

PRIMI PASSI E SUCCESSIVI SVILUPPI DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA ALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ: DAI LABORATORI DI FISICA AL LABORATORIO DI ULTRASTRUTTURE

Gianfranco Donelli

Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità

La nascita della microscopia elettronica si fa risalire alla descrizione dettagliata, pubblicata nel 1932 sugli *Annalen der Physik*, degli esperimenti condotti da Max Knoll e Ernst Ruska al Politecnico di Berlino, che permisero di ottenere per la prima volta l'immagine di un fascio modulato di elettroni tramite l'uso di due lenti magnetiche.

Tuttavia, il brevetto per lo sfruttamento commerciale dell'invenzione risulta assegnato, fin dal 28 maggio 1931, all'Ing. Reinhold Rudenberg, Direttore di Ricerca della Siemens & Halske di Berlino.

Comunque, la costruzione in serie di microscopi elettronici, su progetto di Bodo von Borries e Ernst Ruska, iniziò in Germania solo nel 1939 da parte della Siemens, seguita nel 1940 dalla RCA statunitense.

In quello stesso periodo, siamo alla fine degli anni '30, matura all'Istituto Superiore di Sanità la decisione di acquistare un microscopio elettronico, come racconterà il Prof. Giulio Cesare Trabacchi, Capo dei Laboratori di Fisica, nella conferenza da lui tenuta il 18 giugno 1947, ai Soci dell'Associazione Elettrotecnica Italiana:

“Il nostro Direttore Generale (il Professor Domenico Marotta, N.d.A.), che in ogni occasione cerca di fornire i nostri Laboratori dei più moderni mezzi di studio, decise di acquistare uno di questi apparecchi e diede al Laboratorio di Fisica l'incarico della scelta. Noi ritenemmo conveniente proporre l'acquisto del microscopio costruito dalla Siemens di Berlino.”

Infatti, come mi raccontò negli anni '70 la Prof.ssa Daria Bocciarelli, lei stessa si recò nel 1939, insieme al Prof. Trabacchi di cui era allora assistente, presso la Siemens & Halske di Berlino ove il microscopio elettronico, appena entrato in produzione, fu loro illustrato dal Dr. Heinz Otto Müller.

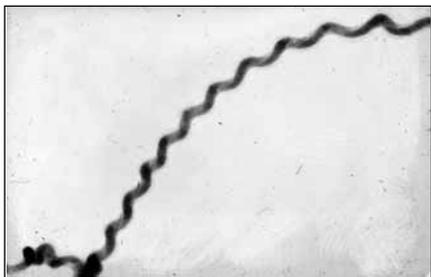


Figura 1. - *Leptospira acquatilis* fu il soggetto della prima micrografia elettronica ottenuta in Istituto il 27 novembre 1942.

Essi si convinsero della validità dello strumento, che aveva un potere di risoluzione di 25 nm ed una tensione di accelerazione variabile da 40 a 100 KV, tanto da ordinarlo subito ma dovettero attendere fino al novembre 1942, quando l'apparecchio (serie UM 100) fu finalmente montato nei Laboratori di Fisica.

Il soggetto della prima micrografia elettronica, ottenuta nel nostro Istituto il 27 novembre del 1942, fu una *Leptospira acquatilis* (Figura 1), come risulta dal quaderno di esperimenti del Laboratorio di Fisica dedicato al microscopio elettronico.

Queste prime osservazioni ultrastrutturali, avviate da Daria Bocciarelli in collaborazione con Brenno Babudieri, allora brillante ricercatore dei Laboratori di Batteriologia, riguardarono microrganismi di notevole rilevanza sanitaria quali le spirochete della febbre ricorrente, il bacillo della difterite (*Corynebacterium diphtheriae*) e il bacillo di Friedlander (*Klebsiella pneumoniae*).

Se da un lato la maggior parte dei ricercatori che richiedevano di effettuare osservazioni al microscopio elettronico erano biologi e medici, dall'altro non mancava certo l'interesse dei fisici italiani nei riguardi dell'ottica elettronica e delle sue potenzialità.

