

1832: Ricerche chimiche nel “*Cholera Morbus*”

G. Dall'Olio

Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale “S. Bortolo”, Vicenza

Riassunto

Alle prime avvisaglie della seconda pandemia di colera asiatico (1828-1838) che nel 1831 si affaccia alle porte dell'Europa, le autorità sanitarie mettono in atto tutte le misure per prevenire la diffusione della malattia ma si preoccupano anche di cercare l'eziologia del morbo. Lo studio del sangue, fino ad allora limitato alla semplice osservazione, è di poco aiuto. Sotto la minaccia del flagello che avanza inesorabile un medico di Berlino, Wittstock, viene incaricato di analizzare chimicamente i fluidi biologici dei colerosi e di confrontarne i risultati con quelli di persone sane per acquisire maggiori informazioni sulla natura della malattia allo scopo di rallentarne la propagazione. E' stato interessante esaminare il lavoro che descrive lo studio chimico pubblicato sugli “Annali del Poggendorff” nel 1832, prima applicazione della chimica a scopo diagnostico, per vedere le tecniche utilizzate, i risultati ottenuti e capire le difficoltà incontrate da questo sconosciuto ma valoroso pioniere della Chimica clinica.

Summary

1832: Chemical investigations in “*cholera morbus*”

At the very beginning of Asiatic cholera pandemic (1828-1832) that reached Europe in 1831, the health authorities not only set up all the steps to forestall the diffusion of the disease but tried also to investigate its etiology. The simple observation of blood was unhelpful and Wittstock, a Berlin physician, was charged with the task to analyze the biological fluids of patients suffering from cholera and to make comparisons with the fluids of healthy people. The aim of this paper is to present the chemical examinations described in a paper published by Wittstock in the “Poggendorff's Annals” in 1832, that was the first application of chemical techniques to diagnosis. The paper will assess the employed methods, the obtained results and the encountered difficulties by this unknown but valiant pioneer of Clinical Chemistry.

IL COLERA ASIATICO

Se il Cinquecento è il secolo della sifilide, il Seicento della peste, il Settecento del vaiolo, nell'Ottocento si prospetta nei paesi europei un altro flagello noto come “*cholera morbus*” o colera asiatico.

E' questa una malattia endemica nella parte orientale del corso del Gange nell'India, la “*home of cholera*” come la definì il medico giornalista Ernest Hart (1835-1898). Da qui si originarono epidemie nell'India, nella Birmania, nell'Indocina, nella Cocincina, nel Tonchino, nel Siam, che portarono alle sette storiche pandemie.

La prima pandemia (1817-1823) si sviluppa in Oriente e, attraverso un corpo di spedizione di truppe inglesi, dall'India tocca il Mar Caspio e si esaurisce alle foci del Volga.

La seconda pandemia (1828-1838) nasce nel Bengala e con sorprendente rapidità raggiunge l'Afganistan, la Persia, il Caucaso. A Tiflis (Tbilisi, Georgia) si divide in due direttrici: una a Sud che attraverso il Mar Nero raggiunge Costantinopoli con propaggini in Egitto ed in Tripolitania;

l'altra, settentrionale, per il Mar Caspio arriva nel 1831 a Mosca e Pietroburgo e di lì ad ondate successive invade Polonia, Austria, Ungheria, Prussia, Finlandia e tutto il resto dell'Europa. La malattia, riconosciuta per la prima volta ufficialmente contagiosa in Russia nel 1830 e non ritenuta tale invece dalla Facoltà Medica di Parigi, farà 100.000 vittime in Francia (20.000 nella sola capitale).

Poiché all'inizio non viene presa alcuna misura profilattica, il colera, portato dagli emigranti, passa anche l'oceano arrivando in Canada, negli Stati Uniti (1833) ed in Messico. Nel 1834 raggiunge la Spagna ed il Portogallo e nel 1835 Torino e Genova dove si accanisce con particolare violenza. Arriva quindi in Toscana ed a Roma e nel 1837 a Napoli e Palermo dove provoca 24.000 morti. In Italia dal 1835 al 1837 le vittime del colera sono 146.000.

