

# Sobre algunos métodos de cultivo de ultravirus

POR

DON DIEGO JORDANO BAREA

Pensionado por la Dirección General de Ganadería en el Instituto «Santiago Ramón y Cajal», para estudio de ultravirus  
Profesor de la Facultad de Veterinaria de Córdoba.

Comunicación presentada al XVIII Congreso de la A. E. P. C. Córdoba, 1944

Señores:

Aprovechando la oportunidad de que el XVIII Congreso de la A. E. P. C. nos reúne, queremos exponer unas técnicas simplificadas de cultivo de ultravirus, con el deseo de llevar a vuestro convencimiento su sencillez y la posibilidad de realizar fructíferas investigaciones virológicas aún en laboratorios que carezcan de instalaciones especiales.

Línea de ellas se refiere al cultivo en huevos incubados, y otra al cultivo en tejidos.

Las técnicas propuestas por PEYTON ROUS y J. B. MURPHY (1911) (1), ELIOT R. CLARK (2), WOODRUFF y GOODPASTURE (1951) (3), pueden simplificarse en pequeños detalles.

La incubación de los huevos necesarios puede llevarse a cabo en la misma estufa del laboratorio regulada a 37°, sin más precaución que colocar una capa de algodón en el suelo y en la rejilla de la estufa, colocando sobre ella los huevos que vayan a incubarse, de modo que no se toquen. También puede prescindirse del volteo.

Los huevos de gallina «para incubar», que se adquieren en cualquier granja avícola, no deberán tener más de una semana de puestas, y no debe olvidarse que las gallinas, a veces, sufren virosis y bacteriosis que pueden interferir los resultados, induciendo al error las primeras y contaminando el material de cultivo las segundas. Tampoco puede olvidarse la influencia

de la raza, que en esta técnica, como en todas las inoculaciones experimentales, se pone de manifiesto. Los huevos de razas rústicas presentan mayor resistencia a la multiplicación de algunos virus inoculados, o pueden vencer la infección provocada reparando las lesiones determinadas por ellos.

En las razas muy mejoradas, que requieren más cuidados por su delicadeza, la alantoides del huevo inoculado suele ofrecer menor resistencia, y ciertos virus, sobre todo en los primeros pases, pueden prender y multiplicarse mejor. La razón de ello es que en estas razas, que tanto se apartan de los tipos ambientales, puede contarse con la existencia de alguna mutación recesiva que produzca un defecto constitucional general con disminución de las defensas orgánicas.

En general [la incubación debe hacerse a 39.5° C. por espacio de 12 días. Al 11.º día se efectuará la ovoscopia mediante una bombilla colocada en el fondo de una caja cuya tapadera tenga una abertura de forma y tamaño suficiente para sustentar el huevo que ha de examinarse a trasluz. Con un poco de costumbre puede hacerse la ovoscopia haciendo sombra mediante la mano derecha, aplicándola semicerrada sobre el huevo mientras sostenemos a éste cerca de una lámpara con los dedos pulgar, índice y medio de la mano izquierda.

Los huevos que tienen el embrión vivo se

conocen porque se perciben las sombras de los movimientos que realiza el pollito. Cuando el embrión ha muerto las sombras del contenido del huevo carecen de movimientos activos y el embrión suele ser de menor tamaño que el que corresponde a dicho día, o bien puede faltar por completo. En este caso el huevo se ve uniformemente iluminado, sin sombra alguna.

Al hacer la ovoscopia se dibujará con lápiz un círculo en la zona de la cáscara opuesta al lugar en que la sombra del embrión es más intensa. El centro de este círculo servirá de punto de referencia para practicar la inoculación.

Antes de proceder a ella efectuaremos siembras en tubos de caldo con el material virulento que se vaya a inocular. La siembra de los huevos se efectuará siempre con materiales que resulten estériles.

Generalmente, cuando se ignore la dilución óptima a que debe ir el material de inoculación, o cuando se trate de tener una idea sobre la actividad de un virus, debe inocularse por lo menos una serie de cuatro huevos con objeto de tantear la acción del virus a diferentes diluciones.

Pueden prepararse diluciones al 1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000 siguiendo la pauta de GROTH. Se hervirán cinco jeringuillas divididas en décimas, siendo preferible hacerlo con la aguja ya montada y con el émbolo puesto; se ahorra tiempo y se evita que la aguja, adaptada con pinzas Pean, quede floja y pueda caer durante las manipulaciones siguientes. En cuanto se enfríe el agua del hervidero se sacarán con pinzas estériles y se introducirá cada una en tubo de ensayo estéril que las preserve de toda contaminación mientras llega el momento de utilizarlas.