Basti ricordare la brillante ed esaustiva monografia sulle lenti elettroniche, di ben 53 pagine, pubblicata da Edoardo Amaldi sui *Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità* alla fine del 1943.

Il fascino del "supermicroscopio", come veniva allora chiamato comunemente, attrasse fin dall'inizio del 1943 illustri scienziati tra i quali ricordiamo:

- Luigi Cavalli, che giunse da Pavia per dedicarsi allo studio della diversa resistenza ai raggi X di *Bacterium coli* in relazione all'età delle cellule batteriche;
- Giambattista Bietti, Direttore della Clinica Oculistica di Sassari, che ottenne ospitalità in Istituto per studiare la batteriolisi da lisozima lacrimale in cocchi gram-negativi.

Questo fervore di attività e di collaborazioni, che vide lo strumento lavorare incessantemente per quasi un anno, fu tuttavia bruscamente interrotto nell'autunno del 1943 quando il Dr. Müller della Siemens si presentò al Prof. Trabacchi e alla Dr.ssa Bocciarelli con una lettera che conteneva l'ordine di requisizione del microscopio che i tedeschi temevano potesse cadere nelle mani degli Alleati.

Il Prof. Trabacchi chiese al Dr. Müller alcuni giorni di tempo per lo smontaggio e l'imballaggio dello strumento, giorni che risultarono molto utili ai fisici dell'Istituto che lavorarono giorno e notte per la raccolta di tutti i dati tecnici e la misurazione delle correnti delle bobine e dei campi magnetici delle lenti. Per l'impossibilità di smontarle, le espansioni polari delle lenti vennero radiografate.

Come raccontò Trabacchi, *"l'8 ottobre 1943, per ordine del Comando Militare Germanico, il microscopio veniva ritirato per essere posto al sicuro con la promessa di restituirlo dopo l'immane vittoria".* Ricorda ancora Trabacchi, *"noi non ponemmo molta fiducia in questa promessa; ed infatti il giorno dopo che fu portato via il microscopio, essendo rimasti molto spiacenti che il nostro Istituto fosse stato privato di tale apparecchio, accettammo la proposta del nostro Direttore Generale di costruirne un altro nella nostra officina".*

Grazie ai rilievi tecnici e alla loro esperienza, i fisici dell'Istituto, avviarono immediatamente la costruzione del nuovo strumento superando notevoli difficoltà per il reperimento dei materiali necessari.

Ad esempio, come mi raccontò la Prof.ssa Bocciarelli, le leghe magnetiche con cui realizzare le espansioni polari delle lenti furono ottenute da amici che lavoravano presso industrie belliche, i quali fornirono anche alcune delle attrezzature necessarie che venivano gettate di notte oltre il muro di cinta dell'Istituto e immediatamente trasportate all'interno dei Laboratori di Fisica.

I valenti meccanici dei Laboratori di Fisica Giuseppe Berardo ed Ermenegildo Savi utilizzarono per gran parte del lavoro un tornio grossolano trasformato in tornio di precisione.

Un piccolo apparecchio per raggi X, opportunamente modificato diventò la sorgente di alta tensione a 100.000 Volt, mentre la cassetta fotografica venne realizzata con il bronzo di un busto che i tempi mutati avevano relegato in un magazzino.

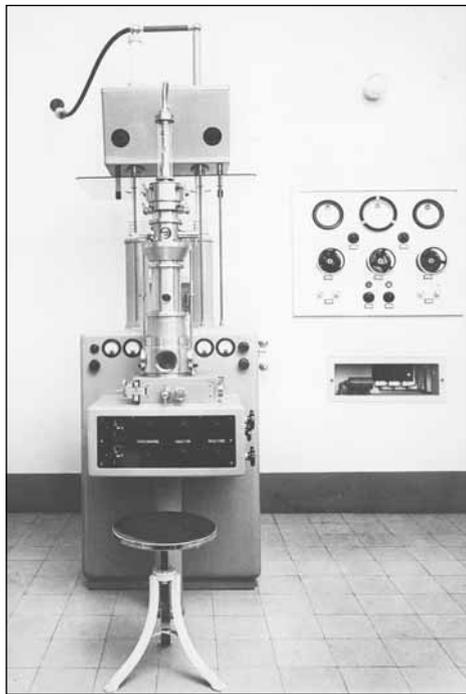


Figura 2. - Il microscopio elettronico ISS costruito nel Laboratorio di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, entrato in funzione nel dicembre del 1946.

