

**Primi passi e successivi sviluppi della
microscopia elettronica all'ISS:
dal Laboratorio di Fisica al Laboratorio di
Ultrastrutture**

**Gianfranco Donelli
Istituto Superiore di Sanità**

**Storie e memorie dell'Istituto Superiore di Sanità
Roma, 4 febbraio 2008**

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 quegli anni 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, 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 Mueller.

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*, come risulta dal quaderno di esperimenti del Laboratorio di Fisica dedicato al microscopio elettronico.

1

MINISTERO DELL'INTERNO
ISTITUTO DI SANITÀ PUBBLICA

LABORATORIO DI Fisica

ANNO 1942 -

Electroni a 65 kv 27 nov. 42

Filipapere a piccolo ingrandimento, con blende 0,07
Senza espansori polari con B_{00} di diametro del
l'immagine intermedia imm 5, di diametro del
l'immagine finale imm 65 lenta 3

$$A_1 = \frac{5}{0,07} = 72$$

$$A_2 = \frac{65}{2} = 32,5 \quad A = A_1 \cdot A_2 = 2340$$

Senza espansori polari con B_{26} lenta 4

$$A_1 = \frac{9}{0,07} = 129$$

$$A_2 = \frac{65}{2} = 32,5 \quad A = A_1 \cdot A_2 = 4200$$

Con espansori polari e P_2 con B_{26}

$$A_1 = \frac{9}{0,07} = 129$$

$$A_2 = \frac{80}{0,317} = 252 \quad A = A_1 \cdot A_2 = 32500$$

2

27. XI. 42 Osservazioni:

Leptospira aquatilis ceppo Tross (acqua di
fotografia N5 (x4000)

Protos x₁₉H (lenta acqua di
fotografia N6 (x4000)

30. XI. 42 Osservazioni:

- 1 *Micrococcus catarrhalis* (acqua di
fotografia N11 (x4200)
- 2 *Cryptococcus parvus* "
fotografia N8 (x4200)
- 3 *Leptospira aquatilis* ceppo Tross "
fotografia N12 (x4200)
- 4 Spirilli acqua (x4200) "
fotografia N1, N5
- 5 *Pro. difteriae* ceppo Park W.8 "
fotografia N2 (x4200)
- 6 *Pro. aemul.* Valtrovica dense aemul. "
fotografia N3 (x4200)
- 7 Spirilli dell'acqua "
fotografia N9 (x4200)

2. XI. 42 8 *Leptospira* tipo 1934 "
fotografia N6

- 9 *Trodgländer* (x4200)
fotografia N3/1/1/1



Leptospira aquatilis fu il soggetto della prima micrografia elettronica ottenuta in Istituto il 27 novembre 1942.

I **primi studi ultrastrutturali** furono avviati da Brenno Babudieri, allora brillante Ricercatore dei Laboratori di Batteriologia, in collaborazione con Daria Bocciarelli e riguardarono appunto microrganismi di notevole rilevanza sanitaria quali le **spirochete della febbre ricorrente**.

Si trattò di **osservazioni** che venivano **svolte nell'ambito delle ricerche** allora in corso in Istituto **sulla cosiddetta "malattia delle risaie"**, i cui contributi conoscitivi originali e la messa a punto di un vaccino efficace porteranno **nel 1956** l'O.M.S. e la F.A.O. ad individuare nell'**Istituto uno dei sei laboratori di riferimento per la leptospirosi a livello internazionale**.



Le **osservazioni di Babudieri** si estesero poi ad altri microrganismi tra cui 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 prestigiosi scienziati** universitari tra i quali ricordiamo:

- **Luigi Cavalli**, che giunse da **Pavia** per dedicarsi allo studio della differente 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 ininterrottamente per quasi un anno, fu tuttavia bruscamente interrotto nell'autunno del 1943 quando il Dr. Muller della Siemens si presentò al Prof. Trabacchi e alla Dr.ssa Bocciarelli con in tasca una lettera che gli era stato proibito di aprire durante il viaggio.

La busta, aperta di fronte a loro, conteneva un ordine di requisizione dello strumento. I tedeschi temevano infatti che il microscopio potesse cadere nelle mani degli Alleati.



