

Vengono ricostruite in questo volume le tappe principali dello sviluppo delle ricerche ultrastrutturali all'Istituto Superiore di Sanità: dal nucleo storico di ricercatori formatosi nel 1942 nei Laboratori di Fisica intorno al primo microscopio elettronico Siemens, alla costruzione del "Supermicroscopio ISS", alle ricerche pionieristiche svolte all'Istituto nei decenni successivi, fino alla creazione nel 1982 del Laboratorio di Ultrastrutture e al suo primo decennio di attività. La ricostruzione dei primi 50 anni di questa avvincente storia è stata possibile grazie alla ricca documentazione conservata nell'archivio personale dell'autore oltre che a quella presente sia nell'archivio fotografico che nell'inventario degli strumenti dell'Istituto.

I beni storico-scientifici dell'Istituto Superiore di Sanità rappresentano una collana di monografie basate su un'intensa attività di recupero, salvaguardia e valorizzazione del patrimonio di interesse storico e culturale che ha lo scopo di documentare le testimonianze sia materiali (strumenti scientifici, documenti, fotografie) che immateriali (interviste a ricercatori e tecnici, racconti orali), della storia dell'Istituto Superiore di Sanità e più in generale della sanità pubblica italiana.

### Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

Presidente: Enrico Garaci

Tel. +39-06 49901

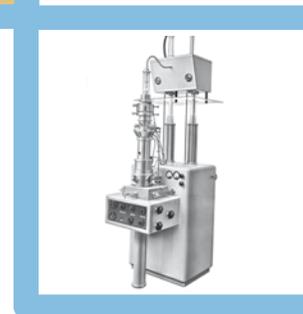
Fax +39-06 49387118

[www.iss.it](http://www.iss.it)



## La microscopia elettronica all'Istituto Superiore di Sanità dal 1942 al 1992: dai Laboratori di Fisica al Laboratorio di Ultrastrutture

Gianfranco Donelli



I beni storico-scientifici dell'Istituto Superiore di Sanità



**Istituto Superiore di Sanità**

**La microscopia elettronica  
all'Istituto Superiore di Sanità  
dal 1942 al 1992:  
dai Laboratori di Fisica  
al Laboratorio di Ultrastrutture**

**Gianfranco Donelli**

*Dipartimento di Tecnologie e Salute*

**I beni storico-scientifici  
dell'Istituto Superiore di Sanità**

Quaderno 4

Istituto Superiore di Sanità

*La microscopia elettronica all'Istituto Superiore di Sanità dal 1942 al 1992:  
dai Laboratori di Fisica al Laboratorio di Ultrastrutture.*

Gianfranco Donelli

2008, 217 p. (I beni storico-scientifici dell'Istituto Superiore di Sanità, 4)

Vengono ricostruite le tappe principali dello sviluppo delle ricerche ultrastrutturali all'Istituto Superiore di Sanità (ISS): dal nucleo storico di ricercatori formatosi nel 1942 nei Laboratori di Fisica intorno al primo microscopio elettronico Siemens, alla costruzione del "Supermicroscopio ISS", alle ricerche pionieristiche svolte all'Istituto nei decenni successivi, fino alla creazione nel 1982 del Laboratorio di Ultrastrutture e al suo primo decennio di attività. La ricostruzione dei primi 50 anni di questa avvincente storia è stata possibile grazie alla ricca documentazione conservata nell'archivio personale dell'autore oltre che a quella presente sia nell'archivio fotografico che nell'inventario degli strumenti dell'Istituto.

Istituto Superiore di Sanità

*Electronic microscopy at Istituto Superiore di Sanità (1942-1992):  
from Laboratori di Fisica to the Laboratorio di Ultrastrutture.*

Gianfranco Donelli

2008, 217 p. (I beni storico-scientifici dell'Istituto Superiore di Sanità, 4)

The main steps in the development of ultrastructural research at the Istituto Superiore di Sanità are reconstructed: from the historic core of scientists of the Physics Laboratories working around the first Siemens electron microscope in 1942, to the construction of the "Supermicroscope ISS" by them, to the pioneering researches conducted in the following decades, until the establishment in 1982 of the Laboratory of Ultrastructure and its first decade of activity. The reconstruction of the first 50 years of this exciting history was made possible thanks to the rich documentation preserved in the personal archive of the author as well as in the photographic archives and inventory of instruments available at the Istituto Superiore di Sanità.

**Comitato redazionale:** Enrico Alleva, Cecilia Bedetti (coordinatrice), Giorgio Bignami, Amilcare Carpi De Resmini, Paola De Castro, Gianfranco Donelli, Anna Farina, Sara Modigliani (Istituto Superiore di Sanità), Francesca Vannozzi (Centro per la tutela e la valorizzazione dell'antico patrimonio scientifico senese, Università di Siena).

**Redazione:** Giovanna Morini e Laura Radiciotti, Istituto Superiore di Sanità.

**Progetto grafico della copertina:** Giacomo Toth, Istituto Superiore di Sanità.

*Ringraziamenti*

Si desidera ringraziare Emilio Guaglianone per la fattiva collaborazione alle ricerche bibliografiche e iconografiche ed alla stesura finale del testo. Si ringraziano inoltre per la documentazione messa a disposizione negli anni i colleghi dell'Istituto Superiore di Sanità: Salvatore Caiazza, Giulio Grisanti, Luigi Paoletti e Fulvia Valente. Si rivolge infine un particolare ringraziamento per il prezioso contributo e le utili informazioni al Prof. Ugo Valdrè dell'Università di Bologna.

Le figure del volume sono tratte dall'archivio personale dell'autore, ad eccezione delle figure 2, 5, 10 e 13 provenienti dall'archivio fotografico dell'Istituto Superiore di Sanità, della figura 19c proveniente dall'inventario degli strumenti dell'Istituto e della figura 20a messa a disposizione da Giuseppe Arancia e Franco Tangucci.

*Copertina*

In copertina: in alto, il microscopio elettronico Siemens acquistato dall'Istituto Superiore di Sanità nel 1942; al centro, la lettera di requisizione dello stesso strumento da parte dell'esercito tedesco nel 1943; in basso, il "Supermicroscopio ISS" costruito in Istituto ed entrato in funzione nel 1946.

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dell'autore.

ISBN 978-88-900028-5-6

© Istituto Superiore di Sanità, 2008

V.le Regina Elena 299, 00161 Roma

## **INDICE**

<b>La microscopia elettronica all'Istituto Superiore di Sanità dal 1942 al 1992: dai Laboratori di Fisica al Laboratorio di Ultrastrutture .....</b>	<b>1</b>
<b>Appendice - Bibliografia analitica delle ricerche ultrastrutturali svolte all'Istituto Superiore di Sanità negli anni 1943-1992 .....</b>	<b>103</b>
<b>Inventario degli strumenti conservati .....</b>	<b>215</b>



## **LA MICROSCOPIA ELETTRONICA ALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ DAL 1942 AL 1992: DAI LABORATORI DI FISICA AL LABORATORIO DI ULTRASTRUTTURE**

La nascita della microscopia elettronica si fa risalire alla descrizione dettagliata, pubblicata nel 1932 sugli *Annalen der Physik*, degli esperimenti condotti da Max Knoll ed 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 (Knoll M, Ruska E, 1932). Dovranno passare tuttavia ben 54 anni prima che, nel 1986, venga assegnato al solo Ernst Ruska, due anni prima della sua scomparsa, il Premio Nobel per la Fisica *for his fundamental work in electron optics and for the design of the first electron microscope*. Il 1932 viene quindi considerato convenzionalmente l'anno d'invenzione del microscopio elettronico a trasmissione, anche se un primo prototipo a lenti elettrostatiche era stato costruito da Ernst Brüche nei laboratori della Allgemeine Elektrizitäts-Gesellschaft (AEG) di Berlino già nel 1931 e nello stesso anno era stato usato per la prima volta il termine di microscopio elettronico (Mulvey T, 1962). D'altronde, i diritti di brevetto per lo sfruttamento commerciale dell'invenzione risultano assegnati fin dal 28 maggio 1931 all'ing. Reinhold Rudenberg, Direttore di Ricerca della Siemens & Halske di Berlino. Tuttavia, il primo microscopio elettronico elettrostatico, in grado di dar luogo ad immagini diverse dal catodo, verrà realizzato solo nel 1939 da Hans Mahl dell'AEG.

Lo sviluppo del microscopio elettronico a scansione è ancora opera di Max Knoll che ne descrive i principi di funzionamento in un suo lavoro pubblicato nel 1935 su *Zeitschrift für Technische Physik* (Knoll M, 1935), anche se bisognerà attendere fino al 1965 quando la Cambridge Instrument Company inglese immetterà sul mercato il primo strumento commerciale. Questo microscopio fu il risultato di una serie di ricerche iniziate da Charles Oatley nel 1948 presso il

Cambridge University Engineering Department (CUED) e proseguite da Dennis McMullan e Kenneth Smith con la messa a punto di prototipi tra il 1951 ed il 1956 (Smith KCA, *et al.*, 2008).

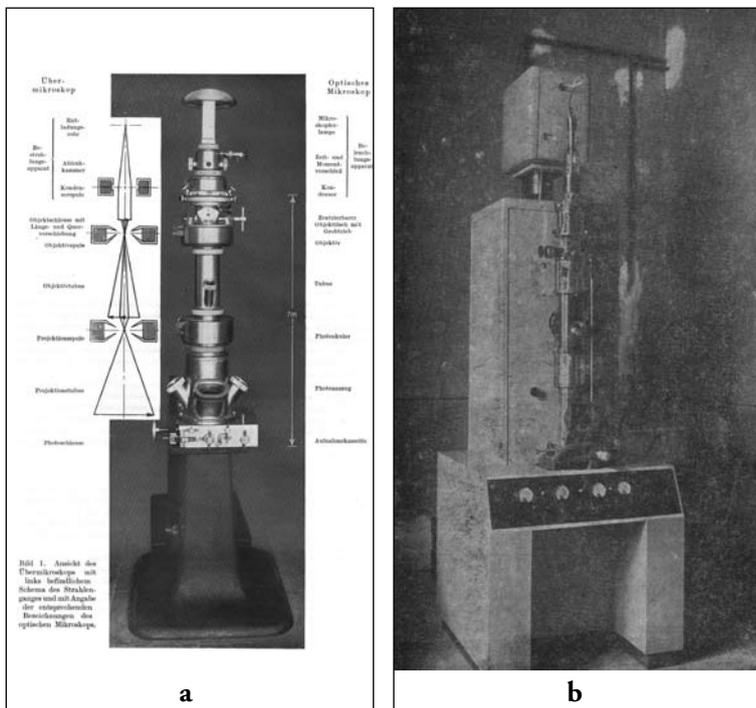
Sempre in Germania Manfred von Ardenne realizzò, nel 1938, un prototipo di microscopio elettronico a trasmissione e scansione costituito da due lenti elettrostatiche, con le bobine per la scansione poste tra queste, che permise di ottenere una micrografia a 8.000 X di un cristallo di ossido di zinco, con una risoluzione spaziale di 50-100 nm (von Ardenne M, 1938a; 1938b).

Nel decennio 1936-1946 diversi prototipi di microscopi elettronici a trasmissione verranno realizzati, oltre che in Germania, anche in Belgio, Canada, Cecoslovacchia, Francia, Giappone, Gran Bretagna, Jugoslavia, Inghilterra, Olanda, Stati Uniti, Svezia, Svizzera, Unione Sovietica e, come vedremo tra breve, in Italia stessa.

La prima costruzione in serie di microscopi elettronici iniziò comunque in Germania nel 1939 su progetto di Bodo von Borries (1905-1956) e Ernst Ruska da parte della Siemens (von Borries B, Ruska E, 1940), seguita nel 1940 dalla RCA (Radio Corporation of America) statunitense.

È tuttavia meno noto che anche in Italia un progetto per la realizzazione di un microscopio elettronico venne avviato fin dal 1939, anno in cui fu istituito, presso il Regio Istituto Sperimentale delle Comunicazioni-Sezione Poste Telegrafi e Telefoni (PTT) di Roma, per iniziativa dell'Ecc. Pession, nella duplice veste di Direttore Generale delle PTT e Presidente del Comitato per la radiotelegrafia e televisione, un reparto per lo studio e la realizzazione di apparecchiature elettroniche. Agli esperimenti preliminari iniziati nel 1940, con la collaborazione tecnica e il supporto finanziario della ditta "Ing. S. Barletta" di Milano, fece seguito la costruzione di uno strumento a lenti magnetiche le cui caratteristiche sono riportate dettagliatamente, insieme alla sua ripresa fotografica (Figura 1), in un articolo pubblicato dal protagonista della sua realizzazione, il Dr. Oliviero Fagioli, sul fascicolo del giugno 1943 della rivista *Poste e Telecomunicazioni* (Fagioli O, 1943).

Ed è proprio in quello stesso periodo che matura all'Istituto di sanità pubblica (solo dal 1941 assumerà la nuova denominazione di Istituto Superiore di Sanità, ISS) la decisione di acquistare un microscopio elettronico, come racconterà ai Soci dell'Associa-

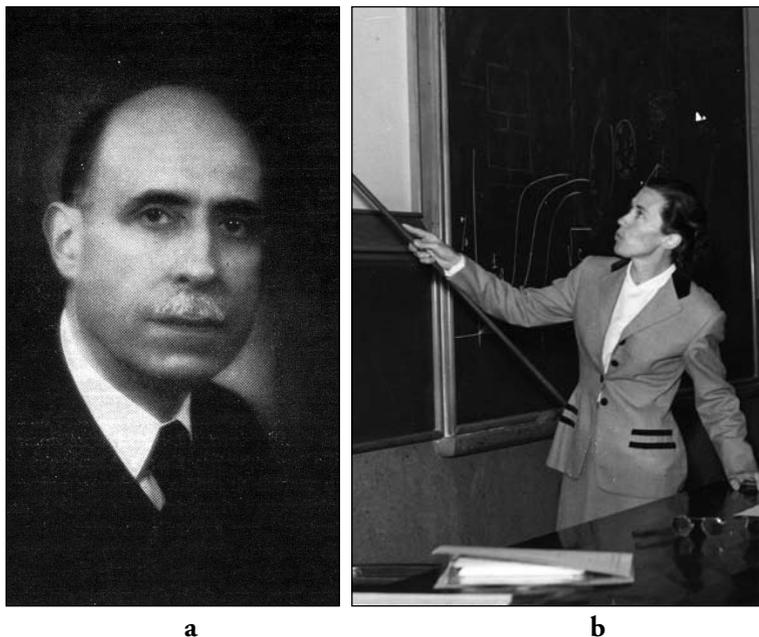


**Figura 1** - Prototipo di microscopio elettronico a lenti magnetiche sviluppato nel 1933 in Germania nei laboratori della Siemens su progetto di Max Knoll ed Ernst Ruska (a); prototipo di microscopio elettronico a lenti magnetiche realizzato in Italia tra il 1940 e il 1942 presso il Reparto per lo Studio e la Realizzazione di Apparecchiature Elettroniche del Regio Istituto Sperimentale delle Comunicazioni-Sezione Poste Telegrafi e Telefoni di Roma, in collaborazione con la ditta Barletta di Milano (b).

zione Elettrotecnica Italiana l'allora Capo dei Laboratori di Fisica dell'Istituto, il Prof. Giulio Cesare Trabacchi<sup>1</sup> (Figura 2), nella conferenza da lui tenuta in Istituto il 18 giugno 1947: "Il nostro

(1) Giulio Cesare Trabacchi (Roma 1884-1959). Laureatosi in fisica nel 1908 all'Università di Roma, continuò a frequentare l'Istituto Fisico prima come allievo interno e successivamente come assistente del Prof. Mario Corbino alla cattedra di Fisica complementare. Dal 1923 iniziò a collaborare con i fisici del gruppo di Fermi alle ricerche sulla radioattività artificiale, occupandosi tra l'altro della preparazione di sorgenti radon-berillio da impiegare nella produzione di neutroni. Chiamato nel 1935 alla direzione dei Laboratori di Fisica dell'appena inaugurato Istituto di sanità pubblica di Roma, continuerà la sua collaborazione con il gruppo dei fisici di via Panisperna impegnandosi fin dal 1938 nella costruzione presso l'Istituto di sanità pubblica di un acceleratore Cockcroft Walton per protoni e deutoni da 1 MeV, alla cui realizzazione parteciparono Edoardo Amaldi, Franco Rasetti e Daria Bocciarelli. Nella sua lunga carriera si dedicò con successo a importanti ricerche di elettrotecnica, tra le quali in particolare quelle sull'alimentazione dei tubi a raggi X per applicazioni in radiodiagnostica e in radioterapia, a ricerche di dosimetria ed alla messa a punto di apparecchiature per la microscopia elettronica.

Direttore Generale (il Prof. 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.”



**Figura 2** - Giulio Cesare Trabacchi (a); la sua assistente Daria Bocciarelli (b).

Nel 1939 infatti, come ella stessa mi racconterà verso la fine degli anni '60, l'allora giovane assistente Daria Bocciarelli<sup>2</sup> (Figura 2) si recò assieme al Prof. Trabacchi a Berlino presso la Siemens & Halske ove il microscopio elettronico venne loro illustrato dal Dr. Heinz

---

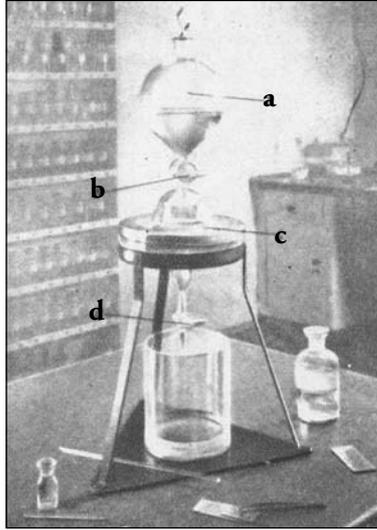
(2) Daria Bocciarelli (Parma 1910-Roma 2007). Laureatasi in Fisica nel 1931 all'Università di Firenze vi restò come assistente alla cattedra di Fisica Sperimentale fino al 1937 anno in cui, ottenuta l'abilitazione alla libera docenza in Fisica Sperimentale, divenne aiuto presso la stessa cattedra dell'Università di Perugia, ove ebbe l'incarico di Chimica Fisica. Nel novembre 1938 entrò come coadiutrice straordinaria nei Laboratori di Fisica dell'Istituto di sanità pubblica, nei quali svolse tutta la sua carriera occupandosi prevalentemente di microscopia elettronica, prima come assistente di Giulio Cesare Trabacchi e poi, dal 1958, quando i Laboratori di Fisica passarono sotto la direzione di Mario Ageno, come Vice-Capo dei Laboratori di Fisica e Capo del Reparto di Microscopia Elettronica fino al raggiungimento dei limiti di età nel 1975.

Otto Müller. 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 dovranno attendere fino al novembre 1942, quando l'apparecchio (serie UM100) verrà finalmente montato nei Laboratori di Fisica (Figura 3).

Daria Bocciarelli ne imparò il funzionamento in sei giorni, invece dei sei mesi previsti dai tedeschi ed in breve fu in grado di attivare importanti ricerche in collaborazione sia con ricercatori dell'Istituto che con professori universitari, dando così l'avvio alla ricerca ultrastrutturale in Italia. Per l'osservazione dei preparati occorreva allestire pellicole sottili di collodio che venivano ottenute mediante l'apposito dispositivo descritto in Figura 4.



**Figura 3** - Microscopio elettronico Siemens, serie UM100, acquistato dall'ISS e installato nei Laboratori di Fisica nel novembre 1942.



**Figura 4** - Dispositivo per la preparazione delle pellicole portaoggetti: a) pallone contenente una soluzione satura di acetato di amile in acqua; b) rubinetto di immissione della soluzione nella sottostante bacinella; c) bacinella contenente dischetti forati; d) rubinetto di scarico. Una goccia di collodio (vernice di Zapon) viene fatta cadere dall'apertura superiore del pallone sullo specchio liquido della soluzione; vuotando il pallone il sottilissimo velo di collodio formatosi sulla superficie della soluzione si depone sui dischetti forati formando la pellicola portaoggetti.

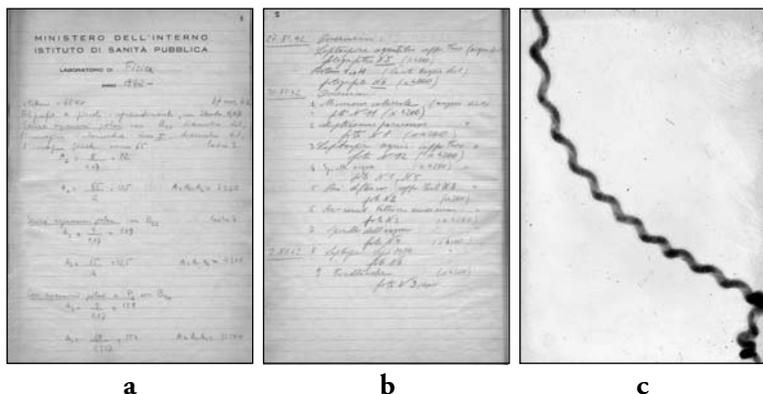
I primi studi, avviati in collaborazione con Brenno Babudieri<sup>3</sup> (Figura 5), allora brillante ricercatore dei Laboratori di Batteriologia dell'Istituto, riguardarono microrganismi di notevole rilevanza sanitaria, quali le spirochete della febbre ricorrente e le rickettsie del dermatifo o tifo petecchiale.

(3) Brenno Babudieri (Trieste 1907-1973). Si laureò in Medicina e Chirurgia con lode nel 1931 all'Università di Pavia con una tesi di laurea sui "Sarcosporidi e le sarcosporidiosi" che, pubblicata integralmente su *Archiv für Protistenkunde*, costituì per diversi anni un contributo fondamentale sull'argomento. Vinse nel 1933 il premio Lepetit del Consiglio Nazionale delle Ricerche e nello stesso anno il concorso per titoli ed esami ad assistente del Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto di sanità pubblica. Nel 1934 conseguì la libera docenza in parassitologia medica e nel 1938 quella in patologia generale. Nel 1936 istituì in Istituto un centro per lo studio e la diagnosi delle leptospirosi che otterrà nel 1956 la qualifica di "Reference Laboratory" dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) con l'incarico della preparazione dei sieri diagnostici standard, mentre il riconoscimento ufficiale del Centro da parte del Ministero della Sanità avverrà solo nel 1961. Di particolare rilievo sono i contributi di Babudieri alla preparazione, sperimentazione ed impiego in Italia, Spagna e molti altri Paesi di un vaccino contro le leptospirosi. Gli ultimi anni della sua carriera gli furono resi difficili da una malattia incurabile, di natura non definita, che lo privò della soddisfazione di ricevere la nomina ufficiale a Capo dei Laboratori di Batteriologia pur avendone ottenuto l'incarico fin dal 1966.



**Figura 5** - Brenno Babudieri.

I soggetti della prima micrografia elettronica, ottenuta nel nostro Istituto il 27 novembre del 1942, furono batteri appartenenti alla specie *Leptospira acquatilis* (Figura 6), come risulta dalle prime due pagine del quaderno di esperimenti nelle quali vennero preliminarmente annotati i parametri operativi dello strumento e quindi i campioni biologici osservati (Figura 6).



**Figura 6** - Le prime due pagine del quaderno di esperimenti dei Laboratori di Fisica dell'anno 1942 dedicato al microscopio elettronico (a, b). Sulla prima pagina (a) sono riportati i parametri operativi dello strumento, mentre sulla seconda pagina (b) sono indicati i campioni biologici osservati e fotografati; *Leptospira acquatilis* fu il soggetto della prima micrografia elettronica ottenuta in Istituto il 27 novembre 1942 (c).

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'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ad individuare nell'Istituto uno dei sei laboratori di riferimento per la leptospirosi a livello internazionale. Le osservazioni di Babudieri si estesero anche ad altri microrganismi, tra cui ceppi clinici di bacilli della difterite e di stafilococchi. 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 nei riguardi dell'ottica elettronica e delle sue potenzialità da parte dei fisici italiani. Basti ricordare la brillante ed esaustiva monografia sulle lenti elettroniche, pubblicata da Edoardo Amaldi sui *Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità* alla fine del 1943 (Amaldi E, 1943).

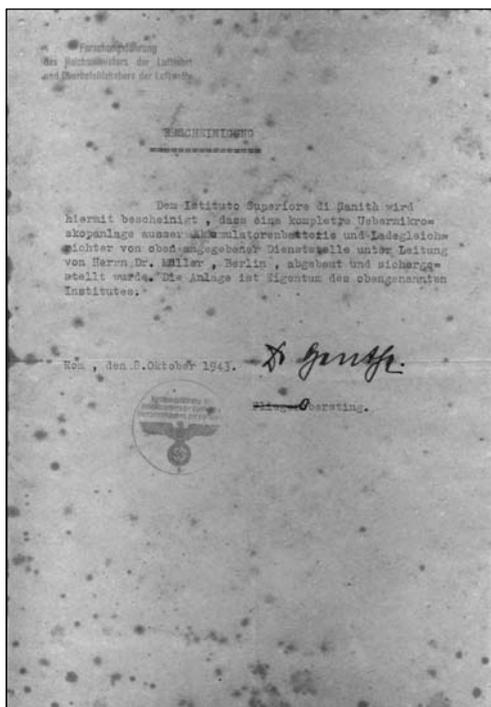
Il fascino del "supermicroscopio", come veniva allora chiamato comunemente, attrasse numerosi ricercatori delle università italiane, tra i quali Luigi Cavalli, che giunse da Pavia per dedicarsi allo studio della differente resistenza ai raggi X di *Bacterium coli* in relazione all'età delle cellule batteriche; e Giambattista Bietti, Direttore della Clinica Oculistica di Sassari, che chiese ospitalità all'Istituto per studiare la batteriolisi da lisozima lacrimale in cocchi Gram-negativi.

Questo fervore di attività e di collaborazioni, che vide il "supermicroscopio" lavorare ininterrottamente 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 Prof.ssa Bocciarelli con in tasca una lettera che non doveva 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. Müller, che non riuscì a nascondere il suo disagio, i fisici dell'Istituto chiesero tempo per lo smontaggio e l'imballaggio dello strumento. I pochi giorni concessi loro furono molto utili: essi 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.

Venne concordato con il Dr. Müller che, essendo stato fino ad allora versato solo il 25% dell'importo complessivo dovuto di un milione di lire, l'Istituto avrebbe trattenuto due espansioni polari di ricambio e alcuni accessori di limitato interesse tecnico-costruttivo.

Come ricordò ancora il Prof. Trabacchi nella succitata conferenza: "l'8 ottobre 1943, d'ordine del Comando Militare Germanico, il microscopio veniva ritirato (Figura 7) per essere "posto al sicuro" con la promessa di restituircelo dopo "l'immane 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 (Domenico Marotta, n.d.a) di costruirne un altro nella nostra officina".



**Figura 7** - *Originale della ricevuta rilasciata dal Comando Militare Germanico a seguito della requisizione del microscopio elettronico Siemens acquistato dall'ISS.*

L'apparecchio tuttavia non ritornò mai in fabbrica ma fece una brutta fine; infatti, secondo quanto io stesso venni a sapere dalla Dr.ssa Cilly Weichan durante una mia visita ai laboratori di ricerca della Siemens a Karlsruhe, ove mi recai a metà degli anni '70 insieme al collega Franco Tangucci, l'incalzare degli eventi bellici portò all'abbandono del microscopio in un deposito di una piccola stazione ferroviaria vicino al confine tedesco, poi completamente distrutta dai bombardamenti alleati.

Grazie ai rilievi tecnici, e soprattutto alla loro esperienza, il Prof. Trabacchi e la Prof.ssa Bocciarelli, superando enormi ostacoli dovuti principalmente alla difficoltà di reperimento dei materiali idonei, avviarono immediatamente la progettazione e la costruzione di uno strumento analogo a quello richiesto. L'impresa per quanto non facile poggiava tuttavia su solide basi. Va infatti ricordato che il Prof. Trabacchi, insieme con il Prof. Corbino, aveva per molto tempo lavorato con gli oscillografi a raggi catodici ed aveva intuito, quasi contemporaneamente ai ricercatori tedeschi Ruska e Knoll, che da un fascio elettronico si sarebbe potuta ottenere un'immagine. Va inoltre sottolineata la lunga esperienza di lavoro di Trabacchi nella progettazione e nella costruzione di impianti da vuoto, impianti per raggi X, amplificatori di impulsi, alternatori, ecc. Trabacchi aveva inoltre collaborato col gruppo di Fermi alle ben note esperienze sulla radioattività artificiale, mentre la Bocciarelli si era precedentemente occupata di raggi cosmici all'Università di Firenze, ove aveva discusso la sua tesi di laurea sulla radioattività del potassio.

In poche settimane fu quindi pronto il progetto esecutivo e fu dato immediato avvio alle operazioni di acquisizione delle apparecchiature e dei materiali occorrenti: da un piccolo apparecchio per raggi X, che con opportune modifiche diventerà la sorgente di alimentazione a tensione continua e costante di 100.000 V, ai lingotti di ferro da utilizzarsi per la costruzione del corpo dell'apparecchio. Per la realizzazione della cassetta fotografica, posta alla base dell'apparecchio, fu destinato il bronzo di un busto che i tempi mutati avevano relegato in un magazzino.

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 del montaggio dell'impianto da vuoto e dei quadri di comando a bassa ed alta tensione (Figura 8).

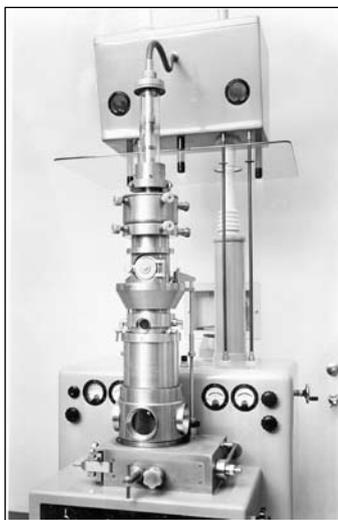
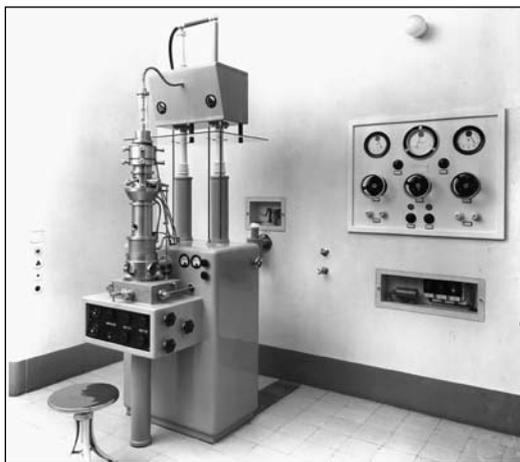


**Figura 8** - *I meccanici dei Laboratori di Fisica al lavoro in officina per la realizzazione dei componenti del microscopio elettronico che venne costruito all'ISS tra il 1943 e il 1946.*

Nel giugno 1944 era stata già realizzata circa metà dell'apparecchio, ma il suo completamento fu reso difficile dalle continue sospensioni giornaliere nell'erogazione dell'energia elettrica, dovute ai frequenti bombardamenti sulla zona in cui sorgeva l'Istituto, che costringevano ad interrompere ripetutamente il lavoro.

Era difficile all'epoca, come mi raccontò alla fine degli anni '60 Daria Bocciarelli, reperire i materiali necessari ed eseguire rapidamente alcune lavorazioni particolarmente complesse. Ad esempio, la preparazione delle leghe magnetiche con cui realizzare le espansioni polari delle lenti richiese molto tempo e gran parte dei materiali necessari furono ottenuti da loro amici che lavoravano presso industrie belliche italiane e che fornirono anche alcune delle attrezzature necessarie. Queste venivano gettate di notte al di là del muro di cinta dell'Istituto e immediatamente trasportate all'interno dei Laboratori di Fisica.

Il 9 luglio 1946, dopo circa due anni e mezzo di lavoro, iniziò la fase di collaudo del nuovo microscopio elettronico, chiamato ISS dalle iniziali dell'Istituto. Esso entrò in funzione nel novembre del '46, fornendo prestazioni migliori rispetto a quelle del microscopio Siemens e consentendo di ottenere micrografie elettroniche con una risoluzione di circa 10 nm (Figura 9).



**Figura 9** - Microscopio elettronico "ISS" costruito nell'Officina dei Laboratori di Fisica dell'Istituto, collaudato nel luglio 1946 ed entrato in funzione nel novembre dello stesso anno.

Iniziò subito un intenso periodo di collaborazioni dei fisici dell'Istituto sia con i ricercatori operanti nei vari laboratori che con altri studiosi italiani, riprendendo gli studi morfologici sui microrganismi e avviando osservazioni su preparati biologici di diversa natura. Risalgono infatti al 1946 i primi studi sull'ultrastruttura del vitreo di Benedetto Strampelli e Arrigo Posarelli, che continueranno a collaborare con l'Istituto fino al 1956.

Sempre in quegli anni ricordiamo l'incessante ed entusiastica attività di Franco Scanga, dei Laboratori di Microbiologia, che riprese le sue ricerche con il nuovo ultramicroscopio all'inizio del '47 studiando con Giuseppe Penso (Figura 10) il meccanismo d'azione su *Escherichia coli* della streptomicina, della penicillina e di alcuni disinfettanti.



**Figura 10** - Giuseppe Penso durante un suo intervento al Convegno di Microbiologia degli Alimenti tenutosi in Istituto nel 1963.

Comunque, anche se le competenze tecnico-scientifiche dell'ISS in materia di microscopia elettronica erano le più sviluppate tra quelle esistenti nel nostro Paese, in diverse Università italiane esistevano docenti e ricercatori pienamente consapevoli degli sviluppi e delle prospettive aperte dagli studi di Knoll e Ruska e dalla successiva costruzione in Germania dei primi microscopi elettronici; tra questi il fisico Giorgio Valle che già nell'aprile 1933 aveva tenuto una conferenza presso la sezione di Torino dell'Associazione Elettrotecnica

Italiana dal titolo “Il microscopio elettronico” in cui aveva esposto i fondamenti teorici ed illustrato le caratteristiche e le prestazioni del microscopio elettronico magnetico di Knoll e Ruska. E sarà proprio lo stesso Valle che, chiamato nel 1947 a ricoprire la cattedra di Fisica Sperimentale e ad assumere la direzione dell'Istituto di Fisica dell'Università di Bologna, si farà promotore dell'istituzione di un Centro di Microscopia Elettronica. Dal verbale della seduta della Facoltà di Scienze del 4 ottobre 1947 risulta infatti che l'allora Preside Prof. Giovanni Battista Bonino portò avanti l'iniziativa di Valle, proponendo ai colleghi la costituzione di un Consorzio Emiliano per il Microscopio Elettronico (CEME). Poco dopo, il 18 ottobre 1947, si formò un Comitato che tracciò una bozza di statuto del Consorzio ed avviò una campagna per la raccolta dei fondi necessari. Il Consorzio, appoggiato dal Rettore Edoardo Volterra, poté ben presto contare su un finanziamento iniziale di ben 8 milioni di lire erogato dal Ministero dell'Istruzione e su altri 2 milioni circa provenienti da vari enti sostenitori, quali la stessa Università di Bologna, l'Università di Parma (da cui proveniva Valle), la Lega dei Comuni della Provincia di Ravenna, la Camera di Commercio e il Rotary Club di Bologna.

Il 5 gennaio 1948 il Provveditore alle Opere Pubbliche confermeva ufficialmente l'assegnazione di un finanziamento di 10 milioni di lire per realizzare i locali del Laboratorio Universitario per il Microscopio Elettronico Bolognese (LUMEB).

L'acquisto del microscopio fu preceduto da un'indagine sulle caratteristiche delle apparecchiature presenti sul mercato che non comprendevano microscopi di fabbricazione tedesca, in quanto la Germania non ne aveva ancora ripreso la produzione dopo la fine della seconda guerra mondiale.

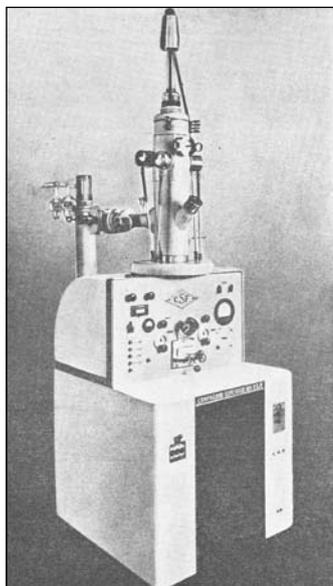
Va comunque qui ricordato come gli scienziati tedeschi, che con i loro studi avevano reso possibile la realizzazione dei primi microscopi elettronici, avessero continuato a svolgere un'intensa attività di ricerca: Ernst Ruska a Berlino presso i laboratori della Siemens, Ernst Brücke a Mosbach/Baden presso i Süddeutsche Laboratorien associati all'AEG e Bodo von Borries a Düsseldorf presso la Gesellschaft für Übermikroskopie da lui stesso promossa. E il crescente interesse di fisici e ingegneri coinvolti nel settore spingerà Bodo von Borries a organizzare a Düsseldorf il 16 febbraio 1949 un incontro

per la fondazione della prima società tedesca di microscopia elettronica, la Deutsche Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, che terrà il suo primo convegno a Mosbach il 23 e 24 aprile del 1949. La presidenza della Società andò a Ernst Ruska, la vice-presidenza a Hans Mahl e la segreteria a Bodo von Borries, affiancati nel comitato esecutivo da Fritz Jung, Walter Kikuth e Otto Scherzer.

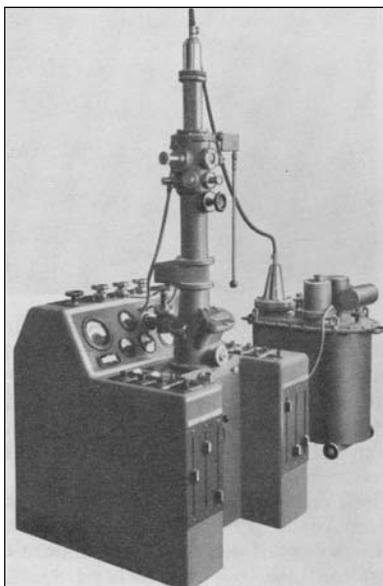
Tornando ora alla scelta che il CEME doveva fare, i microscopi presi in considerazione furono quindi quelli della RCA statunitense, della francese CSF (Compagnie Générale de Telegraphie Sans Fils), e della svizzera Trüb, Täuber & Co (Figura 11). Il microscopio dell'RCA usava lenti magnetiche, il Trüb Täuber aveva l'obiettivo magnetico e la seconda lente proiettore elettrostatica, mentre quello della CSF era uno strumento a lenti elettrostatiche con una tensione massima di lavoro di 60 kV ed un potere risolutivo di 15 nm.

In una ricostruzione storica dei primi passi della microscopia elettronica all'Università di Bologna, che Ugo Valdrè mi fece generosamente pervenire in bozza nei primi anni ottanta (Valdrè U, 1984) come suo personale contributo ad una mia storia della microscopia elettronica in Italia che, sollecitato da colleghi inglesi, stavo tentando allora di redigere, viene anche ricordato che per la scelta del microscopio fu chiesto il parere del Prof. Trabacchi, all'epoca da tutti considerato la persona più competente del settore. Egli, in una lettera datata 30 aprile 1948, nello sconsigliare nettamente l'acquisto dello strumento della CSF e nel definire ugualmente buoni gli altri due strumenti, comunicava inoltre che la SAR (Società Anonima Radiofono) di Roma poteva costruire strumenti analoghi a quello realizzato dall'ISS, ma che ciò avrebbe richiesto tempo, pur assicurando la sua piena disponibilità a collaborare alla realizzazione di microscopi elettronici di fabbricazione interamente italiana.

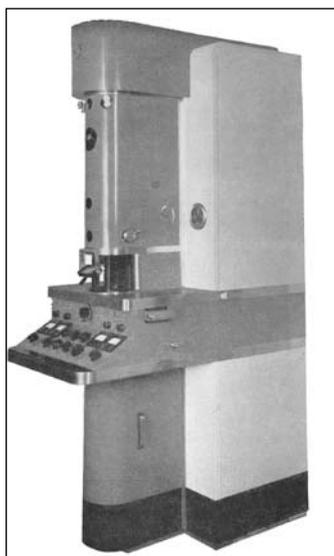
Tuttavia il CEME, nonostante il parere sfavorevole di Trabacchi, dopo aver esaminato le offerte delle varie ditte decise di acquistare proprio lo strumento francese, il cui costo di lire 8.750.000 era di gran lunga inferiore agli 11.600.000 del microscopio RCA, ai 15.400.000 del Trüb Täuber ed ai 16.000.000 richiesti dalla SAR; tale scelta venne motivata anche dalla possibilità di impegnare i residui fondi disponibili per dotarsi della strumentazione necessaria per la preparazione dei campioni. L'ordine di acquisto venne fatto nell'agosto 1948 e nell'ottobre dello stesso anno ebbe luogo a Pari-



a



b



c

**Figura 11** - Modelli di microscopi elettronici prodotti dalla CSF francese (a), dalla Trüb, Täuber & Co svizzera (b) e dalla RCA americana (c) disponibili alla fine degli anni '40.

gi, alla presenza di Valle, il collaudo preventivo in fabbrica. Lo strumento fu montato e collaudato a Bologna nel gennaio successivo e il 10 aprile 1949 Valle ne annunciò ufficialmente alla radio l'entrata in funzione presso il LUMEB.

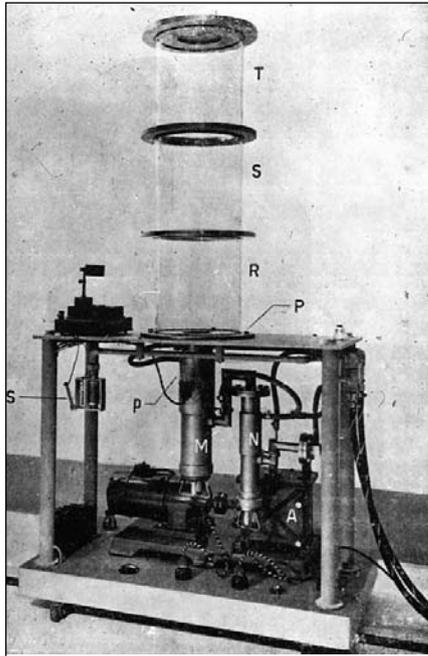
Questa decisione ebbe, come sottolinea ancora Valdrè, conseguenze assai negative, da un lato perché lo strumento non si rivelò affidabile e competitivo e dall'altro perché azzerò di fatto la possibilità, in un momento particolarmente favorevole, di vedere l'Italia inserirsi nella produzione di microscopi elettronici.

Il LUMEB nei primi anni svolse essenzialmente la funzione di servizio gratuito a terzi, dimostrando la disponibilità dei fisici a collaborare con i colleghi di altre discipline. Tuttavia la sua attività si limitò nella maggior parte dei casi ad appagare richieste di osservazione di oggetti e dettagli oltre il limite risolutivo del microscopio ottico. I campioni osservati erano soprattutto di tipo particolare, quali polveri, fumi, fibre, elementi figurati del sangue, ecc., ma si cominciò anche ad applicare la tecnica delle repliche per esaminare la superficie di metalli, leghe e superfici dentarie.

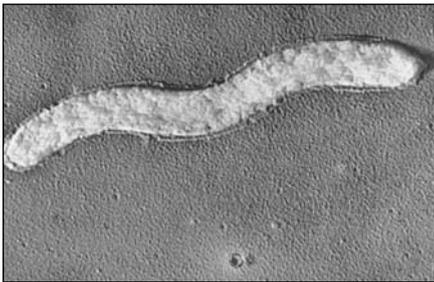
Dopo la morte di Valle, avvenuta il 12 dicembre 1953, il fisico teorico Giampietro Puppi, assunta la direzione dell'Istituto di Fisica dell'Università di Bologna proporrà all'allora studente Ugo Valdrè di dedicarsi al microscopio elettronico con l'intesa che dopo la laurea sarebbe stato il suo impegno prioritario: e così sarà ininterrottamente a partire dall'aprile 1954 ad oggi. Nel novembre di quello stesso anno Valdrè, ormai laureato, verrà a Roma in visita ai Laboratori di Fisica dell'ISS, dove avrà da Trabacchi consigli ed un aiuto concreto: la promessa, ben presto mantenuta, di inviargli un cannone elettronico da lui stesso realizzato, da sostituire a quello del CSF che non permetteva di ottenere un buon allineamento delle lenti.

Tornando alle vicende dei Laboratori di Fisica dell'ISS, verso la fine degli anni '40 va ricordata, sul piano dell'avanzamento metodologico, la progettazione da parte di Trabacchi e della Bocciarelli di un apparecchio, per l'evaporazione metallica sottovuoto, la cui realizzazione, nel 1947, consentì l'applicazione della tecnica delle ombre alla definizione morfologica di alcune specie batteriche (Figura 12) e la messa a punto, a cura di Brenno Badier, di nuovi procedimenti per la fissazione e l'osservazione

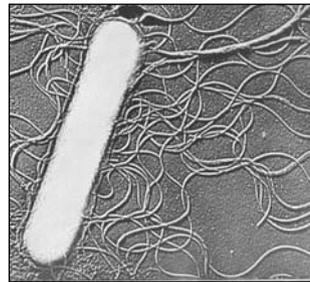
al microscopio elettronico di preparati batterici. Tali progressi vennero illustrati dallo stesso Babudieri in un articolo pubblicato nel 1948 su *Scienza e Lavoro*, rivista divulgativa all'epoca di grande diffusione.



a



b



c

**Figura 12** - a) *Apparecchio per l'evaporazione metallica sottovuoto, realizzato nel 1948 dal Prof. Trabacchi e dalla Prof.ssa Bocciarelli, che consentì l'applicazione della tecnica delle ombre alla definizione morfologica di diverse specie batteriche: b) vibrione del colera, con il caratteristico ciglio polare; c) clostridium tetani, con numerose ciglia evidenti lungo tutto il perimetro del corpo batterico.*

Tra il 1948 ed il 1958, proseguirono gli studi di Babudieri sull'ultrastruttura delle leptospire e sulle alterazioni morfologiche indotte da alcuni antibiotici e disinfettanti sui microrganismi; Franco Scanga condusse importanti ricerche sulla batteriolisi da penicillina e sui componenti della cellula batterica; e Italo Archetti<sup>4</sup> (Figura 13) svolse indagini ultrastrutturali sul virus della malattia di Newcastle del pollo e sui ceppi di virus influenzali isolati a Roma nel corso di un'ondata epidemica verificatasi nel 1952.



**Figura 13** - *Italo Archetti.*

---

(<sup>4</sup>) Italo Archetti (Peschiera Maraglio (BS) 1913-Roma 1998). Laureatosi in medicina all'Università di Pavia nel 1937, dopo la laurea si recò ad Amburgo dove frequentò, a partire dal 1938, i laboratori della Scuola di Medicina Tropicale. Tornato in Italia, frequentò per un breve periodo l'Istituto di Zoologia dell'Università di Roma, prima di entrare a far parte, nel 1942, dei Laboratori di Microbiologia dell'ISS. Negli anni successivi si recò a specializzarsi in prestigiose istituzioni straniere: nel 1948 presso i Laboratori di Virologia dell'Istituto Pasteur di Parigi; nel biennio 1949-1950 presso quelli del Rockefeller Institute for Medical Research di New York. Nel 1949 conseguì la libera docenza in Parassitologia e dal 1952 entrò a far parte del Panel di Esperti in Virologia dell'OMS. Nel 1954-1955, trascorse un periodo di ricerca presso i laboratori londinesi del National Institute for Medical Research e dal 1956 al 1958, fu Associate Professor of Pediatrics nell'Università di Kansas City. La sua attività scientifica, incentrata principalmente sullo studio dei virus dell'influenza e della poliomielite e sulla standardizzazione e il controllo dei rispettivi vaccini, lo portò a creare i presupposti per la istituzione, nel 1976, di 3 reparti di virologia nell'ambito del nuovo Laboratorio di Malattie Batteriche e Virali che guiderà fino al 1978, quando si ritirerà per raggiunti limiti di età.

Sempre dei primi anni '50 sono gli studi di Franco Graziosi, Carlo Castagnoli e Giuseppe Russo sul batteriofago BM attivo su un ceppo di *Bacillus megatherium*; di Rodolfo Negri sull'azione del sulforafene (un antibiotico estratto dai semi di rafano) a livello della divisione cellulare di *Vibrio cholerae*; di Giuseppe Penso, Vittorio Ortali, Gina Castelnuovo, Mario Princivalle, Aldo Gaudiano, Luciano Vella ed Alfredo Zampieri su un nuovo bacillo tubercolare, il *Mycobacterium minettii* e sui fagi dei micobatteri; di Leonida Ravaioli sulla sensibilità alla cloromicetina dell'*Actinobacillus lignieresii*, l'agente responsabile dell'actinobacillosi bovina; ed ancora le ricerche di Franco Scanga e Giuseppe Penso sulle modalità di duplicazione di *Pasteurella pestis* e sul meccanismo d'azione *in vitro* dell'aureomicina e dell'eritromicina su ceppi di Salmonella e Brucella.

Ancora della prima metà degli anni '50 sono gli studi di Leonardo Tentori e Girolamo Vivaldi dei Laboratori di Biologia dell'ISS sui leucociti umani.

Tra le ricerche svolte in collaborazione con studiosi provenienti da diverse Università italiane, ricordiamo in questo periodo quelle di Massimo Aloisi sull'actina muscolare e di Giovanni Lelli ed Ugo Marotta sull'ultrastruttura delle fibrille collagene e sulle malattie del collagene, pubblicate sui *Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità* tra il 1952 e il 1955; quelle di Vittorio Casorati sull'epitelio di corde vocali di cavia ed ancora le ricerche pionieristiche di Silvio Ranzi sulle proteine filamentose del citoplasma cellulare, che oggi chiameremmo citoscheletriche.

Continue furono in quegli anni le visite, da parte di studiosi italiani e stranieri (Figura 14) al "Supermicroscopio ISS" le cui ricerche suscitavano crescente interesse anche sulla stampa internazionale.



**Figura 14** - Gruppi di studiosi in visita al "Supermicroscopio ISS", le cui prestazioni venivano illustrate dalla Prof.ssa Daria Bocciarelli (nelle foto, in camice bianco).

Si può citare ad esempio l'editoriale dal titolo *Research in Rome*, pubblicato sul fascicolo del 6 marzo 1954 del *Journal of American Medical Association*, che evidenzia la risonanza internazionale delle ricerche ultrastrutturali condotte presso l'Istituto, ed in particolare di quelle svolte da Giuseppe Penso sulle fasi di invasione batterica dei batteriofagi (Figura 15).



**Figura 15** - Prima pagina dell'editoriale dal titolo *Research in Rome*, pubblicato sul fascicolo del 6 marzo 1954 del *Journal of American Medical Association*, che evidenzia la risonanza internazionale delle ricerche ultrastrutturali sulle fasi di invasione batterica dei batteriofagi, effettuate da Giuseppe Penso, Direttore dei Laboratori di Batteriologia, con il "Supermicroscopio ISS".

In sede internazionale, dopo i primi congressi di Delft nel 1949 e di Parigi nel 1950 (Figura 16), organizzati tramite accordi diretti tra microscopisti europei, ebbe luogo a Londra nel 1954



il primo congresso organizzato dalla neonata Joint Commission for the Microscopy, che nel 1955 assumerà la denominazione di International Federation of Societies for Electron Microscopy (IFSEM).

La partecipazione italiana a questi primi congressi internazionali di microscopia elettronica fu pressoché inesistente; non venne infatti presentata alcuna comunicazione né a Delft nel 1949, né a Londra nel 1954 ed una sola nel 1950 a Parigi, da parte di Giovanni Lelli e Ugo Marotta, dal titolo “Contribution à l'étude de l'ultrastrutture des fibrilles collagènes au microscope électronique”.

D'altronde in questi anni, oltre a quelli dell'ISS e dell'Università di Bologna, non risultano operativi in Italia altri microscopi elettronici, né nelle strutture di ricerca pubbliche né in quelle private.

Va tuttavia ricordato che nel 1951, tramite il Piano Marshall (ufficialmente European Recovery Program-ERP) per la ricostruzione dell'Europa dopo la seconda guerra mondiale, arrivarono in Italia tre microscopi elettronici, che vennero così assegnati: un microscopio elettronico Philips al Prof. Gino Bozza dell'Istituto di Fisica Tecnica del Politecnico di Milano; uno al Prof. Francesco Giordani dell'Istituto Chimico dell'Università di Napoli ed un microscopio RCA al Prof. Vincenzo Caglioti dell'Istituto Chimico dell'Università di Roma. I direttori degli istituti assegnatari presentarono, assieme ai colleghi dell'Università di Bologna, una richiesta congiunta al Ministero della Pubblica Istruzione al fine di ottenere stanziamenti *ad hoc* da utilizzare sia per il funzionamento che, soprattutto, per le retribuzioni del personale da adibire agli istituendi Centri di microscopia elettronica. Ma i finanziamenti ministeriali furono assai limitati e tardivi e, fatta eccezione per il Laboratorio dell'Università di Bologna, assai poco si conosce circa l'attività e la produttività scientifica degli altri. Per quanto riguarda il microscopio elettronico RCA assegnato all'Università di Roma, dopo qualche tempo il Prof. Vincenzo Caglioti, viste le difficoltà di utilizzo e ben conoscendo la notevole esperienza maturata dai fisici dell'ISS, decise di concedere loro in uso lo strumento, come mi ha confermato recentemente il Prof. Giorgio Cortellessa. Tuttavia, questo non risultò in grado di fornire prestazioni comparabili a quelle ottenibili con

il microscopio ISS e, dopo ripetuti tentativi di impiego condotti sia da Daria Bocciarelli che da Mario Ageno<sup>5</sup> (Figura 17), fu relegato ben presto in un angolo dei Laboratori di Fisica.



**Figura 17** - Mario Ageno al lavoro con il microscopio elettronico RCA modello EMU.

---

(5) Mario Ageno (Livorno 1915-Roma 1992). Di famiglia genovese, si iscrisse al corso di laurea in Fisica presso l'Università di Genova, ma superato il biennio, si trasferì nel 1934 a Roma attirato dai primi esperimenti sul rallentamento dei neutroni che il gruppo di fisici di via Panisperna aveva appena concluso. Completati i suoi studi a Roma e laureatosi con Fermi, gli fu offerto un posto di assistente incaricato che lo portò a collaborare, soprattutto con Amaldi, a ricerche di fisica nucleare; ma durante l'assolvimento degli obblighi di leva fu mobilitato e inviato in Africa, da cui ritornerà per gravi motivi di salute che lo affliggeranno per tutto il resto della sua vita, riprendendo la sua attività di ricerca all'Università di Roma. Nel 1949, rinunciando al posto di professore straordinario di Fisica Superiore all'Università di Cagliari, vinse un concorso per assistente dei Laboratori di Fisica dell'ISS di cui assumerà la direzione nel 1958. Sotto la sua guida, i Laboratori di Fisica ottennero importanti risultati sia nella ricerca che in innovative applicazioni tecnologiche in vari ambiti della fisica: dalla struttura della materia alla biofisica, dalla fisica nucleare alla fisica sanitaria. Nel 1969 lasciò l'ISS per l'Università di Roma, ove si dedicò a pieno tempo alla biofisica, di cui è stato da molti riconosciuto il fondatore in Italia, e del cui corso universitario divenne titolare. Fu socio nazionale dell'Accademia dei Lincei e gli fu conferita dall'Università dell'Aquila la laurea *honoris causa* in Scienze Biologiche.

Di quel periodo mi sembra interessante riportare una sintesi delle ricerche svolte dal Prof. Antonio Ascenzi, illustre anatomo patologo dell'Università di Roma "La Sapienza", che aveva iniziato a collaborare con il laboratorio di microscopia elettronica dell'ISS fin dal 1948, dando l'avvio a fondamentali ricerche ultrastrutturali sul tessuto osseo. In quegli anni, bisognava ingegnarsi a frammentare il materiale da esaminare con i mezzi più vari, partendo dal tessuto allo stato nativo o da componenti di tessuto osseo separati in precedenza; in particolare, si utilizzava la componente minerale, isolata mediante la metodica di Gabriel, quindi polverizzata e sospesa in acqua bidistillata. Una goccia della sospensione veniva quindi adagiata su una griglia ricoperta da una membrana di formvar e, dopo essiccamento, il preparato veniva metallizzato prima di essere osservato al microscopio elettronico. Malgrado gli artefatti derivanti dalle modalità di allestimento del materiale ed il limitato potere risolutivo del microscopio, fu comunque possibile realizzare una serie di osservazioni sull'ultrastruttura dell'osso fetale umano che portarono all'acquisizione di importanti dati concernenti soprattutto le fibrille collagene, la sostanza fondamentale interfibrillare e i rapporti intercorrenti tra matrice organica e componente inorganica. I risultati di queste ricerche furono oggetto di una relazione al IV Congresso della Società Italiana di Patologia, tenutosi a Palermo nel maggio 1955 e di un lavoro *in extenso* pubblicato nel 1956 da Ascenzi, in collaborazione con il suo assistente Ennio Lucio Benedetti, sui *Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità*.

Nel 1956 i pochi partecipanti italiani alla Prima Conferenza Europea di Stoccolma (l'annuncio in Figura 16) fondarono la Società Italiana di Microscopia Elettronica (SIME) nominando Segretario Generale il Prof. Silvio Ranzi dell'Università di Milano e Presidente il Prof. Trabacchi che nel maggio del 1957 organizzerà a Roma, all'ISS, il 1° Congresso Nazionale della SIME (Figura 18).

Tuttavia, l'incarico conferito con unanime consenso al Prof. Trabacchi durerà solo fino al settembre del 1959 quando, alla sua scomparsa, verrà chiamata alla Presidenza della Società la Prof.ssa Daria Bocciarelli. I pochi aderenti iniziali alla Società superarono comunque il centinaio già in occasione del secondo Congresso Italiano di Microscopia Elettronica tenutosi a Milano nel 1959.



**Figura 18** - Partecipanti ai lavori del 1° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microscopia Elettronica, inaugurato a Roma il 4 maggio 1957 nell'Anfiteatro dell'Istituto dal Prof. Giulio Cesare Trabacchi che, seduto alla cattedra, ascolta l'intervento del Prof. Gino Bozza. Seduta avanti sulla poltroncina si riconosce Daria Bocciarelli (ISS). Nella prima fila dell'anfiteatro si riconoscono da destra Giovanni Giulio Calapaj e Renzo Vendramini del Centro di Microscopia Elettronica istituito presso l'Istituto di Igiene dell'Università di Padova, e ancora, quarto, Giorgio Cortellessa (ISS) cui siedono a fianco, ambedue in camicia bianco, Nella Mortara (ISS) e Adriana Chiozzotto (ISS) con accanto Natale Tomassini (ISS), penultimo in fondo è Silvio Ranzi (Istituto di Zoologia, Università di Milano); in seconda fila, da destra, il quinto è Mario Ageno (ISS) con accanto Carlo Sirtori (Istituto dei Tumori, Milano) e Francesco Clementi (Istituto di Farmacologia, Università di Milano); in terza fila, il quarto da destra è Zefirino Orfei (ISS) con a fianco Giulio Lanzavecchia e Alda Le Coultre (Istituto di Zoologia, Università di Milano) e la signora Lanzavecchia; in quinta fila il secondo ed il terzo sono Ugo Valdrè e Antonio Grilli (Istituto di Fisica, Università di Bologna) e appresso a loro Filippo Dentice di Accadia (ISS); il primo della sesta fila è Brenno Babudieri (ISS) ed il terzo Gian Luigi Gatti (ISS).