Il nuovo microscopio elettronico, chiamato ISS dalle iniziali dell'Istituto, entrò in funzione nel dicembre del '46, dimostrandosi in grado di fornire prestazioni migliori rispetto a quelle del microscopio Siemens, consentendo di ottenere micrografie elettroniche con una risoluzione di circa 10 nm (Figura 2).

Iniziò subito un intenso periodo di collaborazioni dei fisici sia con colleghi di vari Laboratori che con altri ricercatori italiani.

Ricordiamo in quegli anni l'incessante ed entusiastica attività di Franco Scanga, ricercatore dei Laboratori di Batteriologia dell'Istituto, che riprese le sue ricerche di microbiologia ultrastrutturale agli inizi del '47 studiando con Giuseppe Penso il meccanismo d'azione su *Escherichia coli* della streptomicina, della penicillina e di alcuni disinfettanti.

Tra il 1948 ed il 1958, ricordiamo le ricerche di:

- Italo Archetti sui ceppi epidemici di virus influenzale isolati a Roma;
- Giuseppe Penso, Vittorio Ortali, Gina Castelnuovo, Mario Princivalle, Aldo Gaudiano, Luciano Vella ed Alfredo Zampieri sul nuovo *Mycobacterium minettii* e sui fagi dei micobatteri;
- Leonida Ravaioli sulla sensibilità alla cloromicetina dell'*Actinobacillus lignieresii*, responsabile dell'actinobacilloso bovina;
- Franco Scanga e Giuseppe Penso sulle modalità di duplicazione di *Pasteurella pestis* e sull'azione *in vitro* dell'aureomicina e dell'eritromicina su ceppi di Salmonella e Brucella;

- Rodolfo Negri sull'azione del sulfarafene (antibiotico estratto dai semi di rafano) nella divisione cellulare di *Vibrio cholera*.

Le micrografie elettroniche più significative relative a queste ed altre ricerche svolte in Istituto in quel periodo, consentiranno al Prof. Franco Scanga, la pubblicazione, nel 1960, del suo famoso *Atlante di Microscopia Elettronica* (Figura 3). Le richieste di visite al "Supermicroscopio" erano infatti continuate ininterrottamente in quegli anni insieme a qualificate richieste di collaborazione da parte di eminenti studiosi di Università italiane:

- Massimo Aloisi sull'actina muscolare;
- Giovanni Lelli ed Ugo Marotta sull'ultrastruttura delle fibrille collagene e sulle malattie del collagene;
- Vittorio Casorati sull'epitelio di corde vocali di cavia.
- Silvio Ranzi sulle proteine citoplasmatiche filamentose;
- Antonio Ascenzi ed Ennio Lucio Benedetti sull'ultrastruttura dell'osso;
- Vittorio Marinozzi sull'istochimica ultrastrutturale dei polisaccaridi e delle glicoproteine

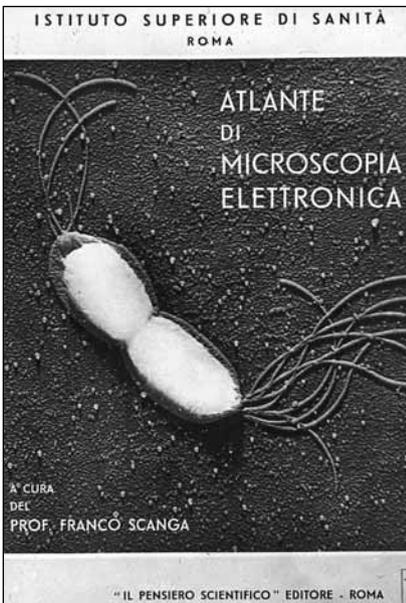


Figura 3. - Il primo atlante di microscopia elettronica edito in Italia a cura del Prof. Franco Scanga dei Laboratori di Batteriologia dell'Istituto Superiore di Sanità.

e sulla messa a punto della tecnica di contrasto delle sezioni ultrasottili mediante impregnazione argentea.

