

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCXCVIII.

1901

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME X.

1° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1901

Fisiologia. — *Sulla natura delle melanine e di alcune sostanze ad esse affini* ⁽¹⁾. Nota preventiva del dott. V. DUCCESCHI, presentata dal Socio LUCIANI.

In questa breve Nota saranno esposti i primi risultati di una serie di ricerche che da qualche tempo vado compiendo su quel gruppo di sostanze colorate, molto affini ai pigmenti animali, le quali si ottengono artificialmente dalle proteine o dai prodotti loro di scomposizione. È noto quanto lo studio di quell'insieme di differenti composti conosciuti sotto il nome di melanine, proteinocromi (Bromkörper ecc.) sostanze uminiche, abbia affaticato chimici e fisiologi e come la costituzione di essi sia rimasta sino ad oggi ravvolta nella completa oscurità. Il concetto dominante sulla natura dei pigmenti naturali ed artificiali è che essi rappresentino sostanze di una complessità molto elevata e che provengano forse da speciali aggruppamenti molecolari (cromogeni) che esisterebbero preformati nelle proteine.

Le prime ricerche che io eseguii su questo proposito (nel Laboratorio di Chimica fisiologica di Strassburg) furono dirette ad ottenere dall'acido melanoideo, preparato dall'albumina d'uovo, dei prodotti di scomposizione a mezzo di processi di ossidazione e di riduzione. Ma i risultati furono presso che negativi; solo con una energica scomposizione con potassa caustica io potevo ottenere, in accordo con alcuni precedenti osservatori, odore di scatolo. Più tardi, durante il corso di alcune indagini sui componenti delle sostanze proteiche spettanti alla serie aromatica, eseguite nel Laboratorio di Fisiologia di Roma, mi avvenne di imbattermi in alcuni composti i quali, sia per il modo di preparazione, sia per le proprietà loro, offrivano un interesse non trascurabile per la conoscenza dei corpi pigmentari artificiali; ciò mi ha indotto a riprendere lo studio di questi ultimi sotto altri punti di vista e sui risultati ottenuti tornerò in altra occasione. Ed ora vengo senz'altro alle ricerche che formano l'oggetto della presente Nota.

A. A due o tre decigrammi di tirosina si aggiunge in una capsulina una diecina di cc. di acido cloridrico concentrato e si riscalda leggermente; si fa cadere quindi nella soluzione, una piccolissima quantità di clorato di potassio in polvere o meglio qualche goccia di una soluzione satura a caldo della stessa sostanza. Si riscalda più fortemente ed il liquido assume dapprima un color rosso vivo che per il continuato riscaldamento e la cauta aggiunta

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto fisiologico di Roma.

di poco clorato potassico si fa più oscuro finchè si ottiene una colorazione nera e talvolta un precipitato dello stesso colore. Se si aggiunge troppo clorato potassico il color rosso primitivo scompare ed il liquido resta tinto leggermente in giallo verdastro. Ottenuta la colorazione nera, si diluisce il liquido con una quantità di acqua distillata uguale al volume della soluzione, si procura che il liquido si mantenga caldo e si neutralizza con soda caustica. Il liquido si scolora, ma non del tutto, e si forma un precipitato fioccoso, nerastro, che si raccoglie nel fondo della capsulina. Si filtra e si lava a lungo in acqua distillata; il precipitato raccolto sul filtro si scioglie con una piccola quantità di una soluzione diluita di soda caustica. Il filtrato di color nero si neutralizza con HCl e si ottiene un nuovo precipitato che si raccoglie su di un filtro, si ridiscioglie in soda caustica e si precipita con HCl un paio di volte; si lava a lungo sul filtro con acqua distillata, si distacca con precauzione dal filtro e si fa seccare a 110°. Si ottiene una polvere bruna, amorfa, la quale possiede le seguenti proprietà:

