

BIBLIOTECA
INCISIANA



18
M. Ehm Comen Fossell
Omaggio Belli & C.
DOTT. ALFONSO DI VESTEA

PASTEUR

E

LA MICROBIOLOGIA

(DALLE FERMENTAZIONI ALLA PROFILASSI DELLA RABBIA)

Addam, quod fermenti et fermentationis naturam
probe intelligens, prae illorum nescio probabili-
ter felicius diversa variorum morborum (febrium
aeque ac aliorum) phaenomena cognoscant; ut-
pote quas, absque fermentationis doctrina,
sufficenter intelligi nesciunt.

ROBERT BOYLE — V. Opera omnia, Tomo II,
pag. 655; Venezia, 1697.



ENRICO DETKEN EDITORE

NAPOLI

Piazza del Plebiscito

1886





L. PASTEUR

DOTT. ALFONSO DI VESTEA

P A S T E U R

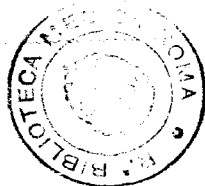
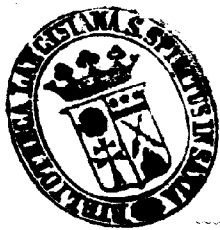
E

LA MICROBIOLOGIA

(DALLE FERMENTAZIONI ALLA PROFILASSI DELLA RABBIA)

Addam, quod *fermenti et fermentationis naturam*
probe intelligens, prae illorum nescio probabili-
ter felicius diversa variorum morborum (februum
aeque ac aliorum) phaenomena cognoscat; ut-
pote quae, *absque fermentationis doctrina*,
sufficienter intelligi nesciunt.

ROBERT BOYLE — V. *Opera omnia*, Tomo II,
pag. 655 ; Venezia, 1697.



ENRICO DETKEN EDITORE
N A P O L I

Piazza del Plebiscito
1886

Tipografia Angelo Trani.

ALL' ADORATA MEMORIA

DE' MIEI GENITORI

PREFAZIONE

Tra i tanti medici di ogni paese, che nella primavera di questo anno si sono affollati attorno al PASTEUR per conoscere da vicino la pratica delle inoculazioni antirabiche, sono stato anch'io; all'uopo inviato sotto il presidio di S. E. il Ministro di Agricoltura, Industria e Commercio, e col valido appoggio di quell'egregio uomo, che è il Conte GIROLAMO GIUSSO, e della mia Provincia (Teramo).

Di ritorno in Italia, consigliato da persona stimabilissima e scienziato eminente della mia Provincia, che ha legato il suo nome ai moderni progressi dell'agricoltura in Italia, mi son messo a scrivere queste poche pagine; dove prendo argomento dalla recente scoperta del PASTEUR, per abbozzare la vita scientifica di tanto uomo, in cui s'incarna la storia dell'origine e dei progressi della Microbiologia.

Ecco com'è nato questo libro. Esso perciò nulla ha di nuovo o peregrino per gli scienziati in materia, ma è fatto più specialmente per le persone colte in genere; le quali, mi lusingo, potranno trovarvi un concetto sommario dei microbi e della molteplice importanza di questi minimi esseri, se non rigorosamente scientifico, almeno più giusto e completo di quello che sogliono attingere dalla stampa quotidiana.

E mi sono accinto a questo lavoro nella speranza di fare due cose buone. La popolarità testè acquistata dal PASTEUR, messo per la cura della rabbia a contatto di gente d'ogni risma e d'ogni conio, m'è sembrato rimpicciolisce la figura di quel grande, se dalla generalità s'ignorasse, ch'egli ha ben altri e maggiori titoli all'ammirazione di tutto il mondo. D'altra parte, dovendo io dargli un attestato di gratitudine, non avrei saputo farlo altrimenti, che appunto ricordando in brevi tratti la parte grandissima da lui avuta all'attuale movimento scientifico.

Così è resa ragione del perchè di questo libro: or agli altri il giudizio se ho bene o male raggiunto lo scopo prefissomi.

Colgo intanto la occasione, per rendere le più sentite grazie ai benemeriti della mia missione scientifica, non che ai miei maestri

Professori CANTANI e PAOLUCCI ed al mio amico Dott. PERLI, che tanto si è adoperato per agevolarmi la via. E tradirei uno de' sentimenti più gelosamente custoditi, se qui taceSSI la mia riconoscenza al nostro illustre Ambasciatore a Parigi, il General MENABREA, la cui benevola accoglienza sarà per me il più bel ricordo dei due mesi passati colà.

Napoli, 31 agosto 1886.

Dall'Istituto di Clinica Medica
del prof. Cantani.

L' AUTORE.

I.

Pasteur e l'Origine della Microbiologia.

SOMMARIO. — La fama di Pasteur. — Concetto della Microbiologia. — Eterogenesi e Fermentazione. — Le prime ricerche. — Lotta con Pouchet e Liebig. — Le Malattie de' vini. — La Tecnica batteriologica e i recenti progressi.

Da parecchi mesi in qua, il Laboratorio del PASTEUR a Parigi offre uno spettacolo dei più attraenti. Tutti i giorni, verso mezzodì, vi si dà convegno una folla di gente, diversa di costumi, età, sesso, condizione, accomunata solo dal pericolo cui espone la morsicatura di animali idrofobi. La notizia di una possibile cura della rabbia ve la conduce da svariati paesi, in compagnia di scienziati e medici, desiderosi di vedere d'appresso i risultati e la pratica di quella cura meravigliosa.

Cotesto singolare pellegrinaggio e l'eco che suscita nella stampa di tutto il mondo, fanno della cura della rabbia la più interessante novità scientifica del giorno. Non seconda a nessuna delle molte scoperte del PASTEUR, e per impronta di genio e per valore scientifico e pratico, essa ha più di qualunque altra contribuito a popolarizzare la fama di quel grande. Chè dai tanti morsicati, i quali accorrono al PASTEUR come all'unica ancora

di salvezza, portasi il suo nome benedetto nelle più remote contrade di Europa e per fino in Africa e in America, dove si rispande per le città e per le campagne.

Ma quanti, tra coloro che oggi conoscono il PASTEUR, sanno di poter affermare, che senza la cura della rabbia egli non sarebbe men grande ? Quanti sanno il posto eminente ch'egli occupa tra gli scienziati viventi, per la parte avuta all'attuale progresso degli studi biologici ?

Non è molto che un nuovo ordine di idee è venuto ad ampliare l'orizzonte scientifico, dando vita propria ad una novella disciplina che porta il nome di *Microbiologia* o *Bacteriologia*. Per essa sappiamo oggi che cosa è una fermentazione, e come la materia che ha cessato di vivere si trasformi per entrare in nuovi cicli di vita. Con essa si è fatta non poca luce sull'origine e diffusione di molte malattie degli animali e delle piante. Questa scienza, che omai interessa l'agricoltore, l'industriante, il medico, l'igienista, è sorta dopochè si è riconosciuta la molteplice importanza che gl'infinitamente piccoli, i così detti *microbi* o *batteri*, hanno nell'economia generale della natura. PASTEUR ha per primo messo in evidenza un tal fatto; e se quelli che l'hanno preceduto nella conoscenza dei microbi possono vantarsi di aver creato un nuovo capitolo di storia naturale, a lui torna il merito, che basta per sè solo a rendere un uomo immortale, di aver gettato le fondamenta della Microbiologia.

Quand'egli apparve nel mondo scientifico, si agitavano due grandi problemi, quello delle fermentazioni e l'altro della eterogenesi o generazione spontanea degli esseri; problemi non nuovi, ma

rivenuti a galla più interessanti, in seguito ai grandi progressi della chimica ed ai meravigliosi trovati del microscopio.

E già per i lavori del nostro SPALLANZANI (1745), continuatore del REMI nella lotta contro l'eterogenesi, erasi acquistato alla scienza questo fatto importantissimo: che le infusioni organiche, le quali abbandonate all'aria prestamente si popolano di microbi, non danno luogo a veruna manifestazione di vita, se si assoggettano per tre quarti d'ora alla temperatura dell'ebollizione in vasi ermeticamente chiusi. E di qui traeva APPERT l'idea del noto suo metodo di conservazione delle materie animali e vegetali, a scopo economico-industriale; il quale consiste appunto nel farle bollire per un certo tempo, e durante o subito dopo l'ebollizione chiudere a tenuta d'aria i recipienti. D'altra parte CAGNIARD-LATOUR in Francia (1835) e, quasi contemporaneamente, SCHWANN in Germania avevano riconosciuto ne'globuli del lievito di birra (visti già da LEUWENHOEK fin dal 1680) dei piccoli esseri vegetali, che si moltiplicano per gemmazione: e messo innanzi il dubbio, se la fermentazione dello zucchero non fosse per avventura un effetto della vita di cote-sto fungo microscopico (1).

Non di meno, portando lo spirito dei tempi a tutto spiegare mercè l'influenza dell'ossigene atmosferico, il fatto messo in luce dallo SPALLANZANI si attribuiva all'esclusione di quest'elemento per effetto della bollitura; e parve indiscutibile l'intervento dell'ossigene nell'iniziare o sostenere qualunque processo di fermentazione.

Indarno lo stesso SCHWANN, SCHULTZE e SCHROEDER col DESCH (1854) tentarono di opporre alle

(1) Ann. di Chim. et Phys., T. LXVIII.

teorie dominanti i loro ingegnosi esperimenti, per i quali si dimostra : che il mosto conservato alla maniera d'APPERT non entra in fermentazione, se l'aria vi si fa arrivare per un tubo di vetro arroventato o attraverso l'acido solforico, oppure semplicemente filtrata per uno strato di cotone. Manifestamente, queste pratiche non importano alcuna modificazione dell'aria per rispetto al suo contenuto d'ossigene; e si sarebbe potuto inferirne, che la presenza di questo è un fatto bensì necessario, ma non sufficiente a produrre la scomposizione dello zucchero.

Che cosa mai poteva essere quel principio dell'aria, cui il calore e l'acido solforico distruggono e la filtrazione meccanica trattiene, e senza del quale la fermentazione non ha luogo? La mente correva subito all'idea dei globuli del lievito, che CAGNIARD-LATOUR avea visto moltiplicarsi nei liquidi zuccherini in fermentazione. Ma chi mai li aveva dimostrati obbiettivamente nell'aria? E d'altro canto, come pronunciarsi per una teorica vitale della fermentazione ne' termini formulati da CAGNIARD-LATOUR, quando il grande LAVOISIER avea detto trattarsi di un semplice fatto di dislocazione molecolare, ossia di un semplice sdoppiamento della molecola dello zucchero in alcool e acido carbonico?

Epperò non era facile cosa sottrarre le menti al dominio della teoria chimica e meccanica delle fermentazioni, appoggiata all'autorità di nomi come quelli di GAY-LUSSAC e di LIEBIG. L'intervento del PASTEUR dovea essere il segnale di una completa rivoluzione.

Chimico di professione, PASTEUR avea fatto le sue prime armi nella fisica molecolare, esordendo con una geniale scoperta circa la forma simme-

trica o non dei corpi cristallizzabili, che gli dava di risolvere una quistione difficilissima sollevata da MITSCHERLICH all'Accademia delle Scienze. La nota di MITSCHERLICH riguardava la singolarità di due sali doppi di soda e ammoniacca, il tartrato ed il paratartrato; i quali, sebbene della medesima composizione elementare e delle stesse proprietà fisico-chimiche generali, pure si differenziano per essere l'uno destrogiro e l'altro inattivo alla luce polarizzata. PASTEUR, guidato dalla sua idea della simmetria sovrapponibile, riuscì a distinguere nel paratartrato due specie di cristalli dotati entrambi di asimmetria, di cui l'una ricordava quelli del tartrato destrogiro, e l'altro quelli del tartrato levogiro che si ricava dal succo di uva (ac. levoracemico). In tal modo per selezione manuale separò l'un sale dall'altro, non senza grande meraviglia dello stesso MITSCHERLICH; nel presentarlo al quale alcun tempo dopo Biot disse a PASTEUR: « voi potete vantarvi di aver fatto qualcosa di grande, trovando ciò che è sfuggito ad un uomo come questi. »

Parecchi anni appresso, stando a Lilla, PASTEUR ebbe contezza della osservazione di un fabbricante di prodotti chimici, che l'impuro tartrato di calcio del commercio, quando è commisto a materie organiche e sciolto nell'acqua, col calore dell'està fermenta e si corrompe. Questo fatto eccitò la curiosità del PASTEUR; e preparata una limpida soluzione di tartrato ammonico puro, vi aggiunse una piccola quantità di sostanza albuminoide e l'abbandonò in una stufa. Vide il liquido dopo breve tempo interbidarsi, e l'interbidamento essere dovuto allo sviluppo di un fungo microscopico. Ripeté allora l'esperimento col paratartrato. Il risultato fu il medesimo, ma con la particolarità che

il liquido, primitivamente inattivo, acquistò man mano un potere di rotazione a sinistra, fino a raggiungere un massimo. A questo punto la fermentazione cessò, e il liquido non conteneva che solo tartrato levogiro: il destrogiro era stato impiegato a fabbricare i tessuti della pianta microscopica. Così avevasi la più bella conferma della precedente scoperta; e con questo ingegnoso esperimento PASTEUR donava alla chimica un nuovo processo per la preparazione dell'acido levoracemico, fondato sul meccanismo di una fermentazione.

Come ognuno vede, rivelasi fin da questi primi lavori la tendenza del PASTEUR allo studio di quella chimica biologica, ch'egli doveva tanto illustrare. Il fatto della scomposizione del paratartrato d'ammonio, sotto l'influenza della vita di un fungo microscopico, maturò in lui il convincimento, intervenire in tutte le fermentazioni un fenomeno di ordine biologico. E sollecitato dal pensiero di giovare alle patrie industrie, si dette senz'altro allo studio delle fermentazioni; ad esso ben presto riunì quello della generazione spontanea, rispondendo ad un concorso bandito dall'Accademia delle Scienze; e si aprì per tal modo la via ad una serie di lavori immortali, che sono la pietra angolare sopra cui via via doveva innalzarsi l'edificio della moderna microbiologia.

Dopo le ingegnose esperienze di SCHWANN e quelle di SCHROEDER e v. DUSCH, restava, come si disse, a dimostrare in maniera obbiettiva nell'aria atmosferica, e propriamente nel suo pulviscolo, la presenza di germi di organismi viventi, del genere di quelli che popolano le infusioni organiche abbandonate alla corruzione. PASTEUR ebbe la felice idea di filtrare l'aria, non attraverso il cotone comune,

ma attraverso il cotone fulminante, che è una sostanza solubile nell'etere. Così gli era dato di esaminare al microscopio il deposito della soluzione eterea di cotone, dove rinvenne una infinità di forme svariate di organismi inferiori.

Ma ciò non bastava; poichè occorreva provare altresì, che le medesime particelle microscopiche trattenute sul filtro fossero capaci di agire da fermento, quando si seminano in un liquido acconcio conservato alla maniera di APPERT. La quale cosa non mancò di fare il PASTEUR con variare le condizioni dell'esperimento, non potendo servirsi del residuo eterico di cotone, dove i germi atmosferici conservano bensì la loro forma, ma restano paralizzati nell'attività proligera. All'uopo controllò dapprima le esperienze di SCHWANN: poscia istituì una lunga serie di innesti con cotone comune infetto di pulviscolo sopra le più diverse soluzioni organiche; le quali, ricevute in palloncini di vetro, venivano previamente bollite per toglier via i germi, venivano cioè *sterilizzate* secondo l'espressione introdotta dallo stesso PASTEUR, e poscia chiuse alla lampada. Al momento dell'esperimento si rompeva il collo dei singoli palloncini, e con un po' di destrezza si faceva discendere nel liquido il cotone infetto, chiudendo nuovamente alla lampada. Per la speciale disposizione dell'apparecchio nuova aria non poteva penetrare nel pallone, se non passando per un apposito tubo di vetro incandescente, ove si sterilizzava.

Il risultato delle esperienze fu sempre il medesimo e decisivo: i palloni seminati s'intorbidavano dopo qualche tempo, dando luogo a svariate vegetazioni ed a fenomeni di fermentazione; mentre altri palloni di controllo, non tocchi in alcun modo o seminati con cotone sterilizzato al calore, con-

servavano indefinitamente la loro limpidezza. — Ho visto testè a Parigi figurare in una esposizione di igiene alcuni palloncini di questa immortale esperienza, dove i liquidi si mantengono tuttavia inalterati, e dove dopo più che 25 anni non è stata possibile alcuna spontanea generazione di esseri.

Il lavoro del PASTEUR contiene altresì un gran numero di altre istruttive esperienze circa la limitata facoltà infettante delle piccole quantità di aria, e circa la varia ricchezza di essa in germi, secondo che si raccoglie per mo' d'esempio in una caserma, ovvero all'aperta campagna o sulla sommità di un monte. Così PASTEUR dimostrò, che di 20 de'suoi palloncini aperti sopra di un monte a 2000 m. sul livello del mare, uno solo dette luogo a intorbidamento, restando gli altri assolutamente sterili. E così provò pure, che può mantenersi un pallone indefinitamente limpido comunque aperto all'aria, purchè abbia l'orifizio zaffato di cotone, oppure sia munito di lungo collo ripiegato in basso o ripetutamente e in vario senso contorto, specie se fatto di tubo capillare. Chiaro è, che stando i germi dell'aria nel pulviscolo, questo suole depositarsi secondo la linea di gravità (1), e viene

(1) A conferma di questa legge, piacemi citare una curiosa esperienza, tra le molte da me fatte nelle mie prime esercitazioni di batteriologia. Avendo osservato, che non ha luogo sviluppo di microrganismi in una provetta contenente gelatina nutritiva disposta a lungo becco di flauto (*dm*), se la si espone all'aria in posizione inclinata ed al riparo dalle correnti; mi proposi di determinare se per avventura esiste un *angolo limite*. All'uopo fissai sopra un quadrante (V. Fig. 1, schematica) una serie di tubi con la superficie libera della gelatina rivolta nel medesimo verso, di cui il primo era disposto verticalmente, l'ultimo in senso orizzontale e gl'intermedii a diverso angolo d'inclinazione. Posto il sistema in un sito riparato, si tolsero via con le volute cautele i turaccioli di cotone a ciascun tubo. Dopo parecchi giorni si trovò sviluppo di colonie di microrganismi su tutta l'estensione della gelatina del primo tubo;

facilmente trattenuto nelle ripiegature e nelle prime porzioni di un tubo di lume ristretto.

In breve il lavoro del PASTEUR stabilisce sopra base incrollabile il principio; che nell'aria atmosferica si contiene in quantità variabile un *quid vivum*, rappresentato da particelle microscopiche capaci di essere trattenute da un filtro e distrutte dal calore o da agenti disorganizzanti, e che seminate in un liquido adatto si moltiplicano all'infinito, riproducendovi le stesse metamorfosi che esso subirebbe esposto liberamente all'aria.

Con ciò per altro non poteva dirsi interamente vinta la battaglia contro gli eterogenisti, tra cui primeggiava il ROUCHET. Dappoichè, sebbene il PASTEUR s'ingegnasse a far vedere in tutte le loro espe-

e mentre la maggior parte degli altri si conservavano sterili, il 2°, il 3° e qualche volta il 4° presentavano inquinamento della gelatina per tratti successivamente più brevi, e sempre in prossimità dell'orifizio. Analizzando meglio il fenomeno, si poteva vedere, come in ciascuna di queste provette lo sviluppo delle colonie avea luogo per un tratto (nm) della superficie libera della gelatina, limitata dal piede della perpendicolare (an) abbassata dal punto più elevato dell'orifizio, rappresentando per così dire la proiezione dell'orifizio medesimo. La qual cosa dimostra, che il fatto avviene nelle identiche condizioni che nella provetta disposta verticalmente; e la legge della deposizione de' germi atmosferici secondo la linea di gravità, resta confermata dall'apparente eccezione dei tubi ad angolo. La legge è soddisfatta pienamente entro certi limiti d'ampiezza del lume delle provette, e sempre che queste abbiano l'altro estremo chiuso; poichè, se vi si pratica un forellino, bastano le semplici oscillazioni della temperatura ambiente per determinare delle lievi correnti nell'interno dei tubi, e manca allora la condizione essenziale dell'esperimento, che, come si disse, riesce nell'aria calma.

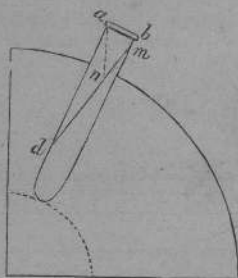


Fig. 1.

rienze il lato debole, con una perspicacia d'intuito veramente eccezionale; restava però sempre una obbiezione a fare, quella stessa per cui il NEEDHAM soleva rimproverare al suo contraddittore, lo SPALLANZANI, ch' egli *metteva le infusioni alla tortura*. Poteva cioè sempre obbiettarsi, che l'alta temperatura a cui si sottopongono i liquidi in esperimenti per renderli sterili, e la quale per alcuni di essi deve spingersi al di là di 100°, affievolisce o spegne addirittura la *forza vegetativa* delle sostanze organiche delle infusioni.

