la fucsina o el violeta de genciana, la tionina y el azul de toluidina, los tres primeros en solución fenicada y el último en solución alcalina, colorean muy bien los anaplasmas cuando éstos son sometidos a la acción de la tinta y, una vez teñidos, pueden diferenciarse los preparados con alcohol sin que por esto se decoloren. No resisten sin embargo a la acción de los ácidos. No toman el Gram. Además no se colorean por ciertos colores de anilina como el verde de metilo o el rosa de Bengala, ultimamente propuesto como un buen colorante bacteriano. La solución de verde de metilo-pironina de Pappenheim no los colorea; si se deja actuar prolongadamente el colorante, apenas si toman un ligero tono rojo pálido. Tampoco se tiñen por las soluciones usuales de hematoxilina, fórmulas de Delafield, Carazzi y Ehrlich, y esta propiedad se nos ocurre uno de los métodos más simples para distinguirlos de los cuerpos de Jolly u otros restos nucleares.

Como es notorio, Schilling, Aragao y Días, Laveran y Franchini y otros, estudiando la sangre en los envenenamientos producidos por la fenilhidracina, ácido pirogálico, nitrobenzol y demás venenos hemolíticos, consiguieron hacer aparecer en la sangre de los animales corpúsculos que no se pueden distinguir sino muy difícilmente de los verdaderos anaplasmas. Reproduciendo estas experiencias pudimos verificar que tales estructuras se dejan teñir fácilmente con las soluciones comunes de hematoxilina, lo cual permite distinguirlas fácilmente de los verdaderos parásitos. En los experimentos, en seguida después de la fase intensiva de la eritrorrexis, que se verifica inmediatamente después de las inyecciones, los antedichos elementos en la sangre junto con otros signos regenerativos, pero en un número muy limitado y de ningún modo comparable con el que se observa en las infecciones anaplasáticas, aún en las de mediana intensidad; además de que desaparecen apenas cesada la acción del veneno.

Los corpúsculos que se encuentran en la sangre, principalmente del conejo y de la cavia intoxicados por la fenilhidracina, presentan todos los caracteres de los cuerpos de Jolly. Encuéntrense aislados o en número de 2 ó 3 esférulas y difícilmente más por cada glóbulo rojo. No es raro ver formas diplocócicas análogas a las de los verdaderos anaplasmas. Hállanse tanto en los eritrocitos ortocromáticos como en los policromatófi-

los y también en los hematíes con granulaciones basófilas. Coloréanse de rojo violeta por el Giemsa; en verde por el verde de metilo-pironina de Pappenheim, y también, como ya se dijo, por las comunes soluciones de hematoxilina. En la sangre de aquellos animales son muy comunes los normoblastos y los núcleos de éstos se encuentran frecuentemente en cariorrexis, pudiéndose en ese caso comprobar la existencia de formas de transición entre los núcleos picnóticos y los cuerpos de Jolly. Por tanto, estos corpúsculos se comportan como residuos cromáticos del núcleo de los eritroblastos y no pueden ser confundidos con los verdaderos anaplasmas.

Los anaplasmas no se encuentran en los hematíes policromatófilos sino de un modo excepcional. Su aparición en la sangre precede, en casi todos los casos estudiados, a la existencia de fiebre o de otros síntomas y siempre mucho antes de la anemia que caracteriza a la enfermedad. Estos parásitos pueden ser vistos durante muchos días sin que aparezcan los signos característicos de los procesos regenerativos de la sangre (hematíes con substancias gránulo filamentosas y metacromáticas, policromatofilia y normoblastos).

Todo lo cual constituye un argumento de valor para eliminar la hipótesis de que los anaplasmas puedan considerarse cuales simples indicios de procesos regenerativos sanguíneos.

El estudio de preparados en gota gruesa, por el método de Ross, es muy instructivo. Debido a la acción del agua destilada sufren estos elementos una especie de plasmolisis, presentándose muchos de ellos disgregados y otros vacuolados. Si se fijan las gotas gruesas por el método de Ruge, los corpúsculos mantienen el mismo aspecto que en la sangre fijada y no pierden las características morfológicas ni sus reacciones colorantes.

En un trabajo anterior indicamos un método para el enriquecimiento de los parásitos sanguíneos, que ya fué aplicado al estudio de otros microorganismos.

El método consiste en disolver 10 gotas de sangre en la siguiente solución, preparada en el momento:

Agua bidestilada recientemente.....	10,0 cm. ³
Acido acético cristalizable.....	0,1 cm. ³
Sol. de ácido ósmico, al 2 %.....	0,2 cm. ³

La sangre se centrifuga inmediatamente a 4.000 revoluciones, por un tiempo de 10 minutos y con el depósito obtenido se confeccionan preparaciones en capa delgada, que luego se

fijan en alcohol absoluto durante 20'. Una vez secos, las preparaciones son teñidas con el método de coloración que se quiera aplicar (Giemsa, tionina, Löffler, Manson, etc.). Por este método se obtiene una disolución casi completa de los estromas de los hematíes con una perfecta conservación de los corpúsculos. El método permite estudiar con mucha nitidez la morfología de los anaplasmas.

