

48. B. BABUDIERI e D. STEVE-BOCCIARELLI. — **La tecnica delle repliche applicata all'osservazione di oggetti biologici con il microscopio elettronico.**

Riassunto. — E' stata studiata la possibilità di applicare la tecnica delle repliche allo studio dei micro-organismi al microscopio elettronico. Questa tecnica presenta il vantaggio di studiare la morfologia del soggetto come appare a fresco, evitando così tutte le cause di errore dovute alla retrazione conseguente all'essiccamento, cui il soggetto va necessariamente sottoposto per l'osservazione al microscopio elettronico. Viene fatto un rigoroso confronto tra l'immagine data dalla replica e quella dell'oggetto in esame, sia nel caso di un oggetto indeformabile che in quello di un elemento biologico soggetto talvolta a forti deformazioni.

Le fotografie qui pubblicate testimoniano quanto sopra; quelle fatte al microscopio elettronico presentano nella stessa fotografia sia il soggetto, sia la sua replica.

Résumé. — On a étudié la possibilité d'appliquer le procédé d'empreinte à l'examen des micro-organismes au microscope électronique. Cette technique présente l'avantage de permettre d'étudier la morphologie de l'objet examiné à l'état frais, en évitant ainsi toutes les causes d'erreur dues à la rétraction qui est conséquence de l'essiccation. On fait une comparaison rigoureuse entre l'image donnée par empreinte et celle de l'objet à l'examen, soit dans le cas d'un objet indéformable, soit dans le cas d'un élément biologique qui peut quelquefois subir de fortes déformations.

Les photographies publiées ici témoignent ce que l'on vient de dire: dans la même image on voit, au microscope électronique, l'objet et son empreinte.

Summary. — The possibility of applying the replica technique to the examination of micro-organisms under the electron microscope was studied. This technique has the advantage that the morphology of the object can be observed on fresh material thus avoiding all sources of error caused by shrinkage due to drying, to which the object is necessarily exposed when observed under the electron microscope. A careful comparison was made between the replica image and the normal direct image of objects that can be altered by shrinkage or not.

The photographs published support the above evidence. Those made under the electron microscope show in the same photograph both the object and its replica.

Zusammenfassung. — Die Anwendung des Abdruck-Verfahrens bei der Untersuchung von Mikro-Organismen mittels des Elektronen-Mikroskops wurde geprüft. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass die Morphologie des Objekts so untersucht werden kann, wie sie in frischem Zustand erscheint. Hierdurch werden alle Irrtumsmöglichkeiten vermieden, die durch das für die Beobachtung mit dem Elektronen-Mikroskop erforderliche Austrocknen und das damit verbundene Einschrumpfen des Objekts gegeben sind. Es wird ein strenger Vergleich zwischen dem von der Abdruck gegebenen Bild und dem Bild des zu untersuchenden Objekts angestellt und zwar sowohl für undeformierbare Objekte wie auch für den Fall biologischer Objekte, die manchmal starker Deformation unterworfen sind.

Die gezeigten Photographien zeigen die Richtigkeit des Gesagten. Die mit dem Elektronen-Mikroskop gemachten Aufnahmen zeigen in dem selben Bild das getrocknetes Objekt und reinen Abdruck.

Nell'interpretazione di immagini osservate al microscopio elettronico occorre tener conto di svariati fattori che contribuiscono a modificare e ad alterare la morfologia dell'oggetto in esame.

In particolar modo, qualora si tratti dell'osservazione di materiale organico, si incontra una importante causa di alterazione morfologica nel processo di disidratazione a cui l'oggetto va necessariamente sottoposto, a causa della sua immissione nell'ambiente di alto vuoto, costituito dal corpo del microscopio.

L'importanza di tali modificazioni è facilmente comprensibile quando si consideri che ad esempio i corpi batterici hanno un contenuto di acqua sull'80%.