PASTEUR tolse di mezzo quest' altra difficoltà dimostrando, che liquidi alterabilissimi, come il sangue e l'urina, possono conservarsi indefinitamente sterili; se si ha l'accortezza di farli passare direttamente dalle loro cavità naturali in recipienti di vetro già purificati al calore. Dopo un' esperienza così dimostrativa, gli eterogenisti non trovavano più a ridire.

Non così LIEBIG e tutti i seguaci della sua seducente teorica delle fermentazioni. Queste, diceva LIEBIG, sono regolate da una legge comune, di compiersi cioè in presenza di una sostanza organica azotata in via di scomposizione; la quale agisce da fermento, comunicando il suo movimento di scomposizione ai liquidi fermentescibili, sostanze di una grande labilità chimica. Il lievito di birra provoca la distruzione dello zucchero, perchè esso medesimo è in via di distruzione: il lievito non fa che corrompersi, e promuovere intorno a sè, oltre la scomposizione dello zucchero, un deposito della materia organica del mosto sotto una forma uguale alla sua.

Un esperimento ben fatto doveva trionfare di questa difficoltà, e dar l'ultimo colpo alla teorica di

LIEBIG, come era accaduto per la generazione spontanea. Se tutto il segreto della fermentazione dello zucchero, disse tra sè PASTEUR, sta in cotesta sostanza organica del mosto, togliamola di mezzo, fabbricando un materiale fermentescibile con zucchero ed elementi minerali. E, preparata una soluzione di puro glucosio, vi aggiunse una piccola quantità d'un sale d'ammonio cristallizzabile, non che del fosfato di magnesio e di potassio. In questo liquido seminò una quantità imponderabile di lievito, e mise il tutto a lieve calore. Si ebbe una fermentazione regolarissima in tutto simile a quella del mosto d'uva, e dove la scomposizione dello zucchero, e quindi lo sviluppo dell'acido carbonico, seguiva passo passo la vegetazione dei globuli del lievito; il quale in luogo di decomporsi e distruggersi, a sensi della teorica di LIEBIG, aumentava di peso, da potersene alla fine raccogliere una quantità 20-30 volte maggiore.

Del pari era noto, che l'acqua alcoolizzata non va mai all'acido, se non vi si aggiunge un po' di materia albuminoide, a cui LIEBIG attribuiva la parte di fermento. PASTEUR, per contrario, partendo dal principio che la materia albuminoide servisse come alimento azotato, indispensabile per lo sviluppo di un piccolo fungo microscopico, il *mycoderma aceti* (volgarmente *madre dell'aceto*), e che a questo si dovesse la proprietà di fissare l'ossigeno dell'aria sull'alcool per convertirlo in acido acetico, riuscì a produrre l'acetificazione dell'acqua alcoolizzata, rimpiazzando la materia albuminoide con principii minerali, tra cui un sale d'ammonio destinato a fornire l'azoto, senza di che i microrganismi non pullulano.

E studiando, più accuratamente che per lo innanzi non si era fatto, i prodotti della fermenta-

zione alcoolica, PASTEUR riuscì a meglio determinare il meccanismo del processo. Egli poté dimostrare, che una parte del glucosio sfugge all'equazione stabilita dal LAVOISIER; e che per giunta essa è tale, da non integrare neppure la tenue proporzione di altri prodotti secondarii rimasti fin allora sconosciuti, come la glicerina, l'acido succinico ecc.; di modo che devesi pensare, che una certa quota dello zucchero è impiegato alla fabbricazione dei nuovi globuli di lievito. È solo a questo modo che poteva immaginarsi la fermentazione come un effetto della vita del lievito, attraverso il ricambio materiale dei globuli di LEUWENHOECK: così la teorica vitale delle fermentazioni appariva in tutta la sua luce; e laddove LAVOISIER credeva aver risoluto un problema di chimica, il PASTEUR elevò un problema fisiologico più complesso e delicato, ma di gran lunga più bello e fecondo.

Simultaneamente alla fermentazione alcoolica PASTEUR studiò quella lattica, dimostrando la parte attiva che in essa prende un microbio ancora più piccolo del fermento alcoolico, che nessuno prima di lui era riuscito a vedere, e ch'egli poté coltivare in altri liquidi nutritivi, come soluzioni zuccherine, soluzioni di lievito di birra, ecc. Similmente studiò la fermentazione acetica e butirica, la fermentazione ammoniacale dell'urina; ed ogni nuovo trovato era la conferma del principio, che ciascuna di queste fermentazioni ha il suo fermento specifico rappresentato da funghi microscopici di varia forma, i quali, nutrendosi e moltiplicandosi a spese della materia fermentescibile, ne determinano la rottura dell'equilibrio molecolare, per cui essa si risolve in prodotti via via più semplici.

Studiò infine la più complessa delle fermentazioni, ossia la putrefazione dei resti animali e vegetali; e dimostrò nella maniera più manifesta, come tutte quelle svariatissime forme viventi infinitesimali, che una volta credevansi nascere dagli elementi della materia organica in preda a corruzione, siano invece la immediata cagione di questa; avvicinandosi le singole specie nei diversi prodotti, via via che questi diventano più semplici, finchè non li abbiano riportati agli elementi formatori della molecola organica, acqua, acido carbonico e ammoniaca.

Forte di questi studii, per i quali era rimosso, in molti problemi di chimica, il mistero di una forza catalitica, PASTEUR rivolse la sua mente alle svariate alterazioni, cui vanno soggette le bevande alcoliche e soprattutto il vino e la birra. L'analogia di esse con i varii processi di fermentazione era troppo manifesta, da valere veramente la pena di cercarvi ancora una conferma alle sue vedute. E intraprese questo studio tanto più volentieri, sapendo di giovare altresì alla pratica, se per avventura gli venisse fatto di trovare un mezzo diagnostico differenziale tra le malattie e le sofisticazioni.

E qui pure trovò in gioco la forza altamente modificatrice de'germi-fermenti. « Le malattie del « vino, PASTEUR conchiude (1), sono dovute alla « vegetazione di parassiti microscopici, che trovano in esso condizioni favorevoli al loro sviluppo, e che l'alterano vuoi sottraendo ciò che « abbisogna alla propria nutrizione, vuoi dando « origine a prodotti nuovi che sono effetto della

(1) PASTEUR, *Études sur le vin*, 1866.

« moltiplicazione di questi parassiti nella massa « del vino ». Ciascuna malattia ha il suo speciale microbio; donde un facile mezzo di riconoscerla con l'esame microscopico, sia per distinguerla da una possibile adulterazione, sia per apportarvi gli opportuni rimedii, cui PASTEUR non manca di suggerire in ciascun caso, guidato sempre dal proposito di fare la scienza per la pratica.

Lo studio delle fermentazioni e delle malattie dei vini porse intanto l'addentellato a mettere in evidenza la diversa morfologia dei microbi, non che una condizione biologica de' medesimi, che oggidì va tenuta presente in ogni ricerca batteriologica.

Ne' diversi processi fermentativi, oltre la forma dei globuli del lievito, piuttosto grandi, rotondi o ovalari, nucleati e che si riproducono per gemmazione, PASTEUR trovò microbi rotondi, ma assai più piccoli (*micrococchi*) che si moltiplicano per scissione, dando luogo alle forme di 8 in cifra (*diplococchi*) o di lunghe coroncine (*streptococchi*); non che microbi a guisa di corti bastoncelli mobili (*bacterium*), o di filamenti più lunghi dritti o tortuosi (*bacilli*, *vibrioni*, *spirilli*), nei quali la riproduzione si fa non che per segmentazione, ma altresì per spore. Di più, mentre la maggior parte di questi microbi vegetano in presenza dell'ossigeno dell'aria, PASTEUR ne trovò alcuni, come il fermento butirrico, i quali (tuttochè bisognosi di quel principio cui sottraggono al loro terreno di coltura) non sviluppano o hanno vita stentata in presenza dell'ossigeno libero, e bisogna coltivarli nel vuoto o nell'acido carbonico. Di qui una generale divisione dei microbi data dal PASTEUR in *aerobi* e *anaerobi*; distinzione importantissima,

non che dal lato scientifico ma dal punto di vista tecnico, potendo l'esito negativo d'una ricerca batteriologica dipendere esclusivamente dall'aver trascurato la pratica necessaria per la coltura dei germi anaerobi.

Le molteplici e svariate esperienze messe in campo dal PASTEUR, in tutti questi suoi lavori, sono il fondamento dell'attuale tecnica batteriologica. Da esse abbiamo la prima idea della coltivazione de'microbi sopra substrati nutritivi artificiali; la quale, semplificando le condizioni dello esperimento e permettendo di variarle a seconda del bisogno, riesce il mezzo più sicuro di raccapezzarsi in mezzo agl'intrigati problemi naturali, che si complicano alla vita degl'infinitamente piccoli. Dobbiamo a PASTEUR la conoscenza dei bisogni nutritivi de'medesimi, e quindi de'criterii che devono guidare alla composizione dei diversi materiali di coltura. Egli per primo ci ha appreso le innumerevoli cause di errore che circondano questo genere di ricerche, e il modo di evitarle; quindi la previa sterilizzazione dei recipienti che devono ricevere un liquido di coltura, la sterilizzazione degli strumenti che devono venire a contatto con esso, la posizione più opportuna da dare ad un palloncino che si apre all'aria e via via dicendo.

Ma la tecnica batteriologica, quale oggi la possediamo, segna un reale progresso della scienza e dell'arte di sperimentare, grazie alla contribuzione di molti altri illustri ricercatori; i quali, attratti dalla novità e dall'importanza delle scoperte del PASTEUR, han fatto sì, che la microbiologia divenisse giovane quasi sul nascere. E la parte principalissima di cotesto progresso devesi

all'insigne naturalista alemanno, il Koch; il quale, con i suoi metodi di coltivazione sopra substrati solidi o solidificabili, ha risoluto il problema di potersi procedere con sicurezza d'esito alla *coltura isolata* delle singole specie batteriche, e di cercare un prezioso mezzo di classificazione e di diagnosi nell'aspetto macroscopico e microscopico dei loro naturali aggruppamenti in colonie.

Allorchè si semina un terreno di coltura liquido con un materiale batterifero complesso, per es. con una goccia di acqua stagnante; accade d'ordinario, che se non tutti, moltissimi dei germi in essa contenuti vi trovano favorevoli condizioni di esistenza, e si sviluppano di conserva. Allora i batteri più mobili si sparpagliano nella massa del liquido, si frammischiano a quelli immobili assembrati in piccole colonie natanti, e li travolgono nei loro vivaci movimenti. Stando così le cose, come fissare la specie che si vuol fare oggetto di studio?

In nessun ordine di esseri la lotta della vita è così meravigliosamente rappresentata come tra gl'infinitamente piccoli; e per essa può bene succedere, che una specie prenda il sopravvento e resti sola padrona del campo, o per ragion di numero, o perchè trova condizioni favorevoli speciali, o perchè il suo ricambio materiale dà luogo a prodotti tossici per le altre specie. In uno di questi modi avviene tal fiata, che una specie prevale di numero a tal segno, che seminando un secondo liquido dal primo, dal secondo un terzo e così via via, si perviene ad ottenerla in coltura isolata.

Or la tecnica batteriologica mette a profitto la lotta della vita per lo scopo della separazione delle specie. Ed il segreto sta nel favorire lo svi-

luppo di questa o quella, facendole arma di difesa ora del grado della temperatura, ora della composizione e reazione del mezzo, ora del contatto dell'aria, ora della precocità dello sviluppo e via via dicendo. Ma come ognuno vede, questo non è il più facile problema a risolvere; e mal si riesce allo scopo senza un grande tatto sperimentale, e se non partesi da un materiale batterifero relativamente semplice, dove predomini la specie che si vuol fare oggetto di studio.

Invece, se quella goccia di acqua si semina, a mo' di esempio, sopra una mezza patata cotta, avendo cura di distenderla il meglio possibile sulla superficie del taglio; facilmente avviene che i singoli germi capitano in punti differenti, dove possono svilupparsi l'uno separatamente dall'altro. E si può far meglio ancora. Si sciolga in un liquido nutritivo una certa quantità di gelatina, sicchè ne risulti un materiale trasparente e solido a temperatura ordinaria, ma fusibile a circa 30° C.: si hanno così le *gelatine nutritive* del KOCH, la quale forma si può dare ai più diversi materiali di coltura, come brodo di carne, siero di sangue, estratto di Liebig, infuso di fieno, urina ecc. Or se la goccia di acqua da esaminare si rimescola ben bene con una determinata quantità di una di queste gelatine convenientemente sterilizzate, e il miscuglio si distende sopra di una lastra di vetro già purificata al calore, operando in modo che prestamente il liquido si rapprenda; i singoli germi resteranno sparpagliati qua e là, e perciò messi in condizione di riprodursi l'uno indipendentemente dall'altro.

Son questi i punti essenziali della tecnica del KOCH, la quale messa in pratica ha rivelato un altro importante pregio. Ha fatto cioè vedere,

che i singoli aggruppamenti o, come dicesi, *colonie* di microrganismi spesso presentano un abito speciale e magari affatto caratteristico; di modo che l'aspetto macroscopico e microscopico della colonia acquista valore d'un carattere botanico di differenziazione de' più definiti e de' meglio controllabili.

La tecnica batteriologica, quale è sorta nelle mani del PASTEUR, ha i suoi grandi pregi, ed ha dato prova di sè luminosissima ne' tanti lavori onde questo sommo ha arricchito la scienza. Nelle mani del KOCH essa è divenuta un metodo nello stretto senso della parola, è stata cioè sottratta all'esclusivismo d'una grande attitudine tecnica; senza di che sarebbe rimasta specialità di pochi, e mancherebbe alla scienza il contributo che oggi largamente riceve da ogni parte.

II.

Pasteur e le Malattie a microbi.

SOMMARIO. — I microbi nel corpo animale. — La scoperta di Davaine. — Le malattie dei bachi da seta. — Carbonchio e Settice-mia. — Microbi patogeni e loro meccanismo d'azione. — Prova della natura microbica dei virus.

Nella lotta contro l'eterogenesi PASTEUR, come abbbiam visto, aveva messo in luce il fatto importantissimo: che, in condizione di sanità, il corpo degli animali è chiuso a qualsiasi penetrazione di germi dal mondo esterno; di modo che il sangue e l'urina, estratti dai loro naturali serbatoi al riparo dai pulviscoli atmosferici, possono conservarsi indefinitamente imputrescibili dentro recipienti sterilizzati.

Questa osservazione, sanzionata da numerosi esperimenti di altri ricercatori, è divenuta il credo della moderna fisiologia. Ne' tessuti del corpo animale, e nei liquidi di cavità chiuse all'aria, l'esame batterioscopico più scrupoloso dà risultato assolutamente negativo (1), o che si faccia durante la vita, o che s'istituisca sul cadavere avanti l'inizio della putrefazione. Per contrario si trovano numerose vegetazioni batteriche sui comuni tegu-

(1) Dico *esame batterioscopico*, perchè la semplice indagine microscopica ha recentemente, nelle mani dell'illustre prof. BIZZOZERO, rivelato la presenza costante di batteri in condizioni fisiologiche dentro i follicoli linfatici dell'intestino del coniglio (V. *Archivio per le scienze mediche*, fascicolo 4° 1886). La medesima osservazione è stata fatta breve tempo dopo da RIBBERT in Germania. Però le ricerche all'uopo istituite dal mio compagno di lavoro Dott. MANFREDI, mercè la coltivazione artificiale, dimostrano trattarsi di batteri privi di vita, essendosi mostrati inetti a fecondare diversi substrati nutritivi (V. *Giornale internazionale delle scienze mediche*, Fascicolo 4°, Napoli 1886).

menti, in tutto il tubo alimentare dalla bocca all'ano, nelle vie respiratorie, nella vagina; in tutte quelle parti insomma che hanno più o meno immediato rapporto con l'esterno, e dove generalmente vivono a spese de' rifiuti dell'economia animale, come sevo cutaneo, epiteli sfaldati, muco, avanzi del lavoro digestivo ecc. La presenza di microbi nella compagine dei tessuti vivi implicherebbe l'idea di una lotta con gli elementi cellulari, i quali dovrebbero per lo meno far parte ad essi del proprio nutrimento: non si saprebbe quindi concepire, senza un qualche detrimento della loro attività nutritiva, formativa o funzionale, senza cioè uno stato di malattia.

Epperò il fatto messo in luce dal PASTEUR (1863) non poteva non richiamare il DAVAINE sopra di una osservazione, fatta parecchi anni prima con RAYER (1851), e confermata poi in Germania da POLLENDER e BRAUEL (1855-1857), della esistenza cioè di piccoli filamenti microscopici nel sangue degli animali carbonchiosi, che avevano grande rassomiglianza con i microbi descritti dal PASTEUR nella fermentazione butirica, e che DAVAINE chiamò col nome di *bacteridi*. La presenza di essi nel sangue di un animale malato, e per giunta di una malattia contagiosa, dopo l'esperimento del PASTEUR menava naturalmente a pensare, che dovessero avere qualche parte nella genesi della infezione. Ma chi a quel tempo avrebbe mai osato di pronunciarsi per una relazione di causa ad effetto, per l'idea cioè di una lotta tra un essere pressochè invisibile e un organismo come quello di un montone o di un bue? La scienza non era peranco matura da consentire un'ipotesi cotanto ardita; e bisognava attendere che PASTEUR, rivelando

un altro lato, così del suo ingegno, come della prodigiosa attività degl'infinitamente piccoli, allargasse i confini della batteriologia ed inaugurasse un'era novella per l'etiologia de' morbi, per la terapia e per l'igiene.

Aveva egli da poco dato termine allo studio delle fermentazioni, quando la sua attenzione fu attratta verso un grande infortunio, che, sullo scorcio della prima metà di questo secolo, colpì la industria della seta, e che nel 1865 minacciava di estinguere addirittura una delle più cospicue fonti della ricchezza nazionale. Trattavasi di una malattia conosciuta col nome di *pebrina*, endemica ed epidemica, contagiosa ed ereditaria; per la quale si vedevano in pochi giorni annientate le più belle partite di bachi, morendo questi nella massima parte consunti, atrofici. Questa malattia, seguendo il commercio del seme, si era man mano diffusa in tutta Europa e in Asia, sicchè al tempo che PASTEUR prese a studiarla restava solo incolume il Giappone.

Un naturalista milanese, il CORNALIA, aveva intraveduto una certa relazione di questa malattia con alcuni corpuscoli microscopici di forma ovale, molto refrangenti e dotati di vivace movimento vibratorio, i quali si rinvenivano nei tessuti de' bachi pebrinosi in qualsiasi fase della loro vita, e perfino nell'interno delle uova: si dicevano allora *corpuscoli vibranti*; oggi vanno col nome di *corpuscoli del Cornalia*. Ma a parte l'importanza diagnostica di tale conoscenza, che il dott. VIRTADINI utilizzava alla selezione del seme sano, nessuno avea ancora fornito la pruova che si avesse a fare con una malattia parassitaria; e, ciò che massimamente interessava, nessuno avea ancora dato

una spiegazione sufficiente del suo modo d'insorgere, di diffondersi e perpetuarsi, donde si potesse trarre qualche utile ammaestramento profilattico.

PASTEUR cercò innanzi tutto di assicurarsi, che i corpuscoli vibranti fossero realmente un elemento estraneo al baco da seta, dimostrando, che nel prodotto di un allevamento fatto con le massime cautele da un seme sanissimo, il bruco, la crisalide, la farfalla e le uova ne sono assolutamente scvri. Poscia dette a mangiare a bachi sani della foglia mescolata con bachi pebrinosi triturati, e li vide cader malati e morire della stessa maniera. Riuscì pure a riprodurre la malattia, pungendo i bachi con un ago intriso di materia pebrinosa.

Con tali esperimenti il valore patogenico dei corpuscoli era messo fuori dubbio. Ed avendoli rinvenuti in gran numero nelle deiezioni, era facile pensare, che la contaminazione della foglia, aggiunta alle punture che i bachi si fanno tra loro, costituisse una causa perenne di contagio. L'ereditarietà era spiegata per la facile infezione delle uova, potendo la malattia svilupparsi durante e dopo la formazione del bozzolo; e non dovea più far meraviglia, se il seme proveniente da una buona partita potesse non dare alcuna raccolta nell'allevamento consecutivo. PASTEUR inoltre dimostrò, che i corpuscoli incistati nelle uova sono l'unico mezzo per cui il morbo si perpetua da un anno all'altro; stantechè quelli abbandonati nel pulviscono delle bigattiere prontamente muoiono. Onde si traeva l'utile ammaestramento, che la malattia sarebbe interamente scomparsa il giorno, in cui per tutto il mondo si allevasse del seme sano. E sa ognuno, quanto il noto *sistema Pasteur* (1) per il

(1) Consiste, per chi nol sappia, nel delimitare esattamente le zone di deposizione delle uova ai singoli bachi. Avvenuto

confezionamento del seme sano, abbia contribuito a risollevar la morente industria della seta.