5. *Ensayos para obtener cultivos de anaplasmas.*

Después de las fascinadoras investigaciones de Noguchi sobre la etiología de la fiebre de Oroya y de la verruga peruana y aquellas de Mayer sobre *Bartonella* de la ratas, cuyas relaciones de parentesco morfológico con los anaplasmas ya intentamos demostrar, estaba naturalmente indicado seguir los pasos de estos investigadores en los ensayos de cultivo.

Y así fué que nos propusimos cultivar los anaplasmas empleando, en el comienzo, los medios aconsejados por Noguchi y después los usados para otros microorganismos de cultivo difícil. Los medios que utilizamos más veces fueron el agar de Noguchi para *Leptospira*, adicionado de riñón de conejo, y, posteriormente, el caldo agar vitamina de Hunton adicionado de sangre, al que se agregaba pulpa cerebral; además de éstos, el medio de Nöller y otros medios utilizados para espiroquetas como los de Kliger y Robertson, Aristowsky y Holtzer, agar y caldo conteniendo extractos de órganos filtrados por bujía, etc. Sin embargo nuestros primeros pasos en esta cuestión fueron bastante obstaculizados por las infecciones secundarias; pues si algunas de éstas eran fáciles de reconocer por la simple inspección macroscópica, otras prestábanse a causas de error, que solo se evitaban mediante comprobaciones muy rigurosas.

Entre estos microorganismos debemos referirnos a ciertas razas de difteroides que, cuando cultivadas en esos medios, adquieren un raro aspecto de minúsculos cocos o de cocobacilos de diminutas dimensiones, los cuales pueden tomarse como formas evolutivas de los corpúsculos que se desean cultivar. Transplantados sin embargo a otros medios, como el suero de Löffler, el agar suero, etc., puede recién entonces reconocerse que se trata de verdaderas infecciones secundarias, que nada tienen que ver con los gérmenes que se intenta cultivar.

Las observaciones hechas hasta ahora pueden resumirse en los siguientes resultados: Los anaplasmas consérvanse bas-

tante bien en los medios de cultivo durante largo tiempo, sobre todo en aquellos medios que aseguran una buena conservación de glóbulos rojos (caldo-sangre; agar de Noguchi, sembrado en el fondo; medio de Nöller). Los corpúsculos se mantienen principalmente incluidos en los hematíes, sin alteración de sus caracteres morfológicos y de sus propiedades colorantes. Un pequeño porcentaje de esos microorganismos puede tornarse libre y, entonces, ellos se presentan como cocos aislados, diplococos y más raramente como pequeñas cadenas irregulares, estreptococciformes. Esta transformación que se hace también en la sangre simplemente desfibrinada, puede prolongarse por un tiempo muy grande. Hasta 120 días después de adicionados a los medios de cultivo, hemos podido encontrarlos con sus caracteres morfológicos perfectos. Las formas libres comienzan a manifestarse en los cultivos después de algunos días de conservación; en el caldo-sangre se ven principalmente a los 20-30 días después de la siembra. Pero cuando se trata de transportarlas a un nuevo medio, no manifiestan signos de multiplicación, ni se observa la aparición de nuevas formas que indiquen una vegetación. Si las siembras son muy abundantes en anaplasmas y las cantidades de medios de cultivo son bastante grandes, los corpúsculos pueden ser encontrados en una serie de tubos, aunque sin evidentes señales de multiplicación.

El mecanismo por el cual los anaplasmas se vuelven libres es difícil de percibir. Posiblemente un cierto número de formas intraglobulares procede de la lisis de los glóbulos rojos parasitados, pues no es raro encontrar en esos cultivos muchos hematíes, casi totalmente desprovistos de hemoglobina, conservando perfectas las inclusiones.

Veglia afirma haber observado una multiplicación *in vitro* de los anaplasmas en el medio de Carpano, multiplicación caracterizada por el aumento de los glóbulos con parásitos. Las diversas tentativas para comprobar este hecho no dieron resultado positivo. La sangre conservada en los diferentes medios de cultivo da siempre la impresión de presentar un mayor número de hematíes parasitados; pero si se efectúan numeraciones cuidadosas luego se borra esa impresión. Las pequeñas oscilaciones de 2 a 5 % que a veces se notan, es natural se atribuyan a la imperfección de los métodos de numeración.