I danni che l'essiccamento provoca, per quanto indubbiamente considerevoli, non debbono però essere sopravvalutati. Infatti anche nella comune tecnica istologica si possono eseguire osservazioni molto delicate e precise su materiale semplicemente essiccato all'aria, come nel caso degli strisci di sangue. Nella microscopia elettronica tuttavia l'essiccamento, in conseguenza appunto dell'alto vuoto, è spinto ad un grado notevolmente superiore e le deformazioni dell'oggetto debbono essere considerate notevolmente maggiori. Inoltre si deve tener conto della circostanza che negli strisci di sangue le cellule, bene aderenti al vetro sottostante, non riducono fortemente il loro diametro durante il processo dell'essiccamento; gli oggetti invece preparati per l'osservazione

al microscopio elettronico, depositi su di una sottile membrana deformabile, durante l'essiccamento coartano, trascinando con sè per un certo tratto la membrana stessa (fig. 1) e determinandone spesso la rottura in corrispondenza dei loro margini. Di conseguenza è da ritenersi che la deformazione dell'oggetto e la modificazione delle sue dimensioni reali, sia qui molto considerevole.

E' quindi di un certo interesse il ricercare un procedimento che permetta di ridurre per quanto possibile questo fattore d'errore nell'osservazione al microscopio elettronico, e che permetta da un lato di determinare le dimensioni reali dell'oggetto osservato, e dall'altro di giudicare quale delle particolarità strutturali messe in evidenza siano realmente presenti nell'oggetto non disidratato, e quali invece siano artefatti consecutivi alla disidratazione stessa. A questo riguardo accenniamo all'immagine molto spesso mostrata da vari germi e costituita da una membrana staccata nettamente dalla massa opaca citoplasmatica centrale: è discutibile se tale spazio tra parte solida del citoplasma e membrana esista in realtà o se sia invece la conseguenza di un distacco del protoplasma dalla membrana cellulare e di una sua maggiore coartazione per effetto dell'essiccamento (fig. 2).

Tentativi di mettere a punto una tecnica che permettesse lo studio di queste alterazioni sono stati eseguiti da alcuni AA., tra i quali ricordiamo WOLF, KELLENBERG, KERN, BARNES e coll. (¹). Questi AA. hanno eseguito con diversi procedimenti e con materiale plastico diverso, repliche di superfici di tessuti e di batteri depositi su vetrini. Da queste repliche è stata successivamente allestita un'impronta sia con gel di silicio sia con film metallico ottenuti per evaporazione nel vuoto; impronta che è stata sottoposta all'osservazione al m. e.

Tali metodi presentano alcuni l'inconveniente di richiedere l'impiego di pressioni o temperature elevate, altri di dare uno scarso potere risolutivo, altri ancora di soffrire di limitazioni nel loro impiego.

Abbiamo voluto vedere se il metodo che abitualmente viene impiegato nel nostro Istituto per fare repliche di superfici metalliche, potesse venire utilizzato, con opportune modifiche, per ottenere repliche di oggetti organici non disidratati. Questo sistema consiste nel distendere sulla superficie da osservare uno strato sottile di una soluzione di nitrocellulosa (*) la quale, dopo evaporazione del solvente, dà una sottile

(¹) V. D. G. DRUMMOND - J. Micr. Soc. 70, 1, 1950.

(*) Tale soluzione, che ci è stata indicata dal prof. O. D'Agostino, che qui ringraziamo vivamente, è così composta: Soluzione 1% di nitrocellulosa in: Acetone 40%; Lattato di etile 30%; Acetato di metil-cellosolve 30%; Trifenilfosfato 0,01%.

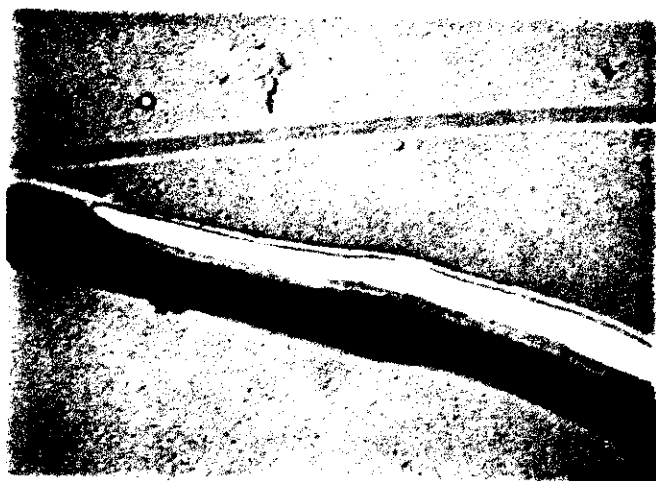


Fig. 1. - *L. bulgaricus* (18.000 $\times$). Rottura della membrana di nitrocellulosa per effetto della retrazione del corpo batterico.