La pebrina forniva così un esempio dello intervento degl'infinitamente piccoli nella genesi della malattia, tuttochè non si sapesse a quale classe di esseri riportare i corpuscoli vibranti, che oggidì il BALBIANI vorrebbe mettere nel gruppo degli *Sporozoari*.

Studiando la pebrina, PASTEUR ebbe occasione di scoprire una seconda malattia del filugello; la quale, perchè compariva di solito in singoli individui, era rimasta confusa con la prima. I bachi che ne vengono colpiti cessano di mangiare, abbandonano la foglia, son presi da una specie di torpore e muoiono conservando le apparenze della vita: bisogna toccarli per conoscere che sono morti; e si ha una sensazione di molle, donde deriva il nome di *flaccidezza* dato alla malattia.

PASTEUR, sezionando di questi bachi, trovò il tubo alimentare fortemente disteso da una grande quantità di detrito di foglia non digerita, ed in mezzo ad esso una infinità di batteri, del tutto simili

l'accoppiamento delle farfalle, il coltivatore distacca le femine dai maschi, e mette le prime separatamente l'una dall'altra sopra pannolini tesi orizzontalmente. Dopo la deposizione delle uova, s'immobilizza ciascuna femina mercè uno spillo in una ripiegatura del pannolino, di modo che restino delimitate le uova spettanti alle singole farfalle. A suo tempo poi si fa lo esame microscopico di queste, pestandole in un mortaio e stemperandole in acqua, per rendersi conto quali sono le zone da prescegliere per l'allevamento consecutivo, e quali da scartare come infette e dare alle fiamme. Notisi l'analogia di un tal modo di procedere con la coltura d'isolamento, che sogliamo fare dei microbi sulle placche di gelatina (v. pag. 17); e come questa ci dà la netta separazione delle singole specie batteriche, così il *sistema Pasteur* fa la selezione del seme sano assai più sicuramente, che non si ottenga con l'esame microscopico delle uova.

a quelli che si sviluppano nella foglia del gelso messa a macerare nell'acqua. Ciò naturalmente lo condusse a ricercare il contenuto intestinale dei bachi sani; e non trovandovi batteri di sorta o pochissimi, concepì che la malattia stesse in rapporto con un'abnorme fermentazione della foglia entro gli organi digerenti, occasionata da inerzia funzionale dei medesimi. Tale ipotesi era altresì appoggiata dal fatto, che la malattia suole manifestarsi più specialmente nell'ultima età del verme, ossia durante quel periodo di voracità prodigiosa che precede la inramatura.

L'esperimento doveva decidere; e, somministrando a bachi sani della foglia contaminata col contenuto intestinale di bachi malati, ovvero della foglia in via di fermentazione, riuscì a riprodurre la flaccidezza. L'effetto era il medesimo, se alla foglia si mescolava il pulviscolo di una bi-gattiera infettata l'anno precedente. Si aveva per tanto, come nella pebrina, una causa di contagio nella contaminazione della foglia da parte degli escrementi; ma l'insorgere del morbo era ben diverso. Poteva cioè attribuirsi ora alla cattiva qualità della foglia, ora a cattive condizioni igieniche che finissero per affievolire la resistenza organica del baco e ne rendessero la digestione languida; ora finalmente la moria avea radice in quella dell'anno precedente. E questo terzo momento patogenetico avea una duplice interpretazione. Innanzi tutto la flaccidezza presenta il carattere dell'ereditarietà; poichè sono singole partite di bachi che ne vengono di preferenza colpite. Accade cioè che, non essendo la malattia assolutamente mortale, molti bachi arrivano a formare il bozzolo o a deporre le uova: però queste, nate da parenti affievoliti, daranno l'anno appresso una generazione di bachi

minacciata dalla flaccidezza. Cosicchè si eredita, non la malattia in germe, come nella pebrina; ma quella debolezza costituzionale, per cui in patologia umana sogliamo dire, che da genitori tubercolotici nascono dei figli disposti a contrarre la tubercolosi. L'altra maniera di perpetuarsi della flaccidezza è dovuta alla persistenza del germe alle cause di distruzione, ciò che permetteva al PASTEUR di riprodurla sperimentalmente, mescolando alla foglia il pulviscolo d'una bigattiera infettata l'anno precedente. Dei microbi trovati nel contenuto intestinale dei bachi flaccidi, colpì soprattutto l'attenzione del PASTEUR una forma di vibrione, che sembrava avesse la parte principale alla genesi della malattia. Or questo vibrione al pari del fermento butirico può riprodursi, oltre che per scissione trasversale, per spore; le quali hanno una grande resistenza di vita, e possono per anni conservare l'attitudine a germinare, date le condizioni favorevoli. Ecco il segreto per cui la malattia si perpetua; e di qui, come dalle altre conoscenze, tutta una serie di utili suggerimenti profilattici, che dettero al PASTEUR di trionfare della flaccidezza, così come avea fatto della pebrina.

Dopo queste importanti rivelazioni, doveva sembrare meno ardita la concezione del DAVANE, che i batterii da lui trovati nel sangue degli animali carbonchiosi fossero la vera causa della virulenza di esso. Già s'aveva la conoscenza di fatti analoghi nel mondo vegetale, essendo dimostrato che la ruggine e la golpe delle biade son dovute a infestazioni di speciali funghi microscopici. E i successi che veniva ottenendo la chirurgia con la medicatura antisettica delle ferite, ispirata all'immortale LISTER dai lavori del PASTEUR e del TYN-

DALL' sui germi atmosferici, contribuivano la loro parte a preparare la via alla moderna teorica delle malattie infettive, che incarna l'indefinito *quid vivum* degli antichi nella nozione dei *batterî patogeni*.

DAVAINE aveva dimostrato, che se s'inocula sotto la pelle di un animale sano una quantità impercettibile di sangue carbonchioso, esso muore sicuramente di carbonchio, presentando moltiplicati all'indefinito i pochi batteridi, che potevano essere contenuti nel materiale d'innesto. E ROBERTO KOCH in Germania già spiegava il modo d'insorgere e di perpetuarsi delle epidemie carbonchiose, guidato dalla osservazione, che i batteridi di DAVAINÉ, al pari del vibrione della flaccidenza, presentano una fase sporifica, dalla quale rinascono a forma di filamenti, quando si coltivano nel siero o nell'umore acqueo (1876). Ma non si era per anco fornita una prova diretta, che la virulenza del sangue carbonchioso fosse legata alla presenza de' batteridi. Le esperienze del DAVAINÉ mettevano fuori dubbio la esistenza di un virus; ma questo poteva essere rappresentato da qualche cosa altro, tanto più che alcune osservazioni di PAOLO BERT e di LEPLAT e JAILLARD accreditavano la possibilità di inoculazioni carbonchiose mortali senza batteridi, capaci di continuarsi in serie indefinita.

La soluzione del problema fu data dal PASTEUR, con una esperienza decisiva, non dissimile da quella con cui aveva abbattuto la teorica di LIEBIG (1). PASTEUR vide subito, potersi togliere di mezzo ogni difficoltà, isolando i batteridi dal sangue. All'uopo innestò una minima quantità di sangue carbonchioso nell'urina neutra, previamente

(1) V. Compt. rend. Acad. des sc., 30 avril 1877.

sterilizzata, dove i batteridi dopo poche ore si moltiplicarono in maniera prodigiosa. Quindi dal primo liquido prese l'innesto per un secondo, da questo per un terzo, e così via via un gran numero di volte. Così facendo chiaro era, che se nella originale particella di sangue ci fosse stato alcunchè di diverso dai batteridi a cui attribuire la virulenza, questa per il frazionamento si sarebbe dovuto prestamente esaurire, e i prodotti dell'ultima coltura avrebbero potuto impunemente inocularsi agli animali. Invece PASTEUR trovò ciascun termine della serie di colture virulento al pari del sangue carbonchioso; la virulenza quindi doveva attribuirsi all'unico elemento che in esso si perenna, ai batteridi di DAVAINE. Ed a rimuovere il dubbio che questi o il sangue carbonchioso potessero portare con sé una sostanza diastastica solubile, aggiunse un'altra prova ancora più diretta. Separò i batteridi dai liquidi di coltura, ovvero dal sangue, mercè la filtrazione meccanica attraverso il gesso; e dimostrò, che mentre la inoculazione del liquido filtrato non produce effetto di sorta, ciò che rimane sul filtro dà agli animali la forma tipica del carbonchio.

Come intanto spiegare i risultati contraddittori delle esperienze di JAILLARD e LEPLAT? — PASTEUR, a cui non erano ignoti i bei lavori di COZE e FELTZ (1866) e dello stesso DAVAINE sulla virulenza dei prodotti della sepsi, aveva notato, che i cadaveri degli animali carbonchiosi vanno rapidamente in putrefazione; cosichè, a capo di 24 ore circa, già il loro sangue contiene oltre dei batteridi il vibrione settico. Avviene di conseguenza, che gli animali inoculati con sangue cosiffatto soccombono alla setticemia, infezione più rapida-

mente mortale, avanti che i microbi carbonchiosi abbiano il tempo di moltiplicarsi. I contraddittori del DAVAINÉ non avevano saputo premunirsi da questa causa d'errore; avevano adoperato il sangue di animali già presi dalla putrefazione, ed era loro sfuggita l'osservazione del vibrione settico, il quale è più facilmente reperibile nella sierosità che avvolge gl'intestini. Il batteride carbonchioso, eminentemente *aerobo*, vince in concorrenza coi corpuscoli rossi del sangue, sottraendo loro l'ossigene; di guisa che il sangue acquista i caratteri dell' asfissia. Questa condizione, mentre ostacola la sporificazione dei batteridi, così come avviene allorchè li si mette in presenza dell' acido carbonico, favorisce grandemente lo sviluppo del vibrione settico, che è un *anaerobo*. E così spiegavasi l'esperienza di PAOLO BERT, come cioè uccidendo i batteridi nel sangue, mercè l'ossigene ad alta pressione, esso riuscisse virulento ed uccidesse gli animali, senza dar luogo a manifestazione batterica. Veramente egli uccideva così i microbi del carbonchio come il vibrione settico; ma non spegneva la vitalità delle spore di questo, che restavano perciò unico agente d'infezione. Del pari spiegavasi un'altra esperienza dovuta al SIGNOL (1875); come cioè asfissando un animale sano, il suo sangue a capo di 16 ore divenisse virulento nelle vene profonde, e con la comparsa di microbi somiglianti ai batteridi di DAVAINÉ, sebbene incapaci di pululare nel sangue degli animali inoculati.

E che la virulenza del sangue in tutti questi esempi contraddittori fosse dovuta al vibrione settico, il PASTEUR lo dimostrò col solito metodo delle colture successive in mezzi nutritivi artificiali. Trattandosi però di un microrganismo anaerobo, che cioè non vive in presenza dell'ossigene libero,

queste colture non potevano essere fatte alla maniera ordinaria, bensì nel vuoto ovvero in presenza dell'acido carbonico. Con tale artificio PASTEUR dimostra nel modo più evidente, che il sangue di un cadavere carbonchioso possiede in primo tempo una sola virulenza, poichè le colture nel vuoto o nell'acido carbonico restano sterili, mentre nelle colture all'aria pullulano i batteridi di DAVAIN; e che per contrario, passate ventiquattr'ore dalla morte, esso possiede una duplice virulenza, valevole a fecondare e l'una e l'altra specie di colture.

Così l'intervento del PASTEUR metteva fine alla lotta suscitata dalla scoperta del DAVAIN, stabilendo sulla base incrollabile di esperienze ben fatte la specificità dei batteridi del carbonchio: nel medesimo tempo spargeva luce nella confusione allora dominante a proposito delle malattie così dette carbonchiose; ed illustrando le belle ricerche di COZE e FELTZ sui prodotti della sepsi, dava esistenza ad un'altra malattia a microbi, la *setticemia acuta sperimentale*.

Da questi studii data l'origine di quel maraviglioso movimento scientifico, a cui si assiste oggidì nel campo dell'etiologia e dell'igiene, e per il quale abbiamo già la prova di fatto della natura microbica di molte altre malattie infettive dell'uomo e degli animali superiori. La storia dell'infezione carbonchiosa è presto completata con i lavori successivi del PASTEUR e con quelli del KOCH, rivolti particolarmente ad indagare le condizioni di vita dei batteridi al di fuori del corpo animale, e la parte che prendono alla loro perpetuazione e disseminazione, da una parte il suolo, le acque, i venti, e dall'altra l'eccezionale resistenza delle spore di essi alle cause di distruzione. Nel giro di

pochi anni, al batteride di DAVAINE, o *Bacillo dell'Antrace* come più comunemente oggi si dice, abbiamo veduto aggiungersi da OBERMEIER lo *Spirillo della Febbre ricorrente*, da KOCH il *Bacillo della Tubercolosi* e il *Vibrione colerigeno*, da FEHLEISEN il *Micrococco dell'Erisipela*, da EBERTH e GAFFKY il *Bacillo della Tifoide*, da FRIEDLAENDER il *Cocco della Pneumonite fibrinosa*, da SCHUETZ e LOEFLEK il *Bacillo della Morva*, ec. La febbrile attività, suscitata dal succedersi di tante scoperte, ha dato vita a malattie batteriche nuove affatto sperimentali, come la *Setticemia* e *Necrosi progressiva del topo* (KOCH), la *Setticemia* e *Piemia sperimentale del coniglio* (KOCH), l'*Edema maligno* del KOCH o *Setticemia acuta sperimentale* del PASTEUR testè ricordata (1). Così man mano all'idea astratta del virus si è sostituita quella concreta del batterio patogeno, il *contagium vivum* è divenuto micrococco o bacillo, e le malattie infettive ricondotte sotto un concetto patologico non nuovo, il *parassitismo*, han preso posto a fianco alla Trichinosi, all'Emauria endemica, all'Anchilostomiasi.

Adunque, accanto ai microrganismi che ci fabbricano la birra e le bevande alcoliche; accanto agl' invisibili *fattori dell'igiene del globo*, come

(1) Tra le malattie microbiche *sperimentali* (sino a novelli studi), devesi oggi registrare anche quella recentemente studiata nel Laboratorio CANTANI dall'egregio mio amico D.r MANFREDI, e che ha per punto di partenza due casi di pneumonite crupale consecutiva a morbillo. Dall'espettorato egli ha isolato in coltura netta, oltre lo pneumococco di Friedländer, un altro micrococco in alto grado patogeno, che su diversi animali e variamente inoculato dà luogo, con sorprendente regolarità, ad una forma di tubercolosi subacuta, con prodotti reinoculabili. L'A. lo ha chiamato *Micrococco dei tinfomi* o *granulomi progressivi* (V. Rendiconto dell' Accad. dei Lincei, Vol. 1, Serie 4^a, 1885).

il DUCLAUX (1) chiama gli agenti della desintegrazione degli avanzi della vita animale e vegetale; accanto ai microbi che, secondo SCHLOESING e MUNTZ, presiedono alla nitrificazione, ed a quelli che conservano la fertilità della terra coltivabile (2), — accanto ai microbi del *bene* abbiamo quelli del *male*, gli agenti delle malattie infettive. E la scienza deve al PASTEUR la prima positiva conoscenza, così del lato buono, come del lato malefico della importanza che gl'infinitamente piccoli hanno nell'economia generale della natura. Dinanzi alla forza dei suoi esperimenti, alla stessa guisa che era caduta, assieme alla teorica di LIEBIG, la generale meraviglia, che la separazione dell'alcool dallo zucchero potesse dipendere dal ricambio materiale dei globuli del lievito; cessava del pari di esistere la meraviglia, che un batterio patogeno potesse trionfare nella lotta con gli animali e con l'uomo.

Donde, si domanda, traggono i batteri tanta forza? Dalla loro stessa piccolezza, per la quale si sottraggono facilmente alla vigilanza di quei poteri fisiologici, che presiedono alla conservazione della vita sana; dalla rapidità con cui le loro file ingrossano all' indefinito; dalla vasta latitudine di adattamento, per cui si fanno veicolo dei mezzi più diversi; dalla loro straordinaria attività modificatrice. Essi non vivono, che alla condizione di scomporre le materie organiche. Questo bisogno è comune altresì agli animali; ma con la note-

(1) *Le Microbe et la Maladie* par E. DUCLAUX, Paris, 1886.

(2) SCHLOESING e MUNTZ, *Nitrification par les ferments organiques* (J. de Chim. et Pharm. 1877). DUCLAUX (*Comptes rendus Ac. des sc.*, 5 Gennaio 1885), opina che la materia organica del suolo, per essere utilizzata dalle piante, deve subire speciali modificazioni per parte dei microbi in esso contenuti. In un suolo scevro di microrganismi non ha luogo la germinazione delle piante.

vole differenza, osserva il DUCLAUX, che un uomo per es. consuma per giorno una quantità di alimento uguale alla cinquantesima parte del suo peso; mentre la *Torula cerevisiae*, ossia il fermento della birra (che non è certo uno dei più attivi), è capace di trasformare in un giorno quattro o cinque volte il suo peso di glucosio.

Una volta impiantati sull'economia vivente, la danneggiano in vario senso secondo la specificità della loro azione. Alcuni funzionano da veri parassiti, nutrendosi e moltiplicandosi a spese dei liquidi e dei gas, che devono servire per gli elementi cellulari tra cui vivono: così il bacillo carbonchioso sottrae l'ossigene ai corpuscoli rossi del sangue, ed uccide perciò asfissiano. Altri combattono corpo a corpo con gli elementi dei tessuti, cacciandosi nell'interno del loro protoplasma e necrotizzandoli, come fa il bacillo tubercolare. Altri finalmente danno origine, come prodotto del proprio ricambio materiale, a sostanze tossiche solubili e facilmente assorbibili, le quali operano a guisa del veleno dei serpenti e degli alcaloidi delle piante (*ptomaine* e *leucomaine*). Tale verosimilmente è il meccanismo d'azione del microbio virgoliforme del colera asiatico, dove il quadro fenomenico è quello di un rapido intossicamento del sangue, e dove spesso la morte sopraggiunge, avanti che l'agente specifico attraversi i primi strati delle tuniche intestinali (1). L'avve-

(1) Oltremodo interessanti sono in proposito le esperienze del mio compagno di lavoro, Dr. DE SIMONE, il quale, con la iniezione peritoneale o sottocutanea di colture vecchie di bacilli-virgola sterilizzate, riproduce in breve tempo nei cani un quadro morboso analogo a quello del colera asiatico. (*Giornale internazionale delle Sc. mediche*, Napoli, Fas. 8°, 1886). Inoltre GABRIEL POUCHET avrebbe isolato, dalle deiezioni colerose e dalle colture di bacillo-virgola, una sostanza alcaloidea del genere delle ptomaine.

nire della scienza forse dimostrerà, che questo è un meccanismo dei più generali, il quale non esige nel batterio patogeno l'attitudine a vivere nella spessezza dei tessuti, superando la resistenza fisiologica degli elementi anatomici. E con un tal modo di considerare le cose, ognuno comprende, che batteri comuni possono per avventura elevarsi al grado di patogeni, come PASTEUR ha dimostrato nella storia della flaccidezza dei bachi.

Ben difficile compito si assume colui, che in pochi tratti vuole compendiare tutto il lavoro dell'ultimo ventennio a proposito delle malattie d'infezione, e le idee venutesi via via svolgendo circa la interpretazione dei relativi fenomeni morbosi, e circa le leggi che presiedono al loro apparire, diffondersi o cessare. Non meno difficile è il compito, di riassumere il contributo portato dal solo PASTEUR alla patologia speciale delle infezioni: tanti e così diversi sono gli argomenti da lui semplicemente toccati o scrutati a fondo; come la Febbre gialla, la Febbre tifoide, la Febbre puerperale, la Foruncolosi, l'Osteomielite, il Colera dei polli, il Mal rosso del porco, la Rabbia.

Riserbandomi a parlare di proposito dell'ultimo argomento, sorvolo sugli altri per non venir meno allo scopo prefissomi. Basti l'essermi intrattenuto abbastanza sulla parte presa dal PASTEUR all'origine della moderna teorica delle infezioni, per far rilevare, che da lui ha ricevuto la microbiologia i criteri fondamentali, che guidano alla dimostrazione della natura batterica di certe malattie.