Numerosi erano stati infatti gli studiosi italiani che negli anni '50, dopo aver frequentato i Laboratori di Fisica dell'ISS, avevano messo a frutto l'esperienza maturata dando vita, nelle proprie sedi di origine, a centri di microscopia elettronica e a laboratori di biologia e patologia ultrastrutturale.

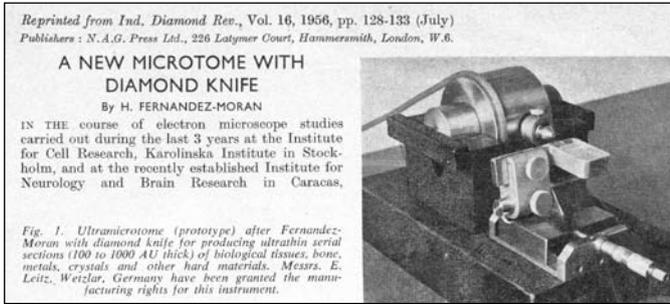
In attesa che anche l'Istituto di Anatomia e Istologia Patologica potesse disporre di un proprio microscopio elettronico, Ascenzi continuerà invece la sua collaborazione con l'ISS fino al 1966, portando a termine due ricerche, una sull'ultrastruttura dell'osteocone e l'altra sull'ultrastruttura dell'osso periostale primario, per la cui realizzazione egli stesso svilupperà una nuova tecnica di micro-dissezione. Queste ricerche risultarono particolarmente utili in quanto rafforzarono l'ormai diffusa convinzione che il microscopio elettronico avrebbe sempre più assunto una posizione preminente nello sviluppo della ricerca morfologica e che da ciò sarebbero scaturiti nuovi rapporti tra morfologia e biochimica. Come lo stesso Ascenzi

descrisse a metà degli anni '80, in un promemoria che mi fece pervenire (Ascenzi A, 1985), Benedetti fu da lui inviato in Francia nel laboratorio del Dr. Bernhard presso l'Istituto del Cancro di Villejuif per apprendere la tecnica delle sezioni ultrasottili; ed è proprio al suo ritorno che fu avviato un importante studio sull'ossificazione diretta della teca cranica, dimostrando come la calcificazione della matrice ossea non si estrinsechi soltanto lungo le fibre collagene, ma si attui anche a livello della sostanza fondamentale interfibrillare. Tali risultati, in contrasto con la tesi allora dominante, trovarono conferma in un'ulteriore indagine eseguita sull'osso follicolinico e verranno più tardi ampiamente sviluppati da Ermanno Bonucci nelle sue ricerche fondamentali che lo porteranno all'individuazione delle *matrix vesicles* e dei *crystal ghosts*.

Un'altra collaborazione di rilievo fu quella che ebbe inizio nel 1956 con il Prof. Vittorio Marinozzi dell'Università di Roma. Egli, forte della sua lunga, personale esperienza nelle tecniche istologiche ed istochimiche e nel loro impiego in diagnostica istopatologica, fu tra i primi a cimentarsi con successo nel campo dell'istochimica ultrastrutturale, mettendo a punto un metodo per la "colorazione" dei polisaccaridi e delle glicoproteine che applicava la reazione di Gomori (acido periodico-argento metenamina) alle sezioni ultrasottili: i suoi primi brillanti risultati, presentati al Congresso Internazionale di Berlino nel settembre 1958, furono resi possibili dall'impiego di una lama di diamante che la Prof.ssa Bocciarelli ottenne nel dicembre 1957 dal Prof. Humberto Fernandez-Moran, Direttore dell'Istituto di Neurologia di Caracas, che aveva messo a punto la tecnica relativa (Figura 19).

Prima di allora infatti, l'ISS disponeva solo di un microtomo adatto a preparati per microscopia ottica, ma con il quale era assai difficoltoso ottenere sezioni sufficientemente sottili per l'osservazione in microscopia elettronica. La possibilità di effettuare ricerche di istologia ultrastrutturale, sia su sezioni di tessuti che in seguito anche di cellule infette, si aprirà quindi con l'acquisto di un nuovo ultramicrotomo Reichert e la disponibilità appunto di una lama di diamante.

Nel frattempo, il glorioso microscopio elettronico ISS, pur migliorato nelle lenti e nell'impianto da vuoto, cominciava a non essere più competitivo rispetto agli ormai numerosi strumenti di fabbricazione straniera che da qualche anno avevano invaso il mercato,



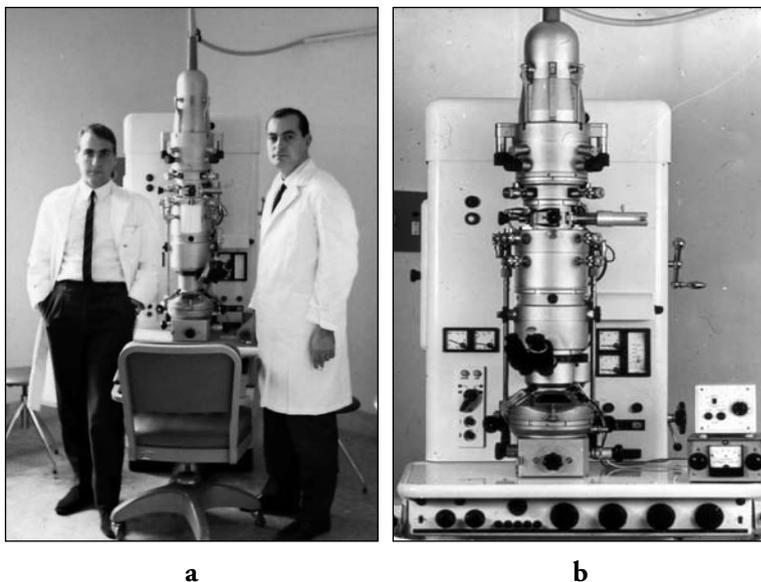
a



b

**Figura 19** - Articolo originale in cui Fernandez-Moran descrive sia la lama di diamante che il microtomo da lui sviluppati (a); lettera con la quale il Prof. Humberto Fernandez-Moran comunica alla Prof.ssa Daria Bocciarelli l'invio della lama di diamante con le relative istruzioni per il montaggio sul microtomo ed il suo migliore utilizzo (b); ultramicrotomo Reichert all'epoca in dotazione dei Laboratori di Fisica (c).

soprattutto per la mancanza di un sistema di correzione dell'astigmatismo della lente obbiettivo. Venne quindi deciso, nel 1958, di acquistare il nuovo Elmiskop I della Siemens (Figura 20) dotato di tensione alla sorgente variabile tra 40 e 100 KeV e di un potere risolutivo limite di 15Å.



**Figura 20** - Una foto di metà degli anni '60 con i giovani tecnici Giuseppe Arancia e Franco Tangucci davanti al microscopio elettronico Siemens Elmiskop I acquistato dai Laboratori di Fisica nel 1958 (a); il microscopio elettronico Siemens modello Elmiskop IA, con potere risolutivo limite di  $15\text{\AA}$ , entrato in funzione in Istituto nel 1963 (b).

L'utilizzo del nuovo microscopio, che iniziò a lavorare in Istituto nel settembre 1958, permise a Marinozzi di ottenere immagini con migliore risoluzione e di affrontare la problematica relativa all'interferenza della fissazione osmica con la reazione di Gomori; sua è la messa a punto della tecnica di contrasto delle sezioni ultrasottili mediante impregnazione argentica, pubblicata nel 1961 in italiano sui *Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità* e, contemporaneamente, in inglese sul *Journal of Biophysics and Biochemical Cytology*.

Il problema dei rapporti tra fissazione e "colorazione" in microscopia elettronica verrà ripreso ed ulteriormente sviluppato da Marinozzi durante il suo soggiorno di studio presso il Centro di Microscopia Elettronica dell'Università di Losanna e, successivamente presso l'Istituto di Ricerca Scientifica sul cancro di Villejuif; egli riuscì infatti a dimostrare l'interazione dell'osmio ridotto con l'idrossido di piombo e la possibilità di migliorare la selettività della "colorazione" delle ribonucleoproteine con lo stesso idrossido di piombo, sostituendo la fissazione con  $\text{OsO}_4$  con la fissazione aldeidica, ovvero ossidando con

acqua ossigenata la sezioni di tessuti fissati in osmio (Marinozzi V, 1963). Egli dimostrò anche la possibilità di ottenere con l'acido fosfotungstico (PTA) una "colorazione" selettiva di un costituente delle plasmamembrane, che verrà poi identificato come il glicocalice, a condizione di eliminare l'interferenza dell'osmio. Applicando a sezioni ultrasottili di tessuti fissati in sole aldeidi e inclusi in glicolmetacrilato, tecniche di "colorazione" preferenziale e di estrazione enzimatica selettiva dell'RNA, egli diede inoltre un importante contributo alla definizione dell'organizzazione macromolecolare del nucleolo.

Le ottime prestazioni del nuovo microscopio elettronico Siemens e l'aumentare continuo delle richieste di indagini ultrastrutturali, sia all'interno dell'ISS che da parte di collaboratori esterni, indurrà Daria Bocciarelli a chiedere e ottenere nel 1963 l'acquisto di un secondo microscopio Siemens modello Elmiskop IA (Figura 20).

Al suo rientro in Italia nel 1964, Marinozzi riprese la collaborazione con l'ISS, e a quel periodo risalgono le ricerche che lo portarono ad acquisire la dimostrazione dell'esistenza dei mitoribosomi nelle cellule dei vertebrati, della possibilità di utilizzare l'acroleina e la glutaraldeide come mediatori per la "colorazione" di costituenti dei tessuti cui le dette aldeidi si legano (polisaccaridi, proteine, DNA), delle condizioni di impiego necessarie per ottenere, con il solo PTA, una "colorazione" selettiva sia delle proteine che dei polisaccaridi e del DNA. Tuttavia, con l'arrivo di un microscopio elettronico Siemens Elmiskop IA anche all'Istituto di Anatomia e Istologia Patologica dell'Università di Roma, la sua collaborazione si trasformerà, a partire dal 1966, in un rapporto di amichevole ma saltuaria consulenza nei riguardi di ricercatori e tecnici di microscopia elettronica dell'Istituto; e così sarà fino alla fine degli anni '80.

Tornando ora al 1958, vediamo come in quell'anno, con la nomina del Prof. Mario Ageno alla direzione dei Laboratori di Fisica, ebbe inizio una nuova primavera per le ricerche ultrastrutturali che vedrà lavorare a fianco dei biofisici dell'Istituto, Mario Ageno, Clara Frontali e Anna Scafati, i primi biologi molecolari italiani Pierluigi Donini, Franco Graziosi, Giorgio Morpurgo, Giorgio Tecce e Giovanni Toschi.

Non meno importante fu l'impegno profuso dagli allora tecnici del Reparto di Microscopia Elettronica Adriana Chiozzotto, Franco Piccirilli, Natale Tomassini e Fulvia Valente, la cui attività contri-

buirà alla pubblicazione, nel 1964, di una prima edizione in due parti del *Ricettario* ad uso del Reparto di Microscopia Elettronica (Ricettario ad uso dei tecnici addetti alla microscopia elettronica, 1964). Esso fu così presentato: “Ad uso di tutti coloro che lavorano nel reparto di microscopia elettronica, in particolare di quelli che iniziano presso di esso la loro preparazione come microscopisti elettronici, sono state raccolte le tecniche di più comune impiego, o per lo meno già sperimentate, trascritte dagli appunti dei tecnici del reparto. Sono state aggiunte le istruzioni relative all’uso degli apparecchi che essi usano abitualmente. Il breve manuale che ne deriva sarà di continuo integrato e completato, come le esigenze del lavoro svolto richiederanno”. Questi ed altri tecnici che si formeranno negli anni immediatamente successivi, affiancheranno la Prof.ssa Bocciarelli nella messa a punto delle tecniche più avanzate di preparazione e osservazione dei campioni. Dato il successo che la prima edizione del *Ricettario* riscosse non solo tra i microscopisti dell’Istituto ma soprattutto tra gli ospiti, i frequentatori esterni e tutti coloro che in altre istituzioni scientifiche pubbliche e private si occupavano di microscopia elettronica, i suoi contenuti vennero ampliati e aggiornati, ed esso venne ripubblicato in cinque parti nel 1967 e, dopo ulteriori aggiornamenti, nel 1970 anche con il contributo dei nuovi tecnici formati in quegli anni, Giuseppe Arancia, Egidio Chessa, Pasqualina Crateri e Franco Tangucci, e di alcuni giovani ricercatori ospiti e borsisti: Umberto Fagiolo, Annarosa Luzzatto, Gabriella Mancini, Adriana Poletti, Giovanna Procicchiani e Giovanna Rosati (*Ricettario ad uso dei tecnici addetti alla microscopia elettronica*, 1970).

Va qui ricordato in quegli anni il generoso e incessante contributo all’attività del Reparto e alla serena e fattiva collaborazione tra tecnici e ricercatori della Prof.ssa Nella Mortara (Figura 18); la mitica “Zia Nella” che, lasciato l’insegnamento di Fisica presso l’Università “La Sapienza” per occuparsi a tempo pieno del Reparto diretto dall’amica di sempre Daria Bocciarelli, collaborò per lunghi anni con modestia al suo buon funzionamento, facendosi apprezzare e benvolere da tutti per le sue straordinarie doti umane.

Fu in quel clima di entusiasmo per i nuovi mezzi di indagine ultrastrutturale che il Reparto di Microscopia Elettronica mano a mano acquisiva, nonché di motivazione professionale e di convinto spirito di collaborazione tra ricercatori e tecnici che, fin dai primi

anni '60 vennero condotte importanti ricerche sulla morfologia, l'ultrastruttura e le proprietà biologiche dei batteriofagi, che rappresentavano uno dei principali modelli di riferimento della neonata biologia molecolare.

Il Prof. Adriano Buzzati Traverso, di ritorno da una lunga esperienza di ricerca e insegnamento negli Stati Uniti, aveva fondato a Napoli nel 1962 il Laboratorio Internazionale di Genetica e Biofisica (LIGB) nel cui ambito operava un gruppo di ricerca ultrastrutturale, di cui assumerà la Direzione nel 1966 il Prof. Werner Hans Schreil dell'Istituto di Biofisica dell'Università di Ginevra.

Nel marzo 1965 Mario Ageno, Eraldo Antonini, Corrado Baglioni, Adriano Buzzati Traverso, Luigi Cavalli Sforza, Orio Ciferri, Franco Graziosi, Alfonso Maria Liquori, Giulio Maccacaro, Giovanni Magni, Luigi Silvestri, Giorgio Tecce e Giovanni Toschi fondano a Roma la Società Italiana di Biofisica e Biologia Molecolare, dando l'avvio ad un fiorire di iniziative scientifiche e formative che si terranno soprattutto presso i Laboratori di Fisica dell'ISS e presso il LIGB.

Va qui ricordato che l'interesse per i virus batterici quali modelli di studio, non solo da parte dei biologi molecolari ma anche dei biofisici, portò Ageno ad occuparsi sempre di più, a partire dai primi anni '60, delle potenzialità di indagine offerte dalla microscopia elettronica per gli studi sulla struttura dei virus, e a criticare al contempo le collaborazioni della Bocciarelli con i virologi dell'Istituto, che egli non esitava a definire ricerche di scarso valore scientifico. Dalla critica serrata e insistente di Ageno nei riguardi della Bocciarelli, sia sul piano metodologico che sui contenuti, si passò ben presto a un alternarsi, con frequenza crescente, di memorabili sfuriate e di successivi momenti di apparente riappacificazione che Ageno stesso ricercava. Questo tipico rapporto amore-odio era a mio avviso dovuto all'insoddisfazione di Ageno per il carattere forte e indipendente della Bocciarelli, che gli lasciava ben pochi margini di manovra nel suo Reparto, ragione per cui egli reagiva tentando di screditarla scientificamente, seppur consapevole delle difficoltà oggettive dell'impresa. Il disegno di Ageno era quello di fare spazio nel Reparto di Microscopia Elettronica ai suoi allievi con i quali svolgere "ricerche di livello" in totale autonomia rispetto alla gestione Bocciarelli; per raggiungere il suo scopo Ageno aveva puntato inizialmente su Clara Frontali ma poi, deluso dal suo insuccesso nell'isolamento del "fago gigante" (n.d.a.

il fago G) osservato nei lisati di alcune colture batteriche, decise di accelerare la mia formazione ultrastrutturale. Io ero allora un giovane borsista ventiquattrenne, cui Ageno aveva concessa l'ospitalità nei Laboratori di Fisica fin dal 1964 su richiesta di Giorgio Tecce, per lo svolgimento di alcuni esperimenti che prevedevano l'impiego in un primo tempo della microcinematografia, per definire le fasi di duplicazione e di sporulazione di *Bacillus mycoides*, e poi della microscopia elettronica, per la definizione ultrastrutturale di un fago di *Bacillus stearothermophilus*; esperimenti e osservazioni che con la competente assistenza tecnica di Carlo Ramoni prima e di Franco Tangucci dopo, avevo dimostrato di saper condurre in porto con successo. Ed Ageno, evidentemente convinto della mia promettente predisposizione al lavoro di ricerca, decise di affidarmi lo studio del "fago gigante" e di cogliere tutte le occasioni per una mia rapida specializzazione, a cominciare dalla partecipazione ai più qualificanti corsi internazionali organizzati in quegli anni.

E fu proprio al primo "Course on the Genetics and Physiology of Bacteriophage", diretto da Gunther Stent (Stent G, 1963) al LIGB dal 21 agosto al 16 settembre 1967, che Ageno volle che partecipassi io, da poco vincitore di una borsa di studio dell'ISS presso il Reparto di Biofisica e Biologia Molecolare dei Laboratori di Fisica (Figura 21); come anche che partecipassi qualche anno



**Figura 21** - Partecipanti al Corso internazionale sul batteriofago tenutosi al LIGB di Napoli nel 1967. Sono riconoscibili in prima fila: secondo da destra Renè Thomas, quarto Gianfranco Donelli, quinta Maria Irene Baldi, sesto Pierluigi Donini, settima Giuliana Boera. In seconda fila: quinto da destra George Streisinger, settimo Gunther Stent e, ultimo, Antonino Cascino.

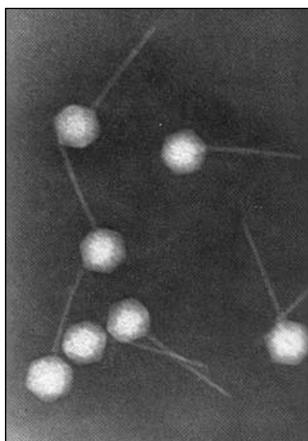
dopo al corso organizzato all'MRC Laboratory of Molecular Biology di Cambridge (UK) dal 14 al 26 settembre 1970, su "New Methods in the Analysis of Biological Structures by Electron Microscopy and Low Angle X-Ray Diffraction" diretto da Hugh Esmor Huxley e Aaron Klug, che otterrà nel 1982 il premio Nobel per la Chimica "per il suo sviluppo della microscopia elettronica cristallografica e per aver chiarito la struttura dei complessi biologicamente importanti acidi nucleici-proteine".

Nel 1970, Ageno invitò anche il Prof. Albrecht Kleinschmidt, lo scienziato del New York University Medical Center che aveva per primo sviluppato le tecniche di osservazione in microscopia elettronica di acidi nucleici in monostrato, a tenere in Istituto il corso "Electron Microscopy of Biomacromolecules"; e l'anno successivo, nell'ambito del Programma Speciale di Tecnologie Biomediche del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), organizzò, dall'8 marzo al 23 giugno 1971, il "I Corso di Strumentazione di Interesse Medico Biologico" in cui mi affidò lo svolgimento di lezioni sulla caratterizzazione al microscopio elettronico dei virus batterici. Nello stesso anno l'International School of Electron Microscopy, diretta dal Prof. Valdrè nell'ambito del Centre for Scientific Culture "Ettore Majorana", organizzò ad Erice (TP) dal 3 al 17 aprile il Corso "Electron Microscopy in Biology: new developments and perspectives". La direzione del Corso fu affidata al Prof. Paolo Buffa dell'Università di Modena ed ebbe tra i docenti i migliori esperti italiani e stranieri di quegli anni: tra i primi, oltre a quelli già citati, Angelo Bairati, Daria Bocciarelli, Vittorio Marinuzzi, Umberto Muscatello e, tra i secondi, Ellis Cosslett, Patrick Echlin, Robert Horne e Hans Moor. Dell'ISS partecipammo, quali discenti, Luigi Paoletti ed io (Figura 22).

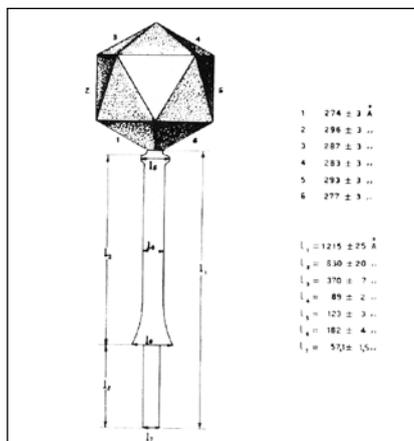
Tornando ora ai primi studi ultrastrutturali avviati all'inizio degli anni '60, ricordiamo quelli sul batteriofago  $\alpha$  (Aurisicchio E, *et al.*, 1960), un fago temperato attivo sul ceppo Parigi di *Bacillus cereus* (Figura 23) come sarà successivamente dimostrato (Donelli G, 1968 b), confermando i dubbi avanzati in precedenza da Marmur e riportati da Franco Graziosi in una sua pubblicazione (Graziosi F, 1963) circa l'attribuzione originaria del ceppo ospite alla specie *Bacillus megatherium*.



**Figura 22** - Un gruppo di docenti e allievi del primo Corso "Electron Microscopy in Biology: new developments and perspectives" tenutosi ad Erice nell'aprile 1971 nell'ambito dell'International School of Electron Microscopy. Si riconoscono da sinistra: 1) Bruno Bertolini; 2) Vittorio D'Uva; 3) Gianfranco Donelli; 4) Umberto Muscatello; 5) Luigi Paoletti; 6) Ellis Cosslett; 7) Ugo Valdrè e 8) Zina Gori.



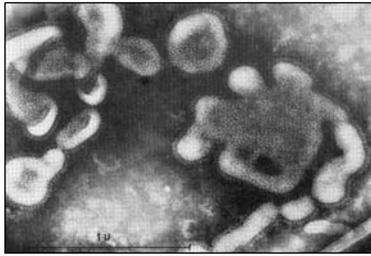
**a**



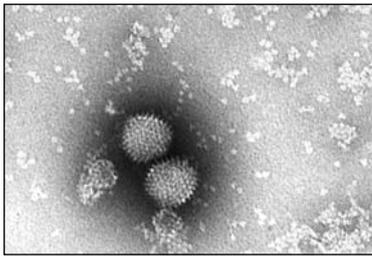
**b**

**Figura 23** - a) Batteriofago  $\alpha$  osservato in contrasto negativo al microscopio elettronico; b) disegno schematico del fago  $\alpha$ , le cui dimensioni vennero definite misurando 100 particelle al microscopio elettronico.

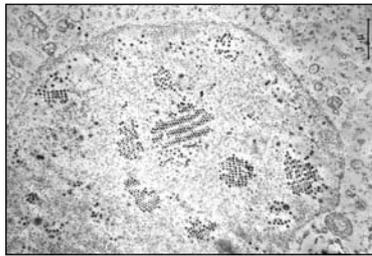
Particolarmente significativi furono poi, sempre in quegli anni, gli studi sulla struttura fine dei virus influenzali (Figura 24) condotti in collaborazione tra Italo Archetti, brillante virologo dei Laboratori di Batteriologia, e Daria Bocciarelli (Archetti I, Bocciarelli D, 1961); e quelli su alcuni adenovirus di scimmia (Archetti I, Bocciarelli D, 1963) (Figura 24).



a



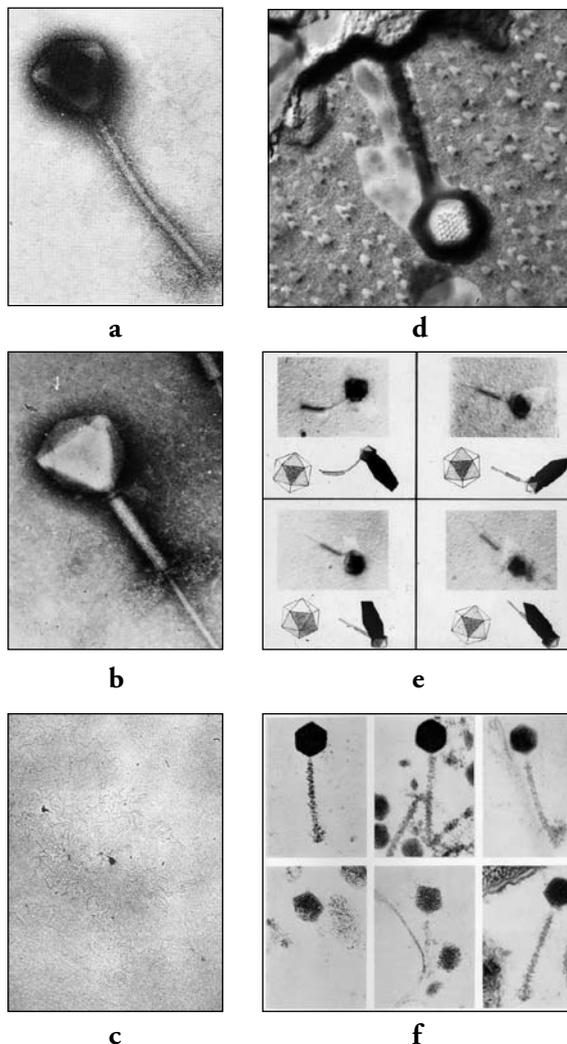
b



c

**Figura 24** - Virus influenzale di tipo A/Roma 2/1952 osservato al microscopio elettronico in contrasto negativo (a); particelle di adenovirus di scimmia SV39 osservate al microscopio elettronico in contrasto negativo (b) e in sezione ultrasottile all'interno del nucleo di una cellula epiteliale di rene di scimmia (c).

Ricordiamo inoltre, alla fine degli anni '60, gli studi che portarono all'isolamento (Donelli G, 1968) ed alla caratterizzazione strutturale e funzionale del batteriofago G di *Bacillus megatherium*, che risulta ancora oggi il batteriofago di maggiori dimensioni mai descritto, contenente un'unica molecola di acido nucleico del peso molecolare di 500 milioni (Figura 25). Gli studi ultrastrutturali effettuati permisero tra l'altro di scartare l'ipotesi avanzata inizialmente da Ageno che potesse trattarsi di un virus batterico a simmetria ottaedrica.

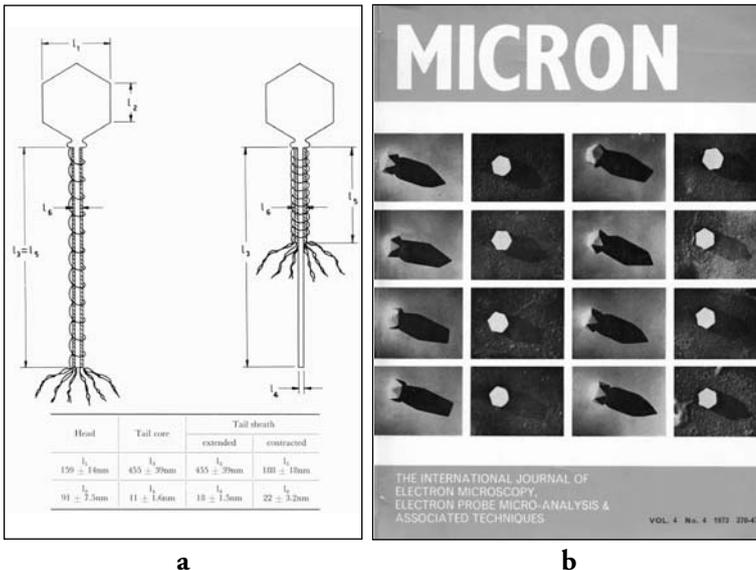


**Figura 25** - Particelle di fago G con coda distesa (a) e contratta (b) osservate al microscopio elettronico in contrasto negativo; (c) molecola di DNA rilasciata da una particella di fago G a seguito di shock osmotico, contrastata con acetato di uranile ed osservata in microscopia elettronica a trasmissione: il filamento di DNA ha una lunghezza di 198  $\mu\text{m}$ ; (d) particella fagica osservata in microscopia elettronica a trasmissione dopo freeze-fracturing per evidenziare le subunità capsidiche; (e) particelle fagiche, in 4 posizioni diverse, osservate in microscopia elettronica a trasmissione con la tecnica delle ombre, dopo evaporazione metallica con platino e, relativi modelli; (f) sezioni ultrasottili di particelle fagiche secondo piani di taglio diversi che evidenziano i tipici profili esagonali e pentagonali di un capside a morfologia icosaedrica.

Tra le tecniche messe a punto in quegli anni vanno ricordate quelle di crio-frattura (*freeze-fracturing*) e di crio-sublimazione (*freeze-etching*), il cui impiego fu reso possibile dall'acquisizione di un apparato Balzers che entrò in dotazione al Reparto di Microscopia Elettronica nel 1970, consentendo lo svolgimento di importanti ricerche volte alla definizione ultrastrutturale di virus, organuli cellulari e membrane biologiche, sia eucariotiche che procariotiche.

La contemporanea acquisizione, nell'autunno del 1969, di un diffrattometro ottico della Polaron permetterà in quegli anni l'ottenimento di risultati di assoluto 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 proprio l'impiego combinato delle tecniche di contrasto negativo, ombratura metallica, ultramicrotomia e *freeze-fracturing*, nonché di diffrazione ottica e di filtraggio ottico delle micrografie, che permise di definire la morfologia icosaedrica del capside, la struttura a subunità e il processo di contrazione del manicotto caudale del batteriofago G (Figura 26). I dati vennero pubblicati su prestigiose riviste internazionali quali *Journal of Molecular Biology* (Donelli G, et



**Figura 26** - Disegno schematico di particelle di fago G con coda distesa e contratta e relative caratteristiche dimensionali (a); copertina della rivista Micron dedicata alle ricerche ultrastrutturali sulla morfologia icosaedrica del capside del batteriofago G (b).

al., 1972; Donelli G, *et al.*, 1975), *Micron* (Ageno M, *et al.*, 1973), che dedicò una sua copertina a questi studi (Figura 26) e *Advances in Electronics and Electron Physics* (Donelli G, Paoletti L, 1977).

Di questo batteriofago e del suo ospite verrà richiesto dall'Università Laval di Quebec, e accordato nel 1987, il deposito presso il "Felix d'Herelle Reference Center for Bacterial Viruses", unica istituzione a livello internazionale deputata specificamente alla conservazione dei fagi e dei loro ospiti batterici.

Le collaborazioni di quel periodo non si limitarono solo a coinvolgere ricercatori dei diversi laboratori dell'Istituto ma anche studiosi provenienti da varie istituzioni italiane pubbliche e private che chiesero e ottennero ospitalità in Istituto sia per svolgere indagini ultrastrutturali che per addestrarsi alle tecniche di microscopia elettronica, nella prospettiva di attivare centri specializzati nelle rispettive sedi. Tuttavia poco è noto circa il contributo dato dall'Istituto alla nascita di centri di microscopia elettronica in industrie italiane, anche se tra i documenti dell'epoca risultano tracce di rapporti con il Centro Ricerche e Controlli delle AFL Falck, l'industria chimica Parodi Delfino e altre. D'altronde, con la sola eccezione della ditta Montevecchio di Porto Marghera, ove era operante già nel 1954 un Laboratorio di Microscopia Elettronica dotato di un microscopio Trüb, Täuber & Co, di cui era responsabile il fisico Primo Gondi, compagno di corso di Ugo Valdrè, non risultano attivi altri centri prima degli anni '60. Infatti, dall'indagine promossa dalla SIME nel 1979 (Baccetti B, *et al.*, 1980) tutti i 15 più importanti centri di microscopia elettronica (FIAT di Orbassano, RIV-SKF di Airasca, CSELT di Torino, SIR di Porto Torres, Assoreni di Monterotondo, ENEL di Piacenza e Milano, Falk di Sesto S. Giovanni, SNIA di Cesano Maderno, Acciaierie di Bolzano, Olivetti di Ivrea, Pirelli di Milano, SNAM Progetti di Milano, Honeywell ISI di Milano, CSM di Pomezia) risultarono essere stati attivati dalla metà degli anni '60 in poi.

A livello delle istituzioni pubbliche si cominciò invece a registrare in Italia, già alla fine degli anni '50, una significativa attività scientifica in campo ultrastrutturale che fece seguito all'istituzione, tra il 1956 e il 1960, di specifiche strutture dedicate alla microscopia elettronica presso le Università di Cagliari, Padova, Milano e Modena.

All'Università di Cagliari il fisico Prof. Nino Marongiu diede vita nel 1956 ad un Centro di Microscopia Elettronica dotato di un microscopio Philips 100, che si sviluppò poi per iniziativa dei clinici Ernico Fiaschi e Remo Naccarato e dell'anatomico Giovanni Montaldo, che ne assumerà la direzione nei primi anni '60, dotandolo delle necessarie apparecchiature per la preparazione di campioni sia liberi che inclusi e di un discreto numero di tecnici; è interessante notare la presenza, tra le cinque unità di personale tecnico, di un diplomato in elettrotecnica, Antonio Casu, che si era perfezionato in ottica elettronica presso i Laboratori di Fisica dell'ISS (Montaldo G, 1964). Anche la nascita di questo centro avvenne quindi in un clima di stretta collaborazione con l'Istituto, tanto che nel 1964 venne pubblicato un lavoro sull'epatite virale umana che vide la collaborazione dei clinici dell'Università di Cagliari Fiaschi e Naccarato con Brenno Babudieri dei Laboratori di Batteriologia e con l'allora giovane tecnico del Reparto di Microscopia Elettronica dell'Istituto, Franco Tangucci (Babudieri B, *et al.*, 1964).

A partire dalla seconda metà degli anni '50, vengono attivati all'Università di Padova ben tre centri di microscopia elettronica: il primo per iniziativa dell'istologo Lorenzo Gotte e del biochimico Vittorio Moret presso l'Istituto di Istologia ed Embriologia, il secondo per iniziativa dell'igienista Renzo Vendramini presso l'Istituto di Igiene ed il terzo presso l'Istituto di Anatomia Umana Normale per iniziativa dell'anatomico Virgilio Meneghelli, come lui stesso mi ricorderà in una sua lettera del luglio 1985 (Meneghelli V, 1985). La prima ricerca ultrastrutturale di Gotte e Moret, riguardante l'elastina, venne pubblicata sui *Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei* nel 1957 (Moret V, Gotte L, 1957), mentre, tra le numerose ricerche svolte presso il Centro dell'Istituto di Igiene, si può ricordare lo studio ultrastrutturale della membrana basale della mucosa nasale dell'uomo, eseguito su campioni biotipici prelevati dai turbinati dal setto nasale, presentato da V. Ricci e G. Gasparini alla Sezione di Padova della Società Italiana di Biologia Sperimentale nella Seduta del 12 maggio del 1960 (Ricci V, Gasparini G, 1960). Come risulta invece dall'elenco dei lavori e dalle brevi informazioni storiche inviatemi da Meneghelli, i suoi primi studi riguardanti l'ultrastruttura del midollo osseo umano, condotti con

un microscopio Hitachi HU-11, vennero pubblicati nel 1962 sugli *Atti della Società Italiana di Medicina e Chirurgia Padovana* (Meneghelli V, *et al.*, 1962).

Per quanto riguarda l'Università di Milano, da pubblicazioni di Giulio Lanzavecchia e collaboratori (Di Mayorca G, *et al.*, 1956) risulta già attivo perlomeno dal 1956, presso l'Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata, un microscopio elettronico Philips 75KV con cui gli autori studiano la morfologia di leucociti umani normali e leucemici in sezioni sottili. Da un rapporto di M. Paganelli dell'Istituto Sperimentale dei Metalli Leggeri di Milano, si evince inoltre la disponibilità, almeno dal 1958, di un microscopio elettronico Siemens Elmiskop I (Paganelli M, 1958). E ancora, da un breve scritto del 1982 di Francesco Clementi, Bruno Ceccarelli e Jacopo Meldolesi (Clementi *et al.*, 1982), risulta che all'ora Direttore dell'Istituto di Farmacologia, Prof. Emilio Trabucchi, con l'aiuto del Prof. Ranzi, riuscì a farsi trasferire nel luglio del 1958, dall'Istituto di Fisica Tecnica del Politecnico di Milano, un microscopio elettronico Philips; dalla copia del verbale di consegna, fattami pervenire da Clementi, risulta che tale strumento, ottenuto attraverso il Piano ERP, venne ceduto in vista dell'arrivo di un nuovo microscopio. Ed è proprio con tale strumento che Francesco Clementi effettuerà i suoi primi studi sulla distribuzione del bismuto nei tessuti che presenterà nel 1960 all'European Regional Conference on Electron Microscopy di Delft. Tra le iniziative congressuali merita di essere ricordato in quegli anni il Symposium Internazionale di Microscopia Elettronica tenutosi all'Università di Milano il 17 marzo 1962, che vide la presentazione da parte dell'ISS di ben otto contributi riguardanti studi ultrastrutturali su adenovirus di scimmia, Leptospire, Haemophilus, Streptomyces, ferritina, cellule neoplastiche, corde vocali e la messa a punto di un sistema per ottenere un'emulsione fotografica ad alta risoluzione (Symposium Internazionale di Microscopia Elettronica, 1962).

Nel 1959, una sovvenzione dell'Amministrazione Provinciale permise all'Istituto di Patologia Generale dell'Università di Modena, allora diretto dal Prof. Massimo Aloisi, l'acquisto di un microscopio elettronico e la realizzazione di un Centro interfacoltà. Nello stesso anno tuttavia, a seguito del trasferimento a Padova di Aloisi,

la direzione dell'Istituto passò al Prof. Paolo Buffa che, in un suo scritto inviandomi nel novembre 1984 (Buffa P, 1984) così mi descriveva i primi anni del Centro: "... Nel 1959 fu acquistato un microscopio elettronico AKASHI Tronscope TRS-50, uno strumento di limitate prestazioni, che servì per avviare la nuova linea di ricerca e al tempo stesso si dimostrò molto utile per la formazione di microscopisti elettronici abili ed esperti. Tutti gli altri strumenti furono successivamente acquistati con fondi assegnati dal Ministero della Pubblica Istruzione e dal Consiglio Nazionale delle Ricerche ... Il Prof. Umberto Muscatello, nel 1960 assistente ed ora ordinario di Patologia generale, fu il primo docente dell'Istituto a dedicarsi alla microscopia elettronica. Egli seguì un corso di ottica elettronica e metodologia presso l'Istituto di Fisica della Università di Bologna e successivamente lavorò per 14 mesi presso il Laboratory of Ultrastructure Research del Karolinska Institutet di Stoccolma (Svezia). Al suo ritorno a Modena collaborò attivamente alla organizzazione del laboratorio e si dedicò alla formazione di personale nel nuovo campo di ricerca ... Nel 1963, in occasione del primo centenario della morte di Giovan Battista Amici (1786-1863), fisico ottico e biologo di Modena, l'Istituto di Patologia generale organizzò un Simposio Internazionale di Microscopia Elettronica intitolato "From Molecules to Cell" ed il volume degli Atti fu pubblicato dal Consiglio Nazionale delle Ricerche a cura dei Proff. Buffa... Dal 1973 è responsabile del laboratorio di microscopia elettronica la Prof.ssa Ivonne Pasquali Ronchetti, Professore Associato di Patologia generale presso la Facoltà di Scienze della Università di Modena; fanno inoltre parte del personale del laboratorio il Prof. Claudio Fornieri, Professore Associato di Patologia generale, la Dott.ssa Miranda Baccarani Contri, Ricercatore confermato, il Dr. Giuseppe Mori, Funzionario Tecnico, esperto in elettronica, e la Dott.ssa Deanna Ascari Guerra, Operatore Tecnico". Per quanto concerne l'attività scientifica del Centro, rivestono particolare rilievo, nei primi anni '60, gli studi morfologici e ultrastrutturali sulle fibre muscolari (Muscatello U, *et al.*, 1961), e, negli anni '70 quelli sui mitocondri (Buffa P, *et al.*, 1970), quelli sullo sviluppo di una nuova tecnica per lo studio dei virus al microscopio elettronico (Horne RW, Pasquali Ronchetti I, *et al.*, 1974) e sull'ultrastruttura dell'elastina (Pasquali Ronchetti I, *et al.*, 1979).

Ancora dall'indagine della SIME del 1979 e da altra documentazione conservata nei miei archivi si evince la nascita di laboratori e centri di microscopia elettronica nel 1960 nelle Università di Catania (Ricamo R, 1960), Messina e Piacenza, e nel 1961 in quelle di Ferrara (Martinelli G, 1985), Genova (Cuneo Crovari P, 1985) e Torino.

Nel 1962 l'Università di Bologna istituì poi il Centro Bolognese per lo Sviluppo della Microscopia Elettronica la cui direzione venne affidata al Prof. Renzo Laschi, appena di ritorno da un lungo periodo di addestramento tecnico nel laboratorio del Prof. Albert Claude in Belgio; inizialmente venne utilizzato l'unico microscopio elettronico allora disponibile presso l'Istituto di Fisica, ma nel 1963, venne acquistato un microscopio elettronico Siemens e il Ministero della Pubblica Istruzione assegnò al Centro un primo nucleo di personale. Il Centro, cui si deve anche la nascita nel 1969 del *Journal of Submicroscopic Cytology* di cui Renzo Laschi fu il primo Editor-in-chief, venne poi trasformato alla fine del 1972 in Istituto di Microscopia Elettronica Clinica.

Negli anni '60 vennero inoltre istituiti altri importanti centri di microscopia elettronica: nel 1963 nelle Università di Ancona e Camerino, nel 1964 a Napoli e Parma e nel 1965 a Bari e Palermo.

In questo contesto di crescente sviluppo della microscopia elettronica italiana si ebbe un fiorire di iniziative scientifiche a carattere editoriale, formativo e congressuale, che coinvolsero ovviamente sia l'ISS che gran parte di questi centri. Tra quelle editoriali ebbe grande successo e ampia diffusione in tutti i centri italiani l'indimenticabile Atlante di Microscopia Elettronica, pubblicato da Franco Scanga nel 1960, in occasione del 25° Anniversario dell'ISS, in larga parte dedicato alla struttura fine di virus, batteri e protozoi studiati con il "Supermicroscopio ISS" (Figura 27).

Non riuscito fu invece il tentativo della Fondazione Carlo Erba di dar vita ad una nuova rivista, dal titolo *Ultrastructura et Biologia Cellularis* diretta da Angelo Bairati, Silvio Ranzi e Carlo Sirtori dell'Università di Milano e da Daria Bocciarelli dell'ISS, che firmarono il relativo contratto in data 10 luglio 1962; ma la rivista non andrà oltre il numero 0 (Figura 28).

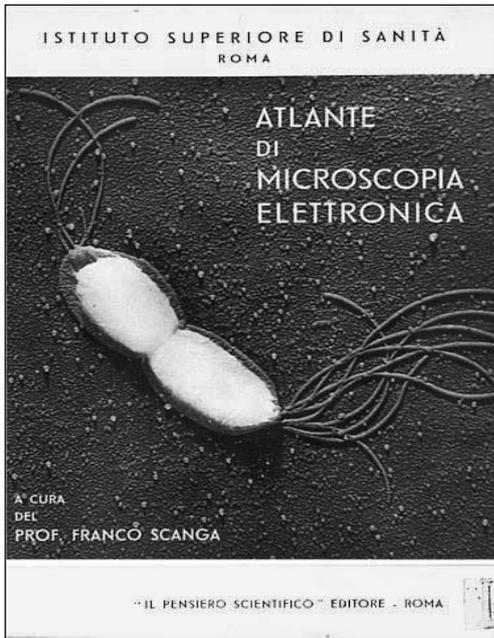


Figura 27 - Atlante di microscopia elettronica a cura del Prof. Franco Scanga, pubblicato nel 1960 in occasione del 25° anniversario dell'ISS.



a



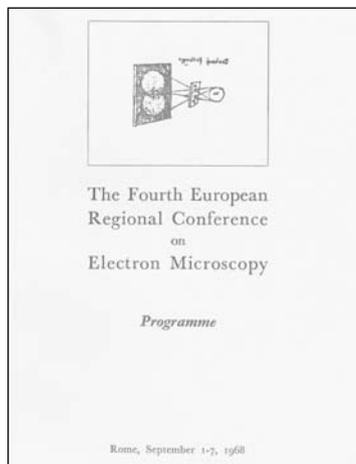
b

Figura 28 - La lettera di impegno firmata dai quattro componenti del comitato direttivo della rivista (a); bozza della copertina della nuova Rivista di studi ultrastrutturali promossa dalla Fondazione Carlo Erba (b).

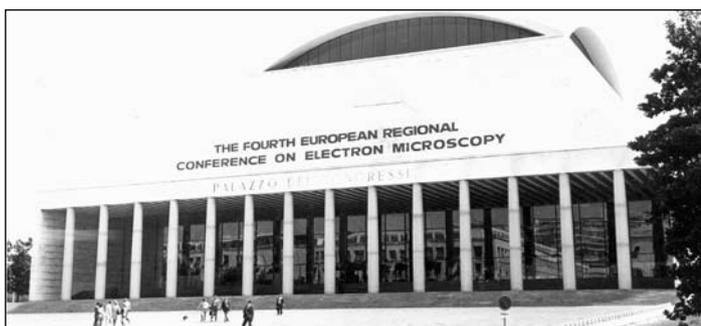
Sul piano formativo assunse particolare rilevanza il “Corso di Addestramento Tecnico alla Microscopia Elettronica” che venne organizzato dai Laboratori di Fisica dell’ISS, per incarico del Comitato Nazionale per la Biologia e Medicina del CNR, che mise a disposizione tre borse di studio. Si trattò di un corso a carattere intensivo della durata di un anno (1° marzo 1968-28 febbraio 1969) che prevedeva due ore di lezione ed un’ora di esercitazione per tre giorni a settimana. Il programma era così articolato: a) nozioni di ottica e fotografia; b) il microscopio elettronico; c) tecniche di preparazione e d) tecniche speciali al microscopio elettronico. Le lezioni e le esercitazioni relative vennero tenute dalla Prof.ssa Bocciarelli e dalle Dott.sse Marta Cremonese, Gabriella Mancini, Franca Podo e Giovanna Procičchiani coadiuvate dai tecnici Giuseppe Arancia, Carlo Ramoni, Fulvia Rosati e Franco Tangucci, tutti del Reparto di Microscopia Elettronica, e per la gestione segretariale dalla Dott.ssa Vilma Alberani e dalla Sig.ra Valeria Dompè. Numerose lezioni sulle tecniche di preparazione vennero inoltre tenute dal Prof. Bruno Bertolini dell’Istituto di Anatomia Comparata dell’Università di Roma.

A livello congressuale notevole rilievo internazionale ebbe la “4th European Regional Conference on Electron Microscopy” (Figure 29-31) che si tenne a Roma dal 1° al 7 settembre 1968 e della quale fu Presidente il Prof. Angelo Bairati dell’Università di Milano, che all’epoca era anche Presidente della SIME. Il comitato organizzatore fu presieduto dal Prof. Luigi Califano, mentre la Prof.ssa Daria Bocciarelli e il Prof. Mario Andreoli ne furono rispettivamente Segretario e Tesoriere; gli altri membri furono i Proff. Giuseppe Andres, Bruno Bertolini, Vittorio Marinozzi, Franco Minio Paluello e Ugo Valdrè.

Svoltasi nel Palazzo dei Congressi all’EUR la conferenza ebbe ampio successo, con la partecipazione di oltre 1.000 congressisti e la presentazione di circa 600 contributi scientifici, compresa la mia prima comunicazione orale in un congresso internazionale che riguardò le ricerche sulla caratterizzazione ultrastrutturale del batteriofago G di cui si è già detto. Tutti i riassunti dei contributi scientifici alla conferenza, corredati da illustrazioni, vennero raccolti in due volumi che furono consegnati ai partecipanti. Parallelamente alla conferenza si svolse anche un’imponente mostra di microscopi elettronici e apparecchiature correlate prodotti da industrie provenienti da diversi Paesi del mondo.



a



b



c

**Figura 29** - Copertina del Programma della Fourth European Regional Conference on Electron Microscopy (a); la sede della Conferenza al Palazzo dei Congressi dell'EUR di Roma (b); la segreteria congressuale (c).



**a**



**b**

**Figura 30** - *Il Prof. Angelo Bairati e la Prof.ssa Daria Bocciarelli accolgono all'ingresso del Palazzo dei Congressi i partecipanti alla Conferenza (a); il Prof. Angelo Bairati rivolge il suo saluto di benvenuto ai congressisti; è riconoscibile alla sua destra il Direttore dell'ISS, Prof. Giovanni Battista Marini Bettolo (b).*



a



b

**Figura 31** - *Due momenti della conferenza: Ugo Valdè, primo da destra, ascolta con attenzione un relatore (a); Angelo Bairati e Daria Bocciarelli, rispettivamente primo e seconda da destra, in una pausa dei lavori posano con due congressisti.*

Indimenticabili per i congressisti furono l'inaugurazione nell'Aula Magna del Palazzo dei Congressi (Figure 30 e 32), il ricevimento organizzato a Castel Sant'Angelo (Figura 32), la cena ufficiale nel Ninfeo di Villa Giulia e l'Udienza speciale del Sommo Pontefice Paolo VI nella residenza estiva di Castel Gandolfo (Figura 33), cui seguì un tour dei Castelli Romani con pranzo tipico finale (Figura 33) che chiuse i lavori congressuali.



**a**



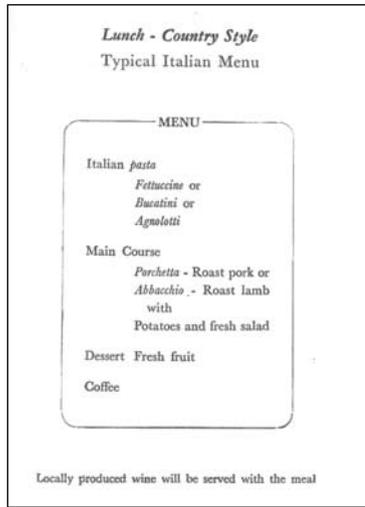
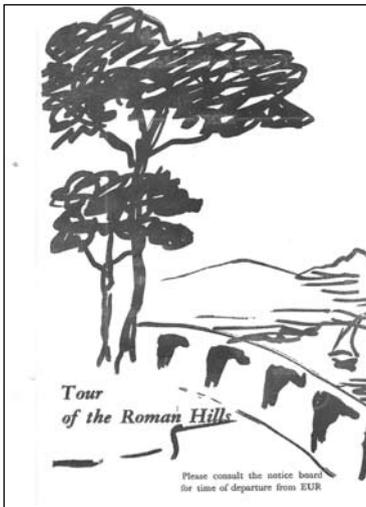
**b**

**Figura 32** - Alcuni congressisti (in primo piano Nora Frontali dell'ISS insieme a Paolo Buffa dell'Università di Modena) durante il ricevimento che segue l'inaugurazione della Conferenza (a); un momento del ricevimento dei congressisti presso Castel San-*l'Angelo* (b).

Alla fine degli anni '60 il microscopio elettronico è quindi diventato uno strumento di cui anche i ricercatori italiani, biologi e fisici, sentono sempre più spesso la necessità, rappresentando un



a



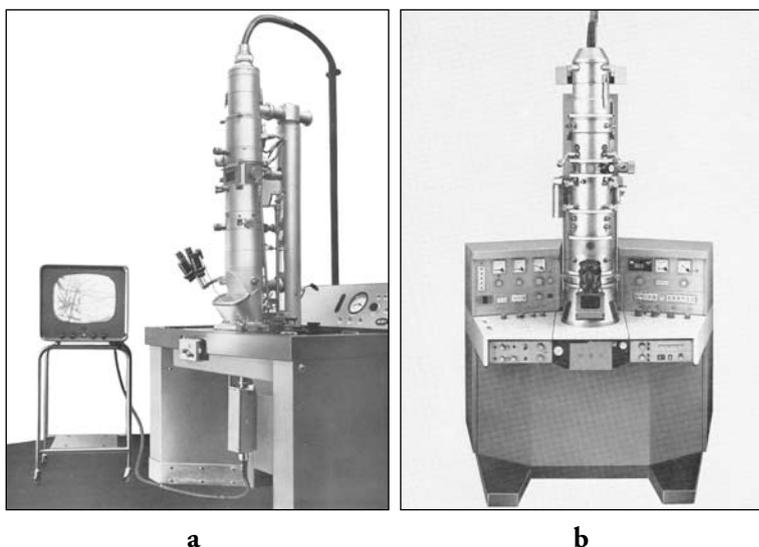
b

**Figura 33** - La foto ricordo della Speciale Udienza Pontificia di sabato 7 settembre 1968 concessa da Paolo VI ai partecipanti della Fourth European Regional Conference on Electron Microscopy nella residenza estiva di Castel Gandolfo (a); l'invito al tour dei Castelli Romani e al pranzo tipico offerto ai partecipanti a chiusura della Conferenza (b).

potente e insostituibile mezzo di indagine morfologica e ultrastrutturale, in grado ormai di superare ampiamente i limiti di ingrandimento e di risoluzione propri dei microscopi ottici.

In quegli anni, il Reparto di Microscopia Elettronica dei Laboratori di Fisica aveva potuto arricchire notevolmente la sua dotazione strumentale, acquisendo nel 1961 un evaporatore metallico della Siemens, nel 1963 un ultramicrotomo LKB 1, nel 1965 un

ultramicrotomo Porter-Blum MT-2 (DuPont Instruments) e nel 1968 un più avanzato evaporatore metallico della 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'AEI modello EM6B prodotto in Inghilterra (Figura 34); questo strumento, oltre ad avere una eccezionale stabilità di funzionamento, permetteva di ottenere immagini ad elevato contrasto con un potere risolutivo di circa  $3\text{\AA}$ , consentendo di spingere le osservazioni in campo biologico a livello di piccoli aggregati molecolari o addirittura di singole molecole. A questo si aggiungerà nel 1973 il nuovo microscopio elettronico Siemens Elmiskop 102 (Figura 34), corredato di accessori per microanalisi a raggi X, anch'esso in grado di offrire un altrettanto elevato potere risolutivo.



**Figura 34** - Microscopio elettronico AEI modello EM6B acquistato dall'Istituto nel febbraio 1969 (a); microscopio elettronico Siemens modello 102 entrato in funzione in Istituto nel 1973 (b).

Questo continuo potenziamento delle prestazioni non era andato tuttavia di pari passo con un adeguato miglioramento delle tecniche di preparazione dei campioni tale da permettere di sfruttare in pieno le potenzialità dei nuovi strumenti. Gli anni '70 registreranno invece sotto questo profilo significativi miglioramenti attraverso

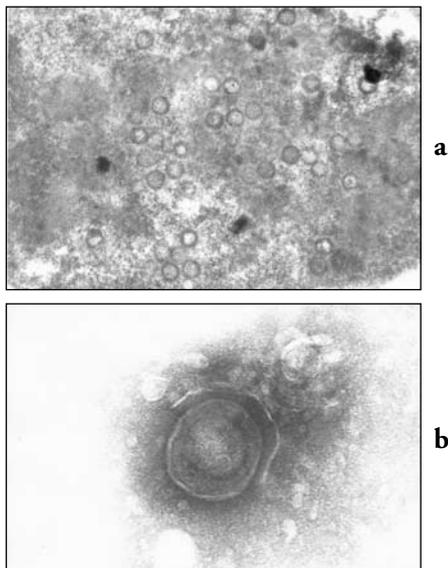
lo sviluppo, soprattutto da parte della DuPont Instruments, della LKB e della Reichert, di ultramicrotomi sempre più sofisticati tali da permettere, attraverso l'utilizzo di lame di diamante, l'ottenimento di sezioni ultrasottili dello spessore di poche centinaia di Å.

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 ed io venni nominato alla direzione del Reparto di Microscopia Elettronica essendo all'epoca l'unico ricercatore di ruolo del Reparto di Biofisica e Biologia Molecolare che si dedicava assiduamente alla ricerca ultrastrutturale in campo microbiologico.

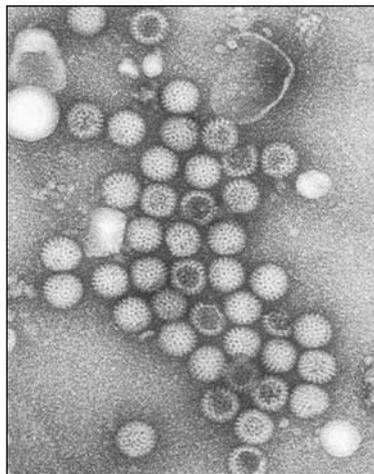
L'anno dopo, a seguito della riforma dell'ISS, disposta dalla Legge n. 519 del 1973, il Reparto di Microscopia Elettronica dei Laboratori di Fisica troverà una sua nuova collocazione nel Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia, con l'intento di sottolinearne l'ormai prevalente indirizzo applicativo in campo biomedico; assumerà così nel 1976 la nuova denominazione di Reparto di Ultrastrutture Biologiche, alla cui direzione venni confermato. Nello stesso anno venni eletto membro del Consiglio Direttivo della SIME, carica che ricoprirò fino al 1981.

In quel periodo, la microscopia e l'immunomicroscopia elettronica si affermarono quali potenti e talora insostituibili strumenti per la diagnosi di laboratorio di agenti virali non coltivabili o di difficile isolamento (Donelli G, *et al.*, 1979). Nell'aprile 1980, la diagnosi differenziale vaiolo-varicella (Figura 35) tramite la microscopia elettronica mi vedrà impegnato insieme a Franco Tangucci e accanto agli esperti dell'OMS, in occasione del caso di sospetto vaiolo a Sesto S. Giovanni (Milano) che risultò poi trattarsi di varicella.

In quegli anni, il Reparto di Microscopia Elettronica fu anche chiamato a svolgere indagini su campioni provenienti da soggetti in età pediatrica deceduti in provincia di Napoli per affezioni respiratorie acute, definite allora come "il male oscuro" (Donelli G, *et al.*, 1981; Pocchiari F, *et al.*, 1981); e ancora ad applicare la microscopia elettronica alla diagnosi rapida di laboratorio di rotavirus in campioni fecali di neonati prematuri affetti da gastroenterite (Rocchi G, *et al.*, 1981; Donelli G, *et al.*, 1981, 1982) (Figura 36) e di bambini con gastroenterite acuta (Nigro G, *et al.*, 1982).



**Figura 35** - Virus della varicella osservato in contrasto negativo al microscopio elettronico: (a) particelle virali osservate a 60.000X e (b) a 200.000X nei campioni prelevati dal caso di sospetto vaiolo dell'aprile 1980.



