

Articoli/Articles

IL PROBLEMA DELLA SPECIFICITÀ NELLA MICROBIOLOGIA  
E NELL'IMMUNOCHEMICA TRA IL 1880 E IL 1930

GILBERTO CORBELLINI

Sezione di Storia della medicina  
Sapienza – Università di Roma, I

SUMMARY

*'SPECIFICITY' IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOCHEMISTRY  
BETWEEN 1880 AND 1930*

*During the second half of the XIX Century, microbiological sciences acquired a set of conceptual, methodological and technological tools that radically transformed theoretical and empirical knowledge of the microorganisms, with particular regard to their biochemical properties and their etiopathological role in infectious diseases. During that period, theoretical and experimental researches in general microbiology and immunochemistry addressed the nature and empirical appearances of microbes, both pathogens and not, and the origins of chemical properties of immune sera. In other words, microbiologists tried operatively explaining the origins of the morphological, physiological, and pathogenetic differences between the microbial species. At the same time physiologists and biochemists investigated the chemical basis of the selective or specific interactions between microorganisms or their chemical components and humoral factors contained into the sera produced by the body in response to the contact with microbes. During the half a century, between 1880 and 1930, qualitative and quantitative experimental studies demonstrated that the specificity of microbiological phenomena depended on the biology of microbes and that the specificity of immune reactions hinged upon the biochemical properties of special molecules synthesized by some physiological system which can recognize and react against any foreign substance.*

*Key words:* History of microbial culture - Microbial species - Koch's postulates - Discoveries of the immunological phenomena

Il batteriologo René Dubos ha rilevato che “il concetto di specificità è stato, sin dall’inizio, una delle principali forze propulsive nello sviluppo della biochimica batterica e delle teorie dell’infezione e dell’immunità”<sup>1</sup>. In effetti, il sostantivo “specificità” e l’aggettivo “specifico” erano le parole utilizzate con maggior frequenza da microbiologi, immunologi e biochimici in quegli anni. Non che l’uso di queste parole nelle scienze mediche fosse particolarmente originale, ma proprio nel contesto della rivoluzione microbiologica si cominciò a capire che alla base della selettività delle interazioni cui partecipano i microrganismi vi è l’organizzazione biologica che li caratterizza come forme viventi. Del resto la vaghezza nel significato dei termini “specificità” e “specifico”, prima dell’avvento della rivoluzione pasteuriana, era testimoniata dalle amplissime definizioni che si possono trovare nei dizionari di medicina dell’Ottocento<sup>2</sup>, ed era stata stigmatizzata con efficacia dal chimico Justus von Liebig, il quale accomunava il valore esplicativo di queste parole ad altre espressioni che per la mancanza di adeguate definizioni operative risuonavano come vuote. Nel 1840 Liebig scriveva che “l’espressione ‘principio vitale’ deve essere considerata di eguale valore dei termini ‘specifico’ e ‘dinamico’ in medicina. *Specifico* è ogni cosa quando non possiamo spiegarla, e *dinamica* è la spiegazione di tutto ciò che non comprendiamo”<sup>3</sup> (corsivo mio).

Durante il mezzo secolo compreso grosso modo tra il 1880 e il 1930 fu dimostrato che la specificità dei fenomeni microbiologici dipende dalla loro natura biologica, furono stabilite le condizioni operative per studiare su basi sperimentali e in modo quantitativo questi fenomeni e furono avanzate le prime ipotesi sui meccanismi più elementari da cui dipendono le interazioni selettive tra elementi biochimici del parassita e dell’ospite.

#### *Tecniche e metodi delle ricerche sulla specificità dei microorganismi*

La trasformazione del concetto di specificità nei differenti contesti della microbiologia fondamentale e medica fu prodotta dallo

sviluppo della ricerca sperimentale, volta all'identificazione dei microrganismi in base alle loro caratteristiche e al tipo di interazioni con l'ospite o con dei componenti di esso. In tal senso, fu necessario sviluppare una serie di tecnologie adeguate.

L'ipotesi elaborata da Pasteur nella seconda metà degli anni Cinquanta del secolo scorso, per cui ogni tipo di fermentazione sarebbe causata dalla crescita e dal metabolismo di un microrganismo specifico, lo indusse a sviluppare metodi per la coltivazione di microrganismi non contaminati da altre specie. Nel 1860 egli introduceva il primo terreno semisintetico per la crescita dei batteri, costituito da sali di ammonio (urina sterilizzata), polvere di lievito e zucchero candito<sup>4</sup>. Sino all'introduzione dei terreni solidi, diversi batteriologi, come Adolf Mayer e Ferdinand Cohn, lavorarono variando, in funzione delle diverse esigenze, la composizione dei terreni liquidi, che consisteva, essenzialmente, di tartrato di ammonio, zucchero, fosfato di potassio, solfato di calcio e polvere di lievito<sup>5</sup>.

Il primo terreno solido per la coltivazione di colonie batteriche fu utilizzato da Robert Koch nel 1881. Si trattava di una patata immersa in una soluzione di "sublimato corrosivo all'1:1000", quindi sterilizzata con vapore e tagliata in due con un coltello sterile. Le due metà in cui era stata divisa la patata venivano lasciate cadere in un vaso di vetro sterile e inoculate con i batteri da coltivare<sup>6</sup>. Nello stesso anno Fredrick Loeffler pubblicava la formula del suo brodo nutriente, in cui era riuscito a coltivare il bacillo della setticemia del topo. Si trattava di un'infusione di carne con l'aggiunta dell'1% di "peptone" e dello 0,6% di sale comune, con cui Loeffler intendeva simulare la composizione degli essudati infiammatori in cui i batteri patogeni crescono nel corpo<sup>7</sup>.

Koch trovò il modo di solidificare questo brodo e preparò le prime piastre di gelatina che avevano tuttavia l'inconveniente che a 37 °C, la temperatura ottimale di incubazione e crescita, corrispondente alla temperatura del corpo umano, si liquefacevano. La soluzione venne

dall'introduzione, nel 1882, dell'agar-agar, una sostanza estratta da un'alga giapponese e già utilizzata per la solidificazione della marmellata. L'invenzione della capsula di Petri, nel 1887, rendeva altresì possibile una migliore organizzazione, visione e controllo delle colonie<sup>8</sup>.

Ovviamente la messa a punto della tecnologia dei terreni di coltura aveva lo scopo di consentire l'isolamento delle diverse forme di microrganismi per caratterizzarne al meglio le proprietà fisiologiche specifiche.

Nel 1873 Edwin Klebs tentò per la prima volta di ottenere colture separate di batteri patogeni con il metodo della "coltura frazionata" (*fractionirte Cultur*), cioè trasferendo con pipette capillari minime quantità di materiale coltivato su terreno sterile, ripetendo continuamente l'operazione nella speranza di ottenere una coltura non contaminata<sup>9</sup>. I principi della metodologia per ottenere colture pure di microrganismi furono enunciati dal micologo Oscar Brefeld, in una serie di volumi sui funghi pubblicati a partire dal 1872 (*Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze*). Nel 1875 Brefeld enunciava le procedure da lui seguite nella coltivazione, come l'inseminazione del terreno a partire da una singola spora fungina, l'uso di terreno "pulito", atto a facilitare la crescita ottimale del fungo sotto esame e il mantenimento della coltura completamente protetta dalla contaminazione esterna<sup>10</sup>. Tuttavia, si pensava che tali principi non fossero realizzabili per i batteri in colture liquide diluite, soprattutto per la difficoltà di praticare l'inseminazione con un singolo batterio. Ma nel 1878 Joseph Lister costruì una speciale siringa graduata, il cui pistone ad avanzamento meccanico consentiva di calcolare con precisione la quantità di coltura da immettere sul vetrino del microscopio, per poi calcolare il numero di batteri contenuti nella quantità di inoculo. A quel punto, come Lister dimostrò, era possibile valutare il grado di diluizione del fluido batterico, tale per cui una certa quantità di inoculo contenesse "in media" un singolo batterio. Il

chirurgo inglese riuscì con questo metodo a isolare e far crescere il *Bacillus lactis* in coltura pura<sup>11</sup>.

L'altro metodo per ottenere colture pure era quello di trasferire il microrganismo nel corpo di animali per un certo numero di volte. Koch sviluppò al meglio questa tecnica e, sia nelle ricerche sul bacillo del carbonchio sia nello studio sulle infezioni delle ferite, riuscì a isolare gli agenti patogeni trasmettendoli ad animali da esperimento<sup>12</sup>. Il primo terreno di coltura differenziale fu descritto nel 1887 da André Chantemesse e Fernand Widal in uno studio sull'uso del glucosio e del lattosio per differenziare tra *E. coli* e *S. typhi*<sup>13</sup>. Il problema di stabilire la differenza tra *E. coli*, un saprofito normalmente presente nella gola e i bacilli del tifo, fra loro morfologicamente simili, divenne più facile quando, nel 1889, Shibasaburo Kitasato sviluppò un test per la produzione di indolo, una proprietà di *E. coli*, ma non di *S. typhi*, quando viene coltivato in una soluzione di "peptone" alla giusta concentrazione<sup>14</sup>.

Presto divenne chiaro che la produzione o l'assenza di gas, durante la fermentazione di carboidrati, era un'importante caratteristica per la classificazione degli enterobatteri patogeni. Durante gli anni Novanta dell'Ottocento furono sviluppati diversi sistemi per rilevare la produzione di gas<sup>15</sup>. Tra il 1900 e il 1905 Alfred MacConkey mise a punto il primo terreno solido differenziale, costituito da taurocolato, glucosio, lattosio e rosso neutro, presto utilizzato come terreno selettivo per isolare i bacilli tifoidei. In questa fase dello sviluppo della tecnologia microbiologica l'invenzione dei terreni avveniva praticamente per tentativo ed errore, attraverso modifiche continue, uso di coloranti e sali diversi per studiarne l'effetto sulla crescita dei microrganismi<sup>16</sup>.

I primi anni del Novecento furono segnati anche dai lavori di Serge Winogradsky e Martinus Willen Beijerinck, basati su colture "elettive" che, mentre dimostravano la diversità nei requisiti nutrizionali di vari tipi di microrganismi, rendevano possibile l'accumulo di conoscenza,

il loro isolamento e l'indagine sulle proprietà. Durante gli anni Venti e Trenta la batteriologia della sanità pubblica avrebbe prodotto un gran numero di terreni selettivi designati soprattutto per il riconoscimento dei patogeni intestinali, fra cui il terreno di solfato di bismuto, nel 1927. Nel 1931 venivano messe a punto le piastre di tellurite per la coltivazione selettiva del bacillo della difterite, che avrebbe consentito una più efficace impostazione delle indagini epidemiologiche volte a differenziare le forme gravi, miti e intermedie dell'infezione<sup>17</sup>. In Inghilterra, durante gli anni Trenta del Novecento, veniva organizzata la prima produzione centralizzata di terreni di coltura insieme a un particolare sistema per garantire che si mantenessero sterili<sup>18</sup>.

Fra le tecniche di laboratorio utilizzate dai batteriologi va ricordata la filtrazione dei liquidi batterici, che già negli anni Settanta dell'Ottocento vide l'introduzione di materiali porosi per separare i bacilli del carbonchio dal fluido di coltura. Nel 1884 Charles Chamberland, collaboratore di Pasteur concepiva delle "candele" di porcellana non vetrificata, che egli vedeva di particolare utilità per filtrare l'acqua che considerava il principale veicolo di batteri<sup>19</sup>. Nel 1891 comparivano le più efficaci "candele di Berkefeld", dal nome del proprietario delle miniere *Kieselguhr*, nei pressi di Hannover, da cui proveniva il terreno di infusori utilizzato per prepararle<sup>20</sup>. Anche la tecnologia delle colture anaerobiche ebbe un importante sviluppo, con la messa a punto di centinaia di apparati per la coltivazione di batteri che vivono in assenza di ossigeno libero, mentre i metodi di sterilizzazione e di disinfezione venivano continuamente perfezionati per controllare le condizioni di coltivazione dei microrganismi in laboratorio. Dopo le prime esperienze di Koch, che già nel 1881 aveva studiato l'azione di diverse sostanze antisettiche sulle colture batteriche, la definizione su basi sperimentali dei fondamenti della disinfezione chimica avvenne prima della fine del secolo<sup>21</sup>.

Parallelamente allo sviluppo di una tecnologia dei terreni di coltura differenziali venivano messi a punto i metodi di colorazione, volti a

rendere visibili i microorganismi per individuarne le caratteristiche morfologiche distintive.

Una delle prime applicazioni di coloranti vegetali ai batteri risale a Hermann Hoffman, che nel 1869 usò il carminio e la fucsina in soluzione acquosa<sup>22</sup>, mentre Carl Weigart, nel 1875, utilizzava vari coloranti semplici, tra cui il blu di metilene sintetico per rilevare i cocci nei tessuti<sup>23</sup>. Questi ricercatori coloravano i batteri in sospensione ed esaminavano tali preparazioni al microscopio. Lo sviluppo dell'industria dei coloranti sintetici in Germania, insieme all'alto livello di istruzione tecnologica di quel paese mise rapidamente a disposizione dei medici-ricercatori tedeschi un vasto repertorio di prodotti chimici da sperimentare come sostanze coloranti, creando le condizioni per una collaborazione che avrebbe favorito la trasformazione di diverse industrie chimiche in industrie farmaceutiche.

Nel 1877 Robert Koch, che l'anno precedente aveva descritto le endospore batteriche di *Bacillus anthracis*, pubblicava le prime microfotografie a partire da pellicole sottili colorate a secco su vetrini con vari colori. La nuova tecnica di dissecazione all'aria e fissazione con alcol era stata sviluppata da Paul Ehrlich a partire dal 1877 per i preparati ematologici, e gli aveva consentito di differenziare le cellule sanguigne in base alla costituzione basica, acida o neutra dei coloranti che le fissavano. Nel 1881 Ehrlich migliorava ulteriormente le possibilità di utilizzazione del blu di metilene, e l'anno successivo Koch riusciva a colorare il bacillo della tubercolosi<sup>24</sup>.

La rivoluzione microbiologica portava con sé il tentativo sistematico di dimostrare la presenza dei batteri in sezioni di tessuto malato. Tuttavia il metodo della colorazione semplice dava risultati insoddisfacenti, in quanto colorava uniformemente le colture ed era difficile decidere se un punto blu scuro su uno sfondo blu fosse un batterio o qualche artefatto sperimentale. I primi tentativi di risolvere il problema miravano a decolorare le sezioni di tessuto dopo la fissazione del colorante. I batteri isolati venivano colorati con un solo

colorante - quelli a base di anilina si dimostrarono i più efficaci -, mentre le sezioni di tessuti venivano prima colorate con un singolo colorante e poi decolorate con alcol. Ma questo procedimento non funzionava su tutti i batteri, visto che tranne i bacilli tubercolari, nella maggior parte dei casi anche i batteri si decoloravano insieme ai tessuti. Il problema fu risolto da Hans Christian Gram, un patologo danese che nel 1884, lavorando alla morgue di Berlino, inventò la tecnica della controcolorazione dopo colorazione.

Il metodo di Gram consisteva nel mordenzare i batteri con una soluzione iodio-iodurata dopo aver colorato le sezioni di tessuti patologici con una miscela di “cristal-violetto” (violetto di genziana cloruro di esametile pararossanilina). La decolorazione di queste sezioni di tessuti con etanolo o acetone lasciava solo i batteri di un colore violetto scuro, mentre tutto il resto, incluse le cellule tissutali e i loro nuclei, diventavano giallognole. A quel punto le cellule del tessuto venivano colorate con tinte di contrasto<sup>25</sup>.