Fig. 2. - *Kl. rhinoscleromatis* (18.000 $\times$). È ben visibile la zona di membrana appiattita che circonda la zona centrale.



Fig. 3. - *L. bulgaricus*. Il germe è in parte sovrapposto alla propria replica.

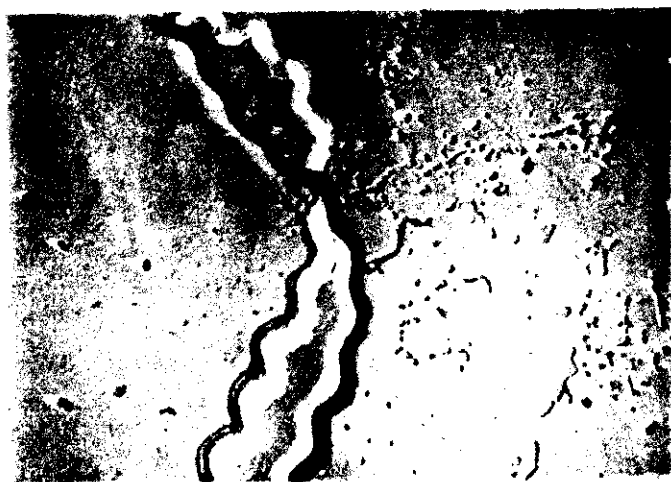


Fig. 4. - *L. ictero-haemorrhagiae* (18.000 $\times$) e propria replica.



Fig. 5. - *E. typhosa* (10.000 $\times$). Germi sovrapposti alle proprie repliche.

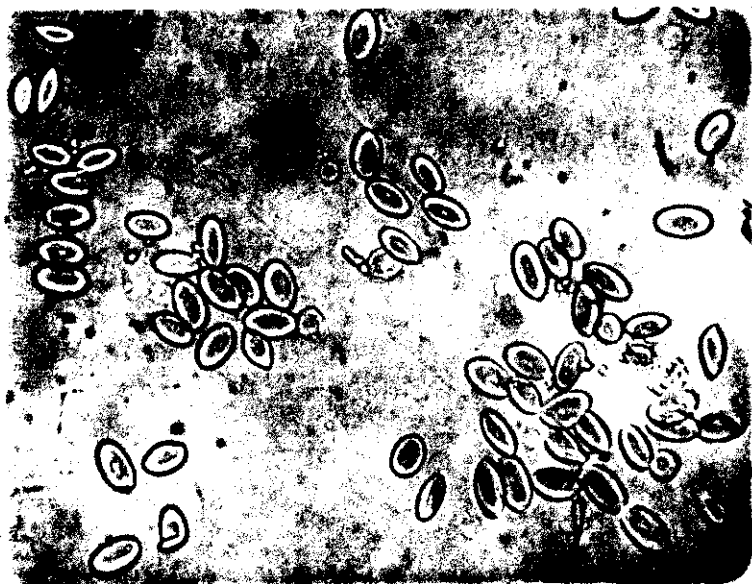


Fig. 6. - Emazie di lucertola (550 $\times$) fissate e sospese in acqua distillata.