Abbiám visto, come non bastasse al DAVINE aver osservato al microscopio i suoi batteridi, e riprodotto con la inoculazione del sangue la forma ti-

pica del carbonchio, per affermare la specificità di quelli. Bisognava, come fece il PASTEUR, isolare i batteridi dal sangue, e sperimentare con essi, indipendentemente dal loro naturale veicolo. E di qui trae origine la pratica batteriologica, di fare sopra substrati artificiali la coltura isolata de'microorganismi, che l'esame microscopico dei prodotti morbosi e l'esperimento fisiologico in massa designa come la probabile causa di una malattia. I metodi, dai primi lavori del PASTEUR ad oggi, sono senza dubbio progrediti; ma resta a lui il merito di aver indiziata la coltivazione artificiale, come il mezzo più acconcio a provare la natura batterica dei virus, e ad indagare le condizioni di esistenza dei microbi patogeni al di fuori del corpo animale, per quindi elevarsi alla legge epidemiologica, scopo supremo cui mira la scienza delle cause morbose.

PASTEUR, portando il suo contributo alla patologia, non si è arrestato alla sterile soddisfazione di aver scoperta la causa di questa o quella malattia. Tutti i suoi lavori sono improntati al carattere di un uomo, che non fa solo la scienza per la scienza. Studiando le fermentazioni, egli mirava al miglioramento delle patrie industrie, ed al vieto metodo di Orléans per la fabbricazione dell'aceto, ne sostituiva uno nuovo con grande economia di tempo e di materiale (1). Prese a studiare le malattie dei vini e della birra, ed era suo

(1) Ecco i punti principali di questo metodo: 1.° sostituire alle botti i tini, che aumentano la superficie di contatto con l'ossigeno dell'aria; 2.° elevare la temperatura dell'ambiente (20°—25° C.); 3.° seminare il liquido col fungo specifico, mettendovi con una spatola un po' del velo micodermico prodottosi nella fabbricazione precedente.

scopo trovare un mezzo di distinguerle dalle sofisticazioni e di curarle (1). Ricercò la causa della moria dei bachi da seta, e col suo sistema di confezionare il seme sano risollevò una preziosa industria morente. Studiò la patogenesi delle malattie infettive dell' uomo e degli animali utili, e donò alla medicina veterinaria e umana la vaccinazione carbonchiosa e la cura preventiva della rabbia.

(1) Oltre i rimedii proposti per le singole malattie, v'ha un metodo generale di cura preventivo, che si applica, così ai vini, come alla birra specialmente in bottiglie, e che va in commercio col nome di *pastorizzazione*. Esso consiste nel prevenire ogni ulteriore fermentazione, assoggettando le bottiglie ben turate alla temperatura di 55°—60° C. in un bagno-maria, ciò che rende i vini e la birra conservabili e trasportabili, senza detrimento del loro gusto.

III.

Pasteur e l' Attenuazione dei virus.

SOMMARIO. — Azione reciproca tra microbi e mezzo di coltura. — Attenuazione del virus del Colera dei polli, del Carbonechio e del Mal rosso. — Lotta per la vita dei batteri tra loro e con gli elementi cellulari. — Immunità patologica. — Vaccinazione. — Ritorno alla virulenza. — Vaccinazione inconsciente. — Legge delle *condizioni minime*, Esperimento di RAULIN. — Interpretazione della immunità.

Allorchè si porta a vivere un microrganismo sopra un terreno di coltura appropriato, e gli si fanno le volute condizioni di temperatura, di umidità e di contatto con l'aria; esso non trova resistenza da vincere, e ben presto vi si moltiplica, modificando più o meno profondamente il mezzo, a seconda de'suoi bisogni nutritivi e dei prodotti di propria elaborazione. E se al tempo del massimo rigoglio si ringiovanisce il terreno di coltura, si semina cioè il microbio in un nuovo mezzo eguale al primo o migliore, e ciò si ripete un certo numero di volte; per solito vedesi lo sviluppo farsi via via più precoce, e più attiva la modificazione del mezzo. Con altro dire, « *la coltura metodica sopra un terreno sempre migliore*, come « WERNICH si esprime (1), sotto la influenza non « interrotta del mezzo adeguato e delle condizioni « esterne, e con la scelta d' un esemplare di microbi bene sviluppato, riesce ad aumentare la « loro potenzialità ».

Non così vanno le cose, quando o il terreno di coltura è poco appropriato, o le condizioni

(1) WERNICH. Desinfectionlehre, Wien u. Leipzig 1882.

esterne si modificano in senso ostile alla vita dei microrganismi. Per esempio, coltivando a bassa temperatura il *Micrococcus indicus* (un bello esemplare di microbi cromogeni, trovato dal Koch nello stomaco d'una scimia), lo si vede perdere col tempo la proprietà di separare attorno di sé la caratteristica materia colorante: lo stesso fatto si ripete nel suo congenere il *Micrococco prodigioso*, coltivato a lungo andare sulla gelatina nutritiva (Cornil e Babès). Di modo che, variando le condizioni della vita entro limiti compatibili con la stessa, creasi al microrganismo una resistenza, superabile bensì per forza di adattamento, ma a costo di una reazione del mezzo su di esso, che si appalesa con un'alterazione della sua specifica attività.

Accade suppergiù il medesimo se, pur restando favorevoli le condizioni esterne, si lascia un esemplare di microbi invecchiare nel meglio adatto terreno di coltura. Man mano si rallenta il processo di nutrizione, l'attività riproduttiva cessa, e, se si aspetta ancora un poco, la vita si spegne. Invano si cerca allora di fecondare con l'innesto un nuovo terreno di coltura; salvo il caso che trattisi d'un microrganismo del genere di quelli, i quali affidano la perpetuazione della specie alla grande resistenza dello spore. Ma se avanti la morte la coltura si rinnova; lo sviluppo, a tutta prima lento e stentato, man mano si ripiglia, e dopo un certo numero di passaggi si riporta al tipo di origine; seguendo in ciò le medesime leggi per cui il micrococco prodigioso, scolorato sulla gelatina, vedesi bel bello rinascere col suo caratteristico rosso di sangue sulla patata, terreno più confacente alla sua natura.

Ma v'ha ancora di più. Sterilizziamo quel materiale di coltura invecchiato, e portiamoci a vi-

vere lo stesso microrganismo preso da una colonia giovanissima. Bene spesso accade che nulla nasce, tuttochè quel substrato nutritivo fosse ancora buono a mantenere in vita la stessa specie batterica; e si assiste ad un esperimento analogo a quello che si fa nelle scuole di fisiologia, quando chiudesi un passero nell'aria confinata. L'animale a poco a poco si accomoda ad una difettosa ossigenazione; e se, prima che la quota dell'ossigene riducasi al minimum compatibile con la vita, si mette sotto la campana un altro passero, vedesi questo cadere asfittico, mentre si è ancora in tempo di salvare l'altro riportandolo all'aria libera.

Brevemente, la legge dell'adattamento, che presiede alla vita degli esseri superiori, è soddisfatta eziandio tra gl'infinitamente piccoli. Essa dà loro di potersi piegare alle più diverse condizioni di esistenza; ma con la conseguenza necessaria di un mutamento delle loro proprietà specifiche, tanto più sensibile e duraturo (epperò trasmissibile per eredità), quanto più è stata lenta e duratura l'azione della causa. E si perviene a questo importante corollario, che vita e attività specifica d'un microbio sono due cose ben distinte; e che, *pur restando le specie immutabili, le loro proprietà sono in continuo divenire.*

Simili considerazioni dovevano svolgersi nella mente del PASTEUR, dopo rinvenuto dalla meraviglia di un fatto straordinario, che gli occorse studiando il microbio del Colera dei polli (1), e nel quale intravide un glorioso avvenire per la terapia dei morbi infettivi. Facendo passare questo mi-

(1) Scoperto e disegnato la prima volta nel 1878 dal nostro PERRONCITO.

crorganismo da un mezzo di coltura in un altro a lunghi intervalli di tempo, s' accorse che la sua virulenza si affievoliva ; e quel micrococco, che prima uccideva 20 polli sopra 20 inoculati , ora ne faceva morire 15, 10, 5 e magari nessuno, limitandosi a produrre una forma lieve e transitoria di malattia. La diminuzione del potere patogeno, l'*attenuazione*, come ora dicesi propriamente, era proporzionata alla durata del tempo intercorso alla rinnovazione della coltura, proporzionata cioè alla sua vecchiezza ; e, cosa ancora più sorprendente, ciascuna riproduceva un esemplare di microbi di eguale virulenza.

Coteste colture erano fatte alla maniera ordinaria, in palloncini di vetro chiusi con turacciolo di cotone; che, mentre si oppone alla penetrazione di germi estranei, lascia passare liberamente l'aria. Quale poteva essere mai la causa dell'attenuazione? PASTEUR sospettò, che la parte principale alla produzione del fenomeno spettasse all'ossigene atmosferico, e l' esperienza confermò la sua supposizione. Comparativamente, allato ad una serie di colture all'aria, ne fece un'altra in tubi di vetro chiusi alla lampada, in cui lasciava un volume di aria il più piccolo possibile. Ben presto si persuase , che mentre le prime via via si affievolivano, le altre mantenevano immutata la loro virulenza per un tempo lunghissimo.

Ecco dunque trovato il segreto della spontanea attenuazione. Nelle colture, che si rinnovano a brevissimi intervalli, ossia al tempo del massimo rigo-
glio, l'ossigene dell'aria serve unicamente alla vita dei microbi; ma quando la loro vegetazione comincia a rallentarsi, vuoi perchè il mezzo progressivamente impoverisce in principî nutritivi, vuoi perchè i prodotti del ricambio materiale di quelli lo

convertono via via in un terreno disadatto ; se l'ossigene continua ad agire, non può che spiegare la sua influenza comburente sul corpo stesso del microbio, donde verosimilmente il progressivo affievolirsi della sua specifica energia. E di ciò abbiamo una riprova nell'influenza più rapidamente attenuatrice dell'ossigene compresso, al punto di poter sterilizzare con questo mezzo, come faceva PAOLO BERT, il sangue degli animali carbonchiosi (V. pag. 28).

Il virus del colera dei polli è un micrococco, che non presenta nella sua vita una fase sporifica, per cui sia possibile un brusco ritorno al tipo di origine, partendo da un esemplare attenuato. Laonde, se l'attenuazione è l'effetto di una reazione del mezzo sopra il microbio, necessitata dallo adattamento a condizioni di vita stentata, deve potersi fare altrettanto d'un microbio sporifero, quando si riuscisse ad impedire la produzione dello spore.

Ebbene, la più bella conferma di coteste idee è data appunto da un simile risultato, ottenuto dal PASTEUR col bacillo carbonchioso. Nel brodo neutro di pollo, questo microrganismo mal si coltiva alla temperatura di 45°; però vive ancora a 42°-43°, e con la particolarità di non sporificare. Ciò posto, mantenendo a tale temperatura ed a contatto dell'aria una coltura *filamentosa* del parassita, per es. del brodo di pollo seminato con sangue carbonchioso fresco; a capo di un mese, o giù di lì, essa è morta e incapace di fecondare un nuovo terreno di coltura. Ma se nell'intervallo si viene via via saggiando la sua virulenza in animali di diversa taglia e di diversa età, si constata questo fatto meraviglioso; che la coltura passa per una serie di virulenze sempre più deboli, ciascuna

delle quali può fissarsi mercè la coltivazione a temperatura ordinaria, mostrandosi capace successivamente di risparmiare il bue ed uccidere la pecora, risparmiare la pecora ed uccidere il coniglio, risparmiare un coniglio adulto ed uccidere un piccolo coniglio, la cavia, il topo.

In questo caso, all'azione dell'ossigene si aggiunge quella del calore, il quale rende il primo più libero di spiegare la sua influenza attenuatrice; sicchè la durata necessaria allo scopo che vuolsi ottenere ne resta notevolmente abbreviata. Col moltiplicarsi delle osservazioni su questa via, si è trovata la legge (CHAUVEAU): che, tra la temperatura mortale e quella più favorevole alla coltura, esiste una *zona di attenuazione*; dove, col far variare il grado del riscaldamento inversamente alla sua durata, si può ottenere una serie di virulenze diverse, e tanto più stabili e facili ad essere fissate con la coltura, quanto più è lunga la durata del riscaldamento. Anche alla luce solare si appartiene una certa influenza attenuatrice, ma assai lenta. Ed una volta stabilito il principio, che l'attenuazione sia l'effetto necessario di un adattamento a condizioni sfavorevoli di esistenza, veniva da sè l'idea di TOUSSAINT e di CHAMBERLAND e Roux, di utilizzare al medesimo scopo l'uso di sostanze antisettiche, aggiunte in proporzioni ben definite ai liquidi di coltura.

PASTEUR cercò ancora una conferma di cotesti fatti nel microbio di un'altra malattia virulenta propria del maiale, da lui studiata con THUILLIER, la quale va col nome di *Rouget* o *Mal rosso*. Ottenne del pari l'affievolimento del virus mercè l'influenza dell'ossigene; ma, cosa più sorprendente, trovò un nuovo mezzo di attenuazione nella

resistenza dell' organismo vivo. Il virus del mal rosso è inoculabile al piccione ed al coniglio: or se si fa una serie di passaggi col sangue infetto da uno ad altro animale, alla fine si ottiene sul coniglio un virus, che riportato sul maiale lo fa ammalare, ma non l'uccide; mentre sul piccione la sua virulenza si esalta al punto, da riuscire più rapidamente mortale dello stesso virus, che sorge spontaneo nel maiale.

Adunque i virus non sono delle *entità morbose* immutabili, come si credeva prima del PASTEUR; ma, pari all'attività specifica di singoli microbi, si può con un artificio di laboratorio esaltarli o affievolirli, e fissare fino ad un certo punto queste modificazioni mercè la coltura. E la importanza di tal fatto non si rimane al fatto stesso, poichè nel medesimo tempo il PASTEUR ha dimostrato: che gli animali, resi semplicemente malati con la inoculazione di un virus debole, diventano per ciò stesso refrattarii all'azione del virus più attivo, restano come si suol dire *vaccinati*.

Per tal modo era trovata in patologia sperimentale la conferma di un fatto, noto per antica esperienza, e dal quale trasse origine la vieta pratica della vaiolazione; che cioè le malattie virulente, una volta superate, non sogliono ripetersi nel medesimo individuo; con altro dire, che la malattia benigna difende e protegge da un attacco minaccioso della stessa. Così giustificavasi la pratica invalsa nelle famiglie, durante le ricorrenze benigne di morbillo, di esporre i bambini al contagio, perchè fossero preservati da eventuali ricorrenze maligne. Così era trovato l'anello di congiunzione con la immortale scoperta di JENNER; ma con la notevole differenza, che ad un fatto iso-

lato, come la vaccinazione j Jenneriana, incapace di ulteriore fecondità, PASTEUR sostituiva un principio, il quale fa dipendere dall'arbitrio dell'uomo la conversione del virus in vaccino, in singole malattie infettive che non recidivano.

Ma torniamo per poco alle nostre considerazioni sulla vita dei microrganismi, che lasciamo al punto in cui essa trova una prima resistenza da vincere, necessitata dall'adattamento a condizioni di esistenza sfavorevoli in un mezzo inerte. E facciamoci ragione del caso, in cui una specie batterica trovasi di fronte, non alla semplice resistenza di un terreno di coltura disadatto, ma a quella devoluta alla vita di esseri congeneri.

Tuttochè le condizioni della lotta siano diverse, vedremo che non v'ha sostanziale differenza nel risultato. Il terreno della lotta è sempre quello dei bisogni nutritivi: e come gl'infinitamente piccoli traggono forza dalle condizioni del mezzo in cui vivono, a seconda che queste rispondono bene o male alla soddisfazione di quelli; così non può dirsi in maniera generale, se una specie sia più forte di un'altra, da prevalere in ogni caso. Così dipenderà dall'acidità del mezzo, se la lotta si decida a favore di una muffa, che trovisi in presenza di una colonia di batteri. La muffa grandeggia nel suo sviluppo: ma ecco che la reazione del mezzo diviene alcalina, pogniamo per i prodotti del ricambio materiale della muffa istessa; onde la sua vegetazione si arresta, e i batteri prendono il sopravvento. Un organismo animale cessa di vivere, e i germi anaerobi che trovansi nell'intestino cominciano il loro lavoro distruttivo nelle parti profonde, protetti dall'assenza di ossigene libero. Ma pian piano, per effetto del medesimo lavoro,

le parti profonde son messe allo scoperto ; e la lotta si decide a favore dei germi acrobi , che prendono a sè il compito di continuare la distruzione della materia organica morta.

Non altrimenti procedono le cose , quando una colonia di batterî trovasi a fronte di un altro ordine d' infinitamente piccoli , quali sono gli elementi dei nostri tessuti , nella cui associazione armonica sta l'unità organica della vita degli esseri superiori. Se s'inocula , come ha fatto METSCHNIKOFF (1), il *Bacillus anthracis* sotto la pelle della rana tenuta nelle condizioni di vita naturale; esso non si diffonde nel sangue, e nel sito dell'innesco trovasi una barriera di cellule linfatiche, che circoscrivono il focolare di batteridi , ed alcuni di questi si vedono incorporati nel protoplasma di singole cellule : si direbbero *mangiati* da esse , e perciò METSCHNIKOFF le chiama *fagociti*. Or se si fa la stessa inoculazione ad una rana tenuta in un bagno a 37°, secondo il modo di sperimentare del GUBIER, i bacilli si diffondono nel sangue, e l'animale prende il carbonchio.

Ecco due esempî di una lotta che si decide a favore, ora dell' uno ora dell' altro combattente , per il solo fatto della temperatura. A bassa temperatura , che è condizione normale per gli elementi cellulari della rana, questi prevalgono sui bacilli carbonchiosi: prevalgono per contrario i bacilli a temperatura elevata , che è favorevole al loro sviluppo, mentre attenua la resistenza fisiologica della rana.

Ma andiamo oltre; e inocuiamo lo stesso bacillo dell'antrace ad un animale previamente vaccinato contro il carbonchio, mercè il virus atte-

(1) Virchow's Archiv, 1834.

nuato alla maniera del PASTEUR. In queste condizioni, se si ricerca il sangue in diversi momenti, si vedrà, che circa 16 ore dopo contiene bacilli liberi e bacilli incorporati nelle cellule linfatiche; più tardi abbondano i fagociti, e i bacilli liberi sono scomparsi; da ultimo nè bacilli liberi, nè fagociti (MERSCHNIKOFF). Come intendere questi fatti? una spiegazione è possibile. Nella malattia benigna prodotta con la vaccinazione la lotta si è decisa a favore degli elementi cellulari, messi, nella pienezza della loro energia fisiologica, a fronte di bacilli affievoliti. E come dalla lotta non si esce senza qualcosa guadagnare o perdere, così gli elementi cellulari devono aver perfezionata l'energia, che diede loro la vittoria, e la quale, conservata o trasmessa nella discendenza, concede di potersi provare contro un nemico più forte.

Chiamasi *immunità patologica* il potere di resistenza innato o acquisito contro la specifica energia di questo o quel virus. È immune la rana pel carbonchio, e la sua dicesi *immunità assoluta*; poichè nelle condizioni di vita naturale l'organismo di essa è inaccessibile al bacillo dell'antraco. Per contrario chiamiamo *immunità relativa*, quella che vien conferita da previa vaccinazione, o da un attacco spontaneo superabile della stessa malattia.

Tutti sanno che alla immunità non può attribuirsi un valore e una durata indefinita; che perciò si consiglia di ripetere la vaccinazione jennericiana ogni 5-10 anni, e si ha poca fiducia nell'efficacia di quel vaccino, che non abbia dato luogo ad una rigogliosa pustola. E la cosa s'intende da sè; poichè, per grande che sia la forza dell'eredità, essa ha i suoi confini; ed una modificazione acquisita finisce per perdersi tanto più rapidamente,

quanto è meno profonda. È noto per giunta, che se il vaccino protegge da una ricorrenza di vaiolo benigno, può non avere alcuna influenza profilattica contro una forma grave; allo stesso modo che un virus attenuato vaccina la madre, ma uccide il feto provocando l'aborto. Nulla v'ha di assoluto in queste cose: una virulenza come 10 difende da un'altra come 15, ma non ha valore contro una virulenza come 20; ed hanno ben motivo di rallegrarsi le madri di famiglia, quando veggono ne' loro figlioli una eruzione morbillosa confluyente; perchè la immunità che una malattia lascia è tanto più solida e duratura, quanto più è grave la forma morbosa da cui è stabilita.

Di qui l'obbiezione mossa dal KOCH contro il PASTEUR, a proposito della vaccinazione carbonchiosa degli armenti. Che cioè, per preservare con sicurezza gli animali dalla moria, bisognerebbe inocularli d'un vaccino che più s'accosta al virus carbonchioso, senz'essere mortale. Lo che praticamente darebbe luogo a molti insuccessi, non essendo facile cosa proporzionare l'energia del virus-vaccino alla resistenza dei singoli animali. PASTEUR ha tolto di mezzo la difficoltà, facendo seguire ad una prima inoculazione debole un'altra abbastanza forte; e le celebri esperienze di vaccinazione fatte prima a Melun, indi a Packisch in presenza del VIRCHOW, e le innumerevoli richieste di vaccino pervenute via via al Laboratorio del PASTEUR, devono omai aver rimosso ogni dubbio circa l'utilità della profilassi carbonchiosa.