Il sistema risultava davvero efficace per i batteri che si coloravano, ma Gram scoprì che c'erano due tipi di batteri, quelli che ritenevano il colorante primario e quelli che si decoloravano e dovevano essere controcolorati con un colore di contrasto. Fu subito chiaro che si trattava di un metodo anche migliore per suddividere i batteri in due classi a seconda del loro comportamento quando veniva loro applicato l'agente decolorante: Gram-positivi e Gram-negativi. Fra i batteri Gram-positivi risultarono esserci stafilococchi, streptococchi, bacilli tubercolari, carbonchio; mentre il pneumococco e i bacilli tifoidei, si dimostravano Gram-negativi.

Il metodo di colorazione di Gram fu subito adottato come routine per descrivere e determinare i batteri in colture miste o sezioni di tessuti, ma era evidente che le differenze fra batteri Gram-positivi e Gram-negativi andavano al di là del colore. In generale i batteri Gram-positivi risultarono più resistenti all'aggressione degli enzimi digestivi, tranne il lisozima, come mostrerà Alexander Fleming nel 1922<sup>26</sup>. Il mecca-

nismo della colorazione di Gram, nonostante intensi studi, è rimasto un enigma fino a pochi anni or sono, quando è risultato che la composizione chimica della superficie cellulare è determinante nel mantenimento del colorante primario dopo trattamento con etanolo o acetone<sup>27</sup>. Con la scoperta dei flagelli nel 1890 da parte di Frederick Loeffler, e delle membrane cellulari nel 1894 veniva completata l'individuazione delle caratteristiche morfologiche esterne delle cellule batteriche, con l'eccezione delle fimbriae, invisibili al microscopio ottico. Di fatto, nel corso del XIX secolo la microscopia aveva visto importanti perfezionamenti, come le lenti acromatiche, l'utilizzazione di combinazioni di lenti e la disponibilità di più potenti obiettivi a immersione. Ma, dato che il potere separatore del microscopio, come dimostrò Ernst Abbé, dipende in modo proporzionale dalla lunghezza d'onda della luce utilizzata e in modo inversamente proporzionale dall'apertura numerica, era ormai necessario agire sulla prima variabile per diminuire la distanza fra gli oggetti che il microscopio poteva rilevare. L'utilizzazione dei raggi ultravioletti<sup>28</sup> non rappresentò una soluzione del problema, che venne invece dall'invenzione del microscopio elettronico a opera di Ernst Ruska, che nel 1931 utilizzava le prime lenti elettromagnetiche nei laboratori della Società Siemens e Halske a Berlino<sup>29</sup>. La microscopia elettronica consentì di dimostrare che i batteri posseggono un'organizzazione interna e di fotografarne la parete cellulare nel 1941<sup>30</sup>.

#### *La questione delle specie microbiche*

Le tecniche di coltivazione selettiva e di colorazione selettiva ebbero importanti ricadute sull'evoluzione della tassonomia batterica, mentre il metodo dell'isolamento delle colture pure portò in pochi anni all'individuazione di un gran numero di batteri saprofiti e patogeni presenti in diversi ambienti<sup>31</sup>.

Già verso la fine degli anni Settanta del secolo scorso i batteriologi tedeschi ormai non parlavano più di batteri in modo generico, ma di

differenti specie batteriche. In tal senso il contributo dei botanici e dei medici era stato essenziale per far accettare il concetto che esistono diverse specie batteriche e che ogni specie è caratterizzata da una morfologia e da processi biochimici particolari, e può essere associata con il manifestarsi di particolari malattie infettive nell'ospite.

Ferdinand Cohn, professore di botanica all'Università di Breslavia, che per primo aveva distinto, nel 1854, fra Protozoi e Protofiti, con una serie di studi, pubblicati fra il 1872 e il 1876, sotto il titolo *Ricerche sui batteri*, stabilì una tassonomia linneana dei microrganismi che li suddivideva i batteri in 4 Tribù e 6 Generi<sup>32</sup>. La classificazione era basata su criteri morfologici ed entrò nella denominazione di alcuni gruppi di batteri. Per esempio: cocchi (cellula a forma di sfera), bacilli (cellula a forma di bastoncino cilindrico) e spirilli (cellula a forma di segmento di elica).

Cohn rimproverava altresì Pasteur per il fatto che questi adoperava una congerie di nomi non scientifici per indicare i microorganismi che egli scopriva (per es. *animalcules*, *infusoires*, *végétaux*, *cryptogenes microscopique* e vari altri). Risentito, da fervido nazionalista quale era, per le critiche di Cohn, Pasteur decise, nel 1881, di accettare come unico termine non certamente quello utilizzato dai tedeschi, bensì *microbe*, che gli era stato suggerito da Charles-Emmanuel Sédillot nel 1878<sup>33</sup>. Il neologismo ebbe grande fortuna e da esso Pasteur ricavava, nel 1888, il termine *microbiologie* con cui intendeva definire una disciplina più ampia della batteriologia “che, appena nata, si impone alle riflessioni e ai lavori della fisiologia e della medicina di tutto il mondo”<sup>34</sup>.

Il problema della classificazione batterica fu comunque il luogo di importanti discussioni teoriche sulla fissità o meno dei caratteri specifici dei batteri, e quindi sull'attendibilità una classificazione rigida di questi organismi. Cohn riteneva che i batteri responsabili di diversi processi chimici e patologici fossero riconducibili a un piccolo numero di specie individuali, sviluppatasi in un gran numero

di razze colturali e naturali. Inoltre, ritenendo che i batteri si riproducano solo in modo asessuato Cohn sosteneva che essi mantengono le loro caratteristiche fisiologiche in modo più sicuro<sup>35</sup>. Questa tesi si sarebbe infine affermata e, appunto, l'idea che le specie batteriche non ricombinino i loro caratteri ereditari entrerà nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1923), in attesa che la scoperta della ricombinazione genetica fra diversi ceppi batterici, da parte di Tatum e Lederberg nel 1947, e quindi del fenomeno della coniugazione, mandasse all'aria questo assunto.

Ma il concetto di "specie batterica", ovvero l'idea che "ogni specie batterica è invariabile nella forma e nelle proprietà e non può trasformarsi in un'altra specie"<sup>36</sup>, dovette imporsi alle dottrine sul *pleomorfismo* dei batteri, sostenute da diversi batteriologi, secondo i quali i batteri cambiavano forma a seconda dell'età della cellula e delle condizioni di accrescimento e moltiplicazione. Taluni ritenevano che addirittura tutti i batteri passassero attraverso tutti gli stadi morfologici descritti.

Era stato il botanico Ernst Hallier a portare nel campo della microbiologia alcune idee trasformiste proprie della morfologia tedesca. Hallier, che era favorevole alla teoria microbica delle malattie, aveva un concetto di micorganismo tale per cui egli riteneva che i parassiti microscopici non fossero di per sé generi o specie, ma semplicemente stadi (*Morphen*) nello sviluppo di funghi più complessi, le cui trasformazioni erano determinate dai cambiamenti nel terreno, nell'umidità e nella temperatura<sup>37</sup>. Un altro botanico, Carl von Nägeli, attaccò direttamente le teorie di Cohn, che nel frattempo erano state adottate da Koch, sostenendo di non vedere la necessità di differenziare anche due sole delle forme batteriche da lui osservate, in quanto la sua esperienza gli mostrava che ogni specie di batteri si presentava con diverse morfologie e funzioni che potevano essere cambiate l'una nell'altra dalle condizioni esterne. Egli definì tale fenomeno "adattamento o acclimatazione" e l'idea, nell'insieme, lo portava a opporsi anche alla dottrina della malattie infettive, sulla base di argomenti più filosofici

che scientifici, dato che le osservazioni riportate erano sostanzialmente dovute a errori metodologici<sup>38</sup>. Verso la fine del secolo, comunque, il termine pleomorfismo già indicava i cicli di sviluppo di tipo limitato a cui vanno incontro i batteri durante la loro crescita<sup>39</sup>.

Nel 1872 Ferdinand Cohn aveva ipotizzato un ruolo dei microbi nei cicli biologici degli elementi, basandosi sull'osservazione dei fenomeni di esaurimento dei terreni sottoposti a coltivazioni continue e di recupero della fertilità in seguito a trattamenti con concimi organici<sup>40</sup>. La conferma di questa ipotesi venne dalla scoperta di Martinus Willem Beijerinck, che nel 1888 descriveva i batteri dei noduli della radice, *Rhizobium*, un genere simbiote in grado di fissare l'azoto quando cresce nel sistema delle radici delle leguminose<sup>41</sup>. L'anno successivo Serge Winogradski scopriva una nuova classe di batteri, gli autotrofi, caratterizzati dalla capacità di crescere in terreni contenenti soltanto ossido di carbonio e sali inorganici<sup>42</sup>.

E' importante ricordare che fino a quel momento tutto il metabolismo batterico era noto solo per l'insieme della trasformazione cui dava luogo. Cioè si conoscevano le sostanze fondamentali che potevano essere attaccate da una data specie e il prodotto finale, ma non si sapeva nulla del metabolismo intermedio.

La scoperta di Eduard Büchner, che nel 1897 dimostrava la possibilità di ottenere la fermentazione dello zucchero utilizzando semplicemente un estratto di lievito<sup>43</sup>, fu subito interpretata come una confutazione della teoria pasteuriana sulla natura biologica delle fermentazioni, la quale assumeva come necessaria la presenza della cellula nella sua interezza perché avvenisse la trasformazione dello zucchero in alcol e anidride carbonica<sup>44</sup>. La scoperta, che avveniva nel contesto di ricerche sulla natura delle sostanze antitossiche, guidate dal fratello di Eduard, Hans Büchner<sup>45</sup>, insieme agli studi di Emil Fisher sulle basi stereochimiche delle interazioni specifiche fra l'enzima e il suo substrato, esemplificate dal famoso modello della chiave e della serratura<sup>46</sup>, fondavano la scienza biochimica a partire

dall'ipotesi che le proprietà degli organismi viventi potessero essere spiegate in termini di chimica e fisica, e portarono allo sviluppo delle conoscenze sui meccanismi del metabolismo microbico<sup>47</sup>.

Büchner pensava che un solo enzima fosse coinvolto nel processo fermentativo, cioè che la trasformazione avvenisse in un solo passaggio, ma già agli inizi del Novecento si comprese che la fermentazione del glucosio in alcol etilico era costituita da più passaggi, a ognuno dei quali era deputato un enzima appropriato<sup>48</sup>.

A quel punto, insieme alle caratteristiche morfologiche, che a lungo continueranno a costituire la base delle classificazioni, anche gli aspetti biochimici diventarono dei criteri tassonomici. A partire dall'ultima decade del XIX secolo, una quantità imponente di dati concernenti le colture, i loro comportamenti patogenetico e biochimico divennero disponibili. Anche se il criterio principale di classificazione continuerà a essere la morfologia fino agli inizi del XX secolo, in trattati fondamentali, come l'*Atlas und Grundriss der Bakteriologie*, di Karl Lehmann e Rudolf Neumann, si adottava un approccio empirico, considerando anche sezioni di colorazione e la capacità di formare endospore come caratteristiche diagnostiche formali<sup>49</sup>.

Nel frattempo, l'uso dei terreni arricchiti prospettava un approccio ecologico ed evolutivo allo studio dell'adattamento batterico, per cui il terreno sperimentale veniva utilizzato per selezionare i batteri diversamente adattati, per isolarli e stabilirne le proprietà funzionali, e collocarlo ordinatamente entro una classificazione. Nel 1901 Beijerinck osserva che per questa fase della microbiologia gli esperimenti con colture arricchite hanno una rilevanza speciale. L'esperimento con colture arricchite rende possibile isolare una grande varietà di microrganismi, che sono adattati a particolari condizioni ambientali e farli sviluppare gli uni accanto agli altri in terreni di coltura liquidi<sup>50</sup>. Tutti i precedenti schemi tassonomici erano stati basati su pochi caratteri biochimici per distinguere specie che erano morfologicamente identiche.

Ancor meglio: l'obiettivo della classificazione andava modificandosi progressivamente. I vecchi sistematici cercavano soprattutto di ridurre la molteplicità delle forme di vita allo stesso ordine, mentre la nuova batteriologia della sanità pubblica aveva a che fare anche col problema particolare di riconoscere gli organismi responsabili delle malattie infettive, e differenziare questi microorganismi pericolosi dai saprofiti morfologicamente simili, ma innocui.

Stranamente, fino al 1908 la patogenicità non era considerata una caratteristica tassonomica. In quell'anno Charles-Edward Amory Winslow pubblicava una monografia sui rapporti sistematici nelle Coccaceae, in cui distinse fra parassiti e saprofiti<sup>51</sup>. Egli ammise come criteri differenziali ulteriori la reazione con la colorazione di Gram e la fermentazione di vari carboidrati.

Nel 1909 Orla Jensen pubblicava quindi un sistema di classificazione basato principalmente sulle attività metaboliche dei batteri<sup>52</sup>. Anche se il tentativo risulterà prematuro, esso anticipava quella che sarebbe stata nei decenni successivi, prima dell'introduzione del microscopio elettronico e dei sistemi computazionali, una delle principali strategie di classificazione adottate dal Committee on Characterization and classification of Bacteria, istituito nel 1917 dalla Society of American Bacteriologists e che fra il 1917 e il 1920 portò alla compilazione del più famoso dei libri moderni sulla classificazione batteriologica, il *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, dal nome del presidente del comitato, David H. Bergey.

Sempre a partire dai primi anni del Novecento, lo studio dei processi di ossidazione biologica e l'identificazione di numerosi enzimi deidrogenati contribuì a dimostrare l'unità essenziale sottostante l'apparente diversità dei percorsi metabolici dei microbi. Nel 1924 Albert Kluver osservava che "le caratteristiche più specifiche della materia vivente risiedono nelle sue proprietà metaboliche" e mostrava che, nonostante le diverse vie metaboliche e le diverse combinazioni di

enzimi e coenzimi, a livello del metabolismo energetico fondamentale esisteva una termodinamica comune<sup>53</sup>.

*Batteri, virus e protozoi*

Come già accennato, Louis Pasteur non utilizzava una terminologia definita per riferirsi alle diverse forme microbiche e, nei suoi testi, era facile trovare un ulteriore termine molto generale per indicare un agente patogeno trasmissibile, dotato di una sua morfologia specifica e potenzialmente attenuabile per la sua patogenicità, quello di *virus*<sup>54</sup>. La parola veniva utilizzata soprattutto per indicare i presunti agenti responsabili di malattie infettive (per esempio, la rabbia, il morbillo) che non si riusciva a isolare con le consuete tecniche batteriologiche. Stante l'etimologia latina della parola, che significa "veleno", il termine divenne particolarmente adeguato per indicare l'agente invisibile che passava attraverso i filtri utilizzati dai batteriologi per separare i batteri dal liquido di coltura.