Nel 1958, con la nomina del Prof. Mario Ageno alla direzione dei Laboratori di Fisica, iniziò una nuova primavera per le ricerche ultrastrutturali dell'Istituto, che vide lavorare a fianco dei biofisici Mario Ageno e Clara Frontali, pionieri della biologia molecolare all'Università "La Sapienza" di Roma quali Pierluigi Donini, Franco Graziosi, Giorgio Morpurgo, Giorgio Tecce e Giovanni Toschi.

Il Reparto di Microscopia elettronica tra il 1961 e il 1971 arricchì notevolmente la sua dotazione strumentale, acquisendo un microscopio elettronico RCA, un evaporatore metallico Siemens, un ultramicrotomo LKB 1 ed un Porter-Blum MT-2 (DuPont Instruments) ed un evaporatore metallico Edwards.

Un deciso balzo in avanti nelle potenzialità di ricerca del Reparto fu poi ottenuto con l'arrivo nel febbraio 1969 di quello che, all'epoca, era considerato il microscopio elettronico di punta, l'A.E.I. mod. 6B prodotto in Inghilterra; questo strumento oltre ad avere una eccezionale stabilità di funzionamento, permetteva di ottenere immagini ad elevato contrasto con un potere risolutivo di circa 3 Å, consentendo di spingere le osservazioni in campo biologico a livello di piccoli aggregati molecolari o addirittura di singole molecole.

Il contemporaneo affiancamento, nell'autunno del 1969, di un diffrattometro ottico permetterà in quegli anni a Gianfranco Donelli e Luigi Paoletti l'ottenimento di risultati di rilievo sia sul piano metodologico che nell'analisi e nella ricostruzione ottica della struttura a subunità di capsidi virali, ed in particolare del batteriofago G.

Fu in quel clima di entusiasmo per i nuovi mezzi di indagine ultrastrutturale, di motivazione professionale e di convinto spirito di collaborazione tra ricercatori e tecnici dei Laboratori di Fisica che vennero condotte importanti ricerche sulle proprietà biologiche e chimico-fisiche di batteri, lieviti, virus umani ed animali e batteriofagi.

Tra i più significativi di quegli anni ricordiamo gli studi sul batteriofago α di Sandro Aurisicchio, Adriana Chiozzotto, Anna Coppo, Pierluigi Donini, Clara Frontali, Franco Graziosi e Giovanni Toschi; quelli sulla struttura dei virus influenzali e di alcuni adenovirus di scimmia di Italo Archetti, Daria Bocciarelli, Giuseppe Arancia, Pasqualina Crateri e Fulvia Valente; e quelli sul fago G di *Bacillus megatherium* di Mario Ageno, Gianfranco Donelli, Elisabetta Dore, Clara Frontali, Michele Grandolfo, Francesco Guglielmi, Luigi Paoletti, Fulvia Valente e Franco Tangucci.

Nell'aprile del 1975, dopo un breve periodo in cui ebbe anche l'incarico di Capo del Laboratori di Fisica, la Prof.ssa Bocciarelli lasciò l'Istituto per raggiunti limiti di età e alla direzione del Reparto di Microscopia Elettronica fu nominato Gianfranco Donelli, all'epoca unico ricercatore di ruolo del Reparto di Biofisica e biologia molecolare che si dedicava assiduamente alla ricerca ultrastrutturale in campo microbiologico.