**Figura 36** - Nel fascicolo del 2 luglio 1981 del Bollettino Epidemiologico Nazionale vengono riportati i risultati delle indagini condotte mediante microscopia elettronica su 1.350 campioni fecali raccolti da 168 neonati prematuri e immaturi, ricoverati presso l'Ospedale "Bambino Gesù" di Roma tra l'ottobre 1980 ed il maggio 1981.  
I neonati coinvolti nel rapporto, di numero, nel corso della prima giornata di vita e la durata media della diagine e nell'ordine dei 61 giorni, nei confronti complessivi 2 settimane e 7 mesi. Campioni di feci per la ricerca di rotavirus sono stati prelevati all'ingresso in reparto e successivamente durante tutto il ricovero, per tutta la durata della diagine di ricovero.

Abbiamo così passato in rassegna le tappe principali che hanno caratterizzato lo sviluppo della microscopia elettronica all'ISS dal 1942 fino alla istituzione del Laboratorio di Ultrastrutture che avvenne nell'ottobre del 1982. L'istituzione di questo Laboratorio fu dovuta alla lungimiranza scientifica dell'allora Direttore dell'ISS, Prof. Francesco Pocchiari, scienziato e manager dalle insostituibili doti professionali ed umane (Alberani V, *et al.*, 1990) che ne promuoverà il crescente, ininterrotto sviluppo fino alla sua prematura scomparsa nel gennaio 1989 (Figura 37).

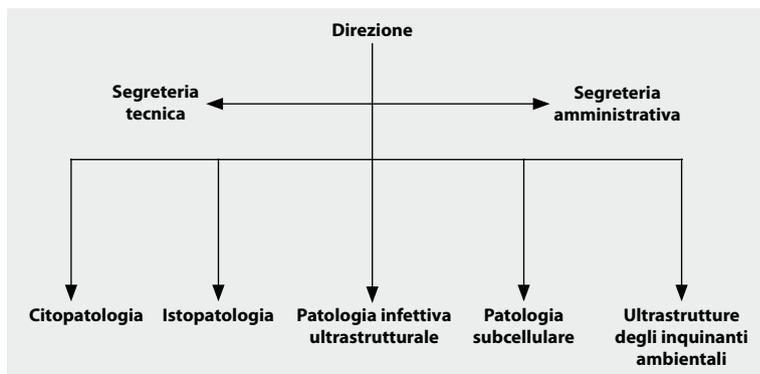


**Figura 37** - Il Prof. Francesco Pocchiari, Direttore dell'ISS dal 1972 al 1989.

Lo “storico nucleo” di ricercatori e tecnici che aveva dato vita nel corso degli anni ai successivi momenti di sviluppo, imposti sia dall'evolversi dei tempi che dalla necessità di adeguarsi alle sempre crescenti funzioni dell'ISS, si era man mano assottigliato tanto che al momento della istituzione del nuovo Laboratorio di Ultrastrutture, oltre a me, vi erano di ruolo solo due ricercatori, Giuseppe Arancia e Luigi Paoletti, e quattro tecnici - Egidio Chessa, Pasqualina Crateri, Franco Tangucci e Fulvia Valente. Nel nuovo Laboratorio confluirono tuttavia ricercatori di altri laboratori: Alfredo Caprioli, Vincenzo Falbo e Franco Maria Ruggeri dal Laboratorio di Batteriologia e Virologia e Salvatore Caiazza dal Laboratorio di Ingegneria Biomedica.

A questo gruppo iniziale, la pianta organica prevista per il Laboratorio permetterà di affiancare ben presto sei nuovi ricercatori: Walter Malorni, Carla Fiorentini, Fiorella Malchiodi Albedi, Domenica Taruscio, Marco Diociaiuti e Fabiana Superti; e ben venti tecnici a vari livelli, molti dei quali laureati: Mario Araco, Lucilla Baldassarri, Domenico Batisti, Lamberto Camilli, Fabrizio Ciaralli, Agnese Molinari, Mario Falchi, Giuseppe Formisano, Silvana Giovannangeli, Francesca Iosi, Maria Luisa Marziano, Fabio Minelli, Stefania Meschini, Sergio Notargiacomo, Assunta Nusca, Silvia Paradisi, Dario Pisani, Michele Sciotti, Antonella Tinari, Laura Toccieli; ed infine, non meno importanti, cinque collaboratrici di Amministrazione: Santina Amici, Maria Grazia Cappella, Daniela Lombardi, Rosanna Loreti e Loredana Tranquilli e cinque di Segreteria Tecnica: Giuse Ardita, Marzia Capelli, Alessandra Ceccarini, Felicina Forteleoni, Anna Maria Morace, cui si affiancheranno negli anni altre tre collaboratrici a contratto: Donatella Lombardi, Odile Krugell e Cristina Di Lollo.

Viene appresso riportato l'organigramma del Laboratorio con la suddivisione in reparti prevista dal regolamento istitutivo.



Il rapido sviluppo del Laboratorio consentì, dopo qualche anno, di poter assegnare numerose borse di studio e contratti di collaborazione sia a giovani laureati che vi avevano svolto la loro tesi sperimentale che a promettenti ricercatori reclutati nelle Università o in altre istituzioni di ricerca. Il lungo elenco comprende: Giuseppina Baldo, Stefano Barrucci, Maria Bartolomei, Maria Patrizia Beltrano, Luana Biondo, Annarica Calcabrini, Susanna Cavallo, Cassandra Conti,

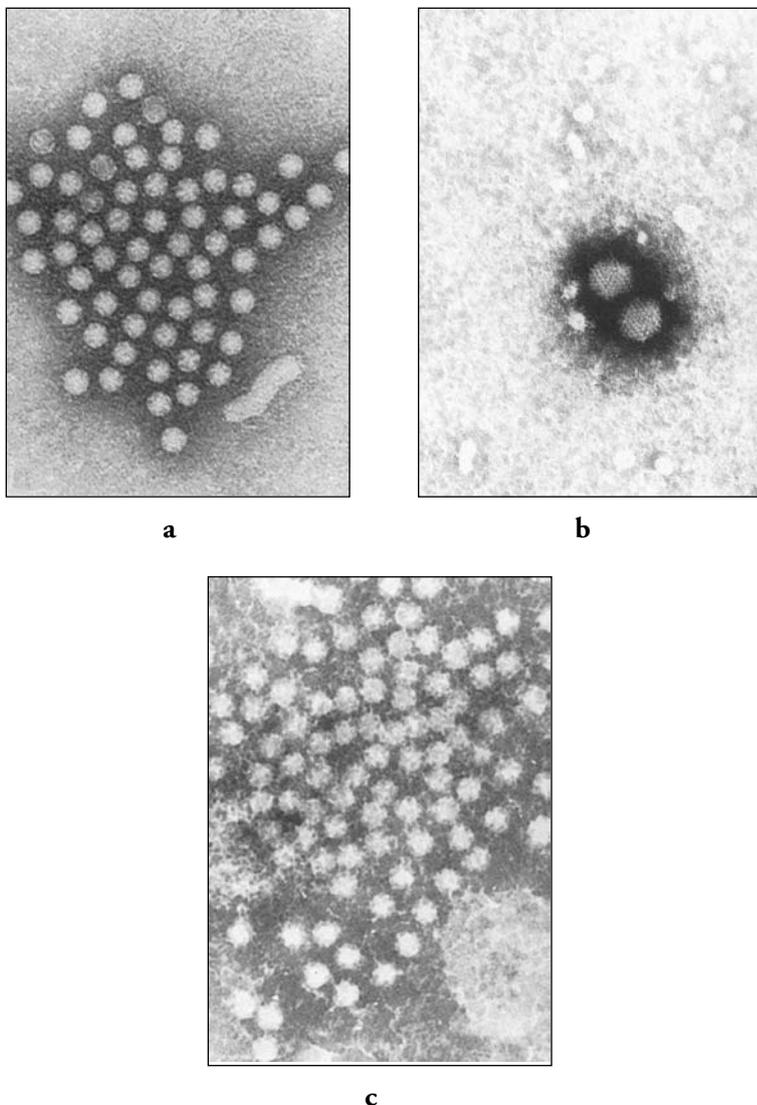
Laura Eibenschutz, Alessia Fabbri, Loredana Falzano, Maria Familietti, Ivan Gabrielli, Antonella Gelosia, Roberto Giusti, Gabriella Griso, Paola Mancini, Paola Matarrese, Roberto Morelli, Carla Passi, Fiorella Piemonte, Gabriella Rainaldi, Simonetta Rebessi, Roberto Rivabene, Enrica Salvatori, Maria Teresa Santini, Elisabetta Straface, Annarita Strigaro, Cristina Tommasini, Paola Veronese e Maria Cristina Voglino. E molti di loro, sperando di non averne dimenticati troppi, entreranno poi nell'organico dell'Istituto.

Al Laboratorio di Ultrastrutture erano state 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;
- 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.

Per quanto riguarda i microrganismi ed i processi infettivi da essi sostenuti, il Laboratorio continuò a svolgere un'intensa attività di ricerca sui virus enterici e sulle sostanze naturali e di sintesi in grado di esplicare un'attività antivirale specifica nei riguardi di questi agenti. Oltre a proseguire lo studio sui rotavirus responsabili di infezioni gastroenteriche sia nell'uomo che negli animali, l'attenzione verrà rivolta anche agli adenovirus enterici, agli astrovirus, ai virus di Norwalk (Figura 38), ai coronavirus e agli "small round viruses" (Capano G, *et al.*, 1982; Castrucci G, *et al.*, 1983; Caprioli A, *et al.*, 1985; Donelli G, 1986; Ruggeri FM, *et al.*, 1986; Donelli G, *et al.*, 1988; Ruggeri F, *et al.*, 1989; Superti F, *et al.*, 1989; Donelli G, *et al.*, 1992).

Su queste tematiche il Laboratorio di Ultrastrutture avviò una serie di contatti con laboratori europei e statunitensi che portarono a forme diverse di collaborazione, inclusi i soggiorni di studio di Antonella Tinari nel 1986 nel Department of Virology del Royal



**Figura 38** - *Virus enterici osservati in contrasto negativo al microscopio elettronico: astrovirus (a); adenovirus (b); virus di Norwalk (c).*

Victoria Infirmary a Newcastle Upon Tyne (UK), diretto da Dick Madeley; e di Franco Maria Ruggeri nel 1988-1990 nel laboratorio di Harry B. Greenberg presso il Department of Medicine, Microbiology and Immunology dell'Università di Stanford in California

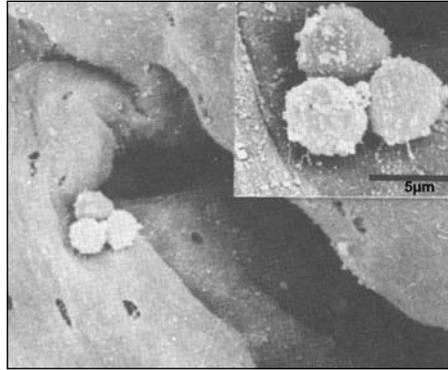
(Ruggeri FM, Greenberg HB, 1991). In quel periodo inoltre, nell'ambito delle iniziative dell'Unione Europea, a favore di Paesi in via di sviluppo quali l'Albania, il Laboratorio contribuì all'addestramento di giovani ricercatori; tra questi la Dott.ssa Elena Diamanti (Figura 39) di Tirana che, dopo un periodo di circa un anno trascorso in Istituto nei primi anni '90, tornò nel suo Paese continuando tuttavia a collaborare con il Laboratorio di Ultrastrutture (Superti F, *et al.*, 1995; Diamanti E, *et al.*, 1996).



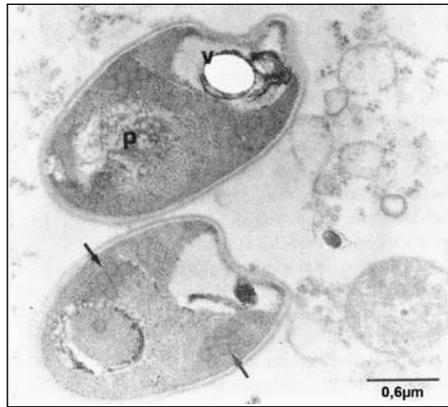
**Figura 39** - Nello studio del Direttore del Laboratorio di Ultrastrutture (al centro), la Dott.ssa Elena Diamanti (a sinistra) del Research Institute of Hygiene di Tirana che, nei primi anni '90 frequentò come ricercatore ospite il Reparto di Patologia Infettiva Ultrastrutturale diretto dalla Dott.ssa Fabiana Superti (a destra).

In collaborazione con ematologi dell'Università "La Sapienza" di Roma e parassitologi dell'Istituto, vennero inoltre studiate infezioni enteriche da *Cryptosporidium* (Figura 40) ed *Enterocytozoon* in pazienti ematologici immunocompromessi e in pazienti con AIDS (Gentile G, *et al.*, 1987; Martino P, *et al.*, 1988; Caprioli A, *et al.*, 1989; Donelli G, *et al.*, 1989; Gentile G, *et al.*, 1991; Rossi P, *et al.*, 1992).

Vennero anche condotti importanti studi sui fattori e sui meccanismi di virulenza di batteri aerobi ed anaerobi, a cominciare dalla scoperta di una nuova tossina batterica, il fattore citotossico necrotizzante (CNF) di *Escherichia coli*, che venne descritta per la prima volta in un lavoro pubblicato nel 1983 su *Infection and Immunity*



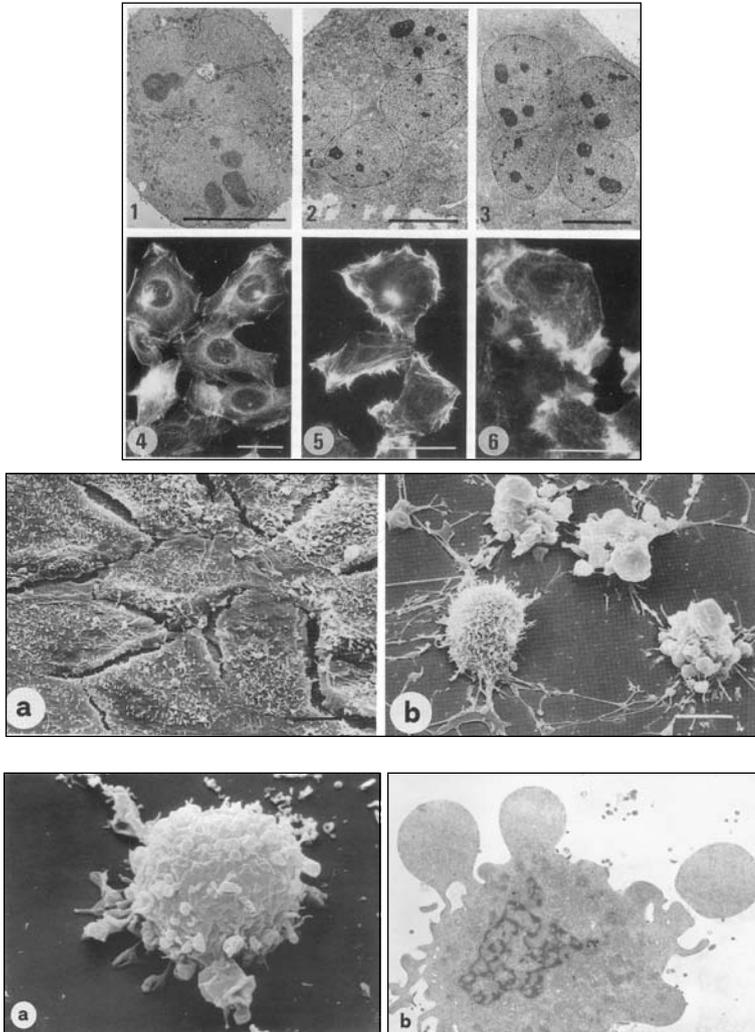
a



b

**Figura 40** - Cellule di *Cryptosporidium* spp. adese alla mucosa del colon, osservate in microscopia elettronica a scansione (a); spore di *Enterocytozoon* in una sezione ultrasottile di biopsia duodenale umana osservata in microscopia elettronica a trasmissione (b); nelle spore oltre al vacuolo (v) e al polaroplasto (p) è evidenziato (freccie) il numero di avvolgimenti del filamento polare.

(Caprioli A, *et al.*, 1983). Sia del CNF (Falbo V, *et al.*, 1986; Ruggeri F, *et al.*, 1986; Fiorentini C, *et al.*, 1988) che delle tossine A e B di *Clostridium difficile* (Fiorentini C, *et al.*, 1989; Fiorentini C, *et al.*, 1990; Malorni W, *et al.*, 1990; Fiorentini C, Thelestam M, 1991; Malorni W, *et al.*, 1991; Donelli G, Fiorentini C, 1992) verranno studiati, in sistemi cellulari *in vitro*, i meccanismi di azione e gli effetti citoscheletrici (Figura 41). Nel 1989-1990 Carla Fiorentini si recò nel Laboratorio di Monica Thelestam al Department of Bacteriology



**Figura 41** - Nelle micrografie in alto sono mostrati gli effetti del fattore citotossico necrotizzante (CNF) di *Escherichia coli* su cellule HEP-2 in coltura osservati mediante microscopia elettronica a trasmissione (1-3) e microscopia ottica a fluorescenza (4-6). Nelle micrografie elettroniche a scansione al centro sono mostrate cellule IEC-6 di controllo (a) e dopo trattamento con 1,5  $\mu\text{g/ml}$  di tossina A di C. difficile per 3h (b): sono evidenti i fenomeni di retrazione del corpo cellulare con successivo arrotondamento e comparsa di blebs. Nelle micrografie in basso è mostrata in (a) una cellula HF19 osservata in microscopia elettronica a scansione dopo trattamento per 24h con 0,15  $\mu\text{g/ml}$  di tossina B di C. difficile che mostra arrotondamento e formazione di piccole blebs; in (b) una cellula HEP-2 dopo lo stesso trattamento osservata in sezione sottile in microscopia elettronica a trasmissione.

del Karolinska Institutet di Stoccolma, avviando una collaborazione sul meccanismo di azione delle tossine batteriche che proseguirà per molti anni (Fiorentini C, Thelestam M, 1991; Donelli G, *et al.*, 1992; Fiorentini C, *et al.*, 1992; Thelestam M, *et al.*, 1992); mentre nel 1992 Loredana Falzano si recherà a Parigi ove frequenterà per un anno il laboratorio del Prof. Patrice Boquet presso l'Unité des Antigènes Bactériennes dell'Istituto Pasteur, approfondendo le tecniche di purificazione delle tossine batteriche e di studio dei meccanismi d'azione (Falzano L, *et al.*, 1993).

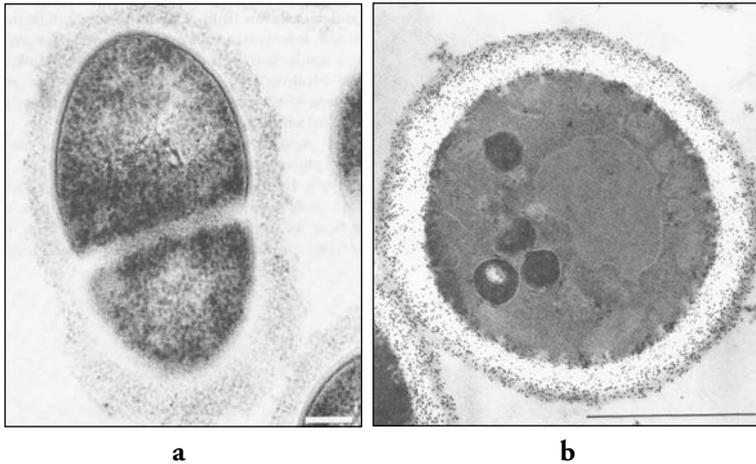
Queste ed altre ricerche saranno rese più agevoli dalla disponibilità di un secondo microscopio elettronico a scansione Cambridge Stereoscan 360 (Figura 42), particolarmente indicato per lo studio di campioni biologici, che si affiancherà al Philips 515 già in funzione da molti anni ma più adatto per osservazioni di campioni non biologici; quest'ultimo verrà comunque presto sostituito da un nuovo microscopio a scansione Philips modello XL30L.

Risultati interessanti verranno inoltre ottenuti dallo studio di strutture microbiche di superficie in streptococchi (Orefici G, *et al.*, 1986; Baldassarri L, *et al.*, 1987; Molinari A, *et al.*, 1987, 1988) clostridi (Baldassarri L, *et al.*, 1989, 1991) e candida (Molinari A, *et al.*, 1992) (Figura 43). Nel 1992 Lucilla Baldassarri si recherà nel



**Figura 42** - Microscopio elettronico a scansione Cambridge modello Stereoscan 360 in dotazione al Laboratorio di Ultrastrutture dal 1990.

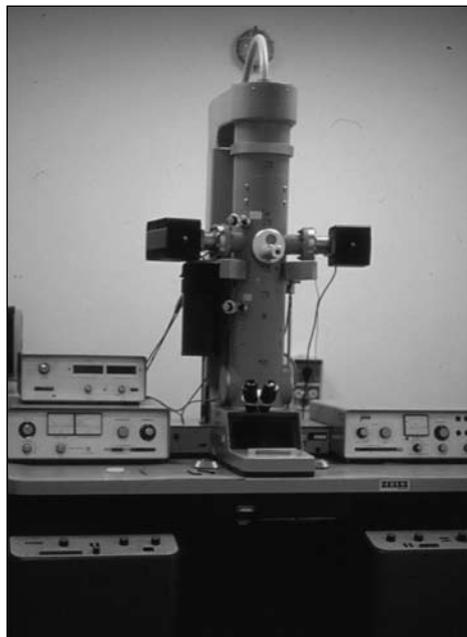
laboratorio del Prof. Gordon D. Christensen, presso la Division of Infectious Diseases dell'Università del Missouri (Columbia, USA), dove si occuperà della messa a punto di tecniche di fissazione e purificazione dello slime batterico, lavorando in particolare su quello prodotto da *Staphylococcus epidermidis* durante la formazione di biofilm (Baldassarri L, *et al.*, 1993; 1996).



**Figura 43** - Micrografia di sezione ultrasottile di *Streptococcus* spp. (gruppo B) incubata con specifico antisiero, barra = 0,1 $\mu$ m (a). Immunolocalizzazione di una manno-proteina espressa sulla parete cellulare di *Candida albicans*, rivelata tramite marcatura con oro colloidale su sezioni ultrasottili, barra = 1 $\mu$ m (b).

Con l'acquisizione di due nuovi microscopi elettronici a trasmissione, uno Zeiss EM 10C nel 1984 ed uno Zeiss 902 nel 1990 (Figura 44), gli studi ultrastrutturali su virus, batteri, miceti e cellule eucariotiche si avvantaggeranno molto sia sul piano qualitativo, per le prestazioni migliori fornite da questi strumenti, che su quello quantitativo, per il significativo aumento di ore-microscopio disponibili.

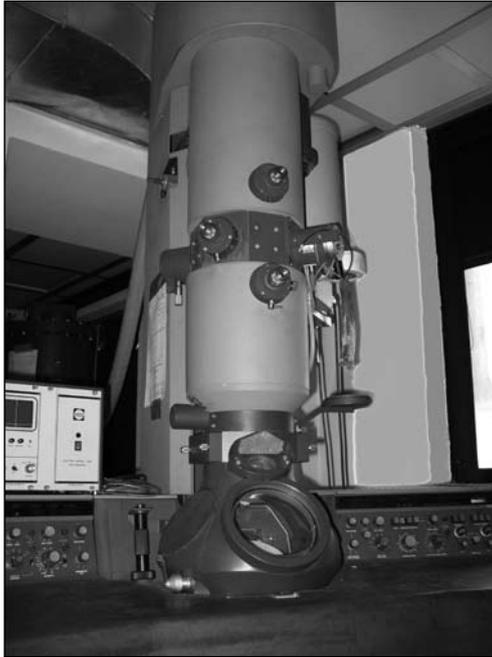
Nei primi anni '80 vennero anche pubblicati da ricercatori del Laboratorio i risultati delle prime indagini sistematiche sulle polveri di talco utilizzate in Italia, condotte allo scopo di stabilirne la contaminazione in amianto (o asbesto) tramite l'impiego della microscopia elettronica in trasmissione associata alla microanalisi a raggi X a dispersione di energia (Paoletti L, *et al.*, 1982). Tali indagini analitiche riceveranno notevole impulso con l'acquisizione, alla fine del 1984 del nuovo microscopio elettronico ad alto



**Figura 44** - Microscopio elettronico a trasmissione Zeiss 902 in dotazione al Laboratorio di Ultrastrutture dal 1990.

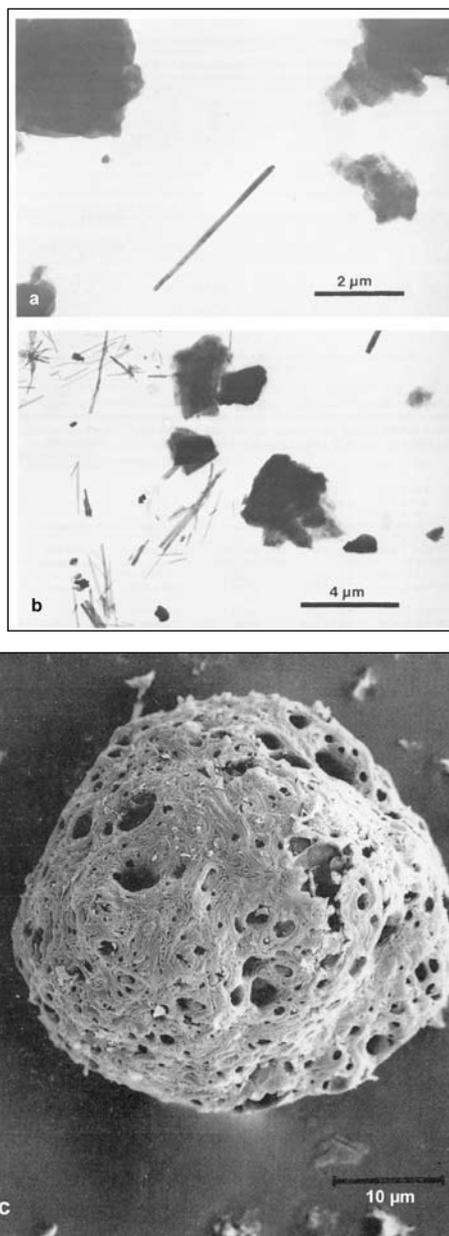
voltaggio EM430 della Philips (Figura 45), capace di lavorare ad una tensione di accelerazione degli elettroni compresa tra 80 e 300 KeV.

L'osservata contaminazione da amianto in un significativo numero di campioni di talco di provenienza italiana porterà l'Istituto a richiedere ed ottenere dalla Farmacopea Europea la possibilità di analizzare campioni di talco provenienti sia da Paesi europei che extraeuropei. Nel 50% dei campioni venne evidenziata la presenza di amianto, per lo più tremolite ma anche crisotilo e antofillite; circa il 75% delle fibre di amianto osservate risultarono inoltre più sottili di  $0,4\mu\text{m}$ , cioè al di sotto del potere risolutivo del microscopio ottico che veniva allora correntemente impiegato per i controlli sulla presenza di contaminanti fibrosi (Paoletti L, *et al.*, 1984) (Figura 46). Tali evidenze portarono la Farmacopea Ufficiale Italiana ad inserire nella sua nona edizione, pubblicata nel 1985, le tecniche di microscopia elettronica analitica messe a punto per queste indagini tra quelle necessarie per accertare l'eventuale presenza di "fibre microscopiche



**Figura 45** - Microscopio elettronico a trasmissione ad alto voltaggio Philips EM430 in dotazione al Laboratorio di Ultrastrutture dal 1984.

e submicroscopiche” di asbesto nei talchi per uso farmaceutico (Ministero della Sanità, 1985). A questi studi sui talchi furono affiancate indagini su campioni autoptici di soggetti professionalmente esposti ad amianto, deceduti per mesotelioma pleurico o peritoneale, al fine di caratterizzare la tipologia delle fibre presenti nei loro tessuti (Donelli G, Paoletti L, 1985). Di particolare rilievo furono poi gli studi condotti, con tecniche di microscopia elettronica analitica, sia sulla correlazione esistente tra inquinamento da particolato aerodisperso e traffico veicolare che sull'esposizione occupazionale a polveri e fibre minerali (Donelli G, Paoletti L, 1986; Paoletti L, *et al.*, 1987; Viviano G, *et al.*, 1988; Paoletti L, *et al.*, 1989). Notevole interesse sanitario rivestì inoltre lo studio di campioni autoptici polmonari di 85 soggetti residenti in area urbana, appartenenti a diverse fasce di età, deceduti per cause diverse ma senza esposizione occupazionale alle polveri; questo studio dimostrò come la residenza in area urbana e il fumo determinino in modo preminente il tipo e la quantità del

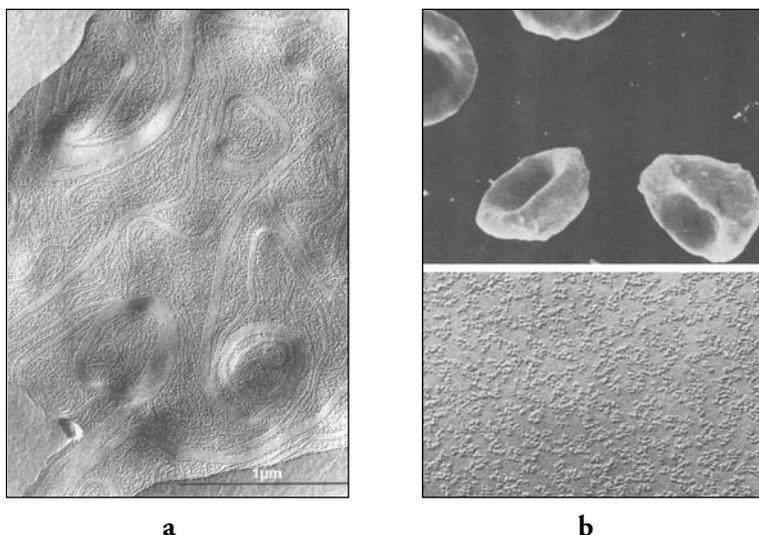


**Figura 46** - In alto, fibre di tremolite (a) e crisotilo (b) osservate in campioni di talco per uso farmaceutico. In basso, cenosfera prodotta dalla combustione di olii minerali, osservata in microscopia elettronica a scansione in un campione di particolato aerodisperso (c).

carico polmonare in soggetti non professionalmente esposti, con conseguente diminuita funzionalità dei sistemi di clearance muco-ciliare e macrofagica (Paoletti L, *et al.*, 1991).

Questa intensa attività di ricerca ebbe ricadute concrete sulla politica sanitaria del nostro Paese nei riguardi dell'amianto, a cominciare dall'emanazione della Circolare del Ministero della Sanità n. 45 del 10 luglio 1986 che, sulla base degli specifici elementi tecnico-scientifici forniti dal Laboratorio di Ultrastrutture, consentì di affrontare il problema della presenza dell'amianto nelle scuole e negli ospedali. Nell'aprile del 1987 il Direttore dell'ISS costituì un gruppo di studio con esperti interni ed esterni all'Istituto, chiamando a farne parte me, in veste di Coordinatore, e Luigi Paoletti; compiti del gruppo erano quelli di definire metodi standardizzati di prelievo delle fibre di amianto negli ambienti presi in considerazione dalla Circolare e di standardizzare le metodiche di microscopia ottica ed elettronica e di diffrazione a raggi X, da impiegare per le attività analitiche previste dalla Circolare stessa. Nello stesso anno il Ministro della Sanità decise l'istituzione di un gruppo di studio interministeriale sull'amianto e ne affidò la Presidenza al Dott. Leonardo Toti, Direttore dei Servizi di Igiene Pubblica del Ministero e già Direttore Amministrativo dell'ISS, e a me la Vice-Presidenza. Iniziò così un percorso istituzionale che vide sempre più il Laboratorio di Ultrastrutture in prima fila nella lotta all'amianto fino all'approvazione della Legge 27 marzo 1992 n. 257 "Norme relative alla cessazione dell'impiego dell'amianto" e, successivamente, nell'ambito della Commissione per la valutazione dei problemi ambientali e dei rischi sanitari connessi all'impiego dell'amianto. La responsabilità scientifica ed organizzativa della Conferenza Nazionale sull'Amianto, che mi verrà affidata nel 1999 dalla Presidenza del Consiglio dei Ministri, rappresenterà il meritato riconoscimento dell'attività quasi ventennale svolta in questo settore dal Laboratorio di Ultrastrutture.

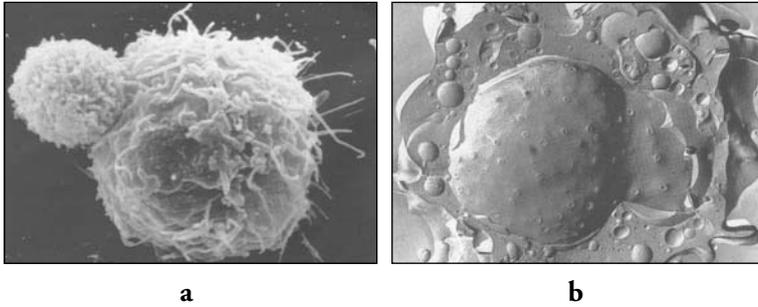
A metà degli anni '80 venne anche avviato un altro filone di ricerca molto promettente, come si dimostrerà in seguito, riguardante lo studio del meccanismo d'azione a livello subcellulare di agenti anti-tumorali di diversa natura, quali l'adriamicina, la lonidamina (Figura 47) e la daunomicina (Arancia G, *et al.*, 1985; 1988; Molinari A, *et al.*, 1990; Arancia G, Donelli G, 1991; Malorni W, *et al.*, 1992).



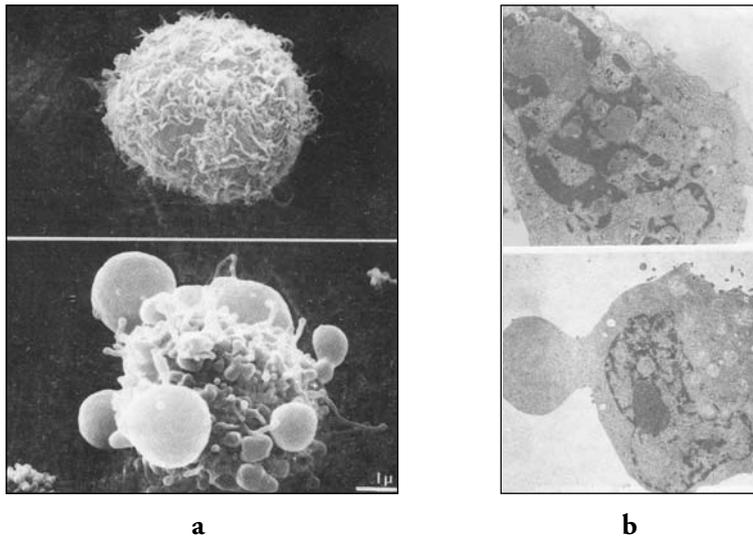
**Figura 47** - (a) Modificazioni ultrastrutturali indotte dall'adriamicina sulla membrana plasmatica di eritrociti umani, rivelabili mediante la tecnica del freeze-fracturing; (b) in alto, forme stomatocitiche e a coppa di eritrociti umani, osservabili in microscopia elettronica a scansione, dopo 2h di trattamento con lonidamina 0,8 mM; in basso, domini lipidici e aggregati di particelle intramembranose osservabili sulla membrana plasmatica (faccia di frattura protoplasmatica) di eritrociti umani trattati per 2h con lonidamina 0,8 mM.

Negli stessi anni vennero condotti interessanti studi volti a definire la morfologia ultrastrutturale dei granulociti eosinofili umani (De Simone C, *et al.*, 1982; Donelli G, *et al.*, 1982) e dei linfociti T e B (Arancia G, *et al.*, 1983; 1986; Arancia G, Donelli G, 1988); furono anche indagati i meccanismi coinvolti nella lisi delle cellule tumorali indotta da linfociti T citotossici e da cellule ad attività "natural killer" (Malorni W, *et al.*, 1989; Arancia G, *et al.*, 1991) (Figura 48).

Nel campo della patologia subcellulare il Laboratorio sviluppò ricerche di citotossità (Figura 49), da agenti di origine biologica (citochine), chimica (solventi, chinoni) e fisica (ipertermia, radiazioni, campi elettromagnetici a bassissima frequenza), approfondendo in modo originale numerosi aspetti della sofferenza e morte cellulare indotte da tali agenti (Malorni W, *et al.*, 1987; Molinari A, *et al.*, 1987, Malorni W, *et al.*, 1988; Bellomo G, *et al.*, 1990; Malorni W,



**Figura 48** - (a) Interazione stretta tra una cellula natural killer (in alto a sinistra) ed una cellula bersaglio tumorale K562 osservate al microscopio elettronico a scansione; (b) grande linfocita granuloso umano osservato dopo freeze-fracturing: sulla faccia di frattura della membrana interna dell'involucro nucleare sono visibili numerosi pori e il citoplasma appare ricco di granuli.



**Figura 49** - (a) Modificazioni della superficie cellulare (blebbing) indotte da stress ossidativo e rivelate tramite microscopia elettronica a scansione; (b) sezioni ultrasottili di cellule epiteliali A431 trattate con: cicloesimide (in alto) in cui sono evidenti alterazioni a livello del nucleo e degli organuli cellulari e condensazione della cromatina; TNF (in basso) in cui è evidente la comparsa di blebs già dopo 3h di trattamento.

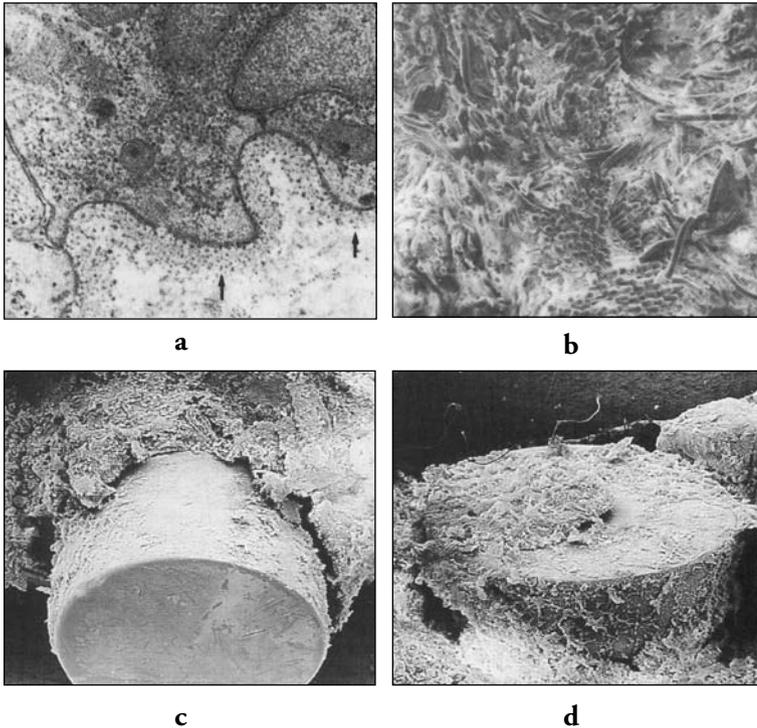
*et al.*, 1990; Malorni W, Donelli G, 1991; Paradisi S, *et al.*, 1992; Santini MT, *et al.*, 1992). In particolare, si puntò ad approfondire il ruolo del citoscheletro nei processi patologici per lo più ipotizzando

meccanismi di citotossicità citoscheletro-dipendenti. Inoltre, avendo identificato i gruppi tiolici delle proteine del citoscheletro quali bersagli del danno provocato dalla formazione di radicali liberi in seguito ad esposizione ad agenti ossidanti si studierà il ruolo protettivo di alcuni antiossidanti, ed in particolare dell'N-acetilcisteina, nei riguardi dei processi di sofferenza e morte cellulare (Malorni W, *et al.*, 1995).

Parallelamente a queste ricerche, nell'ambito del Reparto di Istopatologia, vennero anche condotti interessanti studi istochimici dei glicconiugati nelle cellule epiteliali della mucosa intestinale (Figura 50), evidenziando a livello ultrastrutturale la localizzazione di glicoproteine non collageniche della matrice extracellulare quali laminina e fibronectina (Malchiodi Albedi F, *et al.*, 1988, 1990). Nel biennio 1989-1990 Domenica Taruscio, ricercatrice del Reparto, si recò per un soggiorno di studio nel Department of Human Genetics della Yale University (USA) diretto dal Prof. David Ward dove collaborò con la Prof.ssa Laura Manuelidis apprendendo numerose tecniche all'epoca avanzate quali la "fluorescence in situ hybridization" e collaborando a ricerche in neuropatologia (Taruscio D, *et al.*, 1991). Nel 1992 poi la Dott.ssa Malchiodi Albedi, Direttore del Reparto di Istopatologia, trascorrerà anch'essa un periodo di ricerca negli USA presso il Department of Neurology del Massachusetts General Hospital di Boston.

Un altro filone di ricerca che si aprì con l'istituzione del Laboratorio di Ultrastrutture fu quello relativo alla caratterizzazione ultrastrutturale di biomateriali e dispositivi medici impiantabili. I primi studi riguardarono la messa a punto di un metodo rapido di caratterizzazione dimensionale, mediante microscopia elettronica e analisi di immagine, di particelle di perfluorocarboni dei quali era stato ipotizzato l'impiego come sostituti ematici in quanto ottimi trasportatori di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (Caiazza S, *et al.*, 1983; 1984; 1986; 1987). Vennero inoltre condotti studi ultrastrutturali comparativi sulla degradazione delle guaine isolanti in poliuretano e in silicone di elettrocatereteri espantati da pazienti giungendo a riconoscere come le migliori prestazioni a lungo termine fossero quelle offerte dalle guaine in silicone (Barbaro V, *et al.*, 1984; 1985). Nel campo della emodialisi, il dimostrato rilascio di particelle di silicio dalle linee e dagli emofiltro, mediante indagini di microscopia elettronica associa-

ta a microanalisi a raggi X, fu messo in relazione con l'evidenza di epatosplenomegalia in pazienti pluriemodializzati (Lambertico P, *et al.*, 1984; Giangrande A, *et al.*, 1986; Caiazza S, *et al.*, 1988). Nel settore della implantologia dentale fu messo a punto (Caiazza S, *et al.*, 1991) un supporto sperimentale in titanio, polimetilmetacrilato e Dacron, tessuto sintetico di cui era stata in precedenza verificata (Figura 50) l'osteointegrabilità (Caiazza S, *et al.*, 1988). In collaborazione con il suo ideatore, venne inoltre ottimizzata la cheratoprotesi biointegrabile di Pintucci (Figura 50), un nuovo tipo di dispositivo che, per le sue caratteristiche funzionali, risulterà in grado di sostituire vantaggiosamente la classica osteo-odonto-cheratoprotesi di Strampelli (Caiazza S, *et al.*, 1988; 1990).



**Figura 50** - (a) Mucosa normale di colon umano con glicosaminoglicani solfati regolarmente distribuiti lungo la membrana basale epiteliale, a entrambi i lati (freccie) della lamina densa; (b) filamenti di tessuto di Dacron inclusi in osso; (c) superficie esterna ed interna (d) del cilindro ottico circondato dal feltro di Dacron di una cheratoprotesi di Pintucci, osservata in microscopia elettronica a scansione dopo 10 mesi dall'impianto nel paziente.

Nei primi anni '90 iniziò infine lo studio delle infezioni associate ai biomateriali ed in particolare di quelle correlate all'impianto di cateteri vascolari (Caiazza S, Donelli G, 1991), problema ancora oggi irrisolto su cui si stanno proseguendo gli studi con l'obiettivo di mettere a punto dispositivi impiantabili in grado di prevenire l'adesione microbica e di impedire lo sviluppo di biofilm (Donelli G, *et al.*, 2007).

A questa intensa e diversificata attività scientifica, i cui risultati erano oggetto di frequenti relazioni a invito e comunicazioni ai principali convegni, sia di microscopia elettronica che di altre discipline afferenti alle proprie attribuzioni istituzionali, il Laboratorio di Ultrastrutture affiancò l'organizzazione di corsi e congressi, sia a carattere nazionale che internazionale.

Nel 1983, nell'ambito dell'International School of Electron Microscopy diretta da Ugo Valdrè, venni chiamato a contribuire quale docente e segretario scientifico all'organizzazione, del 6th Course "Recent Progress in Electron Microscopy and Microanalysis Technique of Biological Specimens" che si tenne ad Erice dal 5 al 16 aprile sotto la direzione di Ivonne Pasquali Ronchetti dell'Università di Modena.

L'anno dopo venne organizzato dal Laboratorio, dal 1° al 4 ottobre 1984, il corso "Criotecniche in Microscopia Elettronica e loro Applicazioni Biologiche".

Dal 1988 al 1996 verranno poi organizzate dal Direttore del Laboratorio una serie di iniziative formative e di aggiornamento rivolte essenzialmente ad operatori scientifico-sanitari regionali:

1) Corso Nazionale sulle Problematiche Sanitarie Correlate all'Amianto, in 5 edizioni successive, la cui la segreteria scientifica verrà affidata a Luigi Paoletti e Marco Diociaiuti;

2) Corso Nazionale sulla Diagnosi di Laboratorio delle Infezioni Gastroenteriche, le cui prime 3 edizioni vedranno la segreteria scientifica affidata ad Alfredo Caprioli, mentre le 3 successive coinvolgeranno del Laboratorio anche Fabiana Superti oltre a Mirella Fantasia Mazzotti del Laboratorio di Batteriologia, Leucio Orefice di Alimenti e Patrizia Rossi di Parassitologia;

3) Corso Nazionale sulla Biocompatibilità di Dispositivi Medici Impiantabili, in 4 edizioni per le quali la segreteria scientifica verrà affidata a Lucilla Baldassarri e Salvatore Caiazza.

Dal 1° al 5 giugno 1992 la Società Italiana di Microscopia Elettronica promosse poi, in collaborazione con il Laboratorio di Ultrastrutture e l'Istituto di Anatomia Umana Normale dell'Università "La Sapienza" di Roma, il "Corso di Microscopia Elettronica a Scansione in Biologia e Medicina" di cui venne affidata la direzione a Giuseppe Arancia e la segreteria scientifica a Salvatore Caiazza, Giuseppe Familiari, Guido Macchiarelli e Agnese Molinari, mentre la segreteria organizzativa a Pasqualina Crateri; al Corso prendemmo parte, in qualità di docenti Walter Malorni, Luigi Paoletti ed io.

Nello stesso periodo, dal 23 al 26 giugno 1992, in collaborazione con gli Istituti di Anatomia Umana di Genova e Milano, si tenne ancora in Istituto il "Corso di perfezionamento in Microscopia, Fotomicroscopia e Microscopia a Scansione Laser" del quale fui co-direttore; la segreteria scientifica fu curata da Walter Malorni e Francesca Iosi. Relatori del Laboratorio di Ultrastrutture furono Walter Malorni e Domenica Taruscio, mentre le esercitazioni vennero tenute da Maria Patrizia Beltrano e da Elisabetta Straface.

Per quanto riguarda le attività congressuali, di particolare rilievo fu l'affidamento al Laboratorio, da parte della SIME, dell'organizzazione del XV Congresso Nazionale che si tenne in Istituto dal 28 al 31 maggio 1985 (Figura 51), registrando la presenza di oltre 300 partecipanti, con la presentazione di 53 relazioni ad invito da parte di ricercatori sia italiani che stranieri (Figure 52 e 53) e di 152 comunicazioni orali e poster.

Del comitato organizzatore fecero parte oltre a me (presidente), Giuseppe Arancia (segretario), Salvatore Caiazza, Alfredo Caprioli e Luigi Paoletti.

Il Congresso registrò anche piacevoli momenti di incontro tra i partecipanti sia in occasione del ricevimento di benvenuto che si svolse nei giardini dell'Istituto che in occasione della cena sociale che si tenne in un tipico ristorante dei Castelli Romani (Figura 54).

Parallelamente ai lavori congressuali si svolse anche un'importante mostra tecnico-scientifica in cui vennero esposti i più aggiornati modelli di microscopi ottici ed elettronici e di strumentazioni correlate (Figura 55).



**a**



**b**

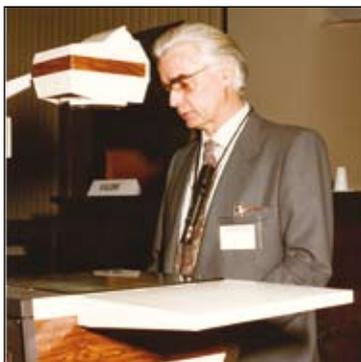
**Figura 51** - *Il Prof. Francesco Pocchiari (al centro), Direttore dell'ISS, dà il benvenuto ai partecipanti al XV Congresso Nazionale di Microscopia Elettronica; alla sua destra il Dott. Pier Giorgio Merli, Presidente della Società Italiana di Microscopia Elettronica, e alla sua sinistra Gianfranco Donelli, Presidente del Congresso (a). Tra i partecipanti, seduti nell'Aula Magna dell'Istituto, si riconoscono in prima fila Francesco Clementi di Milano ed a fianco Ivonne Pasquali Ronchetti di Modena (b).*



**a**



**b**



**c**

**Figura 52** - Tre relatori del XV Congresso Nazionale di Microscopia Elettronica: Elmar Zeitler dell'Istituto Fritz Haber - Max-Planck di Berlino (a), Alfredo Caprioli del Laboratorio di Ultrastrutture dell'ISS (b) e Ugo Valdrè dell'Istituto di Fisica dell'Università di Bologna (c).



a



b



c

**Figura 53** - Tre momenti del Congresso: (a) da sinistra, seduti in prima fila, Giuliano D'Agnolo, Antonio Cassone e Gianfranco Donelli dell'ISS; in seconda fila, ancora dell'ISS, Italo Archetti e Beniamino Cacciapuoti, e Sancha Gaetani dell'Università "La Sapienza" di Roma. (b) A sinistra, Cesare Peschle, Direttore del Laboratorio di Ematologia e Oncologia dell'ISS, modera una sessione insieme a Giuseppe Arancia del Laboratorio di Ultrastrutture. (c) A sinistra, Vittorio Marinuzzi, Direttore dell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università "La Sapienza" di Roma, interviene nel dibattito insieme a Renzo Laschi, Direttore del Centro di Microscopia Elettronica Clinica dell'Università di Bologna.



a



b



c

**Figura 54** - Italo Archetti, Nora Frontali e Francesco Pocchiari dell'ISS colti dal fotografo mentre si intrattengono piacevolmente durante il ricevimento nei giardini dell'Istituto (a); una posa particolarmente riuscita dei colleghi del Laboratorio di Ultrastrutture Fulvia Rosati e Franco Tangucci (b); un tavolo della cena sociale in cui sono riconoscibili in senso antiorario: Gianfranco Donelli che discorre con Elmar Zeitler (di spalle), Paola Mastrantonio del Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Franco Maria Ruggeri e Lucilla Baldassarri del Laboratorio di Ultrastrutture e, di spalle, Ida Luzzi del Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS (c).



**Figura 55** - *La mostra tecnico-scientifica viene inaugurata (da sinistra) dalla Senatrice Marina Rossanda della Commissione Igiene e Sanità, dai Proff. Donelli, Steve (Economista dell'Università "La Sapienza" di Roma), Pocchiari e Bocciarelli e dal Dott. Leonardo Toti, Direttore dei Servizi Amministrativi e del Personale, tutti dell'ISS; ultimo a destra, il Dott. Pier Giorgio Merli, Presidente della Società Italiana di Microscopia Elettronica.*

Analogo successo, sia sul piano scientifico che per l'elevato numero di partecipanti (circa 250), ebbe anche il XXII Congresso della Società Italiana di Istochimica, del cui comitato organizzatore fui presidente, mentre la segreteria scientifica venne affidata a Fiorella Malchiodi Albedi.

Al Congresso, organizzato all'ISS dal 27 al 29 maggio 1987, congiuntamente con il Dipartimento di Biopatologia Umana dell'Università "La Sapienza" di Roma, vennero presentate 12 relazioni ad invito, 41 comunicazioni orali e 138 poster (Figure 56 e 57).

Anche in occasione di questo Congresso, venne organizzata in Istituto una mostra di apparecchiature di microscopia ottica ed elettronica (Figura 58).



**Figura 56** - Ermanno Bonucci (a), a nome del Comitato di Presidenza, inaugura il XXII Congresso della Società Italiana di Istochimica, insieme al Presidente del Comitato Organizzatore, Gianfranco Donelli, rivolgendo un saluto di benvenuto ai partecipanti (b); Francesco Antonio Manzoli, Direttore dell'Istituto di Anatomia Umana Normale dell'Università di Bologna, svolge la sua Conferenza inaugurale dal titolo "Istochimica: memoria e progetto" (c).



a



b



c

**Figura 57** - Tre intervenuti al XXII Congresso della Società Italiana di Istochimica: Guglielmo Scarlato, Presidente della Società Italiana di Istochimica (a); Ismo Virtanen, Direttore dell'Institute of Biomedicine/Anatomy, dell'Università di Helsinki (b); Gabriella Manfredi Romanini, dell'Università di Pavia (c), Editor-in-Chief della rivista *European Journal of Histochemistry*, organo ufficiale della Società Italiana di Istochimica.



a



b

**Figura 58** - Due stand della mostra di apparecchiature tecnico-scientifiche allestiti in occasione del XXII Congresso della Società Italiana di Istochimica. Sono riconoscibili il Dott. Del Marro (a sinistra) dell'Assing che intrattiene una partecipante al Congresso (a) ed il Prof. Tullio Faraggiana, dell'Università "La Sapienza" di Roma (b) che conversa nello stand Zeiss.

Se queste furono le principali iniziative formative e congressuali che il Laboratorio di Ultrastrutture organizzò in quegli anni nel campo della microscopia elettronica e, più in genere, delle tecniche per l'analisi morfologica e ultrastrutturale, non meno importanti furono le partecipazioni sia scientifiche che organizzative ad altri eventi che rientravano nell'ambito delle attribuzioni del Laboratorio.

Ricordiamo tra questi l'"International Meeting Intestinal Flora in Health and Disease" che si tenne in Istituto dal 16 al 18 ottobre 1985 e che vide la mia partecipazione, sia come membro del Comitato Organizzatore che come relatore, e dei colleghi del Laboratorio di Ultrastrutture Lucilla Baldassarri, Alfredo Caprioli, Vincenzo Falbo, Carla Fiorentini e Franco Maria Ruggeri come autori di comunicazioni orali e poster. Al Congresso, che venne organizzato dal Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS, in collaborazione con l'Istituto di III Clinica Medica dell'Università "La Sapienza" di Roma e con il St. Bartholomew's Hospital di Londra (Figura 59), parteciparono oltre 300 ricercatori, tra i quali numerosi relatori stranieri (Figure 60 e 61) e furono presentate 31 comunicazioni orali e 49 poster (Figura 61).

Il Laboratorio di Ultrastrutture fu anche direttamente coinvolto nella organizzazione del "XIII International Symposium on Intestinal Microecology", tenutosi ad Alghero dall'11 al 14 settembre 1988, cui Alfredo Caprioli ed io partecipammo, sia quali membri del comitato organizzatore che quali presentatori di comunicazioni orali e poster, insieme a Lucilla Baldassarri, Vincenzo Falbo, Maria Famiglietti, Carla Fiorentini, Walter Malorni, Fabio Minelli, Silvia Paradisi, Fiorella Piemonte, Fabiana Superti e Antonella Tinari.

Va inoltre ricordata l'organizzazione in Istituto, dal 29 al 31 ottobre 1990, dell'XI Convegno Nazionale della Società Italiana di Colture Cellulari (Figure 62-65), di cui fu affidata a me la presidenza e a Walter Malorni la segreteria scientifica. Ed anche in questa occasione, non mancarono numerosi e qualificati contributi di altri ricercatori e tecnici del Laboratorio: Giuseppe Arancia, Lucilla Baldassarri, Annarica Calcabrini, Pasqualina Crateri, Carla Fiorentini, Maria Luisa Marziano, Agnese Molinari, Fabiana Superti e Antonella Tinari.



**Figura 59** - Gianfranco Donelli accoglie all'ingresso dell'Aula Magna dell'Istituto il Prof. Giuseppe Giunchi, Direttore della III Clinica Medica di Roma (a); Francesco Pocchiari dà il benvenuto ai partecipanti all'International Meeting Intestinal Flora in Health and Disease, insieme agli altri due Presidenti Onorari, Giuseppe Giunchi e Christopher C. Booth, e al Presidente del Comitato Organizzatore, la Dott.ssa Paola Mastrantonio del Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS (b); la Prof. Soad Tabagchali del St. Bartholomew's Hospital di Londra mentre tiene la sua relazione (c).



a



b



c

**Figura 60** - I Proff. Sidney Finegold (a) dell'UCLA School of Medicine (USA), Shearwood Gorbach (b) del New England Medical Center di Boston (USA) e Giovanni Panichi (c) della III Clinica Medica dell'Università "La Sapienza" di Roma durante i loro interventi al Congresso.



**Figura 61** - Il Prof. John G. Bartlett (a) della John Hopkins University School of Medicine di Baltimora (USA) durante la sua relazione al congresso. Nell'Aula Magna, i partecipanti seguono con attenzione la relazione di Carl Erik Nord (b); sono riconoscibili in prima fila da destra Asa Ljungb, Giovanni Panichi, Paola Mastrantonio e Gianfranco Donelli. In (c) Piero Martino dell'Università "La Sapienza" di Roma, (in giacca e cravatta) commenta il poster sulla diagnostica di rotavirus in campioni fecali mediante microscopia elettronica presentato da Franco Ruggeri (di spalle con la felpa bianca) che è insieme ad Antonella Tinari (in felpa azzurra), Luisa Marziano ed Egidio Chessa.



**a**



**b**



**c**

**Figura 62** - L'inaugurazione dell'XI Convegno Nazionale della Società Italiana di Colture Cellulari: il saluto di benvenuto del Direttore dell'ISS, Francesco Antonio Manzoli, con alla sua sinistra Giovanni Astaldi, Presidente dell'Associazione Italiana di Colture Cellulari (a); Silvio Garattini, Direttore dell'Istituto Mario Negri di Milano al tavolo della Presidenza (b); Gianfranco Donelli, in primo piano, e alla sua destra Luigi Frati, Direttore del Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università "La Sapienza" di Roma (c).

a



b



c



**Figura 63** - Ada Sacchi dell'Istituto Regina Elena di Roma (a), Leonardo Santi, Direttore dell'Istituto Nazionale di Ricerca sul Cancro di Genova (b) e Stefano Papa dell'Istituto di Scienze Morfologiche dell'Università di Urbino (c).



**a**



**b**



**c**

**Figura 64** - *Claudio De Simone dell'Università dell'Aquila (a); Claudio Franceschi dell'Università di Modena (b) e Carlo Enrico Grossi dell'Università di Genova (c) mentre presentano le loro relazioni.*

a



b



c



**Figura 65** - *Monica Thelestam del Karolinska Institutet di Stoccolma (a); Giovanni Battista Rossi, Direttore del Laboratorio di Virologia dell'ISS (b) e Walter Malorni del Laboratorio di Ultrastrutture presentano le loro relazioni.*

Il Convegno, cui si iscrissero oltre 250 partecipanti, era articolato in 6 sessioni con 24 relazioni ad invito, 30 comunicazioni orali e 58 poster.