È presso che insolubile in acqua e negli alcool metilico, etilico, amilico, in etere, cloroformio, etere di petrolio, acetone, etere acetico e nei miscugli di questi solventi. È insolubile in acido cloridrico concentrato; nell'acido acetico glaciale si scioglie solo in parte. È solubile in acido solforico concentrato e così pure nell'acido nitrico fumante, con color rosso; dalle soluzioni in questi acidi la sostanza precipita per l'aggiunta di acqua distillata in piccola quantità. La sostanza si scioglie rapidamente e completamente negli idrati di sodio e potassio in soluzione concentrata e diluita ed in ammoniaca, assumendo nelle soluzioni diluite un color rosso cupo ed in quelle concentrate un color nero. Dalle soluzioni alcaline precipita sotto forma di fiocchi nerastri quando si neutralizzi o si acidifichi leggermente con HCl, H₂SO₄ od acido acetico. Se la soluzione alcalina è molto diluita, l'acidificazione produce solo un cambiamento di colore che dal rosso-cupo passa ad un giallo-verdastro. Dalla soluzione alcalina la sostanza precipita per l'aggiunta di alcool assoluto; la soluzione ammoniacale dà il solito precipitato fioccoso, nero, quando si aggiunga cloruro di bario. Il precipitato prodotto si ridiscioglie in carbonato di sodio e da questa soluzione precipita nuovamente nella stessa forma per l'aggiunta di acido acetico. Se si fonde in una provetta una piccola quantità della sostanza con idrato potassico, si avverte un odore distintissimo di scatolo od indolo (1).

Le reazioni che io ho descritte per il composto ottenuto dalla tirosina sono identiche a quelle proprie dell'*acido melanoidico* (Schmiedeberg) (2) derivante dalla sieroalbumina e dal fibrinoso per il trattamento con acidi.

(1) Il prof. F. Hofmeister al quale io comunicava questi risultati, mi faceva gentilmente noto per lettera che nel Laboratorio di Chimica fisiologica di Strassburg, che egli dirige, il dott. Schneider ha già da qualche tempo ottenuto lo stesso odore di scatolo trattando la tirosina con potassa caustica.

(2) *Schmiedeberg*, Arch. f. exper. Path. n. Pharmak. XXXIX. Bd. s. 1. 1897.

Assieme, od in luogo di quel composto, io ne ho ottenuto talvolta un altro del tutto simile per le reazioni eccettuato che esso è solubile in alcool assoluto. Esso si presenta probabilmente quando l'azione dell'acido cloridrico e clorato di potassa fu troppo energica; il difetto di materiale mi ha impedito di determinare con precisione le condizioni in cui esso si forma, ed il perchè spesso questi corpi neri non si presentino affatto ed il liquido resti leggermente colorato in giallo-verdastro.

B. Se ad un grammo di tirosina si aggiungono 25 cc. di HCl concentrato e nel liquido si fanno cadere poche gocce di una soluzione concentrata di nitrito sodico, il miscuglio assume, mentre si sviluppa gas, un color rosso vivo; se si eccede con l'aggiunta del nitrito sodico, il color rosso impallidisce per divenire giallo o verdastro. Se si limita invece la quantità del nitrito sino ad avere il color rosso, si aerea a lungo la soluzione finchè i vapori di acido nitroso sono scomparsi, si diluisce di poco con H_2O e si estrae con etere o con alcool amilico, si osserva che la sostanza colorata trapassa abbastanza bene nell'etere (che assume talvolta transitoriamente un color verde) ed ancor meglio nell'alcool amilico.

Il prodotto di ripetute estrazioni con quest'ultimo solvente, purissimo, si tratta nel modo che segue: si lava ripetutamente con acqua distillata, si raccoglie in una capsula, vi si aggiunge del carbonato di bario finamente polverizzato e si evapora. Il residuo siropposo, di un color rosso oscuro, si scioglie in poco alcool assoluto, la soluzione alcoolica si filtra e si evapora di nuovo, il residuo si riprende con alcool metilico e da questa soluzione si ottiene per l'aggiunta in eccesso di barite sciolta in alcool metilico un precipitato nerastro, voluminoso, che si raccoglie su di un filtro. Questo precipitato si scioglie in poco acido acetico glaciale e da questa soluzione si separa la sostanza sotto forma di fiocchi nerastri per l'aggiunta abbondante di etere. Si filtra e si ridiscioglie nuovamente in poco acido acetico; si precipita con l'aggiunta di H_2O , si raccoglie il precipitato su di un filtro, si lava e si secca a 110° .

La sostanza ottenuta, una polvere scura, opaca, amorfa, offre le seguenti proprietà: è solubile negli alcool metilico, etilico ed amilico ed in acetone ed è difficilmente solubile in acqua, etere, cloroformio, etere di petrolio. La soluzione alcoolica si intorbida per l'aggiunta di acqua; se ora si aggiunge dell'etere e si scuote, la sostanza colorata resta nello strato costituito da alcool ed etere. La soluzione alcoolica non viene precipitata per l'aggiunta di etere etilico od acetico.