Al Dr. Muller che non riuscì a nascondere il suo disagio, il Prof. Trabacchi chiese alcuni giorni di tempo per lo smontaggio e l'imballaggio dello strumento.

I pochi giorni concessi loro furono molto utili: i fisici dell'Istituto impiegarono le ore notturne nel lavoro di misurazione delle correnti delle bobine e dei campi magnetici delle lenti e nella raccolta di tutti i dati tecnici.

Venne inoltre attentamente analizzata la struttura della colonna del microscopio mentre, a causa dell'impossibilità di smontarle, le espansioni polari vennero radiografate.



Forschungsführung
des Reichsministers der Luftfahrt
und Oberbefehlshabers der Luftwaffe

BEESCHEINIGUNG
=====

Dem Istituto Superiore di Sanità wird hiermit bescheinigt, dass eine komplette Uebermikroskopanlage ausser Akkumulatorenbatterie und Ladegleichrichter von oben angegebener Dienststelle unter Leitung von Herrn Dr. Müller, Berlin, abgebaut und sichergestellt wurde. Die Anlage ist Eigentum des obengenannten Institutes.

Rom, den 8. Oktober 1943.

H. Gurski

~~Flieger~~ Obersting.



Come raccontò Trabacchi, “l’8 ottobre 1943, d’ordine del Comando Militare Germanico, il microscopio veniva ritirato per essere “posto al sicuro” con la promessa di restituircelo dopo “l’immancabile vittoria”. “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”.



Ma l'apparecchio non ritornò mai in fabbrica e anzi fece una brutta fine; infatti, secondo quanto io stesso venni a sapere dalla Dr.ssa Cilly Weichan durante una visita ai laboratori di ricerca della Siemens a metà degli anni '70, l'incalzare degli eventi bellici portò all'abbandono del microscopio in un deposito di una piccola stazione ferroviaria vicino al confine tedesco, che venne poi completamente distrutta dai bombardamenti alleati.



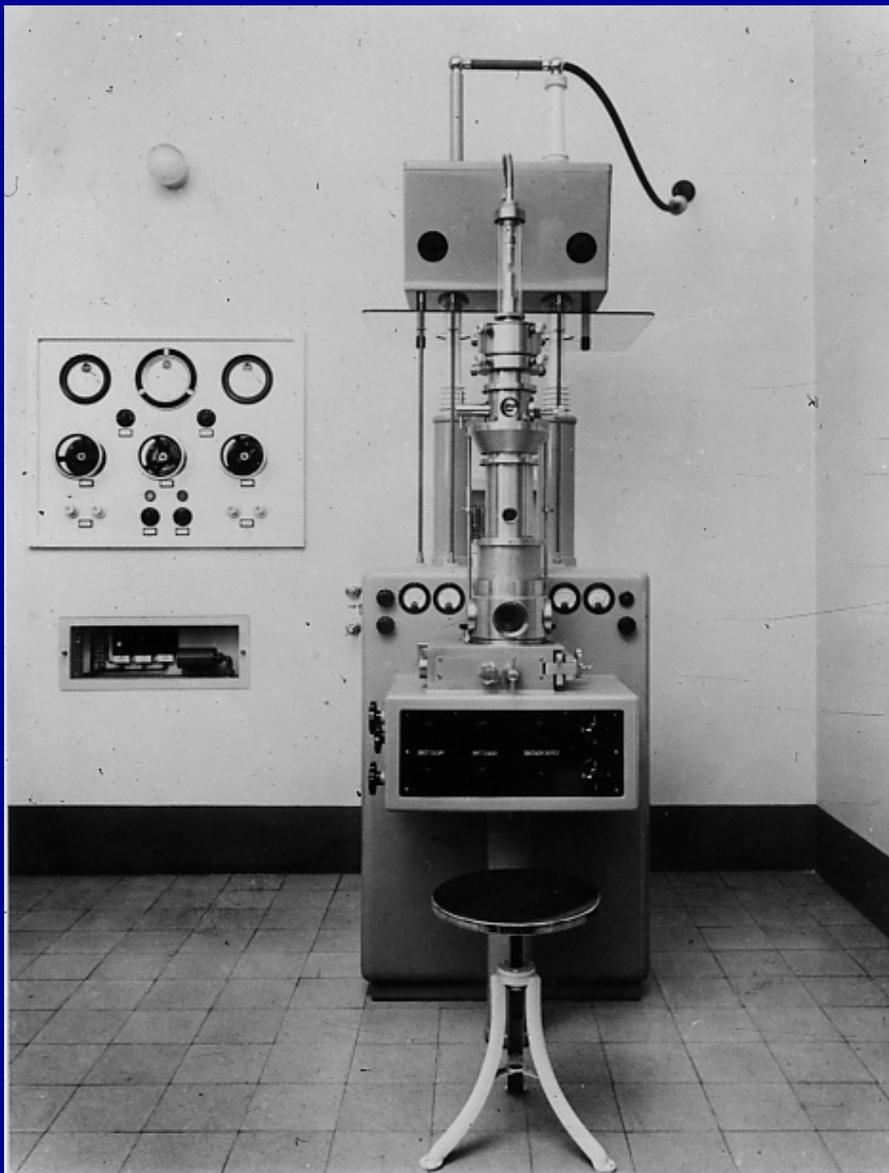
Grazie ai rilievi tecnici e alla loro esperienza, il Prof. Trabacchi e la Prof.ssa Bocciarelli avviarono immediatamente la costruzione di un nuovo strumento superando enormi difficoltà per il reperimento dei materiali necessari.