Il 12 febbraio del 1892, il botanico russo Dimitri Isofovich Iwanowski presentava all'Accademia delle Scienze di San Pietroburgo una comunicazione in cui constatava che il succo delle foglie di tabacco affette da mosaico, conservava le sue proprietà infettanti dopo filtrazione attraverso le candele filtranti di Chamberland e quelle di Berkefeld<sup>55</sup>. L'osservazione di Iwanowsky fu confermata nel 1896 dal batteriologo olandese Martinus Willem Beijerinck, che definiva un po' ambiguamente il principio filtrabile "contagium vivum fluidum", ma di cui riconosceva la capacità di moltiplicarsi sulle giovani piante di tabacco<sup>56</sup>. Nel 1898 Giuseppe Sanarelli, che era stato allievo di Pasteur, studiando all'Istituto di Igiene dell'Università di Montevideo la mixomatosi dei conigli e constatando l'impossibilità di osservare al microscopio ottico l'agente infettivo, ipotizzava una natura organizzata per questi agenti invisibili, affermando altresì che dovevano essere di natura particolare e diversa da quella degli agenti microbici ritenuti causa di malattie specifiche<sup>57</sup>. Nello stesso

anno Frederick Loeffler e Paul Frosh “filtrarono” l’agente dell’afta epizootica con il liquido sieroso delle lesioni che esso provoca nei bovini e trasmisero sperimentalmente la malattia. Negli anni successivi veniva dimostrata l’esistenza di diversi virus invisibili e filtrabili responsabili di malattie degli animali e dell’uomo, fra cui l’arbovirus che causa la febbre gialla, che nel 1901 Walter Reed dimostrò essere trasmesso da una specie particolare di zanzara, *Aedes aegypti*<sup>58</sup>.

Accanto alle caratteristiche negative dei virus, che ne aveva consentito l’iniziale individuazione, cioè il fatto di *non* essere trattenuti da filtri batteriologici, di *non* essere visibili al microscopio ottico, e di *non* crescere su terreni artificiali, si cominciò a cercare anche qualche loro proprietà biologica. Paul Remingler ritenne di individuare fra le caratteristiche comuni ai virus filtrabili la loro scarsa resistenza ad agenti attenuanti, la loro trasmissibilità diretta o per inoculazione da vettore artropodo e delle caratteristiche lesioni anatomopatologiche definibili come inclusioni citoplasmatiche<sup>59</sup>. Nel 1911 lo statunitense Peyton Rous dell’Istituto Rockefeller di New York aveva accertato il principio della trasmissibilità di un tumore maligno in animali mediante un filtrato di cellule cancerose. Le osservazioni di Rous furono subito confermate e nei decenni successivi furono individuate altre forme di tumori a eziologia virale nei mammiferi e, a partire dagli anni Cinquanta il fenomeno cominciò a venire studiato in modo approfondito, portando a scoperte rivoluzionarie circa la natura del cancro<sup>60</sup>.

Per chiarire la diversa natura dei virus e dai batteri, fu di fondamentale importanza lo studio del batteriofago. Nel 1915 Frederick Twort a Londra<sup>61</sup>, e nel 1917 Felix d’Herelle a Parigi<sup>62</sup>, scoprirono un fattore filtrabile in grado di autoriprodursi in un ambiente batterico e distruggere il proprio ospite. Nel 1921 Jules Bordet, direttore dell’Istituto Pasteur di Bruxelles, ed il suo collaboratore Mihai Ciuca, che stavano studiando l’autolisi microbica, osservarono che il “principio litico” portava alla distruzione della maggior parte della colonia di *Bacterium coli*, tranne alcuni individui resistenti che riuscivano a riprodursi, ma

comunicavano, sia ai loro discendenti sia ai batteri normali con i quali venivano messi a contatto, lo stesso potere “autolitico”<sup>63</sup>. Si constatò quindi l’esistenza dei batteri “lisogeni”, che possono cioè produrre dei batteriofagi senza un’infezione precedentemente manifestata. Lo studio della lisogenia mise in luce il ruolo dell’acido nucleico nell’infezione fagica e, non a caso, il batteriofago divenne l’emblema della scuola di biologia molecolare quando Max Delbrück e Salvator Luria, che lo elessero negli anni Quaranta a oggetto privilegiato per lo studio delle basi molecolari dell’ereditarietà<sup>64</sup>.

Nel frattempo, con l’introduzione delle colture di tessuti da parte di Alexis Carrel nel 1912 veniva avviato a soluzione il problema della coltivazione dei virus<sup>65</sup>, mentre l’introduzione del microscopio elettronico rendeva visibili i virus e quindi eliminava un’altra delle loro proprietà negative. Nel 1934 Max Schlesinger constatava che i batteriofagi sono composti per metà di proteine e per metà di acidi nucleici e progressivamente si manifestarono le diverse caratteristiche biologiche dei virus e dei batteri<sup>66</sup>. Occorsero vent’anni perché questa scoperta fosse compresa in tutto il suo significato, in quanto nel 1935 Wendell M. Stanley riuscì a cristallizzare il virus del mosaico del tabacco, ritenendolo costituito esclusivamente da proteine<sup>67</sup>.

Nel corso del XIX secolo erano state raccolte osservazioni sparse, di interesse sistematico e medico sui protozoi, intesi sia come organismi in sé, sia come parassiti o simbionti dell’uomo e degli altri animali. L’interesse per questi microrganismi aumentò parallelamente all’affermarsi della medicina tropicale, negli ultimi tre decenni del secolo scorso. L’organizzazione di servizi medici a sostegno dell’espansione coloniale dei paesi europei favorì il contatto con una serie di malattie parassitarie a cui si dedicò una generazione di medici coloniali alimentata da una tensione sperimentale che si ispirava alle grandi imprese scientifiche di Pasteur e Koch.

Certo, le grandi scoperte sull’eziologia e i meccanismi di trasmissione della malaria e delle tripanosomiasi non cadevano nel vuoto,

in quanto erano già noti protozoi parassiti ed erano già stati tracciati i profili tassonomici entro cui andavano a cadere le grandi scoperte<sup>68</sup>. Tuttavia nelle ricerche sulle malattie parassitarie causate da protozoi si verificò un incontro estremamente proficuo fra metodo sperimentale, conoscenze zoologiche e pratiche sanitarie che, nel caso della malaria, costituisce un complesso unico nella storia della sanità pubblica.

La scoperta del parassita malarico avvenne nel 1880, quando Alphonse Laveran osservò i merozoiti nel sangue malarico<sup>69</sup>. La natura protozoaria e il nome generico di *Plasmodium* per l'agente eziologico di questa malattia in quegli anni molto diffusa anche nelle zone temperate furono stabiliti da Ettore Marchiafava e Angelo Celli pochi anni dopo<sup>70</sup>. Il patologo pavese Camillo Golgi studiò per primo il ciclo di sviluppo del parassita nel sangue umano e, mettendo in relazione la comparsa intermittente della febbre con il manifestarsi della schizogonia, ipotizzò l'esistenza di tre specie diverse di Plasmodi responsabili delle differenti manifestazioni cliniche della malattia<sup>71</sup>. Mentre veniva inventato un metodo di colorazione dei parassiti malarici negli strisci di sangue<sup>72</sup> e veniva individuata nel 1892 da Marchiafava e Amico Bignami una nuova specie di Plasmodio, particolarmente letale, il *P. falciparum*<sup>73</sup>, nel 1893 Theobald Smith e Frederick L. Kilbourne dimostravano che una malattia dei bovini nota come febbre del Texas o febbre emoglobinurica dei bovini era causata da un amatozoo trasmesso dalle punture di una specie particolare di zecca<sup>74</sup>. Questa scoperta, insieme all'idea avuta dal medico inglese Patrick Mason, che, analogamente a quanto da lui verificato per una specie di microfilarie, il parassita della malaria entrasse con il sangue nelle zanzare quando queste pungono l'uomo, stimolò Ronald Ross a compiere una serie di studi che lo portarono, nel 1897-1898, a dimostrare sperimentalmente che la malaria degli uccelli viene trasmessa dalle zanzare, nel cui stomaco il parassita compie un ciclo di sviluppo. Egli osservò altresì, nutrendo una zanzara con sangue malarico, che le semilune

della malaria umana producevano nello stomaco della zanzara delle particolari cellule pigmentate<sup>75</sup>. Ross comprese il ruolo delle zanzare nella trasmissione della malaria, ma non la specificità dell'associazione fra parassita e vettore. Associazione dimostrata da Giovanni Battista Grassi, che individuò nelle zanzare del genere *Anopheles* l'ospite intermedio del parassita malarico dell'uomo<sup>76</sup>. Intorno alla rilevanza esplicativa delle ricerche di Grassi in rapporto a quelle di Ross montò una annosa controversia, che evidenzia quali aspettative e investimenti di prestigio erano collegati agli studi sulla malaria e alla lotta contro questa malattia<sup>77</sup>.

Fra il 1895 e il 1897 un'altra malattia parassitaria, che in Africa colpiva gli equini e i bovini, veniva sperimentalmente collegata a un protozoo, un tripanosoma, da David Bruce, che ne dimostrava la trasmissione attraverso la mosca tse-tse (*Glossina morsitans*)<sup>78</sup>. Nei primi anni del Novecento venivano individuati anche i tripanosomi che infettano l'uomo, quello della malattia del sonno e l'agente della tripanosomiasi umana americana<sup>79</sup>. Nel frattempo William Leishman e Charles Donovan confermavano che ancora un protozoo, già individuato da Peter Borovsky nel 1898, era responsabile di gravi malattie infettive conosciute con il nome di "bottone d'Oriente" e di "kala-azar"<sup>80</sup>. Leishman e Donovan consideravano questo parassita una forma nuova di tripanosoma e il nome *Leishmania* fu coniato da Ronald Ross<sup>81</sup>.

Ma il problema di maggiore rilevanza scientifica per i parassitologi, dopo l'individuazione dei meccanismi di trasmissione e della specificità vettoriale, diventò quello dei cicli di sviluppo dei protozoi parassiti, che risultarono decisamente più difficili da stabilire rispetto a quelli degli elminti, che erano stati disvelati rapidamente intorno alla metà del secolo scorso.

In modo particolare l'attenzione si concentrò, a metà degli anni Venti, sul ciclo di sviluppo della malaria. I protozoologi davano infatti per scontata la validità di una pretesa osservazione di Schaudinn, scopritore insieme a Hoffmann che il *Treponema pallidum* è l'agente

causale della sifilide, che nel 1902 aveva asserito che gli sporozoit entravano immediatamente nell'eritrocita per iniziarsi il ciclo di sviluppo. A confutare questa teoria si giunse grazie a un singolare sviluppo terapeutico in campo neurologico. Infatti, l'introduzione della malarioterapia per la cura della paralisi progressiva da parte di Wagner-Jauregg nel 1917 consentì di studiare innumerevoli casi di malaria indotti artificialmente, di cui si potevano quindi controllare gli sviluppi<sup>82</sup>. Risultò presto evidente, sia osservando che il chinino non preveniva l'infezione se somministrato dopo l'inoculazione del parassita<sup>83</sup>, sia constatando che il sangue periferico di un paziente cui era stato inoculato il parassita diventava infetto solo nove giorni dopo la puntura e solo dopo undici giorni il parassita era osservabile nel sangue periferico<sup>84</sup>, che gli sporozoidi compivano il loro sviluppo in qualche altro organo. Studiando ulteriormente la malaria sperimentale nell'uomo, negli uccelli e nelle scimmie si scopriva che la fase della "schizogonia esoeritrocitaria" avviene nelle cellule reticolendoteliali del fegato, che sostengono lo sviluppo degli sporozoit in merozoit, i quali vengono rilasciati nel sangue per entrare negli eritrociti e compiere il ciclo eritrocitario<sup>85</sup>.

*La specificità delle malattie infettive: i postulati di Koch*

Già agli inizi dell'Ottocento il problema centrale delle malattie contagiose era stato individuato nella natura "specificità" delle manifestazioni patologiche: vale a dire che ogni contagio poteva essere distinto da qualsiasi altro per le particolari forme di alterazioni che produceva nelle strutture dell'organismo. Parallelamente all'approccio anatomico-clinico, sviluppatosi soprattutto in Francia, prese consistenza, a partire dagli anni '40 del secolo scorso, l'ipotesi che la specificità del contagio andasse riferita a una agente microscopico e che, quindi, le modificazioni anatomico-patologiche associate alle malattie infettive fossero causate dall'attività di esseri organizzati

del tipo di quelli descritti da Theodor Schwann nella sua famosa ricerca sulla natura del fermento del 1837<sup>86</sup>.

Le strade che avrebbe portato alla dimostrazione di questa ipotesi passò attraverso le riflessioni di Pierre Fidele Bretonneau, che per primo spostò il problema delle basi della specificità anatomo-clinica delle malattie sul versante etiologico, per cui egli sosteneva che la malattia specifica “si sviluppa sotto l’influenza di un principio contagioso, di un agente riproduttore”<sup>87</sup>. Bretonneau non mise in relazione questo ipotetico “agente riproduttore” dell’infezione con gli agenti microscopici, cosa che invece aveva fatto Enrico Acerbi nel 1822<sup>88</sup>, per la febbre tifoide, e poi Agostino Bassi, che nel 1835 aveva dimostrato il ruolo di un microrganismo vegetale in una malattia contagiosa che colpiva i bachi da seta<sup>89</sup>.

Nel 1840 Jacob Henle pubblicava le sue classiche *Pathologische Untersuchungen*, in cui l’assistente di Johannes Müller affermava che la “sostanza del contagio [...] non è solo organica, ma anche viva” e metteva in relazione la malattia e il suo svolgersi nell’organismo con lo sviluppo di un parassita al cui rilevamento avrebbe dovuto dedicarsi la ricerca etiopatogenetica<sup>90</sup>. Le idee di Henle furono all’origine della formalizzazione di una metodologia volta a stabilire una relazione causale fra il microrganismo e la malattia, nel senso che l’obiettivo di Henle, portato avanti dalle ricerche di Edwin Klebs era di dimostrare sperimentalmente che la presenza di un determinato microrganismo nei tessuti dell’ospite era la causa della malattia, dimostrazione che, in base all’ideale sperimentale della nuova medicina, poteva avvenire solo attraverso l’isolamento dell’agente e la riproduzione della malattia in animali da laboratorio<sup>91</sup>. Fu comunque Robert Koch a sviluppare la riflessione intorno al problema metodologico di quali fossero i criteri da applicare per stabilire in modo certo una relazione causale fra una determinata malattia infettiva e un microrganismo specifico. In quelli che diventeranno noti come i *postulati di Koch*, il ruolo dell’agente patogeno veniva messo in

relazione non solo con la presenza della malattia, ma anche con la sua assenza nel caso in cui il microrganismo non venisse rilevato. In altri termini i criteri di Klebs e Henle stabilivano che l'agente causale era sufficiente per produrre la malattia, mentre Koch portava a livello di causa necessaria il ruolo dell'agente eziologico<sup>92</sup>.

Nel 1876 Robert Koch dimostrava per la prima volta che un microrganismo specifico è la causa di una particolare malattia infettiva in un animale. Il lavoro di Koch conteneva una serie di osservazioni sul trasferimento delle malattie in animali da esperimento, sulle caratteristiche morfologiche del microrganismo al microscopio, rilevato nel sangue, delle sue spore e dello sviluppo delle spore in bacilli e dei bacilli in spore<sup>93</sup>. Nelle ricerche sulle infezioni da ferite, Koch per la prima volta affermava che ogni malattia infettiva è causata da un organismo specifico, che può essere isolato in colture pure<sup>94</sup>. Quindi, nella ricerca sui microrganismi patogeni del 1881 il medico tedesco precisava il ruolo delle colture pure su terreni solidi per la dimostrazione del loro ruolo etiologico, individuando lo stretto rapporto fra il problema etiologico e quello batteriologico della definizione delle specie microbiche, nel senso che, riprendendo i concetti di Cohn, interpretava le differenze morfologiche e le esigenze metaboliche come caratteri distintivi di genere, specie e varietà<sup>95</sup>.