Infine, dal 24 al 27 novembre 1992, in occasione dei primi 50 anni di ricerche ultrastrutturali all'ISS e del 10° anniversario del Laboratorio di Ultrastrutture, venne organizzato in Istituto il Congresso Nazionale "Microscopia e Salute dell'Uomo" del cui comitato organizzatore fecero parte tutti i ricercatori di ruolo del Laboratorio, con l'obiettivo di sottolineare i contributi che le tecniche di indagine morfologica e ultrastrutturale possono apportare alle indagini sull'ambiente, sui farmaci e sugli alimenti, alle ricerche di biologia e patologia cellulare e molecolare, agli studi sulla biocompatibilità di materiali e dispositivi medici ed alla diagnostica di agenti infettivi.

Il Congresso, inaugurato dal Direttore dell'ISS, Francesco Antonio Manzoli, con una relazione introduttiva dal titolo "50 anni di ricerca morfologica ed ultrastrutturale in Italia", venne articolato in 7 sessioni per sei delle quali vi furono relazioni presentate da ricercatori del Laboratorio: ambiente (Luigi Paoletti), farmaci ed alimenti (Giuseppe Arancia) biologia cellulare e molecolare (Domenica Taruscio), patologia cellulare e subcellulare (Carla Fiorentini e Walter Malorni), fisiopatologia, biocompatibilità (Salvatore Caiazza) e patologia infettiva (Gianfranco Donelli). Numerosi furono anche i relatori provenienti da università ed istituti di ricerca italiani: da Ancona, Anne Marie Jezequel; da Bergamo, Andrea Remuzzi; da Bologna, Giovanna Cenacchi, Elisabetta Falcieri, Nadir Maraldi, Giuliano Martinelli, Giovanni Mazzotti e Paola Versura; da Milano, Francesco Clementi, Erminio Giavini e Jacopo Meldolesi; da Modena, Ivonne Pasquali Ronchetti; da Napoli, Gianfranco Peluso; da Pavia, Paolo Lanzarini; da Roma, Tullio Faraggiana e Antonio Pavan; e da Siena, Baccio Baccetti. Nelle Figure 66-70 alcuni dei relatori al congresso.

Riassumendo, si può ricordare che nel suo primo decennio 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 laboratorio di rotavirus, adenovirus, astrovirus, ecc.; alla diagnosi differenziale vaiolo-varicella; alle indagini diagnostico-epidemiologiche sulle infezioni da criptosporidi e microsporidi in soggetti immunocompromessi; alle ricerche



**Figura 66** - Gianfranco Donelli porge un omaggio floreale a Daria Bocciarelli invitata a partecipare alla cerimonia inaugurale del Congresso Nazionale "Microscopia e Salute dell'Uomo", organizzato in occasione dei primi 50 anni di ricerche ultrastrutturali all'ISS e del 10° anniversario del Laboratorio di Ultrastrutture (a); Daria Bocciarelli (b) rivolge un suo messaggio di benvenuto ai congressisti. Gianfranco Donelli presenta la sua relazione "50 anni di microscopia elettronica applicata allo studio dei microrganismi all'Istituto Superiore di Sanità" (c).



**a**



**b**



**c**



**d**

**Figura 67** - Nadir Maraldi (a) e Giovanni Mazzotti (b) dell'Istituto di Anatomia Umana Normale dell'Università di Bologna e Fiorella Malchiodi Albedi (c) e Domenica Taruscio (d) del Laboratorio di Ultrastrutture, presentano le loro relazioni al congresso.



a



b



c

**Figura 68** - Giuseppe Gerzeli dell'Università di Pavia e Rosella Silvestrini dell'Istituto Tumori di Milano presiedono la sessione di Patologia Cellulare e Subcellulare (a) in cui intervengono Carla Fiorentini (b) e Walter Malorni (c) del Laboratorio di Ultrastrutture.



**a**



**b**



**c**

**Figura 69** - Sessione sulla Biocompatibilità, presieduta da Arturo Pizzoferrato (a) dell'Istituto "Rizzoli" di Bologna, nel cui ambito Salvatore Caiazza presenta la sua relazione (b). Luigi Paoletti durante la sua relazione sull'esposizione a polveri e fibre minerali in ambiente urbano nella sessione sull'Ambiente (c).



a



b



c

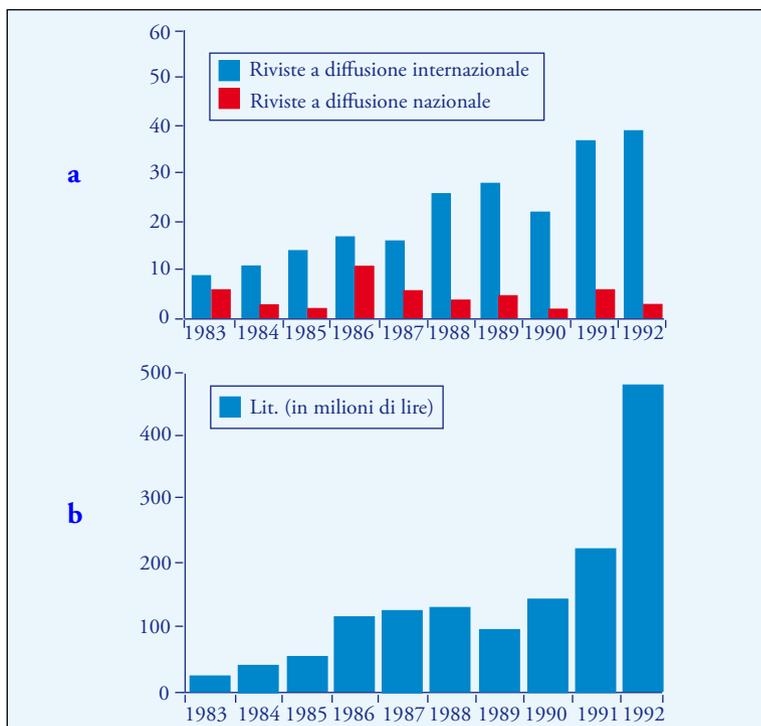


d

**Figura 70** - Due dei relatori nella sessione di Fisiopatologia: Ivonne Pasquali Ronchetti (a) e Baccio Baccetti (b); e due dei relatori in quella su Farmaci e Alimenti: Francesco Clementi (c) e Giuseppe Arancia (d).

di ematologia ultrastrutturale; agli studi sul meccanismo d'azione di tossine batteriche e alle ricerche di tossicologia subcellulare con particolare riferimento ai processi apoptotici e di morte cellulare; 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 biotipici e autotipici di pazienti affetti da mesotelioma.

L'intensa attività svolta dal Laboratorio è testimoniata dal crescente numero di pubblicazioni di quegli anni (Figura 71) e dai numerosi riconoscimenti ottenuti dalla comunità scientifica: dal finanziamento di numerosi progetti di ricerca da parte di enti esterni quali il CNR, il Ministero della Sanità, le Regioni, l'UE, ecc. (Figura 71), all'affidamento dell'organizzazione, come si è visto, di importanti congressi da parte di società scientifiche nazionali ed internazionali.



**Figura 71** - Le pubblicazioni scientifiche prodotte (a) e i fondi extramurari (b) ottenuti dal Laboratorio di Ultrastrutture negli anni 1983-1992.

Finisce così questa breve ricostruzione delle tappe principali del lungo e affascinante viaggio che ha portato l'Istituto dal nucleo storico di pionieri formatosi nel 1942 nei Laboratori di Fisica intorno al primo microscopio elettronico fino alla creazione e allo sviluppo del Laboratorio di Ultrastrutture. Approfittando quindi delle ultime righe per rivolgere a tutti i colleghi che insieme a me hanno percorso questo avvincente cammino il mio più sincero e sentito ringraziamento per la loro preziosa collaborazione che ha consentito il rapido sviluppo e l'affermazione scientifica del Laboratorio di Ultrastrutture che ho avuto l'onore di guidare fino al 1996.

### Note

*I documenti sotto indicati, riportati secondo l'ordine di citazione nel testo, fanno parte dell'archivio personale dell'autore.*

Manoscritto non pubblicato *La microscopia elettronica nell'Istituto di Fisica di Bologna durante il periodo 1947-1982* di Ugo Valdrè inviato a Gianfranco Donelli, 1984.

Pro-memoria di Antonio Ascenzi a Gianfranco Donelli, 1985.

Lettera di Virgilio Meneghelli a Gianfranco Donelli, 8 luglio 1985.

Lettera di Paolo Buffa a Gianfranco Donelli, 26 novembre 1984.

Lettera di Renato Ricamo a Daria Bocciarelli, 27 dicembre 1960.

Lettera di Giuliano Martinelli a Gianfranco Donelli, 5 marzo 1985.

Lettera di Piera Cuneo Crovari a Gianfranco Donelli, 13 maggio 1985.

### Riferimenti bibliografici

Alberani V, D'Agnolo G, Donelli G, Silano V. Francesco Pocchiari: l'uomo, i progetti e le realizzazioni. *Ann Ist Super Sanità* 1990;26(Suppl 1):21-67.

Amaldi E. Le lenti elettroniche. *Rendiconti dell'Istituto Superiore di Sanità* 1943;VI:362-415.

Baccetti B, Clementi F, Donelli G, Laschi R, Pasquali Ronchetti I, Saita A, Valdrè U. *Indagine sullo stato della microscopia elettronica in Italia*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1980. (Rapporti ISTISAN 80/9).

Baldassarri L, Simpson WA, Donelli G, Christensen GD. 1993. Variable fixation of staphylococcal slime by different histochemical fixatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:866-8.

Baldassarri L, Donelli G, Gelosia A, Voglino MC, Simpson AW, Christensen GD. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect Immun* 1996;64:3410-5.

- Borries B, Ruska E. L'ultramicroscopio elettronico Siemens. *Siemens Zeitschrift* 1940;XX(6):217-27.
- Buffa P, Guarriero-Bobyleva V, Muscatello U, Pasquali Ronchetti I. Conformational changes of mitochondria associated with uncoupling of oxydative phosphorylation *in vivo* and *in vitro*. *Nature* 1970;226:72.
- Clementi F, Ceccarelli B, Meldolesi J. La farmacologia cellulare come si è sviluppata nell'Istituto di Farmacologia dell'Università di Milano. *La Farmacologia Cellulare*. Milano;1982.
- Di Mayorca G, Lanzavecchia G, Le Coultre A. . Studio sulla morfologia dei leucociti umani normali e leucemici col metodo delle sezioni sottili al microscopio elettronico, *Rendicondi, Istituto Lombardo di Scienze e Lettere, Classe di Scienze* 1956;90:559-72.
- Donelli G, Paoletti L. Electron micrograph analysis by optical transforms. *Adv Electron Electron Phys* 1977;43:1-42.
- Donelli G. Isolamento a caratterizzazione morfologica di un batteriofago di struttura e dimensioni insolite. Identificazione del ceppo batterico ospite. *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1968. (68/13).
- Donelli G, Merli PG, Pasquali Ronchetti I, Valdrè U. La microscopia elettronica in Italia: stato attuale e prospettive di sviluppo, (Investigation on the state of electron microscopy in Italy). *Ann Ist Super Sanità* 1982;18:153-62.
- Donelli G, Merli PG, Pasquali Ronchetti I, Valdrè U. Electron microscopy in Italy. *Proc Roy Micr Soc* 1985;20:249-53.
- Donelli G, Tangucci F, Tinari A, Rocchi G, Resta S, Cochi S, Menichella D, Varveri A, Caione MD. Rotavirus: risultati preliminari della sorveglianza in un reparto per immaturi. *Bollettino Epidemiologico Nazionale* 1981;29:1-4.
- Donelli G, Francolini I, Romoli D, Guaglianone E, Piozzi A, Ragunath C, Kaplan JB. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2733-40.
- Fagioli O. Microscopia elettronica. *Poste e Telecomunicazioni* 1943;36(6):3-10.
- Falzano L, Fiorentini C, Donelli G, Michel E, Kocks C, Cossart P, Cabanié L, Oswald E, Boquet P. Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor type 1. *Mol Microbiol* 1993;9:1247-54.
- Graziosi F. Proprietà biologiche e molecolari di un nuovo tipo di particella fagica. *Atti Associazione Genetica Italiana* 1963;VIII:9-41.
- Gunther S. Molecular Biology of Bacterial Viruses. WH Freeman and Co, San Francisco; 1963.
- Horne RW, Pasquali Ronchetti I. A negative staining carbonfilm technique for studying viruses in the electron microscope. I. Preparative procedures for examining icosahedral and filamentous viruses. *J Ultrastructural Research* 1974;47:361-83.

Knoll M, Ruska E. Beitrag zur geometrischen Elektronenoptik. *Annalen der Physik* 1932;XII:607-40.

Knoll M. Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper. *Z tech Phys* 1935;16:467-75.

Malorni W, Rivabene R, Matarrese P. The antioxidant N-acetyl-cysteine protects cultured epithelial cells from menadione-induced cytopathology. *Chem Biol Interact* 1995;96:113-23.

Marinozzi V. The role of fixation in electron staining. *J Royal Microscopical Society* 1963;81:141-54.

Meneghelli V, Mazzocchi G, Serafini MT. La fine struttura del midollo osseo umano. *Atti Soc Med Chir Padovana* 1962;38:279-320.

Ministero della Sanità - Commissione permanente per la revisione e la pubblicazione della Farmacopea Ufficiale. I - Microscopia elettronica analitica:102-104; I - Microscopia elettronica analitica. Valutazione del rapporto fibre-particelle in campioni di talco:849; I - Valutazione di fibre minerali in campioni di talco:163-166; II - Talco:1638-1642. *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana* 1985; IX edizione, Vol. I-II.

Montaldo G. Relazione sulla attività svolta nel biennio 1962-63 e 1963-64. Centro di Microscopia Elettronica, Università di Cagliari; 1964.

Moret V, Gotte L. *Rendicondi dell'Accademia Nazionale dei Lincei* 1957; XXIII:153.

Mulvey T. Origin and historical development of the electron microscope. *British J Applied Physics* 1962;XIII:197-207.

Muscattello U, Andersson-Cedergreen E, Azzone GF, Von der Deoken A. The sarcotubular system of frog skeletal muscle. A morphological and biochemical study. *J Biophysical Biochemical Cytology* 1961;10:201.

Paganelli M. Esame al microscopio elettronico di film di ossido ottenuti su alluminio per ossidazione a caldo. Memorie e Rapporti. *Istituto Sperimentale dei Metalli Leggeri*, Serie IX, 1958-1959; n. 202.

Pasquali Ronchetti I, Fornieri C, Baccarani Contri M, Volpin D. The ultrastructure of elastin revealed by freeze-fracture electron microscopy. *Micron* 1979;10:89-99.

Ricci V, Gasparini G. *Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale* 1960;XXXVI(18):932-3.

Ricettario ad uso dei tecnici addetti alla microscopia elettronica. *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1964. (64/43; 64/44).

Ricettario ad uso dei tecnici addetti alla microscopia elettronica. *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1970. (70/7; 70/8; 70/9; 70/10; 70/11).

Ruggeri FM, Greenberg HB. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8 neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. *J Virol* 1991;65:2211-9.

Smith KCA, Oliver C. Wells, McMullan D. The fiftieth anniversary of the first applications of the scanning electron microscope in materials research. *Physics Procedia* 2008;1:3-12.

Symposium Internazionale di Microscopia Elettronica. Milano, 17 marzo 1962. *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1962 (62/8).

Valdrè U. Electron Microscopy in Italy. *Advances Imaging Electron Physics* 1996;96:193-215.

---



*Appendice*

---

**BIBLIOGRAFIA ANALITICA  
DELLE RICERCHE ULTRASTRUTTURALI  
SVOLTE ALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ  
NEGLI ANNI 1943-1992**

*I riassunti di ciascuna pubblicazione, ove presenti sulla rivista, sono riportati nella lingua originale.*

**1943**

Babudieri B, Bocciarelli D. Ricerche di microscopia elettronica. I. Studio morfologico di *Rickettsia prowazeki*. *Rend Ist Super Sanità* 1943;6:298-304.

Gli AA. studiano la morfologia di *Rickettsia prowazeki*, usando come mezzo di osservazione il microscopio elettronico accanto a quello ottico. I reperti ottenuti fanno ritenere che tale microorganismo debba presumibilmente essere considerato come appartenente ad un gruppo a sé stante, sistematicamente affine agli Schizomiceti.

Babudieri B, Bocciarelli D. Ricerche di microscopia elettronica. II. Studio morfologico del genere *Spironema*. *Rend Ist Super Sanità* 1943;6:305-14.

Gli AA. hanno studiato col microscopio ottico e con quello elettronico la morfologia delle spirochete della febbre ricorrente. Essi descrivono due tipi di spirochete: uno con due estremità affilate e uno con un'estremità affilata ed una rotondeggiante. Le spirochete sono provviste di una membrana ondulante e, all'estremità arrotondata, di un ciuffo di flagelli terminali o di un filamento subterminale. Mancano: una membrana avvolgente, formazioni nucleo- o sporo-simili, filamenti assiali. La membrana ondulante può in particolari circostanze sfilibrarsi e simulare l'esistenza di una flagellazione peritrica.

**1944**

Babudieri B, Bietti G, Bocciarelli D. La batteriolisi prodotta dal "lysozym" lacrimale studiata al supermicroscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1944;7: 604-15.

Gli AA. studiano, servendosi del microscopio elettronico, l'azione del lysozym lacrimale su alcuni cocchi dell'aria, e descrivono i successivi aspetti morfologici di questo tipo di lisi.

**1945**

Scanga F. Recenti scoperte sulla natura dei virus filtrabili: le virus-proteine e le proteine batteriofagiche. *Rend Ist Super Sanità* 1945;8:5-140.

Dopo un breve cenno sul problema generale dei virus e dopo una esposizione sommaria dei recenti perfezionamenti raggiunti nei mezzi d'indagine, con particolare riguardo al microscopio elettronico, l'A. espone le ricerche che portano alla scoperta delle virus-proteine vegetali, animali e delle proteine batteriofagiche; ne studia quindi tutti i caratteri e le proprietà chimiche, biologiche, fisiche, ecc. che possano contribuire a far formulare un giudizio sulla loro natura.

**1946**

Bocciarelli D, Trabacchi GC. Il microscopio elettronico dell'Istituto Superiore di Sanità. *Rend Ist Super Sanità* 1946;9(5):762-8.

Si descrive il microscopio elettronico costruito nell'Istituto Superiore di Sanità.

Cavalli L. Contributo al problema del nucleo batterico. Osservazione supermicroscopica e analisi biofisica con raggi X in *B. coli*. *Rend Ist Super Sanità* 1946;9:578-96.

1. Un'analisi dell'azione letale dei raggi X su *B. coli* ha condotto alle seguenti conclusioni: a) la morte dei batteri di coltura sia fresca sia invecchiata avviene ad opera di un singolo "urto" entro un ambito che rappresenta una piccola frazione del corpo batterico; b) le dimensioni di tale volume d'urto sono assai inferiori nei batteri invecchiati, che sono perciò più resistenti dei batteri giovani ai raggi X.
2. È noto che il volume d'urto è una rappresentazione formale delle strutture alle quali spetta nel batterio la funzione della riproduzione. Si è cercato perciò se esistesse una relazione tra i dati forniti dall'analisi biofisica, e le immagini di batteri nelle stesse condizioni di quelli irradiati, ottenute col supermicroscopio elettronico a 18.000 ingrandimenti.
3. I dati qui ottenuti permettono di concludere che le pretese immagini nucleari già descritte e qui nuovamente osservate in *B. coli*, non hanno sicuri rapporti con le strutture batteriche finora ignote, alle quali si riconosce una funzione nucleare.
4. Le immagini supermicroscopiche chiariscono invece le differenze di comportamento ai raggi X di batteri di età diversa, ed indicano, nella flocculazione e disidratazione dei colloid batterici, la causa dell'aumento di resistenza ai raggi X dei batteri invecchiati. La flocculazione può determinare la riduzione del volume d'urto che è causa dell'aumento di resistenza con due meccanismi: uno diretto, per riduzione di volume delle strutture nucleari, ed uno indiretto, per la disorganizzazione strutturale che segue alla flocculazione e che provoca una diminuzione del trasporto di energia nei pressi del volume sensibile.

Strampelli B, Posarelli A. La struttura del vitreo studiato al microscopio elettronico. Nota preliminare. *Rend Ist Super Sanità* 1946;9(5):769-78.

Gli AA. passano in rassegna la letteratura sulle varie teorie ed osservazioni sulla struttura del vitreo. Constatata la varietà e disparità delle medesime, e rilevata la opportunità di indagare coi mezzi che la tecnica moderna ha messo a disposizione, effettuano ricerche con il microscopio elettronico sul vitreo umano di occhi enucleati nel più breve tempo consentito in soggetti di varia età. Si rileva la struttura colloidale del vitreo, in cui le micelle assumono varie disposizioni a seconda delle parti del vitreo stesso osservate. Gli AA. si riservano di completare tali ricerche nel campo della fisiopatologia.

**1947**

Penso G, Scanga F. Studi sul meccanismo di azione della streptomicina. Nota I. Alterazioni della *Escherichia coli*, in fase biotica e trattata colla streptomicina, osservata al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1947;10:633-8.

Si descrivono le alterazioni osservate al microscopio elettronico subite dall'*Escherichia coli* trattata con dosi subinibenti di streptomicina e dopo un contatto di 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 ore.

Penso G, Scanga F. Studi sul meccanismo di azione della streptomicina. Nota II. Azione della streptomicina sull'*Escherichia coli* mantenuta in anabiosi e quindi osservata al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1947;10:639-41.

Da ricerche compiute col microscopio elettronico risulta che la streptomicina non provoca nessuna alterazione morfologica sull'*Escherichia coli* in fase anabiotica.

Trabacchi GC. Il microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1947;10:1222-35.

## 1948

Babudieri B. Applicazioni della microscopia elettronica. *Tecn Ital* 1948;3(3):3-7.

L'A. descrive le principali applicazioni pratiche che la microscopia elettronica incontra nello studio dei colloidi, dei silicati, dei pigmenti coloranti, dei metalli e in microbiologia.

Babudieri B. L'azione antibatterica di alcuni antibiotici, studiata col microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:577-98.

L'A. studia al supermicroscopio elettronico, l'azione di alcuni antibiotici su di una numerosa serie di germi. Egli descrive le alterazioni morfologiche che tali sostanze inducono nei microrganismi, e le accosta a quelle che si manifestano abitualmente nei germi che si sviluppano in un ambiente per loro poco adatto.

Babudieri B. Microscopia elettronica. Poderoso metodo d'indagine. *Scienze e lavoro* 1948;8:150-2.

Babudieri B. Note di tecnica per la microscopia elettronica: II. Fissazione di preparati. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:1225-9.

L'A. tratta dell'influenza che i vari mezzi di fissazione hanno sulla morfologia dei germi osservati al microscopio elettronico; espone i risultati ottenuti dall'uso di vari fissatori, e richiama l'attenzione sugli errori che possono essere determinati dal loro uso indiscriminato. Consiglia come fissatore d'elezione l'acido osmico.

Babudieri B. Osservazioni al microscopio elettronico sulle spirochete della febbre ricorrente. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:1067-70.

L'A. descrive la morfologia del genere *Spironema* studiato al microscopio elettronico.

Babudieri B. Ricerche di microscopia elettronica: III. Studio del genere *Leptospira*. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:1046-1066.

L'A. studia al microscopio elettronico varie specie di leptospire e ne descrive la morfologia. La leptospira è costituita da un lungo e sottile cilindro protoplasmatico racchiuso da una sottilissima e delicata membrana e avvolto intorno ad un sottile assistile. Mancano normalmente cilia, flagelli o granuli. L'A. studia i vari aspetti che le leptospire presentano a seconda dei metodi di fissazione usati e a seconda delle azioni fisiche o chimiche alle quali sono state sottoposte.

Babudieri B. Un nuovo procedimento per l'allestimento di preparati batterici destinati all'osservazione col supermicroscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:572-6.

LA. descrive una nuova tecnica per l'allestimento di preparati batterici destinati all'osservazione col microscopio elettronico. La tecnica consiste nell'allestire culture del germe in esame in una goccia di acqua distillata deposta sulla superficie di un foglietto di cellophane posato sull'agar di una piastra. Con questo procedimento si riesce a mettere in evidenza alcune delicate particolarità di struttura dei germi che l'abituale tecnica della centrifugazione ripetuta, per lo più altera.

Babudieri B, Bocciarelli D. Electron-microscope studies on relapsing fever Spirochaetes. *J Hyg* 1948;46:438-9.

Bocciarelli D, Trabacchi GC. Modifica al microscopio elettronico dell'Istituto Superiore di Sanità. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:794-800.

Si descrivono alcuni perfezionamenti introdotti nel microscopio elettronico destinati ad eliminare alcuni inconvenienti derivanti dall'uso di grasso destinato alla lubrificazione delle parti mobili dell'introduttore dei preparati ed a migliorare la facilità di movimento del soggetto in esame.

Bocciarelli D, Trabacchi GC. Perfezionamenti dell'apparecchio per la tecnica delle ombre nella microscopia elettronica. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11(3): 791-3.

Si descrivono alcuni perfezionamenti introdotti nell'apparecchio descritto in una nota precedente sullo stesso argomento.

Bocciarelli D, Trabacchi GC. Tecnica delle ombre nella microscopia elettronica. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11(1):127-31.

Si descrive un apparecchio per realizzare con facilità la tecnica delle ombre in microscopia elettronica.

Scanga F. L'azione della streptomina, del solfone e di alcuni disinfettanti sui germi, studiate al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:970-9.

LA., servendosi dell'osservazione al microscopio elettronico ha studiato l'azione della streptomina, del solfone e di vari disinfettanti (alcol, ac. fenico e formalina) su alcuni microrganismi (*B. coli* e *M. friburgensis*) mantenuti in anabiosi o in fase di moltiplicazione. Una serie di 36 fotografie illustra e documenta le varie alterazioni riscontrate.

Scanga F. L'azione della streptomina sui germi osservata al microscopio elettronico con la tecnica delle ombre. *Rend Ist Super Sanità* 1948;11:980-9.

È stato anzitutto studiato l'andamento della moltiplicazione batterica in una brodo-cultura normale e in brodo-culture contenenti dosi subinibenti di streptomina, sia mediante sistematico controllo nefelometrico al Pulfrich, sia mediante conteggio dei germi viventi, con la tecnica delle subculture su piastra. Quindi sono state osservate al microscopio elettronico, utilizzando la tecnica delle ombre, le alterazioni che il *B. coli* subisce, tenuto a contatto, in terreno culturale ed a temperatura di crescita, con dosi subinibenti di streptomina. L'azione esplicata dall'antibiotico consisterebbe essenzialmente in un processo di invecchiamento precoce.

## 1949

Ascenzi A. La struttura dell'osso umano osservata al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1949;12:893-902.

Sviluppando una serie di ricerche sistematiche sulla morfologia submicroscopica dell'osso umano, l'autore riferisce le sue prime osservazioni sulla struttura submicroscopica della frazione inorganica studiata direttamente mediante il microscopio elettronico.

Babudieri B. Isolamento del virus dell'attuale epidemia influenzale. *Rend Ist Super Sanità* 1949;12:415-28.

Gli autori riferiscono sull'isolamento di 5 ceppi di virus influenzale e ne descrivono le caratteristiche serologiche ed immunitarie.

Babudieri B. The morphology of the genus *Leptospira* as shown by the electron microscope. *J Hyg* 1949;47:390-1.

Several species of *Leptospira* have been studied by means of the electron microscope. Their morphology is described. The *Leptospira* consists in a long homogenous cylinder of protoplasm, enveloped in a very thin anistic membrane and wrapped around a slender axistyle. Vibratile structures and granules are generally lacking. The appearance of *Leptospiras* differs according to different method of fixation used and according to different physical or chemical treatments to which they are subjected.

Penso G, Ortali V. Studi e ricerche sui micobatteri. Nota II. I fagi dei micobatteri. *Rend Ist Super Sanità* 1949;12:903-18.

Vengono descritti, sia dal punto di vista biologico che morfologico, cinque fagi attivi sui micobatteri: per ognuno vengono presentate le fotografie elettroniche ed esposta la sfera di azione saggiata su 107 ceppi diversi di micobatteri.

## 1950

Archetti I. Il virus della malattia di Newcastle, visto al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:41-5.

L'A. espone i risultati ottenuti studiando con il microscopio elettronico tre ceppi del virus della malattia di Newcastle: i dati confermano la probabile forma rotondeggiante del virus.

Babudieri B. Natura delle cosidette "S-Formen" delle leptospire. Loro identificazione con *Hyphomicrobium vulgare* Stutzer e Hartleb. Studio di quest'ultimo germe. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:580-91.

Da una cultura di *Leptospira canicola* inquinata, l'A. isola in coltura pura un microorganismo ovoidale, provvisto di un filamento, capace di moltiplicarsi per gemmazione, filtrabile. L'A. studia, specie con l'ausilio del microscopio elettronico, la morfologia di tale germe e le sue caratteristiche culturali. Egli ritiene che esso possa essere identificato con *Hyphomicrobium vulgare*. L'A. discute la posizione sistematica di questo germe e specie le affinità che esso ha con *Rhodomicrobinm vannielii*. Egli ritiene che questi due germi debbano essere compresi in un'unica famiglia, quella delle *Hyphomicrobiaceae*, la quale dovrebbe appartenere alla sottosezione delle *Mycophytae* e più probabilmente alla classe delle *Phycomycetales*.

Baroni G, Castagnoli C. Applicazione del microscopio elettronico allo studio dei processi fotografici. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:360-5.

Si descrive una tecnica per l'osservazione al microscopio elettronico dei granuli delle emulsioni fotografiche trattati con sviluppi chimici e fisici. Si descrive inoltre l'azione del fascio elettronico sui cristalli fotografici.

Lelli G, Marotta U. Contributo alla conoscenza dell'ultrastruttura delle fibrille collagene al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:518-33.

Gli AA., dopo aver passato brevemente in rassegna le principali nozioni sull'ultrastruttura del collagene al microscopio elettronico, espongono i risultati delle loro osservazioni su fibrille sottoposte all'azione di soluzioni acide. Fanno presente che, oltre alla striatura, trasversale periodica già da tempo nota, le fibrille collagene così trattate mostrano con chiarezza una struttura longitudinale a tipo filamentoso. I filamenti, solo intravisti o supposti da altri ricercatori, hanno una disposizione ordinata, un andamento ondulato ed una forma nodosa, che sono base della struttura periodica trasversale e forse delle principali caratteristiche fisiche e biologiche delle fibrille. Ammesso che detti filamenti siano formati da catene molecolari, gli autori presentano un'ipotetica struttura di essi capace di spiegare almeno in parte i complicati quadri elettronici del tessuto in esame.

Lelli G, Marotta U. Il collagene di alcune forme tumorali della mammella visto al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:503-12.

L'importanza sempre maggiore assunta dallo stroma nell'organizzazione dei tumori e l'interesse dei più recenti studi sul collagene dell'organismo al microscopio elettronico hanno spinto gli Autori ad esaminare un forte numero di fibrille collagene di differenti forme tumorali della mammella. È stato possibile dimostrare costantemente in questo materiale la striatura trasversale caratteristica messa in evidenza nel collagene dei tessuti normali dagli studi di Hall, Jakus e Schmitt, di Wolpers e di Gross e Schmitt. La misurazione dello spessore di molte di queste fibrille, nonché di fibrille collagene del derma umano, ha permesso di determinare i cosiddetti "spessori medi". Lo spessore medio più alto (oltre i 1000 Å) è delle fibrille collagene del derma. Per le forme tumorali gli spessori medi sono risultati invece inferiori ai 680 Å con valori proporzionali al grado di maturità della forma neoplastica stessa. A tali risultati gli autori non assegnano alcun significato assoluto, ma riconoscono un valore indicativo per altra via da seguire verso una conoscenza morfologica sempre maggiore del collagene delle forme neoplastiche.

Lelli G, Marotta U. Ulteriori osservazioni sul collagene dello stroma di alcune forme tumorali della mammella al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:513-7.

Gli AA. hanno esaminato al microscopio elettronico numerose fibrille collagene dello stroma di forme tumorali diverse della mammella umana. Con la misurazione dello spessore di queste e di altre del derma cutaneo, hanno determinato i cosiddetti "spessori medi". Più alto è risultato quello delle fibrille collagene del derma. Gli spessori medi delle fibrille appartenenti alle forme tumorali hanno dato cifre diverse, ma direttamente proporzionali al grado di maturità della forma neoplastica stessa. La misurazione della lunghezza del periodo ha dato valori medi sostanzialmente identici fra loro e concordi con quelli presentati da altri AA. per i tessuti normali. La zona meno densa è risultata costantemente più breve dell'altra. Dalle ricerche degli AA. risulta inoltre che il rapporto tra spessore delle fibrille e lunghezza del periodo è superiore all'unità nel collagene di tessuti normali o almeno non tumorali nel senso stretto della parola, inferiore ad 1 in quelli neoplastici propriamente detti.

Negri R, Ravaioli L. Sensibilità dell'*Actinobacillus lignieresii* alla cloromicetina. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:555-62.

In base alle recenti conoscenze sull'attività della doromicetina nei confronti dei germi Gram-negativi, gli AA. hanno voluto saggiare la sensibilità dell'*Actinobacillus lignieresii* all'antibiotico. Dalle prove eseguite, con la tecnica dell'agar-germi si è visto come l'actinobacillo abbia uno spettro antibiotico assai simile, a quello delle salmonelle. In conseguenza di ciò gli AA. ritengono che la cloromicetina possa divenire in un prossimo futuro il medicamento specifico contro l'actinobacillosi bovina.

Pergola M. Sopravvivenza ultratrentennale di batteri aerobi asporigeni. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:571-9.

Si riferiscono indagini sulla sopravvivenza, o meno, di 35 culture batteriche, datanti da un minimo di anni 11 ad un massimo di anni 37. Si tratta di batteri aerobi asporigeni, coltivati in tubi di agar obliquo saldati alla fiamma senza previa estrazione dell'aria. Questi batteri, comprendenti 30 stipiti di bacilli e 5 di cocchi, provengono in massima parte da sostanze alimentari, sospette di aver provocato casi di intossicazione nell'uomo, ed appartengono prevalentemente al gruppo del *B. Coli* del *B. Proteus*. Di 35 culture se ne sono riscontrate ancora vive 23, tutte di bacilli e nessuna di cocchi. È particolarmente interessante che fra le culture sopravvissute, insieme con 9 di 20 anni ed oltre (fino a 26 anni) se ne sono trovate 4 a sopravvivenza ultratrentennale e precisamente 3 di 36 anni ed 1 di 37. Tutti gli stipiti batterici ancora vivi dopo tanto lunghi periodi di tempo hanno conservato i caratteri e le proprietà che avevano originariamente, compresi il potere patogeno ed il tossigeno.

Ravaioli L. La conservazione dell'actinobacillo di Lignières e Spitz mediante l'essiccamento nel vuoto. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:474-88.

L'A. fa una breve rassegna bibliografica sull'argomento, prendendo in esame soprattutto l'epizootologia della malattia e lo studio batteriologico del germe che la causa. Passa quindi a descrivere l'essiccamento nel vuoto di tale germe e le variazioni che esso subisce dopo tale trattamento. Descrive pure la morfologia del germe al microscopio elettronico, prima, durante e dopo l'essiccamento.

Scanga F. La batteriolisi da penicillina, osservata al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:85-92.

L'A., dopo aver discusso sui risultati finora ottenuti sulla batteriolisi da penicillina, studia, servendosi dell'osservazione al microscopio elettronico, le alterazioni che si determinano sui germi per azione della penicillina ad alte concentrazioni (200 U/cc). Tali alterazioni arrivano fino alla distruzione completa dell'elemento bacillare con rottura totale della membrana pericellulare e dissolvimento del protoplasma batterico.

Si conferma che tali alterazioni si verificano solo su germi tenuti a contatto con penicillina in liquido nutritivo ed a temperatura di crescita.

Scanga F. La cellula batterica (Studio citologico). *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:749-810.

Partendo dalla premessa che questi ultimi anni sono stati fecondi di risultati nello studio morfologico della cellula batterica, l'A. ha ritenuto utile ed interessante raccogliere in una monografia le più recenti acquisizioni su tale argomento, sperando anche di portare, con personali ricerche, un contributo alla soluzione dei numerosi problemi collegati allo studio della citologia batterica. L'A. espone anzitutto sommariamente le tecniche più recenti ed i mezzi più idonei che sono attualmente impiegati per le

ricerche, sulla morfologia della cellula: reazione di Feulgen, colorazione con idrolisi acida-Giemsa, colorazione con idrolisi enzimatica-Giemsa, bombardamento elettronico o con RX, microscopia ultravioletta o elettronica o a contrasto di fase, microchimica cellulare. Quindi, dopo una definizione della cellula batterica alla luce dei più recenti risultati, l'A. descrive dettagliatamente i singoli componenti cellulari: citoplasma, membrana cellulare, membrana citoplasmatica, inclusioni cellulari, sistema nucleare, spora, capsula e ciglia. Tratta poi le varie modalità di riproduzione della cellula batterica: riproduzione sessuata, mediante scissione semplice, mediante ramificazione, mediante gonidi, mediante spore e mediante gemmazione. Una larga e dimostrativa documentazione fotografica, quasi tutta originale, compiuta con il microscopio elettronico, e numerose figure schematiche documentano sufficientemente l'esposizione.

Scanga F. Sull'azione *in vitro* dell'aureomicina su diversi ceppi di Brucelle e di Salmonelle. *Rend Ist Super Sanità* 1950;13:534-45.

L'A., dopo aver spiegato le ragioni che lo hanno indotto a compiere tali ricerche, ha saggiato la sensibilità *in vitro* verso l'aureomicina della *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A e B* e della *Brucella melitensis, abortus e suis*. I risultati di queste prove, mostrano che le Salmonelle non possiedono un elevato grado di sensibilità verso l'aureomicina e che la loro sensibilità è inferiore a quella delle Brucelle. Fra queste ultime, la *Brucella suis* ed *abortus*, sono più sensibili della *Brucella melitensis*. Una serie di fotografie eseguite con il microscopio elettronico mostra alcuni cambiamenti morfologici determinati dall'aureomicina sui germi.

### 1951

Babudieri B. Leptosirosi. In: *Trattato di malattie infettive* 1951;3(cap. 103): 785-850.

Graziosi F, Russo G. Studio al microscopio elettronico di un batteriofago attivo sul *B. megatherium*. *Rend Ist Super Sanità* 1951;14:839-44.

Gli AA., dopo aver riferito le modalità tecniche dei loro esperimenti, descrivono la morfologia e le dimensioni di un batteriofago attivo su un ceppo di *B. megatherium* (batteriofago BM e *B. megatherium* Parigi), nonché vari aspetti dell'assorbimento e della lisi bacillare. Il batteriofago BM si presenta in forma simile a quella di uno spermatozoo, con una testa rotondeggiante di circa 72 m $\mu$  di diametro medio ed una coda lunga 150 m $\mu$  e dello spessore di 10-15 m $\mu$ , come risulta dalle misurazioni eseguite, con il microscopio comparatore, su fotografie di materiale trattato con la tecnica delle ombre. La lisi dei bacilli infetti si osserva con rigonfiamento del corpo bacillare, seguito da rottura della parete cellulare e fuoriuscita del protoplasto e con la comparsa nel protoplasto stesso di zone opache caratteristiche riferibili, forse, ad agglomerati di fago. Gli AA. riportano un'ampia documentazione fotografica.

Mulè F. Tentativi d'identificazione del virus della poliomielite ai microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1951;14:1000-4.

Ricerche eseguite al microscopio elettronico sulla cultura del sangue proveniente da ammalati di m. di Heine-Medin (forma letale) hanno messo in evidenza corpuscoli elementari dalle dimensioni oscillanti tra 25 m $\mu$  e 250 m $\mu$  con una inedia di 100 m $\mu$ . Nei due stipiti esaminati, in uno (stipite A) gli elementi osservati sono regolari come forma e dimensione; mentre nel secondo (stipite B) i vari elementi hanno forma e dimensione irregolare, sebbene tutti tendano alla sferica. È stata osservata una forma filamentosa direttamente nel sangue (stipite A), e forme allungate in coltura (stipite B).

Negri R. Alterazioni morfologiche dei germi sulforafeno-sensibili viste al microscopio ottico ed elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1951;14:160-70.

L'A. descrive alcune alterazioni morfologiche dei germi sensibili al "sulforafene" viste con gli usuali mezzi di microscopia e con il microscopio elettronico.

Penso G, Ortali V, Gaudiano A, Princivalle M, Vella L, Zampieri A. Studi e ricerche sui micobatteri - VII - Il *Mycobacterium phlei* - (Lehmann e Neumann, 1899, pro parte). *Rend Ist Super Sanità* 1951;14:855-908.

Con il nome di *Mycobacterium phlei* (Lehmann e Neumann, 1899) si indicano, nei vari laboratori del mondo, specie spesso differenti tra loro. Lehmann e Neumann attribuirono il nome di *Mycobacterium phlei* a un gruppo di ceppi, che oggi sappiamo appartenere a specie diverse; dato, però, che essi crearono questo nome particolarmente per la specie che Moeller isolò dal *Phleum pratense*, conviene conservare il nome di *Mycobacterium phlei* soltanto per questa specie, la quale dovrà perciò essere indicata col nome di "*Mycobacterium phlei* (Lehmann e Neumann, 1899, pro parte)". Le caratteristiche principali di tale specie sono le seguenti: germe a bastoncino, nucleato, acidoresistente, con qualche forma giovanile cianofila, gram-positivo; cresce su tutti i comuni terreni a temperature comprese tra 20 °C e 52 °C con *optimum* di crescita a 48 °C, e a pH compresi tra 5,5 e 8,8 con *optimum* a pH 6. In terreni liquidi cresce in superficie; in Dubos e in terreni agitati cresce in profondità dando luogo a formazioni globulari. In terreni solidi dà colonie tondeggianti, frastagliate, a superficie radialmente pieghettata e centro sopraelevato. Si ha formazione di un pigmento arancione con massimo di assorbimento a 460-463 m $\mu$  e bande secondarie a 430-440 e 480-490 m $\mu$  (in clorofornio). Tale pigmento è costituito da tre carotenoidi epifasici, particolarmente da leprotina e  $\alpha$ -carotene, oltre un carotenoide a carattere acido. *Tl Myc. phlei* non fluidifica la gelatina, riduce i nitrati a nitriti; non produce indolo, non coagula il latte, dà emolisi su agarsangue. In terreni sintetici utilizza, come fonte di carbonio, l'alcool amilico, l'alcool butilico, l'alcool etilico, l'adonitolo, l'eritrolo, il glicerolo, il mannitolo, il sorbitolo, l'arabinosio, lo xilosio, il galattosio, il glucosio, il levulosio, il mannosio e il trealosio, non utilizza l'acetone, l'alcool metilico, il dulcitolio, l'inositolio, l'arbutina, l'esculina, la salicina, il ramosio, il sorbosio, il lattosio, il maltosio, il saccarosio, la destrina l'inulina e il raffiniosio. Il *Myc. phlei* è lisato dal *Phagus phlei* (P. e O.), fago ad azione specie specifica. Il *Myc. phlei* non è patogeno per i topi, i ratti, le cavie, i conigli, i piccioni, le rane, le carpe. Non dà lesioni sulla membrana corioallantoidea di embrione di pollo, sulla quale, però, è capace di moltiplicarsi.

Scanga F. Sul modo di riproduzione della *Pasteurella Pestis*. *Rend Ist Super Sanità* 1951;14:123-32.

L'A., dopo una sommaria esposizione dei vari tipi di riproduzione cellulare (riproduzione sessuata, riproduzione mediante scissione semplice, mediante gonidi, mediante ramificazione, mediante spore e mediante gemmazione) riporta alcune osservazioni compiute, servendosi del microscopio elettronico, sul meccanismo di riproduzione della *Pasteurella pestis*. Questo microrganismo, del quale è già noto il marcato pleomorfismo, dimostra anche un complesso modo di riproduzione. Accanto alla scissione semplice è stato osservato un meccanismo di riproduzione mediante scissione atipica e mediante la formazione di piccoli elementi rotondeggianti, coccoidi, riportabili, verosimilmente, a delle vere e proprie gemme. Molte fotografie elettroniche documentano sufficientemente tale affermazione.

Strampelli B, Posarelli A. Acqueo, vitreo e pigmento uveo retinico al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1951;14:845-54.

Vengono studiati al microscopio elettronico l'acqueo, il vitreo e il pigmento uveo retinico. L'acqueo mostra uno speciale aspetto caratterizzato dalla presenza di piccoli corpuscoli rotondeggianti isolati o riuniti in conglomerati, tra cui possono osservarsi cristalli di aspetto vario. L'acqueo di seconda formazione si differenzia per la presenza di fibrina che assume l'aspetto di una massa poco differenziata. Il vitreo appare molto simile all'acqueo però esso mostra tra i corpuscoli una speciale sostanza fondamentale che può assumere un aspetto filamentoso o trabecolare e talora aspetto racemoso che richiama l'aspetto degli pseudopodi osservati da altri ricercatori attorno ai leucociti. Il pigmento uveo retinico si presenta sotto forma di granuli di forma varia, rotondi, ovali o fusati che appaiono specialmente evidenti con ombatura al cromo. Dalla superficie dei granuli possono partire dei filamenti che spesso uniscono i granuli tra loro.

### 1952

Aloisi M, Ascenzi A, Bonetti E. Ricerche comparative al microscopio elettronico, sul comportamento dell'actina estratta da muscoli di conigli normali e da muscoli di conigli in carenza di vitamina E. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15: 430-8.

L'actina G estratta da muscoli di conigli normali appare, al microscopio elettronico, in forma di globetti piuttosto piccoli. La stessa proteina trattata con KCl o con LiCl si trasforma in actina F, che risulta dalla aggregazione laterale di esili filamenti riuniti in coppie. Tali filamenti sono a loro volta costituiti dalla aggregazione lineare di globuli minuti. L'actina G ottenuta da conigli in condizione di grave distrofia muscolare da avitaminosi E, si presenta in forma di globetti di dimensioni, in genere, più grandi e di forma più irregolare di quelli dell'actina G di conigli normali. Trattata con KCl o con LiCl, l'actina dei conigli distrofici mostra aspetti di difettosa o mancata aggregazione lineare e, soprattutto, laterale.

Angelico R, Calò A, D'Amore A, Mariani A, Mariani-Marelli O, Scanga E. Ricerche sull'idrazide dell'acido isonicotinico. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:627-703.

Nella prima parte del lavoro sono riportate le ricerche di ordine chimico e chimico-fisico. Dopo aver riferito sommariamente sui dati bibliografici riguardanti le proprietà fisiche e chimiche, i metodi di preparazione, le reazioni di identificazione ed i metodi chimici e chimico-fisici di determinazione quantitativa dell'idrazide dell'acido isonicotinico, viene presa in esame la spettrofotometria nell'UV: in HCl N/10 il composto ha un massimo di assorbimento a 266 m $\mu$  con  $E = 1\% \text{ 1 cm} = 376$  ed un minimo a 236 m $\mu$ . Il rapporto fra le estinzioni al minimo ed al massimo è 0,50 ma può avere valori più bassi o più alti nel caso di prodotti poco puri. Andamento analogo ha la curva di assorbimento dell'acido isonicotinico. Fra i metodi di determinazione colorimetrica è stato particolarmente studiato quello basato sull'idrolisi acida e condensazione dell'idrazina con p-dimetilammino benzaldeide per formare un colorante giallo. Sono state le condizioni migliori per la reazione e ne è stata studiata l'applicazione alla determinazione dell'idrazide nel siero; con gli accorgimenti suggeriti è possibile determinare nel siero fino ad 1 gamma di idrazide per cm<sup>3</sup>. Per differenziare l'idrazide dall'acido isonicotinico eventualmente presente viene indicato il metodo al 2-4-dinitro-cloro-benzolo accoppiato a quello al bromuro di cianogeno, che però si rivelano di sensibilità limitata. Nella seconda parte del lavoro sono riportate le ricerche di ordine microbiologico. È anzitutto esaminata l'azione antibatterica dell'idrazide *in vitro* verso il *Myc. tuberculosis* e verso il gruppo dei paratubercolari, facendo rimarcare soprattutto il carattere "temporaneo" e "persistente" dell'attività iniben-

te. Servendosi dell'osservazione al microscopio elettronico viene quindi compiuto uno studio sistematico sulle alterazioni morfologiche riscontrate nei germi cresciuti a contatto con dosi subinibenti di idrazide oppure nei germi provenienti da brodocolture già sviluppate e quindi tenuti a contatto a 37 °C con concentrazioni variabili di idrazide. Oltre 50 fotografie elettroniche documentano una gamma estremamente varia di alterazioni: mentre nei germi cresciuti a contatto con dosi subinibenti di sostanza e in quelli, già sviluppati, tenuti a contatto con dosi piccole di idrazide, le modificazioni non sono notevoli, nei germi tenuti a contatto con 10 e 50 gamma di idrazide per cm<sup>3</sup> si notano alterazioni veramente imponenti. L'attività antimicobatterica *in vivo* dell'idrazide è stata studiata mediante numerose prove di protezione nell'infezione tubercolare sperimentale della cavia e del topino e nell'infezione tubercolare naturale della scimmia. I risultati più dimostrativi sono stati quelli ottenuti nel topino. Nella terza parte del lavoro sono riportate le ricerche di ordine tossicologico e farmacologico generale. La tossicità acuta della sostanza è stata studiata sul topino, sul ratto, sul coniglio e sul cane. La tossicità subacuta e cronica sul ratto, sulla cavia e sulla scimmia. L'influenza della sostanza sul sistema nervoso vegetativo è stata studiata attraverso l'azione sul cuore, sulla pressione e sul respiro, sugli organi isolati di coniglio e di cavia e sul bronchospasmo; l'influenza sul sistema nervoso centrale attraverso il rilievo delle modificazioni dell'attività elettrica corticale. Dal complesso delle ricerche tossicologiche e farmacologiche generali risulta che l'idrazide dell'acido isonicotinic è una sostanza di scarsa tossicità, non dotata di effetti secondari sul sistema neurovegetativo centrale. Non emerge pertanto alcun elemento che possa, in linea generale, motivare controindicazioni o limitazioni all'impiego terapeutico del nuovo farmaco antitubercolare.

Babudieri B. Ricerche di microscopia elettronica: IV. Studio morfologico del genere *Treponema*. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:711-22.

L'A. studia al microscopio elettronico la morfologia di tre ceppi di *Treponema pallidum* apatogeno (Reiter, Nichols, Noguchi). Egli considera il *Treponema* costituito da uno spesso cilindro di protoplasma pressochè omogeneo all'osservazione elettronica, avvolto da una sottile membrana di rivestimento, probabilmente anista, la quale alle volte si prolunga, vuota, oltre all'estremità della spirocheta, a simulare un flagello terminale. Lungo il corpo spirochetico decorre, a spirale, una sottilissima e stretta membrana ondulante o "crista", a sostituzione nettamente fibrillare, la quale si stacca in prossimità dell'estremità arrotondata della spirocheta, sì da costituire un flagello ad inserzione subterminale. La membrana ondulante con grande facilità si rompe, mettendo in libertà le sue fibrille costitutive, che possono simulare cilia laterali a disposizione lofotrica, del corpo spirochetico. Anche il flagello subterminale può alle volte dissociarsi in un ciuffo di cilia. In particolari condizioni, sia spontaneamente che sotto l'azione di fattori chimici o fisici (soluzioni ipertoniche, pepsina, ecc.) le spirochete possono presentare aspetti degenerativi, quali arrotolamenti delle estremità, ingrossamenti, spezzettature. Nelle culture di *Treponema* è possibile ritrovare granuli e corpi globosi di svariate dimensioni, molto opachi ai raggi elettronici, i quali alcune volte sono da interpretarsi come impurità del preparato, altre volte come forme degenerative delle spirochete. Manca per ora ogni dimostrazione che simili formazioni possano costituire uno stadio sessuato o asessuato del ciclo biologico del *Treponema*.

Castagnoli C, Graziosi F. Determinazione delle dimensioni di un batteriofago attivo su *B. megatherium* mediante il microscopio elettronico ed i raggi X. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:148-54.

Gli AA. hanno studiato le dimensioni di un batteriofago (fago BM attivo sul *B. megatherium*) mediante il microscopio elettronico e l'inattivazione con i raggi X. Dalla analisi di microfotografie elettroniche di particelle fagiche non ombrate, ombrate

con Cromo a varia incidenza dei raggi molecolari e frammiste a sfere di *Polystyrene Latex* è risultato che questo batteriofago ha una testa sferoidale del diametro medio di circa 60 m $\mu$ . Da esperimenti con i raggi X è risultato che il fago BM ha un volume radiosensibile sferico del diametro medio di 28 m $\mu$ . La differenza trovata tra volume geometrico correttamente determinato e volume radiosensibile appare tanto più significativa data la accuratezza delle misure e l'eliminazione di molte cause d'errore spesso trascurate.

Gherardi F. Studio al microscopio elettronico della parte caudale dello spermatozoo umano. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:286-93.

Nel corso delle ricerche condotte su 100 campioni di sperma umano, provenienti da soggetti diversi, viene lumeggiata la costituzione morfologica della coda dello spermatozoo, quale è rivelata dal microscopio elettronico. L'A. sostiene l'esistenza di una sostanza cementante amorfa, che collega e modella fra di loro gli elementi fibrillari della coda stessa, cioè il fascio assile e la guaina spirale; fornisce dettagli morfologici su queste ultime formazioni.

Mulè F. La viremia della malattia di Heine-Medin. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:220-5.

Vengono riferiti i principali risultati ottenuti osservando il sangue di 10 pazienti affetti da forme acute di malattia di Heine-Medin al microscopio elettronico. In tutte le osservazioni eseguite la viremia si deve ritenere costante. Le probabili espressioni del virus, quali appaiono al microscopio elettronico, si possono presentare con svariate caratteristiche morfologiche. Sono state riscontrate forme rotonde il cui diametro varia da 1 a 400 m $\mu$ , e forme filamentose la cui lunghezza varia da millesimi di micron a sei micron. Tra le forme filamentose alcune possono assumere un aspetto corpuscolato ed organizzato.

Mulè F. Osservazioni al microscopio elettronico del sangue di scimmie rhesus inoculate con virus poliomielitico tipo Lansing. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:230-4.

Sono state eseguite osservazioni al microscopio elettronico sul sangue di due scimmie rhesus infettate per via intracranica con virus poliomielitico tipo Lansing. Gli esperimenti sono stati eseguiti prima della inoculazione ed a distanza di sei ed otto giorni da essa. Delle due scimmie inoculate, una ebbe la paralisi e venne quindi sacrificata. Sui globuli rossi delle scimmie venne notata la presenza di numerosi elementi rotondeggianti della grandezza di 5-20 m $\mu$ , e forme allungate a bastoncino di lunghezza varia vennero riscontrate al di fuori dei globuli rossi. Nel sangue delle scimmie infettate, dopo incubazione di otto giorni, i globuli rossi apparivano in parte disfatti e cosparsi di numerosi elementi rotondeggianti del diametro di 5-50 m $\mu$ . Tali elementi erano visibili anche al di fuori dei globuli rossi.

Mulè F. Osservazioni al microscopio elettronico del sangue di topini infettati con virus poliomielitico stipite Lansing. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:226-9.

Sono state eseguite osservazioni al microscopio elettronico sul sangue di sei topini, lattanti, infettati per via intracranica con virus poliomielitico tipo Lansing. Le osservazioni sono state eseguite prima dell'inoculazione ed a distanza di cinque ed otto giorni da essa. Dei sei topini inoculati, quattro ebbero la paralisi e morirono, mentre due sopravvissero. Nei globuli rossi del sangue dei topini paralizzati venne notata la formazione di filamenti, dalla cui evoluzione origina il disfacimento del globulo rosso. I filamenti assumono l'aspetto di una corona di rosario o di una corda di refe.

Penso G, Castelnovo G, Gaudiano A, Princivalle M, Vella L, Zampieri A. Studi e ricerche sui micobatteri: VIII. Un nuovo bacillo tubercolare: il *Mycobacterium minetti* n. sp. - Studio microbiologico e patogenetico. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:491-548.

Minett (*Jrn Comp Path Ther* 1932;45:317) isolava nel 1930 e '31 da alcuni bovini - che reagivano positivamente alla tubercolina aviaria, alla paratubercolina di Johne e, a volte, anche alla tubercolina bovina - alcuni ceppi acidoresistenti che egli interpretava come bacilli tubercolari aviari. Dal lavoro originale di Minett non si possono però trarre elementi sufficienti e probativi per riconoscere, negli acidoresistenti isolati, ceppi di *Myc. avium* (Chester, 1901). I ceppi del Minett giunsero a noi dalla National Collection di Londra col nome di Cow 18, 19, 70 e 75. Tali ceppi venivano lisati dal *Phagus lacticola* su loro indotto e che non era capace di agire su nessun altro ceppo, salvo che su due ceppi giunti a noi col nome di *Myc. avium* Goring e di *Myc. Enteritidis* C 42. I sei ceppi in questione non venivano bloccati nemmeno da 5.000 µg di PAS per cm<sup>3</sup>, mentre gli aviari veri sono bloccati da poco più di 100 µg di PAS per cm<sup>3</sup>. I nostri ceppi quindi, sia attraverso la tipizzazione fagica che attraverso la loro resistenza al PAS, si rivelarono differenti dagli aviari. Tali ceppi si distinguevano anche dagli aviari veri per la loro facilità e rapidità di crescita sui comuni terreni di coltura. I germi in questione presentano, strisciati su vetrino, la morfologia generale degli acidoresistenti: nelle colture giovani sono a bastoncino, abbastanza grossi; nelle colture più vecchie sono dapprima polimorfi, poi granulati e infine coccoidi. Le microcolonie sono formate da filamenti sempre ramificati. I germi sono acidoresistenti; qualche forma cianofila è spesso presente. Al microscopio elettronico si mettono facilmente in evidenza i corpi sferici, caratteristici di tutti gli acidoresistenti, nonché il granulo centrale visibile anche al microscopio ottico, resistente alla ribonucleasi e da interpretarsi come probabile formazione nucleare. Colturalmente, i germi in questione crescono sui vari terreni dando tipiche colonie rugose e varianti lisce; in brodo crescono in superficie, sebbene con qualche difficoltà dato che i frustoli galleggiano difficilmente. In terreno di Dubos i germi crescono in profondità e così nei comuni terreni mantenuti in agitazione. Dal punto di vista metabolico questi ceppi utilizzano come fonte di carbonio l'alcool propilico, l'alcool butilico, l'alcool amilico, il glicerolo, il glucosio, il levulosio, il lattato di calcio, il citrato di sodio e il succinato di sodio; non utilizzano la paraffina liquida, il petrolio, l'acetone, l'alcool metilico, l'alcool etilico, l'alcool allilico, l'eritritolo, il sorbitolo, l'adonitolo, il mannitolo, il dulcitolio, l'inositolo, la salicina, l'arbutina, l'esculina, l'arabinosio, lo xilosio, il ramnosio, il galattosio, il mannosio, il sorbosio, il cellobiosio, il lattosio, il maltosio, il melibiosio, il saccarosio, il trealosio, il melizitosio, il raffiniosio, la destrina, l'inulina, il formiato di sodio. Non coagulano il latte, non fluidificano la gelatina, non producono indolo né acido solfidrico, riducono i nitrati a nitriti, non danno emolisi su agarsangue. Questi ceppi sono per solito biancastri con qualche sfumatura color avorio. La loro analisi chimica ha dato il 21,1% di glucidi, il 28,8-31,5% di lipidi, il 44,1% di protidi (calcolato moltiplicando per 6,25 la percentuale d'azoto determinato secondo Kjeldahl), il 2,60% di ceneri. È anche presente una piccola quantità di pigmento costituito da almeno quattro sostanze che non danno la reazione dei carotinoidi. L'*Optimum* di crescita si ha a pH 6,8 e a una temperatura di 37 °C. Non vegeta oltre i 40 °C. I ceppi in questione sono risultati patogeni per i topi, le cavie, i conigli, le scimmie, i vitelli e per la membrana corioallantoidea dell'embrione di pollo. Non sono risultati patogeni per i piccioni, i polli e i pulcini. Sulla membrana corioallantoidea questi ceppi producono placche e tubercoli di varia grandezza a differenza degli altri tubercolari da noi usati che, inoculati nella stessa dose, non produssero mai tubercoli. Nei topini, cavie, conigli, scimmie e vitelli si hanno localizzazioni soprattutto alle linfoghiandole e ai reni, che risultarono più o meno colpiti secondo le specie animali. I germi sono sempre coltivabili dalle urine. Nei topini, cavie e conigli si hanno localizzazioni nel

l'orecchio medio e interno con genesi di otiti specifiche. Nei vitelli le lesioni prodotte dall'inoculazione di questi ceppi riguardano soprattutto le linfoghiandole, che divengono enormemente ingrossate (flogosi reticolocitaria e ipertrofia connettivale), oltre naturalmente i reni e l'intestino in cui si producono emorragie. Dall'insieme delle ricerche eseguite, i germi in questione possono considerarsi come l'agente patogeno di una affezione morbosa estrinsecantesi istologicamente con una produzione di cellule fisse e linfocitarie, produzione priva di vasi propri e tendente a isolarsi dal tessuto circostante. Si tratta, dunque, di un tubercolo che differisce da quello tubercolare per la estrema rarità delle cellule giganti, per la costante assenza di cellule epitelioidi e per il tipo particolare di necrosi riscontrata. A conclusione di quanto esposto, si ritiene che il *Mycobacterium* studiato costituisca una nuova specie per la quale viene proposto il nome di *Mycobacterium minetti*, in onore di FC Minetti che, isolando i ceppi studiati, permise le presenti ricerche. Il lavoro è illustrato da 133 fotografie ottiche (in nero e a colori) ed elettroniche, nonché da diagrammi e da tabelle.