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 si misero subito all'opera, utilizzando per gran parte del lavoro un tornio grossolano trasformato in tornio di precisione: **Giuseppe Berardo** si occupò della **costruzione del corpo principale** dello strumento ed **Ermenegildo Savi** della realizzazione e montaggio dell'**impianto da vuoto** e dei **quadri di comando a bassa e alta tensione**.

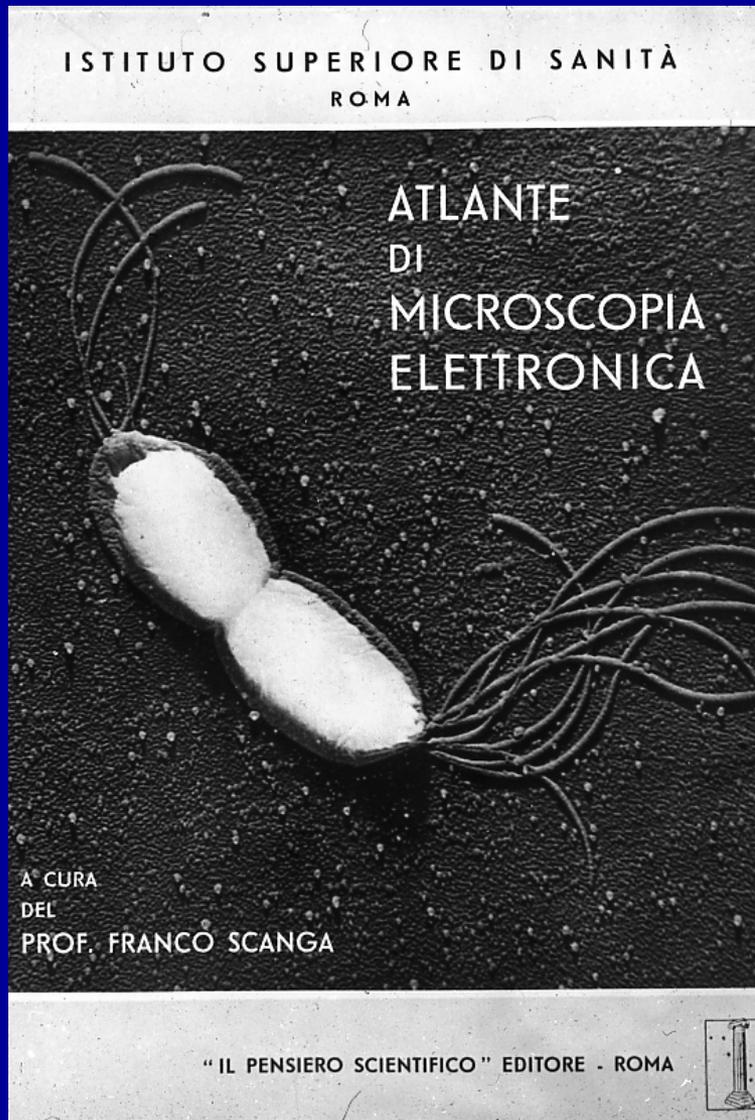




Un piccolo apparecchio per raggi X, con opportune modifiche diventò la sorgente di alta tensione a 100.000 Volt, mentre per la realizzazione della cassetta fotografica venne destinato il bronzo di un busto che i tempi mutati avevano relegato in un magazzino.