A seguito della riforma dell'Istituto Superiore di Sanità, disposta dalla legge n. 519, il Reparto di Microscopia elettronica dei Laboratori di Fisica troverà nel 1976 collocazione nel Laboratorio di Biologia cellulare e immunologia, con l'intenzione di sottolinearne l'ormai prevalente indirizzo applicativo in campo biomedico, ed assumerà la nuova denominazione di Reparto di Ultrastrutture biologiche, alla cui direzione verrà confermato Gianfranco Donelli.

Tra le altre apparecchiature acquisite in quegli anni va ricordato l'apparato per crio-frattura (*freeze-fracturing*) e crio-sublimazione (*freeze-etching*) entrato in dotazione al Reparto nel 1970, che consentì a Gianfranco Donelli, Giuseppe Arancia, Pasqualina Crateri e Fulvia Valente lo svolgimento di interessanti ricerche su capsidi virali (fago G) e su organuli e membrane biologiche, sia di cellule procarioti (*Escherichia coli*) che eucariotiche (eritrociti e linfociti).

Questa rapida rassegna ci ha consentito di ripercorrere per grandi linee il cammino delle indagini ultrastrutturali condotte fino alla costituzione, avvenuta nel settembre del 1982, del Laboratorio di Ultrastrutture, uno dei venti laboratori in cui venne articolato nei primi anni '80 l'Istituto Superiore di Sanità. Al Laboratorio, costituito da cinque Reparti e dotato di una Segreteria Tecnica e di una Segreteria Amministrativa (Figura 4), vennero assegnate le seguenti attribuzioni:

- analisi di strutture biologiche in condizioni normali e patologiche;
- ricerche ultrastrutturali applicate allo studio di microrganismi patogeni e dei processi infettivi da essi sostenuti;
- studio a livello cellulare e tissutale di alterazioni strutturali e funzionali indotte da agenti chimici, fisici e biologici, e/o conseguenti a processi patologici;

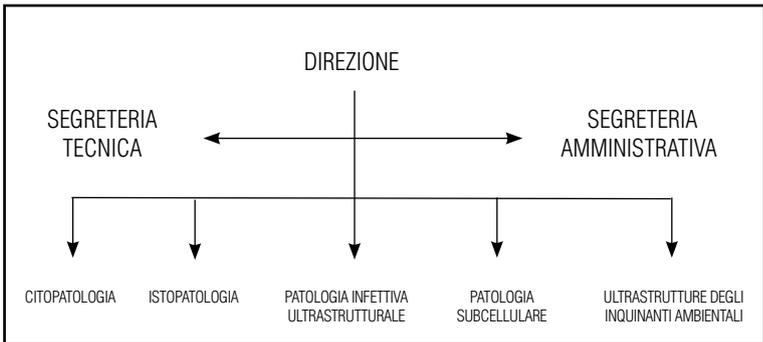


Figura 4. - Organigramma del Laboratorio di Ultrastrutture.

- studio di inquinanti ambientali di particolare rilevanza sanitaria e delle loro modalità di interazione con le strutture biologiche;
- studio delle interazioni di sistemi biologici con biomateriali;
- elaborazione e sviluppo di nuove metodologie per l'analisi strutturale e la diagnostica rapida di laboratorio.

Oltre ai ricercatori (Gianfranco Donelli e Luigi Paoletti) e ai tecnici (Giuseppe Arancia, Egidio Chessa, Pasqualina Crateri e Fulvia Valente) di ruolo provenienti dal Reparto di Ultrastrutture biologiche, confluirono nel Laboratorio i ricercatori Alfredo Caprioli, Vincenzo Falbo e Franco Maria Ruggeri dal Laboratorio di Batteriologia e virologia e Salvatore Caiazza dal Laboratorio di Ingegneria biomedica.