Anche le altre cinque pandemie che infieriscono per tutto l'Ottocento (1841-1856; 1865-1874; 1884-1886; 1892-1895; 1905-1926) hanno pesanti ripercussioni in Europa ed in Italia fino agli ultimi casi ufficialmente segnalati in Russia nel giugno 1926¹.

IL COLERA IN EUROPA

Fin dal suo primo apparire in Russia, all'inizio della seconda pandemia, il colera mette subito in allarme le autorità politiche e sanitarie di tutta l'Europa che inviano subito (1831) a Pietroburgo "specialisti" di malattie epidemiche per capire l'eziologia del male e mettere in atto tutti i possibili "mezzi curativi ed igienici" per arginare il flagello avanzante.

*"Egli non è dubbio che tra gli avvenimenti del secolo decimonono, e in prima fila tra le pubbliche calamità sia da riporre il distrutto flagello detto cholera morbus; da chè, dopo la peste nera, che, fan quattrocento anni, desolò quasi tutte le regioni dell'emisfero nostro, non è esempio di contagio, che con tanta rapidità ed estensione siasi diffuso, apportando in tra tanti differenti popoli terrore e morte"*².

*"Al primo grido di vicina pestilenza due doveri egualmente sacri incombono a ciascun medico probo e filantropo: erigere l'animo a sublime intrepidezza ed in ogni maniera di sacrificio (...) e indirizzare l'intelletto all'acquisto di tutte quelle nozioni che valgono a ben conoscere il morbo, a possibilmente preservarne la nazione, e a mitigarlo almeno, ove speranza non v'abbia d'annichilarlo"*³.

Dal 1831 anche negli Stati italiani tutte le riviste di medicina ed in particolare gli "Annali Universali di Medicina" pubblicano frequentemente lavori sul colera allo scopo di informare i medici sulle modalità di diffusione di questa malattia dall'origine ancora oscura, sui rimedi farmacologici, sulla mortalità, sulla prevenzione, sul progresso degli studi.

IL RUOLO DELLA CHIMICA NELLA DIAGNOSI MEDICA AGLI INIZI DELL'OTTOCENTO

Nei primi anni dell'Ottocento cominciano gli studi di chimica applicata alla fisiologia ed alla patologia soprattutto allo scopo di trarre informazioni utili alla diagnosi, studi che culmineranno nel lavoro di Justus Liebig (1803-1873) "La chimica organica applicata alla fisiologia e alla patologia" del 1842 che apre la strada alla Chimica clinica. Prima di Liebig però l'analisi chimica dei liquidi degli organismi viventi, la "chimica animale", incontra ancora numerosi ostacoli: tecniche analitiche ancora vaghe ed imprecise, pochi i reattivi puri a disposizione dell'analista, praticamente sconosciuti gli strumenti.

L'urina è sicuramente il liquido biologico più studiato dal punto di vista chimico: la prima completa analisi quantitativa (1809) si deve a J.J. Berzelius (1779-1848) il grande studioso che nel 1806-1808 aveva pubblicato i due volumi del "Corso di chimica animale" con le pionieristiche ricerche chimiche sui tessuti e liquidi degli organismi animali. Anche i francesi Gay-Lussac, Thenard, Vauquelin, Fourcroy, Proust, Dumas, Prevost, Lemery, Berthollet, si occupano della chimica dei viventi, in particolare appunto dell'analisi dell'urina e dei calcoli, ma questo tipo di indagini è retaggio di pochi; l'unica analisi "di laboratorio", largamente praticata all'epoca negli ospedali e dai medici pratici, resta l'indagine "visiva" dell'urina: l'uroscopia.

L'analisi chimica del sangue, per la complessità della matrice biologica e le conseguenti difficoltà analitiche che forniscono risultati non sempre illuminanti trova un limitato impiego come supporto nella diagnosi e nella terapia.

Per il sangue umano si utilizzano quindi, agli inizi dell'Ottocento, principalmente le "osservazioni sul sangue e sulle sue varie parti, mentre subisce cambiamenti spontanei nel momento che

*viene estratto da una arteria o da una vena"*⁴: esposto all'aria si raffredda e si separa in siero un liquido giallo, trasparente, che "serve da veicolo" e in crassamento, molle, quasi solido, bruno-rossastro, opaco, che costituisce la parte coagulabile e alla cui superficie in alcune malattie si forma la *cotenna*, una crosta sottile, molle, rossastra.