Da una soluzione in alcool amilico, in alcool ed etere, in etere ed acetone, la sostanza viene asportata da una soluzione acquosa di idrato sodico o potassico o di ammoniacca. La sostanza è ben solubile in questi alcali as-

sumendo un color rosso; dalle soluzioni alcaline essa precipita per acidificazione con HCl od acido acetico; se la soluzione è molto allungata, si ha solo un cambiamento di colore dal rosso al giallo verdastro. Nella soluzione ammoniacale l'acqua di barite induce un precipitato.

La soluzione alcoolica della sostanza non è precipitata da cloruro mercurico e da cloruro di zinco in soluzione alcoolica. La soluzione in NH_3 diluita dà per l'aggiunta di una soluzione ammoniacale di acetato di piombo un voluminoso precipitato rosso-giallastro. Una soluzione metilalcoholica della sostanza non viene decolorata da cloruro di stagno ed acido cloridrico.

Se una piccola quantità della polvere si fonde in una provetta con idrato di potassa, si ottiene ben distinto l'odore caratteristico dello scatolo.

Una piccola quantità della sostanza bollita a lungo con una soluzione alcoolica di cloruro stannoso dà un prodotto di riduzione che è difficilmente solubile in acqua, nei tre alcool e nell'acetone ed è insolubile in etere, etere di petrolio e cloroformio. Precipita con gli acidi dalle soluzioni alcaline. La soluzione ammoniacale della sostanza dà un precipitato anche per l'aggiunta di soluzioni ammoniacali di cloruro di bario, di acetato di bario e di piombo; non precipita invece per mezzo di soluzioni ammoniacali di solfato di rame o di zinco.

Riferendo così minutamente il metodo di preparazione e le reazioni della sostanza da me ottenuta, io non ho fatto che riprodurre in tutti i suoi particolari il metodo adoperato dal v. Fürth ⁽¹⁾ per ottenere la sua *xantomelanina* e ripetere le proprietà che egli descrive nel suo accurato lavoro come caratteristiche di questa sostanza; solo che il materiale da cui partiva il v. Fürth erano la caseina e la raschiatura di corno e su di esso faceva agire l'acido nitrico fumante, mentre io mi son servito della tirosina.

C. Ma passiamo alla terza specie di prodotti che io ho ottenuti dalla tirosina. Ad un mezzo grammo di tirosina si aggiunge tanto di H_2O quanto è necessario per formare una poltiglia non troppo densa; su questa poltiglia si fanno cadere poche gocce di acqua di bromo e si riscalda. Le prime gocce non inducono alcuna colorazione, finchè seguitando con l'aggiunta del bromo il liquido assume un color rosso-violaceo e la tirosina in gran parte si discioglie. Seguitando a riscaldare sino all'ebullizione ed aggiungendo ancora poche altre gocce di acqua di bromo il color rosso del liquido va assumendo una tinta sempre più oscura sino a che diviene nera, nello stesso tempo che si vanno separando numerosi fiocchi nerastri; il liquido resta tinto in rosso.

(1) v. Fürth, *Ueber die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweisstoffe*. Strassburg 1899.

Si raccoglie il precipitato su di un filtro e vi si versa sopra dell'alcool a 95°; una parte del precipitato si discioglie colorando l'alcool in nero od in rosso-rameico se la soluzione è diluita. Quella parte del precipitato che non è sciolta dall'alcool è invece ben solubile in una soluzione di ammoniaca assumendo un colore bleu; questa sostanza si forma solo per una azione protratta del bromo e del riscaldamento. Le due porzioni del precipitato hanno le seguenti proprietà:

a) *Sostanza solubile in alcool a 95°.* — È poco solubile in H₂O, è solubile in NH₃ con color bleu ed in Na OH con un color verdastro e da queste soluzioni vien precipitata con acido acetico. È facilmente solubile in alcool amilico e negli alcool metilico ed etilico a 95°, molto meno nei due alcool a 20°. È poco solubile in etere e cloroformio, insolubile in etere di petrolio. La sostanza è solubile in acido acetico glaciale e precipita se a questa soluzione si aggiunge acqua distillata. Io ne ho ottenuta una piccola quantità per analisi sciogliendola in ammoniaca e precipitandola successivamente, per alcune volte, con acido cloridrico diluito, e lavando sino a scomparsa della reazione del cloro.

b) *Porzione del precipitato insolubile in alcool a 95°.* — È meglio solubile in acqua che non la sostanza precedente; è ben solubile in ammoniaca, con colorito bleu, e nella soda e potassa caustica diluite, con color verdastro o rossastro; da queste soluzioni precipita per l'aggiunta di acidi minerali. Si scioglie poco negli alcool metilico ed etilico a 20°; è insolubile in alcool amilico. È insolubile in acido acetico glaciale, solubile alquanto nello stesso acido diluito.