Sobre una mesa colocaremos una placa de corcho y sobre ella un paño de cocina empapado en una solución antiséptica de acción rápida sobre el virus con que se trabaje. En una gradilla pondremos cuatro tubos de ensayo y en cada uno de ellos 4'5 c. c. de solución salina estéril, valiéndonos de pipeta también estéril.

Con la primera jeringuilla se tomará 0'5 c. c. de la emulsión madre de virus y se echarán en el primer tubo de ensayo, flameando las bocas

de éste y del frasco de origen. La jeringa utilizada se vuelve a colocar en su tubo protector para evitar la diseminación del virus. Se agitará perfectamente el primer tubo y el material virulento quedará diluido al 1:10.

Con otra jeringuilla distinta se toma 1 c. c. del tubo primero, flameando previamente su boca, y se echan 0'5 c. c. de la dilución 1:10 en el tubo número 2. La jeringuilla recién utilizada se vuelve a colocar en su tubo protector y queda ya cargada con 0'5 c. c. de dilución al 1:10, que servirán para inocular el primer huevo de la serie. Del mismo modo se preparan las diluciones al 1:100, 1:1.000 y 1:10.000, o mayores si fuera necesario.

Para evitar confusiones es conveniente marcar en cada tubo de ensayo el título de la dilución que contiene.

Se enciende el mechero de gas, se colocan en un recipiente unas tijeras curvas de puntas muy pequeñas de ramas curvas y afiladas, y se cubren totalmente con alcohol de 70°. Un poco antes de utilizar este material se saca con otras pinzas y se acerca a la llama para que se inflame el alcohol que aún las moja; cuando se apague se dejan enfriar medidas casi del todo en una placa de Petri estéril entreabierta. Entretanto se pone a fundir una poca de parafina en un matraz.

Sacaremos los huevos de la estufa y los numeraremos; se colocan sobre una grada de madera que pueda mantenerlos fijos con el círculo (marcado al hacer la ovoscopia) hacia arriba, y se rocían con alcohol mediante un frasco cuentagojas. Se ca la cáscara, en la coronilla del huevo, que corresponde a la cámara aérea, se perfora la cáscara con la punta de la tijera movida rápida y enérgicamente, con lo cual se equilibran las presiones de la cámara aérea y atmosférica.

Después, en el centro del círculo marcado con lápiz se procura perforar la cáscara mediante un golpe enérgico efectuado con una sola rama de las tijeras. Una vez hecho un orificio minúsculo que corresponde en diámetro a la punta de la tijera, se levanta una porción de cáscara de unos dos o tres milímetros de diámetro, sirviéndonos de la tijera, colocada cas-

tangencialmente, a modo de palanca de primer género. Con las pinzas se retiran los pequeños fragmentos de cáscara que resultan.

Al incidir cuidadosamente la testa, la alantoides aparece descendida dejando un espacio de aire, entre ella y la cáscara, suficiente para inocular cómodamente sin peligro de lesionarla. Acto seguido se procede a la inyección del virus contenido en la jeringuilla de igual número que el marcado en la cáscara del huevo. La cantidad inoculada suele ser de 0'2 c. c. de la dilución virulenta. La inoculación se hace gota a gota introduciendo un poco bajo la testa la punta de la aguja, en dirección oblicua al eje mayor del huevo. La jeringa se vuelve a su tubo correspondiente y después se deposita una gota gruesa de parafina en cada uno de los orificios practicados. No debe calentarse mucho la parafina con objeto de que se solidifique en cuanto toque la superficie más fría de la cáscara; con esta precaución se evita que penetre parafina en el interior del huevo; además, sin esta condición resulta difícil ocluir la abertura practicada en la cámara aérea, situada en un plano vertical, porque, si no se solidifica rápidamente, la gota de parafina resbala inmediatamente.

Para inocular los restantes huevos se realizan las mismas manipulaciones. Debe añadirse una serie de huevos testigos incubados en las mismas condiciones. El primero de esta serie se inocula con 0'2 c. c. de solución salina para ver si el suero fisiológico empleado para diluir el material virulento produce lesiones alantoides inespecíficas inyectadas en el volumen, temperatura y demás condiciones de la experiencia; los demás huevos testigos se inoculan con las diluciones expresadas anteriormente pero inactivas por el calor.