La prima formulazione completa dei postulati si trova nella ricerca sulla tubercolosi del 1884, in cui Koch riconosceva che “le caratteristiche morfologiche non sono normalmente sufficienti per distinguere i batteri”, e integrava i criteri batteriologici e quelli sperimentali. I tre postulati *batteriologici* prevedevano a) l'individuazione di una struttura estranea che fosse presente in tutti i casi di malattia, b) che questa struttura fosse un organismo vivente distinguibile da tutti gli altri e c) che la distribuzione fosse correlata a e in grado di spiegare i sintomi della malattia. I postulati *sperimentali* riguardavano d) la coltivazione del microbo all'esterno dell'ospite e il

suo isolamento da altri prodotti della malattia che potrebbero essere causalmente correlati con essa ed e) l'inoculazione del microrganismo isolato su colture pure in animali da esperimento che devono mostrare gli stessi sintomi dell'animale malato originario<sup>96</sup>.

In realtà lo stesso Koch incontrò subito delle difficoltà nell'ottemperare ai criteri che aveva egli stesso stabilito. Infatti, già dovendo dimostrare, nel 1884-85, che il vibrione da lui isolato nelle persone affette da colera era l'agente etiologico della malattia, poiché il bacillo a virgola non poteva essere trasmesso ad animali, egli dovette basarsi su dati epidemiologici identificando il microbo in tutti i casi di colera e la sua assenza in persone sane o con diverse malattie. Di fatto, però, nel contesto della nuova 'filosofia' della medicina, i postulati 'sperimentali' divennero quelli più importanti. E questo benché Koch sapesse bene che questi erano i criteri più difficili da ottemperare. Nel 1890 egli riconosceva che per varie malattie, come la febbre tifoide, la difterite, la lebbra e il colera non era possibile infettare animali con colture pure, mentre per altre, come la malaria, era impossibile coltivare in laboratorio il Plasmodio. Vi erano poi i casi di infezioni asintomatiche, in cui malattie dovute a microbi diversi potevano intervenire facendo del primo microrganismo un agente fortuito e non patogeno in presenza di una malattia non correlata. Koch accettava ormai l'idea che "l'occorrenza esclusiva e regolare del parassita" fosse sufficiente a stabilire un nesso causale fra il microbo e la malattia<sup>97</sup>. La scoperta delle malattie virali e il modello di associazione causale, di tipo statistico, nelle patologie cronico-degenerative avrebbe ulteriormente sfidato i postulati di Koch imponendo agli infettivologi e agli epidemiologi continui aggiustamenti e alimentando la riflessione metodologica nella medicina del Novecento<sup>98</sup>.

### *La fenomenologia della specificità immunologica*

L'origine e l'evoluzione del concetto di specificità immunologica è strettamente collegato alle questioni sin qui riportate in merito alla

storia delle ricerche sulla specificità batteriologica. E questo non solo perché le reazioni immunitarie prodotte dall'iniezione nell'ospite di cellule batteriche vive o morte rappresentarono uno strumento essenziale per lo studio delle variazioni nell'ambito delle specie batteriche. Ma anche in ragione del fatto che nel contesto delle ricerche sui fenomeni immunitari si presentavano questioni riguardanti la metodologia di indagine e la natura dei processi osservati che spesso riprendevano tematiche affrontate in ambito batteriologico. Va comunque sottolineato che l'immunologia svolse un ruolo essenziale nel promuovere la trasformazione scientifica della medicina e, a partire dalle novità concettuali e metodologiche apportate dalla batteriologia, creò un nuovo contesto euristico per il pensiero biomedico.

Il concetto di specificità immunologica trovava origine nell'osservazione dei fenomeni di immunizzazione naturale e artificiale, fossero questi le pratiche empiriche di immunizzazione attiva, come la vario-lizzazione, cioè l'immunizzazione contro il vaiolo ottenuta somministrando l'agente del vaiolo umano, o la vaccinazione jenneriana, dove invece si utilizzava il vaiolo vaccino. Da tali esperienze risultava la *specificità* della protezione assicurata dall'immunizzazione, vale a dire che, per esempio, l'immunizzazione naturale o artificiale contro il vaiolo immunizzava *solo* da questa malattia infettiva. Tale proprietà richiamò l'attenzione di Louis Pasteur, il quale sviluppò l'ipotesi per cui fra le caratteristiche biologiche dei microbi, la loro capacità di causare le malattie e, nello stesso tempo, di indurre l'immunità in seguito a un primo contatto non letale, doveva dipendere dall'organizzazione *specificità* della materia vivente. Successivamente si scopriva che il siero di un animale immunizzato reagiva soltanto nei riguardi dei microrganismi o delle sostanze che ne avevano stimolata la produzione<sup>99</sup>.

Nel 1879 Pasteur ottenne una varietà *attenuata* del virus del colera dei polli, con cui riuscì a vaccinare contro la forma letale del bacillo<sup>100</sup> e, nel 1885, sperimentò con successo la vaccinazione contro la

rabbia, inaugurando l'era dei vaccini artificiali per l'uomo<sup>101</sup>. L'anno successivo Daniel Selmon e Theobald Smith dimostravano che anche l'agente patogeno ucciso poteva indurre l'immunità<sup>102</sup>. Questa scoperta consentì, prima della fine del secolo scorso, di preparare e utilizzare su larga scala i vaccini contro la febbre tifoide, il colera e la peste, anche se gli ultimi due non garantivano un livello di protezione soddisfacente<sup>103</sup>.

I successi ottenuti da Pasteur stimolarono la ricerca di componenti dell'organismo e dell'agente patogeno responsabili dell'instaurarsi dell'immunità. Il potere protettivo del sangue e la tossicità dei filtrati di batteri patogeni, in particolare di quelli difterico e tetanico, furono intensamente studiati dai batteriologi. Nel 1889 Emile Roux e Alexander Yersin dimostrarono che il bacillo della difterite rilascia nel mezzo di coltura una tossina, la quale è responsabile anche dell'azione patogena, mentre Knud Helge Faber descriveva la stessa per il bacillo del tetano.

Nel frattempo si osservava che alcuni componenti del siero, di natura "albuminosa", distruggevano alcune specie di batteri. George F. Nuttal, nel 1888<sup>104</sup>, rilevava l'azione battericida del sangue defibrinato e Hans Büchner, nel 1889 chiamò le ipotetiche sostanze responsabili di questa attività di difesa dagli agenti patogeni "alessine"<sup>105</sup>, che successivamente saranno denominate "citasi" da Metchnikoff e "complemento" da Ehrlich. Büchner osserverà anche che il riscaldamento per un'ora a 55 °C le rende inattive<sup>106</sup>.

Nel 1890 Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato scoprivano che l'organismo produce, in risposta all'inoculazione di esotossine, delle sostanze, che furono denominate *antitossine*, in grado di neutralizzare e prevenire selettivamente l'azione dannosa dei veleni. La resistenza all'infezione poteva essere trasferita passivamente da un animale all'altro mediante il siero di un donatore immunizzato, che manifestava una proprietà antitossica specifica<sup>107</sup>. Paul Ehrlich, che mise a punto il primo metodo di standardizzazione del siero anti-

difterico, introdusse nel 1892 la distinzione fra immunità acquisita *attivamente* e *passivamente*, che integrava quella fra immunità *naturale* e *acquisita* emersa nel corso delle esperienze pasteuriane di vaccinazione. Ehrlich suggerì per primo, nel 1891<sup>108</sup>, di chiamare anticorpo (*Antikörper*) la sostanza antitossica specifica prodotta in risposta all'inoculazione di una tossina, ma sino ai primi anni di questo secolo i diversi laboratori utilizzavano termini differenti per l'anticorpo, a seconda delle scuole immunologiche (es., i francesi lo chiamavano *fissatore* o *sostanza sensibilizzatrice*) o a seconda della manifestazione sierologica cui dava luogo (es. *antitossina*, *batteriolisina*, *agglutinina*, *precipitina*, *emolisina*, *ambocettore*, etc.)<sup>109</sup>. Il termine *antigene* fu utilizzato per la prima volta col significato di "sostanza immunogena" da Lazlo Deutsch nel 1899, e veniva inteso come una sostanza intermedia fra i componenti microbici e l'anticorpo<sup>110</sup>, per acquistare poi, una volta confutata l'ipotesi teorica cui faceva riferimento Deutsch, il significato di sostanza in grado di indurre una risposta immunitaria specifica.

Le due fondamentali pratiche di immunizzazione artificiale, attiva e passiva, hanno progressivamente migliorato le strategie per rendere più efficaci e più sicuri i vaccini e i sieri. I primi decenni di questo secolo hanno visto intensi sforzi per la produzione di un vaccino anti-tubercolare e per 'detossificare' le tossine allo scopo di utilizzarle nell'immunizzazione attiva. Nel 1921 fu sperimentato efficacemente sull'uomo il Bacillo di Calmette e Guérin (BCG) costituito da un ceppo attenuato di bacilli tubercolari di origine bovina<sup>111</sup>. Nel 1913 fu utilizzata per la prima volta da Emil von Behring una miscela di tossina e antitossina per immunizzare contro la difterite<sup>112</sup>, mentre nel 1923 Gaston Ramon ottenne le *anatoossine* inattivando le esotossine con formaldeide, con cui furono preparati i vaccini antidifterico e anti-tetanico.<sup>113</sup> Le tossine trattate, chiamate *tossoidi*, avevano il difetto di essere assorbite troppo rapidamente dal sito di iniezione e, per prolungare lo stimolo antigenico iniziarono le ricerche degli *adiuvanti*,

sostanze che vengono somministrate insieme all'antigene e incrementano aspecificamente o modificano la risposta immunitaria. Il primo adiuvante, la tapioca, fu usato da Ramon nel 1925<sup>114</sup>, ma solo negli anni Quaranta del Novecento Jules Freund diede l'impulso decisivo alla tecnologia degli adiuvanti con il sistema di emulsione di acqua in olio, in cui l'antigene era sospeso nella fase acquosa, mentre nella fase oleosa vengono sospesi i micobatteri (di solito *M. tuberculosis*) uccisi ed essiccati (*Adiuvante completo di Freund*)<sup>115</sup>. Gli anni Trenta del Novecento videro lo sviluppo delle colture di tessuti che inaugurava una nuova era nella preparazione dei vaccini, procurando dei terreni per la crescita dei virus più efficaci e più sicuri, come la membrana coriollantoide dell'uovo di pollo fertilizzato<sup>116</sup> su cui Max Theiler preparava nel 1937 il ceppo 17D del virus attenuato della febbre gialla da utilizzare per la vaccinazione, meno potente del ceppo sviluppato nel 1935 su cellule nervose di topo, ma privo dell'effetto collaterale di quest'ultimo, che poteva provocare l'encefalite cerebrale allergica<sup>117</sup>. Il problema della specificità immunologica fu studiato quasi esclusivamente nel contesto della ricerca sulla chimica delle reazioni antigene-anticorpo, e, in tal senso, la riflessione intorno a esso riguardava le possibilità e i limiti dell'applicazione dei concetti della chimica per spiegarne la fenomenologia. Tuttavia, va ricordato che ancora prima che fosse scoperta la reattività del siero degli animali immunizzati, lo zoopatologo Elie Metchnikoff concepì l'immunità come una risposta attiva dell'organismo a un agente invasivo, una risposta collegata alla fisiologia normale delle cellule, in particolare alla nutrizione, e ai processi cooperativi e competitivi che assicurano all'integrità funzionale dell'organismo, di cui egli cercò di indicare anche l'origine filogenetica. Nel 1884 egli ipotizzava, infatti, che l'immunità fosse il risultato dell'attività fagocitica dei leucociti (*teoria della fagocitosi*), arrivando a questa conclusione sulla base di esperimenti sul potere digestivo delle cellule mesodermiche distribuite fra i diversi phyla evolutivi e sull'osservazione delle reazioni infiammatorie<sup>118</sup>.

Gli anni Novanta dell'Ottocento videro quindi un serrato confronto fra l'approccio "cellulare" di Metchnikoff e della scuola che egli fondò all'Institut Pasteur di Parigi, e quello umorale della scuola immunologica tedesca formatasi nei laboratori di Koch a Berlino. Mentre i cellularisti riconducevano la fenomenologia dell'immunità all'attività dei fagociti, negando la rilevanza funzionale dei fattori specifici presenti nel siero, gli umoralisti che consideravano, al contrario, il ruolo dei fagociti irrilevante per la distruzione dei microbi, o tutt'al più di supporto, per inglobare i batteri precedentemente uccisi da fattori solubili presenti nel sangue.

Fra il 1890 e il 1905 furono descritti i principali fenomeni immunologici dovuti all'interazione fra il siero immune e i materiali di natura batterica, organica o artificiale in grado di stimolare la produzione di anticorpi, individuando altresì il valore terapeutico e diagnostico delle reazioni. Tali osservazioni rappresentavano il materiale empirico su cui si esercitava l'indagine sulla natura e l'origine della specificità immunologica.

Il riapparire del colera in Europa, nel 1892, intensificò le ricerche batteriologiche sulla natura dell'immunità nei confronti del bacillo a virgola. Richard Pfeiffer realizzò una serie di ricerche sulla batteriolisi specifica del vibrione colerico attraverso cui il principale collaboratore di Koch stabilì uno stretto rapporto fra la specie-specificità dei microbi e la proprietà del sangue immunizzato. In particolare, egli dimostrò che se si immunizzavano delle cavie con due microbi dello stesso genere, ma di specie diverse (*Vibrio cholerae* e *Vibrio metchnikovi*), questi erano distinguibili immunologicamente in quanto l'immunizzazione nei confronti di uno non proteggeva dall'altro. In questo modo Pfeiffer stabiliva lo stretto rapporto fra specificità batteriologica e specificità immunologica. Nel 1894 egli pubblicava queste osservazioni sull'immunità del coniglio alla peritonite colerica sperimentale, in cui descriveva l'agglutinazione e la lisi dei vibriani inoculati nella cavità addominale, sottolineando che ciò era dovuto al

“liquido organico”, senza il concorso dei fagociti<sup>119</sup>. L’anno successivo Jules Bordet riuscì a riprodurre *in vitro* il “fenomeno di Pfeiffer”, dimostrando che la batteriolisi è dovuta all’effetto di due fattori concomitanti, l’uno aspecifico e termolabile (l’alessina di Büchner o complemento) e l’altro specifico e termostabile che si trova solo nel siero immune e che egli chiamò “sensibilizzatrice”, l’anticorpo<sup>120</sup>.

Nel 1896 Max von Gruber, Herbert Durham, Almroth Wright e Richard Pfeiffer suggerirono la possibilità di utilizzare a scopo diagnostico il fenomeno dell’agglutinazione dei batteri da parte dell’antisiero specifico. La reazione fu applicata in campo clinico da Fernand Widai per diagnosticare la febbre tifoide<sup>121</sup>, mentre Durham descrisse analiticamente il significato dell’agglutinazione individuando, fra l’altro, la possibilità di reazioni incrociate che si verificano fra l’anticorpo specifico e un antigene correlato, ma diverso da quello utilizzato come stimolo per indurre la risposta immunitaria, e la cui manifestazione poneva seri problemi a quei ricercatori che ipotizzavano una corrispondenza assoluta fra specificità batteriologica e specificità immunologica<sup>122</sup>.