Similmente nulla v'ha di assolutamente stabile nel fatto dell'attenuazione de' virus. Ecco un esemplare di microbi del colera de' polli, attenuato al punto da potersi impunemente inoculare ad un

pollo giovane. Esso però uccide il pulcino e il passero: ora, se col sangue di questi animali lo si riporta sopra un pollo giovane, lo uccide del pari; come il sangue di questo riesce alla sua volta mortale sul pollo adulto. Così, per una serie di passaggi e dopo una prima vittoria, il virus via via si rinforza e ritorna al tipo di origine. Gli è in sostanza il medesimo fatto del micrococco prodigioso, che scolorato sulla gelatina riprende a poco a poco sulla patata la caratteristica colorazione; e per altra via siamo ricondotti all' affermazione del principio, che *virulenza e proprietà specifica dei microbi sono in perpetuo divenire.*

PASTEUR vede in ciò l'intima ragione del sorgere e del cessare delle epidemie. I germi degli organismi patogeni esistono quali nell'aria, quali nel suolo, quali nelle acque; ci circondano per ogni verso, pronti sempre a stabilire una concorrenza con l'uomo, date le condizioni favorevoli. Per un'influenza qualsiasi valevole a menomare la resistenza fisiologica in un certo numero d'individui, per es. una carestia, ha luogo un primo attacco; e se la lotta si decide a danno de' medesimi, ciò basta per far sorgere da una scintilla un grande incendio. Poichè i germi patogeni, resi più attivi dalla vittoria, si attaccano a individui meno disposti ma capaci di riceverli; la rinforzata specificità dà loro nuovi trionfi, e così l'epidemia ingrossa. Ma a poco a poco scompaiono dalla lotta gl'individui meno resistenti; e restano quelli, contro cui i microbi valgono solo a produrre una malattia grave ma non mortale. L'epidemia segue allora un periodo di decrescenza, aumentano i casi di guarigione; e man mano i germi, affievoliti contro un più forte nemico, tornano nel loro indifferentismo, e l'epidemia si estingue.

Se dunque l'attenuazione dei virus e l'influenza protettiva della stessa sono il risultato di una lotta, che singole specie di microrganismi sostengono con sfavorevoli condizioni di vita, e contro la resistenza fisiologica degli elementi cellulari; che è mai una malattia infettiva, la quale superata una volta non recidiva, se non una vaccinazione inconsciente? Ne abbiamo una prova manifesta dal modo di comportarsi delle malattie virulente nei paesi che visitano per la prima volta, e dalla loro facile acclimatazione. L'innocente morbillo, come ora si presenta da noi questa infezione, è una delle più contagiose che si sappia, e dove la immunità funziona più a lungo: gli è in questo senso che dicesi una malattia dell'infanzia. Ebbene, importato il morbillo l'anno 1875 nelle isole Fidji, per mezzo di un naviglio proveniente da Sydney, vi suscita una epidemia terribile che riporta 40,000 vittime sopra 150,000 abitanti, non risparmiando nè adulti nè vecchi. Come spiegare la mitezza della malattia tra noi? Gli è perchè da tanti anni che il morbillo abita l'Europa, ci trasmettiamo di generazione in generazione un certo grado d'immunità, che ciascun di noi rinforza ne' primi anni della vita mercè una diretta vaccinazione inconsciente. Così via via son venuti facendosi rari i casi gravi, più rari ancora casi mortali; e, senza avvedercene, abbiamo assistito ad una vera acclimatazione della malattia, cosa riconosciuta da tutti i medici, ma di cui solo i recenti studi ci fanno comprendere il meccanismo (DUCLAUX).

Questo modo d'intendere le cose relative alla immunità ed alla variabile virulenza degli agenti infettivi, se bene si osserva, riporta tanti fatti

misteriosi sotto le leggi più generali della vita, che sian usi riguardare negli esseri superiori. La sola differenza sta in ciò, che, consentaneamente alla loro estrema piccolezza e semplicità di struttura, la vita degl'infinitamente piccoli dipende da condizioni minime. E come d'altra parte essi sono capaci di grandi effetti; così, a voler penetrare nei segreti della biologia di questi esseri, bisogna far l'abitudine ad un'apparente sproporzione tra la grandezza degli effetti e la piccolezza delle cause.

Un esperimento fatto dal RAULIN nel Laboratorio del PASTEUR merita, sotto questo riguardo, la più grande considerazione (1). Studiando l'influenza delle diverse sostanze nutritive sullo sviluppo di una muffa, l'*Aspergillus niger*, il RAULIN, dopo numerosi tentativi, riuscì a comporre un liquido, in cui essa dà un raccolto massimo. Questo liquido va col nome dell'autore, e risulta di non meno che 11 elementi (2), tra cui entrano in minime porzioni un sale di zinco e un sale di ferro. Uno de'fatti più curiosi in questo esperimento si è l'influenza dello zinco, la cui soppressione fa cadere la raccolta da 25 grammi a 2,5; e notisi, che la proporzione di metallo nel liquido non è superiore a 32 mmgr. Se si sopprime il sale di ferro, che vi entra suppergiù nelle stesse proporzioni, la

(1) *Recherches sur le developpement d'une mucédinée dans un milieu artificiel*; Annales des sc. naturelles 1870.

(2)	Acqua	1,50 gr.
	Zucchero candito	0,07
	Acido tartarico	4,00
	Nitrato d'ammonio	4,00
	Fosfato d'ammonio	0,60
	Carbonato potassico	0,60
	Carbonato di magnesio	0,40
	Solfato ammonico	0,25
	Solfato di zinco	0,07
	Solfato di ferro	0,07
	Silicato di potassio	0,07

vegetazione della pianta prestamente si arresta, poichè si sviluppa una sostanza tossica, che impedisce l'ulteriore crescimento della muffa, e contro cui il ferro funziona da contravveleno. Ma la cosa più meravigliosa è questa; che se al liquido si aggiunge $\frac{1}{1,600,000}$ di nitrato d'argento, la pianta cessa bruscamente di vivere: del pari la coltivazione non può farsi in un vase d'argento, e la chimica non ritrova nel liquido la benchè minima traccia di questo metallo.

Ecco un esperimento oltremodo istruttivo, e che ci permette di fare ancora un passo nella interpretazione de' fenomeni relativi alla immunità.— Come deve intendersi l'aumento di energia, che gli elementi cellulari riportano nella lotta con i microbi patogeni, e che trasmesso alla discendenza riesce a proteggere l'organismo animale da un nuovo attacco da parte di quelli? Trattasi cioè d'una elevazione pura e semplice della ordinaria resistenza fisiologica? Ma in tal caso la immunità, acquisita per una malattia, dovrebbe poter valere altresì per un'altra che le si avvicini nel grado di virulenza, ciò che generalmente non è d'accordo con la osservazione de' fatti. O piuttosto deve pensarsi ad un aumento *relativo* di energia, inteso cioè nel senso, che il primo attacco di una infezione lasci l'organismo mal disposto a servire come terreno di coltura per una nuova invasione degli stessi microparassiti?

Senza dubbio è questo il modo più plausibile d'intendere il fatto, almeno per la generalità dei casi. Ed allora una delle due: o l'organismo dell'animale vaccinato perde qualche cosa, che funzioni a simiglianza dello zinco del liquido RAULIN; ovvero i microbi patogeni abbandonano ne' tessuti

un prodotto di propria elaborazione, analogo a quello dell'aspergillo che necessita nel liquido RAULIN la presenza del ferro.

L'una e l'altra ipotesi hanno un punto d'appoggio nella osservazione de' batteriologi, che spesso un materiale di coltura, il quale ha servito a nutrire una specie di microbi, diviene improprio a coltivare una seconda volta la stessa specie; e gli agricoltori sanno bene, che un terreno, dove ha vegetato una pianta, mal si presta ad una nuova coltura della stessa, donde la pratica delle rotazioni agrarie. Nè è men vero, che nei materiali di coltura si producono delle sostanze, tossiche per i microbi stessi che le elaborano. È risaputo, per es., che nel mosto in fermentazione, quando la quota di alcool ha raggiunto suppergiù il 12%, i fermenti muoiono. E così, per avere una produzione continua di acido lattico nella fermentazione omonima, è costume di aggiungere al materiale fermentescibile del carbonato di calcio, il quale fissa l'acido man mano che si produce, e mantiene il mezzo sempre neutro, senza di che la fermentazione sarebbe presto arrestata. La scienza oggi possiede molti altri fatti del genere, che spiegano per giunta il quadro sintomatico di singole malattie. Per es. l'assopimento, che domina la scena del colera dei polli, è certamente dovuto ad un prodotto di elaborazione del microbio specifico; poichè il medesimo fenomeno è dato dalla iniezione sottocutanea delle sue colture artificiali sterilizzate. (Cfr. p. 32)

Ma si obietta: se veramente un mutamento chimico ha luogo ne' tessuti o nella crasi dei liquidi organici, in seguito ad una malattia virulenta, perchè sfugge esso alla minuziosa indagine, di cui è capace la chimica moderna? E come inten-

dere il perdurare dell' elemento nocivo o la persistente mancanza di un elemento utile, di fronte all'incessante ricambio della materia de' nostri tessuti, e di fronte all'attività eliminatrice dell' organismo per rispetto a principî, che non entrano nella sua normale composizione? — Si risponde col ricordare, che i fenomeni in parola stanno sotto la dipendenza di condizioni minime, inaccessibili; poichè, con le forze fisico-chimiche entrano in gioco altre forze più delicate e durature, le quali sono del dominio della fisiologia. Una dose insignificante di zinco, ossia di un metallo che sembra non dover avere alcuna importanza per la vita d'una pianta, decide di un abbondante raccolto di aspergillo; e indarno si chiede alla chimica, perchè la coltura di questa muffa nel liquido RAULIN vien meno, quando si fa dentro una capsula di argento. E che sappiamo noi dell'intimo chimismo, che presiede alla vita fisiologica di una cellula? che cosa avviene nel protoplasma delle uova de' bachi flaccidi, per cui nascono da asse bachi designati a morire di flaccidezza? in che differisce la cellula cerebrale d'un uomo sano da quella di un epilettico; e per quali vie misteriose l'alterazione di questa si rannoda ad una discendenza d'idioti, di folli o di delinquenti?

La scienza tace innanzi a questi fatti, e si contenta di registrarli. Avviene sempre così; che, col moltiplicarsi delle conoscenze, mentre molti fenomeni rimasti per lungo tempo inspiegati si rischiarano di viva luce, nuovi problemi sorgono, e nuovi misteri si preparano ad affaticare la mente dell'uomo.

Intanto non è piccolo acquisto per la scienza la nozione della concorrenza vitale degl'infinita-

mente piccoli; e giustamente va tra le più importanti scoperte del secolo quella del PASTEUR, circa la variabile virulenza degli agenti infettivi. Le nostre vedute si allargano ogni giorno più; e come da una parte sparisce il *Deus ex machina* all'erompere e declinare delle epidemie, al loro dominare ora mite ora disastroso, al loro acclimatarsi o spegnersi; così d'altra parte vedonsi rifiorire le speranze, di sottrarre la terapia e la profilassi al gioco del cieco empirismo.

La batteriologia, applicata alla medicina, è stata accusata, quasi sul nascere, di essere impotente a derivare dalla nozione delle cause de'morbi infettivi i mezzi di protezione e di difesa. Ma ecco che la *giovane Bella*, come PETTENKOFER la chiama, accenna a divenire *quella egregia donna di casa e massaia*, ch'egli non dubita debba col tempo divenire; so già discute col CANTANI la possibilità di ridurre la cura di una malattia infettiva ad una lotta tra microbi patogeni e microbi innocenti; se col PASTEUR traduce i virus in vaccini, e fa la cura profilattica della rabbia; se con PETTENKOFER istesso e col KOCK (per vie diverse, ma conducenti al medesimo scopo e affermanti il medesimo principio) cerca mezzi generali di difesa nella epurazione dell'ambiente cosmico, dalle tante cause che attentano incessantemente all'esistenza dell'uomo.

IV.

Pasteur e la Cura profilattica della Rabbia.

SOMMARIO. — Le prime ricerche. — Il Micrococco della saliva. — Veicoli del virus rabido. — Metodo d'innesto per trapiantazione. — Attuali conoscenze sulla natura del virus rabido. — Suo modo di comportarsi sopra diversi animali. — Prime esperienze d'immunità. — Nuovo metodo di attenuazione. — La profilassi della rabbia nell'uomo. — La rabbia del lupo. — Interpretazione del metodo profilattico. — Risultati pratici. — La statistica della rabbia. — Conclusione. —

Abbracciando d'uno sguardo le diverse scoperte del PASTEUR, dopo seguitone l'ordine cronologico, vi si ravvisa tale intimo nesso, che la sua vita scientifica si delinea come la più bella evoluzione d'uno spirito penetrante, il quale, al dire dello CHEVREUL, *forte delle verità acquistate, si porta innanzi a stabilirne delle nuove*. Dalla selezione meccanica dei cristalli di paratartrato, e dalla preparazione dell'acido levoracemico mercè il meccanismo d'una fermentazione, egli si fa strada alla coltura frazionata dei microbi ed alla teorica vitale dei fermenti. Questa lo guida a rintracciare le cause delle malattie delle bevande alcoliche e del filugello, e per esse si apre la via ai più ardui problemi di biologia medica. Quivi scopre il grande principio della variabile virulenza degli agenti infettivi, con la sua importanza profilattica; e questo principio, messo alla prova in diverse malattie degli animali, lo conduce come filo di Arianna all'ultima e più clamorosa delle sue scoperte, la profilassi della rabbia nell'uomo.

Allorchè, or son sei anni, il PASTEUR imprese le sue ricerche sulla rabbia, la conoscenza di questa

malattia, comechè studiata per lo innanzi da eminenti veterinari e medici, limitavasi tuttavia, o quasi, alla nozione pura e semplice del modo, come essa suole comunicarsi e svilupparsi; si sapeva cioè, trattarsi di una malattia virulenta a incubazione piuttosto lunga, il cui principio attivo esiste nella saliva e nella bava. La diversità del quadro sintomatico ingenerava seri dubbî sull'unicità del virus; e ad accrescere la confusione delle idee interveniva il fatto, che la saliva inoculata col morso non sempre riusciva virulenta.

Ai 10 di Dicembre 1880 il PASTEUR fu chiamato nell'ospedale TROUSSEAU a vedere un primo caso di rabbia, in persona d'un fanciullo, che era stato morsicato nel viso un mese innanzi. Era uno dei casi più tipici, dove al sintomo della *idrofobia*, che si esprime con la sensazione brusca di strozzamento e minaccia di soffocazione ad ogni tentativo di bere, si aggiungeva l'altro dell'*aerofobia*, per cui l'infelice era preso da furore, al più lieve soffio che si facesse su di una parte scoperta del suo corpo ed alla sua insaputa. Poche ore dopo la morte, il PASTEUR raccolse le mucosità accumulate nel fondo della bocca, e stemperatele in acqua ne fece una iniezione sotto la pelle di due conigli. Gli animali morirono a capo di 36 ore, e con la loro saliva il PASTEUR poteva trasmettere la infezione a nuovi conigli.

Consimili esperimenti, eseguiti dal dottor RAYNAUD, gli fecero subito credere di avere in suo potere il virus rabido, e di essere in grado di trasmettere la rabbia mercè la saliva dall'uomo al coniglio. Non così il PASTEUR, a cui la troppo breve durata dell'incubazione non poteva non ingenerare seri dubbî, che s'avesse veramente a trattare di infezione

rabica. E guidato dall'esame microscopico del sangue dei conigli morti, riuscì ad isolare in coltura artificiale un micrococco, aerobo e anaerobo nel medesimo tempo ; il quale, inoculato con le debite cautele di purezza, riproduceva costantemente nei conigli la stessa forma d'infezione. E non tardò a riconoscere, che questo microbio trovavasi, non pure nella saliva degli arrabbiati, ma anche in quella di singole persone sane, osservazione confermata di poi da VULPIAN in Francia e da STENBERG in America.

Trattavasi quindi di una nuova infezione puramente sperimentale, che nulla avea di comune con la rabbia. E moltiplicando le ricerche sulla saliva degli animali idrofobi, il PASTEUR prestamente riconobbe, che essa presentasi dotata di una triplice virulenza, potendo la sua inoculazione negli animali dar luogo a tre generi di morte: la morte per il *microbio della saliva* testè ricordato, la morte per suppurazione, e in fine la morte per infezione rabica, caratterizzata da un lungo periodo d'incubazione e dalla mancanza, così di lesioni locali, come di forme batteriche nel sangue e nei tessuti.

A volere perciò studiare la rabbia bisognava cercare un altro punto di partenza, che non fosse la saliva o la bava degli arrabbiati; cercare cioè un altro veicolo del virus rabico, dove questo si trovasse in istato di purezza, sicchè inoculato agli animali riproducesse con tutta sicurezza la malattia. E guidato dalla idea preconcetta, che il focolaio principale del virus fosse il sistema nervoso centrale, come quello che col suo disordine funzionale ha tanta parte nel quadro clinico della rabbia, il PASTEUR volle ripetere le esperienze del GALTIER, il quale, ispirandosi al medesimo

principio, aveva qualche anno prima tentato, ma con insuccesso, di riprodurre sperimentalmente la infezione, partendo dalla sostanza del cervello, cervelletto o midolla allungata dei cani arrabbiati. A ciò fare era altresì consigliato dall'aver osservato che, indipendentemente dai fatti vasali noti a tutti gli anatomisti patologi, si può bene differenziare con l'esame microscopico un bulbo rabico da un bulbo normale; poichè in ambedue si riscontra un numero infinito di granulazioni molecolari, ma il primo ne presenta in maggiore quantità e di più fine (1).

L'esperienza giustificò pienamente l'aspettativa del PASTEUR: tutte le parti del sistema nervoso centrale sono virulente, e non contengono che una virulenza sola, quando si ha cura d'inocularla avanti l'inizio della putrefazione e con tutte le volute cautele.

Con ciò era risolta una parte del problema; e restava di trovare un metodo d'inoculazione, il quale, mentre rendesse sicuro l'esito dell'esperimento, abbreviasse possibilmente la durata dell'incubazione: a gli è un vero supplizio per lo sperimentatore, diceva il PASTEUR, essere condannato ad aspettare per mesi il risultato d'una esperienza, quando l'ar-

(1) L'esame istologico del sistema nervoso centrale degli arrabbiati, allo scopo di cercarvi qualche lesione che potesse ritenersi caratteristica della rabbia, è stato l'oggetto di studio di non pochi osservatori, tra cui GOWERS, MEYNER, COMBAULT, BENEDICT, BALZER, KLEBS, KOLESNIKOFF, WAGNER, KLEINBERG, CHEADLE e, presso noi, il Dr. D. MORISANI. Ma nessuno, che io sappia, parla di lesioni veramente caratteristiche. Tutti generalmente descrivono le note di imponenti disturbi dell'attività vasale; e nella *integrità microscopica presso a poco completa del tessuto nervoso*, come il MORISANI si esprime nella conclusione del suo lavoro (V. *Giornale internaz. delle Sc. mediche*, Nuova serie, Anno, I., Fasc. 3°), *devesi ritenere, che il processo si circoscrive principalmente ai vasi, e si esplica come esagerato potere migrativo degli elementi incolori del sangue.*

gomento ne richiede moltissime ». Egli raggiunse il duplice scopo, inoculando la materia nervosa alla superficie del cervello mercè la trapanazione. così ponesi il virus di primo acchito a contatto degli organi, che ne sono la sede prediletta, e in cui esso deve estrinsecare la sua misteriosa attività.

Ecco in breve la tecnica relativa. — Si comincia dal preparare una emulsione di sostanza nervosa, stemperando in acqua o in brodo sterile, dentro recipiente sterilizzato, un briciolo di midollo spinale o di bulbo o di cervello, tolto ad un animale arrabbiato con tutte le debite cautele di purezza. Ciò fatto, legasi bocconi sul tavolo di operazione l'animale che si vuole inoculare, lo si cloroformizza e si pratica sulla volta del capo un taglio sagittale delle parti molli, da giungere sino all'osso. Tenendo allora divaricati i margini della ferita con una specie di pinza che ricorda il blefarostato degli oculisti, mercè un piccolo trapano si pratica sul tavolato osseo un foro di circa mezzo centimetro di diametro. Messa per tal modo allo scoperto la dura meninge, s'iniettano nello spazio subaracnoideo alcune gocce del liquido previamente preparato, usando all'uopo una siringa di Pravaz con ago-cannula piegato nell'estremo ad angolo retto. Non resta che medicare antisetticamente, e riunire i margini della ferita cutanea con due punti di sutura.