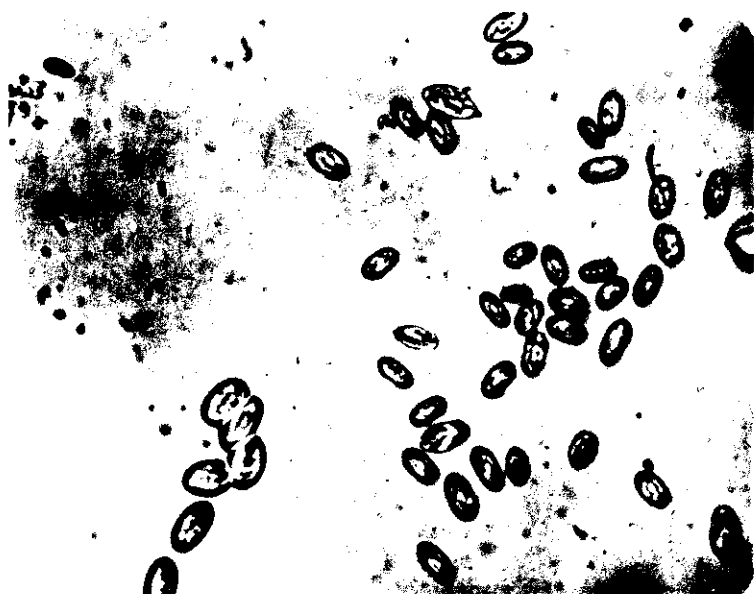


Fig. 7. - Emazie di lucertola (550) appena essiccate, su vetrino.

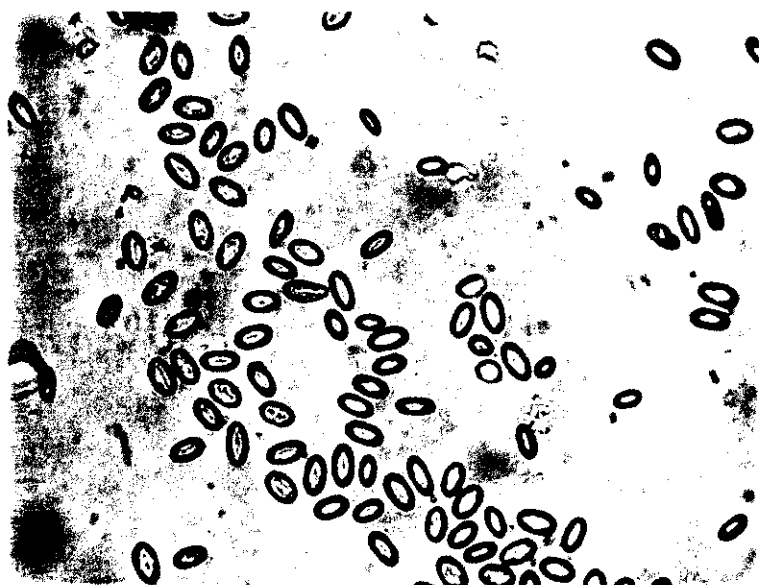


Fig. 8. - Emazie di lucertola (550) dopo essiccamento prolungato, su vetrino.

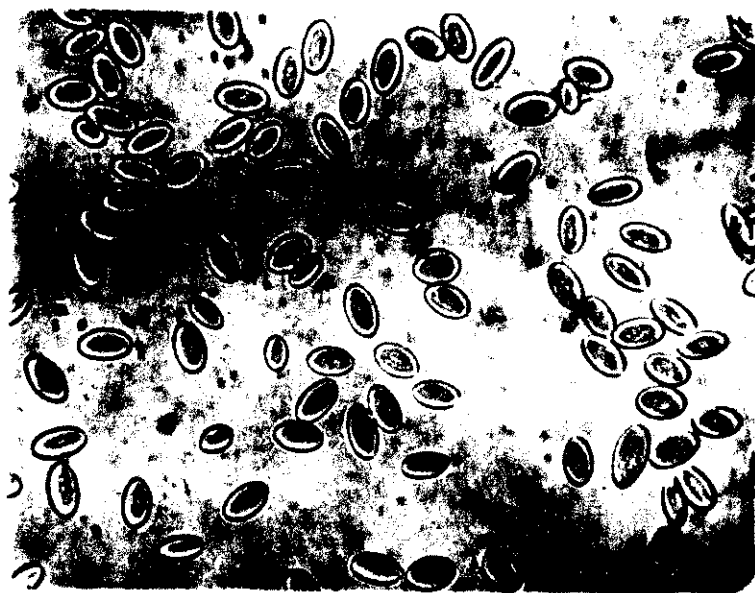


Fig. 9. - Emazie di lucertola (550 $\times$) previamente essiccate e successivamente messe a contatto con acqua distillata.