Il crassamento posto su un filtro e lavato con acqua, si separa in una "materia bianca, tenace, fibrosa che fibrina ora si nomina" che resta nel filtro, mentre nell'acqua si ritrovano globuli rossi che si denominano "cruore" o parte rossa⁵.

Si studiano in questo modo gli "stati morbosi del sangue", e particolarmente approfondite sono, fin dal 1830, le osservazioni su questo fluido di persone morte di un'altra malattia epidemica: la febbre gialla⁶.

Non sono ancora stati evidenziati, nei primi anni dell'Ottocento, "segni chimici" correlati a particolari malattie ed utili quindi alla diagnosi e soprattutto, dato che le indagini sono ancora prevalentemente di tipo qualitativo, non è possibile stabilire degli "intervalli di riferimento" per le varie sostanze rinvenute nel sangue e nell'urina, valori che permetterebbero di discriminare fra lo stato di salute e quello di malattia.

Ai ricercatori che si occupano di "chimica patologica" non resta quindi che analizzare al meglio i reperti di persone malate e di persone sane, studiarne le differenze alla ricerca di "un qualcosa" che caratterizzi una certa patologia, che la faccia distinguere da altre con sintomatologia simile, in modo da indirizzare correttamente alla diagnosi e fornire informazioni prognostiche.

Nel caso del colera, una volta esauriti tutti i tentativi allora noti per riuscire ad individuarne la natura e l'origine si ricorre anche all'analisi chimica dei liquidi biologici estratti dai colerosi conclamati e dai morti di colera, confrontando poi i risultati con analoghe ricerche condotte su persone sane. E' proprio l'incombente minaccia di questa terribile malattia, soprattutto a partire dall'anno 1831 quando raggiunge Mosca e quindi Berlino, a spingere le autorità sanitarie a non trascurare alcun metodo per investigare l'intima natura del morbo e risolvere l'enigma patologico. Si pensa quindi di utilizzare le ricerche chimiche anche se, soprattutto per quanto riguarda il sangue, sono ancora agli inizi⁷.

Il lavoro chimico-analitico affidato al dottor Wittstock, un medico che opera a Berlino, che verrà di seguito analizzato⁸ (Figure 1, 2), si può considerare il primo tentativo di applicazione della chimica alla patologia⁷. I due precedenti lavori del 1830 di Denis⁹ e di Stevens⁶, rispettivamente sul sangue di persone sane e su malati di febbre gialla non contengono infatti nessun tipo di approccio chimico.

LA CHIMICA NELLO STUDIO DEL COLERA

"Quando lo scorso autunno (1831) il Cholera morbus pervenne a Berlino, il sig. dott. Albers, Consigliere Medico di Governo, mi pregò di incaricarmi dell'analisi chimica relativa a questa malattia, onde si potesse acquisire di lei una migliore conoscenza; io colsi premurosamente tale occasione di contribuire per quanto era in me allo scioglimento di questo problema patologico, non dissimulando però quanta difficoltà ed imperfezione accompagnassero questo genere di lavoro.

Gli esperimenti di chimica animale sono tutt'ora d'assai difettosi, giacchè i principali elementi del corpo animale di rado si possono separare e ben frequenti durante lo stesso esperimento compajono dei

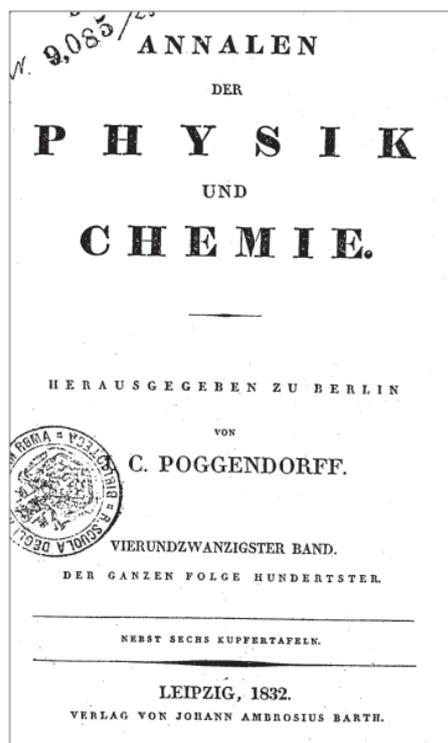


Figura 1. Gli "Annali del Poggendorff" (1832).