Penso G, Castelnuovo G, Princivale M. Studi e ricerche sui micobatteri. - IX - La demolizione fagica del *Mycobacterium minetti*. *Rend Ist Super Sanità* 1952;15:549-54.

Il *Myc. minetti* non è trasparente agli elettroni (60.000 volts), esso lo diviene progressivamente durante la demolizione fagica; è possibile, così, seguire l'evolversi di tale demolizione. In una serie di 32 fotografie elettroniche gli AA. mostrano come il fago omologo del *Myc. minetti* venga dapprima adsorbito dal batterio disponendosi col suo ciglio perpendicolarmente alla superficie esterna del batterio stesso; come penetri successivamente nel germe entro il quale si vedono ammassi di fagi orientati tutti nello stesso senso e come, alla fine, distrutto il batterio, i fagi si liberino. La lisi batterica avviene di solito dall'esterno all'interno del germe, sino a quando il germe si disfa o si spezza e dal suo interno sembra scolare un liquido vischioso carico di fagi.

### 1953

Benedetti EL. Ricerche sul tessuto connettivo reticolare con il microscopio elettronico. Nota I: Immagini elettroniche della cosiddetta sostanza cementante presente nelle fibre reticolari dei linfonodi. *Rend Ist Super Sanità* 1953;16:494-501.

L'autore riferisce su ricerche ancora in corso riguardanti la struttura delle fibre reticolari dei linfonodi studiate con l'osservazione al microscopio elettronico. I risultati, oggetto di questa nota, riguardano la presenza di sostanza non filamentosa ("sostanza cementante") interposta alle fibrille che costituiscono le entità fibrose di maggiore ordine di grandezza, riconoscibili con il microscopio ottico. La sostanza non filamentosa, che risulta intimamente aderente alle fibrille, viene eliminata dalla digestione tripsinica.

Lelli G, Bonanome A, Begani R, Sappa M. Le fibrille collagene dell'avventizia di arterie liofilizzate viste al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1953;16:175-82.

Gli AA. hanno esaminato al microscopio elettronico alcuni frammenti di avventizia di aorta liofilizzata e di aorta fresca, cercando eventuali modificazioni del collagene in rapporto alla liofilizzazione. I risultati ottenuti, mentre escludono cambiamenti di struttura, indicano un comportamento diverso del collagene liofilizzato di fronte ad alcuni agenti chimici. Questi risultati interessano per una maggior conoscenza degli effetti del metodo della liofilizzazione, specie in rapporto allo studio sperimentale dei trapianti con tessuti liofilizzati ed alla conservazione del collagene per ricerche di microscopia elettronica.

Taranta A, Marotta U. Qualche ulteriore osservazione sulla morfologia delle fibre collagene osservate al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1953;16:248-66.

Vengono illustrate le seguenti alterazioni morfologiche delle fibre collagene al microscopio elettronico: periodo e spessore delle fibre; modalità di accollamento fra le fibre collagene; dimostrazione diretta della sostanza cementante interfibrosa: variazioni dello spessore delle fibre in corrispondenza dei punti di incrocio, presenza di diramazioni laterali delle fibre. Studio delle terminazioni delle fibre. Adesività fra le fibre; presenza di striature tra le fibre; influenza della conservazione in formalina sullo spessore delle fibre collagene.

## 1954

Ascenzi A, Benedetti EL. Osservazioni sistematiche sulla struttura del metaplasma osseo eseguite mediante il microscopio elettronico. *Arch Sci Biol* 1954;38:234-48.

È stato praticato uno studio sistematico sulla struttura della frazione metaplasmatica del tessuto osseo al microscopio elettronico, il materiale di ricerca è rappresentato da osso intero, da osso privato della sostanza organica e, rispettivamente, da osso decalcificato; quest'ultimo sottoposto o no a digestione triptica. Gli PA. descrivono i caratteri delle fibrille, della sostanza fondamentale organica e della sostanza inorganica, come pure definiscono i rapporti intercedenti fra le tre componenti del metaplasma osseo.

Babudieri B. Proposta di una nuova sistemazione dell'ordine delle Spirochaetales. *Rend Ist Super Sanità* 1954;17:986-90.

In base a ricerche eseguite con il microscopio ottico e con quello elettronico, l'A. suddivide l'ordine delle Spirochaetales in due famiglie: quella delle Saprospiraceae (n.f.) e quella delle Spirochaetaeae. La prima famiglia comprende due generi: Saprospira e Cristispira; la seconda 6 generi: Spirella, Spirochaeta, Leptospira, Treponema, Cristispirella, Trichospira (n.g.). Questa classificazione si basa essenzialmente su criteri morfologici. I generi Spirella e Cristispirella non sono stati ancora studiati al microscopio elettronico.

Babudieri B, Steve Bocciarelli D. La tecnica delle repliche applicata all'osservazione di oggetti biologici con il microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1954;17:456-62.

È stata studiata la possibilità di applicare la tecnica delle repliche allo studio dei microorganismi 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.

Benedetti EL. Ricerche sul tessuto connettivo reticolare con il microscopio elettronico. Nota II. Rilievi sulla morfologia delle fibre e delle microfibrille. *Rend Ist Super Sanità* 1954;17:839-59.

L'autore studia la struttura delle fibre reticolati dei linfonodi mediante il microscopio elettronico con i seguenti risultati:

- le fibre reticolari visibili con il microscopio ottico sono costituite da due strutture collegate, la sostanza cementante di natura glicoproteica e le microfibrille;
- la sostanza cementante in soluzioni acide ed alcaline si rigonfia pur rimanendo aderente alle microfibrille, le quali anch'esse si rigonfiano;
- le microfibrille reticolari formano le fibre di maggiore spessore, riunendosi in fasci a spirale intrecciata;
- il periodo delle microfibrille corrisponde a 640 Å; si riscontrano microfibrille con il periodo di 210 Å;
- lo spessore più frequente delle microfibrille è di 400 Å;
- mediante le prove di rigonfiamento con soluzioni acide ed alcaline, le microfibrille si risolvono in filiere di globuli, le quali, se si disgregano ulteriormente, perdono la loro individualità filamentosa;
- le microfibrille presentano argentofilia argentaffinità.

Bompiani GD. Ricerche sulla ultrastruttura della fibra muscolare striata nella avitaminosi E sperimentale del coniglio. *Rend Ist Super Sanità* 1954;17:1021-34.

L'A. divide la trattazione, in due parti: nella prima esamina criticamente le nozioni precedentemente acquisite - in base a ricerche di microscopia a luce polarizzata come pure in base ad osservazioni di ordine chimico e chimico-fisico - sulle modificazioni della fibra muscolare striata in corso della avitaminosi E sperimentale del coniglio. Nella seconda parte l'A. riferisce su una ricerca personale al microscopio elettronico volta a definire in forma diretta le modificazioni della struttura proteica contrattile delle miofibrille nella avitaminosi E del coniglio. Vengono anche riferite alcune osservazioni sulla struttura delle miofibrille normali al microscopio elettronico. I risultati si possono sintetizzare come segue:

- la miofibrilla striata appare al microscopio elettronico come una unità preconstituita *in vivo*, formata da filamenti paralleli di actina diretti secondo l'asse longitudinale, e da filamenti di miosina situati a livello delle bande A;
- nella avitaminosi E sperimentale del coniglio la diminuzione di opacità della banda A deve essere interpretata come espressione della scomparsa parziale o totale della miosina, mentre, la disgregazione dei filamenti di actina va considerata alla stregua di un difetto di polimerizzazione della stessa proteina.

Castagnoli C, Graziosi F. Metodo elementare di misura di campioni microelettronici ombrati. *Rivista di Biologia* 1954;46:157-61.

De Caro M, Scanga F. Sull'azione antibatterica dell'Eritromicina. *Rend Ist Super Sanità* 1954;17:964-81.

Gli AA., dopo aver ricordato sommariamente le caratteristiche principali dell'eritromicina, hanno studiato l'azione dell'antibiotico sulla curva di crescita di alcuni batteri, scelti fra quelli sensibili e fra quelli resistenti all'antibiotico. Le prove sono state compiute seguendo l'andamento della crescita batterica in colture controllo ed in colture tenute a contatto con concentrazioni varie di antibiotico, mediante esame nefelometrico al Pulfrich e mediante subcolture su piastra, eseguite sistematicamente ad intervalli stabiliti di tempo. Da tali ricerche risulta che l'eritromicina esplica la sua azione sui germi in fase di moltiplicazione attiva e non su quelli in "restinq phase"; tale azione è strettamente dipendente dalla sensibilità dell'organismo batterico verso l'eritromicina e dalla concentrazione dell'antibiotico. Nei casi in cui tale concentrazione è tenuta ad un livello relativamente basso, dopo un

periodo di arresto della crescita batterica, di durata variabile, a seconda del germe e della concentrazione dell'antibiotico, la moltiplicazione batterica riprende, cosicché, in ultima analisi, l'azione dell'antibiotico in tali condizioni di esperimento, consiste in una batteriostasi transitoria e, nella rappresentazione grafica dell'accrescimento batterico, si traduce in un semplice prolungamento del normale periodo di latenza. Nei casi in cui l'eritromicina trovasi a contatto con germi molto sensibili ed in concentrazioni piuttosto elevate ( $10-100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ), l'azione batteriostatica dell'antibiotico si prolunga, nelle nostre condizioni di esperimento, oltre i 28 giorni e, durante questo periodo, le subcolture eseguite su terreno senza antibiotico, risultano sterili. Successivamente sono state studiate, al microscopio elettronico, le modificazioni morfologiche determinate dall'eritromicina a varie concentrazioni, sui germi tenuti a contatto con l'antibiotico, in differenti condizioni di esperimento. Si è rilevato che concentrazioni subinibenti di antibiotico non determinano sui microorganismi modificazioni morfologiche apprezzabili; in qualche caso si è osservato un aumento delle dimensioni, ma generalmente le caratteristiche citologiche sono rimaste immutate. Con concentrazioni maggiori di eritromicina (da  $0,5$  a  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) le alterazioni morfologiche sono risultate più marcate: i microrganismi appaiono infatti ingranditi, presentano un contorno irregolare, mostrano talvolta vere e proprie extrflessioni citoplasmatiche o delle incisure nel citoplasma a forma di semiluna; in alcuni casi si arriva ad osservare un disfacimento cellulare completo. Le alterazioni più intense e più caratteristiche sono quelle osservate nel *V. cholerae*.

Monteleone M. Indagini di microscopia ottica ed elettronica sullo stroma della mammella di soggetti affetti da cirrosi atrofica del fegato con particolare riguardo alla struttura delle fibrille collagene. *Riv Gerontol Geriatr* 1954; anno IV 6:225-44.

Dopo un'ampia premessa circa i fattori che determinano lo sviluppo della ginecomastia e le anomalie di detto sviluppo, l'A. si sofferma a considerare i fattori che vengono ritenuti responsabili della ginecomastia nella cirrosi epatica. Successivamente sono riportate le ricerche personali dell'A. aventi per oggetto lo studio anatomo-istopatologico, in relazione con quello della ultrastruttura del tessuto ginecomastico, con il microscopio elettronico. Sono stati esaminati individui che avevano sofferto con certezza di cirrosi epatica e che nei casi in esame erano soggetti di età variabile fra i 40-70 anni. In particolare le misurazioni elettroniche delle fibrille del collagene del tessuto mammario nei cirrotici non hanno messo in evidenza la esistenza di fibrille di minor spessore, espressione di giovanilità del tessuto, espressione cioè di reviviscenza della ghiandola. Tali risultati negativi, lungi dal denegare la possibilità che in alcuni casi di cirrosi atrofica del fegato, possano stabilirsi condizioni di reviviscenza della ghiandola stessa, possono valere a dare importanza per la attribuzione di tale fenomeno a fattori individuali locali.

## 1955

Archetti I. Appearances associated with filamentous forms of influenza viruses. *Arch Ges Virusforsch* 1955;6:29-35.

Preparations of recently isolated influenza A virus, obtained from infected allantoic fluid and examined in the electron microscope, showed in addition to the characteristic spherical virus elementary bodies (a) filamentous forms, (b) occasional filaments which appear to be segmenting into spheres, (c) large spherical bodies (150-500 micrometers) usually in dose association with filaments. These spherical bodies were

not found in normal allantoic fluid or in allantoic fluid infected with influenza virus strains which produce mainly elementary bodies. The large spherical bodies recall the balloon-like forms described by Hoyle present as extrusions from normal and virus infected allantoic cells and by Bang in virus infected allantoic cells. Their presence in association with filamentous forms of virus may indicate a different mechanism of virus release from that found for strains producing mainly elementary bodies. The rarity of segmenting filaments in allantoic fluid preparations which we have examined suggests a possibility that there may be two types of filaments - mature forms destined to break down into elementary bodies and living only a short life, and the characteristic filamentous forms which constitute the majority of those seen in allantoic fluid and which do not mature further.

Ascenzi A, Chiozzotto A. Applicazione della tecnica della pseudo-replica allo studio della fine struttura dell'osso al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1955;18:214-24.

Gli autori hanno eseguito uno studio sistematico sulla struttura dell'osso lamellare al microscopio elettronico, applicando per la prima volta la tecnica della "pseudo-replica". Essi giungono alle conclusioni seguenti. L'osso totale (ossea + frazione inorganica) dimostra una morfologia finemente granulata i cui elementi o granuli denunciano un orientamento strutturale abbastanza bene definito. Tale morfologia che corrisponde fondamentalmente a quella della sostanza cementante ("Kittsubstanz" degli autori tedeschi) è la risultante della stretta compenetrazione della sostanza organica fondamentale e della frazione inorganica dell'osso. Infatti, a sua volta, la sostanza organica fondamentale dimostra di essere costituita da minuti globuli o micelle globulari del diametro di 200-250 Å, le quali sono riunite in piccole catenelle o in complessi tridimensionali. Questi globuli sono contenuti entro le maglie di una fine rete formata dalla frazione inorganica. Le maglie della rete hanno uno spessore di 100-150 Å e delimitano degli spazi rotondeggianti delle stesse dimensioni dei globuli di sostanza organica fondamentale, cioè del diametro di 200-250 Å. I globuli micellari della sostanza fondamentale rivelano un chiaro orientamento strutturale nei confronti dei fasci di fibrille collagene, le quali sono parallelamente disposte in concordanza di macroperiodo. Quest'ultimo rilievo porta a ritenere che nelle ossa a struttura lamellare esiste un rapporto ben definito tra fibrille collagene e sostanza cementante.

Cheli R, Dianzani MU. Modificazioni della struttura e dell'adsorbimento del virus influenzale in emazie di cavie trattate con siero emolitico (nota preliminare). *Rend Ist Super Sanità* 1955;18:206-13.

Le emazie delle cavie trattate con siero emolitico presentano irregolarità strutturali analoghe a quelle presenti nella anemia emolitica umana: uguali alterazioni sono rilevabili nelle emazie delle cavie trattate con siero di coniglio normale o con tossina difterica. L'assorbimento di virus influenzale (ceppo PR8) è aumentato in tutte le tre condizioni sperimentali rispetto all'adsorbimento che si ha nelle emazie normali: particolarmente netto è l'aumento nelle emazie delle cavie con anemia emolitica.

Lelli G. Osservazioni di microscopia elettronica sulle malattie del collagene. *Rend Ist Super Sanità* 1955;18:48-56.

L'autore passa brevemente in rassegna i principali lavori di microscopia elettronica esistenti in letteratura in tema di malattie del collagene ed espone successivamente i risultati delle prime osservazioni di alcune personali indagini sull'argomento. Trattando con soluzioni acide le fibrille collagene si osserva un comportamento variabile di queste con un coefficiente di resistenza in linea di massima direttamente proporzionale all'età del soggetto. Le indagini si estendono al confronto dei risultati ottenuti

esperimentando su collagene proveniente da portatori di mesenchimopatie varie con i risultati derivanti dall'uso di collagene di altri soggetti. I dati a disposizione, anche se per ora troppo scarsi e quindi insufficienti per deduzioni di carattere generale, rappresentano una direttrice di studio nella ricerca di risultati nuovi atti ad una migliore conoscenza del complicato problema della biologia e della patologia del connettivo.

Lelli G, Sappa M. Osservazioni al microscopio elettronico sul comportamento del collagene prelevato da soggetti umani di età diverse e trattato con soluzioni acquose di acido lattico. *Rend Ist Super Sanità* 1955;18:43-7.

Gli Autori rendono noti alcuni risultati dell'osservazione al microscopio elettronico di campioni di collagene, trattati con soluzioni acquose di acido lattico, provenienti da soggetti umani di varia età. Dal conteggio delle fibrille alterate e di quelle conservate in ogni campione sono ottenute delle percentuali approssimative necessarie per uno studio comparativo. I dati numerici finora disponibili non permettono conclusioni di ordine statistico, comunque indicano con certezza una diversa resistenza delle fibrille all'azione dell'acido con un aumento della resistenza in rapporto all'età. Dopo elaborazione matematica di questi dati, gli autori prospettano, con le dovute riserve, alcune conclusioni sull'andamento del fenomeno, che sarà oggetto di un più vasto programma di esperienze.

Marotta U. Comportamento del tessuto collagene alla azione dei raggi Roentgen. *Rend Ist Super Sanità* 1955;18:1298-300.

Il tessuto collagene del derma suino subisce in seguito all'azione dei raggi Roentgen alterazioni sostanziali che vengono dimostrate osservando il tessuto stesso al microscopio elettronico.

Penso G. Studi e ricerche sui micobatteri. XII. Sull'esistenza di un micelio vero e ramificato in tutte le specie del genere *Mycobacterium*. *Rend Ist Super Sanità* 1955;18:13-6.

L'A. descrive il micelio iniziale dei micobatteri; tale micelio è formato da lunghe ife ramificate più volte. Tali ife nascono per gemmazione dai singoli batteri e sono fragilissime; per ottenerle e vederle chiaramente occorre far crescere i micobatteri sullo stesso vetrino o sulla stessa membrana di collodio che servirà alla osservazione ottica o elettronica.

Steve Bocciarelli D, Tentori L, Vivaldi G. Osservazioni al microscopio elettronico di sezioni di leucociti umani. *Rend Accad Naz Lincei, Cl Sci fis mat nat* 1955; serie VII, 18:229-33.

Ventra D. Aspetti al microscopio elettronico della struttura submicroscopica delle sostanze basofile del citoplasma nervoso. *Acta Neurol* 1955;10:585-602.

Con il microscopio elettronico è stato intrapreso lo studio della struttura submicroscopica della cellula nervosa. Nel citoplasma, altamente differenziato, sono state individuate e descritte caratteristiche formazioni di aspetto lamellare. Il più sovente tali lamelle sono configurate in ammassi e conservano un decorso concentrico e parallelo rispetto alla membrana nucleare; altre volte s'intrecciano, simulando l'apparenza di fine reticolo a maglie irregolari. A più alta risoluzione elettronica le singole unità lamellari si rivelano formate da doppie membrane (spessore di una membrana 70-80 Å) contenenti materiale granuloso (spessore medio dei granuli 100-150 Å) lungo le pareti interne. Le strutture

lamellari, per la loro diffusione, costituiscono un elemento dominante nella morfologia elettronica di tutti i tipi di neuroni presi in esame, meno che dei granuli del cervelletto, dove sono assenti. Si hanno sufficienti motivi per ritenere che il reperto descritto corrisponda all'aspetto elettronico delle sostanze basofile del citoplasma nervoso. Nel citoplasma neuronico non sono state rinvenute fibrille simili a quelle descritte in istologia. È stata rilevata la presenza di un abbondante materiale amorfo di fine apparenza granulare; si ritiene che esso sia formato da fibrille submicroscopiche conglutinate. Sono stati forniti alcuni dati preliminari relativi alla complessa struttura submicroscopica dei mitocondri, dei nucleoli, dei prolungamenti cellulari ed un accenno è stato dedicato al problema dei rapporti nervosi, il cui studio può essere ora affrontato con più adeguate possibilità.

### 1956

Addamiano L, Babudieri B, Moscovici C. Ricerche sugli aspetti morfologici del virus influenzale. *Rend Ist Super Sanità* 1956;19:160-7.

Mentre il virus influenzale del tipo "B" si presenta in forma di granuli, in quello del tipo "A" sono presenti anche forme a bastoncino. Queste ultime e quelle filamentose costituiscono in genere la maggioranza del virus appartenente al tipo "A1". Gli AA. hanno voluto controllare se in particolari condizioni sperimentali sia possibile alterare le proporzioni reciproche dei due tipi morfologici del virus, e a questo scopo hanno incubato le uova embrionate inoculate con il virus, a temperature diverse: hanno inoculato embrioni a diversi stadi di sviluppo; hanno infettato uova con dosi progressive di virus; hanno esaminato il liquido allantoideo infetto tenuto per periodi diversi di tempo in ghiacciaia; hanno controllato il virus nel liquido allantoideo da poche ore dopo la inoculazione fino a 6 giorni dopo questa; hanno studiato la possibile azione di antibiotici inoculati nell'embrione contemporaneamente al virus. Queste ricerche hanno dimostrato che nei ceppi in cui le due forme di virus coesistono, granuli e filamenti compaiono pressochè contemporaneamente, e che nelle diverse condizioni sperimentate i rapporti quantitativi reciproci delle due forme non mutano.

Ascenzi A, Benedetti EL. Sulla ultrastruttura dell'osso fetale umano indagata mediante il microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1956;19:470-9.

Lo studio al microscopio elettronico della struttura di ossa parietali di feti umani ha permesso di stabilire quanto segue:

- 1) le fibrille elementari non hanno struttura periodica sensibilmente diversa da quella delle fibrille dell'osso adulto. Tuttavia esse sono più sottili ed il loro macro-periodo è di dimensioni più limitate;
- 2) all'impregnazione argentea le fibrille si comportano come quelle del tessuto connettivo reticolare;
- 3) nelle fasi più precoci dell'ossificazione i sali di calcio si depositano attorno alle fibrille in maniera discontinua ed irregolare;
- 4) a mano a mano che le fibrille si accrescono in spessore e che la struttura periodica incrementa le sue dimensioni, compare un guscio calcareo sempre più continuo ed omogeneo;
- 5) nelle fasi iniziali dello sviluppo la deposizione dei sali di calcio nella sostanza fondamentale ha luogo in forma di grossi blocchi omogenei, sferici od ellissoidali. Solo in prosieguo di tempo i sali calcarei si distribuiscono in forma più minuta tra le strutture micellari della sostanza fondamentale ed attorno alle fibrille.

Ortali V, Capocaccia L. Una nuova specie di *Corynebacterium*: il *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali e Capocaccia 1956. *Rend Ist Super Sanità* 1956;19:480-91.

Gli AA. hanno studiato cinque ceppi di un microrganismo isolato da Castellani nel 1942 e considerato l'agente causale di un'ulcera endemica in Africa Settentrionale, ma diffusa anche in altri paesi di Europa e di America, denominata dal Castellani stesso "ulcera tropicale". La classificazione di questo germe è sempre stata fonte di incertezza e Castellani stesso chiamò il germe prima *Micrococcus mycetoides* e poi *Coccobacillus mycetoides* richiamando più volte l'attenzione sulla temporaneità di tale denominazione. In base ai costanti risultati ottenuti dagli AA. su tutti i cinque ceppi, il germe va considerato come una nuova specie di Corynebacterium: *Corynebacterium mycetoides* (Castellani) Ortali e Capocaccia 1956. I principali caratteri propri al germe sono: bastoncini spesso claviformi con granuli metacromatici, raramente forme coccoidi; crescita piuttosto scarsa in agar poveri e crescita su Loeffler e agar ricchi con produzione di abbondante pigmento giallo. Fermentazione del glucosio, ma non degli altri zuccheri. Utilizzazione dei glucosio, levulosio e trialosio quali fonti di carbonio. Aerobio, microaerofilo.

Posarelli A. Il diplobacillo di Morax Axenfeld al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1956;19:151-3.

Viene esaminato al microscopio elettronico il diplobacillo di Morax Axenfeld agente della congiuntivite angolare. Si rilevano i particolari strutturali della sostanza citoplasmatica che a volte costituisce degli addensamenti che in alcuni casi sembrano si continuano da un corpo bacillare all'altro, ed altre volte è in forma granulosa con tendenza a formare ammassi polari. In certi elementi è nettamente evidente la membrana citoplasmatica. La divisione si presenta in varie fasi, a volte in modo atipico. Si riscontrano infine forme bacillari di involuzione.

## 1957

Addamiano L, Babudieri B. Research on spirochaetal strains isolated in Jordan. *Bull Wild Hlth Org* 1957;17:483-5.

Graziosi F, Tecce G. Contributo alla conoscenza della struttura e della composizione chimica della parete cellulare in *Bacillus megatherium*. *Giorn Microbiologia* 1957;3:143-53.

Gli AA. hanno studiato la struttura e la composizione chimica della parete cellulare di un ceppo di *B. megatherium* resistente al lisozima impiegando il metodo descritto da Weidel. A seconda che le cellule si trovino in rapida moltiplicazione o in fase stazionaria (quindi in via di sporificazione), mediante il metodo di Weidel è stato possibile separare dalle cellule una struttura diversa sia per la morfologia sia per la costituzione chimica. Le cellule in rapida moltiplicazione possiedono una parete caratterizzata da un elevato contenuto in lipidi, da un basso contenuto in glucosio e dalla presenza di una proteina solubile in acido acetico glaciale a caldo. Dal punto di vista morfologico questo tipo di parete si presenta plastico e sottile; inoltre in essa è possibile mettere in evidenza una fine struttura submicroscopica. Le cellule di *B. megatherium* in fase stazionaria mostrano di possedere una parete più complessa, caratterizzata dalla presenza di un elevato contenuto in lipidi, da una più varia costituzione in aminoacidi, da un basso contenuto in glucosio; da questo tipo di parete è possibile separare, mediante estrazione con acido acetico glaciale a caldo, una proteina dello stesso tipo di quella presente nella parete delle cellule in rapida moltiplicazione (come risulta dalla composizione in aminoacidi e dall'aspetto dei cristalli che si formano raffreddando le soluzioni in acido acetico glaciale). Da questo tipo di parete è inoltre possibile separare uno straterello polipeptidico, conservante la forma delle cellule e la cui composizione in aminoacidi è tale da giustificare le differenze osservate tra le pareti delle cellule

giovani e quelle delle cellule in fase stazionaria (in esso è presente l'acido diamino-pimelico). Dal punto di vista morfologico queste pareti cellulari si dimostrano assai rigide e prive di struttura submicroscopica; esse contengono inoltre delle formazioni interne derivanti dalla digestione delle prospore (pareti delle prospore). Il confronto dei dati ottenuti in questa ricerca con quelli descritti da altri AA. in *B. megatherium* è difficile data la differenza del metodo di preparazione delle pareti e del ceppo usato nella ricerca. Gli AA. pensano che uno studio più sistematico della parete cellulare in *B. megatherium* in rapporto al processo di sporificazione potrebbe chiarire alcuni aspetti del fenomeno stesso della sporificazione e spiegare alcune contraddizioni tuttora presenti nella letteratura circa la composizione chimica e la morfologia delle pareti cellulari degli sporigeni aerobi.

Tonolo A. Ricerche colturali su alcuni generi di Pirenomiceti. *Rend Ist Super Sanità* 1957;20:848-56.

Sono descritti i caratteri colturali dei seguenti Pirenomiceti: *Hypoxilon fuscum* (Pers.) Fr. *Clypeosphaeria notarisii* Fuck.; *Valsa ceratophora* Tul.; *Ophiobolus rubellus* (Pers.) Sacc.; *Ophiobolus mahieui* (West.) Sacc. e *Lophiostoma perversum* de Not. *La Clypeosphaeria notarisii* Fuck. presenta i caratteri colturali caratteristici delle Xilariaceae per cui si propone di ascrivere il genere a questa famiglia anche per la particolare struttura dell'apice dell'asco.

### 1958

Babudieri B. Die Feinstruktur der Leptospiren und anderer Spirochäten. *Zbl Bakteriol Parasitenk I Orig* 1959;173:386-406.

The author describes the morphology of spirochetes of the genus *Leptospira* and *Treponema*.

Babudieri B, Castelli M. La morfologia di *Leptospira* Celledoni. *Rend Ist Super Sanità* 1958;21:698-700.

Le leptospire del ceppo "Celledoni" sono completamente privi degli uncini terminali caratteristici del genere *Leptospira*. Al microscopio elettronico le estremità di queste leptospire presentano spesso un cappuccetto vuoto, costituito dalla membrana di rivestimento, che si prolunga oltre il limite del cilindro citoplasmatico e dell'assistile.

Conestabile E, Baccarini V, Cecchi E. I globuli rossi della malattia di Marchiafava-Micheli osservati al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1958;21:724-33.

Dopo una breve rassegna del quadro clinico e dei dati biologici che conducono alla diagnosi della malattia di Marchiafava-Micheli, gli AA. riferiscono i risultati dello studio al microscopio elettronico dei globuli rossi di un caso occorso alla loro osservazione. È stato in tal modo possibile confermare quanto precedentemente osservato da Matthes e coll. circa la presenza, nel 60-70% degli elementi, di una anomalia stromatica che conferisce ai medesimi un particolare aspetto grossolano macchiato o aereolato. Tale anomalia, presente in maniera evidente all'acme di una crisi, subisce, viceversa, una notevole riduzione nelle fasi di quiescenza clinica. Gli AA. discutono il significato da attribuire al fenomeno descritto, e, fra le altre, prospettano l'ipotesi che possa rappresentare il risultato di un'interazione fra properdin e stroma del globulo rosso.

Von Lorch L, De Felip G, El Zofri M. Studio morfologico di alcuni lattobacilli e dei loro mutanti resistenti agli antibiotici. *Rend Ist Super Sanità* 1958;21:174-80.

Gli AA. hanno eseguito uno studio morfologico comparativo, al microscopio elettronico di alcuni stipti di lattobacilli e delle loro loro mutanti antibiotico-resistenti. Gli stipti presi in considerazione sono: *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Streptococcus lactis* e le loro mutanti a resistenza indotta alla penicillina, tetracicline, cloramfenicolo. È stato evidenziato a carico delle mutanti bastoncellari, che la resistenza alla penicillina determina aumento del volume cellulare, mentre la resistenza al cloramfenicolo si accompagna a coartazione ed irregolare distribuzione della massa citoplasmatica. La resistenza alle tetracicline permette di evidenziare formazioni endocitoplasmatiche, in concomitanza con il processo di divisione cellulare. Tali formazioni possono venire rilevate anche nei ceppi originari, mediante la colorazione metacromatica di Albert. Gli AA. hanno inoltre osservato, al microscopio elettronico, un probabile "ciclo di sviluppo" del *Lactobacillus bifidus*.

Penso G. La cinetica della lisi fagica. *Rend Ist Super Sanità* 1958;21:511-7.

L'autore descrive e illustra - con una serie di fotogrammi, presi alla velocità di 400 al secondo - il fenomeno dell'infezione fagica di un batterio e conseguente sua lisi fagica.

## 1959

Alberti S, Tonolo A, De Felip G. Osservazioni preliminari sulla flora microbica delle acque termali di Viterbo in ordine ai solfobatteri. *Rend Ist Super Sanità* 1959;22:1018-24.

Sono state compiute alcune ricerche sulla flora microbica delle acque sulfuree di Viterbo. Le ricerche hanno, per adesso, condotto all'identificazione di un ceppo di *Rhodopseudomonas palustris* del quale sono stati considerati alcuni suoi aspetti morfologici e fisiologici.

Felici A, Archetti I. Nota su alcuni episodi di influenza verificatasi nel 1959 in Italia. *G Mal Infett Parass* 1959;11:755-60.

Vengono riferiti i dati clinici, epidemiologici e virologici raccolti nel corso dello studio di alcuni focolai epidemici di influenza verificatisi in Italia nei mesi di gennaio-febbraio 1959.

Steve Bocciarelli D, Casorati V. Ultrastruttura dell'epitelio di corde vocali di cavie (prime osservazioni). *Rend Ist Super Sanità* 1959;22:619-37.

Gli AA. studiano al microscopio elettronico l'epitelio del margine libero della corda vocale di cavie. Viene descritta la ultrastruttura dei vari strati.

- a) *Cellule dello strato basale*: sono allungate, disposte in più piani e poggianti su di una membrana basale da cui sono separate da un sottile interspazio di circa 1000 Å di spessore. Scarse le lacune intercellulari. Tra cellula e cellula sono spesso presenti aggregati mitocondriali. Il citoplasma è piuttosto denso con reticolo endoplasmico discretamente sviluppato e con elementi del Golgi poco estesi. I mitocondri sono, in genere, di forma allungata, provvisti delle caratteristiche criste. Presenti in abbondanza vacuoli con profili circolari nel loro interno; assenti i granuli. Il nucleo è piuttosto grande, disposto nella parte centrale della cellula. Sono, infine, riconoscibili i caratteristici desmosomi.
- b) *Cellule dello strato medio*: di forma rotondeggiante, disposte in più piani. Molto abbondanti e di un certo volume gli spazi intercellulari, ove sono visibili numerosi ponti protoplasmatici, che si legano intimamente con quelli delle cellule adiacenti.

Citoplasma piuttosto denso, ben provvisto di reticolo endoplasmico e di zone del Golgi. I mitocondri sono di forma rotondeggiante, ma con striature interne poco evidenti; presenti numerosi vacuoli e granuli. Visibili numerose fibre con decorso ondulante a sede perinucleare. Il nucleo è in genere di forma ovalare, disposto nella parte di centro della cellula, con duplice membrana e provvisto frequentemente di nucleolo.

- e) *Cellule dello strato superficiale*: la superficie libera di questi elementi è caratterizzata dalla presenza di numerosi villi che non sono altro che proiezioni citoplasmatiche dirette verso il lume della glottide. In corrispondenza della superficie libera le membrane laterali di due cellule adiacenti costituiscono le caratteristiche "terminal bars". Frequenti le proiezioni citoplasmatiche fra cellula e cellula, tanto da Conferire l'aspetto di una sutura cranica. Il citoplasma è meno denso rispetto a quello delle cellule che compongono gli altri strati. Pressoché assenti gli elementi che compongono la sostanza del Golgi ed il reticolo endoplasmico. I mitocondri sono piuttosto piccoli, di forma rotondeggiante, con striature interne poco marcate, ma provvisti di piccole granulazioni intensamente opache. Presenti numerosi vacuoli.

Steve Bocciarelli D, Castagnoli B, D'Amore A, Mazzaracchio V, Orfei Z, Ravaioli L. Osservazioni al microscopio elettronico di cellule renali di suino infettate con virus aftoso (nota preliminare). *Rend Ist Super Sanità* 1959;22:619-37.

Vengono riportate le osservazioni, compiute al microscopio elettronico, su cellule renali di suino normali e su cellule infettate con virus aftoso. Sono descritte le varie alterazioni osservate nel citoplasma e nel nucleo delle cellule infettate. Non è stato possibile finora individuare gli elementi virali che causano le alterazioni cellulari.

Steve Bocciarelli D, Tentori L, Vivaldi G. Ultrastruttura dei leucociti normali del cavallo. *Rend Ist Super Sanità* 1959;22:1059-67.

Sono stati studiati al microscopio elettronico, in sezioni ultrasottili, i leucociti del sangue di cavallo. Vengono discussi alcuni particolari morfologici e le differenze che queste cellule presentano rispetto alle corrispondenti cellule dell'uomo.

Steve Bocciarelli D, Violante A. Una leucemia sperimentale studiata al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1959;22:1068-74.

È stata studiata al microscopio elettronico la struttura delle cellule di una leucemia del ratto: il mieloma di Oberling, Guérin e Guérin. Di tali cellule è data una dettagliata descrizione degli aspetti morfologici, nucleari e citoplasmatici che, nel loro insieme, consentono di accostarle ai monociti istioidei. È opportuno pertanto classificare questa leucemia del ratto tra le istioleucemie ad impronta monocitica. Gli aspetti morfologici che esse presentano consistono in un nucleo ampio, polimorfo, di aspetto generalmente monocitoide, munito di grossi nucleoli e con note di immaturità. Il citoplasma, ampio e sfrangiato, è ricco di reticolo endoplasmico e di mitocondri. Questi ultimi presentano costantemente delle alterazioni strutturali interne. È riscontrata frequentemente un'attività fagocitante delle cellule mielomatose più vitali nelle zone dove abbondano le cellule necrotiche. Vengono fatti dei confronti tra le cellule mielomatose osservate al microscopio elettronico e le stesse viste al microscopio ottico.

Steve Bocciarelli D, Zardi O. Ricerche di microscopia elettronica: studio di *Treponema hispanicum* su sezioni ultrasottili (Nota preliminare). *Rend Ist Super Sanità* 1959;22:1-5.

Sezioni ultrasottili di *Treponema hispanicum* vengono studiate al microscopio elettronico. Viene osservato che la spirocheta è provvista di:

- 1) membrana ondulante, "crista", contenente nella sua compagine numerose fibrille a decoro parallelo. La "crista" appare essere una espansione della membrana esterna di rivestimento;
- 2) una doppia membrana di rivestimento delle quali quella esterna, di probabile natura elastica, appare staccata dal protoplasma ed assume aspetto ondulato. La membrana interna appare invece aderente al protoplasma ed è forse costituita da ispessimento di questo;
- 3) protoplasma a costituzione prevalentemente granulare, contenente un certo numero di vacuoli, per lo più irregolari, che tendono ad allinearsi lungo l'asse centrale della spirocheta. Alcuni di questi contengono un corpuscolo opaco ai raggi elettronici di forma rotondeggiante.

Non sono state osservate le ciglia.

## 1960

Agno M. Alcune considerazioni sulla forma dei virus. *Rend Ist Super Sanità* 1960;23:1149-60.

Le particelle di uno stesso virus sono tutte uguali tra loro quanto a forma. e dimensioni. Le forme osservate sono tutte poliedriche, talora regolari. La costanza e la specificità di tali forme non si possono giustificare, ricorrendo a modelli noti di solidi naturali dotati di forma propria, quali i cristalli e le molecole. Sulla base delle osservazioni al microscopio elettronico, si propone un nuovo modello, che sembra capace di inquadrare in modo soddisfacente i risultati sperimentali. Secondo tale modello, la forma esterna della particella virale sarebbe essenzialmente dovuta al rivestimento esterno di molecole proteiche, costituente un monostrato chiuso di elementi tutti uguali tra loro. Si fa vedere che ciò porta come conseguenza che solo alcune categorie di forme sono possibili (quali l'icosaedro regolare, il prisma esagonale retto, ecc.) e che i volumi risultano in ogni caso quantizzati. Ne segue la possibilità di una cristallografia sistematica dei monostrati chiusi che permette di prevedere e classificare tutte le forme possibili.

Agno M. Some remarks on the shape of viruses. *Nuovo Cimento (Suppl.)* 1960;18:166-75.

Archetti I, Steve Bocciarelli D, Toschi G. Development and structure of a simian enteric virus. *Proc Eur Reg Conf Electron Microscopy Delft* 1960;2:964-7.

Archetti I, Steve Bocciarelli D, Toschi G. Electron microscopic structure of a simian enteric virus. *Nuovo Cimento (Suppl.)* 1960;18:176-8.

Archetti I, Steve Bocciarelli D, Toschi G. Studio al microscopio elettronico dello sviluppo della struttura di un virus enterico della scimmia. *Rend Ist Super Sanità* 1960;23:1161-76.

Colture primarie di cellule epiteliali di rene di scimmia sono state infettate con dosi massive di virus SV39, quindi prelevate a tempi diversi (dopo 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 48 ore dall'infezione), incluse in resine acriliche e osservate in sezioni al microscopio elettronico. Sono state così seguite le alterazioni morfologiche delle cellule e le fasi progressive dello sviluppo del virus. Il virus ha origine intranucleare, comincia a mostrarsi alla sedicesima ora e si forma da caratteristici addensamenti che vengono a costituirsi nella matrice nucleare. Verso la ventesima ora si cominciano a vedere nei nuclei degli aggregati di particelle virali a gruppi che spesso sono disposti ordinatamente, quasi a formare strutture cristalline. Circa alla trentaduesima ora l'azione citopatica del virus ha raggiunto il suo massimo e le cellule ormai sono disfatte: il virus è sparso irregolarmente nel nucleo, nel

citoplasma e nel liquido ambiente. La struttura delle particelle virali è stata studiata sia sulle sezioni delle cellule infettate osservate a forti ingrandimenti, sia sul virus isolato e purificato, preparato con tecniche diverse. Il virus maturo, completo, si presenta in forma poliedrica, provvisto di un nucleo centrale pure poliedrico, avente densità maggiore del mantello esterno. Il diametro esterno è da 700 a 800 Å, quello del nucleo da 450 a 500 Å. La superficie del virus, che è quella di un icosaedro, è costituita di elementi tondeggianti (subunità) disposti con simmetria esagonale, aventi diametro apparente da 50 a 60 Å e distanti 80 Å da centro a centro. La disposizione delle subunità sulla superficie dell'icosaedro sembra differire da quella già trovata da altri AA. per un adenovirus umano. Le subunità, che presumibilmente sono molecole proteiche e che si valuta abbiano peso molecolare dell'ordine di 100.000, si presentano spesso come dispiegate sia sulla superficie del virus, sia sparse in gran numero sul fondo del preparato.

Aurisicchio S, Chiozzotto A, Coppo A, Donini P, Frontali C, Graziosi F. Physico-chemical and morphological aspects of temperate phage  $\alpha$  particles. *Nuovo Cimento* (Suppl.) 1960;18:197-202.

Babudieri B, Steve Bocciarelli D. Further research on the fine structure of leprospirae. *Nuovo Cimento* (Suppl.) 1960;18:212-5.

Carta S, Vivaldi G. Studio dell'attività colinesterasica e fosfatase della membrana del globulo rosso. *Rend Ist Super Sanità* 1960;23:761-82.

Le attività fosfatase e colinesterasica presenti negli eritrociti umani sono state studiate durante le varie fasi della preparazione della stromina secondo la tecnica di Moskowitz e Calvin. È stato possibile dimostrare la presenza negli eritrociti di almeno due fosfatasi; una pirofosfatasi che libera ortofosfato dal pirofosfato ed una apirasi che può essere considerato un enzima specifico nella liberazione dell'ortofosfato dall'ATP. È stato d'altra parte osservato che negli eritrociti umani è presente, come del resto era già noto, la sola colinesterasi vera. I tre enzimi presentano una sistemazione differente l'uno dall'altro nella compagine degli eritrociti umani; la pirofosfatasi sembra essere legata alla presenza di emoglobina e relativamente indipendente dai costituenti dello stroma; l'apirasi è sicuramente contenuta nello stroma ma è indipendente dalla stromina; mentre a questo complesso lipoproteico è saldamente legata la colinesterasi, tanto che la proteina o le proteine contenute in questo, presentano un'attività colinesterasica specifica pari ad otto volte quella delle proteine contenute nelle altre frazioni della preparazione della stromina. Viene discusso il possibile ruolo di questi enzimi nel trasporto del glucosio e degli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  attraverso la membrana degli eritrociti.

Mancuso V. La membrana ovulare di *Mytilus edulis* studiata al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1960;23:793-6.

È studiata al microscopio elettronico la membrana che avvolge l'uovo di *Mytilus edulis*. Tale membrana risulta costituita da due strati, uno interno ed uno esterno, congiunti da numerose "formazioni trasverse" immerse in una sostanza fondamentale amorfa. Le "formazioni trasverse" hanno la forma cilindrica con una parete opaca agli elettroni ed una parte interna trasparente. La membrana ha stretti rapporti col cortex dell'uovo da cui si distacca in corrispondenza dei solchi di segmentazione.

Reverberi G, Mancuso V. I costituenti dell'uovo di *Ciona intestinalis* (Ascidie) al microscopio elettronico. *Rend Ist Super Sanità* 1960;23:783-92.

I differenti componenti dell'uovo vergine di *Ciona* sono stati studiati al microscopio elettronico. Le principali osservazioni sono le seguenti:

- 1) le cellule testali contengono un reticolo citoplasmatico ed alcuni mitocondri;
- 2) il reticolo citoplasmatico dell'uovo risulta costituito da numerose piccole vescicole che portano ribosomi. Questo reticolo sembra piuttosto primitivo o indifferenziato;
- 3) i mitocondri si presentano diversi da quelli delle cellule dei Mammiferi, possedendo nel loro interno numerose membrane, ripiegate in differenti modi, che li riempiono completamente;
- 4) vengono inoltre descritte le caratteristiche dei granuli di tuorlo, dei lipidi e di un materiale basofilo che si raccoglie nella parte più (centrifuga dell'uovo).

Reverberi G, Mancuso V. The constituents of the egg of *Ciona intestinalis* (Ascidians) as seen at the electron microscope. *Acta Embryol Morphol Exper* 1960;3:221-35.

Tecce G, Toschi G. A study of ribosomes from a thermophilic microorganism. *Nuovo Cimento (Suppl.)* 1960;18:207-11.

Steve Bocciarelli D, Violante A. Modificazioni morfologiche delle cellule patologiche caratteristiche del mieloma di Oberling, Guérin e Guérin in ratti trattati con Bis (Beta-Cloroetil) p-aminofenilalanina. *Rend Ist Super Sanità* 1960;23:111-21.

Sono stati trattati ratti portatori di mieloma per 3 giorni con Bis-( $\beta$ -cloroetil)p-aminofenilalanina e quindi studiate le modificazioni morfologiche delle cellule neoplastiche allo scopo di individuare i principali punti di attacco del citostatico usato. I dati raccolti depongono per un interessamento iniziale e preminente delle funzioni nucleari, la cui sostanza componente va incontro ad un progressivo addensamento e quindi ad una successiva frammentazione. I nucleoli tendono a scomparire. Le alterazioni citoplasmatiche, mitocondriali e del reticolo endoplasmico sembrano seguire le alterazioni nucleari. Viene discusso il probabile meccanismo di insorgenza delle alterazioni osservate.

## 1961

Archetti I, Steve Bocciarelli D. Contributo allo studio della struttura del virus influenzale. *Rend Ist Super Sanità* 1961;24:546-52.

Mediante varie preparazioni osservate al microscopio elettronico sono stati studiati tre ceppi di virus influenzale di tipo A, allo scopo di chiarire la struttura ed il significato delle forme filamentose. In queste è stata messa in evidenza una struttura superficiale identica a quella osservata nelle forme sferiche, ed una segmentazione corrispondente a possibili suddivisioni. È stata inoltre osservata una struttura interna caratteristica, diversa da quella che compare nelle forme sferiche.

Archetti I, Steve Bocciarelli D. On the structure of a filamentous influenza virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1961;11:599-606.

The observation of two filamentous strains of influenza A viruses shows that filaments present a surface structure identical to that of spheres, as already observed by Choppin et al. This outer shell is comprised of dumb-bell shaped subunits (80 Å from axis to axis). The diameter of each small grain of the dumb-bell is about 30 Å and they are about 25 Å apart. As is clearly seen in the sections, these subunits are supported by a continuous membrane, as already suggested by Morgan et al. and by Hoyle et al. In the cross section of the filaments, an internal material is also revealed; this seems to be unevenly distributed along the filament and appears to be constituted of ordered little grains, 50 Å in diameter. This material is dissimilar to that observed in the spheres, in which it has the appearance of very thin threads, about 25 Å thick. The frequent presence of septa

(in about 25% of filaments) can be clearly seen. Sometimes, instead of septa, a regular succession of constrictions is observed, which is in keeping with the hypothesis that some of the spheres are formed from the filaments by a process of segmentation.

Archetti I, Steve Bocciarelli D. Structure of an enteric simian virus. *Virology* 1961;13:149-52.

Archetti I, Steve Bocciarelli D, Violante A. Studio al microscopio elettronico della miosite dei topi neonati inoculati con virus ECHO 9 e osservazioni sulla struttura del virus. *Rend Ist Super Sanità* 1961;24:826-33.

La miosite determinata nei topi neonati dal virus ECHO 9 è stata studiata al microscopio elettronico ed al microscopio ottico. Le osservazioni fatte con quest'ultimo hanno permesso di localizzare il processo a livello muscolare, mentre apparentemente indenni risultano gli altri organi. Viene fatta la descrizione particolareggiata delle alterazioni muscolari, al microscopio ottico ed al microscopio elettronico; e vengono riferiti i risultati ottenuti dallo studio del virus, sia nelle cellule di colture di tessuto, sia libero e purificato.

Aurisicchio S, Chiozzotto A, Coppo A, Donini P, Frontali C, Graziosi F. Aspetti chimico-fisici morfologici delle particelle del fago temperato alpha. *Nuovo Cimento (Suppl.)* 1961;19:279-80.

Il fago temperato alfa, attivo su *B. megatherium*, presenta proprietà che lo rendono simile al colifago phiX 174; esso infatti è enormemente sensibile ai raggi X e alle disintegrazioni del <sup>32</sup>P assimilato. Abbiamo pertanto formulato l'ipotesi che, analogamente al colifago phiX 174, anche il fago alfa presenti un DNA più semplice, costituito da un'unica catena polinucleotidica. Abbiamo pertanto condotto una serie di ricerche sia sulle particelle integre, sia sul DNA purificato usando metodi fisici, chimici e biologici per vagliare la suddetta ipotesi di lavoro. In questa comunicazione sono riferiti e discussi risultati ottenuti mediante: la microscopia elettronica, la ultracentrifugazione analitica, la spettrofotometria nell'ultravioletto, la cromatografia, l'analisi chimica e l'azione mutagena dell'acido nitroso. Dai dati riferiti emerge che il fago alfa è caratterizzato da proprietà biofisiche simili ma non identiche a quelle del fago phiX 174 e che pertanto sono necessarie ulteriori indagini per chiarire le peculiarità delle sue strutture genetiche.

Babudieri B, Steve Bocciarelli D. Ulteriori ricerche sulla fine struttura delle leptospire. *Nuovo Cimento (Suppl.)* 1961;19:279-80.

Gli AA. hanno proseguito le loro ricerche al microscopio elettronico sulla fine struttura delle leptospire, impiegando in queste, oltre alle tecniche abituali, anche quelle delle sezioni ultrasottili e quella della colorazione di contrasto con l'acido fosfotungstico. Le leptospire sono state osservate sia integre, sia dopo trattamento con sostanze ad azione litica. I componenti morfologici della leptospira sono i seguenti: 1) membrana di rivestimento estremamente elastica, sottile, priva di struttura evidente; 2) cilindro protoplasmico omogeneo, probabilmente rivestito da una seconda esilissima membrana; 3) assistile, che risulta costituito da un sottile tubicino contenente nel suo interno un filamento privo di struttura periodica, ma provvisto di attività contrattile. In particolari condizioni ambientali, alcuni ceppi di leptospire presentano, a carico del protoplasma, la formazione di ammassi globosi di diametro spesso superiore a quello della leptospira, opachi ai raggi elettronici, disposti spesso a corona di rosario. Essi, pur ricordando queste dal punto di vista morfologico, non possono tuttavia essere considerati come spore. Con l'osservazione al microscopio elettronico non è stato possibile mettere in evidenza nel corpo delle leptospire formazioni nucleoidi.

Casorati V, Silvagni C, Steve Bocciarelli D. Osservazioni sulla ultrastruttura della fine vascolarizzazione della corda vocale vera di cavia. *Rend Ist Super Sanità* 1961;24:850-7.

Gli AA. riportano le loro prime osservazioni sulla ultrastruttura della fine vascolarizzazione della corda vocale di cavia. Essi:

- 1) sottolineano la presenza di capillari di tipo semplice in corrispondenza dello strato muscolare, e di capillari di tipo composto a livello dello strato sottomucoso;
- 2) evidenziano, in vicinanza delle cellule endoteliali che rivestono la parte del capillare, elementi rotondeggianti, provvisti di lamine intramurali a sede perinucleare e numerose fibre collagene ed elastiche; 3) rilevano in tutti i capillari una membrana esterna a decorso lineare ed una membrana interna di aspetto ondulato.

Gli AA. infine, nella discussione, prendono in considerazione alcuni aspetti funzionali dei dati morfologici.

Chiozzotto A, Coppo A, Donini P, Graziosi F. Icosahedral shape of a temperate phage of *Bacillus megatherium*. *Sci Repts Ist Super Sanità* 1961;1:12-26.

The shape of a recently isolated bacteriophage active on *B. megatherium* has been studied by means of negative staining. Its head has been shown to be of icosahedral form and careful measurements carried out on about a hundred particles have furnished interesting morphological details.

Cuccurullo C. Dilatazioni pseudoaneurismatiche del dotto arterioso di Botallo pervio. *Rend Atti Acc Sci Med Chir Soc Naz Scienze Lettere Arti*. p. 69-72.

Gigante D, Marotta U, Tomassini N. Osservazioni al microscopio elettronico di linfonodi in condizioni normali e patologiche (leucemia linfoide, granuloma maligna e linfofibrosarcoma). *Rend Ist Super Sanità* 1961;4:128-38.

È stata studiata al microscopio elettronico, in sezioni ultrasottili, la struttura cellulare di linfonodi umani normali e di leucemia linfoide cronica, di granuloma maligno e di linfofibrosarcoma. Vengono descritti e commentati gli aspetti morfologici delle cellule linfatiche normali e le alterazioni che presentano nelle condizioni morbose prese in esame. In particolare sono riferite le caratteristiche ultrastrutturali delle cellule pre-Sternberg e di quelle linfofibrosarcomatose.

Lelli G, Restivo ML. Ricerche al microscopio elettronico sul legamento sospenditore del cristallino. *Rend Ist Super Sanità* 1961;24:57-64.

Gli AA. hanno studiato al microscopio elettronico il tessuto della zonula e confermano in esso una struttura fibrillare. Indicano come componenti fondamentali alcune fibrille di spessore fra 141-175 Å e considerano gli elementi fibrillari più spessi come aggregati di fibrille elementari. Dette fibrille, secondo gli AA., non appartengono per più caratteri al gruppo del collagene.

Marinozzi V. Impregnazione argentea delle sezioni ultrasottili per la microscopia elettronica. *Rend Ist Super Sanità* 1961;24:558-66.

Viene descritto un nuovo procedimento per l'impregnazione argentea delle sezioni ultrasottili per la microscopia elettronica. Sezioni di vari tessuti, fissati in acido osmico ed inclusi in metacrilato, sono state trattate con una soluzione ammoniacale di argento, direttamente o previa ossidazione con acido periodico o con acqua ossigenata. Dopo fissazione in acido osmico tutte le strutture membranose citoplasmatiche rivelano una spiccata argentaffinità primaria, dovuta alla riduzione della soluzione ammoniacale di

argento ad opera dell'osmio ridotto legato ai lipidi insaturi. L'ossidazione con acqua ossigenata previene l'argentaffinità delle strutture protoplasmatiche. Il trattamento delle sezioni con acido periodico produce una diminuzione dell'argentaffinità dei componenti protoplasmatici mentre l'argentaffinità delle strutture metaplasmatiche è notevolmente aumentata. Quest'ultima procedura si rivela particolarmente utile per incrementare il contrasto delle membrane basali.

Marinozzi V. Silver impregnation of ultrathin sections for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:121-33.

A new procedure is described for silver impregnation of thin sections for electron microscopy. Sections of various tissues, fixed in OsO<sub>4</sub> and embedded in methacrylate, were treated with an ammoniacal silver solution, directly or after oxidation with periodic acid or hydrogen peroxide. After OsO<sub>4</sub> fixation all cellular membranous systems exhibit a primary argentaffinity probably due to the reduction of ammoniacal silver solution by the reduced osmium bound to unsaturated lipids. Bleaching the sections with hydrogen peroxide removes the argentaffinity of protoplasmic structures. Treatment of the sections with periodic acid results in decreased argentaffinity of protoplasmic components while the argentaffinity of metaplasmic structures is greatly enhanced. The latter procedure appears particularly useful for enhancing the contrast of basement membranes.

Visintin B, Zavattiero J. Bacillo termofilo isolato da un'acqua termale dell'isola d'Ischia, indagine microbiologica - Nota I. *Rend Ist Super Sanità* 1961;24:649-56.

È stato isolato dall'acqua ipertermale (60 °C) della fonte di S. Restituta di Lacco Ameno d'Ischia, un bacillo termofilo con optimum di sviluppo a 55 °C e resistente fino a 71,5 °C. Su di esso gli autori hanno eseguito una serie di indagini microbiologiche tendenti ad individuarne le caratteristiche.

### 1962

Archetti I, Steve Bocciarelli D. Contribution to the knowledge of the structure of filamentous form of influenza viruses. *Nuovo Cimento (Suppl.)* 1962;25: 11-7.

Ascenzi A, François C, Steve Bocciarelli D. Hystoradiographic and electron microscopy study of calcification in folliclinic bone. *Nuovo Cimento (Suppl.)* 1962;25:18-24.

Babudieri B, Tomassini N. Fine struttura dei tripanosomi. *Parassitologia* 1962;4:89-95.