Igualmente fueron infructuosos los ensayos realizados para obtener la multiplicación de los anaplasmas mediante la adi-

ción de sangre infectada y sangre fresca de un animal no inmune a los medios de Carpano y al caldo sangre. Las numeraciones no revelan un aumento sensible de los glóbulos infectados, lo cual significaría multiplicación de microorganismos y ataque a nuevos glóbulos sanos.

Indicios de multiplicación intraglobular *in vitro* fueron también indicados por Veglia y por Quevedo. En nuestro sentir no es posible interpretar las formas de diplococos, cuádruples, o las de pequeños estrepto, como signos seguros de multiplicación.

También fueron siempre negativos los ensayos para obtener infecciones con cultivos de más de 30 días. Las inoculaciones en un plazo de más corto tiempo no tienen gran valor por cuanto, como ya fué señalado anteriormente, la sangre por sí puede conservar la virulencia anaplasmática por un período de 23 días como mínimo.

Cuando iniciamos nuestros estudios en Río de Janeiro sobre el cultivo de los anaplasmas, obtuvimos de la sangre de un bovino infectado el cultivo de un microorganismo que, por sus caracteres particularísimos, no podía considerarse como un germen vulgar de infección secundaria o extraña; microbio que pudimos resembrar en serie a través de 3 pasajes sucesivos.

La sangre de ese bovino, fué sembrada en agar-vitamina con cerebro de bovino, adicionado con sangre de caballo, según la técnica de Nöller. A los 20 días de sembrada, aunque macroscópicamente todavía no se notaba ningún desarrollo, el examen microscópico demostró la existencia de corpúsculos diminutos, algunos cocciformes y otros de formas difícilmente precisables por su acentuada pequeñez, casi en el límite de la visibilidad.

Estos cultivos obtenidos en 4 tubos, entre una docena de tubos sembrados, habían sido mantenidos a la temperatura de Río (24° - 30° C.) y transportados en las mismas condiciones a Buenos Aires, habiendo sido tomadas todas las precauciones para evitar la acción directa de los rayos solares y de cualquier otro factor que pudiera determinar un recalentamiento.

En Buenos Aires se hicieron numerosos trasplantes en idénticos medios nutritivos y pudieron, entonces, realizarse las investigaciones morfológicas que pasamos a relatar.

Macroscópicamente no se puede reconocer ningún desenvolvimiento, bajo formas de colonias o de cualquier otro aspecto, en la superficie del agar sembrado. Los "frottis" se hicieron

principalmente con el agua de condensación y con las partes del agar inclinado más cercanas a dicha agua. El examen de estos "frottis", coloreados por el Giemsa, mostró la existencia de pequeños microorganismos teñidos de rojo violeta o azul violeta. Algunos tenían la forma de un fino bastoncito de 0.5 a 1 μ , cuya porción mediana tomaba generalmente menos colorante; otros, la de minúsculos cocos de contorno irregular de 0.2 a 0.5 μ de diámetro; otros, por fin, la de un diplococo con los componentes unidos por una sustancia menos ávida de colorante. Algunos elementos mostraron un aspecto granuloso y no fué raro ver también formas mayores u ovoides, presentando estas últimas el fenómeno de la coloración polar. Encuéntrase los excepcionalmente aislados, pues tienen mucha tendencia a conglutinarse. En los grumos formados en los cultivos de estos microorganismos surgen formas cocoides, vacuoladas. En ellos también puede percibirse, entre los elementos constitutivos, la existencia de una sustancia que por lo general se tiñe de azul, mediante el Giemsa. Estos gérmenes no toman el Gram ni se colorean por el Ziehl-Nielsen. Morfológicamente se aproximan a ciertas formas de *Rickettsia*.

Fué posible mantenerlos en cultivos a partir de la siembra original, durante 3 trasplantes sucesivos, empleándose siempre el mismo medio adicionado de sangre de bovino después del primer subcultivo. El desenvolvimiento pareció hacerse aquí un poco mejor, aunque todavía muy escaso, no pudiéndose tampoco advertir un desarrollo macroscópicamente visible. Estos microorganismos se desarrollaban muy lentamente. En los trasplantes comenzaron a verse después del 5º día, desde la siembra, y llegaban a un máximo entre el 25º y 30º día, época en la cual aparecían formas irregulares indicadoras de involución. Las resiembras en los medios comunes de cultivo—caldo simple, agar simple, suero de Löffler y medio de Dorset, no dieron ningún desarrollo.

Tres tubo de cultivo del tercer trasplante, emulsionados en suero de bovino normal, fueron inoculados a un vacuno sano y este animal 90 días después presentó una anaplasmosis de evolución benigna, con pequeñas elevaciones térmicas, mediana destrucción globular (4.3000.000 x mm.³), y no obstante la presencia de numerosos anaplasmas en la sangre periférica. Tentativas posteriores para aislar otra vez este germen de la sangre de los bovinos con anaplasma no dieron resultado po-

sitivo. Como se trata de un cultivo único y de una única inoculación es fácil comprender que no es posible sacar ninguna conclusión de esa experiencia. Puede ser que se trate de otro organismo, rickettsiforme, parásito de los bovinos, algo semejante a los que ocurre en las ovejas y que nada tiene que ver con los anaplasmas. Trataríase en este caso, simplemente, de una conservación excepcionalmente larga del virus anaplasmaico.