prodotti affatto nuovi, ed assolutamente estranei all'organismo vivente"⁸.

Ecco quindi, incaricato dal governo, uno studioso che dovrà analizzare chimicamente il sangue e le urine dei malati di colera per cercare lumi sulla natura della malattia all'unico scopo di trovare le armi per debellarla.

Il materiale biologico per le indagini viene raccolto da *"diversi ammalati affetti da Cholera bene caratterizzato (...) nello Spedale dei Cholerosi di Berlino"*⁸.

Il resoconto delle ricerche di Wittstock, pubblicate sugli "Annalen der Physik und Chemie" ("Annali del Poggendorff") nel 1832⁸ e quindi in francese sulla "Gazette médicale de Paris" nel 1833 ed in italiano sugli "Annali Universali di Medicina" nel 1834 (Figura 3), ci rende partecipi delle fatiche e dell'apprensione di questo studioso praticamente inerme di fronte alla complessità dell'analisi chimica dei numerosi liquidi biologici di soggetti ammalati di colera su cui indaga.

I capitoli che l'autore approfondisce maggiormente riguardano il sangue e l'aria espirata dai pazienti nei diversi stadi della malattia.

"Ricerche chimiche sul sangue de' Cholerosi"

Il sangue estratto per salasso da un giovane coleroso viene raccolto in un bicchiere e lasciato tre giorni a separare il crassamento dal siero: *"i nostri metodi per conseguire questa separazione sono così imperfetti, che non si possono stabilire i rapporti di queste due sostanze se non per approssimazione"*. Il crassamento costituisce il 64% e il siero il 36%. Quest'ultimo ha un peso specifico di 1.038, dà reazione alcalina alla carta al tornasole e facendone essiccare 100 grani (1 grano = 0.06 grammi circa) lascia 12.75 grani di una massa color ambra, gialla semitrasparente, con una perdita di acqua del 25.5%. L'autore confronta i suoi risultati con quelli ottenuti da Dumas, Prévost e Berzelius su uomini sani. Secondo quest'ultimo il

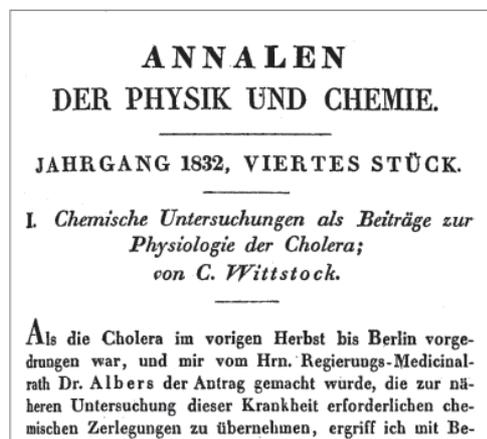


Figura 2. Le ricerche chimiche sul colera di Wittstock (1832).

sangue di un uomo sano è costituito per il 25% da crassamento e 75% di siero il quale ha un peso specifico fra 1,027 e 1,029.

"Dubitando io che il crassamento del sangue choleroso contenesse ancora molto siero, mi posi ad investigare la quantità relativa di fibrina nel sangue normale e nel morbosio". Ottiene il 6% di fibrina nel sangue del coleroso e il 13% nell'uomo sano, osservando che *"la fibrina estratta, mediante il dilavamento, dal sangue coleroso non divenne giammai così bianca come quella del sangue normale, che era infinitamente meno densa e che si separava con maggiore difficoltà dalla sostanza colorante"*⁸.