Gli AA. studiano con il microscopio elettronico la fine morfologia di *T. brucei*, *T. evansi* e *T. lewisi*. Vengono impiegati i seguenti metodi: osservazione dei parassiti integri, osservazione dei parassiti parzialmente lisati, studio di sezioni ultrasottili.

Casorati V, Silvagni C, Steve Bocciarelli D. Ultrastruttura del muscolo della corda vocale di cavia. *Rend Ist Super Sanità* 1962;25(1):231-5.

Nel presente lavoro si studia al microscopio elettronico il muscolo vocale di cavia al fine di rendersi ragione delle caratteristiche strutturali di questo muscolo dotato di una attività del tutto particolare. L'elevato numero di mitocondri disposti anche in catene e provvisti di molte cristelle, il reticolo sarcoplasmatico di Sjöstrand largamente

rappresentato, i sarcomeri brevi (circa 1,4 micron) e la presenza nel sarcolemma di un ricco sistema caveolo-vescicolare fanno riscontrare nel muscolo vocale le caratteristiche morfologiche di muscolo rapido dotato di una attività metabolica notevolmente elevata.

Chiozzotto A, Rosati Valente F. A new autoradiographic technique in electron microscopy. *Nuovo Cimento* (Suppl.) 1962;25:3-10.

Dymowska Z, Babudieri B. Studi sulla cosiddetta "lisi immunitaria" delle leptospire. *Rend Ist Super Sanità* 1962;25:433-6.

Gli autori studiano il cosiddetto fenomeno della lisi immunitaria delle leptospire. Essi confermano con varie esperienze l'opinione di Lawrence, che le cosiddette "lysis balls" sono in realtà ammassi compatti di leptospire integre agglutinate e che la lisi manca in esse completamente, anche qualora alla miscela spirochete-siero immune si aggiunga il complemento. Per la formazione delle "lysis balls" è indispensabile la motilità vivace degli uncini terminali delle leptospire. Se questa manca, come nel caso dei ceppi privi di uncini, si ha il quadro dell'agglutinazione a fascetti o a reticolo. Se infine le leptospire sono uccise e non possiedono più alcuna motilità, l'agglutinazione si manifesta soltanto con la formazione di ammassi poco compatti ed irregolari di leptospire.

Mancuso V. L'uovo di *Ciona intestinalis* (Ascidia) allo stadio di 8 blastomeri osservato al microscopio elettronico. *Acta Embryologiae et Morphologiae Experimentalis* 1962;5:32-50.

È studiata al microscopio elettronico la distribuzione dei componenti dei primi otto blastomeri dell'uovo di *Ciona intestinalis*. Nei quattro blastomeri animali il tuorlo si raccoglie alla periferia dei blastomeri, in più strati, al di sotto del cortex. Tra i granuli di tuorlo si trovano anche goccioline di lipidi e ribosomi. La parte più centrale dei singoli blastomeri è occupata dal reticolo endoplasmatico, costituito principalmente da vescicole ricche di ribosomi, e dal nucleo; intorno al nucleo sono raccolti i mitocondri. Nei due blastomeri vegetativi anteriori si ha fondamentalmente la stessa disposizione dei diversi componenti; i granuli di tuorlo, però, sono più numerosi nella parte più vegetativa. Nei due blastomeri vegetativi posteriori si rinviene un territorio particolare, quello della semiluna gialla, costituito quasi esclusivamente da mitocondri e da elementi del reticolo endoplasmatico. In questo territorio si ha una densità di mitocondri quale non si riscontra in nessun altro territorio dell'uovo. In tutti i blastomeri si rinvengono alcuni mitocondri dalla forma allungata (2  $\mu$  circa) con una strozzatura mediana più o meno accentuata; si tratta probabilmente di mitocondri in riproduzione. Questi mitocondri si rinvengono più frequentemente nel territorio della semiluna gialla.

Parnas J, Chiozzotto A. Die morphologie der Brucella-phagen. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig* 1962;186:84-91.

The morphology of the phage 371/XXIX *Brucella bovis* has been studied by electron microscope. These investigations have confirmed the reports published by Morgan and co-workers and by Jones and co-workers; not, however, the results obtained by Ostrowskaya and Soloviov (1960). The Brucella phages are corpuscles of a polygonal, usually hexagonal or even round shape and are about 50 micrometers in size. They are provided with a tail the length of which ranges from 10 to 27.5 micrometers. Beyond the variety in the shape of the phages, some stages of the development of the phage have been observed.

Parnas J, Chiozzotto A. Further studies on Brucella phage morphology. *Bull Acad Pol Sci Ser Sci Biol* 1962;10:135-7.

The morphology of the phage 371/XXIX *Brucella bovis* has been studied by electron microscopy. These investigations have confirmed the reports published by Morgan et al. and by Jones et al., not, however, the results obtained by Ostrowskaya and Soloviov (1960). The Brucella phages are corpuscles of a polygonal, usually hexagonal or even round shape and are sized about 50 micrometers. They are provided with a tail the length of which ranges from 10 to 27.5 micrometers. Beyond the variety in the shape of the phages, some stages of the "development" of the phage have been observed.

Violante A, Steve Bocciarelli D. Virus oncogeni al microscopio elettronico: Rivista sintetica e dati sperimentali. *Rend Ist Super Sanità* 1962;25(1):302-36.

Dopo una breve messa a punto dei risultati ottenuti negli ultimi anni sul problema dell'eziologia del cancro, è stata raccolta una vastissima bibliografia degli studi fatti al microscopio elettronico sui virus oncogeni. Se ne discutono i risultati. Nella seconda parte del lavoro sono riportati i risultati delle ricerche fatte durante quasi due anni al microscopio elettronico sulle cellule del mieloma di Oberling, Guérin e Guérin allo scopo di rivelare la eventuale presenza di particelle virali nelle cellule di questa neoplasia. I risultati sono stati del tutto negativi: difatti solo raramente si notano dei corpiccioli rotondeggianti, che sono però da ritenersi alterazioni citoplasmatiche prodotte durante il disfacimento delle cellule.

## 1963

Archetti I, Steve Bocciarelli D. Structure of some simian adenoviruses. *Virology* 1963;20:399-404.

Several strains of simian adenoviruses were observed with the electron microscope; all of them were about 800 Angstrom in diameter and had an internal core of about 450 Angstrom in diameter; their external shell was icosahedral in shape and built from 252 morphological components or capsomeres which looked identical and were uniform in arrangement. The strains were all quite similar to adenovirus type 5 described by Horne et al. The capsomeres showed evidence of being built from five small subunits 20-30 Angstrom in diameter. Elongated forms, apparently helical in shape, which can easily be seen in virus preparations, may be aggregates of scattered capsomere.

Ascenzi A, François C, Steve Bocciarelli D. On the bone induced by estrogens in birds. *Ultrastruct Res* 1963;8:491-505.

For the first time an ultrastructural investigation on the bone induced by estrogens in pigeons and in ducks was carried out with the help of an electron microscope. A chemical analysis of the bone matrix was also performed. In the bone matrix the fibrils lack any orderly arrangement and are associated with a variable amount of cementing substance. In accordance with the random distribution, and orientation of the fibrils, the crystallites - which by electron diffraction show the pattern of hydroxyapatite - interweave in all directions. Their width ranges from 10 to 45 Angstrom; their length is not less than 500 Angstrom. The crystallites reveal a dose relationship with thin filamentous entities showing periodic banding and having size and features of tropocollagen units. There is no visible relationship between the crystallites and the periodic banding structure of fibrils. The present analysis, supporting the view that the bone induced by estrogens lacks any mechanical

function but obeys the necessity of accumulating rapidly a very high amount of calcium salts, are discussed in the light of the data furnished by the chemical analysis.

Gandolfo N, Sampaolo A. Procedimento di estrazione e di purificazione della clorofilla "a" e "b" e dei rispettivi derivati idrosolubili. *Rend Ist Super Sanità* 1963;26:935-46.

Viene descritto un procedimento di estrazione e di purificazione cromatografica della clorofilla "a" e "b" e dei rispettivi derivati idrosolubili. La tecnica seguita ha permesso di ottenere prodotti puri. Viene inoltre descritto un procedimento di estrazione dalle foglie di clorofille idrosolubili particolarmente idoneo ad ottenere rapidamente prodotti chimicamente puri. Esso si basa sul trattamento delle foglie, seccate e polverizzate, con potassa metil-alcolica al 12% in modo da realizzare la saponificazione delle clorofille liposolubili durante la stessa fase estrattiva.

Violante A, Steve Bocciarelli D. A contribution to the study of oncogenic viruses. *Acta Unio Int Cancrum* 1963;19:424-7.

Systematic observations were carried on by electron microscope in order to detect viruses in the leukemic cells of rats, bearers of Oberling's myeloma. This tumor is transmitted by cell transplants but not by cell-free filtrates; however, previous investigations performed by others demonstrated the presence of viruses in the cells of this neoplasia. In our observations at the electron microscope, thousands of leukemic cells were examined, but no viruses were detected. The presence of cell changes has been pointed out; these changes resemble virus-like particles, but they are quite aspecific in nature. These changes are comparable to those occurring in the renal cells of monkey cultures *in vitro* and infected by ECHO virus.

## 1964

Babudieri B, Fiaschi E, Naccarato R, Scuro LA, Papa G, Haase J, Tangucci F. Indagine sull'agente eziologico dell'epatite virale umana e lesioni submicroscopiche della cellula umana nel corso di questa malattia. *Boll Acc Med Rom* 1964;89:87-92.

Vengono descritte le lesioni submicroscopiche dell'epatocita in corso di epatite virale. Vengono inoltre illustrate le caratteristiche di particolari elementi rotondeggianti, di 260 Angstrom di diametro, racchiusi in sacculi citoplasmatici, di possibile natura virale.

Moretti B, Orfei Z, Mondino G, Persechino A. La rinotracheite infettiva del bovino: (IBR) osservazioni cliniche ed isolamento del virus. *Vet Ital* 1964;15:677.

Da un allevamento di vitelli con sindrome respiratoria acuta è stato isolato un agente virale su colture di cellule renali di embrione bovino. L'effetto citopatico caratteristico, l'esame al microscopio ottico delle inclusioni intranucleari, l'osservazione al microscopio elettronico di elementi virali appartenenti al gruppo dei virus erpetici, le prove di siero-neutralizzazioni crociate ed infine la riproduzione sperimentale della malattia nei vitelli, portano gli AA. ad identificare l'agente isolato come virus della IBR. In base a tali risultati ed unitamente alle osservazioni cliniche, si può ricondurre l'affezione respiratoria osservata, nelle sue manifestazioni fondamentali, alla Rinotracheite Infettiva dei Bovini.

Morpurgo G, Serlupi Crescenzi G, Tecce G, Valente F, Venettacci D. Cambiamenti nella struttura del *Saccharomyces cerevisiae* durante l'adattamento respiratorio, osservati per mezzo del microscopio elettronico. *Ric Sci* 1964;5:169-78.

In un precedente lavoro è stato dimostrato che le cellule di *S. cerevisiae*, cresciute in anaerobiosi, sono prive di mitocondri e di altre strutture membranose, ma che gli uni e le altre sono presenti se il terreno di coltura conteneva ergosterolo. I risultati del precedente lavoro sono stati ampliati e sono stati inoltre studiati i cambiamenti della struttura delle cellule, che avvengono durante l'adattamento respiratorio. Nelle cellule cresciute in assenza di ergosterolo si hanno, durante tale adattamento, cambiamenti notevoli nella struttura, con la formazione di membrane e la comparsa finale dei mitocondri, mentre in quelle cresciute in presenza di ergosterolo non si hanno cambiamenti notevoli. I risultati ottenuti indicano che in anaerobiosi la sintesi delle membrane richiede ergosterolo. I mitocondri formati in queste condizioni però, non sono funzionanti perché l'ossigeno è indispensabile per la sintesi degli enzimi respiratori.

Morpurgo G, Serlupi Crescenzi G, Tecce G, Valente F, Venettacci D. Influence of ergosterol on the physiology and the ultrastructure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 1964;201:897-9.

## 1965

Aiello I, Frontali C, Tangucci F. Descrizione di un fago temperato del *Bacillus megatherium*. *Ann Ist Super Sanità* 1965;1:119-23.

Vengono descritte alcune proprietà biologiche e chimico-fisiche di un nuovo batteriofago, attivo su *Bacillus megatherium*. La sua struttura è stata studiata al microscopio elettronico.

Archetti I, Steve Bocciarelli D. Struttura e caratteristiche biologiche di un piccolo virus non ancora tipizzato. *Ann Ist Super Sanità* 1965;1:103-6.

Nel campione originale dell'adenovirus della scimmia, ceppo SV 11 (Simian virus 11), proveniente dall'American Type Collection, si presentavano al microscopio elettronico, accanto alle particelle dell'adenovirus, numerosissime particelle di un virus notevolmente più piccolo. Questo virus non è emoagglutinante e appartiene, quasi senza dubbio, al gruppo degli ECMO. Il suo diametro è circa 240 Å, la sua forma è poliedrica, e la disposizione dei capsomeri corrisponde ad una struttura icosaedrica con un capsomero al centro di ciascuna faccia; complessivamente, quindi, il numero dei capsomeri sarebbe 20. Sarebbe questo il primo esempio di virus animale il cui capsido è costituito da 20 capsomeri.

Ascenzi A, Bonucci E, Steve Bocciarelli D. An electron microscope study of osteon calcification. *J Ultrastruct Res* 1965;12:287-303.

The dynamics of osteon (Haversian system) calcification was investigated under the electron microscope applying a specially devised dissection technique in order to examine units in which the amount of calcium salts had been previously established. After a sudden initial penetration of a large percentage of the matrix by elongated needle-shaped crystallites, the apatite is laid down slowly, starting from the broad bands at the major collagen periods. Here small spots corresponding to foci of crystal inception are distributed along the axis of the collagen and fuse in needle-shaped crystallites, reaching a maximum width of 40-50 Å. Successively the crystallites are long enough to span two or more major periods, completely obscuring the fiber structure. Of course as the osteon

calcification increases, the areas covered by needle-shaped crystallites gets larger. The significance of these findings is discussed as well as the differences between calcification of the osteonic bone and calcification of some primary and coarse-fibered bone.

Babudieri B, Fiaschi E, Naccarato R, Scuro LA, Papa G, Haase J, Tangucci F. Indagini sull'agente eziologico dell'epatite virale umana. *Ann Ist Super Sanità* 1965;1:478-86.

Le lesioni submicroscopiche della cellula epatica in corso di epatite virale consistono in un rigonfiamento dei mitocondri ed in una frammentazione e diminuzione delle loro cristae, in una dilatazione dei canalicoli del reticolo citoplasmatico, in una ipertrofia dei lisosomi contenenti pigmenti lipidici ed in un forte aumento del numero dei ribosomi, che invadono alcune zone citoplasmatiche disponendosi su più file parallele. Nel citoplasma delle cellule infette vengono descritti ammassi di granuli di 200 Å di diametro, racchiusi in sacculi ovalari circondati da una membrana semplice. Gli AA. ritengono che questi granuli possano corrispondere all'agente dell'epatite virale. Vengono descritti i risultati di prove di immunofluorescenza e dei primi tentativi di cultura del presunto virus su cellule.

Bedini C. Ultrastruttura degli occhi di uno scorpione *Euscorpium carpathicus* (L.). *Ann Ist Super Sanità* 1965;1:107-10.

È stata studiata al microscopio elettronico la struttura dell'occhio mediano e dell'occhio laterale di uno scorpione, *Euscorpium carpathicus* (L.). In questa nota preliminare sono descritte le cellule del corpo vitreo, della membrana preretinica e le cellule retiniche.

Bonucci E. Lipid globules in osteogenic cells: a histochemical and electron-microscopy investigation. *Journal de Microscopie* 1965;4:57-70.

A histochemical and electron microscopic study of cells involved in membranous ossification (with special reference to lipid globules) is presented. Lipid globules are richer in osteocytes, fibroblasts and preosteoblasts than in osteoblasts. They can be defined histochemically as unsaturated acid lipids, at least partly, phospholipids. The fine structure of fibroblasts, preosteoblasts, osteoblasts and osteocytes shows progressive variation in cytoplasmic differentiation. In fibroblasts, few rough-surfaced cisternae and vesicles are present. There is much glycogen, often circling the many lipid globules. Preosteoblasts have a more developed cytoplasm than fibroblasts and an endoplasmic reticulum variable in extension and richer in more differentiated cells. Lipid globules and glycogen are present in lower quantities than in fibroblasts. Osteoblasts have few lipid globules and practically no glycogen, but a highly organized endoplasmic reticulum with many dilated cisternae, containing a fine fibrillary substance. Osteocytes exhibit an inconspicuous endoplasmic reticulum, with few dilated cisternae. There are some lipid droplets and much glycogen. These results suggest that the acquisition of a high rate of synthesizing activity may be connected with glycogen and lipid depletion. The significance of this is discussed.

Casorati V, Rosati Valente F, Silvagni C. Ultrastruttura della porzione respiratoria della mucosa nasale umana. *Ann Ist Super Sanità* 1965;1:739-45.

È descritta la ultrastruttura della mucosa nasale. Sono considerati, in particolare, gli aspetti submicroscopici delle cellule che compongono lo strato epiteliale (ciliate, calciformi, a spazzola e basali). È quindi trattata la struttura ultramicroscopica della membrana basale e della lamina propria. Sono tratte, infine, alcune conclusioni sui vari dati riportati.

Cassigena R, Miggiano V, Steve Bocciarelli D. Studio comparativo al microscopio elettronico di linee cellulari isogeniche di origine autologa alcune delle quali tumorigene. *Ann Ist Super Sanità* 1965;1:111-8.

Due linee cellulari (PG e PT) provenienti da un unico espianto di tessuto polmonare normale di topo C57BL, cellule tumorali provenienti da tumori sviluppatasi in seguito alla inoculazione di cellule PT, e cellule di una linea (PTa T1) derivata *in vitro* da un tumore analogamente ottenuto, sono state osservate al microscopio elettronico. Se ne discutono le differenze morfologiche. La ricerca di un materiale virale come reperto costante nei tumori e nelle linee cellulari tumorigene è stata negativa.

Steve Bocciarelli D. The structure and development of animal viruses. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 1965;15:149-87.

Steve Bocciarelli D, Orfei Z, Mondino G, Persechino A. Il virus della rinotracheite infettiva del bovino al microscopio elettronico. *Zooprofilassi* 1965;20:283-94.

Gli autori riportano alcune osservazioni eseguite al microscopio elettronico sul virus della Rinotracheite Infettiva del Bovino (ceppo R/63): di questo virus vengono precisate le caratteristiche morfologiche; in molte particelle viene messo in evidenza il nucleo e dalle sue dimensioni valutato il peso molecolare del contenuto in DNA. In altre particelle il DNA risulta diffuso in tutto lo spazio racchiuso dalla membrana esterna.

Violante A, Steve Bocciarelli D. Contributo apportato dal microscopio elettronico allo studio dell'eziologia virale del cancro. *Recenti Prog Med* 1965;38:1-41.

## 1966

Archetti I, Bereczky E, Steve Bocciarelli D. A small virus associated with the simian adenovirus SV 11. *Virology* 1966;29:671-3.

Avellini G, Mondino G, Moretti B, Orfei Z, Pedini B, Persechino A, Steve Bocciarelli D, Lupini P, Bartoletti G, Tangucci F, Pacelli A. Indagini sul virus della rinotracheite infettiva del bovino in Italia. *Ann Ist Super Sanità* 1966;2:560-72.

Babudieri B, Fiaschi E, Naccarato R, Scuro LA, Haase J, Papa J, Tangucci. Presence of virus-like bodies in liver cells of patients with infectious hepatitis. *J Clin Pathol* 1966;19:577-82.

Cytoplasmic "sacculles", bordered by monolayer membranes, containing round, virus-like particles, with a diameter of about 200 Å, are described in liver cells of 11 patients suffering from viral hepatitis. The differences between this pattern, glycogenic clumps of granules, polysomes and cytoplasmic autolysis processes are discussed.

Babudieri B, Fiaschi E, Scuro LA, Naccarato R, Tangucci F, Haase J. Contributo allo studio dell'etiologia delle epatiti virali. *Epat* 1966;12(2):97-107.

Gli AA. si sono proposti di ricercare, con l'ausilio del microscopio elettronico, in puntati epatici di persone affette da epatite virale, l'agente etiologico dell'infezione. Nel citoplasma di alcune cellule epatiche, prevalentemente di natura istiocitaria, sono stati osservati ammassi più o meno abbondanti di granuli rotondeggianti, d'aspetto uniforme, con un diametro di circa 200 Å, racchiusi in sacculi delimitati da una membrana monostratificata. Queste formazioni sono state viste in 11 pazienti su 12 esaminati.

Esse non sono state trovate in puntati epatici tratti da persone affette da malattie diverse dalla virus-epatite. Questi granuli si colorano bene con il Karnowski e con l'acetato di uranile. Si possono differenziare dai ribosomi per le loro dimensioni un po' maggiori, per la loro forma regolarmente rotonda, per essere contenuti in "sacculi". Sono differenziabili dal glicogeno perché non assumono l'aspetto cosiddetto "a rosetta", caratteristico del glicogeno contenuto negli epatociti, perché sono colorati dall'acetato di uranile così come accade per le formazioni contenenti acidi nucleici, per non essere distrutti dalla diastasi. Sono inoltre agevolmente differenziabili dai vacuoli di citolisi contenenti granuli di Palade, che si possono trovare nelle cellule epatiche, e dai lisosomi contenenti granuli di pigmento. Questi "sacculi" sono piuttosto rari da trovarsi, ma per lo più sono multipli nella cellula che li contiene. Gamma-globuline di convalescenti coniugate con ferritina, messe a contatto con sezioni di cellule infette danno un quadro morfologico che potrebbe essere interpretato quale conseguenza di un avvenuto legame fra gamma-globuline e granuli. Gamma-globuline di convalescenti coniugate con isotiocianato di fluoresceina, successivamente adsorbite con polvere di fegato umano normale e messe a contatto sia di sezioni che di strisci di tessuto epatico prelevato a pazienti, determinano la comparsa di aree di fluorescenza costituite per lo più da ammassi di piccole aree circolari che, per dimensioni a distribuzione, potrebbero corrispondere ai "sacculi" osservati al microscopio elettronico. Le formazioni qui descritte sono molto simili, dal punto di vista morfologico, ai sacculi di virus dell'epatite dell'anatra, descritti da Richter e coll., ed i granuli corrispondono, come dimensioni, a quelle che Mc Collum aveva calcolato, con il procedimento della filtrazione attraverso membrane graduate, per il virus dell'epatite da siringa. Tentativi di coltura su cellula del presunto virus sono attualmente in corso.

Luzzatto AC, Ferretti G. Osservazioni con il microscopio elettronico sulla superficie di rivestimento di alcuni plattelminti parassiti. *Ann Ist Super Sanità* 1966;2:675-86.

La superficie del corpo del Cestode *Hymenolepis nana* e del Trematode *Dicrocoelium dendriticum* è formata da un tegumento di tipo particolare, le cui cellule hanno forma molto irregolare e ramificata, col nucleo nella parte della cellula che si trova nel parenchima al di sotto degli strati muscolari e della membrana basale. Alcune ramificazioni di queste cellule si espandono a formare lo strato superficiale del tegumento ove costituiscono un vero e proprio sincizio ricco di mitocondri e granuli ed anucleato. Il tegumento di *D. dendriticum* presenta un profilo molto irregolare, mentre tutta la superficie di *H. nana* presenta numerosi microvilli fittamente addensati. L'epitelio intestinale di *D. dendriticum* appare di natura sinciziale, e sulla sua superficie libera presenta numerosissimi microvilli filamentososi.

Orfei Z, Persechino A, Lupini P, Bellani L. Proprietà chimico-fisiche, biologiche e serologiche di due entervirus isolati dal bovino. *Ann Ist Super Sanità* 1966;2:12-28.

Gli AA. riferiscono sull'identificazione di due agenti virali (EV-130 ed EV-150) isolati in coltura di tessuti, da feci di vitelli con affezioni entero-respiratorie acute. Entrambi i virus sviluppano su cellule renali di embrione bovino e su cellule renali di scimmia; in colture primarie di rene bovino formano placche di citonecrosi; la loro fase di eclissi è di circa un'ora, dopodiché essi entrano nella fase di sviluppo raggiungendo il massimo titolo dopo 48-72 ore. Non posseggono potere emoagglutinante, nè potere emoadsorbente. Osservati al microscopio elettronico, presentano un diametro di circa 15-20 m $\mu$ ; sono resistenti al trattamento con etere (20%), cloroformio (10%) e saponina (0,1%) e sono abbastanza stabili in un'ampia zona di pH (2,13-9,7). La loro moltiplica-

zione *in vitro*, mentre non viene per nulla influenzata dalla presenza di 50-100y/ml di 5-iodo-2'-deossiridina nel terreno colturale, risulta invece completamente inibita dal 2-( $\alpha$ -idrossibenzil) benzimidazolo alla concentrazione 219-493  $\mu$ M. La loro termoresistenza a 56 °C viene notevolmente potenziata dalla presenza di cationi bivalenti (Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>) in concentrazione 1 M. Inoculati per diverse vie, non inducono disturbi clinici apprezzabili ne1 bovino, scimmia, coniglio, cavia e topino. Nelle prove di sieroneutralizzazione crociata, i due virus mostrano solo una lieve differenza antigenica. I due agenti isolati possono quindi essere compresi in un unico prototipo, fra gli Enterovirus del Bovino.

Orfei Z, Persechino A, Lupini R, Mohamed AA. Isolamento caratterizzazione di due ceppi di virus parainfluenza-3 (PI3 - 9931, PI3-3207) del bovino. *Vet Ital* 1966;17:664-97.

Viene riportato l'isolamento, in coltura di tessuto, di due virus appartenenti al 2° sottogruppo dei mixovirus, tipo Parainfluenza-3 (PI3 - 9331, PI3-3207) del bovino, da secrezioni nasali di vitelli con affezioni respiratorie acute. Entrambe i virus sviluppano su cellule renali di embrione bovino e suino con effetto citopatico; in colture primarie di rene bovino formano sincizi, inclusi citoplasmatici e nucleari, e placche di citonecrosi; posseggono capacità emoadsorbente verso emazie di cavia, bovino, montone, coniglio, suino, topo, scimmia, pollo e uomo gruppo O, nonché potere emolitico con emazie di cavia. Osservati al microscopio elettronico, presentano un diametro di 1.200-2.500 Angstrom, una struttura interna elicoidale ed una membrana esterna con proiezioni irradianti dalla superficie. La loro moltiplicazione *in vitro* non viene inibita dalla presenza di 50 gamma/ml di 5-iodo-2'deossiridina né di 0,02 gamma di Actinomicina D; sottoposti all'azione dell'etere mostrano un incremento del titolo emoagglutinante ed una perdita di quello infettante; alla temperatura di 56 °C si verifica la perdita tanto della loro capacità infettante che di quella emoagglutinante; a pH 2,8 ugualmente essi presentano una notevole abbassamento del titolo emoagglutinante e di quello infettante. Alle prove sierologiche (sieroneutralizzazione, inibizione dell'emoagglutinazione, deviazione del complemento) i due virus dimostrano una stretta affinità antigenica con il ceppo SF4. Il comportamento sierologico dei vitelli dai quali i virus sono stati isolati, il decorso dell'affezione, la notevole percentuale di positività verso i due agenti riscontrata alle prove sierologiche nei sieri prelevati nel periodo di convalescenza, fanno ritenere che i due virus siano stati la causa determinante della malattia.

Rosati G. Granuli di glicogeno al microscopio elettronico. *Ann Ist Super Sanità* 1966;2:687-94.

I granuli di glicogeno epatocitario e muscolare sono stati esaminati al microscopio elettronico sia in sezioni di tessuto sia isolati. Sono stati effettuati dei trattamenti enzimatici in ambedue le condizioni. Gli enzimi usati sono diastasi, amilasi e pepsina. I trattamenti effettuati su sezioni sottili hanno dato i seguenti risultati:

- 1) i granuli di glicogeno scompaiono dalle sezioni di fegato dopo digestione con ognuno degli enzimi usati;
- 2) i granuli di glicogeno muscolare rimangono evidenti anche dopo tempo di trattamento molto più lunghi.

I granuli di glicogeno isolati sia dal fegato che dal muscolo sono invece digeriti dalla diastasi senza alcuna distinzione. Frammenti di fegato e di muscolo, incubati in glucosio 0,1% per sintetizzare nuovo glicogeno, mostrano granuli di dimensioni maggiori rispetto ai preparati normali. Dopo trattamento con diastasi i granuli di glicogeno tornano alle loro dimensioni normali. Viene discusso il significato di questi risultati.

Sabatini MT, Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Effetti precoci del siero anti-Nerve growth factor (anti NGF) sulla cellula nervosa. *Ann Ist Super Sanità* 1966;2:349-55.

È stata studiata l'azione del siero anti-NGF valutata mediante l'incorporazione di uridina-C14 in gangli cervicali superiori di topi neonati in prove *in vitro* e *in vivo*. I risultati dimostrano una rapida inibizione della sintesi di RNA nelle prove sperimentali cui corrisponde morfologicamente una alterazione primaria a livello nucleare precedentemente descritta. Viene inoltre discussa la specificità d'azione di tale siero anti-NGF quando paragonato ad altri sieri citotossici.

Steve Bocciarelli D. Osservazioni sul processo di calcificazione ossea. *Ann Ist Super Sanità* 1966;2:657-764.

Dalle osservazioni di sezioni sottili di osso al microscopio elettronico si possono stabilire le relazioni spaziali tra il minerale di calcio e il substrato organico, a livello molecolare. Queste vengono commentate e discusse sulla base delle nozioni che oggi si possono raccogliere dall'enorme massa di lavoro fatto da biologi, biochimici e mineralogisti in questo campo.

Steve Bocciarelli D, Orfei Z, Mondino G, Persechino A. The core of bovine herpes virus. *Virology* 1966;30:58-61.

## 1967

Arancia G, Bandiera M, Morpurgo G. Formazione di cloroplasti in colture di tessuti di *Daucus carota* in diverse condizioni ormonali. *Ann Ist Super Sanità* 1967;3:175-8.

Culture di tessuti *Daucus carota*, alla luce, divengono verdi, se coltivate in presenza di opportune concentrazioni di auxine e chinetine; se si sostituisce all'auxina e alla chinetina l'acido 2,4-dicloro-fenossiacetico (2-4D) le cellule rimangono invece bianche. L'esame delle sezioni cellulari al microscopio elettronico ha mostrato che in quelle coltivate in presenza di 2-4D lo sviluppo del cloroplasto si arresta allo stadio iniziale di proplastidio.

Arancia G, Miggiano VC, Prociachiani G. Membranes caractéristiques dans le cytoplasme de lymphocytes humains transformés *in vitro*. *J Microsc* 1967;6:71a.

Les petits lymphocytes activés en culture par divers stimulants immunologiques (PHA, tubercuine, culture mixte) se transforment en grands cellules indifférenciées (blast-like cells), dans un pourcentage qui dépend des antigènes employés. Dans les cultures de lymphocytes traitées avec PHA, et dans certaines cellules en particulier, on a observé dans le cytoplasme des arrangements de membranes qui peuvent être interprétés comme des vésicules aplaties accolées. Un ensemble est ainsi formé par quatre membranes; son épaisseur est à peu près de 400 Angstrom, et plusieurs ribosomes sont fixés aux membranes externes. Ces structures se développent en longueur jusqu'à une dizaine de microns. Très souvent on en a observé le long de la membrane nucléaire; dans le cytoplasme elles peuvent se séparer en deux citernes qui font partie du R.E. "rough", ou, enfin, elles se continuent en lamelles annelées. Leur mise en évidence dans des cellules riches en glycogène suggère l'hypothèse qu'elles sont caractéristiques de lymphoblastes qui n'ont pas encore eu une division mitotique. Par contre, Roymond *et al.* (1965), qui a observé des structures semblables dans les lymphocytes

du thymus qui se multiplie normalement *in vivo*, suppose qu'elles sont des résidus de la membrane nucléaire après sa rupture en prophase: en télophase, elles réapparaissent pour former la nouvelle membrane nucléaire. Toutefois, ces structures ont été observées en très grande quantité dans des cellules qui montrent une membrane nucléaire déjà formée, et là où on observe la division de l'ensemble en deux citernes on voit plusieurs polysomes: cela suggère que ces membranes sont intéressées au mécanisme de synthèse et sécrétion protéique. Enfin, puisque ces formations ne se trouvent pas dans les autres cultures étudiées (tuberculine, culture mixte), il semble qu'elles soient caractéristiques d'un type cellulaire différent de celui des cellules ayant une compétence immunologique.

Archetti I, Jemolo A, Steve Bocciarelli D, Arangio-Ruiz G, Tangucci F. On the fine structure of the influenza viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 1967;20, 133-6.

Pleomorphism of influenza virions and the facility to change their shape is partly explained by the looseness of the envelope. Despite this lack of a rigid form the projections present in the outer coat of the particles seem to be arranged in a regular fashion. Hoyle *et al.* (1962), in a study on the structure of strain of influenza A, observed that the projections were regularly packed when seen end on. Waterson *et al.* found that in some places of filamentous forms of the strain 1233 of influenza C a hexagonal packing of the projections could be seen. These authors think that a similar disposition of the projections must also be present in the spherical particles. In a study, which is still in progress, on the biological behaviour and morphological appearance of strain 1233 of influenza (obtained through the courtesy of Dr. H. Pereira - WHO Influenza Center - London), a pattern of the disposition of the projections was found, both on round (Fig. 1) and filamentous forms (Fig. 2), which corresponds to that shown in the picture of Waterson *et al.* (1960) The projections, seen end on, show that they are arranged on the vertices of regular hexagons. If the picture from the paper of Waterson *et al.* and our own are compared with those of Hoyle *et al.*, it appears that the surface arrangement of the projections observed in the particles of influenza C is different from the hexagonal dose packing recognizable in the paper of Hoyle *et al.* on the virions of the A type strain. While the distribution of the projections found on type C influenza virus corresponds to the presence of one projection on each point of a regular hexagonal lattice, so that each projection has only three other adjacent projections (Fig. 3a), that observed by Hoyle *et al.* and also by us on round particles of A and A2 corresponds to six projections adjacent to a single one (Fig. 3b). The adjacent projections in influenza C are about 60 Angstrom apart and are usually linked together. Five projections on the vertices of a regular pentagon can sometimes be seen (Fig. 1, inset), as should be present somewhere on the surface of the virion in order to get an enclosed structure. Henle, on the basis of the biological behaviour of influenza C, has questioned whether it should belong to the influenza group. This morphological difference between influenza C and the other influenza viruses could perhaps be related to some of the biological characteristics of this virus.

Ascenzi A, Bonucci E, Steve Bocciarelli D. An electron microscope study on primary periosteal bone. *J Ultrastruct Res* 1967;18:605-18.

Our specially devised dissection technique for electron microscope examination of bone units in which the degree of calcification has been previously established was applied to investigate primary nonlamellar periosteal ox bone. The circumferential systems forming this type of bone tissue are made up of collagen bundles running concentrically in a shell-like arrangement. Each bundle is in dose contact with the next, but the direction of the fibrils changes in successive bundles. Not all collagen fibrils are totally calcified. Along fibrils totally obscured by a large amount of needle-shaped

apatite crystallites, there are only a few areas in which calcium deposition involves only a portion 400 Angstrom wide of the main cross-banding of fibrils. Whereas along the very highly calcified cementing bands interposed between the circumferential systems the organic matrix is composed of collagenous fibrils irregularly oriented in all directions and heavily flanked by a very large amount of apatite crystallites totally covering the collagen. The present results are thoroughly discussed and compared with the findings obtained for other types of bone tissue in order to furnish further data on general problems concerned with ossification.

Bedini C. The fine structure of the eyes of *Euscorpium carpathicus* L. (Arachnida Scorpiones). *Arch Ital Biol* 1967;105:361-78.

The visual cells are grouped in retinulae. The rhabdom of the retinulae in the median eyes consists of five closely applied rhabdomeres, while those of the lateral eyes are irregularly shaped. The rhabdomeres are formed by closely packed tubular units 1.0 micron long. The submicroscopic organization of the vitreous body cells, of the pre-retinal and postretinal membranes, and of the nerve fibers is also described.

Frontali N, Mancini G. Studio istochimico e al microscopio elettronico delle strutture sinaptiche nei corpi pedunculati degli insetti. *Boll Soc Ital Biol Sperim* 1967;43:152.

I corpi pedunculati del cervello degli insetti constano di cellule e di neuropilo (calcilobo alfa e lobo beta). Essi sono stati riconosciuti come sede della elaborazione di complessi schemi di comportamento in rapporto con l'ambiente. Corpi pedunculati di *Periplaneta americana* sono stati studiati con un metodo istochimico per la acetilcolinesterasi. Integrando i risultati di questi due metodi, si è potuto concludere che le cellule dei calici non sono né adrenergiche né colinergiche, ma che i loro prolungamenti fanno sinapsi con fibre adrenergiche nei lobi alfa e beta, e con fibre colinergiche nei calici. Al microscopio elettronico il neuropilo dei corpi pedunculati risulta formato quasi esclusivamente di fibre e di terminazioni nervose, contenenti vescicole sinaptiche e granuli densi, provvisti di membrana, del diametro di 600-1100 Angstrom. Trattamento anche prolungato delle blatte con reserpina non provoca lo svuotamento o la scomparsa di questi granuli, mentre abolisce completamente la reazione istochimica fluorescente. Si conclude che non vi è rapporto fra la densità ottica dei granuli e la presenza di catecolamine.

Mancini G, Frontali N. Fine structure of the mushroom body neuropile of the brain of the roach, *Periplaneta americana*. *Z Zellforsch* 1967;83:334-43.

The neuropile of the mushroom bodies is enveloped by a glial coating, sending a few septa inside. It is formed by nerve fibers and nerve endings which are smaller, more uniform in size, and more regularly arranged than those of the surrounding neuropile. The nerve endings are full of clear vesicles, dense granules 600-1100 Angstrom in diameter, and mitochondria; the nerve fibers contain neutrotubules, mitochondria, and often also some vesicles and granules. The fibers mainly follow a parallel trend; where the endings are present, they intermingle with the fibers without any recognizable order. The nerve fibers and endings come into contact with each other without glial sheets separating them; the cleft is 100-200 Angstrom wide; no structural character was observed indicating the areas where synapses occur. The functional polarity of the contacts, the origin of the fibers and the nature of the dense granules are discussed.

Rosati G. Enzyme treatment of glycogen particles in rat liver and muscle. *J Ultrastruct Res* 1967;18:444-55.

Liver and striated muscle glycogen particles, both isolated and in tissue secretions, were examined in the electron microscope. They were treated enzymatically with diastase, amylase and pepsin. Pepsin was used because it is believed that glycogen tissues is bound to proteins. The enzymatic treatment of ultrathin sections gave the following results: (a) Liver glycogen particles disappeared from the sections after digestion with any one of the enzymes used; (b) muscle glycogen particles did not disappear from the sections even after a double treatment with pepsin and diastase. Glycogen particles isolated from either liver or striated muscle were digested by diastase. Pieces of liver and muscle, incubated in 0.1% glucose to synthesize more glycogen, contained glycogen particles which appeared larger than usual, as seen in the electron microscope. Following diastase treatment, these particles returned to their original dimensions in muscle sections, and disappeared completely from the liver sections.

### 1968

Arancia G, Tuttobello L. Studio al microscopio elettronico dell'alga cloroficea *Dictyococcus cinnabarinus* in auto- ed eterotrofia. *Ann Ist Super Sanità* 1968;4:534-44.

L'alga verde *Dictyococcus cinnabarinus* è studiata nella "normale" forma verde e nelle forme che si pigmentano in rosso per aggiunta di glucosio al terreno di Detmer modificato. Fissata con glutaraldeide e  $\text{KMnO}_4$  od  $\text{OsO}_4$  e inclusa in araldite, mostra una complessa parete cellulare, un nucleo con larghi pori, più cloroplasti periferici includenti granuli di amido, numerosi corpi granulari di incerta natura e funzione, oltre ai normali costituenti citoplasmatici (mitocondri, ribosomi, granuli osmiofili, dictiosomi, ecc.). Nell'arrossamento si disintegrano le lamelle cloroplastiche, sembra che diminuisca il numero dei mitocondri e dei corpi granulari, come tutto lo spazio endoplasmico, compreso da numerosi granuli di amido e circondato da uno spesso anello di grasso, ricco in carotenoidi.

Archetti I, Berczky E, Steve Bocciarelli D, Arancia G, Trovalusci L. Electron Microscopy of an adenovirus associated virus. *Ann Ist Super Sanità* 1968;4:261-5.

Nuclei of monkey kidney cells infected with simian adenovirus SV11 accompanied by its AAV (adenovirus associated virus) apparently contained either the adenovirus or the AW only, or both, AAV particles appeared as complete virions, and often as empty particles which might constitute entire parts of the nucleus. Specific viroplasma of the adenovirus and AAV with an occasionally different structure could be observed. Results obtained after digestion with either RNase or DNase of both free AAV and ultrathin sections containing the virus were not clear, so that no conclusion was reached concerning the nucleic acid content of AAV.

Babudieri B, Fagiolo U, Tangucci F. Monoparticulate glycogen in human liver. *Histochimie* 1968;15:184-6.

Round granules about 200Å in diameter have been observed in the sinusoids bordering cells of human liver and possibly also in the hepatocytes. These granules clustered together to form clumps 0.3 μ in diameter, are enclosed in a fine cytoplasmic membrane, and are very similar in appearance to the so-called "monoparticulate" glycogen present in cells of extrahepatic tissue. These granules are of glycolytic nature as shown by their sensitivity to a prolonged diastase treatment.

Carnevali F, Donelli G. Some properties of a thermophilic phage DNA. *Arch Biochem Biophys* 1968;125:376-7.

Cuccurullo L, Violante A. Osservazioni al microscopio elettronico su di un micoplasma coltivato in terreni acellulari ed in cellule amniotiche umane. *G Mal Infett Parass* 1968;20:496-8.

È stato condotto al microscopio elettronico lo studio sulla morfologia di un micoplasma isolato presso i Laboratori di Virologia dell'Istituto di Patologia Medica dell'Università di Napoli ed indicato come ceppo "P". Lo studio biologico ed immunologico di tale ceppo permette di affermare che esso è molto simile al micoplasma *Hominis* 2. Le indagini ultrastrutturali sono state svolte impiegando sia micoplasmi coltivati su terreni acellulari (brodo) che micoplasmi coltivati su terreni cellulari (cellule amniotiche umane); in queste ultime condizioni sono state effettuate prove di isolamento microbiologico in mezzi acellulari e ricerche di ordine enzimatico (test della Arginina-Deiminasi), allo scopo di accertare l'avvenuta infezione (Barile *et al.*, 1963). Le ricerche sono state svolte per i micoplasmi liberi mediante contrasto negativo con PTA e su sezioni di particelle fissate in formaldeide ed osmio ed incluse in araldite; le cellule amniotiche umane latentemente infette o sperimentalmente infettate con i micoplasma P (positività del test della Arginina-deiminasi) sono state fissate in glutaraldeide ed osmio ed incluse, dopo disidratazione, in araldite. Le sezioni ottenute mediante ultramicrotomia, sono state colorate con idrossido di piombo secondo Karnovsky *et al.*, con acetato di uranile. I corpi micoplasmici, sulla base delle osservazioni effettuate, possono essere divisi in due gruppi principali, tra loro ben differenti sul piano morfologico: il primo è costituito da forme grandi o "mature", con tendenza ad assumere aspetti vescicolosi; il secondo da forme piccole e compatte, paragonabili ai cosiddetti "Corpi elementari". (Maniloff *et al.*, 1965; Humler, 1965).

Donelli G. Isolamento di un batteriofago di eccezionali dimensioni attivo su *B. Megatherium*. *Rend Acc Naz Lincei Cl Sci Fis Mat Nat* 1968;44:95-7.

The data relative to the isolation of a temperate bacteriophage of exceptional dimensions are given as well as the identification of the host bacterial strain. The results of an electron microscope investigation of the complex structure of this phage are also reported.

Fortunato V, Steve Bocciarelli D, Auriti G. Contributo allo studio morfologico degli ossicini. *La Clinica ORL* 1968;3:163-75.

Lo studio microradiografico degli ossicini costituisce un elemento importante della ricerca della fine struttura canalicolare degli ossicini stessi per qualsiasi indagine sulla vascolarizzazione intraossea di essi. Oltre a confermare l'esattezza dei più recenti studi di istologia effettuati prevalentemente dalla scuola americana (Anson), si richiama l'importanza di questa tecnica per chi desidera affrontare e cercare di risolvere alcuni problemi di patologia e di microchirurgia ossiculare.

Lopes MC, Verani P, Balducci D, Chiodera Filetici V. Infezione latente in topi di laboratorio. Isolamento di reovirus tipo 3. *Ann Ist Super Sanità* 1968;4:222-8.

Un reovirus di tipo 3 è stato isolato dall'allevamento di topi dell'Istituto Superiore di Sanità. Tale virus è stato isolato da un caso sporadico di malattia di un topo neonato, inoculato con una sospensione di zecche durante studi sistematici per l'isolamento di arbovirus. L'identificazione del virus è stata eseguita sia mediante lo studio delle caratteristiche biologiche (patogenicità per animali ospiti, sensibilità ad agenti chimici, effetto citopatico in coltura cellulare, morfologia al microscopio elettronico), sia mediante identificazione sierologica.

Luzzatto AC, Proccichiani G, Rosati G. Rat submaxillary gland: an electron microscope study of the secretory granules of the acinus. *J Ultrastruct Res* 1968;22:185-94.

Fine structural studies of the rat submaxillary gland, after double fixation in glutaraldehyde and OsO<sub>4</sub>, have revealed a very characteristic crystal-like arrangement in the granules of the acinar cells. This peculiar structure was studied using various fixations, differential staining, and enzymatic digestion. Its nature is discussed in this paper in relation to the biochemical and ultrastructural data available in literature.

Minio Paluello F, Rosati G. The influence of fixation and dehydration on the isolated glycogen. *J Microsc* 1968;7:275-80.

Proccichiani G, Miggiano V, Arancia G. A peculiar structure of the membranes of the PHA-stimulated lymphocytes. *J Ultrastruct Res* 1968;22:195-205.

Normal human lymphocytes when stimulated *in vitro* with PHA are activated and develop into large basophilic blast cells capable of synthesizing DNA and RNA and of undergoing mitoses. This process has been fully described in literature, and the ultrastructure of these "blast cells" is well known. This paper deals with an unusual structure of membranes found in the cytoplasm of the activated cells and discusses their relationships with the nucleus, the endoplasmic reticulum, the annulate lamellae, and other cytoplasmic components.

Scullica L, Tangucci The ultrastructural relationship between pigment cells and photoreceptors. *J Microsc* 1968;7:1085-92.

Anticorpi per il reovirus di tipo 3 sono stati trovati nei topi dell'allevamento. Questo è il primo reperto di isolamento di un reovirus in Italia.

Violante A, Poletti A, Marchegiani M. Sulle caratteristiche morfologiche di cellule di topo di coltura primaria e di linea, normali o portatrici di virus e capaci di dare tumore. *Ann Ist Super Sanità* 1968;4:254-60.

È stata eseguita una ricerca sulla morfologia di vari tipi di cellule coltivate *in vitro* capaci di determinare l'insorgenza di neoplasie quando venivano inoculate in topi neonati. La ricerca è stata impostata allo scopo di poter evidenziare caratteristiche morfologiche che potessero essere considerate peculiari della malignità delle cellule. Lo studio accurato ha permesso di rilevare la presenza di particelle virus-simili nel citoplasma delle cellule di coltura capaci di dare tumore e nelle cellule dei tumori derivati, mentre tale reperto mancava nelle cellule di controllo.

## 1969

Castelnuovo G, Giuliani HI, Luchini De Giuliani E, Arancia G. Protein components of mycobacteriophage. *J Gen Virol* 1969;4:253-7.

The protein components of a mycobacteriophage were associated with various concentrations of KOH. The tails disintegrated at concentrations leaving the heads intact. The process of disintegration at the heads was gradual and increased when the normality of the potassium hydroxide was augmented. Following dialysis of the alkaline degraded material against distilled water at + 4 °C and adjustment of pH to 5 a reaggregation of protein fragments very similar to tails was observed. This also occurred before disintegration of the heads. The alkaline-degraded material was studied by immunodiffusion before and after dialysis; the ability to precipitate with antibodies was lost after treatment with strong KOH but was recovered after dialysis.

Cuccurullo L, Violante A. Osservazioni al microscopio elettronico di un micoplasma coltivato in terreno acellulare e in coltura di fibroblasti - Rassegna della letteratura. *Boll Ist Sieroter Milan* 1969;48:561-7.

Gli AA., dopo aver passato in rassegna la letteratura intorno alla fine morfologia dei micoplasmi, espongono le personali ricerche al microscopio elettronico sul micoplasma P. Questo micoplasma è stato studiato sia in contrasto negativo che dopo inclusione in resine e, per meglio rilevarne le caratteristiche morfologiche nell'arco del suo accrescimento, sono stati utilizzati sia micoplasmi di ceppo P coltivato in brodo che micoplasmi in culture di cellule a linea continua e specialmente infettate.

Poletti A, Violante A. Sulla evidenziazione e localizzazione dell'acido ascorbico in epatociti di ratti normali e leucemici: studio al microscopio elettronico. *Il Laboratorio nella Diagnosi Medica* 1969;14:167-73.

## **1970**

Ageno M. Architettura e simmetria delle particelle virali. *Quad Ric Sci* 1970;57:40-68.

Archetti I, Berezky E, Rosati Valente F, Steve Bocciarelli D. Elongated structures present in cells infected with influenza viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 1970;29:275-86.

Elongated tubular structures, which may reach a maximum length of 1 micron, were found in cells infected with two strains of influenza virus rich in filamentous forms. They had a cross section of about 330 Angstrom in diameter and a clear banding with a periodicity of 65-70 Angstrom visible in the longitudinal section. According to the results obtained using various techniques these structures should correspond to specific viral ribonucleoprotein.

Castrucci G, McKercher DG, Cilli V, Arancia G, Nazionali C. Characteristics of a paravaccinia virus from cattle. *Arch Gesamte Virusforsch* 1970;29:315-30.

A strain of paravaccinia virus (66/1456Sc) was isolated from nasal flushings and pharyngeal swabbings collected from one calf involved in an outbreak of a respiratory disease syndrome which occurred in a group of 20 stabled cattle. The isolate appeared to be a lipovirus of the DNA type, pH 3 labile, heat sensitive, and not affected by either 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole in a concentration of about 50 microgram per ml or by a 0.125% solution of trypsin. The isolate multiplies in bovine embryo kidney (BEK) cell cultures, producing CPE characterized by the formation of "closed plaques" and intracytoplasmic inclusions. It possesses morphologic characteristics peculiar to those of the paravaccinia viruses, and dimensions of approximately 280 by 160 micrometers. The virus is devoid of hemoagglutination or hemoadsorption activity, and failed to infect sheep, rabbits or mice, or to produce lesions on the CAM of fertile hens' eggs. Cattle inoculated intranasally, intravenously or intramuscularly with the isolate, or by the intradermal route in the neck or muzzle, remained clinically healthy. However, when inoculated into the submucosa of calves, or intradermally into the teats of milking cows, the virus produced small ulcerative lesions in the former and erythematous nodules in the latter animals. Neutralizing antibodies were not produced by any of the following viruses: parainfluenza-3, vaccinia, bovine viral diarrhea, infectious bovine rhinotracheitis, pseudorabies, Shope fibroma, or sheep pox. The isolate reactivated heat-inactivated Lancy-Vaccina strain of vaccinia virus in CAM and BEK cell cultures. Studies of the isolate in cattle indicate that it was not responsible for the respiratory signs observed in the disease outbreak from where it was isolated.

Castrucci G, Pedini B, Cilli V, Arancia G. Isolation in Italy of a viral agent resembling bovine herpes mammillitis virus. *Boll Ist Sieroter Milan* 1970;49:477-83.

A herpes virus indicated as 69/1 LO, was isolated from an ulcerative lesion of the oral mucosa of a calf dead from alimentary troubles. Based on the results of a virological and serological investigations, as well as from the experimental response of bovine and laboratory animals, it was concluded that the isolate possesses the characteristics peculiar to bovine herpes mammillitis virus.

Donelli G, Guglielmi F, Rosati Valente F, Tangucci F. Determinazione della forma di particelle virali da sezioni seriate. *Ann Ist Super Sanità* 1970;6:88-94.

La tecnica delle sezioni in serie è ormai da molti anni efficacemente impiegata in microscopia elettronica, ai fini della ricostruzione tridimensionale di strutture biologiche in genere. Scarsa applicazione ha tuttavia finora trovato come ausilio nello studio morfologico delle particelle virali, le cui dimensioni impediscono la realizzazione di ricostruzioni spaziali. Scopo di questa nota è quello di proporre un metodo che, a partire da sezioni seriate di particelle virali, ne permette una ricostruzione "bidimensionale", tramite sovrapposizione fotografica di sezioni successive. Le informazioni ricavabili dal metodo (profili esterni delle particelle secondo ogni direzione, disposizione relativa delle sezioni successive), unitamente alla conoscenza dello spessore medio delle sezioni, permettono una decisiva verifica delle ipotesi di forma, avanzate in base all'osservazione di sezioni singole.

Fortunato V, Steve Bocciarelli D, Auriti G. Contributo allo studio della morfologia ossea dell'area cribrosa dell'etmoide. *La Clinica QRL* 1970;1:3-15.

Gli AA. attraverso uno studio microradiografico della morfologia ossea dell'area cribrosa dell'etmoide, hanno sottolineato la notevole variabilità di conformazione anatomica esistente tra un caso e l'altro, ipotizzandone una variabilità di funzione olfattoria per peculiari caratteristiche scheletriche e somatiche; ma soprattutto, col rilievo del dettaglio della fine struttura dei cribrî olfattori, hanno voluto considerare la stessa struttura ossea dei cribrî, come un elemento fondamentale, nei riflessi della fisiologia olfattoria, di un possibile sistema di blocco esistente in un momento del passaggio dei neuroni olfattori, i cui altri elementi, soprattutto i neuro-vascolari, già in corso di studio, saranno oggetto di una prossima pubblicazione.

Frontali N, Mancini G. Studies on the neuronal organization of cockroach corpora pedunculata. *J Insect Physiol* 1970;6:2293-2301.

Continuing an electron microscopic study of the corpora pedunculata of *Periplaneta americana*, we have found that the alpha lobe is ultrastructurally very similar to the beta lobe, both with regard to the characteristics and the polarity of the synapses. Both neuropiles are essentially formed by nerve fibers and nerve endings coming into close contact with each other. There are at least two types of nerve fiber. Type 1 fiber (which are interpreted as axonic processes of the globuli cells) are uniformly thin and often roughly parallel to each other; they give rise to an enormous number of nerve endings containing small clear vesicles and slightly larger semi-dense granules. These fibers sometimes make synaptic contacts between themselves (axo-axonic synapses). More often, however, they synapse on type 2 fibers, which are characterized by the lack of synaptic vesicles. Type 2 fibers, which are therefore considered as post-synaptic, are in all probability the dendrites of neurons which are extrinsic to the corpora pedunculata. Two types of neuropile are therefore present in the corpora pedunculata. In the calices the large nerve endings of the extrinsic fibers each make numerous synaptic contacts with thin dendritic branches of the globuli cells. In the alpha and beta lobes, however, numerous nerve endings of the globuli cell axones converge to the synapse on the thin dendritic branches of the extrinsic neurons.

Lopes MC, Ronda C, Verani P, Balducci M. Growth of Bhanja virus in tissue culture. *Acta Virologica* 1970;14:244-8.

Bhanja virus produced a cytopathic effect (CPE) in chick embryo, HeLa and BHK-21 cells. In the latter, which were found the most suitable for studying the virus in cell culture, the CPE was marked and characterized by bubbling of the cell periphery with cytoplasmic vacuolization and pyknosis. The growth curve of Bhanja virus-infected BHK-21 cells revealed roughly spherical virions, consisting of a dense core about 700 Angstrom in diameter, surrounded by spiky surface subunits. The maximum diameter of the whole viral particle was about 900 Angstrom. An attempt to produce plaques under agar was made.

Mancini G, Frontali N. On the ultrastructural localization of catecholamines in the beta lobes (*corpora pedunculata*) of *Periplaneta americana*. *Z Zellforsch* 1970;103:341-50.

In the brain of the cockroach *Periplaneta americana*, the beta lobes of the corpora pedunculata respond with an intense positive reaction to a specific fluorescence histochemical method for catecholamines. The fluorescence reaction disappears completely after prolonged treatment of the cockroaches with reserpine. An ultrastructural examination of the beta lobes in formaldehyde-glutaraldehyde-osmium fixed preparations reveals the presence of two types of fibers: 1) Fibers and nerve endings containing small clear vesicles and slightly larger vesicles with a semi-dense content. The appearance and size distribution of these dense vesicles is only slightly affected by treatment of the cockroaches with reserpine. If the brain slices are incubated in a medium containing nonadrenaline or alpha-methyl-noradrenaline and fixed in permanganate, small vesicles with electron-dense central cores show up, similar to those which have been described in vertebrate adrenergic nerve fibers ("small granular vesicles"). They are confined to one of the two types of fibers (a and b) visible in these preparations, namely type b, whose correspondence with type 2 fibers of formaldehyde-glutaraldehyde-osmium fixed preparations is discussed.

Mangia F, Proccichiani G, Manelli H. On the development of the blood island in *Xenopus laevis* embryos: light and electron microscope study. *Acta Embryol Exp* 1970;163-84.

L. and E.M. observations have been made in parallel with the pattern of the benzidine reaction on the development of the blood island in *Xenopus laevis* (Daud.), from stages 27 to 42 using Nieukoop and Fabers tables (1956). The observations may be summarized as follows:

- 1) the morphogenesis of the blood island and the maturation of the erythroid cells follows a cranio-caudal direction from the region immediately posterior to the liver primordium to the anus;
- 2) early stages of development (27 to 29/30) are characterized by the presence of undifferentiated mesoderm cells in the ventral region of the embryos. These cells are elongated in shape and free from contacts with the adjacent endoderm cells. Their cytoplasm is rich in deutoplasmic material and their mitochondria are small with a dense matrix and well-arranged cristae;
- 3) stages of development 31, 32 immediately precede the onset of the positive benzidine reaction. The hematic cords of the V-shaped blood island are forming. The mesoderm cells shifting towards the erythroid line show certain peculiar features such as enlarged mitochondria, well-developed nucleoli and extracellular glycogen. Partial apposition of the plasma membranes of the primitive blood cells and the endoderm cells is observed;

- 4) in stage 33/34 a positive benzidine reaction is first detected in the cephalic region of the blood island. In the cytoplasm of the primitive blood cells, groups of spiral polyribosomes can be recognized;
- 5) in stages 35/36 to 39 the lacunae of the blood island gradually extend along the entire ventral region of the embryos. Endothelial cells engulf the erythroid cells and establish mutual contacts by means of desmosomes;
- 6) in stages 40 to 42 circulating erythroid cells are observed in the hearts. The features of basophilic erythroblasts can be recognized in these cells. Residual lipid droplets are seen extruded into the lumen of the vessels.

Steve Bocciarelli D. Morphology of crystallites in bone. *Calc Tiss Res* 1970;5:261-9.