El procedimiento llamado de ventana es más engorroso, y se practica cuando se pretende ver la alantoides durante la incubación a que se someten los huevos después de inoculados. La técnica es semejante a la descrita anteriormente pero difiere en que la perforación que se hace en la cáscara es de 1 cm. de diámetro, o de lado si se hace de forma triangular o cuadrada. Si se trata de practicar una abertura circular puede hacerse uso de las tijeras curvas finas;

en cambio para hacer un triángulo equilátero se precisa un disco cortante que en su borde lleva pegado polvo de carburo y en su centro un vástago perpendicular por el que se sujeta a una manga giratoria movida por un motorcillo eléctrico. El disco cortante gira rápidamente, y aplicado a la cáscara determina su desgaste.

Después de efectuada la inoculación con los mismos detalles expuestos anteriormente, se procede a depositar un anillo alto de parafina alrededor de la abertura. También aquí se obtienen buenos resultados con la parafina fundida si se procura que no esté muy caliente, aunque puede emplearse una mezcla de parafina y vaselina como recomiendan GOODPASTURE y BLIDDINGH (4), y empleada con éxito por BLURNET. Nosotros preferimos la parafina fundida. Después de solidificada, se toma con unas pinzas un cubreobjetos, puesto con otros en una placa de Petri con alcohol, se deja que éste escurra un momento y después se flamea dejando que ardan los restos de alcohol. Como el cubreobjetos va caliente, al aplicarlo tangencialmente sobre la abertura bordeada se adhiere a la parafina; mientras ésta se derrite un poco al contacto del cubreobjetos nivelaremos éste apretando su superficie con las pinzas para que se adapte bien y no deje ningún resquicio por el que pueda penetrar el aire del exterior.

Se evitará tener los huevos fuera de la estufa mucho tiempo; apenas se terminen las inoculaciones se llevarán a la estufa regulada a 37°, procurando que el sitio de la inoculación o la ventana estén siempre mirando hacia arriba.

A continuación debe efectuarse una siembra en tubos de caldo ordinario con tres gotas por tubo de la dilución contenida en cada una de las jeringuillas utilizadas, poniendo a cada tubo el número de la dilución y de la jeringa correspondiente.

Después, el material utilizado se hierve o se flamea y el paño de cocina se introduce en un cristalizador grande casi lleno de solución antiséptica.

El tiempo que dura la incubación de los huevos inoculados varía según la finalidad perseguida, pero depende principalmente de la rapidez e intensidad con que se desarrollen las

lesiones. Generalmente se recomienda una incubación de tres días, excepto en aquellos virus que se multiplican más lentamente, como el del sarcoma de Rous (5 a 7 días) y las rickettsias.

Llegado el término de la incubación (3 días casi siempre) se procede a la apertura de los huevos para extraer su contenido. Para ello se preparan tres placas de Petri estériles por cada huevo: una mayor y más profunda y dos pequeñas. Se extiende el paño, se introduce en una cubeta con alcohol las tijerillas curvas y un par de pinzas de ramas curvas y finas, disponiendo en el centro del paño una placa de Petri grande con una almohadilla de algodón a propósito para sostener el huevo sin que ruede. La abertura por donde se hizo la inoculación o la ventana seguirán hacia arriba. Se baña la cáscara del primer huevo con alcohol y se deja secar mientras se flamea y guarda el instrumental como se dijo al hablar de la inoculación. A continuación se empuñan las tijerillas y con una de sus puntas se pincha la cáscara un poco por encima de un punto cualquiera de la cáscara determinado por la intersección de un plano paralelo al eje mayor del huevo, que corte a éste en dos mitades iguales. Se mete un poco más la punta de la tijera curva y se corta la cáscara como si fuera cartón, practicando el corte de derecha a izquierda. Si la tijera se coloca algo oblicuamente, de arriba abajo y de atrás a delante, y si se va dando la vuelta al huevo alrededor de un eje perpendicular a la mesa, que pase por el punto de inoculación, se consigue abrir el huevo como una lata de conservas, levantando después la tapadera que resulta con ayuda de las tijeras. Inmediatamente se sujeta la tapadera con una de las pinzas y se va levantando con cuidado hasta darle la vuelta.