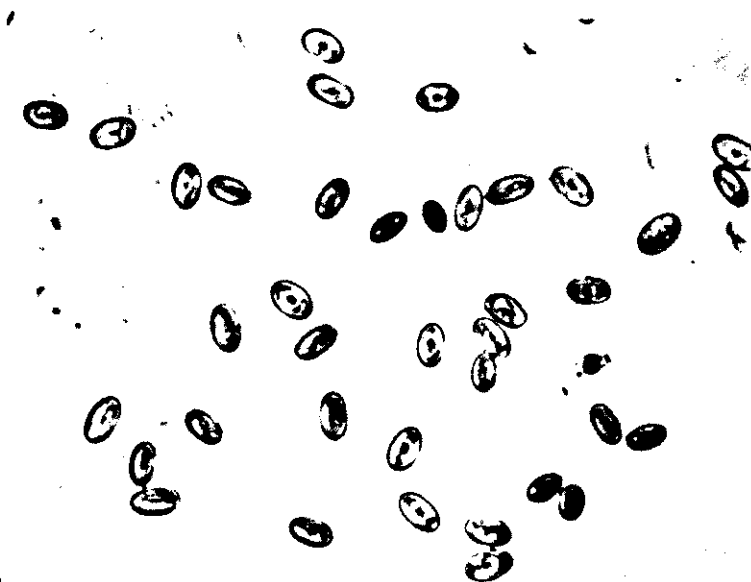


Fig. 10. - Emazie di lucertola (550 $\times$) previamente essiccate e poi ricoperte con la soluzione di nitrocellulosa.

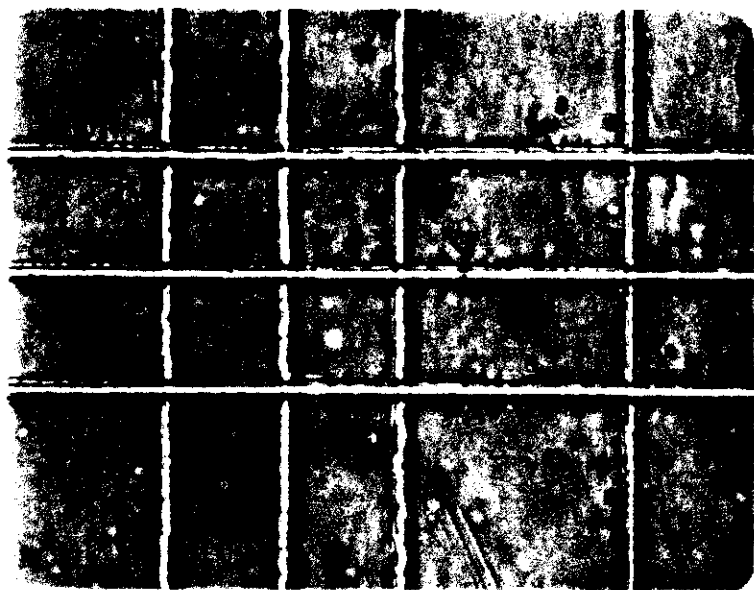


Fig. 11. - Reticolo di Thoma-Zeiss, immagine diretta (550 $\times$).