Dopo circa due anni e mezzo di lavoro, il 9 luglio 1946 iniziò la fase di collaudo del nuovo microscopio elettronico, chiamato ISS dalle iniziali dell'Istituto.

Esso entrò poi in funzione nel dicembre del '46, fornendo prestazioni migliori rispetto a quelle del microscopio Siemens e consentendo di ottenere micrografie elettroniche con una risoluzione di circa 10 nm.

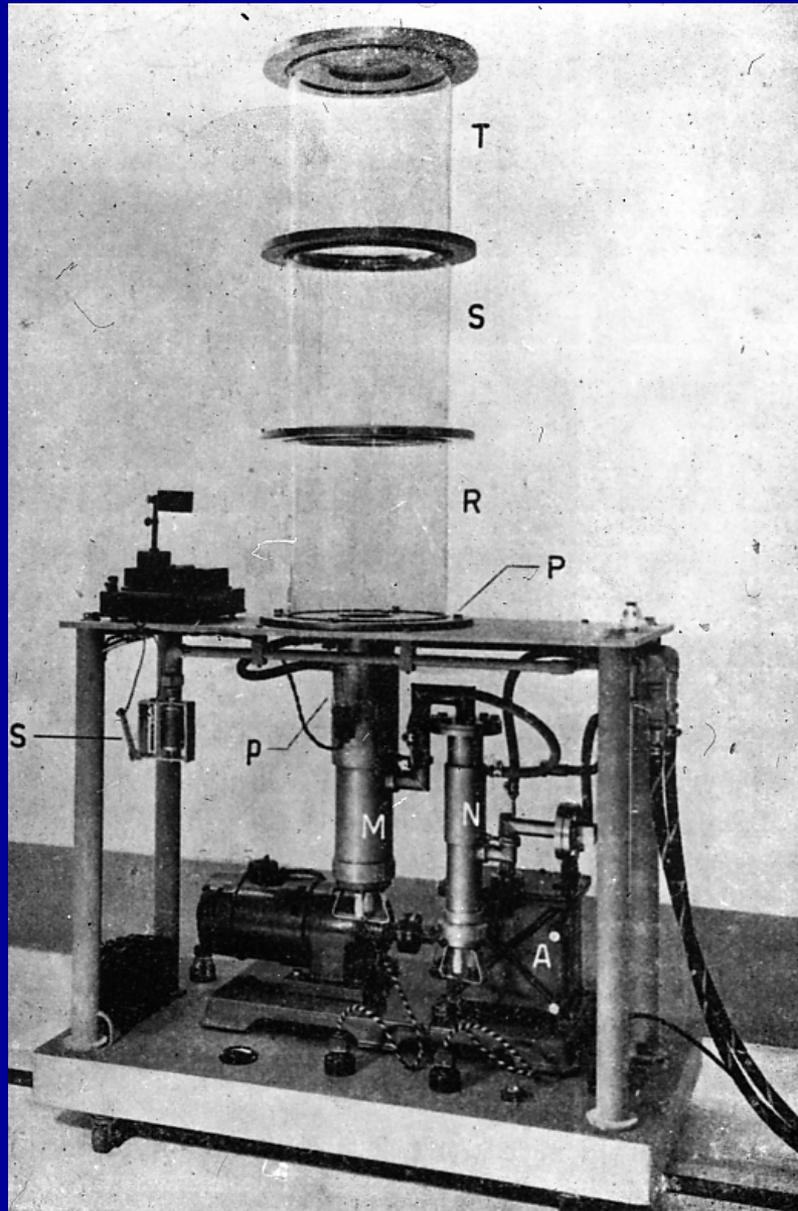


Iniziò subito un intenso periodo di collaborazioni dei fisici sia con colleghi di vari Laboratori che con altri ricercatori italiani.