Wittstock procede quindi a *"ricerche tendenti a scoprire se il grumo del sangue choleroso contenga acido carbonico od altro acido libero"* ponendo 2 oncie (1 oncia = 30 grammi circa) di crassamento in una piccola storta *"con tubo lungo piegato a ginocchio"* la cui estremità pesca in un vaso con acqua di calce e scaldando in modo da svolgere l'acido carbonico. L'acqua di calce rimane limpida indicando che non si è formato il carbonato di calcio e quindi l'assenza di acido carbonico (Figura 4).

Una stessa quantità di crassamento viene sottoposta a distillazione *"ordinaria"*: i primi prodotti della distillazione danno sempre sostanze alcaline che, mescolate con acido cloridrico, formano, dopo evaporazione, cristalli di *"muriato d'ammoniaca"*. Poiché altri studiosi avevano rilevato che il crassamento ed il siero del sangue normale e quello dei colerosi dava sempre reazione acida, l'autore si preoccupa di dimostrare l'esattezza dei suoi esperimenti *"più volte reiterati"* riscaldando in una provetta di vetro il siero o il crassamento, tenendovi sopra un filo di ferro umettato con acido cloridrico: rileva sempre sviluppo di *"nubi molto dense"*. La prova che le parti del sangue, sia di persone sane sia di colerosi, contengono un sale di ammoniaca viene confermata dall'autore mescolandole a piccole quantità di idrossido di sodio che ne sposta l'ammoniaca. Conclude quindi: *"non potersi supporre una reazione acida del sangue normale né in quello choleroso, ma doversi considerare il crassamento come una sostanza saturata di un liquido alcalino, che è il siero"*⁸.

Passa a distillare il crassamento del sangue "coleroso" con acido solforico trattando i prodotti con carbonato di potassio, quindi evapora e cristallizza più volte, estrae in alcool, saggia con vari reattivi. Attraverso percorsi analitici davvero onerosi, arriva ad una soluzione che diviene di un rosso più carico *"come avviene degli acetati quando si frammischiano ad un sale di ferro"*. *"Questi fenomeni, che io osservai del pari trat-*

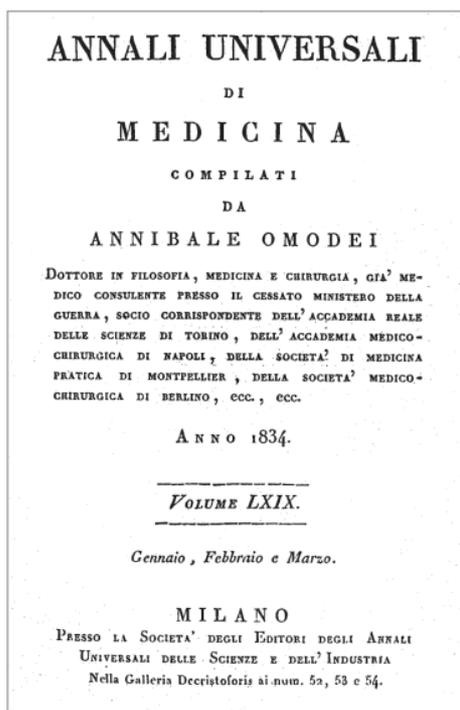


Figura 3. Gli "Annali Universali di Medicina" (1834).

tando il sangue normale, sembravano indicare chiaramente l'esistenza degli acetati nel sangue (...). Ricerche lunghe e pesanti quindi che gli permettono però di rilevare nel sangue alcune sostanze e di poter effettuare comparazioni certamente utili. Le indagini chimiche dell'epoca prevedevano operazioni "standard" di pretrattamento del campione per analisi gravimetrica quali la precipitazione, l'incenerimento (Figura 5), la cristallizzazione ed altre come la digestione, la lissivazione, la distillazione, l'ebollizione, l'estrazione (soprattutto con alcool), ed ancora il rilievo dell'acidità o dell'alcalinità, reazioni del campione biologico o dei suoi estratti o distillati con nitrato d'argento, cloruro di mercurio, tintura di galla, cloruro di zinco, acetato di piombo, cianuro di mercurio, osservando se si formavano precipitati o se la soluzione si colorava o se cambiava colore. Con simili procedimenti l'autore procede a "lavorare" il coagulo sanguigno di un coleroso dopo digestione in alcool rettificato ottenendo:

1. una pinguedine solida e cristallina
2. una pinguedine gialla e fluida
3. del cloruro di sodio
4. del cloruro di potassio
5. del lattato di soda e d'ammoniaca
6. dell'osmazoma^a
7. delle tracce di fosfati.