A questo nucleo iniziale, la pianta organica prevista per il nuovo Laboratorio permetterà di affiancare nel decennio 1982-1992 altri sei validi ricercatori: Marco Diociaiuti, Carla Fiorentini, Fiorella Malchiodi Albedi, Walter Malorni, Fabiana E. Superti e Domenica Taruscio, e ben diciotto tecnici a vari livelli, molti dei quali laureati: Lucilla Baldassarri, Domenico Batisti, Lamberto Camilli, Fabrizio Ciaralli, Mario Falchi, Carla Fanizza, Giuseppe Formisano, Silvana Giovannangeli, Francesca Iosi, Maria Luisa Marziano, Stefania Meschini, Agnese Molinari, Fabio Minelli, Silvia Paradisi, Dario Pisani, Michele Sciotti, Antonella Tinari, Laura Toccaceli; ed infine, non meno importanti, le collaboratrici di ruolo e non della Segreteria Tecnica e della Segreteria Amministrativa: Santina Amici, Giuse Ardita, Maria Grazia Cappella, Alessandra Ceccarini, Maria Cristina Di Lollo, Manuela F. Forteleoni, Valeria Guglielmi, Odile Krugell, Daniela Lombardi, Donatella Lombardi, Rosanna Loreti, Annamaria Morace, Cristina Quattrini, Loredana Tranquilli.

Nel decennio 1982-1992 il Laboratorio di Ultrastrutture si impegnò in ricerche e attività istituzionali sia in campo biologico che ambientale: dalle applicazioni della microscopia elettronica alla diagnosi rapida di rotavirus, adenovirus e astrovirus in campioni fecali, alla diagnosi differenziale vaiolo-varicella; alle indagini diagnostico-epidemiologiche sulle infezioni da criptosporidi e microsporidi in soggetti immunocompromessi; alle ricerche di ematologia ultrastrutturale; agli studi sul meccanismo d'azione di tossine batteriche e, in particolare, del fattore citotossico necrotizzante di *Escherichia coli* e delle tossine A e B di *Clostridium difficile*; alle ricerche di tossicologia subcellulare con particolare riferimento ai processi apoptotici; alle in-

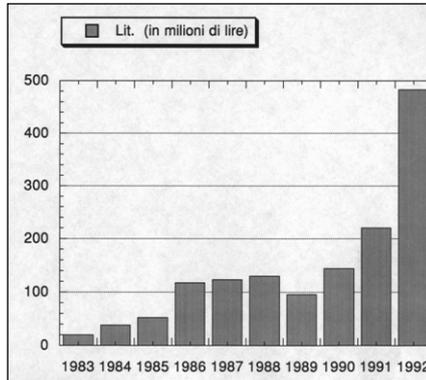


Figura 5. - Fondi extramurali affluiti al Laboratorio di Ultrastrutture nel decennio 1982-1992 a seguito del finanziamento di progetti sia a livello nazionale che internazionale.

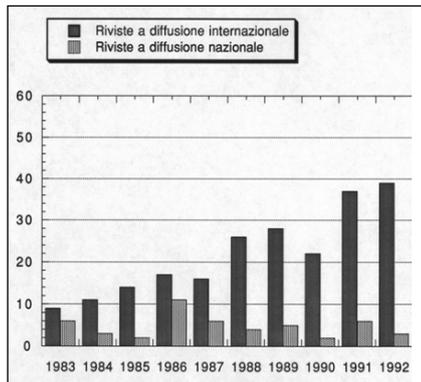


Figura 6. - Andamento della produttività scientifica del Laboratorio di Ultrastrutture nel decennio 1982-1992.

dagini sulla matrice extracellulare; agli studi sull'adesione batterica, la colonizzazione e la formazione di biofilm nelle infezioni associate all'impianto di dispositivi medici; all'individuazione e al riconoscimento delle fibre di amianto in diverse matrici ambientali e in campioni biotipici e autotipici di pazienti affetti da mesotelioma.

L'affermazione scientifica del Laboratorio di Ultrastrutture nel decennio 1982-1992 è testimoniata sia dal progressivo affluire di crescenti fondi extramurali (Figura 5) che dall'elevato numero di pubblicazioni su qualificate riviste nazionali ed internazionali (Figura 6).

Desidero quindi cogliere l'occasione per rivolgere a tutti i colleghi del Laboratorio di Ultrastrutture il mio sincero ringraziamento per la loro preziosa collaborazione che consentì in quegli anni un rapido sviluppo ed una significativa affermazione scientifica del Laboratorio.