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**, ricerche che continuerà ininterrottamente fino alla pubblicazione, nel 1960, del suo famoso **Atlante di Microscopia Elettronica**.



Sul piano metodologico va ricordata la **realizzazione nel 1948**, a cura del Prof. Trabacchi e della Prof.ssa Bocciarelli, di un **apparecchio per l'evaporazione metallica sottovuoto**, che consentì l'applicazione della tecnica delle ombre alla definizione morfologica di alcune specie batteriche.



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'actinobacillosi 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 cholerae*



Continue furono in quegli anni le **visite al “Supermicroscopio”** e le **richieste di collaborazione** di 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 e sulla messa a punto della tecnica di contrasto delle sezioni ultrasottili mediante impregnazione argentea





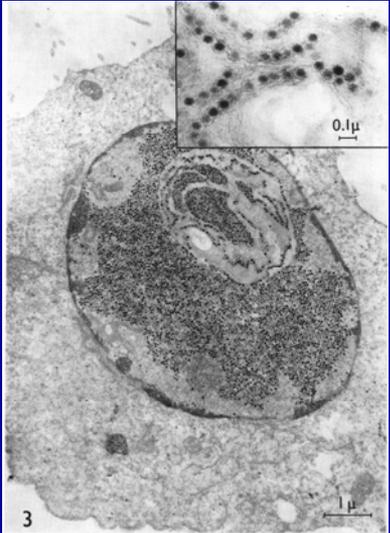
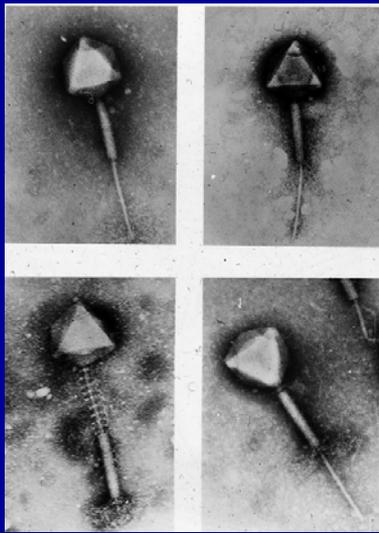
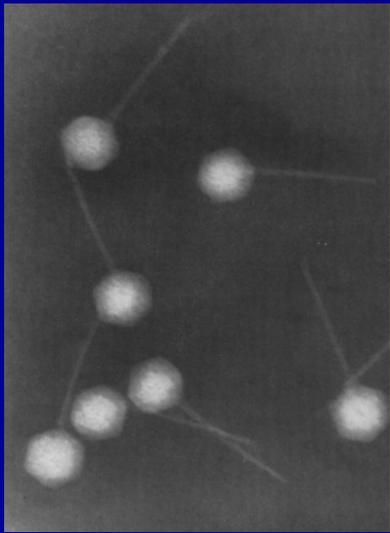
Nel 1958, con la nomina del Prof. Mario Ageno alla direzione dei Laboratori di Fisica, iniziò una nuova primavera per le ricerche ultrastrutturali all'Istituto Superiore di Sanità che vide lavorare a fianco dei biofisici dell'Istituto, Mario Ageno e Clara Frontali, pionieri della biologia molecolare 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\AA , 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.