Richard Kraus ottenne nel 1897 la precipitazione flocculenta di un filtrato di vibrione colerico mediante l’antisiero. La natura specifica e il significato diagnostico della reazione furono dimostrati dallo stesso Kraus e, negli anni successivi la tecnica della precipitazione fu alla base di importanti applicazioni nel campo forense e nella ricerca tassonomica e filogenetica<sup>123</sup>. Il fatto che la specificità delle reazioni immunologiche, al di là di limitati casi di reazioni incrociate, consentisse di discriminare esattamente fra diversi composti chimici di natura organica o inorganica aprì la strada all’applicazione delle tecniche sierologiche, oltre che in campo terapeutico e diagnostico, nella soluzione di alcuni classici problemi di differenziazione fra composti diversi. Per esempio, il George Nuttal intraprese l’ambizioso programma di ricerca di utilizzare il metodo sierologico della precipitazione, allo scopo di dimostrare che i caratteri immunologici delle sieroproteine sono correlati filogeneticamente. Allorché anticorpi e corrispondenti

sieroproteine reagivano in vitro, si formava un composto insolubile, dall'aspetto di un precipitato biancastro. Così, gli anticorpi preparati nei conigli contro le sieroproteine di un altro animale reagivano specificamente con le proteine della seconda specie e, in minor misura, con quelle di una specie strettamente affine<sup>124</sup>. La reazione di precipitazione veniva utilizzata anche in medicina legale per identificare sostanze organiche di natura umana e animale, poichè quantità minime di sieroproteine erano sufficienti per il manifestarsi del precipitato<sup>125</sup>. Nel 1898 Jules Bordet aveva messo in relazione l'emolisi, osservata per la prima volta da Serafino Belfanti e Tito Carbone<sup>126</sup>, con la batteriolisi<sup>127</sup> e, nel 1901, con Octave Gengou, descrisse la fissazione del complemento, per cui in presenza di una reazione antigene-anticorpo il complemento si lega al complesso e non si trova libero nel siero<sup>128</sup>. Anche grazie ai lavori di Carlo Moreschi venne l'idea di applicare questa reazione per rilevare la presenza di un antigene specifico nel siero, utilizzando come indicatore l'azione litica esercitata dal complemento eventualmente lasciato libero - cioè nel caso in cui non fosse avvenuta alcuna reazione antigene-anticorpo - in un sistema emolitico. Nel 1906 il metodo fu utilizzato da August Wasserman per la diagnosi della sifilide<sup>129</sup>.

Almroth Wright e Steward Douglas scoprirono nel 1903 il fenomeno dell'opsonizzazione, cioè il potere di alcuni componenti del siero di facilitare la fagocitosi da parte dei leucociti. Con scarso successo Wright tentò una ricomposizione fra gli approcci divergenti delle teorie umorali e cellulari<sup>130</sup>. Ma la divaricazione che si andava realizzando in quegli anni fra l'approccio chimico e quello fisiologico all'immunità, con una prevalenza del primo, non lasciava molto spazio a un'ipotesi che in sostanza cercava di rilanciare le idee di Metchnikoff.

### *La natura della specificità immunologica*

Il termine "immunochimica" fu coniato dal chimico svedese Svante Arrhenius, nel 1907, per dare il titolo a un volume che raccoglieva

sei conferenze sulle *Reazioni immunitarie* tenute all'Università della California, a Berkley, nell'estate del 1904. "Con questa parola – scriveva Arrhenius nella prefazione – voglio indicare che in queste pagine vengono esaminate le reazioni chimiche delle sostanze che sono prodotte in seguito all'iniezione di sostanze estranee nel sangue degli animali, per esempio mediante immunizzazione"<sup>131</sup>. L'obiettivo del chimico svedese era comunque la confutazione delle teorie chimiche di Paul Ehrlich e l'applicazione del concetto di equilibrio chimico allo studio quantitativo delle reazioni immunitarie.

Anche se le ricerche sulla composizione delle antitossine iniziarono subito dopo la loro scoperta, fu solo con gli studi sperimentali di Paul Ehrlich, volti a definire un metodo di standardizzazione dei sieri antitossici, che i concetti e le tecniche della chimica cominciarono a essere applicati adeguatamente per studiare la dinamica delle reazioni immunitarie.

In pratica, Ehrlich identificò specificità immunologica e affinità chimica, sostenendo l'ipotesi della complementarità strutturale fra i gruppi atomici dell'anticorpo e dell'antigene, riconoscendo l'eterogeneità dell'affinità di legame, ma affermando che questa era da attribuirsi all'antigene, mentre l'affinità degli anticorpi era da considerarsi omogenea, e, infine, stabilendo che la reazione fra antigene e anticorpo dipende dalla temperatura e dalla concentrazione dei reagenti. L'approccio di Ehrlich assumeva come modello della fisiologia cellulare la teoria protoplasmatica di Edward Pflüger, che individuava le funzioni fisiologiche delle cellule viventi nell'attività di specifici gruppi atomici, attaccati al nucleo chimico della cellula, intese quindi come catene laterali dotate di funzioni metaboliche distinte<sup>132</sup>. Pflüger utilizzò questo modello di protoplasma, per caratterizzare i processi ossido-riduttivi che intervengono nella combustione fisiologica, ed Ehrlich approfondì questi studi, nella sua tesi di dottorato, misurando l'avidità per l'ossigeno delle diverse cellule dell'organismo in differenti specie animali<sup>133</sup>.

Dopo una serie di ricerche effettuate con tossine vegetali, la ricina e l'abrina, attraverso cui arrivò a definire il tipo di protocollo sperimentale adatto per un'indagine chimica sulla neutralizzazione fra tossina e antitossina, produsse, su invito dello Stato Prussiano, che lo nominò direttore di un apposito Istituto, le norme per la standardizzazione dei sieri, che caratterizzeranno per oltre mezzo secolo gli studi quantitativi della reazione antigene-anticorpo. Nel definire quantitativamente i valori di tossicità delle tossine in termini di dosi letali, cioè della quantità di tossina necessaria a uccidere una cavia di 250 gr. entro 96 ore, e il potere di neutralizzazione delle antitossine in termini della quantità di antitossina necessaria a neutralizzare 100 dosi letali, Ehrlich assunse come presupposto la validità della legge delle proporzioni multiple. E, di fronte all'evidenza sperimentale che dimostrava l'estrema variabilità delle dosi di antitossina necessarie a neutralizzare una determinata quantità di tossina, così come la variabilità della dose letale, quando questa veniva aggiunta a una miscela di tossina e antitossina già neutralizzata, Ehrlich decise di non cambiare il modello chimico di spiegazione, ma di adottare una serie di ipotesi *ad hoc* circa l'esistenza di una pluralità di componenti delle tossine, dotati di un diverso grado di tossicità. Sulla base di queste ricerche quantitative, nel 1897 Ehrlich presentò una teoria dell'immunità, che chiamò *teoria delle catene laterali*, in cui ribadiva il concetto che le leggi specifiche nell'immunità dipendono dalle leggi della chimica strutturista. In altri termini, per Ehrlich la reazione fra antigene e anticorpo era fondata sui principi che governano le reazioni di sintesi organica, vale a dire doveva trattarsi di una reazione irreversibile, caratterizzata da legami chimici forti (covalenti) e governata dalla legge delle proporzioni multiple. La specificità degli anticorpi, che per la teoria corrispondevano alle catene laterali, cioè erano normali prodotti cellulari presenti, con funzione di recettori, sulla superficie del protoplasma, era una conseguenza dell'interazione fra strutture molecolari chimicamente definite e

fra loro complementari. Ehrlich esemplificava tale rapporto con il modello della chiave e della serratura, proposto da Emil Fischer per spiegare la specificità dell'interazione fra enzima e substrato<sup>134</sup>.

Svante Arrhenius, che fu invitato dallo stesso Ehrlich a studiare le basi chimiche delle reazioni immunitarie, adottò un diverso modello di spiegazione dell'eterogeneità delle reazioni antigene-anticorpo. Il fondatore dell'elettrochimica spiegava l'interazione molecolare in termini di legami ionici e della legge dell'azione di massa, e, contrariamente a Ehrlich, che sosteneva che la combinazione era completa e considerava la neutralizzazione della tossina da parte dell'anti-tossina corrispondente a una reazione fra acido forte e base forte, vedeva nell'interazione fra antigene e anticorpo un'esemplificazione del modello dell'equilibrio chimico per l'interazione fra acidi e basi debolmente dissociati<sup>135</sup>. La controversia, che produsse innumerevoli studi sperimentali, sarebbe stata risolta da Linus Pauling, che spiegò come attraverso le forze deboli intermolecolari e la stereocomplementarietà si possono verificare unioni stabili fra le molecole anche se le energie di legame sono basse<sup>136</sup>.

Tuttavia, a partire dall'ultimo decennio dell'Ottocento, fino agli anni Venti del Novecento, il punto di vista prevalente nella spiegazione delle interazione fra sostanze biologiche era quello "colloidale". La teoria dei colloidi non concepiva l'esistenza di macromolecole, come di fatto era il protoplasma secondo Pflüger, quali elementi costitutivi della forma e della funzione degli organismi viventi, ma attribuiva i fenomeni biochimici a interazioni fisiche 'non specifiche' fra le superfici di ammassi molecolari, che proprio in virtù delle loro dimensioni davano luogo a un'amplificazione delle forze elettriche e magnetiche producendo fenomeni come l'*adsorbimento* o l'*autocatalisi*. Per la scienza dei colloidi, l'apparente selettività di questi processi non aveva nulla a che fare con la struttura molecolare delle sostanze interagenti e non poteva essere spiegata con le normali leggi della chimica (leggi delle proporzioni costanti e multiple e legge dell'azione di massa),

ma dipendeva dall'attività superficiale degli aggregati colloidali che prevedevano esclusivamente interazioni di tipo fisico<sup>137</sup>.

I fondamenti della teoria colloidale della vita furono abbracciati da un importante immunologo, Jules Bordet, il quale riteneva che la specificità avesse una base biologica e non chimica. Il microbiologo belga, allievo di Metchnikoff, faceva appunto notare a Ehrlich che i diversi anticorpi manifestavano gradazioni di affinità di fronte a differenti antigeni e, inoltre, che non esisteva alcuna evidenza a favore di una combinazione chimica, cioè di una relazione quantitativa definita fra l'antigene e l'anticorpo. Egli ipotizzava che l'interazione fra antigene e anticorpo fosse un fenomeno di adsorbimento, cioè un processo fisico di aderenza molecolare fra queste sostanze, governato dalle leggi della chimica-fisica dei colloidi e analogo a un processo di mordenatura<sup>138</sup>. "L'affinità dell'adsorbimento – scriveva Bordet – è sufficientemente delicata, graduale ed elettiva da rendere la nozioni della sua partecipazione nella reazione antigene-anticorpo del tutto compatibile con quella della specificità"<sup>139</sup>. Secondo Bordet, la causa fisiologica della specificità restava avvolta nel mistero, anche se egli riteneva che proprio "la specificità dei sieri [contribuisse] a fornire al concetto della diversità delle specie una base materiale"<sup>140</sup>.

Un altro confronto, dai toni assai più esasperati, sulla natura della specificità immunologica, contrappose Ehrlich al medico viennese Max von Gruber, in quanto esponenti di due filosofie della natura inconciliabili che riproponevano, nel contesto del dibattito immunologico la controversia circa la natura "discreta" o "continua della specie-specificità batteriologica. Gruber si riconosceva nell'idea "continuista", fondata sul concetto di una "gradualità quantitativa" nella determinazione dei fenomeni biologici, che derivava direttamente dal botanico Carl von Nägeli e da Hans Büchner, mentre Ehrlich rappresentava la scuola batteriologica e microbiologica di Ferdinand Cohn, Robert Koch e Carl Weigart, che propugnava un

concetto di specificità “discreta” dei microrganismi, considerati come specie distinte sia dal punto di vista tassonomico, sia da quello eziopatogenetico, sia da quello immunologico<sup>141</sup>.

Gruber sollevò tuttavia alcune questioni che avrebbero impegnato le successive generazioni di immunologi. Egli riteneva non fosse possibile spiegare in termini chimici il numero straordinariamente grande di specificità tra loro differenti richiesto dalla teoria di Ehrlich. Inoltre sottolineava come il manifestarsi di anticorpi specifici per antigeni che non sono presenti nell’ambiente naturale contraddiceva il principio darwiniano della selezione naturale. Ma il vero bersaglio della critica di Gruber era il concetto di specificità immunologica “assoluta”, intesa da Ehrlich come un’unione di tipo forte e irreversibile fra antigene e anticorpo. In questo senso, i fenomeni sierologici che si prestavano a essere interpretati ambiguamente erano le reazioni incrociate<sup>142</sup>. Mentre per Ehrlich e Pfeiffer, le reazioni incrociate erano il risultato dell’interazione di anticorpi diversi con miscele di antigeni, per cui era fondamentale utilizzare antisieri con un titolo molto basso per evidenziare la specificità dell’interazione, Gruber, da parte sua, riteneva che ogni anticorpo interagisse, con affinità gradualmente diverse, con numerosi antigeni differenti e questo era evidenziato dalle reazioni incrociate. Egli le considerava il prototipo delle reazioni non specifiche, predicando ovviamente l’utilizzazione di antisieri di titolo elevato per studiare il meccanismo di queste interazioni<sup>143</sup>.

Ehrlich era l’unico a pensare che la specificità fosse piuttosto una caratteristica da ascrivere all’anticorpo, inteso come recettore, per cui la specificità antigenica non comportava, dal suo punto di vista, alcuna implicazione riguardo alla natura omogenea o meno degli antigeni stessi. Questi, fino alla metà degli anni Venti, venivano considerati di natura proteica, e la maggioranza degli immunochimici li riteneva in qualche modo coinvolti nell’origine della specificità dell’anticorpo<sup>144</sup>.

Se Ehrlich, Bordet, Arrhenius e Gruber affrontarono le grandi questioni teoriche collegate a un approccio chimico nello studio dei fenomeni immunitari, la raccolta e l'analisi dettagliata dei dati empirici fu realizzata da Karl Landsteiner, che fu assistente di Gruber a Vienna e di Fischer a Jena, e che sviluppò sistematicamente lo studio della reazione antigene-anticorpo per stabilire la natura della specificità immunologica. Il suo nome è legato soprattutto alla scoperta dei gruppi sanguigni ABO, nel 1901, e del fattore Rh, nel 1940, ma si può dire che Landsteiner fu, nel periodo tra le due guerre, il punto di riferimento della ricerca immunochimica<sup>145</sup>.

A partire dal 1917 Landsteiner si dedicò a sviluppare l'approccio inaugurato nel 1906 da Friedrich Obermayer e Ernst Peter Pick, e ripreso da Pick nel 1911<sup>146</sup>, che indicava la possibilità di provocare una risposta specifica nei confronti dei sostituenti chimici in proteine alterate, indipendentemente dalla specie-specificità delle proteine medesime. Nel 1912, Pick dimostrò che il numero dei possibili sostituenti in grado di stimolare la formazione di anticorpi era enorme ed era inconcepibile come i mammiferi potessero prevedere, stando alla teoria di Ehrlich, l'esistenza di composti che i chimici ancora non avevano sintetizzato<sup>147</sup>.

Le ricerche di Landsteiner sui composti proteici solfonati, metilati e diazotati portarono alla conclusione che la specificità immunochimica è determinata dalla struttura di una porzione relativamente piccola della molecola antigenica. L'influenza del composto organico semplice installato sulla proteina, chiamato da Landsteiner "aptene", sulle proprietà del siero immune sembrava effettivamente la conseguenza di una corrispondenza stereochimica fra gruppi atomici, del tipo di quella suggerita da Fisher per l'interazione enzima-substrato, e adottata da Ehrlich. Lo stesso Landsteiner scopriva la possibilità di discriminare, mediante antisieri specifici, gli stereoisomeri dell'acido tartarico, e altri isomeri otticamente attivi legati a una sostanza proteica mediante diazotizzazione. Ma, fedele all'inse-

gnamento del suo maestro Gruber, Landsteiner tendeva a mitigare questa interpretazione, affermando che, accanto alla configurazione, un ruolo importante è svolto dalle proprietà chimiche dei gruppi che intervengono nella specificità sierologica. “La specificità – osservava – è l’espressione di un’affinità quantitativamente variabile che mostra il suo valore massimo per una certa combinazione, i termini della quale sono detti: antigene specifico e anticorpo omologo”<sup>148</sup>.