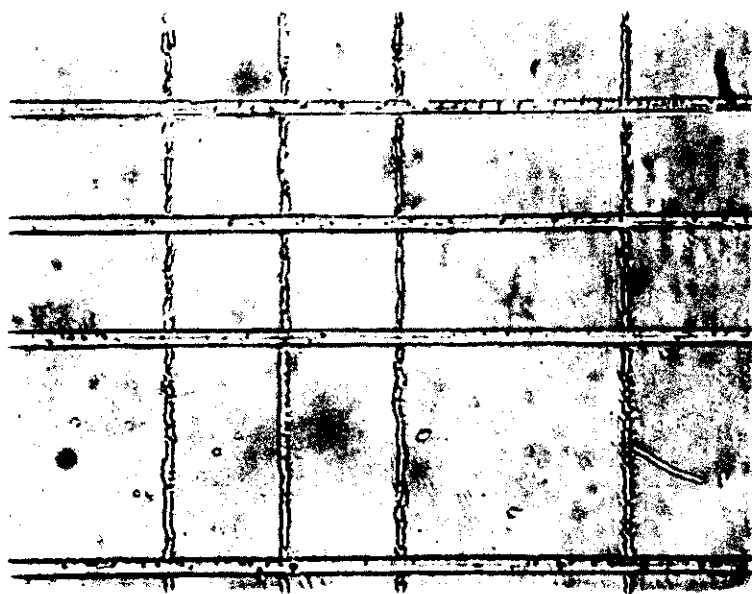


Fig. 12. - Replica della stessa regione del reticolo di Thoma-Zeiss rappresentata nella foto n. 11 (550 $\times$).



Fig. 13. - *C. burnetii* (18.000 $\times$), immagini dirette e repliche.



Fig. 14. - Fibra del collagene e relativa replica (18.000 $\times$).



Fig. 15. - *E. typhosa* (118.000 $\times$). Deformazione della replica per rottura centrale della membrana.



Fig. 16. - *E. typhosa* (10.000 $\times$). Germi giovani e repliche.



Fig. 17. - *Kl. rhinoscleromatis* (18.000 $\times$), Germi giovani e repliche.

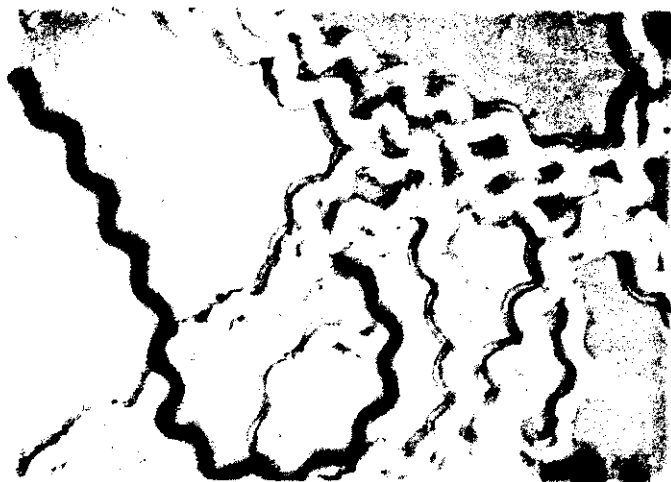


Fig. 18. - *L. ictero-haemorrhagiae* (18.000 $\times$), Germi e impronte.



Fig. 19. - *S. typhosa* (18.000). Coltura vecchia.



Fig. 20. - *S. typhosa* (18.000 $\times$). Coltura vecchia, forme diafane.

pellicola che si può distaccare dalla superficie e che, ombrata con cromo, viene osservata al m. e.

Prima di usare questo metodo per la replica di materiale biologico, era necessario stabilire se il solvente determinasse o meno alterazioni morfologiche dell'oggetto da trattare.

A questo scopo abbiamo sospeso nel solvente, batteri (*E. coli*), e leptospire sia non fissati che fissati con vapori di acido osmico. Dopo alcune ore la sospensione è stata centrifugata e i germi, ripetutamente lavati con acqua distillata, sono stati osservati al m. e. Abbiamo così constatato che in confronto ai controlli i germi non fissati presentavano alterazioni evidenti, mentre quelli fissati erano morfologicamente identici ai controlli. Tale prova eseguita con successo anche su di un germe oltremodo delicato quale la leptospira, ci dava affidamento che la nostra soluzione di cellulosa, che non è miscibile con l'acqua, non poteva danneggiare gli oggetti previamente fissati, che fossero da essa ricoperti.

La tecnica da noi usata per ottenere repliche di germi è la seguente: si prepara una sospensione in soluzione fisiologica dei germi in esame e si fissano con alcune gocce di acido osmico al 2%; si lava successivamente la sospensione con acqua distillata secondo la tecnica abituale; si depone una goccia di tale sospensione sulla superficie di un vetrino porta-oggetti accuratamente pulito; si attende che l'acqua della goccia sia completamente evaporata a temperatura ambiente. Non appena finita l'evaporazione s'immerge il vetrino nella soluzione di nitrocellulosa; il vetrino viene successivamente disposto in posizione pressochè verticale in modo che l'eccesso della soluzione defluisca verso il basso lasciando sul vetrino medesimo uno strato molto sottile. Questo, essiccato, costituisce un film di cellulosa che si distacca facilmente dal vetro per immersione in acqua distillata.