Questi stessi composti a) e b) si ottengono anche facendo agire per uno o due giorni il bromo sulla tirosina a freddo.

Ambedue le sostanze fuse con potassa caustica danno un odore ben distinto di indolo o scatolo. Esse corrispondono per il modo di preparazione, di isolamento e per molte loro reazioni ad alcuni composti ottenuti già da molto tempo facendo agire il bromo sui prodotti della digestione pancreatica (*proteinocromi, Bromkörper*) e che furono studiati più specialmente dal Neumeister (1), Stadelmann (2), Nencki (3) e dal Kurajeff (4). Tutti questi autori sono concordi nell'ammettere che tali sostanze rappresentino un miscuglio di più composti il cui contenuto in bromo è variabile ed il colore dei quali oscilla fra il rosso, il bleu, il violetto ed il nero. Anche nelle mie ricerche io mi sono convinto di aver che fare con un miscuglio di corpi dei quali i due descritti sono i più facilmente isolabili; a me però non riuscì di ottenere

(1) Neumeister, Zeitschr. f. Biol. Bd. XXVI. s. 329. 1890.

(2) Stadelmann, Zeitschr. f. Biol. Bd. XXVI. s. 491. 1890.

(3) Nencki, Ber. d. d. chem. Ges. Bd. XXVIII. s. 560. 1895.

(4) Kurajeff, Zeitschr. f. physiol. Ch. Bd. XXVI. s. 501. 1899.

il composto dal colore violetto distinto che sarebbe più specialmente caratteristico della reazione del triptofano.

Il difetto di materiale mi ha permesso di compiere sinora solo poche e non perfette ricerche analitiche sulle sostanze che io ho studiato; per la stessa ragione non ho potuto ancora determinare in modo soddisfacente le condizioni più opportune della loro formazione ed estendere le ricerche sulla natura di esse. Prima di riferire i dati analitici che possiedo, premetto che io mi son servito per le mie indagini di tre campioni di tirosina purissima dei quali uno apparteneva al Laboratorio di Fisiologia di Roma, l'altro mi fu fornito dal Merck ed il terzo me lo sono procurato io stesso scomponendo la raschiatura di corno con acido cloridrico. Da questi tre campioni di tirosina, io ottenni sempre prodotti identici per le loro proprietà; il ricavato, in forma pura, corrispose all'incirca al 10 % della tirosina adoperata.

L'analisi del C, H ed N (quest'ultima col metodo del Dumas) della sostanza (A) ottenuta facendo agire l'acido cloridrico ed il clorato di potassio sulla tirosina, dette i seguenti valori:

C. 52.19 %.
H. 4.75 %.
N. 6.43 %.

L'analisi della sostanza solubile in alcool (C. a) ottenuta col bromo dette le seguenti percentuali:

C. 40.83 %.
H. 3.87 %.
N. 5.47 %.

La quantità del materiale di cui io disponeva non fu sufficiente ad una determinazione quantitativa di bromo.

Debbo aggiungere che le sostanze analizzate contenevano una piccola quantità di ceneri. Spero di poter ripetere e completare queste analisi al più presto su materiali che offrano maggiori garanzie di purezza. Questa scarsità di dati analitici mi impedisce di trarre dai miei numeri qualsiasi deduzione sui rapporti che esistono fra la composizione dei miei prodotti e quella delle sostanze simili che si ottengono dai proteici. Ed una difficoltà non indifferente su questo proposito è costituita anche dalle discordanze che si trovano nei valori delle analisi compiute da diversi osservatori sopra melanine artificiali apparentemente identiche.

La conclusione che si può trarre dalle ricerche sopra esposte è che CON SPECIALI TRATTAMENTI DELLA TIROSINA SI OTTENGONO DEI PRODOTTI CHE

HANNO MOLTI PUNTI DI SOMIGLIANZA, SIA PER IL METODO DI ISOLAMENTO, SIA PER LE PROPRIETÀ LORO, CON SOSTANZE CHE SI PRODUCONO CON TRATTAMENTI ANALOGHI DAI PROTEICI.