"Tutta questa analisi è stata, come le precedenti, paragonata alle analisi fatte contemporaneamente del sangue normale, ed i due sangui

^a Osmazoma, osmazomo (οσμη odore, ζωμος brodo).

"Propose il Thenard di dare questo nome a certa materia estrattiva contenuta nella carne muscolare e nel sangue degli animali (...). Esiste nei muscoli del bue e si presume che la si rinvenga eziandio in quelli di tutti gli animali adulti, la cui carne è bruna e saporita (...). È un composto complesso, formato di sostanze azotate, di lattato di soda, acido lattico, e specialmente di certa materia solida perlata, cristallizzabile, insipida, azotata, detta creatina (...). Si sviluppa essa, da ultimo, per accidente sotto l'influenza di certi stati patologici (...)"⁴.

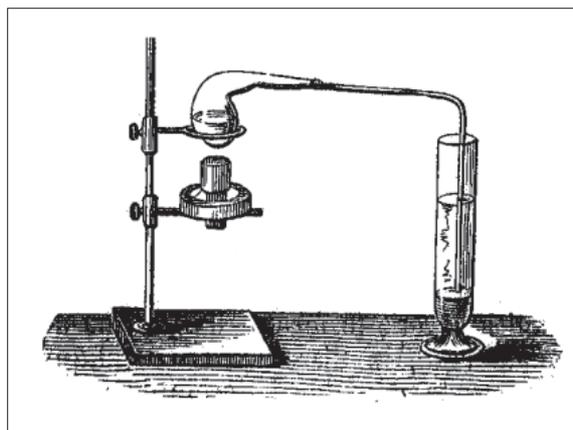


Figura 4. Storta con tubo lungo piegato a ginocchio.

non hanno presentata alcuna sensibile differenza quanto alla qualità dei loro elementi", solo il residuo secco risulta diverso: 31% per il coagulo "coleroso" e 38% per il normale. L'estrazione con alcool rivela inoltre che le sostanze estratte sono maggiori nel sangue normale e questo "giustifica l'opinione che il sangue choleroso è meno consistente e che si separa più difficilmente dal siero".

Nella analisi del siero di un altro coleroso, l'autore nota chiaramente che questo presenta una massa "che pareva molto più densa del siero coagulato degli individui sani" poiché certamente, egli osserva, doveva contenere meno quantità di acqua, confermato dal residuo secco superiore per i colerosi rispetto ai sani. Riporta il peso specifico e il residuo secco del siero, tutti assai elevati, di alcuni pazienti morti di colera:

- giovane di 20 anni: ps = 1045; residuo secco = 16.5%
- uomo : ps = 1041; " = 14.5%
- ragazza di 17 anni: ps = 1043; " = 15.5%

"Le altre analisi del sangue choleroso estratto col salasso, non presentarono alcuna differenza, solamente che i rapporti tra il siero ed il crassamento variavano secondo gli individui. La massa del crassamento era considerevole in ragione della gravità cui era giunta la malattia. Nei cholerosi freddi, bleu, senza polsi, non avea più luogo la separazione del siero. Tutti gli elementi del sangue normale si sono del pari sino ad ora riscontrati nel sangue choleroso" (...). Il siero del sangue coi reattivi conosciuti si comportò come il siero choleroso"⁸.

Altre indagini

Con procedimenti simili Wittstock sottopone ad esame: i "fluidi evacuati per secesso dai cholerosi", "i fluidi del canale intestinale nei cadaveri dei cholerosi", i "liquidi vomitati dai cholerosi", le "materie contenute nello stomaco de' cadaveri dei cholerosi" e naturalmente l'urina dei colerosi dove "raffrontando i risultati di quest'analisi con quelli dell'analisi dell'urina de' sani, vi si riscontrano poche differenze, né queste poche sono costanti. L'urina dei cholerosi reagisce come quella dei sani, cioè come acido; nella maggior parte dei casi non differiscono nemmeno i pesi specifici"⁸.