Il PASTEUR trovò nei vasi venosi un'altra preziosa via d'inoculazione; e con questi due metodi, data la possibilità di raccogliere dal sistema nervoso un virus rabido di assoluta purezza, si aprì più facile via allo studio propostosi.

Innanzi tutto dimostrò, che non pure l'asse ce-

rebro-spinale in tutta la sua lunghezza, ma anche il sistema nervoso periferico è virulento, essendo riuscito per es. ad inoculare con successo un pezzettino di nervo vago, preso in un punto qualsiasi del suo decorso. Dimostrò inoltre essere virulento il succo espresso della glandola parotide, della sottomascellare, della sublinguale, del pancreas; e come spesso il virus si coltiva naturalmente nel liquido cefalo-rachideo, mentre è rara evenienza ritrovarlo nel sangue. Constatò o confermò la suscettibilità per la rabbia nel coniglio, nella cavia, nei polli, nella scimia. Stabili che le due forme principali, sotto cui la malattia clinicamente si manifesta, procedono dal medesimo virus; e che mentre l'innesto per trapanazione dà per solito luogo alla forma *furiosa*, l'innesto per le vie venose o sotto la pelle riproduce più volentieri la forma *muta*, caratterizzata dalla mancanza di agitazione e nei cani dei caratteristici latrati. Rilevò infine l'importanza delle piccole quantità di virus nel prolungare il periodo d'incubazione, e nel dar luogo di preferenza alla forma furiosa della rabbia, qualunque sia la porta d'ingresso del virus.

Ma che è mai il virus della rabbia dal punto di vista morfologico? non ha esso il suo microbio, come quello per es. della tubercolosi, del farcino e via dicendo? — La è forse una delle prime domande che il PASTEUR ha rivolto a sè medesimo; ma che, cosa strana, attende ancora una risposta decisiva. Egli è riuscito a vedere isolate nel sangue quelle granulazioni finissime, che l'esame microscopico discopre nella sostanza nervosa, iniettando nelle vene di un animale arrabbiato, al cominciare del periodo asfittico, una emulsione di bulbo rabido. Con questo artificio gli elementi nor-

mali del tessuto nerveo in breve tempo scompaiono, presumibilmente fissandosi nei capillari, e restano dei minutissimi granuli di uguale grandezza, i quali si tingono con i colori di anilina. Sarebbero mai essi dei micrococchi? Ma l'esame microscopico non basta ad un'affermazione di tal genere: ci abbisogna altresì la prova della coltura artificiale. Or tutti i tentativi fatti all'uopo, così sui comuni terreni di coltura, come nel liquido cefalo-rachidiano e su pezzi di tessuto nervoso tolti da animali sani, sono riusciti senza frutto. Epperò la conoscenza del virus rabido, sotto il rispetto morfologico, è riserbata a ulteriori e più fortunate ricerche (1).

Delle innumerevoli esperienze fatte dal PASTEUR sugli animali, richiamò in modo speciale la sua attenzione quella relativa ad un cane; il quale, superstita un anno innanzi alla morte di due ani-

(1) Anche fuori del Laboratorio del PASTEUR, la ricerca del microbio della rabbia è stato ed è un argomento prediletto di studio. I più s'accordano nel ritenerlo un micrococco (GIBIER, RIVOLTA, FOL, BABÈS). Molto attendibili sembrano i risultati di questi due ultimi osservatori. Il FOL, per l'esame microscopico dei centri nervosi, si è servito del metodo d'indurimento di ER-LIZKY, e del metodo d'impregnazione emossilica di WEIGERT; ed è riuscito ad isolare, sopra un terreno di coltura espressamente preparato con cervello di montone, una varietà di micrococchi molto affini a quelli designati dalla ricerca istologica. Il BABÈS parla di risultati analoghi ottenuti sul comune siero di sangue e sul brodo gelatinizzato di cervello di coniglio. Tutti e due sarebbero riusciti, più di una volta, ad infettare di rabbia gli animali con i prodotti delle loro coltivazioni artificiali. Recentissimamente (Giugno 1886) è apparsa nel *Lancet* una comunicazione preventiva del DOWDESWELL, il quale con un metodo affatto speciale di colorazione (non essendo a lui riuscito quello impiegato dal FOL) trova, soprattutto nella midolla spinale e nella midolla allungata, dei micrococchi non piccolissimi, difficilmente colorabili, e che talvolta si presentano in ammassi attorno alle pareti vasali e tra i corpuscoli rossi.

mali compagni di esperienza, si mostrò refrattario alla infezione in due successive prove di trappazione. Non poteva credersi che fosse naturalmente immune, avendo l'animale dietro il primo innesto presentati segni evidenti di rabbia: si era perciò di fronte ad un esempio di immunità relativa, il quale portava a mettere la rabbia tra le malattie virulente che non recidivano.

Ecco il primo passo verso la immortale scoperta della profilassi della rabbia, che quindi innanzi fu l'unico pensiero del PASTEUR. Se non che il problema si presentava con condizioni affatto eccezionali, trovandosi la prima volta ad aver che fare con un virus, incapace di coltivarsi su terreni artificiali. Tuttavia a lui non era nuovo, per i suoi precedenti studi sul Mal rosso, che anche l'organismo vivente si presta alla produzione sperimentale di diversi stati di virulenza di uno stesso virus. La via dunque era trovata, e non poteva essere che una, *saggiare cioè il modo di comportarsi del virus rabido sull'organismo di diversi animali.*

E moltiplicando le esperienze d'infezione su vasta scala, non tardò il PASTEUR a convincersi che, analogamente a quello del *rouget*, il virus della rabbia, passato successivamente da uno ad altro animale della medesima specie per un certo numero di volte, mostra tendenza in alcuni animali ad affievolirsi ed in altri a rinforzarsi. Di fatti, se a partire, per mo' d'esempio, da un cane idrofobo di strada, si provoca la infezione in una scimia, da questa in un'altra scimia, dalla seconda in una terza e così via via; prestamente vedesi il virus indebolirsi a tal segno, che riportato sull'organismo del cane non produce più effetto. Per contrario, se il virus primitivo del cane s'innesta al coniglio o alla cavia; col procedere innanzi nella

serie delle inoculazioni successive, notasi la durata della incubazione farsi via via più breve, e raggiungere a capo di un gran numero di passaggi un *minimum* pressochè fisso, che per il coniglio è di 6-7 giorni e per la cavia di 4-5. Or questo fatto non saprebbe altrimenti intendersi, se non ammettendo, che il virus si modifichi nel senso di una più attiva moltiplicazione e diffusione; ed è così che parlasi di rinforzamento della sua specificità nell'organismo del coniglio, e prendesi la durata dell'incubazione come misura del grado di virulenza.

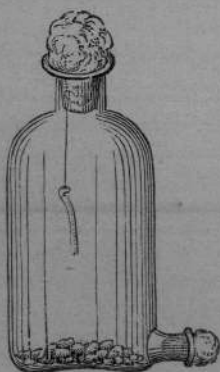
Ciò posto, il virus affievolito ad un certo grado sulla scimia, se non dà la rabbia al cane, può comunicarla al coniglio dopo un lungo periodo d'incubazione. E come occorre un numero grandissimo di passaggi su questo animale, per riportarlo al grado massimo di virulenza; così, partendo da un termine della serie di scimie piuttosto elevato, può lo sperimentatore creare sul coniglio e mettere a sua disposizione una serie progressiva di stadii di virulenza, i quali, messi singolarmente a fronte dell'organismo del cane, si appalesano come virus successivamente innocui, deboli, attivissimi. E si perviene a questo importante risultato; che se un certo numero di cotesti virus s'inoculano l'un dopo l'altro sotto la pelle o nelle vie sanguigne di uno stesso cane, i primi lo preservano dall'azione dei virus meno attenuati, e questi alla loro volta dai virus assolutamente mortali. L'animale dicesi allora *vaccinato*: esso è divenuto refrattario alla infezione rabica; poichè si può impunemente, non che esporlo al morso di un cane con rabbia spontanea, ma inoculargli eziandio per trapanazione il virus rinforzato al massimo nel coniglio.

Così il PASTEUR ribadiva con lo studio della rabbia il principio da lui stabilito, della variabile virulenza degli agenti infettivi; ed acquistava alla scienza un altro dato di fatto, per affermarne la grande importanza pratica. Col suo metodo rese un gran numero di cani refrattarii alla rabbia; e dimandò e ottenne dal Ministro della pubblica istruzione, che una commissione di eminenti scienziati controllasse i suoi maravigliosi risultati di vaccinazione.

Arrivato a questo punto, non poteva il PASTEUR non chiedere a sè medesimo, se per avventura non si trovasse di possedere un espediente, valevole a prevenire lo sviluppo della rabbia nell'uomo in seguito a morsicatura, ed a ritogliere tante vittime alla più terribile delle morti. Se non che il metodo, che gli aveva dato di creare l'immunità per la rabbia nei cani, era ancora ben lungi dal possedere i necessari requisiti per un'attuazione pronta e rapida, quale si conviene al caso dell'uomo.

Ogni difficoltà cadde alla scoperta di un nuovo e facilissimo metodo di attenuazione del virus. Se si espone all'essiccamento un tratto di midollo rabido, la sua virulenza viene bel bello scemando, e la capacità sua a riprodurre la rabbia diventa via via più incerta, in ragione della durata dell'essiccamento. Ciò posto, nulla è più facile che di procurarsi una serie di virus, successivamente l'uno meno forte dell'altro, sospendendo in una fiala di vetro sterilizzata, con dei pezzi di potassa caustica nel fondo (Fig. 2), un tratto di midollo di coniglio, morto d'un virus di brevissima incubazione. Se l'estrazione della midolla, e tutte le altre operazioni successive si praticano con le maggiori possibili cautele di purezza, non v'ha pericolo che il pezzo

messo ad attenuare vada in preda alla putrefazione: soprattutto poi l'essiccamento procede così rapido sotto l'influenza della potassa, che qualche



(Fig. 2)

germe di quella eventualmente cadutovi ne resta senz'altro sterilizzato. Ora, regolando la inoculazione degli animali col virus fisso in maniera, che quotidianamente qualcuno ne muoia; riesce, per cotesto mezzo semplicissimo, di avere giorno per giorno disponibile un gran numero di midolle a diverso grado di attenuazione, dalle più innocue alle più virulente.

Ciò posto, ecco il modo facile, di rendere un cane refrattario alla rabbia in un tempo relativamente breve. Ogni giorno gli si inocula sotto la pelle una siringa di Pravaz di brodo sterile, in cui si è stemperato un pezzettino di una di coteste midolle attenuate. Si comincia da una midolla che conta oltre dieci giorni di essiccamento, da essere sicuro che la sua virulenza è completamente spenta (1); e, passando per midolle via via più recenti separate da un intervallo di due giorni, si arriva

(1) Non si può dire a priori da qual termine della serie di midolle occorre cominciare; perchè l'attenuazione non è semplicemente proporzionale alla durata dell'essiccamento, avendovi altresì influenza la spessezza della midolla, e soprattutto il grado di temperatura ambiente. La temperatura della està esige una durata di esposizione minore che quella dell'inverno. Sorge perciò la convenienza, di tenere le midolle in attenuazione in una camera a temperatura pressochè costante, per evitare lo sconcerto di dovere volta per volta ripetere la determinazione della scomparsa della virulenza, quando si voglia praticare la vaccinazione su larga scala.

ad una virulentissima, che abbia subito l'influenza dell'aria secca per uno o due giorni solamente. Ad un cane così operato, si può in seguito impunemente inoculare, magari per trapanazione, il prodotto di una midolla freschissima di coniglio, non assoggettata ad alcuna influenza attenuatrice. Questo metodo, oltre di essere di facile applicazione, ha sull'altro primamente impiegato dal PASTEUR il vantaggio, di garantire il risultato che vuolsi ottenere senza eccezione alcuna. Le prove di controllo, che il PASTEUR viene via via facendo ora a questo ora a quello dei suoi cani vaccinati con questo metodo, non ci dicono ancora quale durata abbia l'immunità conferita con l'innesto rabido.

La storia della scienza registrerà tra le date più gloriose quella del 6 Luglio 1885, in cui il PASTEUR, non senza grave preoccupazione, ardì di tentare il nuovo metodo di vaccinazione antirabica sopra un fanciullo alsaziano, GIUSEPPE MEISTER, presentatosi a lui con 14 ferite inflittele due giorni prima da un cane arrabbiato. Tuttochè le principali di queste morsicature fossero state cauterizzate all'acido fenico 12 ore dopo l'incidente, l'avviso dei professori VULPIAN e GRANCHER, cui PASTEUR desiderò mettere a parte della sua responsabilità, fu, che per il numero e l'intensità delle ferite il piccolo MEISTER fosse pressochè fatalmente esposto a morire di rabbia. Laonde, procedendo con la massima circospezione, fece praticare agl'ipocondrii del fanciullo 12 inoculazioni nel termine di 10 giorni, cominciando con una midolla che contava 14 giorni di essiccamento e terminando con la midolla di un coniglio morto il giorno avanti. Nel medesimo tempo istituì una serie d'innesti per trapanazione su conigli sani, con gli stessi virus che via via ve-

niva inoculando a MEISTER; donde poi constatò, che le cinque ultime inoculazioni erano sicuramente attive, avendo riprodotto la rabbia negli animali dopo 15, 8 e 7 giorni d'incubazione, proporzionatamente al grado rispettivo di virulenza.

Or son passati più che 13 mesi da questa memorabile esperienza, e la salute del MEISTER non lascia alcunchè a desiderare. Un'inchiesta ordinata dall'autorità germanica ha messo fuori dubbio la esistenza della rabbia nel cane che lo avea morsicato, ed ogni spirito prevenuto contro l'efficacia della cura profilattica praticatagli dal PASTEUR, non può almeno sconvenire in ciò; che essa ha reso possibile, in un fanciullo di 9 anni, *la perfetta tolleranza di un virus rabido a brevissima incubazione*, più attivo cioè di quello che esiste nella stessa saliva degli animali spontaneamente arrabbiati.

La notizia di tanto successo fece tosto il giro del mondo; e, in meno di un anno, si sono visti accorrere al Laboratorio di via d'Ulm a Parigi oltre 1500 morsicati, per subirvi le inoculazioni profilattiche. Col succedersi delle osservazioni la pratica ha insegnato, non esser necessario, nella generalità dei casi, spingersi all'uso di virus fortissimi, così come fu fatto la prima volta per MEISTER. Epperò il numero dei vaccini si è ridotto a dieci, il primo e l'ultimo preparati rispettivamente da midolle rabiche, che hanno subito 14 e 5 giorni di essiccamento; e l'uno dopo l'altro si vengono via via inoculando a ciascun morsicato nel termine di 10 giorni. La inoculazione suole praticarsi nel lasco connettivo sottocutaneo della zona superiore del ventre, mediante la siringa di Pravaz ripiena a metà o poco più di liquido. Il virus fisso, punto di partenza per la confezione

dei diversi virus-vaccini, è fornito in base ad un bene ordinato ciclo di morti in una lunga serie di conigli rabidi; la quale, cominciata il 15 Novembre 1882 con la inoculazione sottomeningea della sostanza cerebrale di una vacca, morta di rabbia nei dintorni di Melun, si continua tuttodì, perpetuando con sorprendente regolarità il virus al grado massimo di virulenza raggiunto verso il 50° passaggio, a cui corrisponde una durata minima d'incubazione di 6-7 giorni. Si ha cura di allestire i liquidi vaccinali dalle midolle attenuate in un tempo il più vicino possibile al momento di servirsene; la quale cautela riparando, a mio modo di vedere, a qualche piccola imperfezione di tecnicismo, inevitabile per la natura stessa della cosa, costituisce forse il segreto per cui, tra tante migliaia di iniezioni ipodermiche, non vedesi pur una dar luogo a incidenti infiammatorii e suppurativi.

Attualmente il PASTEUR esegue la cura a tutto rigore, presso a poco come fece per MEISTER, nel caso speciale dei morsicati da lupi. Le morsicature di lupo arrabbiato sono notoriamente di gran lunga più pericolose di quelle del cane o di altri animali domestici; tanto che sono eccezionali i casi che sfuggono alla morte, e devesi appunto ad esse la maggior parte degl'insuccessi che finora il metodo profilattico registra.

Il PASTEUR, cercando la ragione del fatto, ha inoculato a diversi animali la sostanza nervosa di alcuni russi, morti in seguito a morsicatura di lupo durante il trattamento profilattico, ed ha ottenuto lo sviluppo della rabbia *con l'ordinario periodo d'incubazione, che presenta il virus della rabbia del cane di strada*. Tale esperimento (isti-

tuito altresì a proposito di pochi casi infelici tra i vaccinati per morsicature di cani), mentre esclude il dubbio che la morte potesse essere stata conseguenza delle ultime inoculazioni profilattiche, poichè in questo caso lo sviluppo della rabbia negli animali messi in esperimento avrebbe dovuto presentare una più breve durata d'incubazione; nel medesimo tempo induce a credere, non esistere sostanziale differenza tra il virus della rabbia del lupo e quello della rabbia canina. Di modo che, non si saprebbe dare più plausibile spiegazione della differenza di mortalità, se non ammettendo: che il numero maggiore, la maggiore ampiezza e profondità delle ferite, che sogliono riportare i morsicati da lupo, abbiano verosimilmente per effetto d'innestare il virus rabido sopra più vasta superficie e in parti più disposte all'assorbimento, da riuscire di conseguenza ad abbreviare la durata dell'incubazione.

Gli è in base a queste esperienze e considerazioni, che il PASTEUR ha creduto utilmente modificare l'ordinario trattamento nel caso speciale dei morsicati da lupi. Ed insistendo più che mai sulla condizione, di non mettere tempo in mezzo a intraprendere la cura, moltiplica il numero delle inoculazioni da farne più di una al giorno; e, senza prolungare la durata del trattamento, si spinge fino all'uso di una midolla rabida di due giorni a vie meglio assicurare lo stato refrattario. V'ha ancora un altro caso, in cui il PASTEUR pratica un trattamento rapido ed energico; ed è, quando l'individuo morsicato vedesi sotto la minaccia dei sintomi precursori dell'accesso rabico, per tentare possibilmente di abortirlo.

Quale interpretazione potrebbe darsi di questo

nuovo metodo di prevenire la rabbia in seguito a morsicatura? Manifestamente, esso non ha riscontro esatto con gli altri noti processi di vaccinazione; poichè non trattasi di provocare con l'innesto protettivo una forma benigna della specifica infezione, bensì creasi l'immunità per un tale avvezzamento graduale dell'organismo all'influenza di virus successivamente innocui, deboli, attivissimi. E cotesto avvezzamento è più apparente che reale; dappoichè non si dà a ciascun virus il tempo necessario per manifestare l'energia di cui è capace, com'è il caso ad es. del duplice innesto nella pratica della vaccinazione carbonchiosa; ma le singole inoculazioni si seguono a breve intervallo, e regolarmente non ha luogo alcuna reazione dell'organismo.

Epperò il concetto più plausibile che possiam farci circa l'attenuarsi delle midolle rabide a contatto dell'aria secca, si è quello di pensare meno ad un affievolimento intrinseco della energia del virus, che ad un progressivo impoverirsi dell'elemento attivo di esso. Più propriamente, tratterebbesi di una *modificazione in quantità* di cotesto elemento, per rispetto a qualche altra cosa che accompagna la sua vita, ed ha forza di opporsi al suo ulteriore sviluppo. Con altro dire s'immagina, che l'ignoto microrganismo che forma l'essenza del virus rabido, trovisi nella sua naturale evoluzione prestamente in presenza di un principio non vivente; il quale abbia la proprietà di preparare, via via che si produce, un terreno disadatto all'ulteriore crescimento di quello, analogamente al prodotto di elaborazione dell'*Aspergillus niger*, che necessita nel liquido di RAULIN la presenza del ferro.

Con cotesto modo d'intendere la vaccinazione

antirabica, essa rientra perfettamente sotto uno dei due concetti generali svolti nel precedente capitolo, a proposito della immunità patologica. Il segreto della cura starebbe in un mutamento della crasi degli umori e dei tessuti per effetto del principio non vivente del virus; il quale, col progressivo essiccarsi delle midolle, trovasi via via in aumento relativo per rispetto al principio attivo, se questo realmente diminuisce. E sotto questo punto di vista, ognuno scorge di quanta luce si rischiari la cura profilattica del PASTEUR, e come non sia del tutto infondata la speranza, di poter giungere un giorno per fino ad abortire la minaccia dell'accesso rabico.