Ed ora poche parole di commento a questa conclusione; comincerò col dire che il prodursi di sostanze simili a quelle che io ho descritte, per trattamenti analoghi a quelli da me adoperati, era già stato osservato ⁽¹⁾; solo per il Bromo la comparsa di tali prodotti è esclusa ⁽²⁾.

Io so bene che nel corso di moltissime reazioni su composti organici, specialmente della serie aromatica, si formano sostanze più o meno nere, picce, resiniformi aventi molte reazioni in comune, di natura presso che ignota e non mi sarei certamente occupato dei corpi analoghi in cui casualmente mi avvenne di imbartermi operando sulla tirosina, se non per considerarli sotto un punto di vista tutto speciale ed estraneo alla costituzione loro, riferendomi invece ai rapporti di origine, di preparazione e di proprietà che essi hanno con le melanine artificiali e composti affini. Ed a questo proposito è necessaria ancora una spiegazione. Ho detto che le mie sostanze erano ottenute con procedimenti analoghi a quelli in uso per produrre dei composti simili dai proteici: ora se ciò è abbastanza evidente per quello che riguarda le sostanze ottenute trattando la tirosina con l'acido nitroso e col bromo, potrebbe sembrarlo meno per quello che riguarda il corpo ottenuto con l'acido cloridrico e piccole quantità di clorato potassico; infatti lo Schmiedeberg trattava le proteine semplicemente con acidi minerali più o meno diluiti. Ma la differenza è forse più apparente che reale; che durante la scomposizione delle proteine con gli acidi si abbia uno sviluppo di energie ossidative e che ad esse sia legata la produzione dell'acido melanoidico, si può dedurre dal fatto ben noto che esso non comparisce quando l'acido cloridrico agisca in presenza di cloruro stannoso.

Ciò che mi ha indotto a prendere in considerazione tali sostanze si è che in tutti i casi in cui le melanine artificiali ed i proteinocromi furono ottenuti dai proteici, nello stesso modo col quale io ottenevo i miei prodotti dalla tirosina, per lo stesso trattamento si metteva in libertà della tirosina (azione degli acidi) o questa si era già precedentemente formata in abbondanza (azione del Bromo sui residui della digestione triptica). È condizione esclusiva per la produzione dei proteinocromi (e su questo punto tutti gli osservatori sono d'accordo) che la scissione dei proteici giunga sino alla formazione della tirosina; per ciò che riguarda le melanine lo Schmiedeberg osserva che la comparsa di esse non sembra possibile senza che si originino insieme anche della tirosina.

(1) Vedansi specialmente: Wiche, *Liebig's Annalen*. 101, s. 314 e Städeler, *Liebig's Annalen*. 116, s. 64.

(2) Beilstein, *Handbuch der organischen Chemie*. 2 Band. s. 1006. Leipzig 1888.

Si noti di più che i proteinocromi si ottengono, oltre che dal residuo della digestione pancreatico, anche per l'azione degli alogeni sul pus, sui prodotti della putrefazione dei proteici e per la scomposizione di questi con idrato di barite, in condizioni cioè in cui vien messa in libertà della tirosina.

È LEGITTIMA QUINDI LA SUPPOSIZIONE CHE ALLA PRODUZIONE DELLE MELANINE ARTIFICIALI E DEI «BROMKÖRPER» POSSA CONCORRERE LA TIROSINA PER UN PROCESSO DI FORMAZIONE ANALOGO A QUELLO COL QUALE IO HO OTTENUTE LE SOSTANZE IN PRECEDENZA DESCRITTE; questa è la conseguenza che si può trarre dalle mie osservazioni, ed il sospetto è tanto più giustificato per ciò che tanto i miei prodotti quanto quelli che si ottengono dalle proteine, richiedono gli stessi mezzi di isolamento e non offrono proprietà che permettano, almeno sino ad ora, di differenziarli.

Ma con ciò io non voglio trarre la conclusione ipotetica che i pigmenti artificiali non siano altro che prodotti di ossidazione o di condensazione della tirosina. Anzi, in conformità con quanto è stato osservato per i proteinocromi è possibile che anche le melanine non rappresentino che un miscuglio di sostanze simili per alcuni loro caratteri e difficilmente isolabili; a favore di questa ipotesi parlerebbe anche la sconcordanza notevole che si osserva tra le analisi dei vari osservatori. Ciò farebbe pensare che in modo simile a quanto avviene per la tirosina anche da altri prodotti di scomposizione avanzata dei proteici, di quelli ben noti e relativamente semplici per costituzione, possano formarsi i corpi pigmentari; ed a questo proposito sarà bene tener presente l'eventuale origine di una parte di essi da altri prodotti di scissione appartenenti alla serie aromatica e, per ciò che riguarda le melanine, anche dal gruppo carboidrato della molecola proteica.