In ultrathin sections of bone specimens observed in the electron microscope, many apatite microcrystals having a plate-like habit are clearly visible, besides the well-known needle-shaped forms. Stereoscopic views demonstrate that the needle-like microcrystals are actually the edge view of small, thin platelets.

Tuttobello L, Arancia G. Crescita e trasformazioni strutturali dei *Dictyococcus cinnabarinus* con vari carboidrati. *Ann Micr* 1970;21:145-62.

È stato fatto uno studio di crescita del *Dictyococcus cinnabarinus* in terreno di Detmer/3 con aggiunta dei più significativi monosaccaridi (glucosio, mannosio, fruttosio, galattosio) e disaccaridi (saccarosio e lattosio), in relazione alla nota capacità dell'alga cloroficea a dar luogo ad un "effetto arrossante" con glucosio che, da nostri precedenti lavori, era stato dimostrato essere dovuto a scomparsa di clorofilla e accumulo di carotenoidi e ad una profonda trasformazione citologica e chimica delle strutture endocellulari. Dall'analisi dei dati ottenuti si ricava che con i monosaccaridi l'andamento delle colture algali è sostanzialmente simile nella crescita, nell'utilizzazione delle varie fonti carboniche e nell'arrossamento finale delle colture, quest'ultimo più anticipato con glucosio e mannosio. I disaccaridi sono utilizzati con difficoltà e in misura minore e quindi non danno l'arrossamento. Un controllo al microscopio elettronico mostra la degenerazione già nota in glucosio, ripetersi con modalità simili negli altri monosaccaridi, fino alla completa degenerazione amilacea e grassa ed alla scomparsa dei cloroplasti, alla rarefazione dei mitocondri e dei corpi granulari, alla compressione in piccolissimo spazio del citoplasma residuo; nei disaccaridi, seppur evidente alla fine il processo degenerativo, sono ancora presenti lamelle cloroplastiche e gli altri organelli cellulari.

Violante A, Trovalusci Crateri P. Studio istochimico al microscopio ottico ed elettronico dell'acido ascorbico in cellule di ratti normali e leucemici. *Haematologica* 1970;55:49-68.

Sulla base di precedenti ricerche, condotte su animali da laboratorio e su uomo, con le quali si era potuto dimostrare che l'acido ascorbico veniva assorbito in misura minore nei tessuti leucemici, si è avviata la presente ricerca con metodiche citochimiche di microscopia ottica ed elettronica. L'attuale studio ha permesso di riconfermare quanto più sopra esposto e cioè che le cellule di alcuni organi di ratti leucemici assumono in minor misura l'acido ascorbico somministrato per via parenterale. Segue la discussione sui risultati.

## 1971

Bortoletti G, Ferretti G. Observations on the ultrastructure of the tegument in the larval forms of *Hydatigera* (= taenia) *taeniaeformis* and considerations on the development of the Cyclofillidian cestodes larvae. *Riv Parassitol* 1971;32: 249-71.

Electron microscope studies have been carried out on 14-, 30- and 100-day-old *Hydatigera taeniaeformis* larvae from experimentally infected mice livers. The tegument shows very little variation in the different stages and is similar to that found in adult Cestodes. The cytoplasmic inclusions of the superficial layer of the tegument (mitochondria, vacuoles, electron dense rod-like formations) vary in frequency according to the age of the larvae and may be found in the strobilae or the terminal vesicle. Microtriches of 30-day larvae have particular characteristics probably related to their neo-formation. The globular-shaped 14-day-old larvae imbedded in situ in the hepatic parenchyma appear to be in direct contact with the host tissues and the microtriches penetrate into the inner part of the cells of the adjacent phlogistic tissue. The 100-day-old larvae are rolled up into a spherule and are in dose contact with the disintegrating cells which surround them. There is no sign of an autonomous cystic wall. The similarities found between the larval forms of *Hydatigera taeniaeformis* in *Echinococcus granulosus* and other Cestodes are discussed.

Ciofi Luzzatto AR, Rosati Valente F. Some autoradiographic and ultrastructural observations on the oogenesis of *Dytiscus marginalis* L. *Ann Ist Super Sanità* 1971;7:31-6.

In the oogenesis of the nurse cells of *Dytiscus marginalis* a large increasing of the nuclear DNA is found during the growing process when many endomitoses occur. After many histochemical and ultrastructural observations a DNA flow from the nucleus to the cytoplasm was hypothesized. The DNA seemed to be localised in some electron-dense bodies around the nucleus. The presence and localisation of this cytoplasmic DNA is now revealed by autoradiography at the electron microscope, using material labelled with <sup>3</sup>H thymidine. The follicular cells show two different morphological aspects: the cells of the first type are roundish, with little electron-dense cytoplasm, rich in mitochondria, and reveal a high incorporation of thymidine into the nucleus, while the cells of the second type are elongated, with a strongly electron-dense cytoplasm apparently lacking mitochondria; they do not incorporate thymidine at all. Following this result it may be suggested that these last cells are in a degenerating stage.

Magrassi F, Georgiades J. In collaboration with: Catalano G, Coraggio F, Coto V, Cuccurullo L, Nasti J, Trovalusci Crateri P, Violante A, Galeota G, D'Acunto A. The problem of viral carcinogenesis: present aspects and perspectives. *Boll Ist Sieroter Milan* 1971;50:152-75.

Notargiacomo S. Applicazione della tecnica di Kleinschmidt a studi sulla conformazione del DNA in soluzione. *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1971. (71/22).

Si descrive la tecnica di Kleinschmidt per la preparazione per la microscopia elettronica, di singole molecole di acido desossiribonucleico, ottenute mediante formazione di strati proteici. I precisano in particolare i materiali ed il procedimento manuale usati nella tecnica detta di "distensione", eseguita sul DNA del fago T2.

Steve Bocciarelli D. Structure of crystallites in bone and dentin. *Isr J Med Sci* 1971;7:425-6.

Violante A, Bellavia E. Conoscenze attuali sull'ultrastruttura dei cromosomi: rivista sintetica e valutazione critica. *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1971. (70/12).

Lo studio della fisiologia e della morfologia dei cromosomi ha apportato notevoli risultati. I processi riproduttivi sono adesso abbastanza chiari mentre molto resta ancora da sapere sulla struttura cromosomica a livello molecolare. Gli studi compiuti fino ad ora hanno permesso di stabilire che un cromosoma è composto essenzialmente da fibre di 240 Å di diametro, con 350 Å nei rigonfiamenti lungo il decorso. Alcune di queste fibre sembrano girare attorno al corpo centrale del cromosoma avvolgendolo.

### 1972

Borrè E, Morgantini LE, Ortali V, Tonolo A. Production of lytic plaques of viral origin in *Penicillium*. *Nature* 1972;229:568-9.

Castrucci G, Pedini B, Cilli V, Arancia G. Characterization of a viral agent resembling bovine herpes mammillitis virus. *Vet Rec* 1972; 90:325-35.

A virus designated 69/1 LO was isolated from an ulcerative lesion in the oral mucosa of a calf which had died from digestive tract troubles. The virus multiplies in bovine embryonic kidney (BEK) cell cultures, giving rise to large multinucleate cells, many of which contain Cowdry-type A nuclear inclusions. The viral particle is approximately 85 to 96 micrometers in diameter and in some cases appears to be surrounded by a loose envelope. It is a DNA lipovirus. These features identify it as a herpes virus. On the basis of serological studies and the response of cattle and laboratory animals to experimental infection, it is concluded that the isolate processes the characteristics of bovine herpes mammillitis virus, the isolation of this virus from cattle in Europe has been reported only by investigators in the United Kingdom.

Donelli G, Guglielmi F, Paoletti L. Structure and physico-chemical properties of bacteriophage G. I. Arrangement of protein subunits and contraction process of tail sheath. *J Mol Biol* 1972;71:113-25.

With the help of diffraction and optical image reconstruction we have begun to study the arrangement of the protein subunit in the G bacteriophage of *Bacillus megathierium*. The arrangement of the structural subunits in the tail sheath was completely defined for both the extended and the contracted states. It is basically the same as that observed for the T-even phages, despite their different general architecture. With regard to the process of contraction of the sheath, an unstable intermediate state was observed. This corresponds to a rearrangement of the chemical bonds between the protein subunits before the complete mechanical contraction of the sheath. The process of contraction itself was studied and a simple model proposed.

Donelli G, Paoletti L. Diffrazione e filtraggio ottico di micrografie elettroniche come metodo di analisi di strutture periodiche. *Ann Ist Super Sanità* 1972;8:197-228.

Scopo di questa rassegna è quello di introdurre le tecniche di diffrazione e di filtraggio ottico come metodi di analisi di micrografie elettroniche e di presentarne, pur senza alcuna pretesa di completezza, gli aspetti teorici fondamentali. Vengono altresì forniti gli elementi necessari alla interpretazione delle figure di diffrazione, sia per strutture periodiche piane che per strutture a simmetria elicoidale, insieme ad alcuni esempi applicativi.

Donelli G, Paoletti L. Structural analysis by optical diffraction of tail sheaths of different bacteriophages. *J Submicrosc Cytol* 1972;4:112-3.

As far as the structural and functional study of the tail sheath contraction in bacteriophages is concerned, the experimental results are practically those relative to phage

T4 (Moody 1967) and to phage G (Donelli, *et al.*, 1971). Models basically analogous in structure but different in function are proposed by these authors. The aim of this note is to compare the above-mentioned results with those obtained by the structural analysis of the tail sheaths of other phages: phage T2 of *E. coli*, phage LP, of *B. licheniformis* and phage I of *B. subtilis*. The electron micrographs in negative contrast (NaPt 2%; pH 7.0) were analysed by the optical diffraction technique. On the basis of the theory of diffraction of a helical structure (Cochran *et al.*, 1952; Klug *et al.*, 1958) the values of the geometrical parameters of the sheaths considered were determined. The comparison between the results obtained and those relative to phages T4 and G, has shown that the structural arrangement of the protein subunits is basically the same in the five phages considered, in spite of their different general architecture.

Frontali C, Notargiacomo S. Electron microscopic observation of a condensed form of the DNA molecule. *J Submicrosc Cytol* 1972;4:115.

At low pH values, a transition has been observed in the physio-chemical properties of the DNA molecule in solution. This transition has been suggested to cause the DNA molecules to pass from the extended form, normally observed in solution, to a much more compact (condensed) form. The transition is shown to be reversible by light scattering, buoyant density and adsorption measurements, i.e. in the condensed state the DNA molecule is still double stranded. Direct observation by electron microscope of T2 DNA molecules at different pH values, made possible by the spreading technique developed by Kleinschmidt, allowed us to characterise the compact form, and to demonstrate the recovery of the native structure upon neutralization. The possible relationship between the new condition of the DNA molecule and the intraphage condition is discussed.

Steve Bocciarelli D, Tangucci F. Film di C sottilissimi calibrati per microscopia elettronica. *Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1972. (72/19).

Sono state provate varie tecniche di deposizione e raccolta di film sottilissimi di carbone per microscopia elettronica, e vari metodi di misura degli spessori dei film ottenuti. È stato messo a punto un metodo semplice per ottenere film di carbone di spessore predeterminato. Con questo metodo il limite inferiore dello spessore dei film ottenuti, che presentino sufficiente continuità e resistenza meccanica da poter essere usati come supporti per microscopia elettronica, raggiunge i 10-15 Å. Si dà un esempio di immagine di subunità ribosomali deposte su film di carbonio di 15 Å di spessore.

## 1973

Ageno M, Donelli G, Guglielmi F. Structure and physico-chemical properties of bacteriophage G. II. The shape and symmetry of the capsid. *Micron* 1973; 4:376-403.

The shape of the capsid of phage G, active against *B. megatherium*, has been studied by electron microscopy using a variety of approaches including negative staining of whole particles, examination of stereoscopic micrographs, shadowing, observations on capsids devoid of their DNA content ('ghosts'), short and prolonged fixation and the use of single and serial ultrathin sections. The results were conflicting. With negative staining the appearance of the capsid was not consistent with an icosahedral shape but could be related to that of an octahedron. The shape of the capsid in 'ghost' preparations was definitely octahedral. However, after fixing for 1h or longer and shadowing, the capsids were clearly icosahedral in shape with their sides equal to about

half the length of those of the octahedron seen by negative staining. The same results were obtained by the thin sectioning technique. From a study of the two types of geometrical figures it was found that an octahedral container can be transformed into an icosahedral one with sides of half the original length if it is folded inwards on itself at 6 consecutive points. If this type of effect occurred during the preparative procedure it would account for the two apparently conflicting appearances of the capsid. Such an effect would involve a marked change or 'jump' through an intermediate unstable form. While it would reconcile the different results it is emphasized that such an interpretation is essentially speculative. To illustrate the complexities of the problem, an interesting geometrical exercise is presented in the Appendix.

Arancia G, Archetti I, Rosati Valente F, Steve Bocciarelli D. Osservazioni al microscopio elettronico sul ciclo di sviluppo e sulla morfologia del virus rabico. *Ann Ist Super Sanità* 1973;9:218-24.

È stato condotto uno studio, al microscopio elettronico, dello sviluppo intracellulare e della morfologia di un ceppo di virus rabico adattato a crescere in cellule di linea BHK 21. viene dato uno schema della particella virale completa, molto simile a quello del virus della stomatite vescicolare, che rappresenta il prototipo del gruppo dei rabdovirus.

De Martino S, Accini L, Proccichiani G. Ultrastructural study on contractile structures in mammalian nephron. Their development in the metanephros of human embryo. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1973;140:101-24.

Cytoplasmic filaments have been observed in the cells of normal and pathological kidneys. These filaments are usually grouped into bundles anchored to electron dense bodies underlying the cell membrane. In the embryonic human metanephros the filaments are found within the cells of different portions of the nephron at various stages of development. They appear first in the podocytes, almost simultaneously in the Bowman's capsule and tubular cells, then in the "mesangial cells", and finally in the cells of the media of the afferent glomerular and interlobular arterioles. The presence of filaments and their attachment bodies in the mammalian nephron suggests that the podocytes and the so-called mesangial cells have a contractile activity, thus representing an intraglomerular apparatus which regulates the intravascular pressure, blood flow and filtration rate in the glomerular capillaries, whilst the contractile activity of the Bowman's capsule and proximal, distal and collecting tubules could facilitate the progression of the filtrate. The increase in number of filaments in some pathological conditions is probably related to the functional changes of the intraluminal pressure in the glomerular capillaries, in the Bowman's space and in the tubular lumen.

Dore E, Frontali C, Notargiacomo S. Electron microscope observations of DNA condensates at low pH values. *J Mol Biol* 1973; 78:391-3.

Coliphage T2 DNA in sufficiently low concentration forms a molecular condensate in acidic (pH 1-9) saline (0.3M) solution. Electron microscopic observations of acidic monolayered DNA- cytochrome c films confirm previous indirect evidence concerning the dimensions of the *in vitro* condensation products and their ability to increase and compose confluent aggregates. The phenomena described here suggest that hydrophobic interactions may play a role in both the condensation and aggregation processes.

Rosati Valente F. Intensificazione del contrasto in microscopia elettronica. *Ann Ist Super Sanità* 1973;9:245-50.

Si riportano i risultati ottenuti sull'ossidazione e colorazione di sezioni di preparati fissati in solo osmio, oppure in glutaraldeide-osmio e trattati con acetato d'uranile prima

dell'inclusione. Sono stati usati batteri *Bacillus megatherium* ceppo PGH mescolati a fagi G e cellule in coltura infettate con diversi tipi di virus. L'ossidazione delle sezioni è stata ottenuta mediante trattamento con  $H_2O_2$  o con acido periodico; la colorazione è stata fatta usando citrato di Pb. Un'ossidazione blanda delle sezioni dei batteri produce un'attenuazione generale del contrasto dei componenti cellulari anche se i filamenti che costituiscono il materiale nucleare e i ribosomi appaiono più sottolineati rispetto al resto. Un'ossidazione più intensa provoca la scomparsa quasi totale della parete cellulare e della membrana citoplasmatica. La seguente colorazione con Pb eccita il contrasto di tutte le strutture con particolare riguardo per quelle contenenti RNA o DNA. I risultati sono messi a confronto con quelli ottenuti da altri. Si discute sul meccanismo dell'ossidazione delle sezioni di preparati "post-fissati" con acetato d'uranile.

Steve Bocciarelli D. with the technical assistance of Arancia G, Trovalusci P. Apatite microcrystals in bone and dentine. *J Microsc* 1973;16:21-34.

Electron diffraction patterns of microcrystals from bone and dentine were compared with those obtained from synthetic crystalline hydroxyapatite (HA), octa-calciumphosphate (OCP), octacalciumphosphate carbonate (OCPC), dicalcium (DCP) and tricalcium phosphate (TCP), calcium carbonate, with the aim of identifying some of these minerals in the natural mineralized tissues. In contrast to X-ray, electron diffraction patterns of HA and OCP seem to differ by the presence of a line, which appears to be absent or very faint in HA patterns. If this finding is correct, it should be possible to identify OCP in the presence of HA, OCP and PCPC appear to be present in bone and dentine whereas DCP, TCP and  $CaCO_3$  have not been revealed.

Steve Bocciarelli D. with the technical assistance of Arancia G, Trovalusci P. Controls on electron microscope data in bone and synthetic apatites. *J Microsc* 1973;16:15-20.

Experiments have been carried out in order to check the alterations that the mineral phase of bone may undergo under the electron beam of an electron microscope. Bone specimens and synthetic apatites were examined both in formal condition and using the cooling stage ( $-50^\circ C$ ) or the heating stage (up to  $900^\circ C$ ). Morphological examinations and electron diffraction pattern recordings were made. No alteration in mineral phase of bone appeared to occur under an up-to-date electron microscope, in ordinary working conditions (double condenser).

## 1974

Barberi M, Calderoni G, Cartesi C, Formaseri M. Huntite, a mineral used in antiquity. *Archaeometry* 1974;16:211-20.

Donelli G, D'Uva V, Paoletti L. Ultrastructure of lizard gliosomes. *J Submicrosc Cytol* 1974;6:116-7.

Crystalline inclusions of a particular type are present in organelles known as gliosomes, which are considered to be modified mitochondria. These gliosomes, described by several authors (Srebro 1965; Hashimoto 1969) in glial fibers of some animal species, were observed and studied by us in ependymal cells of *Acerata s. sicula* Raf., both from the morphological and from the ultrastructural points of view (D'Uva 1970; Donelli *et al.*, in press). The analysis of electron micrographs of gliosome ultrathin sections by the optical Fourier transform technique (Lipsom 1972; Donelli, Paoletti 1972) made it possible to obtain a meaningful set of structural data. On the basis of the ultrastructural organization of the matrix, two types of gliosomes were recognized, namely, a) gliosomes with lamellar

matrix (LMG) and b) gliosomes with granular matrix (GMG). While it was possible to define the structure of the inclusions in the GMG, it was not possible to detect any "crystalline" structure of the interlamellar matrix in the LMG. The data obtained did not allow a thorough understanding of the functional significance of these formations. However, reconstruction of the crystal lattice, and determination of the parameters of the GMG unit cell by the above technique made it possible to put forth a number of hypotheses concerning the nature of the observed crystalline inclusions. An evaluation of the molecular weight of the single asymmetrical subunit of the crystal lattice was also obtained.

Paoletti L, Rosati Valente F, Trovalusci Crateri P. Fourier analysis of charge distribution on the tropocollagen molecule. *J Submicrosc Cytol* 1974;6:128.

The electron microscopic examination of different aggregation states (native fibrils, SLS, FLS) of tropocollagen molecules, positively stained with uranyl acetate or PTA, gives direct information about distribution of both acid and basic side-chains. The exact distribution of the polar side-chains determines the ordered aggregation of tropocollagen molecules in their different states depending on the environmental conditions. We report some results about the charge distribution along the tropocollagen molecules, obtained by analysing electron micrographs of native fibrils and SLS with the optical Fourier transform technique. Particularly, the presence of 640 Angstrom and 430 Angstrom wide bands is pointed out on SLS images. According to the structure data reported by Ramachandran about the tropocollagen molecule, we may conclude that the observed charge distribution is consistent with the presence of charge edges on the molecule length. Moreover, it seems that along every molecule, two charge edges separated by 110° radial angles, must be present.

Rebessi S. Ultrastruttura di cellule linfoblastoidi umane in coltura: uno studio con la tecnica del freeze-etching. *Ann Ist Super Sanità* 1974;10:73-8.

Una linea cellulare linfoblastoide umana è stata studiata al microscopio elettronico applicando la tecnica del freeze-etching. L'osservazione ha confermato le caratteristiche ultrastrutturali proprie dei linfociti già messe in evidenza con le tecniche di microscopia elettronica usuali. È stato inoltre possibile studiare le superfici delle membrane nucleare e plasmatica, ed in quest'ultima sono stati osservati caratteristici granuli proteici intramembranosi. È stata infine ottenuta una serie di dati quantitativi relativi alle strutture evidenziate.

Santoli D, Arancia G, Archetti I. Studio al microscopio elettronico del ciclo di sviluppo di un virus erpetico bovino. *Ann Ist Super Sanità* 1974;10:1-8.

Gli stadi sequenziali dello sviluppo di un virus erpetico bovino (69/1 LO), molto simile antigenicamente a quello della mammillite erpetica bovina, sono stati studiati in colture di cellule di rene di embrione bovino. Quasi tutte le fasi osservate non differiscono in modo sostanziale da quelle già descritte per molti altri virus del gruppo erpetico. Non si sono avuti risultati sufficientemente probativi per quanto riguarda le fasi di assorbimento e di penetrazione della particella virale nella cellula ospite; sembra che la fuoriuscita del virus dalla cellula avvenga per protrusione della particella attraverso la membrana cellulare, e non per un processo di fagocitosi inversa. Sono state viste numerose particelle extracellulari, di forma rotondeggiante e molto dense, presenti dalle 16 ore dopo l'infezione in poi: il loro significato e la loro natura non sono ancora stabiliti.

Silva I, Steve Bocciarelli D, Rosati Valente F, Trovalusci Crateri P. Electron microscope identification of mesosomes in some water strains of leptospira by reduction of tetrazolium chloride to formazans. (Preliminary report). *Ann Ist Super Sanità* 1974;10:179-82.

Rounded granules protruding from the external surface of some water *Leptospira* strains and considered as mesosomes were studied by electron microscope and by means of the intravital reduction of tetrazolium chloride. Satisfactory results were obtained with two of the strains studied. It appears that neither the culture medium nor the age of the culture have any influence on the usual position of the mesosomes.

Steve Bocciarelli D. Ultrastructure of native collagen. *Ann Ist Super Sanità* 1974;10:191-202.

Native collagen fibrils, mechanically detached either from leg tendon of rabbits or from the tail tendon or aortic adventitia of adult rats, were observed at the electron microscope by various technical methods. The density patterns recorded along and across integer fibrils, laid down on ultrathin C films, show that the density ratio of the light to the dense bands is much higher than that expected from the generally accepted quarter-stagger array of collagen components. Swollen fibrils show long filaments about 50 Angstrom thick, reasonably identified with their building constituents. The characteristic collagen banding of about 640 Angstrom periodicity, never exhibited by single filaments, is already present in groups of very few filaments (about two or three). Partially disrupted fibrils suggest that the building filaments may be assembled in a monolayer, having the form of a long ribbon, spirally wound around the longitudinal axis of the integer fibril.

Steve Bocciarelli D, Tangucci F. Calibrated ultrathin carbon films for electron microscopy. *J Submicrosc Cytol* 1974;110.

Different techniques have been tried to obtain carbon supporting films for electron microscopy, and many methods were checked for thickness measurement. Calibrated films were obtained by a standard simple procedure. Ultrathin films, up to 10-15 Angstrom in thickness, continuous and strong enough to be used as supporting films for electron microscopy, can be easily obtained by this routine method. Some examples of images obtained from biological specimens laid down on a 15 Angstrom carbon film are reported.

Steve Bocciarelli D, Tangucci F. Ultrathin supporting films in electron microscopy of unstained biological macromolecules. *Ann Ist Super Sanità* 1974;10:183-90.

A simple technique is described, in which the increase in thickness of a carbon film is controlled. Films up to 10-15 Angstrom in thickness, which are both continuous and strong enough for use as supporting films in electron microscopy, can be easily obtained by this routine method. Images are shown of unstained ribosomal subunits and tropocollagen molecules on 15 Angstrom carbon films.

Violante A, Rebessi S. Ultrastruttura di cromosomi di cellule HeLa con la tecnica del freeze-etching e delle repliche ombrate. *Ann Ist Super Sanità* 1974;10:164-9.

Cellule HeLa bloccate in metafase sono state studiate con la tecnica del freeze-etching. Sulle sezioni osservate è stato possibile riconoscere l'organizzazione dell'elica primaria dei cromosomi, ma è stata anche confermata la difficoltà di osservare l'ultrastruttura interna del materiale cromosomico. Sono state successivamente studiate repliche di piastre metafasiche ottenute secondo una tecnica usuale per la microscopia ottica. I risultati cui si è pervenuti non sembrano tuttavia applicabili alla messa a punto di un metodo di osservazione a scopo diagnostico.

1975

Arancia G, Grandolfo M, Manfredotti C, Rizzo A. Electron-diffraction study of melt and vapour grown GaSxSe1-x single crystals. *Boll Soc Ital Fis* 1975;106: 83.

We report that, for the first time, a systematic comparison between the structural parameters of GaSxSe1-x solid solutions, obtained both from the vapour and from the melt, taking 0.1 as the step in x. Lattice constants have been carefully determined by electron diffraction for all the compositions. The results are discussed taking into account previously reported data on the energy gap variation with the composition, as obtained in the same samples by optical measurements. We found that the growth method strongly influences the structural modification of the crystals, at least for sulphur contents x ranging from 0 to 0.45. In fact, in this range of compositions, melt grown samples show energy gaps slightly lower than vapour grown ones, and an abrupt change in the c lattice constant is observed at x = 0.45 only in crystals obtained from the melt. We conclude that in the vapour grown crystals the beta modification generally prevails, while in the melt grown ones a change occurs for x = 0.45 between eta and beta modifications.

Donelli G, Dore E, Frontali C, Grandolfo ME. Structure and physico-chemical properties of bacteriophage G. III. A homogenous DNA of molecular weight  $5 \times 10^8$ . *J Mol Biol* 1975;94, 555-565.

The physico-chemical properties of the DNA released from bacteriophage G (active on *Bacillus megatherium*) are described. Phage G, an unusually large bacteriophage, has a nucleic acid content of 4 to  $6 \times 10^8$  daltons. Sedimentation velocity analysis at low angular speed and examination by electron microscopy, indicate that a single DNA molecule, sedimenting with  $s_{20, w0} = 125 \pm 1.5$  S and at least  $200 \pm 20$   $\mu$ m long, is released upon thermal or osmotic shock. Melting temperature data and chromatographic analysis indicate a mean base composition of 70% A + T. CsCl and Cs<sub>2</sub>S<sub>04</sub> buoyant density data, circular dichroism spectra and sensitivity to specific nucleases indicate that phage G DNA is similar to the DNAs from T-even phages and is more glucosylated than phage T6 DNA. Direct glucose determination indicates a 185% molar ratio of glucose to cytosine. Linear density extrapolated from literature data and contour length measurement yield a lower limit for the molecular weight of phage G DNA of  $4.9 \times 10^8$ . Comparison of this value with the  $s_{20, w0}$  measured with the analytical ultracentrifuge seems to confirm the validity of the empirical relationship proposed by Freifelder (1970), between  $s_{20, w0}$  and molecular weight, over a larger range than that previously known. A possible systematic error in defect in length determination, however, prevents a discrimination between this and other empirical formulae proposed by various authors, which predict a molecular weight that is 20 to 25% higher.

Donelli G, D'Uva V, Paoletti L. Ultrastructure of gliosomes in ependymal cells of the lizard. *J Ultrastruct Res* 1975;50:253-63.

Gliosomes similar to those already described by other authors in amphibians and mammals were found in the hypothalamic region of *Lacerta s. sicula* Raf. The internal matrix of these particular organelles, which closely resemble transformed mitochondria, is in a more or less advanced state of crystallization. The dimensions of the unit cell, the symmetry and the space group of these mitochondrial crystals were determined by analyzing electron micrographs of ultrathin sections of gliosomes by means of the optical transform technique. An evaluation of the molecular weight of the single asymmetrical subunit of the crystal lattice was obtained.

**1976**

Arancia G, Grandolfo G, Manfredotti C, Rizzo A. Electron diffraction study of melt- and vapour growth GaSe<sub>1-x</sub>S<sub>x</sub> single crystals. *Phys Stat Sol (a)* 1976; 33:563-71.

Single crystals of the complete series of GaSe<sub>1-x</sub>S<sub>x</sub> solid solutions have been obtained from the melt by the Bridgeman-Stockbarger method and from vapour by a chemical transport method. Precise measurements of lattice parameter variation, as a function of composition *x*, were carried out by electron diffraction for all compositions for both types of crystals. Similar behaviour of the *a*-lattice constant with respect to *x* were found, while remarkable differences between melt and vapour grown materials were observed in the composition dependence of the *c*-parameter. The results are discussed also taking into account previously reported data on the energy gap variation with *x* obtained in the same samples by optical absorption measurements. A strong influence of the growth method on the structure of the crystals is evidenced, at least for a sulphur content *x* ranging from 0 to about 0.45.

Bisso G, Castelnuovo G, Nardelli MG, Orefici G, Arancia G, Laneelle G, Asselineau G, Asselinou J. A study on the receptor for mycobacteriophage: phage phlei. *Biochimie* 1976;58:87-97.

From *Mycobacterium phlei*, glycolipid fractions have been isolated which inactivate phage Phlei. On the basis of the characteristics of the inactivation (specificity, kinetics, requirement for Ca<sup>++</sup>) typical of the phage-host cell system, it was concluded that these fractions contain the receptor sites for phage Phlei; this conclusion was supported by electron microscopic studies. All the active fractions contain four kinds of components: fatty acids, glycerol, sugars (d-lyxose, 6-O-methyl-d-glucose, and low amounts of glucose and mannose) and water-soluble acids. These acids are isolated by degradation of the receptor fractions as oxalic and pyruvic acids. Variations of the ratio oxalic acid/pyruvic acid according to the mode of degradation of the receptor fractions as oxalic and pyruvic acids. Variations of the ratio oxalic acid/pyruvic acid residue in the NMR spectrum, suggest that these acids might arise from the splitting of oxaloacetic acid. A tentative structure of the receptor is proposed, in which monoglycerides are linked through keto-acid to a polysaccharide.

Camatini M, Ceresa Castellani L, Franchi E, Lanzavecchia G, Paoletti L. Thick filaments and paramyosin of annelid muscles. *J Ultrastruct Res* 1976;55:433-47.

Thick filaments from the annelid muscle were observed by positive and negative staining of the glycerinated sample, which was homogenized in a relaxing medium containing ATP. The preservation of myosin on the filament surface was strictly related to a very high concentration of ATP (12 mM). The 144 Angstrom periodicity was scarcely visible. When the ATP in the homogenate was at low concentration (less than 3 mM), the underlying periodic structure of paramyosin appeared. Purified paramyosin cores (at low pH and high ionic strength) presented a striation with a 144 Angstrom pitch. The Bear-Selby net pattern was also present, even in a small number of filaments. Paramyosin was extracted and purified from fresh muscles of *Lumbricus terrestris* and *Sipunculus nudus*. The purified protein exhibited a single peak in the ultracentrifuge, and the intrinsic sedimentation constant was 3.29 S for *Lumbricus* and 3.19 S for *Sipunculus*. After dialysis with divalent cations, paracrystals were obtained, most of which showed a 144 Angstrom periodicity; sometime, paracrystals with a different band pattern appeared. In all tactoids observed a 48 Angstrom subperiod was evident, as in the native isolated cores.

Camatini M, Franchi E, Paoletti L. Molecular organization of thick filaments in annelid muscles. *J Submicrosc Cytol* 1976;8:247.

Thick filaments from annelid body-wall muscles were observed by positive and negative staining of the glycerinated sample, which was homogenized in a relaxing medium containing ATP. Fractions from the species analyzed (*Lumbricus terrestris*, *Eunice fucata*, *Glossiphonia complanata*, *Sipunculus nudus*) contained mainly filaments with diameters of 250-400 Angstrom, which were derived from longitudinal fibers, as evidenced from sections. At high ATP concentration (12 mM) the 144 Angstrom axial periodicity was scarcely visible, for myosin preservation on the filament surface. These native filaments linked to actin ones and presented ATPase activity. Partly purified paramyosin cores were obtained at low pH and high ionic strength. The cores presented a striation pattern of 144 Angstrom and the Bear-Selby net type could rarely be observed. Optical diffraction analysis confirmed a meridional spatial frequency of 1/149-1 Angstrom, with the third order intensity maxima at about 1/50-1 Angstrom. These results demonstrate that thick filaments of annelid muscles have a central supporting paramyosin core, as has just been demonstrated for filaments of numerous animal groups. Nevertheless the molecular organization of paramyosin in Annelida differs from the general model evidenced in mollusc muscles.

De Felici A, Vella S, Anzidei G, Tangucci F, Giannini V, Archetti I, Rocchi G. Incidenza delle infezioni da "Rotavirus" (agenti reovirus simili) in una casistica opedaliera di enteriti acute infantili. *G Mal Infett Parass* 1976;28:631-4.

Vengono presentati i risultati di uno studio condotto con il microscopio elettronico su campioni fecali di pazienti con gastroenterite acuta. La presenza di Rotavirus è stata riconosciuta in 15 su 150 campioni esaminati, ottenuti da altrettanti pazienti.

Donelli G, Griso G, Paoletti L, Rebessi S. Capsid ultrastructure of bacteriophage G. *J Submicrosc Cytol* 1976;8:251.

This phage, active against *Bacillus megatherium*, has an unusual size which makes it particularly well suited for structure studies. The head has an icosahedral shape with edges measuring about 900 Angstrom, and a contractile tail is present some 4500 Angstrom long. The capsometric arrangement on the intact phage head is difficult to be revealed from images of negatively stained particles. The capsid substructure was nevertheless observed both on the negatively stained and on the shadowed ghost capsid; capsomers are arranged on a plane lattice for which the symmetry is that of the p6 hexagonal net. Optical transforms from images of ghosts allowed us to value the lattice period at about 140-150 Angstrom. It was possible to visualize the capsomers on the intact phage particle by freeze-etching technique; phages were fixed in 0.5% glutaraldehyde (in 0.2 M magnesium acetate) for 1hr and resuspended in 0.2 M ammonium acetate. Pellet from the latter suspension was frozen into liquid Freon-22 and used for replicas preparation with standard procedures. Measurements of lattice period on different freeze-etched capsids were coincident with the results obtained from the ghost analysis. The capsid ultrastructure appears to follow the general principle of quasi-equivalence, nevertheless it is worth observing that, unlike some results reported for other viruses, the observed structure seems to be consistent with the presence of trimmers in positions corresponding to the three-fold axes of the hexagonal net.

Nardoni C, Tangucci F, Accinni L, De Martino C. Light and electron microscopic studies of the pronephros of *Xenopus Laevis*. *J Submicrosc Cytol* 1976; 8:257.

The pronephros of *Xenopus laevis* and possible structural differences with the mesonephros and metanephros were investigated. The study of serial sections showed

that amphibian pronephros is made up of a glomus devoid of Bowman's capsule, a nephrostoma which opens directly into the coelom, two different segments of proximal tubule, and a distal tubule which is connected with the pronephridic duct. The intermediate segment between the proximal and distal tubules, described by others, was never observed. The ultrastructural features of the proximal and distal tubules are similar to those of the corresponding meso- and metanephric tubules. In the glomus the podocytes are formed by the coelomatic epithelial cells, the endothelial laminae of the capillary loops are very thin and without fenestration, mesangial cells are absent. Furthermore, granulated cells were never observed in the wall of the afferent vessel. It is our opinion that the tubular segments only should be considered to form the pronephridic nephron because of the lack of anatomical continuity between the glomus and the nephrostoma. This discontinuity suggests that the capillary loops of the glomus are responsible for the differentiation of the coelomatic cells into podocytes. In the meso- and metanephric glomeruli the latter cells derive from the meso- and metanephric vesicles, which develop within the intermediate mesoderm, and depend directly upon the organizing capacity of the Wolfian duct. These observations could indicate that the differentiation of the visceral epithelium of the meso- and metanephric glomeruli is partly indicated by the capillaries invading into the meso- and metanephric vesicles.

Natali PG, De Martino C, Nicotra MR, Capanna E, Nardoni C, Accinni L. Phylogenesis of the mesangium. Morphological and immunological studies. *J Submicrosc Cytol* 1976;8:258.

The extensive investigations performed on the structure and function of normal mammalian glomeruli have clarified that the following functions can be ascribed to mesangial cells: 1) contractility; 2) synthesis and deposition of mesangial matrix and of collagen fibers; 3) phagocytosis and amoeboid movements; 4) proliferation. This study has been conducted in order to evaluate mesangial cells distribution and functions during phylogenetic evolution of the glomerulus. On the basis of the structural organization of the mesangium three types of distribution within the glomerulus could be observed: 1) "diffuse mesangium" in the glomeruli of cyclostomes, amphibians and selachians; 2) "concentrated mesangium" (mainly located at the vascular pole) in the glomeruli of reptiles, birds and teleosts; 3) "mixed type mesangium" (located both at the periphery and at the vascular pole) in the glomeruli of mammals. Contractile activity of the mesangium has been analyzed by immunohistochemical techniques (indirect immunofluorescence) employing human anti-smooth muscle antibodies (from patients with chronic active hepatitis). Contractile proteins in various amounts have been detected in the mesangium of all classes studied, suggesting that this property of mesangial cells, although maximally expressed in selachians and mammals, is present in all vertebrates. The ability of mesangial cells to produce mesangial matrix and collagen fibers has been shown to be highly present in cyclostomes, selachians and amphibians. (Reptiles and birds have demonstrated a selective localization of mesangial matrix and collagen fibers in the hilar mesangial areas.) The ability of amoeboid movements and of phagocytosis has been evaluated by estimating the frequency of luminal pseudopodia and peripheral cytoplasmic projections of mesangial cells. While phagocytic activity is present in all types of glomeruli, amoeboid movements are more pronounced in the first and third type of mesangium. Mesangial cell mitosis has been shown only in mammalian glomeruli. These findings suggest that the different mesangial cell activities, described in normal mammalian glomeruli, are present in all vertebrates. According to the animal class, on the other hand, some of these functions are enhanced.

**1977**

Donelli G, Paoletti L. Electron micrograph analysis by optical transforms. *Adv Electron Electron Phys* 1977;43:1-42.

**1978**

Arancia G, Donelli G, Mastini C, Trovalusci P. Effect of divalent cations on the cytoplasmic membrane structure of *E. coli*. *J Submicrosc Cytol* 1978;10:106.

Ultrastructural changes in the *E. coli* cytoplasmic membrane were studied with the freeze-etching technique on cells grown in divalent cation deprived medium. Control bacteria, grown in normal synthetic medium, in the convex cytoplasm membrane surface, show a random distribution of the intermembranous particles (IMP). These particles are 80-100 Angstrom in size. Cells growing exponentially in divalent cation depleted medium present several particle-free zones. Other authors have already observed these smooth areas and have interpreted them as a consequence of chemical-physical modifications of the medium; these areas were interpreted as a lipid phase transition. Under our conditions, the phase transition should be induced by absence of divalent cations. The IMP squeezed out from the transitioned zones should be concentrated outside lipid domains. In bacteria observed at the beginning of the stationary phase the particle-free zones are enlarged and extensive crystalline structures are formed. These structural modifications may be related to the absence of divalent cations since they were never seen in normal medium growth cells. The optical diffraction analysis of the crystalline structures has revealed regular periodic arrays with a rhomboid repeating unit of dimensions 50 x 70 Angstrom and an angle of 70° between the axes. We are now attempting to relate the described structural changes to the decreased permeability of the cell envelope noted in our previous experiments.

Arancia G, Trovalusci P. Some observations on the use of glutaraldehyde and glycerol in the freeze-etching technique. *J Submicrosc Cytol* 1978;10:106-7.

In the freeze-etching method, fixation of the specimen by rapid cooling is often preceded by prefixation with glutaraldehyde and/or glycerol treatment. A systematic study on the morphological differences and the different response to fracture, observed using the above-mentioned pre-treatment, has been carried out. *E. coli* cells grown in divalent cation-deprived synthetic medium have been employed. In non-prefixed cells, the convex cytoplasmic membrane surface shows a distribution of the intramembranous particles (IMP) characterized by crystalline aggregates and particle-free zones. In prefixed bacteria, instead, crystalline structures are present while the particle-free areas are not visible. Glutaraldehyde preserves the vesicles on the outer membrane, not visible without prefixing, while there are no differences in the fracture planes between prefixed and non-prefixed cells. Glycerol induces a good preservation of the cells while it does not seem likely to produce any effect on the structures described. Using glycerol, fracture planes appear very different. In this case, the convex surface of the outer membrane is difficult to observe while the concave surface either of the cytoplasmic or the outer membrane is often visible.

Cicogna VA, De Simone C, Donelli G, Proccichiani G, Rosati Valente F. Interaction between human lymphocytes and sheep red blood cells (spontaneous E rosettes): preliminary observations with the freeze-etching technique. *J Submicrosc Cytol* 1978;10:110.

Non-enriched preparations of human peripheral blood lymphocytes with sheep red blood cells (spontaneous rosettes) were frozen in partially liquid freon using differ-

ent methods of sample treatment: 1) rapid freezing; 2) 2.5% glutaraldehyde fixation before freezing; 3) treatment with a cryoprotectant followed by freezing; 4) 2.5% glutaraldehyde fixation, then treatment with a cryoprotectant and final freezing. The experimental data presented refer to samples treated as in point 4), which gave the best results for both lymphocytes and erythrocytes with regard to the preservation of the intracellular morphology and the fine structure of the plasmamembrane and the intramembranous particles (IMP). We have little evidence of broad contact between lymphocytes and erythrocytes, while finger-like processes are more common. Intramembranous particles are often clearly visible on both types of cells forming rosettes. Since other authors (De Vries et al., 1976) have related the presence of particles of the IMP type to the coating of erythrocytes with an IgM antibody and complement, further observations using different technical approaches on the presence and arrangement of the intramembranous particles themselves will be carried out.

Donelli G. Diffraction and optical filtering of electron micrographs as methods for the fine structure analysis of biological membranes. *J Submicrosc Cytol* 1978;10:144-6.

Donelli G, Frontali N, Guarcini AM, Saltari C, Tangucci F. Light and electron microscope observations on peripheral nerves of rats treated with n-hexane and cyclohexane. *J Submicrosc Cytol* 1978;10:125-6.

Exposure to the solvents of the glues used in shoe and other leather goods manufacture has been recognized as one of the causes of polineuropathies occurring among the workers employed in these industries. It has been demonstrated that the exposure of rats to mixtures of hydrocarbons or to pure n-hexane causes a polineuropathy which is similar to the one occurring in man from the point of view both of the symptoms and of the morphological alterations of the affected nerve trunks ("giant axonal degeneration"). Rats have been exposed for a few months to concentrations of pure n-hexane and cyclohexane in ambient air of about 2000 ppm. After perfusion with glutaraldehyde some branches of the tibial nerves have been dissected out and included in "low viscosity". Response for teasing out of the individual nerve fibers or (after hardening at 70°C) for sectioning. Typical signs of giant axonal degeneration (paranodal and internodal swellings) were demonstrated at the light microscope in teased and in sectioned preparations obtained from n-hexane treated rats. At the electron microscope alterations were found regarding: a) the morphology and the localization of intra-axonal organelles; b) the density of neurofilaments; c) the contact surfaces between axones and Schwann cells (honeycomb structures, as already described). No morphological alterations could be found in the same nerve trunks from rats treated with cyclohexane.

Orfei Z, Stammati AL, Di Trani L, Arancia G. Osservazione rapida al microscopio elettronico di alcuni virus degli animali domestici: metodica utilizzabile ai fini di una rapida diagnosi di virosi. *Clin Vet* 1978;101:839-45.

Viene descritta una metodica per le diagnosi di virosi degli animali mediante il microscopio elettronico. il metodo è stato applicato per virus isolati su colture di tessuti (cellule di rene bovino, cellule di rene suino in coltura continua, fibroblasti di embrione di pollo). La tecnica consiste principalmente nel lisare cellule infette, mediante diluizione in mezzo ipotonico, a cui fa seguito la colorazione con PTA al 2% e l'osservazione diretta al M.E. Questa tecnica semplice e rapida può essere tenuta presente anche per diagnosi di eventuali casi sospetti di epizootie di natura virale esotica.

Proccichiani G, Revoltella R. Ultrastructural studies of C1300 neuroblastoma cell-interaction with syngeneic spleen lymphocytes. *J Submicrosc Cytol* 1978;10:117.

Splenic lymphocytes derived from normal young adult A/J mice or from mice bearing a C1300 neuroblastoma tumor, recognize specific antigenic differences on the surface membrane of syngeneic differences on the surface membrane of syngeneic C1300 neuroblastoma cells in mixed lymphocytes tumor cell cultures *in vitro*. The early event of this recognition reaction is apparently the binding of the attacking lymphocytes to the target cell. In this study we set out to examine the fine structure of the events following this cellular interaction. The tumor cells attacked by lymphocytes usually undergo degenerative changes and death; alternatively, interaction between neuroblastoma cells and lymphocytes is only transitory and does not apparently affect cellular components. There is moreover evidence of a third phenomenon that follows cell adhesion: the entry of lymphocytes transformed into killer cells from the inside of the target cell, or to lymphocytes digestion by the neuroblastoma cell attacked.

### 1979

Donelli G, Araco M, Ruggeri F. Il contributo della microscopia elettronica nella diagnosi delle infezioni virali. *Ann Ist Super Sanità* 1979;15:801-32.

Frontali C, Dore E, Ferrauto A, Gratton E. An absolute method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs. *Biopolymers* 1979;18:1353-73.

Information on spatial correlation in the tangent direction along electron microscope images of filamentous molecules is shown to be obtainable by the analysis of statistical fluctuations in curvature, yielding an absolute measure of the persistence parameter  $\mu$ . The relationship of  $\mu$ , a local, microscopic parameter, to the persistence length introduced by Kratky and Porod is discussed. The hypothesis underlying the assumed theoretical model concern (1) the shape of the angle distribution, assumed to be Gaussian; (2) the passage from a three- to a two-dimensional situation, which is supposed to occur by deformation of the flexible chain in a manner that preserves the memory of the spatial correlation in orientation (except for the blocking of one degree of freedom); and (3) the adsorption conditions, which should meet the equilibrium requirement as closely as possible. The analytical method has been checked on computer simulated "Gaussian" molecules: the study of the simulated sample was essential in solving the problems connected with minimum statistics requirements and the effect of the reading error. Experimental images obtained for T2 DNA fragments at different ionic strengths by Kleinschmidt's adsorption technique have been analysed by means of an automatic flying spot digitizer, the "Precision Encoder and Pattern Recognition." The results show that adsorbed molecules do in fact "remember" the rigidity they possessed in solution and that the Gaussian hypothesis is well verified. Consequently, the slopes of  $\log \cos \theta_1(l)$  of  $\theta_2(l)$  may be used indifferently in the estimate of  $\mu$ . The dependence of this parameter on ionic strength in the range explored shows the expected behaviour.

Minetti M, Aducci P, Viti V. Interaction of neutral polysaccharides with phosphatidylcholine multilamellar liposomes. Phase transitions studied by the binding of fluorescent-conjugated dextrans. *Biochemistry* 1979;18:2541-8.

The interaction of neutral polysaccharides with membrane models was studied by determining the binding of fluoresceinylthio-carbamoyl-dextran (FITC-D) to phosphati-

dylcholine multilamellar liposomes. The amount of FITC-D bound to liposomes increased with temperature and showed two sharp changes at temperatures around the phase transitions of synthetic phosphatidylcholine multilamellar liposomes. The temperatures midway between these abrupt changes correspond well with the temperature prephase and phase transitions. At temperatures around the prephase transition, FITC-D adsorption isotherms suggested that the increase in bound polymer was due to an increase in the affinity of liposome membrane for FITC-D. Proton nuclear magnetic resonance data in this range of temperature showed a slight increase in the relaxation times of the phospholipid polar head group. The enhancement of the  $^{31}\text{P}$ (1H) nuclear Overhauser effect characteristic of the polar head group of phosphatidylcholine was reduced in the presence of FITC-D. These data suggested that the interaction of FITC-D with liposomes induced a slightly different mobility and packing of phospholipids which is responsible for the weakening of the association of polar head groups with the bilayer. At the gel-liquid-crystalline phase transition, fluorescence and electron microscopy data showed that the second increase in FITC-D bound to liposomes was due to the formation of unilamellar vesicles with the polymer internalized within the vesicle. The increased disorder of the bilayer, necessary for the formation of vesicles, may also be induced by cholesterol even at low temperature.

## 1980

Arancia G, Belli S, Donelli G, Trovalusci P. Ultrastructural changes in *Escherichia coli* grown in divalent cation-deficient medium. *J Microsc* 1980;119:155-64.

*Escherichia coli* strains B and K12 could grow in very limiting conditions of divalent cation deficiency. Growth curves showed a long lag period of about 30 h, followed by an exponential phase bringing the bacterial concentration to about  $10^7$  ml<sup>-1</sup>, with a 24 min doubling time, while the growth curves of control cultures were characterized by short lag periods, maximum populations of about  $10^9$  ml<sup>-1</sup> and an 18 min doubling time. The DNA/protein ratio in bacteria grown in deficient medium was 0.48 compared with 0.21 for control bacteria. Significant differences were found in the ultrastructure of the two types of bacteria. Freeze-etched control cells showed the typical appearance with the protoplasmatic fracture face of the cytoplasmic membrane (PFC) having a random distribution of intramembranous particles. Bacteria growing in deficient medium in exponential phase presented several particle-free areas on the PFC. At the beginning of the stationary phase, the particle-free zones became larger and crystalline structures were formed. These structural modifications, which increased with culture age, were never observed in bacteria grown in control medium. Optical diffraction analysis of the crystalline structures in freeze-etched cells revealed regular periodic arrays with a rhomboid repeating unit approximately  $7.6 \times 5.4$  nm in dimension and an angle between the axes of about  $73^\circ$ . Negative staining of isolated membranes of bacteria grown in deficient medium showed a more complex organization of the crystalline arrays, each unit being clearly composed of subunits.

Arancia G, Rosati Valente F, Trovalusci Crateri P. Effects of glutaraldehyde and glycerol on freeze-fractured *Escherichia coli*. *J Microsc* 1980;118:161-76.

Glutaraldehyde and glycerol are widely used in the freeze-fracture technique as sample pretreatments before rapid freezing. However, they can both introduce relevant structural changes and influence the visualization of the fracture faces and surfaces of membranes. A comparison of the results obtained on *E. coli* cells differently pretreated with glutaraldehyde and glycerol is presented. In particular the effect on the distribution and density of the intramembranous particles (IMP) is pointed out.

Glycerol treatment at 310K introduces and IMP redistribution, outlined by the appearance of several smooth areas on the fracture faces of the cytoplasmic membrane, which is prevented by glutaraldehyde prefixation at the same temperature. On the other hand, glutaraldehyde treatment at 310K following glycerol incubation results in the disappearance of the smooth areas, suggesting a substantial change in the IMP distribution caused by the fixative. Cells shifted down to 277K and treated with glycerol at this temperature before quick-freezing, present on the convex fracture face of the cytoplasmic membrane large smooth areas resulting from a lipid transition while the smaller areas observed at 310K are not detectable. Glutaraldehyde treatment at 277K seems also to be responsible for the redistribution of IMP since poorly delimited large smooth areas, containing several IMP, can be observed. In this paper the results of a statistical analysis are also reported, showing that the IMP density can be strongly influenced by pretreatments.

Buonavoglia C, Di Trani L, Tollis M, Orfei Z. Identificazione del parvovirus del cane, agente causale di una grave forma di gastroenterite: primo isolamento in Italia. *Selezione Veterinaria* 1980;21:1073-4.

De Simone C, Donelli G, Meli D, Rosati F, Sorice F. Human eosinophils and parasitic diseases: light and electron microscopy evidence of interaction with sheep erythrocyte. *Clin Exp Immunol* 1980;390:247-53.

The aim of this study was to investigate the possible formation of spontaneous rosettes between human eosinophils and sheep erythrocytes. In patients with parasitic diseases a percentage of 15.7 +/- 6 (range 6-23%), eosinophils were able to form rosettes. Each rosette showed as few as four to eight erythrocytes attached per eosinophil. Two types of interaction were observed at the electron microscope: point attachments and large surface contacts. In patients with non-parasite induced eosinophilia the formation of rosettes is decidedly below the above-mentioned percentage (<2%) or totally absent. It follows that during parasitic infections with blood eosinophilia, whatever the mechanism responsible, the formation of spontaneous rosettes could be of diagnostic significance and might reflect qualitative or quantitative modifications in the eosinophil population.

## 1981

Arancia G, Gripari E, Rosati F, Trovalusci P. La membrana plasmatica dei linfociti umani: studio al microscopio elettronico con la tecnica del freeze-fracturing. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1981;1:35-41.

Arancia G, Gripari E, Rosati F, Trovalusci P, Meli D. Density and size distributions of the intramembranous particles in the cytoplasmic membrane of human peripheral blood lymphocytes. *European Journal of Cell Biology* 1981;25, 272-7.

A freeze-fracture study has been carried out on human peripheral blood lymphocytes (hPBL) from healthy donors. Lymphocytes were frozen either from 37 degrees C or 4 degrees C. Quantitative analysis performed on density and size of intramembranous particles (IMPs) present on both fracture faces of the plasma membrane has revealed: a) a difference in size between IMPs on the external face (EF) and those on the protoplasmic face (PF); b) a remarkable influence of temperature either on size or density of the IMPs; c) the existence at 4 degrees C of two lymphocyte populations differing in IMP density.

Buonavoglia C, Di Trani L, Tollis M, Tangucci F, Orfei Z. Parvovirus associato ad una grave forma di gastroenterite del cane: isolamento e identificazione. *Clin Vet* 1981;104:219-26.

Gli AA. descrivono l'isolamento e l'identificazione di elementi virali appartenenti al gruppo dei Parvovirus, da un cane con una grave sintomatologia a carico dell'apparato gastroenterico. Il virus è stato isolato su cellule renali di feto di gatto nelle quali produce inclusi intranucleari. Il virus isolato è antigenicamente correlato al virus della Panleucopenia dei felini: ciò è stato osservato utilizzando le tecniche di inibizione dell'emoagglutinazione (IEA) e di immunofluorescenza diretta (IF).

Donelli G, Arancia G, Caiazza S, Chessa E, Mancini P, Notargiacomo S, Rosati F, Tangucci, Trovalusci P. Indagini al microscopio elettronico su campioni relativi a 26 soggetti in età pediatrica deceduti per affezioni respiratorie acute. *Ann Ist Super Sanità* 1981;17:783-8.

Cecchetti G, Marconi A, Paoletti L. L'analisi a raggi x puntuale con analizzatore di lunghezza d'onda. Applicazione nel riconoscimento delle fibre d'amianto. *Ann Ist Super Sanità* 1981;17:569-74.

Donelli G. La microscopia elettronica nella diagnostica delle malattie infettive. *Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio* 1981;1:26-30.

In molti Paesi scientificamente avanzati l'utilizzazione della microscopia elettronica a fini diagnostici ha raggiunto da tempo un notevole livello di diffusione soprattutto nel campo della patologia infettiva. In Italia invece, si è finora assistito ad uno sviluppo assai limitato di questo specifico indirizzo applicativo, tanto più sorprendente se rapportato da un lato al discreto numero di centri di microscopia elettronica ad orientamento biomedico operanti nel nostro Paese, dall'altro ai molteplici e significativi contributi che tale approccio metodologico è in grado di fornire alla diagnostica delle infezioni batteriche e virali. L'intento di questa breve rassegna è appunto quello di tracciare un quadro riassuntivo delle principali tecniche di microscopia elettronica di interesse diagnostico e delle relative potenzialità applicative nel settore delle malattie infettive, sottolineandone al contempo vantaggi e limiti d'impiego.

Donelli G, Tangucci F, Tinari A, Rocchi G, Resta S, Cochi S, Menichella D, Varveri A, Caione MD. Rotavirus: risultati preliminari della sorveglianza in un reparto per immaturi. *Bollettino Epidemiologico Nazionale* 1981;29:1-4.

A longitudinal E.M. study on rotavirus infections among premature infants carried out from October 1980 to May 1981. 1350 faecal specimens were collected from 168 cases admitted to the special case ward of the Bambino Gesù paediatric hospital in Rome. Rotavirus excretion was demonstrated in 49% of the babies. Gastroenteritis occurred in about 45% of rotavirus excretors.

Floridi A, De Martino C, Marcante ML, Apolloni C, Scorza Barcellona P, Silvestrini B. Morphological and biochemical modifications of rat germ cell mitochondria induced by new antispermatogenic compounds. *Studies in vivo and in vitro. Experimental Molecular Pathology* 1981;35:314-31.

The morphological changes induced in rat germ cell mitochondria by chlorobenzyl-1H-indazol-3-carboxylic acid (AF 1312/TS) and Ionidamine (AF 1980), two antispermatogenic compounds, are described. Twenty-four hours after treatment, numerous dumbbell-

shaped mitochondria appear in the Golgi, cap, and acrosomic spermatids, whereas after 48 hrs severe signs of mitochondrial degeneration are visible in the maturation phase spermatids. Biochemical studies performed on isolated germ cells and their mitochondria, harvested from the testes of normal and treated rats, are also described. In the normal rats, the cells and mitochondria were incubated with the antispermatogenic compounds. Aerobic and anaerobic glycolysis was evaluated on isolated germ cells, whereas the following parameters were evaluated in the mitochondria: ADP/O ratio, respiratory control ratio (RCR), and ADP affinity. The results obtained demonstrate that the antispermatogenic agents induce, both *in vivo* and *in vitro*, similar changes in energy metabolism; respiration, RCR, and ADP affinity are significantly reduced, while aerobic glycolysis is increased.

Picozzi P, Santucci S, Paoletti L. Preparazione e caratterizzazione di film granulari metallici ottenuti per evaporazione in gas inerte: i film di Nickel. *Vuoto - Scienza e tecnologia* 1981;11:141-9.

Sono stati studiati, mediante la microscopia elettronica in trasmissione, film granulari di nickel ottenuti per evaporazione in ambiente di gas inerte. Si è osservato che le dimensioni delle particelle costituenti il deposito dipendono fortemente dalle condizioni di evaporazione (pressione, natura del gas, temperatura del crogiuolo ovvero velocità di evaporazione). Il controllo di questi parametri permette di ottenere particelle di diametro mediano prefissato. Il procedimento di "annealing" in aria del deposito provoca il rivestimento dei grani metallici con pellicole isolanti di ossido.

Pocchiarri F, Zampieri A, Donelli G, Greco D. Relazione sullo stato di avanzamento delle ricerche epidemiologiche, virologiche e batteriologiche. *G Mal Infett Parass* 1981;33:1323-31.

Vengono qui riassunti i risultati preliminari delle indagini epidemiologiche, virologiche e batteriologiche avviate in relazione all'eccesso di mortalità infantile osservato nella provincia di Napoli nell'autunno-inverno 1978-1979.

Rochi GU, Vella S, Resta S, Cochi S, Donelli G, Tangucci F, Menichella D, Varveri A, Inglese R. Outbreak of rotavirus gastroenteritis among premature infants. *Br Med J* 1981;283:886.