Se fosse lecito nell'uomo, così come negli animali, produrre un controllo sperimentale dello stato refrattario acquisito; manifestamente la efficacia del metodo profilattico sarebbe messa ad una prova ineluttabile. Ma non essendo ciò possibile altrimenti, che quando per caso qualcuno dei vaccinati dal PASTEUR venisse di nuovo morsicato da un animale certamente rabbioso e si abbandonasse alla sua sorte; nè volendosi accettare l'argomento di analogia che risulta dalle esperienze sugli animali, o dare gran peso al fatto della *perfetta tolleranza degli ultimi vaccini*, che hanno un grado non insignificante di virulenza; chiaro è, che unica stregua del giudizio debb'essere la statistica.

Or i dati statistici, che finora si posseggono, giustificano pienamente l'efficacia del metodo profilattico; e non ha guari DUJARDIN-BAUMETZ rilevava (1), *che in seguito all'apertura della clinica di via d'Ulm, la mortalità per rabbia a Parigi è pres-*

(1) Da un Rapporto al Consiglio d'Igiene pubblica.

sochè scomparsa. Chè facendo astrazione da una cinquantina di morsicati da lupo, che han dato al PASTEUR 7 insuccessi (e si sa, che la mortalità abituale per morsicature di lupi non è inferiore all'82 %); su tutta la grande massa dei vaccinati in seguito a morsicature di cani, o eccezionalmente di altri animali domestici, che omai va oltre la cifra di 1700, fin qui non si registrano che 4 morti (1).

Ma si obietta: fra tanto affluire di gente, quanti possono certificare di essere stati morsicati da animali veramente rabbiosi? quanti non avranno sterilizzato issofatto il virus, mercè una efficace medicatura della ferita? quanti non saranno, a cui il virus non è riuscito a infiltrarsi nelle carni, respinto da una copiosa fuoruscita di sangue? e quanti finalmente, che non saranno stati neppure tocchi dal virus, vuoi arrestato nella spessezza degl'indumenti, vuoi esaurito in precedenti sfoghi di rabbia, come dicesi poter succedere allorchè un animale arrabbiato morde successivamente un gran numero di persone?

Quale che sia il valore di coteste obiezioni, sia in tesi generale, sia in rapporto con la statistica del PASTEUR, io non sento il bisogno di fer-

(1) Fino al 15 Maggio si avevano le cifre seguenti, fornitemi personalmente dal PASTEUR per la Relazione ufficiale al Ministero di Agricoltura, Industria e Commercio, la quale porta la data da Parigi del 18 Maggio:

Numero dei vaccinati = 1045, tra cui 46 morsicati da lupo;

Numero dei vaccinati usciti fuori del periodo ancora temibile per lo sviluppo della rabbia = 460;

Numero dei morti = 8, tra cui 6 per morsicature di lupo.

Il 2 Agosto la statistica è rappresentata dalle cifre qui appresso, disposte nel medesimo ordine:

1753 — 54 ; 1100 ; 11 — 7.

Esse mi furono fornite gentilmente dall'amico D. R. RANDAZZO di Catania, dietro informazione autentica.

marmici più che tanto. Non posso però tacere a questo proposito, che il PASTEUR esige regolarmente un certificato di medico o veterinario sullo stato di salute degli animali voluti rabbiosi; che d'ordinario rifiutasi alla cura d'individui morsicati in parti coperte, dove non ci sia stata ampia lacerazione delle vesti; e che non trascura di redigere in ciascun caso una breve nota clinica, fornita dei particolari più importanti. Di modo che, egli ben trovasi in possesso degli elementi necessari per far ragione di buona parte di quelle difficoltà; e potrà a suo tempo metter fuori una statistica la più possibilmente rigorosa.

Tuttavolta, poichè le statistiche comuni della mortalità per rabbia non sono, generalmente parlando, gran fatto meno appuntabili, è sempre possibile un confronto. Secondo un rapporto del *Consiglio d'igiene pubblica e di salubrità del Dipartimento della Senna*, nel 1885 si sarebbero avuti 19 morti per rabbia sopra 719 morsicati da cani o da qualche altro animale domestico, avendosi però solo per 64 di essi motivi sufficienti ad affermare negli animali l'esistenza della rabbia. Come vedesi, l'è una statistica superiore ad ogni sospetto; poichè dà un per cento di morti relativamente piccolo, di fronte per esempio ad una statistica tedesca (NOWAK), che dà una *mortalità reale* (1) di 35 %. Or tengasi presente, che tra i 1700 vaccinati dal PASTEUR in seguito a morsicature di cani, ben 1100 trovansi abbastanza allontanati dal tempo della presuntiva inoculazione del virus, stando all'ordinaria durata dell'incubazione della rabbia nell'uomo, che è di 40-60 giorni. E se nella statistica sopra

(1) Per brevità chiamo *mortalità reale* quella che si rapporta ai casi *attendibili* di morsicatura, dove cioè si ha sicurezza della esistenza della rabbia negli animali.

riferita si contano 19 morti, sopra una cifra bruta di morsi che presenta il 9% di casi attendibili; chi oserebbe sfrondare la statistica del PASTEUR sino al punto, da non concedere che nella cifra di 1100 morsi ci sia almeno il 5% di casi attendibili? E ridotti in questi limiti, con la cura profilattica non avremmo neppure una mortalità reale dell'8%; giacchè, come si disse, si registrano fin qui quattro soli insuccessi tra i vaccinati in seguito a morsicatura di cani o di altri animali domestici (1).

Non insisto con nuovi confronti, perchè credo che si possa e giovi attendere ancora qualche tempo, per servirsi a dovere del criterio statistico. Non è passato un anno che si sperimenta sull'uomo, e nulla sappiamo ancora, così dei possibili esiti lontani della cura, come dei vantaggi che ad essa presumibilmente apporteranno le modificazioni del metodo già introdotte, e quelle che per avventura potranno via facendo la pratica e il progresso della scienza suggerire.

Intanto, senza nascondere che il criterio statistico sarà sempre l'unico argomento possibile, per accreditare la scoperta del PASTEUR dinanzi alla grande massa del pubblico; io chiedo a me stesso, se dinanzi al tribunale della scienza non abbia uguale valore, e magari più grande, l'argomento di analogia che può desumersi dall'applicazione del metodo agli animali, dove è lecito fornire un controllo sperimentale della immunità conferita.

(1) Ho avuto testè contezza di questo dato statistico interessantissimo, che si conta un solo morto sopra 96 individui curati dal PASTEUR per morsicatura di cani, accertati rabbiosi da lui medesimo mercè l'innesto della sostanza nervosa nel coniglio. Si avrebbe quindi una mortalità reale di 1,04%, che non può avere riscontro in nessuna delle statistiche comuni.

Manifestamente, nel caso che ci riguarda, l'analogia ha forza d'argomento affatto eccezionale, trattandosi di una infezione per la quale gli animali, ed in ispecie il cane, sono assai più disposti dell'uomo. Gli è un fatto della più volgare esperienza, che la morsicatura d'un cane idrofobo costituisce *quasi sempre* un pericolo per un gran numero di animali domestici, mentre non può dirsi altrettanto dell'uomo. E di cotesta differente suscettibilità per la rabbia troviamo, forse, un indizio nello stesso dato sperimentale offertoci dal PASTEUR, che l'organismo della scimia, animale prossimo all'uomo, affievolisce l'energia del virus rabido. Or bene, se il metodo profilattico del PASTEUR riesce con tutta sicurezza ad acquistare agli animali, e segnatamente al cane, la immunità per la rabbia, perchè non dovrebbe valere a prevenire lo sviluppo di essa nell'uomo, di sua natura meno disposto a contrarre quella infezione? (1)

Cosicchè i risultati pratici fin qui ottenuti e i dati sperimentali, che guidarono il PASTEUR a met-

(1) Ch'io sappia, non vi sono ragioni speciali, che spieghino in modo soddisfacente nella razza umana la sproporzione dei casi di rabbia, per rispetto al numero dei morsicati *attendibili*. Le stesse morsicature in parti denudate, e magari quelle del viso che vanno tra le più pericolose, danno al massimo 180 % di morti. Non so se siasi messa mai in campo un'altra possibile ragione; che cioè, contenendosi nella saliva dei cani idrofobi anche il germe della suppurazione, questo prevalga in singoli casi, e nell'uomo più spesso che non negli animali, dove le ferite cutanee notoriamente guariscono con assai facilità. Ma neppure è un fatto frequentissimo nell'uomo la voluta ostinatezza delle morsicature rabide nel venire a cicatrice. Del resto, dato pure che non sia ammissibile una minore suscettibilità dell'uomo per la rabbia in confronto degli animali, nessuno potrà affermarla maggiore; e l'argomento di analogia, nel modo da me invocato a difesa del metodo PASTEUR, non cessa di avere la sua grande importanza.

tere in campo la cura profilattica della rabbia in seguito a morsicatura, militano manifestamente in favore della stessa.

A torto poi le si nega da alcuni ogni opportunità, o per troppa fede nell'efficacia dei mezzi di medicatura locale, ciò che numerosi esempi smentiscono (1); o per la sicurezza, che in loro generano i provvedimenti di profilassi pubblica. Non v'ha dubbio, che presso noi la rabbia figura tra le malattie più rare, e che la causa prossima della infezione può dominarsi con un bene organizzato servizio di pubblica igiene. Ma è pur vero, che malgrado le più energiche e pronte causticazioni delle ferite, malgrado i più severi regolamenti sanitari, qualche infelice morsicato vi sarà sempre, che reclami la conservazione della propria esistenza; e si ha l'obbligo di venire in suo aiuto, se la scienza ne possiede il mezzo. E messa pure da banda la quistione pratica, non v'ha chi non scorga nella scoperta del PASTEUR una importanza scientifica

(1) Tra gli esempi citati a questo proposito dal PASTEUR trovo quello di un cane, che nello stesso giorno morde un uomo, 7 maiali e 2 vacche. Tutti e 9 gli animali furono causticati da un veterinario col ferro rovente; e, ciò non pertanto, presero la rabbia e morirono, non senza grande spavento dell'uomo, che corse difilato al PASTEUR. — Un altro esempio molto istruttivo, anche sotto il rispetto della strana durata d'incubazione che talvolta la rabbia presenta, lo trovo nel mio registro degli italiani, che durante la mia dimora a Parigi han fatto la cura profilattica. ERICO RE e FRANCESCO PAGANI da Legnano mi raccontarono, esser stati morsicati 8 mesi prima da un cane accertato rabbioso, il quale nel medesimo giorno aveva morso altri 8 individui, tra cui la Contessa del Maino e il suo cuoco; e fu in seguito alla morte di tre di essi, che RE e PAGANI si decisero a fare la cura profilattica. Queste tre morti avvennero rispettivamente a capo di 15 giorni, 4 mesi e 7 mesi dalla morsicatura. A giudizio dei medici, non ci sarebbe stato alcun dubbio sul genere di morte. Tra le vittime fu la contessa. Ora il primo morto e RE e PAGANI erano stati cauterizzati colla pietra infernale; la contessa e il terzo morto col ferro rovente (2).

colossale; poichè, confermando certi principii di patologia generale, e mettendo in campo dei preziosi mezzi d'indagine, feconda sempre più il cammino alla ricerca del vero, e spiana la via per nuovi possibili trovati, che sieno per riuscire di un interesse umanitario grandissimo.

Ecco abbozzata la storia di questa clamorosa scoperta, che come le altre ha radice in quelle medesime prime ricerche del PASTEUR sugli organismi delle infusioni, a proposito delle quali il gran TYNDALL, dieci anni or sono, gli scriveva queste memorabili parole:

« Per la prima volta nella storia della scienza
« abbiamo il dritto di nutrire speranza certa e si-
« cura, che, relativamente alle malattie epidemiche,
« la medicina sarà ben presto sottratta all'empiri-
« smo e messa su basi scientifiche reali. Quando
« quel gran giorno sarà giunto, a mio avviso, saprà
« il mondo riconoscere, che spetta a voi la mi-
« glior parte della sua gratitudine. »

E il gran giorno preconizzato dal TYNDALL potrebbe per avventura essere arrivato; se JURIEN DE LA GRAVIÈRE, presidente dell'*Accademia delle Scienze*, sentita la comunicazione del PASTEUR sui primi risultati della cura profilattica della rabbia, non osa esprimergli tutta la sua ammirazione e riconoscenza, temendo di attribuirsi il diritto di parlare, non più a nome dell'*Accademia*, ma a nome della umanità tutta quanta (1).

(1) Da poco tempo in qua, il PASTEUR ha reso possibile che le sue classiche esperienze si ripetessero in altre parti di Europa, cedendo la semenza del virus rinforzato o fisso. Così si sono visti sorgere sollecitamente diversi servizi di vaccinazione in Russia (Odessa, Pietroburgo, Ssmara), uno a Vienna; ed una inchiesta ordinata dal Governo inglese, per giudicare alla guida dell'esperimento il valore terapeutico del me-

todo PASTEUR, già si dichiara favorevole alla efficacia delle inoculazioni antirabiche.

L'esempio ha avuto imitatori anche in Italia; e non ha guari ho intrapreso anch'io, coadiuvato dal dottor ZAGARI, gli studi preliminari nel Laboratorio della Clinica CANTANI, partendo da due conigli inoculati a Parigi il 24 Luglio, che i distinti dottori GASPARI e RANDAZZO (recentemente delegati a studiare il metodo di profilassi della rabbia dalle rispettive provincie Teramo e Catania) ottennero dalla gentilezza dell'eminente scienziato francese, e che essi donarono al CANTANI.

Il buon esito delle trapiantazioni del virus fatte su larga scala alla morte dei due animali, e via via in prosiegua, mi ha in breve tempo messo al punto di possedere un numero sufficiente di cicli d'inoculazione a diversa scadenza, e con ciò la serie progressiva delle midolle attenuate, necessaria alla pratica della vaccinazione. Delle quali mi servirò innanzi tutto per provarmi a rendere dei cani refrattarii, ed a curarne altri in seguito a morsicatura, desiderando, prima di passare all'uomo, poter offrire una garanzia del mio operare.

V.

Ricordi del Laboratorio Pasteur.

SOMMARIO. — Sterilizzazione dei liquidi di coltura per mezzo della filtrazione. — La Pipetta Pasteur. — Coltura de' microrganismi anaerobi. — Conservazione dei virus. — Mezzi d'iniezione dei medesimi.

Piacemi terminare con pochi ricordi di tecnica batteriologica, limitandomi a quelle cose che formano, direi quasi, una specialità del Laboratorio PASTEUR. Mi lusingo di fare con ciò cosa grata ai cultori della batteriologia in Italia; i quali difficilmente trovano ne' manuali da laboratorio una descrizione sufficiente di alcune utili pratiche, le quali accoppiate ai metodi alemanni, presso noi generalmente in voga, completano la tecnica batteriologica.

a) IL FILTRO CHAMBERLAND.

Si sa, che il mezzo più comunemente impiegato per isterilire i materiali di coltura è il calore. E come alcuni di essi non consentono una temperatura molto alta o molto prolungata (esempio le gelatine, che oltre 100° perdono la proprietà di rapprendersi); e come d'altra parte la temperatura di 100°, se uccide le *forme adulte* de' microbi, non spegne la vitalità delle *forme perennanti* o *spore*; così, seguendo la tecnica del KOCH, è invalso l'uso di fare la così detta *sterilizzazione discontinua* del TYNDALL. Cioè dire, i liquidi di coltura in genere (eccettuato il siero del sangue che si sterilizza a non più di 60° C.), messi in appo-

siti recipienti, previamente sterilizzati con turacciolo di cotone a 150° C., vengono esposti tre volte di seguito e per un quarto d'ora ad una corrente di vapor d'acqua a 100° , facendo passare tra una sterilizzazione e l'altra un intervallo di 24 o 48 ore, a norma della temperatura ambiente. Operando in tal modo, se ad una prima azione del calore restano delle spore, esse, trovandosi in un mezzo adeguato si sviluppano in microbi, e sotto questa forma vengono uccise nella sterilizzazione successiva. Così il liquido di coltura rimane sterilizzato per uccisione immediata dei microbi, e per graduale esaurimento del contenuto di spore.

Si comprende però di leggieri, che l'influenza di una temperatura elevata può non riuscire indifferente alla composizione chimica del mezzo; ed il batteriologo sente talora il bisogno, di avere a sua disposizione un materiale di coltura chimicamente definito, che esposto a 100° di calore non sarebbe più desso. Per esempio, se si volesse preparare un terreno di coltura pel virus rabido con la sostanza cerebrale, siccome ha fatto il Fol, non si potrebbe sterilizzarlo al calore, senza ridurlo supergitù nelle condizioni di un comune infuso di carne, su cui l'innesto di quel virus non dà sviluppo alcuno di colonie. Inoltre, spesso occorre in batteriologia di saggiare i liquidi di coltura, che han servito allo sviluppo di un dato microrganismo, indipendentemente dalla presenza di esso: essendosi omai riconosciuto, che l'azione fisiologica di singoli virus è dovuta, non tanto ai microbi che li rappresentano, quanto ai prodotti di loro specifica elaborazione. Or la sterilizzazione al calore mette bensì fuori quistione l'influenza vitale dei microbi; ma non esclude l'eventuale influenza de' loro avanzi organici, e non sempre

lascia prevedere se il loro veicolo conservi immutata la chimica composizione, e quindi le sue proprietà fisiologiche.

L'uno e l'altro scopo si raggiungono mercè la filtrazione meccanica; ossia con quello stesso mezzo onde il PASTEUR riuscì a dimostrare, che la virulenza del sangue carbonchioso non può attribuirsi, non che ai corpuscoli, ma neppure a una sostanza diastastica disciolta nel plasma.

Essendosi dimostrato, che i materiali, onde son fatte le tante varietà di filtri inventati per l'economia domestica, sono tutti più o meno permeabili ai microbi (1), il problema di costruire un *filtro a microbi*, come si suol dire, è stato lungamente agitato e risoluto, entro limiti abbastanza estesi, dallo CHAMBERLAND nel Laboratorio del PASTEUR. E quivi si ricorre spesso al filtro CHAMBERLAND, per sterilizzare dei liquidi di coltura fatti specialmente a base di saccarosio, i quali a temperatura superiore di 100° resterebbero chimicamente alterati.

La parte essenziale di cotesto filtro è rappresentata da un vase cilindrico A di porcellana porosa ricotta (Fig. 3) che va col nome di *bougie*, chiuso ermeticamente dentro un manicotto metallico BCD. Il liquido da filtrare è ricevuto sotto pressione nello spazio E compreso tra i due cilindri cavi; ed essendo l'estremità aperta del vase poroso fuori l'astuccio metallico, la filtrazione in quello si fa da fuori in dentro. Il sistema innestato per l'estremo B al robinetto di un condotto

(1) Esistono in proposito numerosi lavori, tra cui uno recentissimo fatto nel Laboratorio del CANTANI dal D.^r SANNA-SALARIS, come contribuzione alla non potabilità delle acque filtrate in tempo di epidemia (V. *Giornale internazionale delle Scienze mediche*, Fascicolo di Luglio 1886).

d'acqua, costituisce la disposizione comunemente adottata in molte case di Parigi, per utilizzare il filtro CHAMBERLAND a scopo igienico.

Ben diverso però è il modo di usarlo nei Laboratorii, allo scopo di sterilizzare i liquidi di coltura. La *bougie* dev'essere previamente sterilizzata nella stufa a secco, avendo prima innestato al suo beccuccio, mercè cotone, una sfilatura F di tubo di vetro chiusa in basso. Messo quindi il vase poroso nel suo astuccio metallico, si avvita questo per l'estremo B ad un serbatoio anch'esso di metallo sorretto da un trepiedi. Il serbatoio ha coverchio a chiusura ermetica, munito di manometro, non che di un'apertura in cui si avvita un lungo tubo di piombo, che stabilisce la comunicazione con una macchina di compressione. Il liquido che si vuol filtrare si versa nel serbatoio metallico, che comunica con lo spazio E compreso tra la *bougie* e il suo astuccio. Quando tutto è all'ordine, si sterilizza con la fiamma a spirito la estremità della pipetta F, la si rompe con pinzetta sterilizzata e vi si adatta sotto un matraccio anch'esso sterilizzato, occludendo rapidamente il collo di questo col suo turacciolo di cotone. Per meglio guarentire l'orifizio del matraccio, si suole covrirlo d'un cappelletto di carta acconciato attorno alla pipetta F. Non resta allora che chiu-

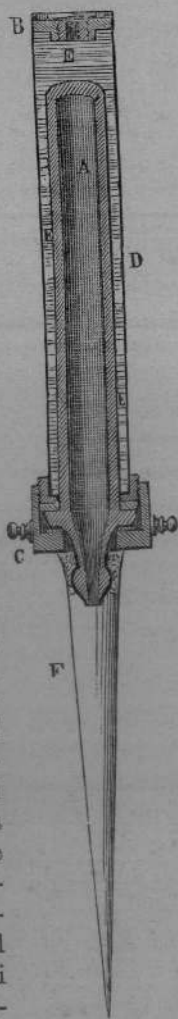


Fig. 3.

dere il serbatoio, e mettere in funzione la macchina a comprimere.