Analisi chimica dell'aria espirata

L'aria espirata dai pazienti allo stadio terminale è oggetto di approfondite analisi: "per tema di errare, quest'analisi è sempre stata eseguita due volte, e l'aria sottoposta ad analisi, fu presa da due individui freddi, bleu, e senza polsi, i quali morirono dopo averla

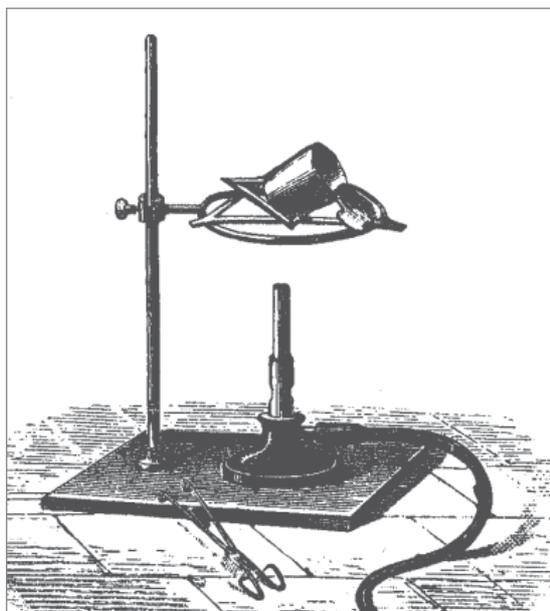


Figura 5. Crogiolo per incenerimento.

somministrata". Anche la raccolta del campione è accurata: "l'aria espirata è stata raccolta in vesciche di spesse pareti e più volte espulsa per togliere il sospetto che fosse mescolata all'aria atmosferica"⁸.

Viene utilizzato per l'analisi l'eudiometro, apparecchio per misurare l'ossigeno presente nell'aria. Lo strumento, ideato da Marsilio Landriani (1751-1815) nel 1775 per le sue "Ricerche fisiche intorno alla salubrità dell'aria" (Figura 6), viene poi (1777) perfezionato da Volta per l'analisi dei gas e utilizzato in applicazioni della chimica pneumatica all'igiene. E' in questo lavoro che l'eudiometro trova per la prima volta impiego clinico nella determinazione dell'ossigeno dell'aria espirata dall'uomo e, oltre alla bilancia, è l'unico strumento utilizzato.

Con altre procedure viene misurata poi l'anidride carbonica e quindi ricavata per differenza la quantità di azoto.

I due pazienti colerosi sui quali l'autore effettua gli esperimenti sono un maschio di 27 anni (paziente A) ed una donna di 26 anni (paziente B).

I due esperimenti, eseguiti in doppio, pochi per un tratta-

Tabella I. Risultati dell'analisi dell'aria espirata ottenuti con l'eudiometro

	Paziente A	Paziente B
Ossigeno (%)	20,37 20,33	19,42 19,44
Azoto+Anidride carbonica (%)	79,63 79,67	80,58 80,56

Tabella II. Composizione dell'aria espirata

	Paziente A	Paziente B
Ossigeno (%)	20,35	19,43
Azoto (%)	76,60	78,44
Anidride carbonica (%)	3,05	2,13

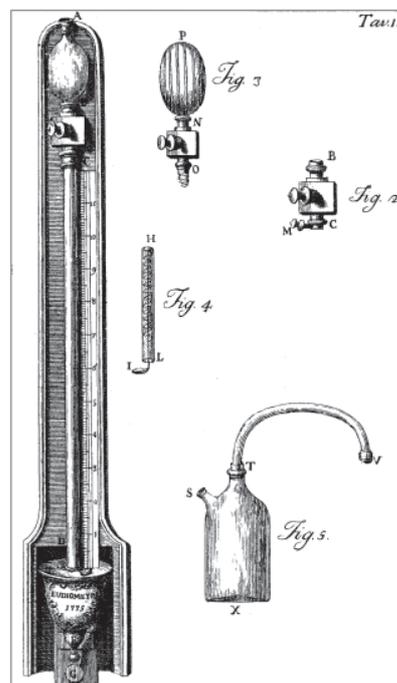


Figura 6. L'eudiometro di Marsilio Landriani (1775).