La alantoides, adherida a la cáscara, ha quedado cortada en dos mitades: una superior, que suele quedar adherida a la tapadera cuando el embrión está vivo, y que corresponde a la zona que rodea al punto de inoculación, donde suelen ser más abundantes las lesiones, y otra inferior que queda revistiendo la porción mayor de cáscara cuando se vacía su contenido (pollo y saco vitelino). Con las otras pinzas curvas se sujeta la porción superior de alantoides por su

borde, se desprende de la tapadera firando suavemente, y se coloca en el interior de una de las placas de Petri pequeñas. Se procurará realizar estas operaciones lo más rápidamente posible para disminuir los riesgos de contaminación. Acto seguido se coje la porción de cascarón que contiene al pollo, se vuelca sobre la placa de Petri más grande y se vuelve a tapar.

Si el embrión está vivo realiza movimientos bruscos en cuanto se abre el huevo, y sigue haciéndolos durante la manipulación anterior hasta que muere, por hemorragia, en poco tiempo. Con un poco de costumbre se sabe si el embrión está vivo o muerto en el momento de cortar la cáscara sin necesidad de verlo realizar movimientos. Si está vivo, al cortar los vasos alantoideos suele salir un poco de sangre; en el caso contrario lo que sale es un líquido citrino. De este modo puede ahorrarse tiempo y material firando los huevos en que suceda esto último, a menos que interese el estudio de las lesiones que puedan haber determinado la muerte del embrión de pollo.

Inmediatamente después se desprende la porción inferior de la alantoides, como queda dicho para la superior, y se coloca en la otra placa pequeña. Se escribe sobre cada placa la misma signatura o el mismo número que figure en el huevo abierto y se procede a hacer el control bacteriológico de éste.

El control directo se hace tomando con unas pinzas una pequeña porción de la membrana vitelina (color amarillo), de la cual se quita el exceso de líquido frotándola dos o tres veces por la parte interna de la tapa de la misma placa de Petri en que está contenida. Con lo que quede entre las bocas de la pinza se hace un frotis, al que se pone el número o la signatura correspondiente. El huevo es un buen medio de cultivo para muchos gérmenes, y si hubo contaminaciones bacterianas, como estuvo a 37° varios días, en un simple frotis se verán en gran número en la mayoría de los casos. Sin embargo, en estos frotis los granos de vitelo más pequeños toman en ciertos campos del frotis disposiciones y color muy parecidos a los de los cocos. Se distinguen de ellos porque los hoy de todos los tamaños y se encuentran todas

las transiciones; porque se presentan aislados casi siempre; porque cuando se encuentran reunidos adoptan la disposición de cadenas de estreptococos, de dos o cuatro elementos cuando más, sólo en algunos campos, lo cual es prueba de que se trata de una agrupación fortuita. Sólo cuando se necesita una certeza absoluta sobre la pureza del material obtenido se procede a sembrar en los medios de cultivo ordinarios tomando con el asa de platino una pequeña cantidad de material de la placa de Petri grande.

Los cascarones vacíos y el material que se vaya utilizando se coloca en una cacerola con tapadera, que se pone a hervir una vez que esté llena para destruir el virus que los contamina.

A continuación se destapan una por una las placas que contienen las alantoides y se extienden bien en el fondo de la misma placa, mediante dos pinzas, con objeto de estudiar las lesiones. En este momento se seleccionan las alantoides en dos grupos: 1.º El de las destinadas a otros pases. 2.º El de las que se destinan al estudio histológico.

Las del grupo 1.º se introducen asépticamente mediante pinzas en un frasco de perlas de vidrio estéril; se le añaden 5 c. c. de solución salina estéril y se agita para obtener un líquido virulento. Se numera el frasco y se guarda en la nevera.

Las del grupo 2.º se fijan en formol al 10 % en solución salina fisiológica, procurando que no formen pliegues. A las 24 horas la fijación es más que suficiente; entonces se cortan con tijeras las porciones que interesen estudiar.

Su área será de un centímetro cuadrado aproximadamente; estos trozos se deshidratan, se aclaran y se incluyen en parafina, para dar cortes seriados. Se cortan también otros fragmentos mayores, de unos 4 cm. x 4 cm. para montarlos, después de lavados con solución salina, entre porta y cubre con objeto de hacer su observación a pocos diámetros. Si quieren conservarse se montan en glicerina o en glicerina-gelatina, o bien se deshidratan con alcohol absoluto después de enjuagarlos con un papel de filtro; se escurre luego el alcohol, se enjuga de nuevo entre papel de filtro, se cubre con unas

gotas de glicerina gelatinada caliente a la cual se haya añadido un poco de formol inmediatamente antes de usarla, y se cubre con cubreobjetos grande o con un vidrio cortado de las dimensiones convenientes. Al hacer esta operación se procurará que no queden burbujas. Mas las lesiones macroscópicas suelen perder contraste y por consiguiente se destacan menos.