Egli, inoltre, considerava essenzialmente diverse la specificità delle reazioni di precipitazione, che sembravano mostrare un’affinità graduale, e la specificità delle reazioni di agglutinazione, soprattutto le emoagglutinazioni. Queste ultime manifestavano una specificità pressoché assoluta, con poche reazioni incrociate. Landsteiner, riteneva che le strutture chimiche responsabili del potere antigenico nelle due reazioni (“precipitinogeni e agglutinogeni”) fossero di nature diverse. Sulla base delle osservazioni di Michael Heidelberg e Ostwald Avery sui polisaccaridi dei pneumococchi e dei lavori di Forsmann sugli antigeni eterologhi, concluse che la maggior parte degli antigeni cellulari dovevano essere considerati come “apteni di natura non proteica”<sup>149</sup>.

La scoperta di Heidelberger e Avery, nel 1923, che il materiale capsulare responsabile della specificità sierotipica del pneumococco, e un polisaccaride, rivoluzionò la nozione di antigenicità<sup>150</sup>. Infatti, ad eccezione di Ehrlich, la cui teoria della specificità non implicava alcuna ipotesi riguardo la natura dell’antigene, sino a quel momento si riteneva che soltanto le proteine fossero dotate di potere antigenico. Addirittura si pensava che la specificità immunologica fosse riconducibile alla struttura lineare delle proteine<sup>151</sup>.

Nel 1929, lo stesso Heidelberger mise a punto un metodo di precipitazione quantitativa in mezzo liquido, che gli consentì di dimostrare la natura proteica degli anticorpi, la reversibilità del legame per l’antigene e di inaugurare un corso di ricerche quantitative che avrebbero portato, seguendo le vie alterne dello studio delle caratteristiche

chimiche dell'antigene o dell'anticorpo a una comprensione quasi completa delle basi strutturali della specificità immunologica<sup>152</sup>. Basandosi su questi lavori, il patologo chimico John Richardson Marrack, ipotizzò nel 1934 che la precipitazione dell'antigene e dell'anticorpo fosse dovuta alla formazione di un reticolo molecolare, il che implicava la multivalenza dell'anticorpo<sup>153</sup>.

La caratteristica costitutiva dell'approccio immunochimico era, in quegli anni, la prevalenza del ruolo dell'antigene come riferimento nell'indagine sul problema della specificità. In questo senso, fra tutte le idee di Ehrlich, quella che maggiormente veniva ritenuta inaccettabile era proprio l'attribuzione all'anticorpo della funzione centrale nella determinazione della specificità delle interazioni immunitarie. Si rifiutava, cioè, la nozione di "recettore", che stabiliva la preesistenza della struttura anticorpale complementare all'antigene<sup>154</sup>.

Lo studio diretto delle caratteristiche chimico-fisiche dell'anticorpo fu possibile solo con l'avvento della tecnica di ultracentrifugazione, ideata da Theodor Svedberg, e dell'elettroforesi in fase libera, predisposta da Arne Tiselius<sup>155</sup>. Gli anticorpi furono quindi differenziati, a partire dalle loro caratteristiche fisiche (carica elettrica, coefficiente di sedimentazione, peso molecolare, etc.), anche per quanto riguardava le funzioni biologiche (fissazione del complemento, passaggio attraverso la placenta, partecipazione alle manifestazioni allergiche), evidenziando il fatto che essi, diversamente dalle altre proteine seriche, erano eterogenei sia dal punto di vista della specificità, sia dal punto di vista della funzione biologica<sup>156</sup>.

#### *Unità e diversità funzionale degli anticorpi*

L'approccio chimico mirava a risolvere tutti i processi immunitari nei termini della reazione antigene-anticorpo. Gli aspetti funzionali delle risposte immunitarie venivano collocati in secondo piano e il problema stesso dell'origine della specificità per molti immunochi-

mici non era fondamentale e, comunque, trovava la sua implicita soluzione nei dati sperimentali. In questo senso, si assisteva a una curiosa contraddizione, per cui, mentre le ricerche immunochimiche dimostravano l'eterogeneità degli anticorpi, sia per rispetto alla specificità che alla funzione, la potenziale immunogenicità degli antigeni artificiali portava a sostenere una teoria che implicava la "totipotenza" degli anticorpi.

Nella sierologia classica, quella che copre i due decenni a cavaliere del 1900, gli anticorpi erano considerati "uni potenti", nel senso che per ogni reazione sierologica si ipotizzava l'esistenza di un anticorpo *ad hoc*, quello responsabile dell'agglutinazione lo si chiamava agglutinina, della precipitazione precipitina, dell'emolisi emolisina, e così via. L'ipotesi era che se il batterio o una proteina sono costituiti da una molteplicità di elementi antigenici differenti, quando l'organismo animale viene trattato con queste sostanze e trova dei recettori corrispondenti, formerà una molteplicità di anticorpi qualitativamente diversi<sup>157</sup>. Anche Ehrlich, il quale non riconosceva l'eterogeneità degli anticorpi rispetto alla specificità, concepiva una loro diversità funzionale. Una pluralità di sostanze nel siero era implicita nell'idea che le catene laterali del protoplasma, svolgendo normalmente una funzione nutritizia, dovevano servire per l'assimilazione da parte della cellula di sostanze diverse.

Tuttavia, nel 1908 e nel 1909 il concetto dell'identità essenziale delle precipitine e delle agglutinine fu proposto da alcuni batteriologi, fra cui Oskar Bail, che dirigeva il Dipartimento di Igiene e Batteriologia presso l'Università germanica di Praga. La teoria detta "unitaria", per cui tutti gli anticorpi sarebbero identici per costituzione e capacità di partecipare alle reazioni sierologiche, fu comunque enunciata da Hans Zinsser nel 1921<sup>158</sup>. Secondo Zinsser la fenomenologia delle reazioni sierologiche dipendeva dallo stato fisico dell'antigene e dalle condizioni ambientali in cui era effettuata l'osservazione. Come risultato dell'unione con l'anticorpo, l'antigene veniva modificato

per quanto riguarda il suo comportamento fisico e, entro certi limiti, forse anche chimico. Le reazioni risultanti che si potevano osservare con l'antigene sensibilizzato (agglutinazione, precipitazione, fissazione del complemento, fenomeni battericidici, batteriolisi, opsonizzazione o effetti di sensibilizzazione in senso anafilattico) sarebbero determinate non dalle differenze nella natura degli anticorpi con cui l'antigene è unito, ma piuttosto dallo stato fisico dell'antigene stesso, dalla natura delle sostanze che cooperano alla risposta (alossina, leucociti, cellule tissutali) e dalle condizioni ambientali in cui viene effettuata l'osservazione<sup>159</sup>.

Un appoggio fondamentale all'ipotesi "unitaria", va ricordato, venne dagli sviluppi delle ricerche quantitative sull'interazione antigene-anticorpo di Michael Heidelberger, che nel 1934, insieme a E.A. Kabat, dimostrò l'identità delle precipitine e delle agglutinine prodotte in risposta allo stesso antigene<sup>160</sup>.

E' vero che Zinsser attribuiva a questa ipotesi piuttosto un valore orientativo, trovando illogico immaginare che l'inoculazione di un antigene puro richiamasse "cinque o sei reazioni fundamentalmente diverse da parte delle cellule tissutali"<sup>161</sup>, tuttavia diverse ricerche mostravano che la teoria era sostenibile ed essa fu implicitamente inglobata nelle teorie della formazione dell'anticorpo basate sul concetto di stampo antigenico.

*L'origine della specificità immunologica: il problema della formazione dell'anticorpo*

Strettamente collegata alle riflessioni e alle indagini sperimentali riguardanti la natura dell'interazione fra antigene e anticorpo, emerse nel contesto della nascente scienza dell'immunità la questione circa il meccanismo fisiologico che potesse garantire la produzione di anticorpi specifici proprio per quell'antigene che ne aveva stimolato la formazione.

Pasteur, che si era interessato ai problemi dell'immunità a scopo prevalentemente pratico, vale a dire per trovare strumenti efficaci nella lotta contro le malattie infettive, inizialmente ipotizzò che l'immunità acquisita fosse dovuta all'impossibilità per un determinato microbo patogeno di crescere in un terreno nel quale si era sviluppato precedentemente a causa dell'esaurimento di "qualche principio che la vita non ristabilisce più". L'immunità naturale veniva a sua volta spiegata sulla base della "costituzione" e della "resistenza vitale" dell'ospite, interpretando questi concetti nel senso di una concorrenza, o di una lotta per l'esistenza fra i parassiti e le cellule dell'organismo per l'ossigeno e le sostanze nutritive. Tuttavia, a partire da 1884, Pasteur cominciò a orientarsi verso una spiegazione 'chimica', per cui attribuì allo stesso microrganismo la secrezione di una sostanza antagonista chimicamente definita la quale impediva il suo successivo sviluppo. I concetti di "lotta per l'esistenza" e di "antagonismo microbico" sui quali egli aveva basato le sue due teorie, insieme alla percezione dei propri limiti riguardo le conoscenze biologiche generali, furono probabilmente all'origine della disponibilità di Pasteur nei riguardi delle idee di Metchnikoff, per cui a partire dal 1887 questi cominciò a lavorare all'Institut Pasteur, ancora in costruzione, fondando una scuola di immunologia che influenzò profondamente la crescita delle conoscenze sulla fisiologia e la biologia dell'immunità<sup>162</sup>.

Per quanto riguarda l'antitossina, la prima 'classe' di anticorpi individuata, poiché se ne ignorava la natura chimica, l'ipotesi che apparve più plausibile alla maggior parte dei ricercatori prevedeva che la stessa sostanza tossica entrasse materialmente a formare l'anticorpo. Nel 1893, Hans Büchner, in una comunicazione presentata alla Società Medica di Monaco affermava che ogni evidenza era indicativa della presenza nell'antitossina di una sostanza cellulare del batterio specifico, la quale si accumulerebbe nel corpo dell'animale immunizzato. Solo l'origine comune di entrambe le sostanze

dal “plasma batterico”, quella velenosa e quella protettiva, secondo Büchner, rendeva immediatamente intelligibile “la natura specifica di questa protezione”<sup>163</sup>.

Questa ipotesi era condivisa da Metchnikoff e da von Gruber, che la ritenevano l’unica spiegazione ‘logica’ della specificità degli anticorpi. Tuttavia, Emile Roux già nel 1893 dimostrò che il salasso continuo di un animale immunizzato non diminuiva il titolo di anticorpi presenti nel siero, anche dopo che era stata prelevata una quantità di sangue equivalente al volume originario. Altre esperienze mostravano dimostrò che per ogni unità di tossina iniettata nel cavallo potevano formarsi più di 100.000 unità di antitossina circolante e, poiché era abbastanza difficile spiegare questi dati nei termini dell’ipotesi di Buchner, questa fu presto abbandonata<sup>164</sup>. Va ricordato, tuttavia che, nonostante tali evidenze contrarie, nella seconda metà degli anni Venti Wilfred Hamilton Manwaring proclamò rivalutando le idee di Buchner, allo scopo di superare quelli che il patologo statunitense considerava gli ostacoli teorici e pratici posti alla ricerca immunologica dalle idee di Ehrlich. A partire dal 1929, comunque, venne ribadita la validità delle originarie esperienze contrarie a all’ipotesi di una ritenzione dell’antigene. Heidelberger e Kendall confermarono che la quantità di anticorpo prodotto dall’animale immunizzato è di gran lunga superiore alla quantità di antigene utilizzato per l’immunizzazione e fu altresì stabilito che gli anticorpi contro antigeni artificiali non contengono traccia del composto immunizzante<sup>165</sup>.

La teoria della formazione dell’anticorpo che ebbe maggior risonanza, anche perché fu adottata da tutta la scuola batteriologica tedesca, fu comunque la teoria delle catene laterali di Ehrlich.

L’origine degli anticorpi specifici, secondo Ehrlich, non era per nulla avvolta nel mistero, ma si inquadrava in quella che egli definiva “l’antica saggezza del protoplasma”. Le catene laterali del protoplasma “tossophile”, che si legano al recettore “gruppo aptoforo” della tossina, erano per il medico tedesco le stesse che fissavano le sostanze

alimentari essenziali per la vita della cellula. Esse, quindi, erano già presenti sulla superficie del protoplasma di tutte le cellule dell'organismo. L'origine delle antitossine, e, analogamente, degli 'altri' anticorpi, veniva spiegata in base all'ipotesi che l'unione dei gruppi aptofori porterebbe a una riduzione del funzionamento normale della cellula, della sua fisiologia nutritiva, per cui essa avrebbe dovuto rigenerare i gruppi laterali in quantità proporzionali alla tossina immessa nell'organismo. In base a una legge della patologia, enunciata da Carl Weigart, questa compensazione procedeva oltre il livello necessario ("sovracompensazione"), per cui a un certo momento le catene laterali presenti sulla superficie della cellula erano in quantità troppo grande perchè questa le possa trasportare, e venivano quindi secrete e immesse nella circolazione sanguigna<sup>166</sup>.

Per Ehrlich, la formazione di antitossine era priva di ogni carattere finalistico, trattandosi di un processo del tutto analogo ai processi di sintesi sui quali si fonda il metabolismo cellulare. Questa analogia con i processi di sintesi e quindi l'interpretazione dell'interazione fra tossina e antitossina in termini di legami chimici forti (covalenti) creò a Ehrlich non poche difficoltà concettuali nell'utilizzazione della teoria delle catene laterali come modello esplicativo dell'azione farmacologica delle sostanze chimiche. Infatti, fino al 1906, Ehrlich pensava che la reversibilità dell'interazione fra alcuni farmaci e i tessuti dell'organismo collocasse questo tipo di processi in una categoria diversa da quella delle reazioni immunitarie specifiche. Solo la lettura dei lavori del fisiologo inglese John Langley e la constatazione che il neurofisiologo inglese interpretava le "sostanza recettiva" alla luce della teoria delle catene laterali, modificò l'atteggiamento di Ehrlich inducendolo a sviluppare le sue ricerche chemioterapiche sulla base dello stesso concetto di specificità utilizzato nell'indagine immunologica.

La teoria di Ehrlich sulla formazione dell'anticorpo fu concepita nel 1897, vale a dire quando ancora non erano stati scoperti gli isoanticorpi e gli autoanticorpi, e l'antigenicità dei composti chimici arti-

ficiali. Il medico tedesco tentò di adattare il suo modello esplicativo alle evidenze impreviste, ma il risultato fu una proliferazione inarrestabile di ipotetiche entità riferite alla costituzione degli antigeni e a una diversificazione dei recettori cellulari, che resero complicatissima e quasi del tutto inutilizzabile la teoria delle catene laterali. Fu soprattutto l'ampliamento del repertorio di specificità necessarie all'organismo per il riconoscimento di tutti i possibili antigeni a rendere inverosimile l'ipotesi di una preesistenza degli anticorpi.

Oskar Bail e la sua scuola, lavorando presso il dipartimento di Igiene e Batteriologia dell'Università di Praga, elaborarono in alcuni saggi pubblicati prima della Grande Guerra una teoria istruttiva della formazione dell'anticorpo. Essi ipotizzarono che l'antigene poteva continuare a reagire con l'anticorpo naturale anche dopo il primo incontro, imprimendo così la sua specificità su tutte le molecole anticorpali che incontrava in circolazione. Ciò avrebbe spiegato le relazioni quantitative che confutavano la teoria di Buchner. Inoltre, Bail sosteneva di essere riuscito a riprodurre il processo in vitro, nel caso del vibrione colerico, anticipando così un tema metodologico fondamentale delle future teorie istruttive, la dimostrazione *in vitro* del meccanismo di stampo diretto<sup>167</sup>.