mento statistico dei dati da utilizzare come segno di patologia, sono comunque interessanti per verificare la ottima ripetibilità delle misure, indice della bontà del metodo e soprattutto della notevole manualità degli operatori. I dati ottenuti sono riportati nelle Tabelle I e II.

L'anidride carbonica viene determinata lasciando l'aria espirata a contatto con idrato di potassio per alcuni giorni: nel caso del paziente A risulta pari al 3,05% mentre per la paziente B è del 2,13%.

Per differenza ottiene rispettivamente una percentuale di azoto pari a 76,60 e 78,44.

Le stesse esperienze condotte su persone sane danno una quantità di anidride carbonica che varia dal 3,3% al 13,8% (il traduttore e commentatore italiano dell'articolo di Wittstock, dottor Domenico Branca, suggerisce che una differenza così grande sia da attribuire ad errori analitici e propone la media ottenuta da due autori dell'epoca: 8% e 8,5%).

L'aria espirata dai pazienti colerosi mostra quindi una quantità di anidride carbonica compresa fra il 2% ed il 3%, circa un quarto di quanto espirato dagli individui sani. "Una diminuzione tanto sensibile dell'acido carbonico nell'aria espirata dai cholerosi, deve trarre seco le più importanti conseguenze per l'economia animale, poiché per tale circostanza si esaurisce la sorgente principale del calore animale"⁸.

CONCLUSIONI

Poco illuminanti in definitiva le numerose e pesantissime analisi effettuate per capire l'eziologia del terribile morbo ma sicuramente la grande quantità di esperimenti e soprattutto la comparazione dei risultati ottenuti dai colerosi ai vari stadi della malattia con quelli di persone sane hanno aiutato i medici dell'epoca a capire in quale liquido biologico si riscontravano le maggiori differenze fra sano e malato e quindi quali erano i reperti da analizzare a scopo diagnostico. Anche il notevole sforzo analitico sicuramente

te non è stato vano poiché ha permesso di affinare le tecniche nel campo della “chimica animale”, campo, da un punto di vista chimico analitico, ancora tutto da esplorare.

Bibliografia

1. Sanarelli G. Il Colera Asiatico. In: Casagrandi O. Trattato Italiano di Igiene. Torino: UTET; 1931. p. 577-621.
2. Moreau de Jonnes A. Cholera morbo. *Annali Universali di Medicina* 1831; 60:198-220.
3. Sormani NM. Problemi patologici sulla natura e sul trattamento terapeutico del cholera morbus, basati sopra dati non ancora presi in esame dai pratici. *Annali Universali di Medicina* 1831; 60:39-56.
4. Levi MG. Dizionario economico delle Scienze Mediche. Vol. IV (2). Venezia : Antonelli; 1858.
5. Gallini S. Nuovi elementi della fisica del corpo umano. Padova: Zanon Bettoni; 1808.
6. Stevens W. Osservazioni sul sangue nella febbre gialla. *Annali Universali di Medicina* 1830; 56:205-7.
7. Hickel E. The emergence of clinical Chemistry in 19th century: presuppositions and consequences. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982; 20:521-30.
8. Wittstock C. Chemische Untersuchungen als Beiträge zur Physiologie der Cholera. *Annalen der Physik und Chemie* 1832; 24:511-33. Ripreso in: Ricerche chimiche sul cholera per servire alla Storia fisiologica di questa malattia. *Annali Universali di Medicina* 1834; 69:156-74.
9. Denis PS. Ricerche sperimentali sul sangue umano nello stato di salute tendenti a determinare le modificazioni, cui soggiace la composizione di quest'umore, e a chiarire i fenomeni fisiologici ad esso attinenti. Parigi 1830. *Annali Universali di Medicina* 1831; 57:483-508.