6. *Experiencias con azul tripán en la anaplasmosis.*

Aragao y Días (1914), en un trabajo sobre la naturaleza de los anaplasmas, intentaron demostrar que, por medio de inyecciones repetidas de tripán, se podía obtener un cuadro clínico y el aspecto microscópico sanguíneo de la anaplasmosis. Ellos sostenían que a las propiedades hemolíticas del tripán debía atribuirse la aparición de esos corpúsculos. Para verificar estos resultados procedimos a realizar varios ensayos en animales ya infectados con anaplasmosis y en un animal sano.

Con los conocimientos actuales que tenemos sobre la anaplasmosis, lo que podía esperarse era una explosión aguda de anaplasmosis verdadera, tanto más que la prueba arriba mencionada había sido hecha en el Brasil, en una zona en que, sin miedo a equivocarse, puede decirse que el 100 % de los animales están infectados de anaplasmosis.

Por eso es que a 2 bovinos con la enfermedad en fase crónica, cuando ya no se encontraban más parásitos en la sangre circulante, los inyectamos con dosis repetidas de azul tripán.

El primer animal recibió, en el plazo de 8 días, 20 gramos de tripán. En el 6º día comenzó a presentar temperaturas elevadas (40° C.), que se mantuvieron durante más de 4 días entre 40° - 40.8 C. y al 10º día sucumbió después de presentar fenómenos graves de adinamia. El examen de sangre hecho diariamente no reveló la presencia de corpúsculos anaplasmaicos, ni nada de particular.

La obducción mostró, además de la intensísima coloración azul de los tejidos, producida por el tripán, numerosos focos de tuberculosis caseosa del pulmón y del hígado, en estado latente de evolución tórpida.

El 2º animal recibió 11 gs. de tripán en un plazo de 10 días. Desde el 7º día comenzó a dar temperaturas elevadas (40° - 40.5 C.); en el 10º, como la temperatura descendiera, se le practicó una nueva inyección de tripán (4 g.), la cual fué se-

guida por pequeñas oscilaciones de temperatura hasta el 20° día; en los días siguientes la temperatura se elevó a 41° - 41.7 C., volviendo enseguida a la normal; en el 30° día se inició la hipotermia y el animal murió en el 33° día. Los exámenes de sangre, hasta el 15° día, no revelaron la presencia de anaplasmas ni de cuerpos de Jolly. En los días siguientes fueron vistos muy raros corpúsculos intraglobulares, difícilmente identificables, que desaparecieron posteriormente a pesar del profundo estado de intoxicación en que se hallaba el animal.

La obducción puso de manifiesto los siguientes hechos anatómicos importantes: sufusiones hemorrágicas subpericárdicas, a nivel del surco aurículo-ventricular. Edema sanguinolento del tejido conjuntivo de los grandes vasos. El hígado presentábase adherente al diafragma y al peritoneo, pero podía separarse sin dificultad. La superficie del órgano, principalmente del lado derecho, mostraba numerosos nódulos blancuzcos, no salientes, recubiertos de un fino exudado fibrinoso, que contrastaban con la coloración rojo azulenta de la viscera. A la sección manaba abundante sangre y esparcidos por todo el parénquima, veíanse nódulos casi blancos, con tonalidad verdosa, de tamaño variable desde el del grano de maíz hasta el de una nuez, de consistencia más firme que el resto del parénquima, bien circunscritos, dibujo regular y límites nítidos. Vesícula biliar distendida por la presencia de un líquido viscoso muy espeso, de coloración amarillo verdosa, conteniendo concreciones blandas de dimensiones variables.

El examen histológico del hígado demostró que dichos nódulos estaban constituidos por extensas necrosis del parénquima, presentando sin embargo conservado el tejido de sostén, restos nucleares y vasos trombosados. En la periferia de estos focos necróticos observóse una zona constituida principalmente por restos nucleares y leucocitos. Además de los focos necróticos, muchas células presentaban esteatosis y se veían también grandes espacios claros, en la vecindad de los focos antedichos, con el conocido aspecto de la infiltración por burbujas gaseosas. En las preparaciones coloreadas por la tionina comprobamos también que estos focos necróticos estaban llenos de numerosos bacilos la mayoría de las veces dispuestos 2 a 2, formando pequeñas cadenas de 3 a 4 elementos, de extremidad redondeada y de aspecto fusiforme. Estos elementos presentaban dimensiones variables, oscilando su largo entre 3 y 8 μ .