Oltre che per le considerazioni ora esposte il fatto della formazione di composti simili alle melanine dalla tirosina, mi è sembrato degno di interesse sotto un altro punto di vista. Alcune indagini compiute in questi ultimi anni dimostrarono come gli organismi viventi utilizzino talora la tirosina per la produzione di pigmenti normali. Questa facoltà è specialmente propria, almeno per quanto ne sappiamo sino ad ora, dei vegetali e la trasformazione della tirosina avverrebbe per l'attività di uno speciale fermento ossidante, la *tirosinase* del Bertrand (1). Recentemente il Gonnermann (2) ha riconosciuto che il pigmento normale della barbabietola è l'acido omogensinico, e che questo si può ottenere in vitro facendo agire sulla tirosina il fermento relativo estratto dalla barbabietola.

Per ciò che riguarda l'organismo animale l'unica osservazione in propo-

(1) Bertrand, C. R. Acad. sc. CXXIII, pag. 463.

(2) Gonnermann, *Plüger's Arch.* 82, Bd. s. 289. 1900.

sito è il fatto importante trovato da Wolkow e Baumann ⁽¹⁾ i quali dimostrarono che il pigmento bruno il quale si riscontra nell'urina degli alcaptonurici è costituito principalmente da acido omogensinico, e che in questa sostanza si trasformano quantità ingenti di tirosina introdotte nell'organismo degli alcaptonurici.

Ciò mi ha indotto a ricercare se nell'organismo animale vi siano fermenti capaci di trasformare la tirosina in composti colorati che offrano qualche analogia con quelli già noti; ma i risultati di queste indagini formeranno l'oggetto di una ulteriore pubblicazione.

Parassitologia. — *Studi sul vaccino.* Nota V preventiva del dott. C. GORINI, presentata dal Socio CREMONA.

Nel corso de' miei studi sul vaccino ho osservato i seguenti fatti:

1. Un vaccino attivo, che risulta sterile nei comuni mezzi di cultura, mostra, al microscopio, di contenere forme cocco-batteriche endo ed extracellulari, le quali, all'aspetto ed al comportamento verso le sostanze coloranti, si possono presumere dotate di vitalità.

2. Inoculando un siffatto vaccino nella cornea del coniglio si ottiene, all'osservazione macroscopica, quella reazione vaccinica che nella mia Memoria sul controllo biologico del vaccino ⁽²⁾ ho chiamata *normale*, non accompagnata da fenomeni infiammatori; e, all'esame microscopico, si osserva, oltre alla comparsa dei *cytocytes* Guarnieri (reazione vaccinica *positiva*), ed anzi ancor prima di questi, una invasione endocellulare di forme cocco-batteriche simili a quelle riscontrate nel vaccino inoculato, unitamente a quelle molteplici manifestazioni di iperattività nucleare che descrissi nella seconda Nota preventiva ⁽³⁾.

In base a prove di controllo, sono condotto ad escludere che questa invasione batterica sia da attribuirsi ai germi che normalmente si trovano sulla congiuntiva dei conigli, o ad inquinazioni avventizie di piogeni, come lo prova del resto anche la mancanza di fenomeni infiammatori. Percui tutto mi lascia credere che quelle forme cocco-batteriche siano il prodotto della moltiplicazione endocorneale delle forme analoghe contenute nel vaccino inoculato.

Sebbene io abbia già avuto occasione di verificare i fatti suesposti con diverse qualità di vaccino, tuttavia non possiedo ancora una casistica suf-

⁽¹⁾ Wolkow u. Baumann, *Zeitschr. f. physiol. Ch.*, XV, s. 228, 1891.

⁽²⁾ *Il controllo del vaccino mediante le inoculazioni corneali.* — Archivio per le Scienze Mediche, Vol. XXIII, 1898, p. 27.

⁽³⁾ Rendiconti della R. Accademia dei Lincei — Vol. IX, 2° sem., serie 5^a, fasc. 7°. Questa medesima Nota fu poi ristampata a parte col corredo di due tavole litografiche. Pavia, Tipografia e Legatoria Cooperativa 1900.