Con questo procedimento una parte dei germi rimane attaccata al vetrino, e sul film si può osservare la loro impronta; altri invece vengono portati via dal film medesimo.

In casi fortunati alcuni germi restano aderenti al film, ma dopo essersene distaccati in parte, comparendo così all'osservazione al m. e. vicino alla propria impronta (figg. 3, 4, 5). Per rendere facile il procedimento relativo al trasporto della pellicola sul porta oggetti del m. e. conviene; prima di distaccare la pellicola stessa dal vetrino, incidere la con una punta sottile delineando così tanti quadratini che, all'atto dell'immersione del vetrino nell'acqua si staccano da questo e fluttuano singolarmente sulla superficie. Prima dell'osservazione al m. e. la replica deve essere ombrata nel modo usuale.

Le immagini delle repliche che così si osservano al m. e. sono note-

volmente diverse e precisamente di dimensioni molto maggiori di quelle dei germi osservati al m. e. nel modo abituale. Per renderci conto delle ragioni che producono una diversità così evidente, occorre eseguire delle ricerche di controllo per stabilire il comportamento sia dei germi, sia della replica durante i trattamenti richiesti dalla esecuzione del metodo.

Una prima ipotesi poteva essere quella che al momento della esecuzione della replica i germi contenessero ancora una discreta quantità d'acqua e che quindi le dimensioni rivelate dalla replica fossero sensibilmente vicine a quelle del germe a fresco; l'altra invece che la pellicola di cellulosa a contatto dell'acqua si deformasse allargandosi maggiormente in corrispondenza dell'impronta dove la pellicola è più sottile: in tal caso l'immagine data dalla replica sarebbe necessariamente molto diversa da quella originale.

Per controllare queste ipotesi era necessario sperimentare su oggetti di dimensioni tali da poter essere agevolmente osservati e misurati al microscopio ottico. Siamo ricorsi perciò a una sospensione di emazie di lucertola fissate con acido osmico. Queste sono state osservate con il microscopio ottico su vetrino, sia a fresco (fig. 6), sia immediatamente dopo evaporazione dell'acqua (cioè nelle condizioni in cui vengono eseguite le repliche — fig. 7), sia dopo essiccamento prolungato (fig. 8). Abbiamo così constatato che in seguito all'essiccamento si ha una notevole retrazione dell'emazia (circa $1/4$ del diametro trasverso), retrazione che è maggiore quando l'essiccamento viene prolungato. Che tale retrazione sia dovuta alla perdita d'acqua è dimostrato dal fatto che ridando alle emazie essiccate dell'acqua, esse riprendono le dimensioni che avevano a fresco (fig. 9).

Se, subito dopo l'evaporazione, le emazie sono ricoperte dalla soluzione di nitrocellulosa che serve a costituire la replica, esse riprendono similmente le dimensioni originali (fig. 10). E' quindi da ritenersi che l'immagine data dalla replica sia quella che più si accosta all'immagine del soggetto a fresco.

Per controllare la seconda ipotesi occorre poter disporre di un oggetto non deformabile: a questo scopo abbiamo fatto delle repliche di un reticolo inciso su una cellula di Thoma-Zeiss, fotografando più repliche, fatte in tempi diversi, di una stessa regione del reticolo. Le figg. 11 e 12 mostrano rispettivamente l'originale — una di queste repliche. Dal confronto delle fotografie risulta che l'immagine della replica non ha in nessun modo dimensioni maggiori dell'originale.

Un'altra prova è stata eseguita utilizzando una sospensione di *Coxiella burnetii*, germe di dimensioni piuttosto uniformi e poco retrat-

tile per effetto dell'essiccamento. Come si vede dalla fig. 13 nella quale accanto a varie repliche si vedono molti elementi originali, le dimensioni delle impronte non differiscono sensibilmente da quelle delle Coxielle.