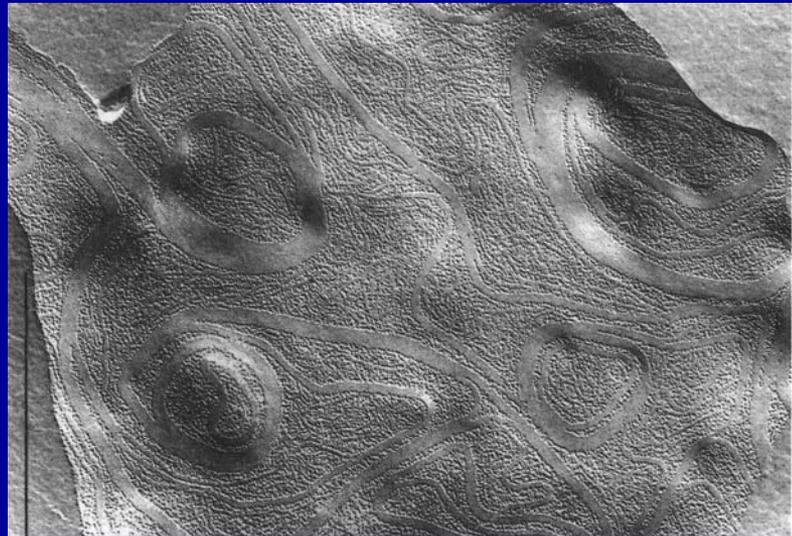
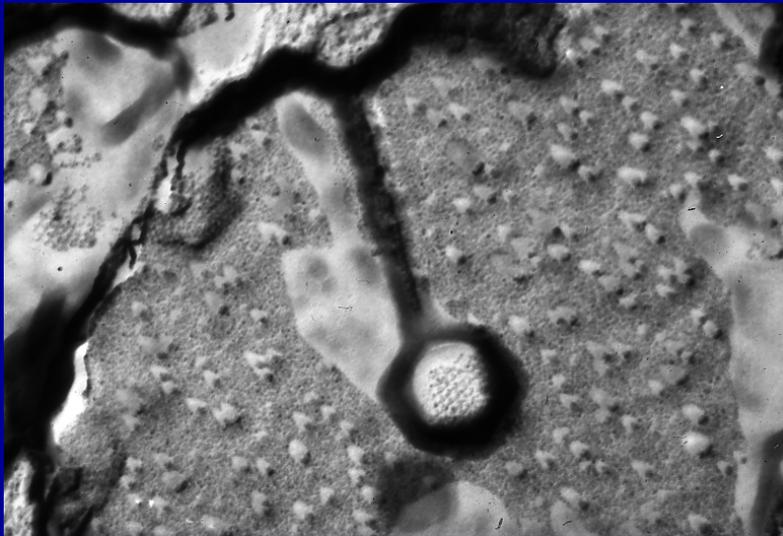
Tra i più significativi di quegli anni ricordiamo gli studi sul **batteriofago α** di **Sandro Aurisicchio, Adriana Chiozzotto, Anna Coppo, Pierluigi Donini, Clara Frontali, Franco Graziosi e Giovanni Toschi**; quelli sulla struttura dei **virus influenzali** e di alcuni **adenovirus di scimmia** di **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 Rosati Valente e Franco Tangucci**.

Nell'aprile del 1975, dopo un breve periodo in cui ebbe anche l'incarico di Capo dei 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.