Las lesiones que demuestran la existencia o la multiplicación de un virus suelen ser pequeños focos blanquecinos, de forma circular o poco menos, distribuidos con cierta irregularidad. Pero no debe olvidarse la existencia de lesiones inespecíficas parecidas, que pueden ser causa de error.

Los líquidos empleados para diluir y los embriones de tejidos no virulentos pueden determinar sobre la alantoides lesiones inespecíficas por acciones mecánicas, osmóticas o químicas. La pérdida de la posición normal de la alantoides determina un ligero espesamiento de la misma. Además pueden observarse algunas opacidades más o menos imprecisas, de color parecido a las queratitis incipientes. Otras veces estas opacidades adoptan la forma granular, y puede haber pequeñas hemorragias producidas por el insulto mecánico de la inoculación.

En los huevos incubados menos de doce días aparece con mucha frecuencia una lesión llamada úlcera traumática, completamente inespecífica, que no deja de presentarse, aunque con más rareza, en los que tienen doce días de incubación. Se caracteriza por su color gris, por ser opaca, por estar limitada por un borde algo elevado, blanquecino e irregular en su contorno, del cual pueden partir girones radiados y opacos, especialmente a lo largo de los vasos.

Cuando se inoculan emulsiones de tejidos avirulentos las lesiones inespecíficas predominantes suelen ser el edema de toda la zona de inoculación con el consiguiente espesamiento; las opacidades granulares, distribuidas casi uniformemente y con tendencia a agruparse en la zona de alantoides que queda debajo de la abertura por donde se hizo la inoculación, y, finalmente, la úlcera traumática descrita (BURNET) (5).

Cuando un líquido irritante para la alantoides destruye su capa ectodérmica se produce una exudación que queda recubriendo la membrana, produciendo el espesamiento y la opacidad consiguientes.

Consecuencia de todo esto es que para considerar como específica una lesión debe poder reproducirse la enfermedad con material alantoides en los animales receptibles, después de varios pases por huevo. Los testigos inoculados con emulsiones avirulentas deben dar resultados negativos. Las lesiones producidas deben guardar relación cuantitativa con la cantidad y título del inoculado: las diluciones bajas deben dar lesiones confluentes y las altas, separadas progresivamente al aumentarse el grado de dilución (BURNET).

Finalmente queremos referirnos al cultivo de ultravirus en tejidos, particularmente al método de MAITLAND y MAITLAND simplificado y al método de RIVER.

La técnica de cultivo de tejidos no está al alcance de todos por su complicación cuando se trata de mantener vivos los explantos durante pases sucesivos. Mas debemos señalar que en el cultivo de los ultravirus en presencia de tejidos no nos interesan más que la multiplicación del virus, importándonos poco que las condiciones en que coloquemos a las células no sean las más favorables para la larga pervivencia de éstas.

Complicado de obtener y difícil de conservar es el plasma de gallina, pero puede prescindirse de él por completo porque su papel es de medio de sostén, una vez que se ha solidificado. Por eso MAITLAND y MAITLAND utilizan en su técnica simplificada: suero, que puede ser de cualquier especie, pero se dará la preferencia al animal del que procedan las células y el virus; Tyrode y extracto de embrión de pollo, riñón o de testículo de conejo, etc. En lugar de frascos de Borrel puede utilizarse un matraz de Erlenmeyer de 25 o 50 c. c.

El método de RIVER representa la simplificación máxima, pues utiliza 0'1 gramo de tejido fresco y 4 o 5 c. c. de Tyrode. Este último líquido se echa en frasco de Borrel, en matraces de Erlenmeyer o en simples placas de Petri, y en

él se van colocando perfectamente distanciados los trocitos de tejido (de tamaño pequeño para que puedan nutrirse bien). Se procurará operar en vitrina para evitar las contaminaciones del aire atmosférico. No importa que los fragmentos se desplacen al ser transportados a la estufa a 37°. Los explantos e incluso los tejidos pueden conservarse en la nevera a 4.° durante 4 o 5 días sin que pierdan sus propiedades para cultivo de ultravirus.

En estas condiciones las células del explanto conservan su vida e incluso se observa una ligera multiplicación. El virus a cultivar se siembra preparando diluciones progresivas como se dijo para los cultivos en huevo, y de cada una de ellas se depositan dos o tres gotas en la placa de Petri con el cultivo de tejidos correspondiente. De este modo se obtiene una repartición del virus más uniforme que cuando se efectúa la siembra depositando en el Tyrode que rodea los explantos trocitos pequeños de tejidos procedentes de animales afectados de la virosis cuyo agente se trata de cultivar.