Tales microbios que se colorearon bien por el método de Gram, encontrábanse más numerosos en las zonas periféricas de los focos necróticos, formando cordones o madejas irregulares, y en menor número en las partes centrales de los referidos focos.

Como se puede desprender de esta descripción sumaria, trátase en el caso de una hepatitis necrosante aguda, que presenta muchas semejanza con el "Braxy" o "Black disease" de las ovejas australianas, estudiada por Turner y Davesne y atribuida al *B. oedematiens*, o también con el "Leber Gasbrand", de Chile, estudiada por Sanz y Skiba, siendo esta última la hemoglobinuria de los bovinos conocida con los nombres vulgares de "meada de sangre" o "teleraña", infección muy semejante clínicamente a la "tristeza" y para la cual estos autores atribuyen papel etiológico al *Clostridium Welchii*.

Desgraciadamente, en el momento que se realizó la obducción, estábamos enteramente desprevenidos sobre la naturaleza de esos grandes focos necróticos y, por eso, no pudimos realizar las pesquisas bacteriológicas sobre este caso que vendría a decidir acerca de la existencia de esa nueva entidad mórbida en los bovinos de la Argentina.

Un tercer bovino normal fué inyectado con dosis repetidas de azul tripán, recibiendo en 13 días 20.5 gr. de medicamento. Después de la 3ª inyección el animal comenzó a presentar fuertes reacciones febriles, oscilando entre 40° - 40°.9 C. Luego, después de la última inyección el vacuno que manifestaba un gran enflaquecimiento, anorexia, y otros fenómenos de intoxicación, tuvo un colapso, razón por la cual se suspendió el tratamiento.

Exámenes diarios de sangre, durante casi un mes, no mostraron la presencia de corpúsculos intraglobulares. El examen de sangre hematológico realizado a los 3 días, desde la última inyección, dió el siguiente resultado:

Hematíes: 6.800.000 x mm.³. Hemoglobina: 47 (Sahli-Leitz, patrón humano). La proporción de hematíes con substancia gránulo-filamentosa y metacromática es bajísima y no se observa otras alteraciones globulares.

Los leucocitos se presentan disminuidos en número, 5.700 x mm.³, con neutropenia y monocitosis.

El tripán parece ser un débil veneno hemolítico para los mamíferos, como ya lo demostraron las observaciones anteriores de Piorkowsky en el conejo. Tal vez sea más activo para las ranas, sin embargo en este caso las irregularidades compro-

badas hacen suponer la intervención de otros factores no aclarados.

Por tanto, parece justificado reconocer que el azul tripán no provoca en los animales en estado crónico de infestación latente anaplasmática una reviviscencia de la enfermedad (como ocurre, por ejemplo, en el caso de la *Bartonella muris* y el "205 Bayer"), y que no reproduce, tanto en estos animales como también en los sanos, ni el cuadro clínico ni el aspecto hematológico de anaplasmosis.

LEYENDAS DE LAS LAMINAS

Todas son microfotografías originales de preparados teñidos con el licor de Giemsa. Se hicieron con aparatos Zeiss; empleándose para todas el objetivo inm. hom. 2mm. a 1.40. Las numeradas 37, 38, 39, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 63, 71, 73 y 75 fueron tomadas con el ocular 7 X y fuelle de 40 cms. (aumento 1.000 diámetros). Las demás se fotografiaron con el ocular 15 X y fuelle de 45 cms. (aumento 2.430 diámetros).

LÁMINA XI.

- Figs. 1, 2, 3, 7, 8, 9—*B. argentina*, formas ameboideas redondeadas.
» 4, 5, 6, 10, 11, 12—*P. bigeminum*, formas ameboideas.

LÁMINA XII.

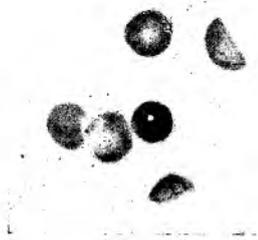
- Figs. 13, 14, 15—*B. argentina*, formas ameboideas alargadas.
» 16, 17, 18—*P. bigeminum*, » » »
» 19, 20, 21—*B. argentina*, » bigeminadas.
» 22, 23, 24—*P. bigeminum* » »

LÁMINA XIII.

- Figs. 25, 26, 27,
31, 32, 33—*B. argentina*, formas bigeminadas.
» 28, 29, 30,
34, 35, 36—*P. bigeminum*, » »

LÁMINA XIV.