E' significativo che il primo ad avanzare un'ipotesi della formazione dell'anticorpo basata sull'idea che l'antigene funzionasse come uno stampo e trasmettesse la specificità all'anticorpo fosse proprio Bail. Infatti, Bail sosteneva anche l'ipotesi *unitaria* riguardo la funzione dell'anticorpo. E' vero che i dati sperimentali mostravano che la specificità immunologica dipendeva da un rapporto stereochimico fra anticorpo e antigene e, nello stesso tempo, che si dimostrava praticamente sconfinato il repertorio dei possibili antigeni, per cui l'ipotesi di una preesistenza degli anticorpi, *à la* Ehrlich, suonava alquanto inverosimile per le nozioni di biologia cellulare e molecolare che si avevano in quegli anni. Tuttavia sta forse nel rapporto tra il concetto di 'omogeneità' degli anticorpi, prima dell'incontro con

l'antigene, e quello di una loro 'eterogeneità' dopo questo incontro, la chiave per capire la logica delle teorie dello stampo antigenico. Infatti, poiché l'eterogeneità della combinazione fra anticorpo e antigene era vista come una caratteristica che contraddiceva l'argomento di una preesistenza di anticorpi fra loro diversi, allora questa variabilità, che nel frattempo emergeva a ogni livello dell'indagine immunochimica, doveva essere imposta dall'esterno. Riassumendo lo stato delle conoscenze sulla natura degli anticorpi, Sanford Hooker scriveva nel 1937 che "la maggior parte dei cambiamenti fisici che si manifestano in una miscela di antigene e anticorpo sono sussidiari al fenomeno centrale della combinazione specifica"<sup>168</sup>.

Fra il 1930 e il 1932, in pieno periodo di ricerche biochimiche sulle proteine, furono avanzate, da Felix Haurowitz<sup>169</sup>, da Stuart Mudd<sup>170</sup>, e da Jerome Alexander<sup>171</sup>, una serie di ipotesi, fra loro analoghe, sul processo di formazione dell'anticorpo, che precedettero e prepararono il terreno al più conosciuto modello elaborato Linus Pauling.

Queste teorie erano basate sull'intervento diretto dell'antigene e prevedevano, in origine, che l'antigene, trasportato nel sito in cui doveva avvenire la sintesi delle proteine, orientasse l'assemblaggio degli amminoacidi in modo che "la molecola dell'anticorpo cresca solo se conforme ai requisiti spaziali e chimici dell'interfaccia antigene-protoplasma, in cui la sintesi viene effettuata"<sup>172</sup>. Ma l'ipotesi che la complementarità strutturale della molecola di anticorpo fosse dovuta a una messa in ordine degli amminoacidi durante la sintesi proteica, sotto il diretto controllo dell'antigene, non era sostenibile data l'impossibilità di prevedere un meccanismo plausibile in grado di effettuare l'operazione.

Nel 1940, Linus Pauling, che aveva iniziato a lavorare sul problema della specificità immunologica su invito di Landsteiner, avanzò un'ipotesi che avrebbe dominato l'immunochimica per due decenni. Egli riteneva, in base alle sue ricerche sulla denaturazione e coagulazione delle proteine, che la presenza dell'antigene nell'ambiente

di formazione dell'anticorpo funzionasse da stampo nel senso di determinare la configurazione stereocomplementare della molecola, imprimendole in tal modo la specificità. Per Pauling, "tutte le molecole di anticorpo differiscono dalla globulina normale soltanto nella configurazione delle catene, cioè nel modo in cui le catene si avvolgono nella molecola". La specificità immunologica veniva spiegata in termini di forze intermolecolari non covalenti, come i legami idrogeno e le forze di van der Waals, che stabilizzavano la configurazione dell'anticorpo nella sua forma complementare all'antigene<sup>173</sup>. Questo modello istruttivo troverà delle difficoltà a spiegare quei fenomeni immunologici che manifestavano una natura biologica, piuttosto che chimica, come per esempio la maggiore efficacia della risposta secondaria, con il caratteristico incremento dell'affinità per l'antigene o il fenomeno della tolleranza immunitaria. E proprio nella critica all'approccio chimico nella spiegazione della specificità immunologica si eserciterà la rinascita di una impostazione funzionale nello studio delle risposte immunitarie<sup>174</sup>.

#### BIBLIOGRAPHY AND NOTES

1. DUBOS R.J., *The Bacterial Cell - Its Relations to problems of Virulence, Immunity and Chemotherapy*. Harvard University Press, Cambridge Mass., 1949; tr. it., Einaudi, Torino, 1957, p. 406.
2. Cfr. per esempio la voce *Specificité*, in: DECHAMBRE A., *Dictionnaire encyclopedique des sciences médicales*, Paris 3<sup>sér.</sup> vol. X, 1881, 800-807.
3. LIEBIG J., *Chemistry and its application to agriculture and physiology*. John Owen, Mass., 1842, p. 75 (ed. or. 1840). E' da sottolineare il fatto che il Liebig fu, sino all'ultimo, uno dei principali avversari di quei microbiologi che lavoravano a dare una base sperimentale alla teoria biologica delle fermentazioni e alla teoria microbica delle malattie e che in pratica negò la validità scientifica dell'imponente sforzo compiuto da Ferdinand Cohn, Paul Ehrlich, Robert Koch, Joseph Lister, Louis Pasteur per definire operativamente il concetto di specificità di determinati fenomeni osservabili nel campo medico e

*Specificità microbiologica e specificità immunologica*

naturalistico, in termini di proprietà biochimiche, morfologiche, immunitarie ed etiopatogenetiche dei microrganismi.

4. PASTEUR L., *Mémoire sur la fermentation alcoolique*. Ann. Chim. Phys., 3<sup>e</sup> sér., 1860; 58: 323-346.
5. Cfr. BULLOCH W., *The history of bacteriology*. Oxford University Press, Londra, 1938, pp. 217-218.
6. KOCH R., *Zur Untersuchung von pathogen Organismen*. Meitt. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte 1881; 1: 1-48.
7. LOEFFLER F., *Zur Immunitätsfrage*. Mitt. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte 1881; 1: 134-187.
8. PETRI R.J., *Eine kleine Modifikation des Kochischen Plattenverfahrens*. Zentralbl. f. Bakt., 1887; 1: 279-280.
9. KLEBS E., *Beiträge zur Kenntniss der Micrococcen*. Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol., 1873; i :31-64.
10. BREFELD O., *Methoden zur Untersuchung der Pilze*. Verhaudl. d. phys-med. Gesellsch. in Würzburg 1875; 8: 43-62.
11. LISTER J., *On the lactic fermentation and its bearing on pathology*. Trans. Path. Soc. London 1878; 29: 425-67.
12. KOCH R., *Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten*. F.C.W. Vogel, Leipzig, 1878.
13. CHANTEMESSE, A. WIDAL G.F.I., *Le bacille tiphique*. Gaz. hebdom. Méd. Chir. 1887; 146-160.
14. KITASATO S., *Die negative Indol-Reaktion der Typhusbacillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bacillenarten*. Z. Hyg. InfektKrankh. 1889; 7: 515-520.
15. DURHAM H.E., *A simple method of demonstrating the production of gas by bacteria*. Br. Med. J. 1898; i: 1387-89.
16. Cfr. COLLARD P., *The development of Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1976, pp. 31-37.
17. ANDERSON J.S., HAPPOLD F.C., MCLEOD J.W. e THOMSON J.G., *On the existence of two forms of diphtheria bacillus - B. diphtheria gravis and B. diphtheria mitis - and a new medium for their differentiation and for the bacteriological diagnosis of diphtheria*. J. Pathol. Bact. 1931; 34: 667-681.
18. MCCARTNEY J.E., *Screw capped bottles in the preparation and storage of culture media*. Lancet 1933; ii: 433-436.
19. CHAMBERLAND C., *Sur un filtre donnant de l'eau physiologiquement pure*. Compt. rend. Acad. Sc. 1884; 99: 247-248.

20. NORDTMEYER H., *Über Wasserfiltration durch Filter aus gebrannter Infusorienerde*. Z. Hyg. Infektkrankh 1891; 10: 145-154.
21. KRONIG B. e PAUL T., *Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Disinfection*. Zeitschr. f. Hyg. u. Infectionkrankh. 1897; 25: 1-112
22. HOFFMAN H., *Ueber Bakterien*. Bot. Ztg. 1869; 17: 265-272.
23. WEIGART C., *Über eine Mykose bei einem neugeborenen kinde*. Jahresshr. d. schlesischen Ges. f. vaterland. Cultur Braslau 1875; 53: 229-230.
24. EHRLICH P., *Ueber das Methylenblau und seine klinische-bacteriologische Verwerthung*. Z. Klin. 1881; 2: 710-13.
25. GRAM F.C., *Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt und Trockenpräparaten*. Fortshr. Med. 1884; 2: 185-189.
26. SCHERRER R., *Gram's staining reaction, Gram types and cell walls of bacteria*. TIBS, May 1984, 242-245.
27. ROGERS H.J., PERKINS H.R. e WARD B.J., *Micorbial cell walls and membranes*. Chapman & Hall, 1980.
28. BARNARD J.E., *The limitations of microscopy*. J. R. Microsc. Soc. 1919: 1-13.
29. RUSKA E. e KNOLL M., *Die magnetisch Sammelspule für schnelle Elektronenstrahlen*. Zeitschr. f. Techn. Physik., 1931; 12 : 389-399.
30. MUDD S., LACKMAN D.B., *Bacterial morphology as shown by the electron microscope*. J. Bact. 1941; 41: 415-420.
31. Cfr. BULLOCH W., *The History of Bacteriology*, op. cit., pp. 236-238.
32. COHN F., *Untersuchungen über Bakterien IV*. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, Bd. II, Heft II, 1876, pp. 248-276.
33. SÉDILLOT C., *De l'influence des découvertes de M. Pasteur sur les progrès de la chirurgie*. Compt. rend. Acad. Sc., 1878 ; 86: 634-640.
34. PASTEUR L., *Discours prononcé à l'inauguration de l'Institut Pasteur le 14 novembre 1888. Ouvres de Pasteur réunis par Pasteur Vallery-Radot*. Masson & C. ie Editeurs, Paris, 1939, Tome VII, p. 417.
35. COHN F., *Untersuchungen über Bakterien*. Beiträge zur Biologie der Pflanzen 1875; 1: 127-222.
36. DUBOS R.J., *The Bacterial Cell*, op. cit., tr. it., p. 411.
37. HALLIER E., *Researches into the nature of vegetable parasitic organisms*. Med. Times and Gazette, London 1868; ii: 222-23; IDEM, *Die Parasiten der Infektionskrankheiten, bei Menschen, Thieren und Pflanzen*. Jena, 1878.
38. VON NÄGELI C., *Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektionskrankheiten und der Gesundheitspflege*. München, R. Oldenburg, 1877.

*Specificità microbiologica e specificità immunologica*

39. WINOGRADSKY S., *Sur le pléomorphisme des bactéries*. Ann. Inst. Pasteur 1888; 3 : 249-264; METCHNIKOFF E., *Contributions à l'étude du pléomorphisme des bactériens*. Ann. Inst. Pasteur 1888; 3: 61-68.
40. COHN F., *Bacteria, the smallest Living Organisms*. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1881.
41. BEIJERINCK M.W., *Die Bakterien der Papilionaccen-Kno:llchen*. Bot. Ztg 1888 ; 46 : 724-735.
42. WINOGRADSKY S., *Recherche physiologiques sur les suphobacteries*. Ann. Inst. Pasteur 1889; 3 :49-60; WINOGRADSKY S., *Recherches sur les organismes de la nitrification*. Ann. Inst. Pasteur 1890; 4: 213-231, 257-275, 760-771.
43. BÜCHNER E., *Alkoholische Gährung ohne Hefezellen*. Ber dtch. Chem. Ges. 1897; 30:117-124.
44. KOHLER R., *The of Eduard Büchner's Discovery of Cell-free Fermentation*. J. Hist. Biol. 1972; 5: 327-353.
45. KOHLER R., *The Background to Eduard Buchner's Discovery of Cell-Free Fermentation*. J. Hist. Biol. 1971; 4: 35-61
46. Cfr. OPPENHEIMER C., *Enzymes and Their Actions*. Charles Griffin, Londra, 1901.
47. KOHLER R.E., Jr., *The Enzyme Theory and the Origin of Biochemistry*. ISIS 1973: 181-196.
48. HARDEN A., *Alcoholic Fermentation*. Green & Co., Londra, IV<sup>a</sup> ed., 1932.
49. LEHMANN K.B. e NEUMANN R.O., *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch des speciallen bakteriologischen Diagnostik*. J.F. Lehmann, München, 1896.
50. BEIJERNICK M.W., *Auhänfungsversuche mit Ureumbakterien*. Centralbl. f. Bakt. 1901; 7, 2: 33-61.
51. WINSLOW C.E.A. e ROGERS A.F., *A statistical study of genetic character in the Coccaceae*. J. Inf. Dis. 1908; 3: 485-546.
52. JENSEN O., *Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystem*. Zentralbl. f. Bakt. 1909; 22: 305-346.
53. KLUYER A.J., *Eenheid en verscheidenheid in de stofwisseling der microben*. Chemich Weekblad. 1924; 21: 266-293.
54. Cfr PASTEUR L., CHAMBERLAND C. , ROUX E., THUILLIER L., *De l'atténuation des virus*. Revue Scientifique, 3<sup>e</sup> série, 1882 ; 4 : 353-358.
55. IWANOVSKI D.I., *Über die Mosaikkkrankheit der Tabakspflanze* (letto il 12 febbraio 1892). Bull. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg 1894 ;35 : 67-70.

56. BEIJERINCK M.W., *Over een contagium vivum fluidum als oorjaak van de vlekziekte der tabaksbladen*. Versl. gewone Vergad. wis en natuurk. Afd. K. Akad. Wet. Amst. 1898; 7: 229-235.
57. SANARELLI G., *Das mixomatogene virus. Beitrag zum Studium der Krankheitserreger auserhalb des Sichtbaren*. Centralblatt f. Bakt., Parasit. u. Infekt. Erste Abteilung 1898; 23: 865.
58. Cfr. REED W. e J. CARROLL, *The etiology of yellow fever*. Am. Med. 1902; 3: 301-305.
59. REMINGLER P., *Les microbes filtrants*. Bull. Inst. Pasteur 1906; 4: 337-345, 385-392.
60. ROUS P.F., *The challenge to man of the neoplastic cell*. Science 1967; 167: 24-28.
61. TWORT F.W., *An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses*. Lancet 1915; 2: 1241-1243.
62. D'HERELLE F., *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique*. C. Rend. Acad. Sciences, Paris 1917; 165: 373-375.
63. BORDET J. e CIUCA M., *Remarques sur l'historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible*. C. R. Soc. Biol., Paris 1921; 84: 745-747.
64. Cfr. STENT G.S., *Molecular Genetics. An introductory narrative*. New York W.H. Freeman & Co., 1971.
65. CARREL A., *On the permanent life of tissues outside of the organism*. J. Exp. Med. 1912; 15: 516-528.
66. SCHELESINGER M., *The Feulgen reaction of the bacteriophage substance*. Nature 1936; 138: 508-509.
67. STANLEY W.M., *Isolation of a crystalline protein possessing the properties of tobacco mosaic virus*. Science 1935; 81: 644-645.
68. Cfr. FANTINI B., *Biologie, médecine et politique de santé publique: l'exemple historique du palidisme en Italie*. Thèse pour le Doctorat, Ecole pratique des Hautes Etudes, Sorbonne-Paris, 1992.
69. LAVERAN, A. *Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre*. Bull. Acad. Med. 1880; 9: 1235-1236, 1268, 1346-1347.
70. MARCHIAFAVA E. e CELLI A., *Nuove ricerche sulla infezione malarica*. Annali di Agricoltura 1885; 35: 5-32.
71. GOLGI C., *Sul ciclo evolutivo dei parassiti malarici nella febbre terzana; diagnosi differenziale tra i parassiti endoglobulari malarici della terzana e quelli della quartana*. Arch. Sci. Med., 1889; 13: 173-196.