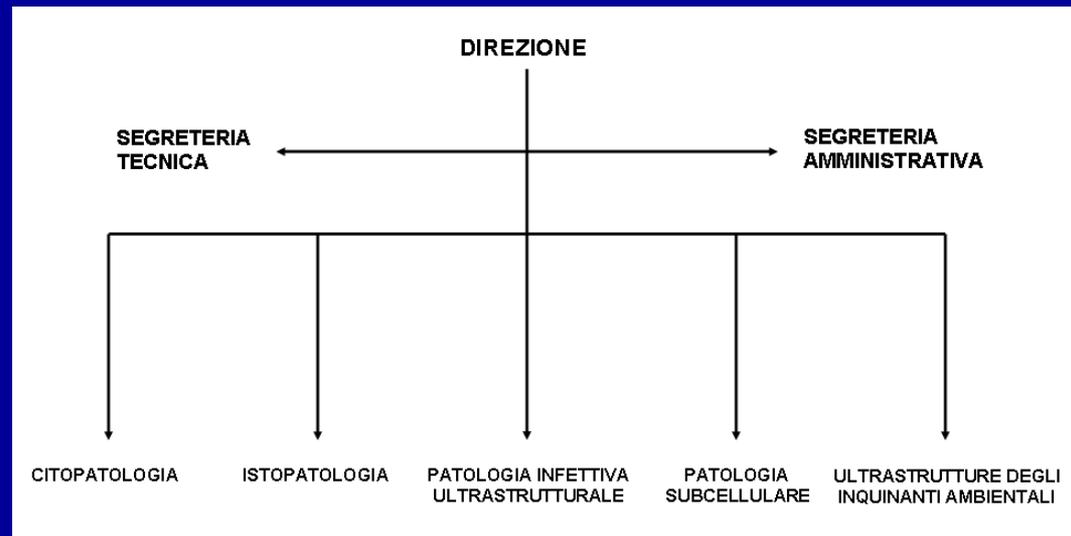
A seguito della riforma dell'Istituto Superiore di Sanità, disposta dalla legge n. 519, il Reparto di Microscopia Elettronica dei Laboratori di Fisica troverà nel 1976 collocazione nel Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia, con l'intento di sottolinearne l'ormai prevalente indirizzo applicativo 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 Rosati Valente** lo svolgimento di interessanti ricerche su capsidi virali (fago G) e su organuli e membrane biologiche, sia di cellule procariotiche (*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.



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
- 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 (G. Donelli e L. Paoletti) e ai Tecnici (G. Arancia, P. Crateri, F. Valente, E. Chessa) di ruolo provenienti dal Reparto di Ultrastrutture Biologiche confluirono nel Laboratorio quali Ricercatori A. Caprioli, V. Falbo e F. M. Ruggeri dal Laboratorio di Batteriologia e Virologia e S. Caiazza dal Laboratorio di Ingegneria Biomedica.