Lo stesso risultato abbiamo ottenuto da repliche di fibre collagene, elementi anche questi scarsamente deformabili. Nella fotografia 14 si può confrontare l'immagine delle fibre con quelle della replica relativa (*)

Concludiamo da queste prove che l'immagine della replica si accosta notevolmente all'immagine reale dell'oggetto non disidratato. In determinati casi però, specie nell'esecuzione di repliche di oggetti di dimensioni cospicue può accadere che la membrana della replica, resa troppo sottile in corrispondenza della parte più prominente dell'oggetto, si rompa; in questo caso l'immagine data dalla replica risulta evidentemente deformata (figg. 5, 15).

Dalle osservazioni fatte mediante il metodo sopra descritto su germi di vario tipo ci risulta quanto segue:

1) La retrazione del germe per effetto dell'essiccamento è considerevole, tale da modificare in maniera molto notevole le dimensioni del germe; essa però varia a seconda che il germe osservato sia tratto da colture di recente allestimento o da colture vecchie. Nel primo caso, quando il germe presenta una omogenea opacità ai raggi elettronici [I° stadio di RUSKA e PIEKARSKI ^(2, 3)] il germe sembra ridurre il suo diametro trasverso fino al 50% e oltre (figg. 3, 4, 16, 18); nel secondo caso quando il germe si presenta trasparente ai raggi elettronici e non ha un aspetto omogeneo (II° e III° stadio di RUSKA e PIEKARSKI) la riduzione è molto minore (figg. 19, 20).

Questo fatto si spiega verosimilmente ammettendo che nei germi giovani, nei quali la membrana racchiude una notevole quantità di sostanze proteiche, la coartazione dovuta all'essiccamento avviene attorno a questa massa centrale che si presenta al m. e. come una massa opaca; nei germi vecchi invece molto scarsi di protoplasma e ricchi di acqua, la membrana batterica si affloscia sul porta-oggetti senza essere sostenuta dalla massa protoplasmatica e di conseguenza la riduzione del diametro del germe è minore.

*) Ringraziamo il prof. Lelli che ci ha cortesemente dato il materiale dal quale è stata tratta la fotografia 14.

⁽²⁾ RUSKA M. - Arch. f. Virusforsch. 1942, 2, 343.

⁽³⁾ PIEKARSKI G. - Arch. f. Mikrobiol. 1937, 8, 428.

2) Il grado di retrazione delle diverse specie di microorganismi, anche a prescindere da quanto esposto più sopra, non è costante. Per es. in *Klebsiella rhinoscleromatic* (fig. 2), la retrazione è proporzionalmente minore che in *Salmonella typhosa*; è minima in *Coxiella burnetii* (fig. 13).

Si deve ritenere che ciò possa dipendere o da un diverso contenuto in acqua, o da una certa qual rigidità del corpo batterico.

3) Anche nelle repliche è spesso osservabile un alone depresso che circonda la parte rilevata del batterio che corrisponde al tratto di membrana, vuoto di protoplasma, che compare in modo molto evidente nelle fotografie di germi essiccati. Nelle repliche, questa zona è tuttavia più ristretta (fig. 17). E' molto probabile che essa sia da considerarsi come un artefatto dovuto a disidratazione; il fatto che essa compaia anche nelle repliche dimostra che anche queste non riproducono con assoluta fedeltà l'immagine del germe a fresco.

Interessante è la constatazione che nelle repliche delle leptospire l'immagine della membrana è molto evidente (figg. 4, 18).

4) Per quanto riguarda i flagelli (fig. 20) non si nota diversità di diametro tra le immagini originali essiccate e le repliche; si tratta evidentemente di deformazioni così sottili che la disidratazione non giuoca in maniera sensibile sulle loro dimensioni.

Dalle dimensioni dei flagelli si può valutare che il potere risolutivo di questo tipo di repliche raggiunge per lo meno i 100 μ .

5) Un vantaggio della tecnica delle repliche è quello di poter mettere in evidenza particolarità strutturali delle superficie di microorganismi molto opachi, tali da non rivelare alcuna struttura all'osservazione diretta al m. e.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di microbiologia e laboratorio di fisica.