- Figs. 37, 38, 39—Cortes histológicos de cerebro bovino con los capilares repletos de hematíes parasitados por *B. argentina*.
» 40, —Corte histológico de corazón bovino mostrando capilares que contienen numerosos individuos de *B. argentina*



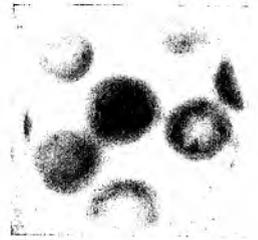
1



2



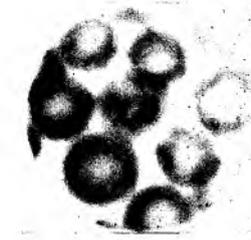
3



4



5



6



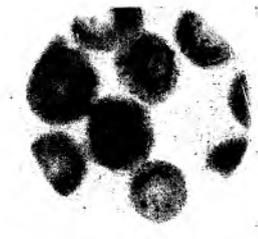
7



8



9



10



11



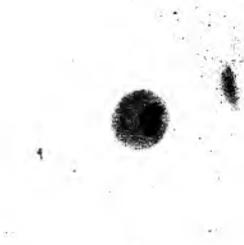
12



13



14



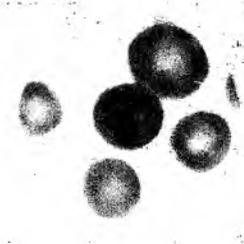
15



16



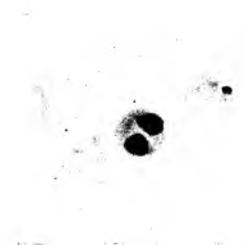
17



18



19



20



21



22



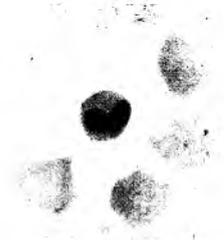
23



24



25



26



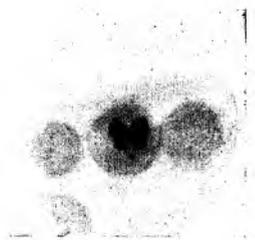
27



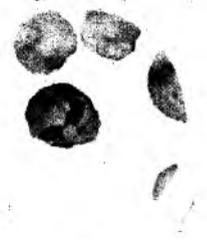
28



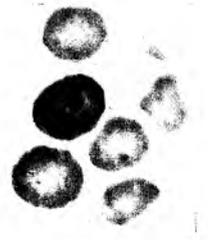
29



30



31



32



33



34



35



36



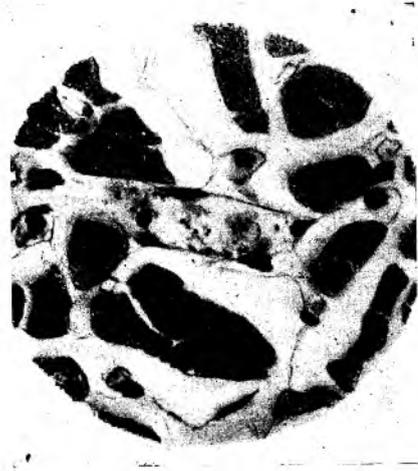
37