*Specificità microbiologica e specificità immunologica*

72. ROMANOVSKI D.L., *Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria*. St. Petersburg Med. Wochenschr., 1891; 8: 297-315.
73. MARCHIAFAVA E. e BIGNAMI A., *Sulle febbri malariche estivo-autunnali*. Boll. R. Accad. Med. Roma, 1892; 18, V: 297-463.
74. SMITH T. e KILBORNE F.L., *Texas fever and cattle ticks*. Letter to editors, dated April 8, Veterinarian 1892; 65 : 351.
75. ROSS R., *Pigmented cells in mosquitoes*. Brit. Med. J. 1898; i: 550-551; IDEM, *Report on the cultivation of Proteosoma Labbé in grey mosquitoes*. Indian Med. Gaz., 1898; 33: 401-408, 448-451.
76. GRASSI G.B., BIGNAMI A. e BASTIANELLI G., *Ulteriori ricerche sul ciclo dei parassiti malarici umani nel corpo dello zanzarone*. Rend. R. Accad. Lincei 1899; 8 : 21-28.
77. Cfr. FANTINI B., *Biologie, médecine et politique de santé publique: l'exemple historique du paludisme en Italie*, cit.
78. BRUCE D., *Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand*. Bennett & Davis, Durban, 1895; IDEM, *Further report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand*. London, 1897.
79. DUTTON J.E., *Preliminary note upon a trypanosome occurring in the blood of man*. Thompson Yates Lab. Rep. 1902; 4: 455-468; CHAGAS C., *Neue Trypanosomen*. Arch. Schiffs- und Tropen-Hyg. 1909; 12: 120-132.
80. LEISHMAN W.B., *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India*. Brit. Med. J. 1903; i: 1252-1254; DONOVAN C., *On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India*. Brit. Med. J. 1903; ii: 79.
81. ROSS R., *Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan*. Brit. Med. J. 1903; ii: 1261-1261; 1401.
82. Cfr. WAGNER-JAUREGG J. von, *Treatment of general paresis by inoculation of malaria*. J. Nerv. Ment. Dis. 1922; 55: 369-375.
83. YORKE W. and MACFIE J.W.S., *Certain observations on malaria made during treatment of general paralysis*. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 1924;18: 13-44.
84. BOYD M.F. e STRATMAN-THOMAS W.K., *On the duration of infectiousness in anophelines harboring Plasmodium vivax*. Am. J. Hyg. 1934; 26: 1-10.
85. Cfr. SHROTT H.E. e GARNHAM P.C.C., *Exoerythrocytic parasites of Plasmodium cynomolgi*. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 1948; 41: 485-795.
86. SCHWANN T., *Vorläufige Mittheilung betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulnis*. Annalen d. Phys. u. Ch. 1837; 41: 184-193

87. BRETONNEAU P.F., *Traité de la dothinentérie et de la spécificité publiés pour la première fois d'après les manuscrits originaux avec un avant-propos et des notes de L. Dubrenil-Chambardel*. Vigot. Paris, 1922.
88. ACERBI E., *Dottrina teorico-pratica del morbo petecchiale con nuove ricerche intorno l'origine, l'indole, le cagioni predisponenti ed effettrici, la cura e la preservazione del morbo medesimo in particolare e degli altri contagi in generale*. Co' Tipi di Giovanni Pirotte, Milano, 1822.
89. BASSI A., *Del mal del segno calcinaccio o moscardino, malattia che affligge i bachi da seta e sul modo di liberarne le bigattaje anche le più infestate*. Lodi, Dalla Tipografia Orcesi, 1835, Parte I Teorica.
90. HENLE J., *Pathologische Untersuchungen*. Berlin, A. Hirschwald, 1840.
91. KLEBS E., *Beiträge zur pathologischen Anatomie der Schusswunden*. Leipzig, Vogel, 1872.
92. CODELL CARTER K., *Koch's postulates in relation to the work of of Jacob Henle and Edwin Klebs*. Medical History 1985; 29: 353-374.
93. KOCH R., *Die Aetiologie der Milzbud-krankheit, begr:ndet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis*. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, vol. 2, No. 2, 1876, pp. 277-310.
94. KOCH R., *Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten*, op. cit.
95. KOCH R., *Zur Untersuchung von pathogen Organismen*, op. cit.
96. KOCH R. *Die Aetiologie der Tuberkolose*. Mitth. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1884; 2: 1-88.
97. KOCH R., *Bacteriological Research*. Br. Med. J. 1890;2: 380.
98. EVANS A.S., *Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited*. Yale J. Biol. Med., 1976; 49: 175-195.
99. Cfr. SILVERSTEIN A.M., *A History of Immunology*. New York Academic Press, 1989; CORBELLINI G. (a cura di), *L'evoluzione del pensiero immunologico*. Bollati Boringhieri, Torino, 1990.
100. PASTEUR L., *De l'atténuation du virus du choléra des poules*, C. r. Séanc. Acad. Sci., 1880; 91: 673-680.
101. PASTEUR L., *Méthode pour prevenir la rage après morsure*. C. r. Séanc. Acad. Sci., 1885; 101: 765-773.
102. SALMON D.E. e SMITH T., *The bacterium of swine-plague*. Am. mon. micr. J., 1886; 7: 204-205.
103. PARISH H., *A History of Immunization*. Edinburg, Livingstone, 1965.
104. NUTTAL G.H., *Experimente über die bakterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körper*. Zeit. Hyg. Infect. 1889; 4: 353-394.

*Specificità microbiologica e specificità immunologica*

105. BÜCHNER H., *Ueber die bakterientödtende Wirkung der Zellenfreien Blutserums*. Zentralbl. Bakt. 1889; 5: 817-823.
106. BÜCHNER H., *Ueber Bakteriengifte und Gegengifte*. Münch. med. Wochenschr. 1893; 40: 449-452.
107. BEHRING E. VON e KITASATO S., *Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren*. Dtsch. med. Wochenschr. 1890; 16: 1113-1114.
108. EHRLICH P., *Experimentelle Untersuchungen über Immunität*. (II: Ueber Abrin). Dtsch. med. Wochenschr. 1891; 17: 1218-19.
109. Cfr. LINDENMAN J., *Origin of the Terms "Antibody" and "Antigen"*. Scand. J. Immunol. 1984; 19: 281-285.
110. *Ib.*
111. PARISH H., *A History of Immunization*, op. cit.
112. *Ib.*
113. *Ib.*
114. *Ib.*
115. FREUND J., *The mode of action of immunologic adjuvants*. Adv. Tubercul. Res. 1956; 7:130-148.
116. GOODPASTURE E.W., WOODRUFF A.M. e BUDDINGH G.J., *Vaccinal infection of the choriollantoic membrane of the chick embryo*. Am. J. Path. 1932; 8: 271-281.
117. THEILER M. e SMITH H.H., *The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization*. J. Exp. Med. 1937; 65: 787-800.
118. METCHNIKOFF E., *Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger*. Arch. Path. Anat. Physiol. klin. Med. 1884; 96: 177-195; cfr. TAUBER A.I. e CERNYAK L., *Metchnikoff and the Origins of Immunology*. New York, Oxford University Press, 1991.
119. PFEIFFER R., *Weitere Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität und über specifisch baktericide Prozesse*. Z. Hyg. InfektKrankh. 1894; 18: 1-16.
120. BORDET J., *Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le serum d'animaux injectés de sang défibriné*. Annales de l'Institut Pasteur 1895; 12: 688-695.
121. WIDAL G.F.I. e SICARD A., *Recherches de la réaction agglutinante dans le sang et le sérum desséché des typhus et dans la sérosité des vésicatoire*. Bull. Mém. Soc. méd Hôp., Paris, 3<sup>e</sup> sér., 1896; 13: 681-682.

122. DURHAM H.E., *On a special action of the serum of highly immunised animals and its use for diagnostic and other purposes*. Proc. Royal Soc., London 1896; 5: 224-6.
123. KRAUS R., *Ueber spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-Typhus-Pestbouilloculturen erzeugt durch homologes Serum*. Wiener klinische Wochenschrift 1897; 10: 736-738.
124. NUTTAL G.H., *Blood immunity and blood relationships*. Cambridge, 1904.
125. Cfr. CITRON J., *I metodi dell'immunodiagnosi e dell'immunoterapia*. Torino, UTET, 1914.
126. BELFANTI S. e CARBONE T., *Produzione di sostanze tossiche nei sieri di animali inoculati con sangue eterogeneo*. Giornale della Reale Accademia di medicina di Torino, 4<sup>a</sup> serie, 1898; 46: 321.
127. BORDET J., *Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le serum d'animaux injectés de sang défibriné*. Annales de l'Institut Pasteur 1898; 12: 688-695.
128. BORDET J. e GENGOU O., *Sur l'existence de substances sensibilitrices dans la plupart des sérums antimicrobiens*. Ann. Inst. Pasteur 1901; 15: 289-302.
129. WASSERMANN A., NEISSER A. e BRUCK C., *Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis*. Dtsch. med. Wochenschr. 1906; 32: 745-746.
130. WEIGHT A.E. e DOUGLAS S.R., *An experimental investigation of rôle of the blood fluids in connection with phagocytosis*. Proceedings of the Royal Society, London, 1903; 72: 357.
131. ARRHENIUS S., *Immunochemistry. The application of the principles of physical chemistry to the study of biological antibodies*. New York, MacMillan, 1907, vii.
132. PFLÜGER E., *Ueber die physiologische Verbrennung in den lebendigen Organismen*. Pflüger's Arch. ges. Physiol., 1875; 10: 251-367.
133. EHRLICH P., *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus*. Berlin, Hirschwald, 1885.
134. EHRLICH P., *Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen*. Klinisches Jahrbuch, 1897; 6: 299-326.
135. Cfr. MAZUMDAR P.M.H., *The antigen-antibody reaction and the physics and chemistry of life*. Bull. Hist. Med. 1974; 48: 1-21.
136. PAULING L., *Molecular structure and intramolecular forces*. In: LANDSTEINER K., *The specificity of serological reactions*. Cambridge, Mass., Harvard Univ. Press, 1945, pp. 275-29.
137. Cfr. DEBRU C., *L'esprit des protéines*. Paris, Hermann, 1983.

*Specificità microbiologica e specificità immunologica*

138. Cfr. BORDET J., *Studies in Immunity*. New York, Wiley, 1909.
139. BORDET J., *Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses*. Paris, Masson, 1919, p. 546.
140. *Ib.*, p. 548.
141. Cfr. MAZUMDAR P.M.H., *Karl Landsteiner and the problem of species*. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 1976.
142. GRUBER M. e PIRQUET C.P.F. VON, *Toxin und antitoxin*. München med. Wchnschr. 1903; 501: 1193-1211.
143. *Ib.*
144. WELLS H.G., *Les aspects chimiques de l'immunité*. Paris, Librairie O. Doin, 1928 (ed. ingl., 1924).
145. Cfr. MOULIN A.M., *Le dernière language de la médecine*. Paris, Presses Universitaire de France, 1991.
146. Cfr. WELLS H.G., *op. cit.*
147. PICK E.P., *Biochemie der Antigen, mit besonderer Berücksichtigung der chemischen Grundlagen der Antigenpezifität*. In: KOLLE W. e WASSERMAN A. VON, *Handbuch der pathogenen Microorganismen*, Jena, 1912, pp. 685-868.
148. LANDSTEINER K. e LAMPL H., *Über die Abhängigkeit der serologischen Spezifität von der chemischen Struktur*. Biochem. Z. 1918; 86: 343-394.
149. Cfr. LANDSTEINER K., *Immunochemische spezifität*. *Convegno di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Immunologia*. Roma, Reale Accademia d'Italia, 1933, pp. 61-7.
150. HEIDELBERGER M., *Lectures in Immunochemistry*. New York, Academic Press, 1956.
151. WELLS H.G., *op. cit.*
152. HEIDELBERGER M. e KENDALL F.E., *A quantitative study of the precipitin reaction between Type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody*. J. Exp. Med. 1929; 50: 809-823.
153. MARRACK J.R., *The chemistry of antigens and antibodies*. Special Report Series no. 194. Medical Research Council, London, 1934.
154. PAULING L., *A theory of the structure and process of formation of antibodies*. J. Chem. Soc. 1940; 62: 2643-2657.
155. TISELIUS A. e KABAT E.A., *An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparation*. J. Exp. Med. 1939; 69: 119-131.
156. Cfr. FAHEY J.L., *Heterogeneity of gammaglobulins*. Adv. Immunol. 1962; 2: 41-107.

157. Cfr. KOLLE W. e WASSERMAN A., *Handbuch der Pathogenen Microorganismen*. Jena, 1904<sup>1</sup>.
158. ZINSSER H., *On the essential identity of the antibodies*. Journal of Immunology 1921; 6 : 289-299.
159. ZINSSER H., *On the essential identity of the antibodies*. Op. cit. cfr. inoltre NICOLLE C., *Antigènes et Anticorps*. Masson et C<sup>le</sup>, Paris, 1920.
160. Cfr. HEIDELBERGER M., *Lectures in immunochemistry*. New York, Academic Press, 1956, pp. 57-59.
161. ZINSSER H., *On the essential....*, op. cit., p. 298.
162. Cfr. TAUBER A. e CERNYAK L., *Metchnikoff and the Origins of Immunology*. Oxford University Press, 1992.
163. BÜCHNER H., *Weitere Untersuchungen über die bakterienfeindlichen und globuliciden Wirkungen des Blutserum*. Archiv für Hygiene 1893; 17: 112.
164. Cfr. SILVERSTEIN A.M., *A History of Immunology*, op. cit.
165. *Ib.*
166. EHRLICH P., *On Immunity with special reference to cell life*. Prooc. Royal Soc., serie B, 1900; 424-448 .
167. Cfr. SILVERSTEIN A.M., *A History of Immunology*, op. cit.
168. HOOKER S.B., *The nature of antibodies*. Journal of Immunology 1937; 33: 57-74:60.
169. BREINL F. e HAUROWITZ F., *Chemische Untersuchung des Präzipitates aus Hämoglobin und Anti-Hämoglobin-Serum und Bemerkungen über Natur der Antikörper*. Z. physiol. Chem. 1930; 192: 45-54.
170. MUDD S., *A hypothetical mechanism of antibody formation*. J. Immunol. 1932; 23: 423-27.
171. ALEXANDER J., *Some intracellular aspects of life and disease*. Protoplasma 1931; 14: 296-306.
172. MUDD S., *A hypothetical mechanism of antibody formation*. Op. cit.
173. PAULING L., *A theory of the structure and process of formation of antibodies*. Op. cit.
174. Cfr. CORBELLINI G. (a cura di), *L'evoluzione del pensiero immunologico*. Torino, Bollati Boringhieri, 1990.

Correspondence should be addressed to:

[gilberto.corbellini@gmail.com](mailto:gilberto.corbellini@gmail.com)