En la estufa a 37° las células perviven el tiempo suficiente para que se produzca una multiplicación del virus sembrado; a los tres días empiezan a degenerar y los productos de autoólisis pueden destruir rápidamente el virus existente.

Llamamos la atención sobre la sencillez de este procedimiento y sobre las ventajas que pueden obtenerse uniéndolo con los cultivos en alantoides. Las lesiones alantoides, efectivamente, servirán para indicarnos en todo momento la actividad del virus durante los pases por cultivo de tejidos, si quiere prescindirse de las pruebas de experimentación en los animales.

Y para terminar señalaremos que la técnica de cultivo en huevo ofrece grandes perspectivas técnicas. GOODPASTURE y K. ANDERSON han dado el primer paso para el estudio de la acción patógena de algunas bacterias cultivadas en huevos de gallina incubados, mediante el estudio de las lesiones producidas en la alantoides. He aquí un nuevo camino abierto para la investigación.

Estos intentos no se han limitado a las bacterias; muchos tripanosomas han sido cultiva-

dos con éxito. Nosotros que tenemos actualmente en España un brote de durina podemos estudiar la preparación de material antigénico obtenido de cultivos en huevo, con el fin de ver si resulta bien en la fijación de complemento y si su preparación resulta más económica que obteniéndolo de cobayas o ratas blancas.

### Bibliografía

- (1) ROUS, P. y MURPHY, J. B.: Tumor implantations in the developping chick embryo. Experiments with a transmissible sarcoma of the fowl. *J. A. M. A.* 56, 741 (1911).
- (2) CLARK, E. R.: Technique of operating on chick embryos. *Science* 51, 371 (1920).
- (3) WOODRUFF, A. M. y GOODPASTURE, E. W.: The susceptibility of the chorioallantoic membrane of chick embryos to infection with fowl-pox virus. *Amer. J. Path.* 7, 239 (1931).
- (4) GOODPASTURE, E. W., WOODRUFF, A. M. y BLIDDINGH, G. J.: Vaccinal infection of the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Amer. J. Path.* 8, 271 (1932).
- (5) BLIRNET, F. M.: The growth of viruses on the chorioallantois of the chick embryo. *Handbuch der Virusforschung*, de Doerr y Hallauer; T. 1.º, p. 443. (1938). Viena.

## ESPAÑA Y LA LUCHA CONTRA LAS EPIZOOTIAS

Comunicación que presenta al Congreso de Ciencias de Córdoba, don Mariano Giménez Ruiz, Jefe de los Servicios provinciales de Ganadería de Córdoba

Octubre de 1944

### Generalidades

Desde los primeros pasos de la Humanidad, ya en los albores de la domesticación de los animales por el hombre, surgió en éste la necesidad de protegerlos contra las enfermedades plagas, que los diezaban, para utilizarlos con las mayores ventajas de aprovechamiento.

Fundamentalmente considerada la explotación de la bestia por el hombre, en sus dos acepciones esenciales, motor de sangre y dispensa de sus mejores reservas alimenticias, tiene la próxima y remota finalidad de su rendimiento económico; pero este rendimiento económico tiene una quiebra incomparable que reside en su inutilización para el fin que se le destina o en la enfermedad infecto-contagiosa que destruye en instantes, la labor de meses y años de vigiliat, sacrificios y trabajos.

Con la necesidad de curar las dolencias de toda índole, aparece el primer brote médico,

que en sus inicios de un empirismo mediocre se transforma con la experiencia y el uso de la intuición y de la inteligencia en algo ya, que bordea los límites de un curanderismo racional. El hombre examina la bestia y en su contemplación adquiere orientaciones de un tratamiento y de una medicación: en el lamido de las heridas, de un animal a otro obtiene su primera experiencia de desinfección; aprende como el vómito se provocan algunas especies animales con la ingestión de hierbas; distingue por las predilecciones de aquellos, cuales son útiles o nocivas, que un miembro puesto al sol, si estaba aterido, recobra su normalidad y mil otras ideas rudimentarias que van contorneando los límites de una medicina simplista y de una farmacopea sencilla.

La medicina y el médico no conoce aún, por aquellos tiempos distinción de enfermos y trata la enfermedad por igual, en cualquier organismo que se presente, sea humano o bestia, hasta