38



39



40



41



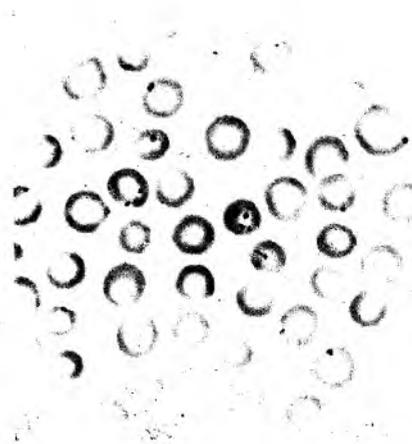
42



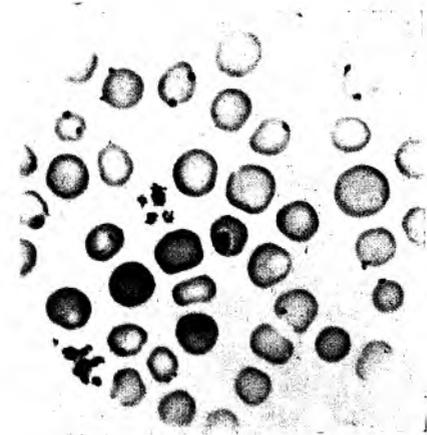
43



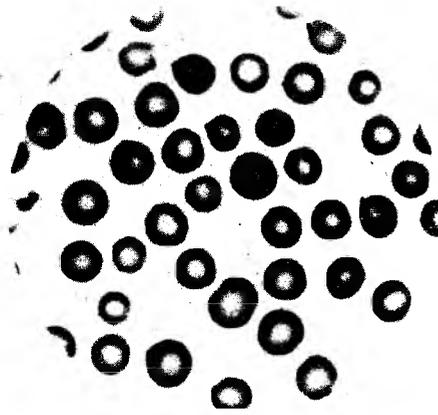
44



45



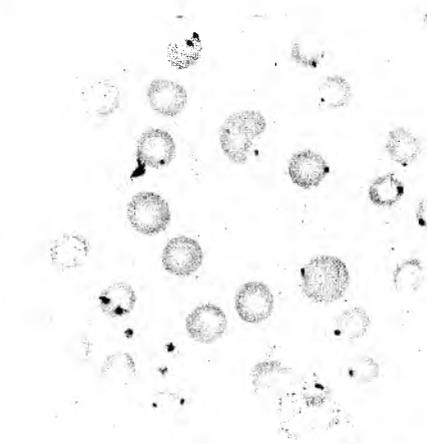
46



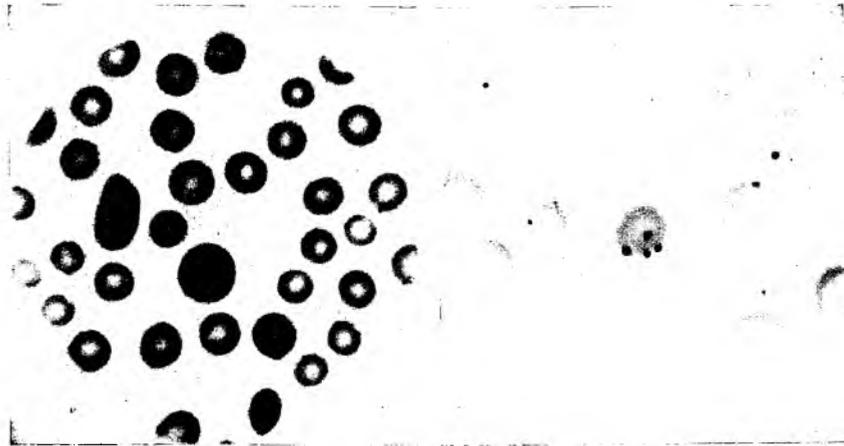
47



48

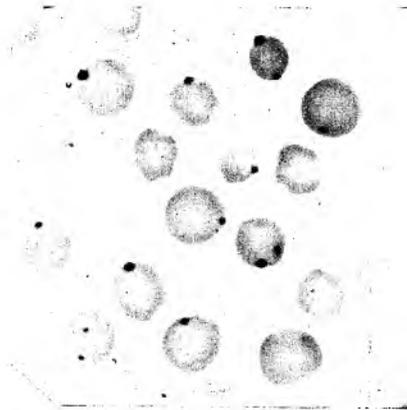


49

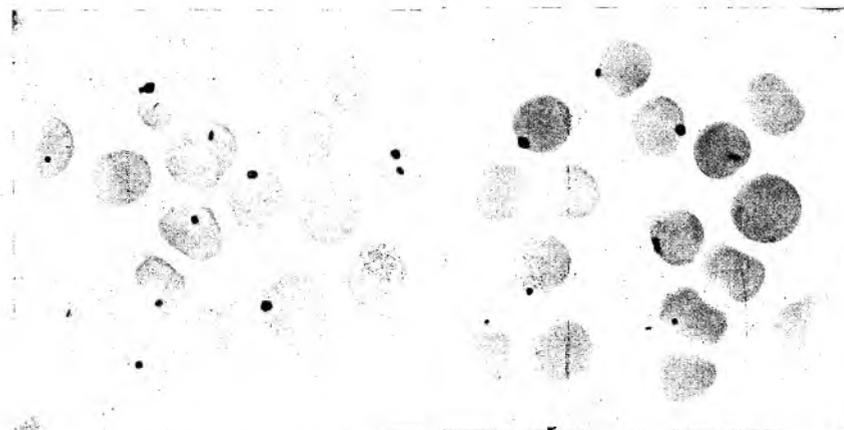


50

51



52



53

54



55



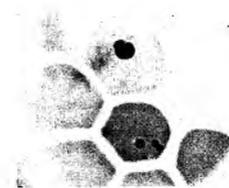
56



57



58



59



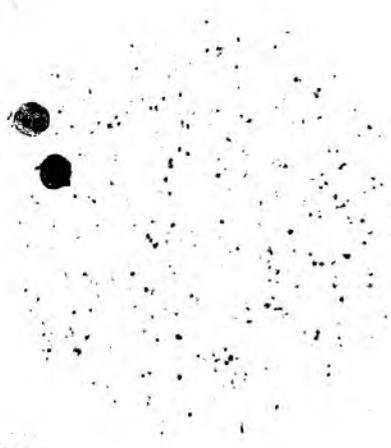
60



61



62



63



64



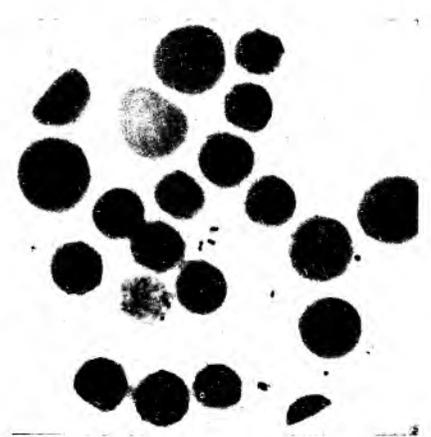
65



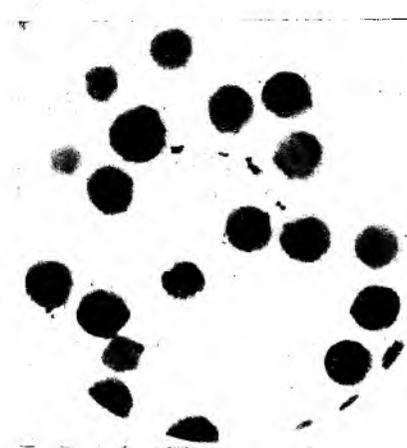
66



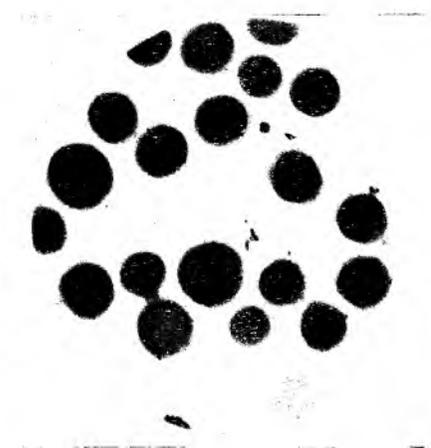
67



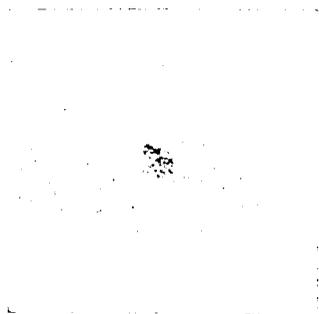
68



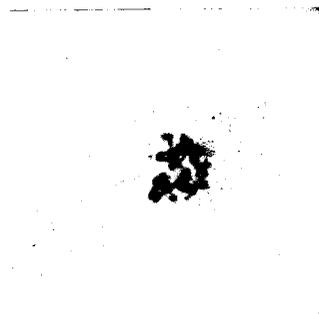
69



70



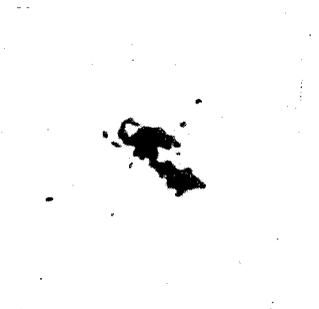
71



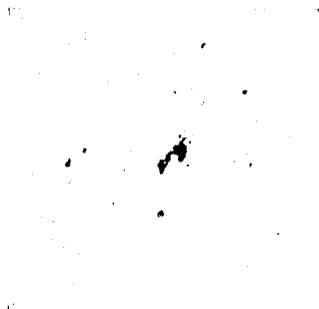
72



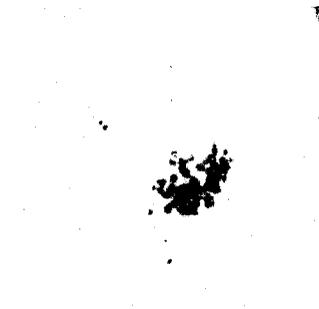
73



74



75



76

LÁMINA XV.

- Fig. 41, — Corte histológico de corazón bovino con individuos de *B. argentina* en los hematíes situados en el interior de los capilares.
» 42, 43 — Cortes histológicos de riñón bovino con *B. argentina* en los hematíes de los capilares.
» 44, — "Frottis" de riñón bovino con *B. argentina*.

LÁMINA XVI.

- Figs. 45, 46, 47, 48, 49 — *Anaplasma*.

LÁMINA XVII.

- Figs. 50, 51, 52, 53, 54 — *Anaplasma*.

LÁMINA XVIII.

- Figs. 55, 56, 57, 58,
59, 60, 61, 62 — Alteraciones de los eritrocitos (sangre periférica) de cavia y conejo por efecto del envenenamiento con fenilhidracina.

LÁMINA XIX.

- Figs. 63, 64, 65, — Gotas gruesas de sangre periférica, no fijadas, con *Anaplasma*.
» 66, — Gota gruesa de sangre periférica, fijada, con *Anaplasma*.

LÁMINA XX.

- Figs. 67, 68, 69, 70 — Cultivos de *Anaplasma*.

LÁMINA XXI.

- Figs. 71, 72, 73, 74, 75 y 76 — Cultivos de *Anaplasma*.