Il più delle volte si opera a circa 2 atmosfere di pressione, che in casi eccezionali può spingersi fino a 4: oltre di questo limite il vase poroso non resisterebbe. Dovendosi cambiare il recipiente in cui si riceve il liquido filtrato, s'interrompe l'effetto della pressione, girando un robinetto che sta tra il serbatoio e il filtro. Il liquido filtrato, prima di essere adibito come materiale di coltura, si tiene nella stufa d'incubazione per 48 ore.

Diversi liquidi possono a questo modo essere sicuramente sterilizzati. Anche il latte passa attraverso il filtro CHAMBERLAND, ma perde la parte grassa. La stessa *bougie* può servire più di una volta, quando si ha cura di lavarla per bene, e di farla lentamente prosciugare alla stufa. In ciò naturalmente v'ha un limite, determinato soprattutto dalla varia natura dei liquidi a filtrare (1).

b) LA PIPETTA PASTEUR.

Il brodo di vitello, di pollo ed altri materiali liquidi di coltura, che possono impunemente assoggettarsi ad una temperatura elevata, non sogliono sterilizzarsi più di una volta nel Laboratorio del PASTEUR; eseguendosi l'operazione in una grossa pentola alla PAPIN, che va in commercio col nome di *Autoclave de Chamberland*, regolata per una pressione del vapor d'acqua che corrisponde alla

(1) All'Esposizione d'Igiene urbana in Parigi ho visto figurare l'Apparecchio CHAMBERLAND con una piccola modificazione, che consiste nel ricongiungere il beccuccio del vase poroso col matraccio sottostante, mercè un tubo di gomma elastica. In tal caso va previamente sterilizzato, ma al calore umido, tutto il sistema formato dalla *bougie*, tubo e recipiente, il quale ultimo è rappresentato dalla Pipetta PASTEUR.

temperatura di 115°C . Tale temperatura, fatta agire per una minima durata di 10 minuti, regolarmente basta allo scopo che si vuol ottenere. Si dà quindi grande importanza al modo di travasare i materiali di coltura, per la loro ripartizione in piccoli recipienti; i quali, una volta riempiti, vanno semplicemente provati alla stufa d'incubazione per 48 ore.

All'uopo serve la *Pipetta Pasteur* (Fig. 4), ossia un palloncino di vetro B, fornito superiormente di lungo collo A zaffato di cotone, e di una tubulatura laterale C, che si ripiega in basso e finisce assottigliandosi. Questo apparecchio va previamente sterilizzato vuoto, alla maniera ordinaria, essendo già chiusa alla lampada l'estremità della tubulatura laterale.

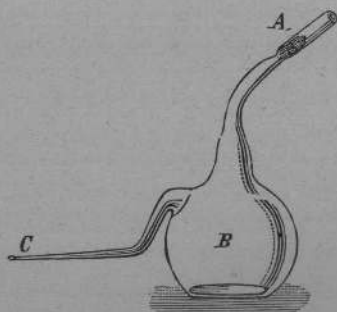


Fig. 4.

Suppongasi per es. di dover travasare del brodo, che si è sterilizzato nell'Autoclave dentro un pallone di vetro chiuso alla lampada, come ordinariamente si pratica. Si apre questo col carbone BERZELIUS; e, situatolo in posizione obliqua, vi si immerge dentro la tubulatura C della pipetta (aperta alla punta e passata prima sulla fiamma a spirito) e si aspira per il collo A. Una volta trava-

l'altezza di un quarto circa ; lo che si pratica , immergendo una per volta le appendici laterali, aperte in punta e passate alla lampada, dentro il recipiente che contiene il liquido , ed aspirando per il tubo mediano A. In una delle branche si mette liquido sterile, per es. del brodo di carne di vitello; nell'altro del brodo previamente seminato col microrganismo che si vuol coltivare. Resta allora di chiudere le appendici laterali, fondendole alla lampada; e l'apparecchio è pronto per praticarvi il vuoto.

All'uopo si adopera la macchina pneumatica a mercurio, la quale , là dove possiedesi una sufficiente pressione di acqua, può più comodamente essere sostituita dalla pompa BUNSEN. S'innesta l'apparecchio alla macchina pneumatica per la branca mediana A, servendosi di un robusto tubo di gomma elastica; e, fatto il vuoto, vi si fa passare mercè un gioco di robinetti del gas idrogeno o del gas carbonico assolutamente privi di ossigene , e si torna a fare il vuoto. Così operando per 4-5 volte di seguito, quella piccola quantità di aria che resta sempre nell'apparecchio, qualunque sia la capacità funzionale della macchina, si diluisce a tal segno, da potere dopo tutto ritenere, che non rimane traccia calcolabile di ossigene. Allora con un piccolo dardo di fiamma si fonde la porzione affilata del tubo mediano A, e si ripone l'apparecchio nella stufa d'incubazione.

Nel praticare il vuoto bisogna por mente, che il liquido entra in ebollizione, e i gas, che si sprigionano, si sollevano in forma di bolle umide fin verso la curvatura di riunione delle due branche dell'apparecchio; cosicchè v'ha pericolo imminente, che s'inoculi da per sè la branca con brodo sterile. Facile cosa è riparare a questo inconveniente, se

man mano che le bolle si formano, si riscalda dolcemente con una fiammella a gas le pareti dell'apparecchio: così le bolle si disfanno prima di guadagnar l'alto. È questo un punto molto delicato dell'operazione, che bisogna attentamente sorvegliare.

L'acido carbonico, ovvero l'idrogeno, destinato a spingere il vuoto d'ossigene al limite estremo, si conserva in un gazometro fatto di due vasi comunicanti a dislivello, dove si contiene un volume uguale d'una soluzione d'idrosolfito di soda. Stando il vase che porta questa soluzione ad un livello superiore, si ottiene così dall'altro un flusso di gas carbonico o d'idrogeno, il quale man mano che abbandona il recipiente proprio, vien rimpiazzato dal liquido. Se per questo si adoperasse dell'acqua semplice, non sarebbe possibile mantenere il gas così privo d'ossigene, come è stato preparato.

L'apparecchio a forchetta offre questo vantaggio, che la branca con brodo sterile serve di controllo alla branca inoculata; ed avvenuto lo sviluppo, si può ottenere una coltura di seconda generazione senza bisogno di rinnovare il vuoto, se inclinando il sistema in certo senso, si fa passare una goccia del liquido fecondato nel brodo della branca di controllo.

Della gelatina nutritiva si fa uso molto ristretto nel Laboratorio del PASTEUR; e quando si vuol coltivare sopra di essa un microrganismo anaerobo, per studiarne la forma della colonia, si procede come appresso. La gelatina è previamente messa e sterilizzata in una provetta di vetro piuttosto lunga, che si termina verso l'orifizio con una specie di collo, e che alla base di questo tiene saldato lateralmente ad angolo retto un altro piccolo tubo.

Le due branche, con cui la provetta si termina, portano ciascuna uno zaffo di cotone.

Essendo la gelatina a stato liquido, e la branca orizzontale dell'apparecchio chiusa alla lampada, si fa per l'altra il vuoto nella maniera precedentemente descritta, moltiplicando le cautele per rispetto alla produzione delle bolle, che, stante la viscosità della gelatina, saranno naturalmente in questo caso più copiose e tenaci. Allora si aspetta un poco che la gelatina si rapprenda. Poscia aperta con un colpo di lima la branca orizzontale, e mescolando in comunicazione col serbatoio di acido carbonico ovvero d'idrogeno, si distacca dalla macchina pneumatica il piccolo apparecchio; e si ha così in esso un flusso di gas, contro la pressione atmosferica, il quale va dalla branca orizzontale verso quella verticale. Nel frattempo s'introduce per quest'ultima un lungo filo di platino portante il materiale d'innesto, e si punge rapidamente la gelatina. Non resta quindi che chiudere alla lampada l'una e l'altra branca.

Stante la rarità de' microrganismi veramente anaerobi, la coltura nel vuoto riesce il più delle volte coltura d'isolamento. Tuttavia può darsi il caso, che in un materiale batterifero complesso altri sospetti più varietà di anaerobi, o che vi sieno simultaneamente degli aerobi capaci di pullulare nel vuoto; sicchè nasce il bisogno di fare la coltura in placca. Si adopera all'uopo un grosso tubo di vetro lungo 20-25 centimetri, che si tira negli estremi alla lampada e si piega a forma di U. Avendolo previamente sterilizzato, vi si fa entrare da una delle branche per aspirazione la voluta quantità di gelatina, già innestata e convenientemente rimescolata. Quindi si pratica il vuoto alla maniera solita, dopo di che la gelatina si lascia rappren-

dere a larga superficie. Avvenuto lo sviluppo delle colonie, si divide il tubo col diamante nel senso della lunghezza, e la doccia che ne risulta si sottomette all'esame microscopico.

d) CONSERVAZIONE DEI VIRUS.

Nel Laboratorio del PASTEUR si dà grande importanza al modo di conservare gli esemplari di colture patogene, avuto riguardo all'influenza attenuatrice, che spiegano sulla loro energia l'ossigene atmosferico, e in parte anche la luce del sole. Epperò si usa di tenerli in tubi chiusi alla lampada, in cui cercasi di lasciare la minore possibile quantità di aria. Questi tubi poi ravvolti ben bene in carta si mettono in luogo oscuro.

Vogliasi, a mo' d'esempio, conservare del sangue carbonchioso. Prendesi una pipetta di vetro sterilizzata (1), e si tira alla lampada in B in modo, da darle la figura disegnata a fianco. Messo allo scoperto il cuore di un animale morto di carbonchio, vi si passa sulla superficie una bacchetta di vetro fortemente riscaldata, e s'immerge nella muscolatura la punta rotta della pipetta, passata prima sulla fiamma a spirito. Quindi si aspira il sangue fino al punto B, e si chiude l'estremo libero alla lampada a spirito. L'altra chiusura al di sopra di B va fatta al cannello, mercè un dardo piccolissimo.

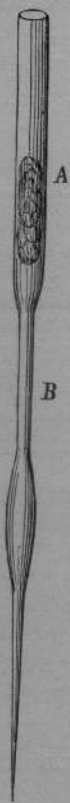


Fig. 6.

(1) Si fa grande uso nel Laboratorio PASTEUR di pipette di vetro, che tra le altre cose, sostituiscono regolarmente il comune filo di platino per la pratica degli innesti. Epperò se ne ha sempre in pronto una buona provvista. Esse vanno sterilizzate con uno zaffo di cotone, e si conservano saldate alla punta.

Avvenuta la fusione del vetro, si tira fino a tale sottigliezza, da bastare poscia un semplice colpo di fiamma per dividere la pipetta in due, con chiusura esatta della porzione inferiore.

e) MEZZI D' INIEZIONE DEI VIRUS.

L'istrumento più generalmente adoperato a questo scopo è la siringa di Pravaz, variamente graduata a seconda delle circostanze, fatta di argento e con stantuffo di cuoio o di gomma a ricambio. La si sterilizza al calore umido, oppure si lava con una soluzione di potassa caustica e poscia ripetutamente con acqua sterilizzata.

Per piccolissime quantità di liquidi da iniettare, si ricorre volentieri alle comuni pipette di vetro sterilizzate. Quando poi si devono iniettare delle

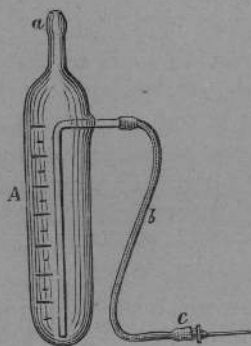


Fig. 7.

grandi quantità, si fa uso di una provetta graduata di vetro, della forma disegnata nella Fig. 7. La parete di essa è attraversata lateralmente da un sottile tubo di vetro che va fino al fondo, e che porta

per la sua estremità esterna un tubo più o meno lungo di gomma elastica, munito di ago-cannula. Il collo della provetta è zaffato di cotone. L'apparecchio si sterilizza al calore umido, e funziona mercè una pompa di gomma o un aspiratore qualsiasi applicato al collo (1).

(1) Il mio egregio amico TURSINI, chimico del Laboratorio annesso alla Clinica Cantani (dal quale quanti lavoriamo in esso ripetiamo le prime conoscenze di tecnica batteriologica, da lui appresa nell'Ufficio d'igiene di Berlino), ha apportato delle importanti innovazioni nella pratica delle inoculazioni dei virus. Ormai è abbastanza diffusa la siringa sterilizzabile, che va col suo nome; la quale, avendo l'ago-cannula saldata al vetro, e funzionando mercè un aspiratore speciale indipendente da essa, garantisce, come nessun'altra, la purezza assoluta del materiale che vuolsi estrarre, per es. da una cavità del corpo, oppure iniettare ad un animale in esperimento. (V. la descrizione fattane dall'Autore nel *Morgagni* 1886). Questa siringa oggi è costruita da PIVETTA a Napoli, da ZAMBELLI a Torino e da WIESNEG a Parigi.

Per le iniezioni voluminose egli ha messo in uso il semplice sistema rappresentato dalla Figura 8. Il liquido da inoculare è ricevuto in una comune fiala di Erlenmeyer B, graduata se occorre; la quale è chiusa con un turacciolo di gomma, traversato da due tubi di vetro. Di questi uno va fino al fondo, e per l'estremo esterno finisce o con ago saldato al vetro, o con punta arrotondata da poterla introdurre senz'altro per es. nel retto di un animale, oppure porta un tubo di gomma D come nell'apparecchio della Fig. 7. L'altro cannello di vetro sormonta il livello del liquido, ed esternamente mettesi in comunicazione con una bottiglia a doppia tubulatura A, anch'essa munita di due tubi, come la fiala di Erlenmeyer, ma situati in senso inverso: il più lungo di essi mettesi in rapporto col tubo di scarico di un comune enteroclisto, posto a diversa altezza, secondo che si richiede una pressione più o meno forte. L'acqua dell'enteroclisto riempie la bottiglia da basso in alto, scacciandone l'aria; la quale va a far pressione nel liquido da iniettare, purificandosi attraverso l'ovatta ond'è zaffato il piccolo cannello della fiala di Erlenmeyer. Mediante un robinetto si può avviare l'apparecchio o arrestarne istantaneamente la funzione. Come ben s'intende, la prima parte del sistema può essere sterilizzata vuota o ripiena, a seconda della natura del liquido da iniettare.

E sempre sullo stesso principio d'innestare l'ago-cannula al vetro, e di rendere il meccanismo di pompa indipendente dal-

Le pipette sterilizzate sono di una utilità pratica incontestabile: facilitano la tecnica in modo singolare, mentre garentiscono pienamente la purezza degl'innesti. Provate una volta invogliano a regolarmente preferirle; tanto più che sono di facilissima costruzione, e possono, in casi eccezionali, essere adoperate appena fatte, se si ha cura nel costruirle di riscaldarne fortemente il corpo. Fuori di questo caso, torna ancora più comodo sterilizzarle aperte alla punta dentro una provetta da saggio, fissandovele con uno zaffo di cotone; ciò che nell'atto di servirsene dispensa dal passare la parte affilata sulla fiamma a spirito.

Forse l'uso delle siringhe del Pravaz lascia

l'apparecchio sterilizzabile, il Tursini ha costruito delle siringhe saldate lateralmente ad un palloncino di vetro, da potere con questo mezzo estrarre direttamente delle grandi quantità di

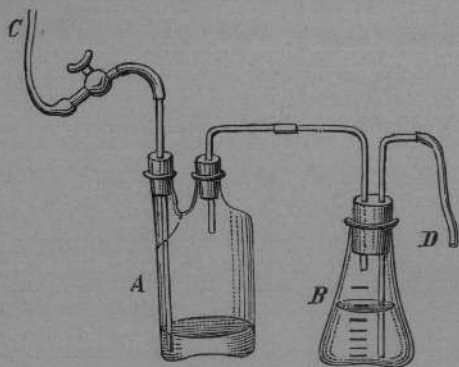


Fig. 8.

sangue. Più di una volta egli se n'è servito, ad es., per estrarre dalle vene del braccio dei tísici circa 20 C. C. di sangue; il quale, abbondato poi nella stufa d'incubazione dentro lo stesso palloncino, ha visto conservarsi per mesi assolutamente sterile.

qualcosa a desiderare, ed ognuno può trovare a ridire sulla loro attitudine ad essere sicuramente e in ogni punto sterilizzate. Tuttavia si dee convenire, che in ciò v'ha esagerazione; dimenticando, che l'eventuale inquinamento da parte dell'ambiente di regola non ha forza a modificare l'attività fisiologica dei virus. Lo studio della rabbia insegna; dove, per quante cautele si prendano, nessuno pretenderà di mettere assolutamente al coperto dai germi atmosferici l'estrazione del midollo spinale e la preparazione del liquido virulento: eppure le inoculazioni riescono con sicurezza sorprendente.

Il rigore massimo si esige, e giustamente, nelle esperienze di massima, nel saggiare per la prima volta un materiale sospetto virulento, e soprattutto quando trattasi di servirsi delle siringhe per estrarre liquidi da cavità chiuse, che devono essere esaminati batteriologicamente. Chiaro è, che in questo caso l'intromissione di germi estranei può indurre nell'errore, di ritenere batterifero un materiale di sua natura sterile. E d'altra parte, poichè i comuni terreni di coltura artificiale sono sempre qualcosa di diverso dagli umori e tessuti organici, può bene succedere, che batteri comuni dati dall'ambiente trovino in quelli più favorevoli condizioni di esistenza che non un esemplare di microbi patogeni, e, tuttochè in grande minoranza, si sviluppino soli o di conserva o in predominio. E sotto questo rapporto non v'ha strumento, che per rigore sperimentale regga al confronto della siringa del TURSINI.

FINE.

INDICE

PREFAZIONE	pag. V
----------------------	--------

I. Pasteur e l'Origine della Microbiologia.

Popolarità acquistata dal nome del PASTEUR	» 1
Concetto sommario della Microbiologia	» 2
I microbi delle infusioni, Metodo di conservazione di APPERT	» 3
Primi lavori del PASTEUR sull'acido tartarico	» 4
I germi dell'aria	» 6
Legge di deposizione de' germi dell'aria secondo la linea di gravità	» 8
Lotta contro la teoria della Genesi spontanea	» 9
La teorica vitale delle Fermentazioni	» 10
Le malattie dei vini e della birra	» 13
Morfologia e classificazione dei microbi	» 14
La tecnica batteriologica	» 15
Progressi della stessa mercè i lavori del KOCH	» 16

II. Le malattie a Microbi.

Microbi nell'organismo animale	» 19
La scoperta del DAVAINE	» 20
Le malattie de' bachi da seta	» 21
Sistema Pasteur per la selezione del seme-bachi	» 22
La infezione carbonchiosa in rapporto con i batteridi di DAVAINE	» 26
Esperienze contraddittorie	» 27
La Setticiemia acuta sperimentale	» 28
Teorica parassitaria delle infezioni	» 30
I microbi patogeni e loro meccanismo d'azione	» 31
Contributo del PASTEUR alla Patologia speciale delle infezioni	» 33
Dimostrazione della natura batterica dei virus	» »

III. Attenuazione dei virus.

Azione reciproca dei microbi e del mezzo ove si coltivano	» 36
---	------

Attenuazione del virus del Colera de' polli	pag. 38
Attenuazione del virus carbonchioso	» 40
Attenuazione del virus del Mal rosso	» 41
Influenza protettiva dei virus attenuati, Vaccinazione.	» 42
Azione reciproca dei microbi tra loro e cogli elementi istologici, Lotta della vita	» 43
Immunità patologica	» 45
Ritorno alla virulenza e Legge delle epidemie	» 47
Vaccinazione incosciente.	» 48
Legge delle condizioni minime, Esperimento di RAULIN.	» 49
Interpretazione della immunità	» 50
L'avvenire della terapia de' morbi infettivi	» 52

IV. La Cura profilattica della Rabbia.

Preliminari	» 54
Il Micrococco della saliva	» 56
Principale veicolo del virus rabido	» 57
La inoculazione sottomeningea	» 58
La morfologia del virus rabido	» 59
Sua variabile virulenza	» 61
Prime prove di vaccinazione nei cani	» 62
Nuovo metodo di attenuazione	» 63
Il fatto di MEISTER.	» 65
Pratica della vaccinazione nell'uomo	» 66
La rabbia del lupo.	» 67
Interpretazione del metodo profilattico.	» 68
La statistica del PASTEUR	» 70
Valore pratico e scientifico della scoperta del PASTEUR.	» 74

V. Ricordi del Laboratorio Pasteur.

Il Filtro CHAMBERLAND.	» 78
La Pipetta PASTEUR.	» 82
Coltura degli Anaerobi in mezzi liquidi	» 84
» » nella gelatina	» 87
Conservazione dei virus	» 89
Mezzi d'iniezione dei virus.	» 90