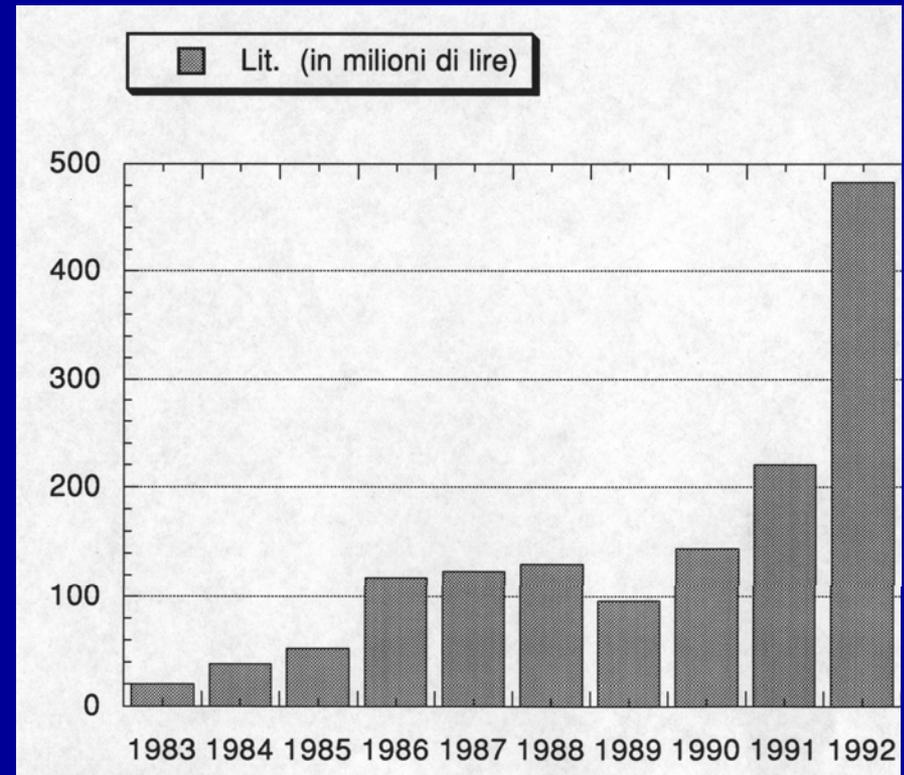
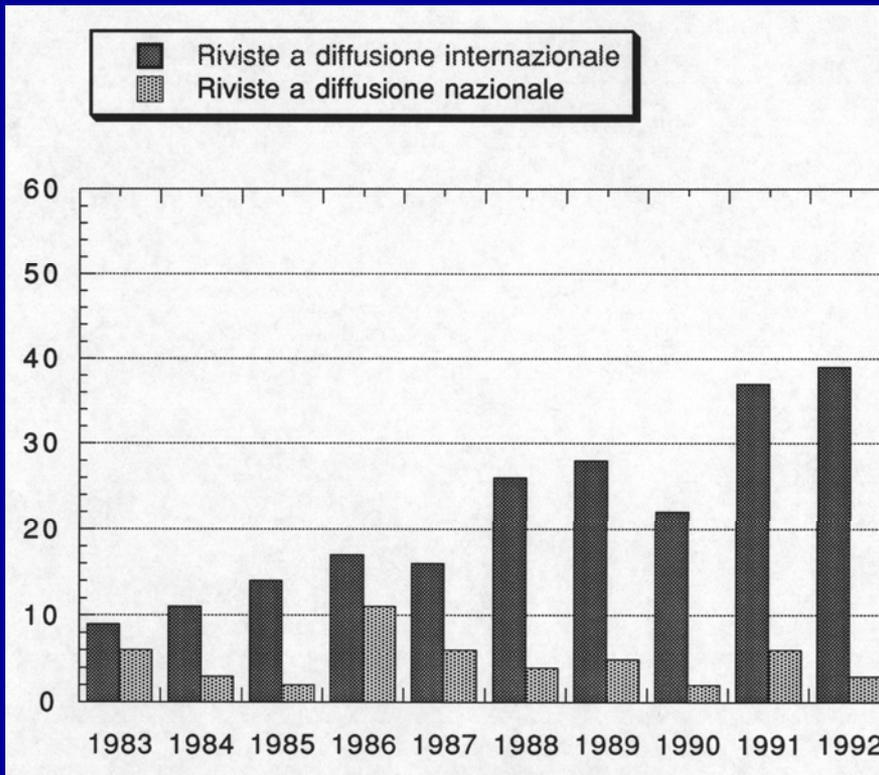
A questo nucleo iniziale, la pianta organica prevista per il nuovo Laboratorio permetterà di affiancare nel decennio 1982 – 1992 altri 5 validi Ricercatori: W. Malorni, C. Fiorentini, F. Malchiodi Albedi, D. Taruscio e M. Diociaiuti, e ben 16 Tecnici a vari livelli, molti dei quali laureati: L. Baldassarri, D. Batisti, L. Camilli, A. Molinari, M. Falchi, G. Formisano, S. Giovannangeli, F. Iosi, M. L. Marziano, F. Minelli, S. Meschini, M. Sciotti, S. Paradisi, D. Pisani, A. Tinari, L. Toccaceli; ed infine, non meno importanti, 3 collaboratrici di Amministrazione: S. Amici, D. Lombardi e L. 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 in campioni fecali, di rotavirus, adenovirus, astrovirus, 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 *E. coli***; alle ricerche di tossicologia subcellulare con particolare riferimento ai **processi apoptotici**; alle indagini sulla **matrice extracellulare**; agli studi sull'**adesività microbica**; alle indagini ultrastrutturali sulle **infezioni associate all'impianto di dispositivi medici**; all'individuazione e al riconoscimento delle **fibre di amianto in diverse matrici ambientali e in campioni bioptici e autoptici di pazienti affetti da mesotelioma.**



Laboratorio di Ultrastrutture



Publicazioni scientifiche 1983 – 1992.

Fondi extramurari 1983 – 1992.

Approfitto dell'occasione per rivolgere a tutti i colleghi coinvolti in queste ricerche il mio sincero ringraziamento per la preziosa collaborazione che ha consentito in quegli anni il rapido sviluppo e l'affermazione scientifica del Laboratorio di Ultrastrutture.