Though rotavirus causes severe gastroenteritis predominantly in infants and young children, it may infect any age group. In neonates rotavirus infection is usually subclinical, and even in premature babies the infection is reportedly mostly mild. We report an outbreak of rotavirus infection among premature and low-birthweight babies in a special-care ward. In most cases virus excretion was associated with gastroenteritis. Dehydration, weight loss and growth retardation occurred in several cases.

Santucci S, Picozzi P, Paoletti L, Tangucci F. Optical properties of granular metal films: the Au/Ag system. *Thin Solid Films* 1981;79:133-6.

Silver, gold and Ag/Au films were prepared by the gas evaporation technique. The optical transmittances are reported. Our measured data are well reproduced by a modified Garnett formalism.

## 1982

De Simone C, Donelli G, Meli D, Molinari A, Rosati F, Sorice F. Human peripheral eosinophils with receptors for IgM: demonstration and ultrastructural morphology. *Immunobiology* 1982;162:116-27.

Receptors for IgM were detected on peripheral blood human eosinophils by a rosette technique with ox red blood cells coated with the IgM fraction of the specific immun-serum. Between 14% and 43% (mean 27%) FcμR positive cells were found after an overnight incubation period at 37 degrees C by using this technique. The specificity of the receptors for IgM was assessed by studying the inhibitory capacity of purified human IgM in the rosette assay. From an ultrastructural point of view, the EAM rosette-forming cells are mature eosinophilic granulocytes characterized by a nucleus with a variable number of lobes and a certain number of "first type" granules partially or totally devoid of their content.

De Simone C, Donelli G, Meli D, Rosati F, Sorice F. Human eosinophils and parasitic diseases. II. Characterization of two cell fractions isolated at different densities. *Clinical and Experimental Immunology* 1982;48:249-55.

A new procedure, based on centrifugation through multiple discontinuous gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica particles has been developed for the separation of almost pure eosinophils from blood samples of healthy donors. When this technique is employed for the purification of eosinophils from the peripheral blood of patients with parasitic diseases, two cell fractions almost pure in eosinophil granulocytes are harvested at different densities. Preliminary results, concerning the characterization of these cell fractions, indicate that in the terms of detectable membrane receptors and K cell activity, two distinct eosinophil subpopulations can be recognized.

Donelli G, Molinari A, Rosati F. Aspetti ultrastrutturali dei granulociti eosinofili. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1982;3:111-4.

Donelli G, Rocchi G, Menichella D, Varveri A, Tangucci F, Resta S, Caione MD, Cochi S, Tinari A. Sorveglianza delle infezioni da rotavirus in un reparto per immaturi: ottobre 1980-maggio 1981. *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie* 1982;12:1679-80.

Nel periodo ottobre 1980-maggio 1981 è stato effettuato uno studio longitudinale tendente a realizzare, mediante indagini in microscopia elettronica, la sorveglianza delle infezioni da rotavirus in un reparto per immaturi. Sono stati esaminati circa 1.350 campioni fecali relativi a 168 degenti: infezioni da rotavirus sono state documentate nel 49% dei casi studiati, con picchi di maggior frequenza nei mesi di ottobre 1980 e maggio 1981, oltre al tipico picco invernale occorso nel trimestre gennaio-marzo. L'infezione da rotavirus è risultata associata a gastroenterite nel 45% circa dei casi.

Donelli G, Rocchi G, Menichella D, Varveri A, Tangucci F, Resta S, Caione MD, Zard A, Tinari A. Studio epidemiologico delle infezioni da rotavirus nell'immaturità. *Ann Ist Super Sanità* 1982;18:437-40.

Vengono riportati i risultati di uno studio longitudinale della durata di un anno, condotto su 287 piccoli ricoverati di un reparto ospedaliero per immaturi, allo scopo di valutare l'incidenza delle infezioni enteriche da virus in questa particolare categoria di pazienti. L'osservazione elettronicomicroscopica dei campioni fecali relativi ai soggetti studiati, congiuntamente all'analisi dei dati clinici, ha indicato:

- a) una escrezione di rotavirus nel 39% e di altri virus nell'8% dei casi;
- b) una più elevata frequenza di infezioni nei mesi di ottobre 1980, gennaio-marzo e maggio 1981;
- c) un'incidenza di gastroenteriti acute, associate cronologicamente alla escrezione virale, pari al 58%.

Nigro G, Donelli G, Tangucci F, Menichella D, Tosti U, Midulla M Studio clinico delle gastroenteriti acute da rotavirus nell'area di Roma. *Rivista Italiana di Pediatria (IJP)* 1982;8:867-71.

In 80 bambini, da 18 giorni a 6 anni di età, ricoverati per gastroenterite acuta, è stata effettuata con un metodo ELISA la ricerca di rotavirus nelle feci prelevate mediante tampone rettale. Sono risultati positivi 52 campioni (65%) che, conservati in PBS a +4 °C, sono stati esaminati, dopo circa 6 mesi, al ME: i rotavirus sono stati evidenziati in 26 preparati (50%). Mediante FC sono state dosate le Ig totali anti-rotavirus, su siero acuto e convalescente, in 5 bambini negativi ed in 10 positivi, di cui 8/10 hanno presentato sieroconversione. Poco indicativi sono stati i risultati emersi dal dosaggio delle IgM solo su siero acuto. L'esame dei dati clinici ha evidenziato una compromissione più intensa nei bambini negativi rispetto ai positivi, nei quali la sintomatologia è apparsa generalmente più grave in caso di concentrazione elevata di rotavirus nelle feci.

Paoletti L, Caiazza S, Chessa E, Notargiacomo S, Donelli G. Valutazione qualitativa e quantitativa mediante microscopia elettronica e tecniche associate, del grado di inquinamento da asbesto di talchi per uso industriale, cosmetico e farmaceutico. *Ann Ist Super Sanità* 1982;18:341-50.

È noto che l'esposizione professionale alle polveri di talco può condurre ad un tipo di fibrosi polmonare nota come talcosi. Inoltre un gran numero di dati epidemiologici e sperimentali mette in evidenza il rischio di tumore associato alle componenti fibrose delle polveri di talco, in particolare alla presenza di fibre di asbesto, un contaminante naturale dei giacimenti di talco. In considerazione di ciò, è sembrato opportuno iniziare uno studio sistematico delle polveri di talco utilizzate in Italia allo scopo di stabilire il loro contenuto in fibre ed, in particolare, il loro contenuto in asbesto. Nei campioni di talco studiati sono state osservate percentuali di particelle fibrose fino al 20% del totale delle particelle. Circa la metà dei talchi ha rivelato la presenza di asbesto: in un caso, crisotilo (asbesto di serpentino); negli altri casi, tremolite (asbesto anfibolico). La quantità di asbesto variava notevolmente da un campione all'altro, fino al 30% della frazione fibrosa. Circa il 75% delle fibre di asbesto osservate nelle polveri di talco è risultata avere uno spessore inferiore a 0,4 µm, cioè al potere risolutivo del microscopio attico che è tuttora strumento più utilizzato per lo studio di particelle e fibre minerali.

### 1983

Arancia G. Contributi della tecnica del freeze-fracturing allo studio delle membrane biologiche. *Ann Ist Super Sanità* 1983;19:287-316.

Da alcuni anni la tecnica del freeze-fracturing sta fornendo un notevole contributo agli studi sull'ultrastruttura delle membrane biologiche. Tale metodo di preparazione per la microscopia elettronica consiste nell'ottenere una replica della superficie di frattura del campione dopo averlo congelato a bassissima temperatura. Poiché la frattura avviene preferenzialmente lungo il piano idrofobico mediano delle membrane, il freeze-fracturing è particolarmente adatto per la visualizzazione e per lo studio dell'organizzazione molecolare dei componenti di membrana. In questa rassegna viene dapprima descritta l'evoluzione dei modelli strutturali delle membrane biologiche elaborati nel corso degli ultimi anni. Viene quindi descritta la tecnica del freeze-fracturing, articolata nelle sue varie fasi, soffermandosi sugli effetti che esse possono avere sulle strutture di membrana. L'attenzione viene infine focalizzata sulle particelle di membrana e sulle più recenti acquisizioni riguardanti la loro natura e funzione.

Arancia G, Rosati F, Trovalusci P. Density and size distribution of the intramembranous particles in the cytoplasmic membrane of human peripheral blood lymphocytes. II. Ultrastructural differences between T and B cells. *European Journal of Cell Biology* 1983;31:62-70.

Separated T and B lymphocytes from human peripheral blood were studied using the freeze-fracture technique. Quantitative analysis performed on density and size of intramembranous particles (IMPs) present on both fracture faces of the plasma membrane has revealed remarkable differences between cells belonging to the two main lymphocyte populations. In particular: (a) both fracture faces of the cytoplasmic membrane of B lymphocytes exhibit larger particles than T lymphocytes; (b) the mean densities, on both protoplasmic (PF) and external (EF) fracture faces, in B lymphocytes are lower than in T lymphocytes; (c) in B cells the partition ratio of particles between PF and EF is reversed with respect to T cells; (d) on both fracture faces of B lymphocytes, the IMP densities present a normal distribution while on T cells, density values show bimodal distributions indicating the existence of two cell subsets differing in particle density.

Arancia G, Trovalusci P, Bhattacharyya FK, Castellani Pastoris M, Donelli G. Electron microscopy investigation on an aflagellate *Vibrio cholerae* strain exhibiting low motility. *IRCS Medical Science* 1983;11:1081-2.

Caiazza S, Fanizza C, Ferrari M. Rapid dimensional characterization of perfluorocarbon (PFC) particles by means of EM and automatic image analysis methods. *Micron and Microscopica Acta* 1983;14:357-60.

A technique for dimensional characterization of perfluorocarbon particles in artificial blood substitutes by means of electron microscopy and automatic image analysis is reported. This method allows a rapid, simple and direct evaluation of particle size which is strictly correlated to the biocompatibility of perfluorocarbon emulsion.

Caprioli A, Falbo V, Roda LG, Ruggeri FM, Zona C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infection and Immunity* 1983;39:1300-6.

A factor produced by several strains of *Escherichia coli* isolated from enteritis-affected children has been shown to produce both a necrotizing effect on rabbit skin and striking morphological alterations on CHO, Vero, and HeLa cells. The same strains were found to have hemolytic activity on sheep erythrocytes. The toxic, cell-altering factor was demonstrated to be different from both heat-labile and heat-stable enterotoxins and from Vero toxin. The main effect induced by the isolated factor on cultured cells was the formation of large multinucleated cells. The partial purification achieved suggests that the same factor (most likely a protein with a molecular weight of 70,000 to 80,000) is responsible for toxic and cell-altering activities, whereas a different molecular species is responsible for hemolytic activity.

Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, Cilli V, Caleffi F, Aldrovandi V, Rampichini L, Tangucci F. Experimental infection and cross protection tests in calves with cytopathic strains of bovine rotavirus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1983;6:321-32.

Four cytopathic strains (81/32F, 81/36F, 81/40F, 82/80F) of bovine rotavirus were shown to be pathogenic for conventionally reared newborn calves. Calves were infected orally, using 3 calves for each isolate. All became febrile, were depressed and diarrhoeic. Two calves, one of which in the group of those infected with 81/36F isolate, and the other infected with

strain 81/40F, were killed when moribund. A 3rd calf from the 81/36F infected group, died. At necropsy localized lesions of the small intestines, which are considered to be typical of rotavirus infection, were found. Virus was consistently isolated from the fecal samples of the inoculated calves up to 13 days post-inoculation. It was speculated that some differences existed in the virulence of the bovine rotaviruses tested. The cross protection tests revealed that 1 strain (81/36F) might be antigenically more complex than the others.

Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, Cilli V, Donelli G, Angelillo G, Bruggi M. A study of cytopathic rotavirus strains isolated from calves with acute enteritis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1983;6:253-64.

Nine cytopathic bovine rotavirus strains were isolated in MA-104 cell cultures from fecal specimens of dairy calves suffering from diarrhea. Isolation of the virus was accomplished from three outbreaks which occurred on dairy farms located in Central and Southern Italy. Fecal suspensions were treated with a high concentration (1000 micrograms/ml) of trypsin, and inoculated into MA-104 cell cultures grown out in Eagle's minimum essential medium (MEM) containing 5 micrograms/ml of the enzyme. Cytopathic effects (CPE), characterized by intracytoplasmic inclusion bodies of different sizes and shapes, were observed on the 1st passage with five of the strains and on the 2nd (2 strains) or the 3rd (2 strains) passage for the others. The presence of trypsin and the use of MA-104 cells appeared to be essential for the occurrence of CPE, inasmuch as no CPE was detected when trypsin was omitted in the MA-104 cell system. Replication failed to occur when primary bovine embryo kidney cell cultures with or without trypsin were used. Electron microscopy revealed the presence of particles with a typical rotavirus morphology. In MA-104 cells, the titre of virus reached its maximum 48 hr after inoculation. Small, clear-cut plaques were produced by the isolates in MA-104 cells under the overlay of MEM containing carboxymethyl cellulose, trypsin and DEAE-dextran. The nine rotavirus strains were antigenically related, whereas the relationship to either the Nebraska or the Compton rotaviruses was quite weak.

## 1984

Caiazza S, Fanizza C, Ferrari M. Fluosol 43 particle localization pattern in target organs of rats. An electron microscopy study. *Virchows Archiv A. Pathological Anatomy and Histopathology* 1984;404:127-37.

Perfluorocarbons (PFCs), chemically inert fluorinated organic compounds with high binding capacity for O<sub>2</sub>, are under discussion as substitutes for erythrocytes. Given the paucity of E.M. observations after their use, the aim of this study was to provide more extensive ultrastructural data about PFC particle size in the emulsion and about the localization pattern in organs of rats after infusion of Fluosol 43. Attention has been focused on the particle relationships with subcellular structures and on the subsequent histopathological implications.

Caprioli A, Donelli G, Falbo V, Possenti R, Roda LO, Roscetti G, Ruggeri FM. A cell division-active protein from *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118:587-93.

A purification procedure for a protein obtained from an pathogenic strain of *E. coli* is described. The protein-called CNF-is active in inhibiting the duplication of cultured mammalian cells. Since nuclei division is apparently normal, treatment of cultured cells with CNF leads to the formation of gigantic, polynucleated cells. The purified protein is chromatographically and electrophoretically homogeneous. A partial characterization of CNF protein is also given.

Lampertico P, Giangrande A, Cantù P, Biagini G, Donelli G. Epatopatia da accumulo di materiale estraneo in pazienti dializzati. *Istocitopatologia* 1984;6:139-43.

In 1981 the first liver biopsy of a patient, on hemodialysis since 1970 for postpartum cortical necrosis, showed a marked accumulation of macrophages in the sinusoids. Similar observations were made subsequently on both liver and spleen biopsies of patients on hemodialysis treatment. The substance accumulated in the macrophages is probably particles which have migrated from the dialysis tubing although its true nature was not demonstrated in the present case or in the few cases mentioned in the literature. Reports of similar cases observed in other hospitals may help to establish the real incidence of this iatrogenic complication.

Malorni W, De Martino C, Capanna E. Ultrastructural features of epididymal spermatophagy in subfertile chromosomally derived mice. *Arch Androl* 1984;13:289-97.

A cytochemical analysis of aneuploid gametes in chromosomally derived subfertile mice has demonstrated a prezygotic selection against the aneuploid gametes during the epididymal transit. The present investigation deals with an electron microscopic analysis of the epididymis in subfertile hybrid mice heterozygous for eight Robertsonian metacentrics. The epididymal epithelium of these mice appears to be formed by four cell types with different morphological features. In the tail of the epididymis all these cell types are present. Moreover, several giant vacuolizations of principal cells containing mature and immature spermatozoa are often visible in this region. This observation, confirming previous data on the fate of aneuploid spermatozoa on hypofertile Robertsonian heterozygotes, suggests a phagocytic activity of the epididymal epithelium of these mice. The epididymal epithelium "filter function" in recognizing and eventually disposing of immature or anomalous germ cells is discussed.

Marconi A, Menichini E, Paoletti L. A comparison of light microscopy and transmission electron microscopy results in the evaluation of the occupational exposure to airborne chrysotile fibres. *Ann Occup Hyg* 1984;28:321-31.

A comparison has been made between light microscope (LM) and transmission electron microscope (TEM) counts of airborne chrysotile fibres, collected on 30 membrane filters from different working processes. For TEM counts, fibres of length  $l > 5 \mu\text{m}$  were classified according to diameter  $d$ , namely  $0.3 \mu\text{m} < d < 3 \mu\text{m}$  (microscopic fibres) and  $d \leq 0.3 \mu\text{m}$  (submicroscopic fibres); short fibres,  $l \leq 5 \mu\text{m}$ , were taken into account separately. A very good correlation has been found between LM and TEM counts, both for microscopic and total (microscopic + submicroscopic,  $l > 5 \mu\text{m}$ ) fibres, for densities 40–500 fibres  $\text{mm}^{-2}$ . The median of the ratios between TEM and LM counts has been found to be 1.1 for microscopic fibres and 1.2 for total fibres. From TEM counts, submicroscopic fibres have been found to account for about 10% of total  $l > 5 \mu\text{m}$  fibres. The mean ratio between short fibres and those with  $l > 5 \mu\text{m}$  was in the range 0.8–3.6, depending on the working process. These results suggest the possibility of adopting factors, varying with the kind of working process, to be applied to LM counts in order to estimate the exposure to all the asbestos fibres considered important for a comprehensive evaluation of the risk.

Molinari A, Arancia G, Donelli G. Immunolocalizzazioni in microscopia elettronica. *Ann Ist Super Sanità* 1984;20:171-92.

L'applicazione delle tecniche di immunomarcatura in microscopia elettronica (IEM) rappresenta un significativo approccio metodologico per lo studio delle relazioni struttura-funzione a livello subcellulare. Queste tecniche, già largamente utilizzate in

microscopia ottica, sfruttano la proprietà degli anticorpi di legarsi in maniera specifica a determinati gruppi antigeni rendendoli reagenti ideali per l'identificazione, la visualizzazione e la localizzazione dei vari componenti cellulari. In questa rassegna verranno dapprima descritte quelle sostanze che vengono più comunemente usate in IEM come liganti, intendendo con questo termine quelle molecole o complessi in grado di legarsi in maniera specifica e stabile ai componenti che si vogliono localizzare. Verranno quindi descritti i marcatori, quelle sostanze cioè che, opportunamente coniugate ai liganti, per le loro peculiari caratteristiche di forma, dimensioni e densità elettronica sono facilmente individuabili e riconoscibili dai normali costituenti cellulari. Di ciascun ligante o marcatore verranno prese in esame le principali caratteristiche, le possibilità di impiego ed i problemi riguardanti il loro uso. Infine, poiché la realizzazione delle immunolocalizzazioni in microscopia elettronica pone problemi diversi a seconda della metodica di preparazione impiegata, l'ultima parte di questa rassegna è stata dedicata all'analisi delle applicazioni delle IEM alle diverse tecniche di preparazione dei campioni.

Paoletti L, Caiazza S, Donelli G, Pocchiari F. Evaluation by electron microscopy techniques of asbestos contamination in industrial, cosmetic and pharmaceutical talcs. *Regul Toxicol Pharmacol* 1984;4:222-35.

Talc powders from national and international markets were analyzed in order to assess their fiber contents and the proportion of asbestos in the fibrous material. Samples of talc powders used as excipients in pharmaceutical and cosmetic preparations demonstrated fiber contents up to 30% of total particles. About a half of the talc powders revealed the presence of asbestos: in five samples chrysotile (a serpentine asbestos) was present, in the other ones tremolite and anthophyllite (an amphibole asbestos). The amounts of asbestos vary up to 90% in the different samples of the fibrous fraction. About 75% of observed asbestos fibers were thinner than 0.4 micron, i.e., below the resolving power of light microscopy which until now was the most utilized technique for evaluating the environmental pollution due to asbestos.

Paoletti L, Rosa PA, Diociaiuti M, Picozzi P, Santucci S. Structural studies of small gold clusters by transmission electron microscopy. *Vuoto* 1984;14:59-64.

Usando la diffrazione elettronica in un microscopio elettronico a trasmissione sono stati studiati piccoli aggregati d'oro con diametri compresi tra 11 e 212 Å. L'aumento del diametro degli anelli di Debye nel diffrattogramma al diminuire delle dimensioni dell'aggregato indica una contrazione del parametro reticolare. Lo studio della posizione del picco (311) nelle tracce microdensitometriche nelle figure di diffrazione elettronica per diversi diametri dell'aggregato, effettuato prendendo in considerazione la distribuzione dei diametri proiettati equivalenti, ha permesso di determinare la contrazione in funzione del diametro degli aggregati. I risultati preliminari sono stati interpretati con un modello macroscopico a goccia liquida. Sulla base di questa interpretazione si ricava un valore di 2825 dyne/cm per la tensione superficiale e questo valore viene discusso con riferimento a studi precedenti.

Paoletti L, Rosa PA, Picozzi P, Santucci S. Electron microscope study of very thin mixed Cu/CuO films. *J Vac Sci Technol A* 1984;2:1471-7.

The oxidation kinetics and morphology of very thin (<10 nm) mixed Cu/CuO films obtained by exposing very thin discontinuous Cu films to atomic oxygen plasma were investigated by electron diffraction and dark field electron microscopy. The oxidation process is characterized by an initial stage of oxide logarithmic growth which goes

on until about 50% of the initial Cu is oxidized. The morphology of the films during the oxidation evolves from a situation characterized by discontinuous metallic islands covered with an oxide layer to another one in which metallic grains are embedded in a continuous oxide film.

## 1985

Barbaro V, Bosi C, Caiazza S, Chistolini P, Ialongo D, Rosa PA. Implant effects on polyurethane and silicone cardiac pacing leads in humans: Insulation measurements and SEM observations. *Biomaterials* 1985;6:28-32.

Recently, polyurethane cardiac pacing leads have been under discussion because of some failures, probably due to modification of surface insulating properties. In order to verify the reliability of polyurethane versus silicone rubber as coating material, the authors, starting from previous clinical research, have carried out a study of electrical insulation related to implant time. At the same time the outer and inner lead surfaces have been submitted to scanning electron microscope (SEM) analysis. The results show, for the polyurethane leads, a significant increase in the leakage or currents in explanted samples, and a significant degradation (cracking) of the outer surfaces.

Castrucci G, Ferrari M, Frigeri F, Cilli V, Perucca L, Donelli G. Isolation and characterization of cytopathic strains of rotavirus from rabbits. *Arch Virol* 1985;83:99-104.

Three cytopathic rotavirus isolates were recovered from young rabbits affected by an enteric syndrome. The three isolates, when compared by cross serum-neutralization tests, were found to be of the same serotype. Cross neutralization occurred also between a representative of the rabbit isolates and one strain of bovine rotavirus.

De Martino C, Marcante ML, Malorni W, Citro G, Floridi A, Scorza Barcellona P, Capanna E. Morphological and karyological studies on *in vitro* Sertoli cells of adult crab-eating macaques (*Macaca fascicularis*). *Am Journal Primatol* 1985;9:173-87.

Sertoli cell cultures were obtained from isolated seminiferous tubules of adult crab-eating macaques (*Macaca fascicularis*). Cells were identified by their morphological characteristics and their capacity to produce and release in the culture medium  $17\beta$ -estradiol and androgen-binding protein (ABP). Several cells were undergoing mitosis. Karyological analysis showed both diploid and tetraploid metaphases. Patterns of nuclear scission were also observed.

Donelli G, Paoletti L. Riconoscimento di fibre minerali mediante microscopia elettronica. In: Università di Torino (Ed). *Mesotelioma maligno - Gruppo di studio della SIPDTT. Panel Nazionale dei Mesoteliomi*. Torino;1985. p. 94-102.

Malorni W, Rosati F, De Martino C, Isacchi G, Arancia G. Effects of Ionidamine on the plasma membrane ultrastructure of human T lymphocytes. *IRCS Med Sci* 1985;13:168-9.

Nigro G, Cardi E, Donelli G, Tangucci F, Midulla M. Protracted carbohydrates malabsorption associated with rotavirus-astrovirus gastroenteritis in an infant without immunodeficiency. *Ital J Gastroenterol* 1985;17:38-9.

Protracted carbohydrate malabsorption associated with rotavirus-astrovirus gastroenteritis in a 10-month-old infant not immunodeficient is described. Vomiting and diarrhoea persisted, almost unremittingly, for one month while D-xylose tolerance test appeared still abnormal one week later. Complete disappearance of the carbohydrate malabsorption was disclosed three months after the onset of the gastroenteritis. Rotavirus was detected in stool specimens by EM and ELISA for more than three weeks. Astrovirus was visualized by EM for eight days. Seroconversion of IgG and IgM to NCDV was demonstrated in acute- and convalescent-phase sera by CF technique. The pathogenetic role of this dual virus infection in determining prolonged gastroenteritis and subsequent carbohydrate malabsorption is discussed.

Nista A, De Martino C, Malorni W, Marcante ML, Silvestrini B, Floridi A. Effect of Lonidamine on the aerobic glycolysis of normal and phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Exp Mol Pathol* 1985;42:194-205.

The effect of lonidamine on the aerobic glycolysis and on the ultrastructure of normal and phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes has been investigated. In quiescent lymphocytes lonidamine does not affect aerobic lactate production and does not induce ultrastructural modifications. On the contrary, lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin become susceptible to lonidamine inhibition. The rate of lactate production is decreased by 50% and mitochondria appear swollen with rarified matrix and disrupted cristae. The different effect of lonidamine can be ascribed both to the biochemical modifications induced by phytohemagglutinin and to the mechanism of lonidamine itself. Phytohemagglutinin increases the activity of hexokinase and phosphofructokinase and determines a shift of cytoplasmic hexokinase toward the mitochondria-bound form which is responsible for the increased lactate production. This interpretation is supported by the finding that lonidamine, which specifically inhibits mitochondria-bound hexokinase only when mitochondria are in a condensed state, decreases lactate production to a value similar to that found in unstimulated cells. The inability of lonidamine to affect the aerobic glycolysis of quiescent lymphocytes can be interpreted along the same line. On this basis it is suggested that the inhibition of mitochondria-bound hexokinase might be ascribed to marked changes in membrane conformation that affect the activity of membrane-associated enzymes, rather than to a direct effect of the enzyme itself.

## 1986

Arancia, G, De Simone, C, Rosati, F, Trovalusci, P. Differences in the plasma membrane ultrastructure between TM and TG lymphocytes: a freeze-fracture study. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1986;6:137-44.

Arancia G, Fiorentini C, Ferrari C, De Panfilis G, Manara GC. Morphometric characterization of NK cell subsets expressing the Leu-11 antigen in comparison to Leu-7 positive, 11 negative cells. *Cell Biol Int Rep* 1986;10:845-53.

Three subpopulations of human natural killer (NK) cells were identified by immunoelectron microscopy, using combinations of anti-Leu-7 and anti-Leu-11 monoclonal antibodies. For each subpopulation the nuclear area/cellular area ratio (An/Ac) and the perimeter/equivalent circumference ratio were evaluated employing an interactive image analyzer. Leu-11+ cells showed a larger area, a smaller An/Ac and a higher "villosity degree" in comparison to Leu-7+, 11- cells. These differences were proved to be significant using the Kolmogorov-Smirnov two sample test. Previous studies described

the existence of distinct cytotoxic capability, recombinant interleukin 2-mediated activation, and ultrastructural features of Leu-11+ in comparison to Leu-7+, 11- cells. This is the first report in which morphometric differences within NK cell subsets are exactly determined.

Arancia G, Malorni W, Mariutti G, Trovalusci P. Effect of hyperthermia on the plasma membrane structure of Chinese hamster V79 fibroblasts: a quantitative freeze-fracture study. *Radiat Res* 1986;106:47-55.

Hyperthermia in the range 41-45 degrees C can induce wide biochemical, physiological, and morphological changes in mammalian cells both *in vivo* and *in vitro*. In general, its effects on membranes, particularly on the plasma membrane, are still poorly understood. To investigate the effects of heat on this cell structure, Chinese hamster V79 fibroblasts were exposed to 43 degrees C hyperthermia for 1 h, immediately fixed with glutaraldehyde after treatment, and freeze-fractured for electron microscopic examination. Particular attention was given to the density and size of intramembranous particles (IMPs) on both protoplasmic (PF) and external (EF) fracture faces of the plasma membrane. The quantitative study performed by an interactive image analyzer on the IMPs, generally reported as plasma membrane proteins, showed in heat-treated cells a statistically significant increase in their density and size on both fracture faces. The differences observed demonstrate that in our experimental conditions, hyperthermia in plasma membranes produces structural changes whose biological significance has to be clarified. Moreover, our findings seem to support recent data indicating an involvement of membrane proteins in the cell response to hyperthermia.

Arancia G, Ragona G, Rocchi G, Donelli G. Epstein-Barr virus-related ultrastructural modifications of plasma membrane during B-cell transformation. *Int J Cancer* 1986;38:549-52.

Ultrastructural modifications are described in the plasma membrane of *in vitro* established human B cells. By the freeze-fracture technique, intramembrane particles (IMPs) are quantified in B lymphocytes following Epstein-Barr virus (EBV) transformation *in vitro*, and in B-lymphoma (Burkitt-type) cells, either positive or negative for EBV genome. Analysis shows an overall increase in IMP density as compared to normal controls. Differences are observed between the protoplasmic and exoplasmic faces of fractured membranes as well as among *in vitro* transformed and clearly neoplastic cells. Results indicate that conformational changes in IMP distribution parallel neoplastic evolution of transformed cells.

Caiazza S, Fanizza C, Ferrari M. Fluocarburess comme substituts artificiels du sang: une étude au microscope électronique. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1986;29:455-63.

In spite of the great interest in developing a perfluorocarbon (PFC) blood substitute with a wide range of applications, the *in vivo* and *in vitro* knowledge of the interactions between PFCs and cells, from the ultrastructural point of view is limited up to now. In this framework, our observation confirmed the PFC particle uptake by rat hepatocytes *in vivo* as well as *in vitro*. The absence of endocytosis by rat and guinea pig myocytes *in vivo*, to be confirmed by *in vitro* experiments, could favour a safe use of PFCs as components of cardioplegic solutions.

Castrucci G, Frigeri F, Cilli V, Donelli G, Ferrari M, Chicchini V, Bordoni E. A study of a herpesvirus isolated from dairy cattle with a history of reproductive disorders. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1986;9:13-21.

Three strains of herpesvirus were recovered from cows with vulvovaginitis. The three isolates (85/BH 16TV, 85/BH 17TV, 85/BH 18TV), when compared by cross serum neutralization (SN) tests, were found to be antigenically identical. They were serologically distinct from infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and Bovid herpesvirus 2 (BHV2), while they cross reacted with bovine herpesvirus DN-599. Besides the serologic aspects, the three isolates appeared to share common biological, physical and morphological properties with the newly recognized bovine herpesviruses, of which DN-599 is a representative strain.

De Crescenzi M, Diociaiuti M, Picozzi P, Santucci S. Electronic and structural investigation of palladium clusters by X-ray absorption near-edge structure and extended X-ray absorption fine-structure spectroscopies. *Phys Rev B Condens Matter* 1986;34:4334-7.

Palladium metal clusters with an average diameter of 14 Å embedded in a carbon matrix have been studied by synchrotron-radiation x-ray absorption measurements. The data analysis of the L<sub>2,3</sub> edge (p-d transitions) shows (a) a strong reduction of the absolute value of the absorption compared to the bulk, (b) a shift towards higher binding energies of about 2 eV, and (c) a broadening of the same structures. We explain these effects as mainly due to a change of the d density of states at the Fermi level, since the L<sub>1</sub> edge (s-p transitions) does not show similar effects. The extended x-ray absorption fine-structure analysis reveals an important increase of about 3% of the first-nearest-neighbor distance, in contrast with other metals which show a lattice contraction.

Diociaiuti M, Lozzi L, Picozzi P, Santucci S, De Crescenzi M. Structural properties of small copper clusters. *Vuoto* 1986;16:89-92.

È stata impiegata la tecnica l'EELFS per studiare la struttura locale di cluster di rame. È stato possibile rivelare una contrazione della distanza fra i primi vicini in funzione delle dimensioni dei cluster. I risultati sono in buon accordo con il modello a goccia per il cluster che spiega la contrazione come dovuta a stress superficiale.

Donelli G. Le enteriti acute infantili. *Ann Ist Super Sanità* 1986;22:823-36.

Le enteriti acute in età infantile costituiscono ancor oggi un grave problema di sanità pubblica. Nei Paesi in via di sviluppo oltre un terzo dei decessi, nella fascia di età inferiore ai 5 anni, viene attribuito a tale patologia che rappresenta la maggiore causa di morbilità nell'età pediatrica. Nei Paesi industrializzati la patologia enterica acuta, pur responsabile di tassi di mortalità inferiori di oltre due ordini di grandezza a quelli sopra citati, rimane comunque la seconda causa di morbilità e mortalità nella prima infanzia. È in questo contesto che si colloca l'avvio, nel 1984, di un progetto di ricerca pluriennale dell'Istituto Superiore di Sanità sulla patologia gastroenterica, con particolare attenzione a quella in età infantile. All'attività di ricerca si è affiancata di recente una attività volta da un lato ad una sistematica raccolta ed elaborazione dei dati disponibili in Italia relativamente alla patologia gastroenterica acuta e cronica, dall'altro ad offrire l'Istituto stesso quale struttura di coordinamento, di supporto e di valorizzazione delle esperienze e competenze presenti nelle diverse regioni, sia a livello diagnostico-epidemiologico che a livello clinico-terapeutico. Viene presentato e analizzato un primo quadro dei dati fino ad oggi raccolti sulle enteriti acute infantili in Italia, sottolineando in particolare le principali indicazioni metodologiche ed operative che ne emergono, nonché le priorità di ricerca.

Donelli G, Paoletti L. La valutazione del significato sanitario della presenza di asbesto nell'ambiente. *Acqua Aria* 1986;9:955-8.

Per una valutazione del rischio associato all'esposizione ambientale all'asbesto si deve poter disporre delle seguenti informazioni: la concentrazione nell'ambiente, il tipo minerale e lo spettro granulometrico del particolato. La microscopia e le tecniche ad essa associate sono oggi le uniche che possano fornire precisi dati completi al riguardo. Le osservazioni in microscopia elettronica e trasmissione permettono infatti di ottenere lo spettro granulometrico; la diffrazione elettronica fornisce la struttura cristallografica del particolato; la microanalisi a raggi X mediante sonda elettronica consente l'analisi degli elementi chimici contenuti nel campione e quindi l'individuazione del tipo minerale. Nel Laboratorio di Ultrastrutture dell'Istituto Superiore di Sanità queste tecniche analitiche, messe a punto già da qualche anno, vengono attualmente utilizzate per lo studio di vari aspetti dell'inquinamento da asbesto.

Giangrande A, Donelli G, Caiazza S. Potenziale tossicità dei materiali di dialisi. Aspetti cronici della biocompatibilità. Editoriale. *G Ital Nefrol* 1986;3:75-80.

Majori G, Ali A, Donelli G, Tangucci F, Harkrider RJ. The occurrence of a virus of the Pox Group in a field population of *Chironomus salinarius* Kieffer (Diptera: chironomidae) in Italy. *The Florida Entomologist* 1986;69:418-21.

Manganaro M, Luparini MR, Barillari G, Rosati F, Malorni W, Arancia G. Survival decrease and morphological changes induced by lonidamine on cultured *Trypanosoma lewisi*. *IRCS Medical Science* 1986;14:33-4.

Orefici G, Molinari A, Donelli G, Paradisi S, Teti G, Arancia G. Immunolocalization of lipoteichoic acid on group B streptococcal surface. *FEMS Microbiol Lett* 1986;34:111-5.

The distribution of lipoteichoic acid (LTA) in a reference strain of group B streptococci was investigated by immuno-electron microscopy. Observations of unfixed and unembedded streptococci incubated with LTA-antibodies and protein A-gold complexes indicate that the lipoteichoic acid is located within the bacterial capsule. Gold particles were distributed all around the cell and apparently aggregated to form filament-like structures. Electron microscopic observations of capsular structure in thin sections of cells embedded after stabilisation with wheat germ agglutinin confirmed the location of LTA molecules within the bacterial capsule.

Pantosti A, Baldassarri L, Babudieri S, Borriello S, Gianfrilli P. Clostridi elicoidali simili al *Clostridium spiroforme*: nuovi patogeni intestinali? Comparazione tra un ceppo umano e ceppi di provenienza animale. *Ann Ist Super Sanità* 1986;22:1055-8.

Un clostridio di morfologia elicoidale simile al *C. spiroforme*, isolato dalle feci di una donna di 60 anni affetta da sindrome del colon irritabile, e due clostridi elicoidali isolati da conigli con diarrea da ampicillina, sono stati comparati sulla base di diverse caratteristiche. Il ceppo umano differisce dai ceppi di coniglio per la morfologia della superficie batterica e per la sua capacità emoagglutinante. I pattern biochimici e di resistenza agli antibiotici dei tre ceppi sono diversi. Il ceppo umano e uno dei ceppi di coniglio producono una tossina iota-like con effetto tossico su colture cellulari, neutralizzabile dall'antitossina contro il *C. perfringens* tipo E.

Paoletti L, Diociaiuti M, Picozzi P, Santucci S. Numerical simulation of kinematic diffraction by ultrathin granular films for structural parameter analysis. *Thin Solid Films* 1986;145:249-57.

The possibility of employing the standard inversion procedure of the diffraction pattern by a Fourier transform for the structural analysis of an ultrathin granular film was assessed. The study has demonstrated that a correct interpretation of the diffraction pattern can only be obtained with both a complete dimensional analysis of the film and the application of a diffraction simulation procedure permitting the fitting of a model to the data of the diffraction experiment.

Ruggeri FM, Fiorentini C, Caprioli A, Arancia G, Falbo V, Donelli G. Ep-2 cells multinucleation induced by an *E. coli* cytotoxic factor. *IRCS Med Sci* 1986;14:833-4.

Ruggeri FM, Marziano ML, Tinari A, Donelli G, Menichella D, Concato C, Caione D. Tipizzazione di stipiti di rotavirus da bambini con gastroenterite acuta a Roma. *Ann Ist Super Sanità* 1986;22:1071-4.

È stata studiata la diffusione dei rotavirus nelle diarree infantili a Roma. La circolazione di diversi stipiti virali è stata dimostrata mediante studio biochimico del genoma virale.

## 1987

Baldassarri L, Caprioli A, Donelli G. Adherence to and penetration of cultured cells by an invasive strain of *E. coli*: an ultrastructural study. *Microbiologica* 1987;10:317-23.

The penetration process of an enteroinvasive strain of *Escherichia coli* 0124 into HEp-2 cells has been studied by electron microscopy. Bacteria penetrated into cultured cells by a phagocytosis-like mechanism, and multiplied within the vacuoles as well as in the cytoplasmic matrix. On the whole, the infection cycle of EIEC appeared to be similar to that described for *Shigella*. The stain examined has also been found to elaborate a 40 nm-thick glycocalyx, which is probably involved in the recognition of host surface receptors and therefore in the attachment of microorganisms to the cell membrane.

Caiazza S, Fanizza C, Ferrari M. Possible role of perfluorochemical particles as drug delivery agents in liver. *Advances in Biomaterials*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam 1987;7:655-60.

Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Baldassarri L, Bisicchia R, Ippolito G, Romoli E, Donelli G. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J Clin Microbiol* 1987;25:146-9.

Two hundred and nineteen strains of *Escherichia coli* from extraintestinal infections and feces of healthy subjects were examined for hemolysin (Hly) and cytotoxic necrotizing factor (CNF) production and for mannose-resistant hemagglutination. Of 105 strains from extraintestinal infections, 42 (40.0%) were positive for production of both Hly and CNF, and 21 (20.0%) were positive for Hly alone; on the contrary, only 1 Hly- and CNF-positive strain and 2 Hly-positive strains were found among 114 strains from normal stools. CNF production was not found to occur among the nonhemolytic strains, confirming the close association existing between these toxic factors. Hemolytic strains positive for CNF showed mannose-resistant hemagglutination less frequently than did Hly-positive, CNF-negative strains (25.6 versus 82.6%), suggesting the existence of two distinct classes among hemolytic strains of *E. coli*.

De Crescenzi M, Diociaiuti M, Lozzi L, Picozzi P, Santucci S. Surface electron-energy-loss fine-structure investigation on the local structure of copper clusters on graphite. *Phys Rev B Condens Matter* 1987;35:5997-6003.

The lattice parameters of copper clusters deposited on graphite substrates were determined by surface extended energy-loss fine-structure measurements. The Fourier analysis of the fine structures beyond the M<sub>2,3</sub> copper edge shows a sizable lattice-parameter contraction when the cluster mean diameter  $\bar{d}$  decreases. This contraction amounts to 4.7% for the particles with  $\bar{d}=9$  Å. The contraction is linearly dependent on  $1/\bar{d}$ , which is why it was interpreted in terms of the liquid-drop model. Moreover, the observed strong enhancement of the Debye-Waller factor allowed us to estimate the decrease in melting point for small clusters. The sizable changes in the nearest-neighbor distance of our clusters are closely related to the change in the near-L<sub>2,3</sub>-edge features. Our results are in good agreement with recent density-of-state calculations for compressed Cu crystals.

De Martino C, Malorni W, Accinni L, Rosati F, Nista A, Formisano G, Silvestrini B, Arancia G. Cell membrane changes induced by Lonidamine in human erythrocytes and T lymphocytes, and Ehrlich ascites tumor cells. *Exp Mol Pathol* 1987;46:15-30.

Lonidamine, a derivative of indazol carboxylic acid, has been found to exert a powerful inhibitory effect on oxygen consumption and aerobic glycolysis of neoplastic cells through mechanisms yet to be defined. Recent freeze-fracture studies have shown that Lonidamine alters the distribution of intramembranous particles in the plasma membrane, suggesting that the cell membranes, rather than the energy metabolism, are the drug's primary target. The present study was carried out to further evaluate the effects of Lonidamine on cell membranes, using normal human erythrocytes and T lymphocytes and Ehrlich ascites tumor cells as cell models. These studies indicate that plasma and mitochondrial membranes are the primary site of the drug's action, though other cell membranes seem to be affected as well. Thus, Lonidamine inhibition of energy metabolism in nucleated cells reported in previous studies must be considered as a consequence of the structural damage of the inner and outer mitochondrial membranes, which in turn affects respiration and glycolysis and then cell viability.

Gentile G, Baldassarri L, Caprioli A, Donelli G, Venditti M, Avvisati G, Martino P. Colonic vascular invasion as a possible route of extraintestinal cryptosporidiosis. *Am J Med* 1987;82:574-5.

Malorni W, Formisano G, Molinari A. *In vitro* effects of 2,5 hexanedione on a melanoma cell line: a morphological study. *Toxicology* 1987;43:269-82.

The effect of 2,5 hexanedione (2,5 HD) on a cultured human melanoma cell line (JR8) was explored. The addition of the toxicant at noncytotoxic concentrations (0.08-0.16%) to the monolayers for 24 and 48 h, resulted in an irreversible inhibition of cell proliferation. Cessation of melanoma cell proliferation was accompanied by wide changes in morphological features of cells still adhering to the substrate. Incubation with the toxicant seemed to induce a differentiative process characterized mainly by a significant increase in cell protrusions. Melanoma cells, losing their bipolar appearance, often increased cell size and developed long dendritic and axon-like processes sometimes ramified in distal portions. Electron microscopic observations established that a change in the polarized appearance of control cells often occurred with 2,5 HD treatment and that a regular arrangement of organelles and cytoskeletal elements was detectable within these dendritic and axon-like protrusions. Furthermore, immunocytochemical

studies confirmed an involvement of microtubules and actin network within cell prolongations. After the differentiative process a necrotizing effect occurred, inducing a progressive loss of viable, dendritic cells after 4 or 5 days. Incubation with cyclic AMP was ineffective in control cells while after 2,5 HD treatment seemed to increase the survival rate of neuronal-like cells. Possible mechanisms for the growth inhibitory and differentiative effects of 2,5 HD were discussed.

Molinari A, Formisano G, Malorni W. Modification of the cell surface expression of histocompatibility antigens induced by the neurotoxin 2,5 hexanedione. *Cell Biol Toxicol* 1987;3:417-30.

Class I histocompatibility antigens (HLA) are expressed on the surface of almost all nucleated mammalian cells; the expression of this surface antigenic molecule may be changed or abrogated by several factors. In this paper, a modification in HLA expression in a human carcinoma cell line following exposure to the neurotoxicant 2,5 hexanedione is reported. This compound is known to produce a wide spectrum of subcellular pathological events; in this study, we describe an effect on the surface and cytoplasmic distribution of both light and heavy subunits of HLA antigens, demonstrated by immunocytochemical and immunoelectron microscopy techniques. Human carcinoma cells, which under normal growing conditions express the HLA, abrogate the surface expression of this glycoprotein after exposure to 2,5 hexanedione and an intracytoplasmic accumulation seems to occur. Several possibilities are discussed, such as an effect of the toxicant on the transport of the nascent glycoprotein.

Molinari A, von Hunolstein C, Donelli G, Paradisi S, Arancia G, Orefici G. Effects of some capsular components on pathogenicity of type IV and provisional type V group B streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 1987;41:69-72.

Recently, 2 new Group B Streptococcus (GBS) serotypes, IV and provisional V, have been described. To gain information on the relationship between pathogenicity and occurrence of some specific bacterial components, we studied the virulence in a mouse model, the ultrastructural aspect of type IV and V cells, and their sialic acid content. The new serotypes exhibited very low virulence for the mouse, similar to that found in GBS serotype III. The amount of sialic acid present on the bacterial surface (4.8 mg/g of bacterial cells in type IV and 1.8 mg/g in provisional type V) accorded well with this low virulence. When pretreated with type-specific antisera, a very thin and irregular layer of capsular material surrounded the cells in type IV, while a clearly defined capsule was observed in provisional type V.

Paoletti L, Batisti D, Caiazza S, Petrelli G, Taggi F, De Zorzi L, Dina MA, Donelli G. Mineral particles in the lungs of subjects resident in the Rome area and not occupationally exposed to mineral dust. *Environ Res* 1987;44:18-28.

We studied the inorganic particulate contained in the lung parenchyma of 10 subjects (5 males and 5 females) resident in an urban area and not occupationally exposed to dusts. A total of 17 mineral types were identified, along with 16 metal elements in the form of oxides and sulfides. Approximately 70% of the minerals were made up of phyllosilicates, in particular clay, mica, and talc; three metal elements, Fe, Al, and Ti, accounted for more than 75% of the recovered oxide particles. The mean concentration of the observed inorganic particles was approximately  $1.8 \times 10^5$  pp/mg dry tissue. No significant differences were observed in terms of total particulate concentration in the various areas of the lungs and between the right and left lung. Instead we observed a larger concentration of fibrous particles in the upper lobes. The analysis of the data made it possible to determine the presence of a high degree of correlation between

the concentrations of silicates and the concentrations of metal oxides and sulfides, implying the existence of a ubiquitous environmental source of these mineral particles. The frequent observation of tremolite fibers is remarkable. This finding, confirmed elsewhere, indicates that the magnitude of the sources of these fibers in the environment, constituted by contaminated talc dusts, has been underestimated until today.

Superti F, Seganti L, Ruggeri FM, Tinari A, Donelli G, Orsi N. Entry pathway of vesicular stomatitis virus into different host cells. *J Gen Virol* 1987;68:387-99.

A biochemical and morphological investigation of the mechanism of entry of vesicular stomatitis virus (VSV) into host cells of mammalian (HeLa), avian (CER), piscine (EPC) and arthropod (*Aedes albopictus*) origin, is described. VSV was capable of infecting all cell lines tested by an endosome- and/or a lysosome-dependent step since ammonium chloride and amantadine blocked the early stages of infection. Complement-dependent immune lysis of infected host cells provided evidence that in none of the four different cell types examined did insertion of VSV antigens occur from the outside to any great extent on the cell surface. When the entry process was studied by electron microscopy, virus particles were seen to be bound to the cell surface at 0 degrees C. After warming at 37 degrees C for homeothermic cells or at 26 degrees C for poikilothermic cells, virus was detected within coated pits and coated vesicles and, later, in lysosomes. VSV entry was seen to take place by endocytosis in all four cell lines, which were derived from phylogenetically unrelated species.

## 1988

Arancia G, Donelli G. Surface features of human lymphocytes. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1988;8:96-102.

Arancia G, Malorni W, Crateri Trovalusci P, Isacchi G, Giannella G, De Martino C. Differential, effect of Lonidamine on the plasma membrane ultrastructure of normal and leukemic human lymphocytes. *Exp Mol Pathol* 1988;48:37-47.

The effect of Lonidamine on the plasma membrane ultrastructure of normal and leukemic human peripheral blood lymphocytes (hPBL) was studied by freeze-fracture electron microscopy. Lonidamine induces remarkable changes in the intramembrane particle distribution on both fracture faces of the plasma membrane as well as of the intracytoplasmic membranes. In particular, a dose-dependent clustering of intramembrane particles was observed in all cell types examined, i.e., normal T and B lymphocytes, T cells from acute lymphoblastic leukemia, and B cells from chronic lymphocytic leukemia, though to a different extent. Normal T lymphocytes appear to be the most sensitive to the action of the drug, while corresponding B cells are much less affected. As regards leukemic cells, in T lymphoblasts the ultrastructural membrane changes are lower than in normal T lymphocytes, whereas leukemic B cells show the same low response to Lonidamine treatment as their normal counterpart. Such a differential effect may be explained by the different membrane molecular organization displayed by normal T and B lymphocytes and by normal and leukemic cells. Moreover, the extent of the ultrastructural modifications at the plasma membrane level, correlates well with literature data on the inhibition of the aerobic glycolysis induced by Lonidamine on the different lymphoid cell types. These findings seem to further confirm that cell membranes are the primary targets of Lonidamine action.

Arancia G, Molinari A, Crateri P, Calcabrini A, Silvestri L, Isacchi G. Adriamycin-plasma membrane interaction in human erythrocytes. *Eur J Cell Biol* 1988;47:379-87.

A great body of data increasingly point to the cell membrane as an important target for adriamycin (ADR). However, the exact mechanism by which ADR exerts its cytotoxic action through the interaction with the plasma membrane is still unknown. In this study, the interaction of ADR with red blood cells from healthy donors was investigated by freeze-fracturing (FF) and scanning electron microscopy (SEM). The results obtained can be summarized as follows: a) a dose-dependent modification in the intramembrane particle (IMP) distribution was revealed by FF on both fracture faces of the plasma membrane of erythrocytes treated with 50 or 100 microM ADR; b) SEM observations allowed to reveal a discocyte-stomatocyte transition induced by 50 microM ADR and the formation of mottled cells at the higher dose; c) these morphological and ultrastructural changes were not related to lipid peroxidation as demonstrated by experiments with radical scavengers or strong oxidant substances; d) the analysis of IMP density seemed to rule out a segregation process of membrane proteins suggesting that ADR interacts with the plasma membrane by becoming incorporated within the lipid bilayer.

Arancia G, Trovalusci P, Malorni W, Donelli G. Comparative freeze-fracture study between normal and leukemic lymphocyte plasma membrane. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1988;8:103-8.

Barsotti P, Malchiodi Albedi F, Fabrizi E, Marinozzi V. Ultrastructural localization of sulphate glycoconjugates in the human glomerular capillary wall using the high iron diamine method. *J Submicroscop Cytol Pathol* 1988;20:549-56.

The distribution of fixed anionic sites within glomerular capillary walls has been studied in man by applying two ultrastructural histochemical methods--the high iron diamine and dialysed colloidal iron methods--to tissue chopper sections and to isolated glomeruli obtained from surgical fragments of renal tissue. By using the high iron diamine method we have been able to demonstrate that in man, too, there are sulphate (possibly heparan sulphate proteoglycan) sites preferentially located in the lamina rara esterna of the basement membrane and in the cell coat of the urinary surface of podocytes. Non-sulphate (high iron diamine-negative, dialysed colloidal iron-positive) anionic sites have been identified not only in the glycocalyx of the epithelial and endothelial cells but also in the laminae rarae of the basement membranes, where they show a more extensive distribution pattern than sulphate sites. The proposed methods seem particularly suitable for the study of human renal tissue; they could, in fact, provide useful information about the behaviour of the various anionic components of the glomerular capillary wall in pathological conditions.

Buonavoglia C, Di Trani L, Di Pasquale R, Tinari A, Ruggeri FM, Galassi D. Sui recenti episodi di mortalità nei conigli in Italia. Nota preliminare. *Selezione Veterinaria* 1988;29:1509-10.

Caiazza S, Colangelo P, Taruscio D, Ciaralli F, Pintucci S. Studio della osteointegrazione di un tessuto di Dacron. *Biomateriali* 1988;2:61-4.

In vista dell'uso di un tessuto di Dacron quale componente biointegrabile di un supporto rigido per implantologia dentale, se ne è studiata l'integrazione nell'osso mandibolare di coniglio, a distanza di 1-3 mesi dalla sua inserzione sotto forma di tassello. È stato verificato, tramite osservazioni in microscopia ottica ed in microscopia elettronica a trasmissione ed a scansione unite a microanalisi a raggi X, che la osteointegrazione delle fibre di Dacron costituenti il tessuto è già in stadio avanzato dopo un mese dall'inserzione e che il tessuto è completamente permeato da osso neoformato dopo tre mesi. I risultati dello studio consentono di considerare realistica la prospettiva di uso prevista per tale biomateriale nel dispositivo impiantabile.

Caiazza S, Fanizza C, Ferrari M. Ultrastructural aspects and clinical implications of PFC/non phagocytic cell interaction. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:485-93.

Many *in vivo* studies showed the accumulation of PFC particles in reticuloendothelial cells of target organs such as spleen, lungs and liver. Surprisingly, an uptake of PFCs particles by liver parenchymal cells as well was described by some authors. In order to clarify whether Kupffer cells and/or liver environmental factors could be involved in particle uptake we exposed cultured rat hepatocytes to Fluosol 43. PFC particles were noted, after a 3-hour incubation, in lysosomes. This result suggests that more attention must be paid to liver toxicity of PFC blood substitutes. Isolated mouse myocytes were exposed as well to Fluosol 43 for 3 hours. Preliminary results confirm the absence of the particle uptake previously noted also in our *in vivo* studies on rat and guinea pig heart-lung preparation. The possible subsequent absence of cytotoxicity at myocardial level could underline the reliability of using optimized PFCs as components of cardioplegic solutions in open heart surgery.

Caiazza S, Fanizza C, Mazziotti I, Pintucci S, Tomaino MA. Light and scanning electron microscopy evaluation of the Dacron felt as the haptic part of an improved keratoprosthesis. An *in vitro* and *in vivo* study. *Clin Mater* 1988; 3:33-40.

The artificial cornea (keratoprosthesis) is indicated in severe ocular diseases not amenable by means of a corneal transplant. In order significantly to reduce the number of the failures due to the epithelization of keratoprosthesis implants, an improved device with a Dacron haptic part has been developed. The light (LM) and scanning electron microscopy (SEM) observations showed that the Dacron felt is ingrown by ocular tissues, *in vitro* and *in vivo*. Fibrous connective tissue stops the epithelial proliferation around the prosthesis by contact inhibition, thus avoiding its encapsulation and/or extrusion. These results may be predictive of the new keratoprosthesis reliability.

Caiazza S, Giangrande A, Cantù P, Castiglioni A, Paoletti L, Donelli G. Particle migration from haemodialysis circuit: electron microscopy and microprobe analysis. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:721-9.

It has been recognized that storage inflammation in organs of uraemic patients is due to silicone particle migration from tubing segments of the haemodialysis circuit to blood. Nevertheless, iatrogenic storage of foreign material containing Si has been also observed in long-term dialysis patients which, in our Unit, used only PVC or PU-PVC tubings. The origin and the nature of the particulate has been investigated *in vivo* and *in vitro* on bioptical samples as well as on cuprophane dialyser and PVC tubing eluates. This study carried out by means of TEM, SEM and microprobe EDS revealed the presence of variously shaped material and particles containing Si in bioptical samples and in eluates. Si containing contaminants were not demonstrated in eluates filtered in absence of the dialyser. This result suggests that leachable products can result from the dialyser and that such release can be an additional risk for uraemic patients.

Ciranni Signoretti E, Dell'Utri A, Paoletti L, Batisti D, Montanari L. Parenteral solutions: nature of particulate matter. *Drug Dev Ind Pharm* 1988;14:1-12.

An investigation on the level and nature of particulate contamination in 36 large volume injectable solutions produced in Italy was performed, using Scanning Electron Microscopic (SEM) and X-ray microanalytic (EDS) techniques. Wide variability of the contaminant level, even within each individual batch, was observed. About

20% of the samples revealed a considerable amount of contaminants greater than 20 µm. Fibers of presumably textiles, cellulose or plastic materials were detected. Other particulate matter, from manufacturing and packaging processes, were observed.

Donelli G, Ruggeri FM, Tinari A, Marziano ML, Menichella D, Caione D, Concato C, Rocchi G, Vella S. A three-year diagnostic and epidemiological study on viral infantile diarrhoea in Rome. *Epidemiol Infect* 1988;100:311-20.

Rotavirus infection was demonstrated in 168 (29.3%) of 573 children hospitalized for acute diarrhoea in Rome between January 1982 and December 1984. Laboratory diagnosis of these infections was made by transmission electron microscopy and enzyme immunoassay techniques with an overall agreement of 91.3%. Astroviruses, adenoviruses and small round viruses were detected in the faeces of 36 patients (6.4%). Whereas in 1982 rotavirus positive patients were clustered in the winter and following spring, in the following years cases were recorded all year round. The median age of patients with rotavirus infections was 17, 10 and 11.5 months in 1982, 1983 and 1984, respectively. In addition, a smaller number of rotavirus positive cases were admitted in 1983 when compared to those admitted during the previous as well as the subsequent years. It is suggested that a herd immunity was induced in the population by epidemic spread of rotavirus in the first half of 1982.

Fiorentini C, Arancia G, Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Donelli G. Cytoskeletal changes induced in HEp-2 cells by the cytotoxic necrotizing factor of *Escherichia coli*. *Toxicon* 1988;26:1047-56.

The effect of the cytotoxic necrotizing factor of *Escherichia coli* on HEp-2 cells was studied by fluorescence and scanning electron microscopy. This cytotoxin, known for inducing the formation of giant multinucleated cells in several cell lines, caused changes in actin and tubulin organization. The presence of membrane ruffles at the cell border and of numerous thick bundles of actin crossing the cell body, suggests that the factor promotes cell spreading; this probably interferes with cytokinesis, ultimately leading to the formation of very large flattened multinucleated cells. Moreover, the nuclear segmentation observed in treated cells seems to be associated with a rearrangement of actin in the perinuclear region and with the presence of tubulin bundles in proximity to nuclear clefts. Although the primary target is still unknown, these findings suggest that the cytoskeleton is affected accounting for the multinucleation process induced by the factor.

Malchiodi Albedi F, Cassano AM, Ciaralli F, Donelli G, Giuliani A, Mingazzini P, Marinozzi V. Influence of cetylpyridinium chloride on the ultrastructural appearance of sulphated glycosaminoglycans in human colonic mucosa. *Histochemistry* 1988;89:397-401.

The effect of adding cetylpyridinium chloride to the fixative on the preservation of sulphated glycosaminoglycans (SGs) was studied in human normal colonic mucosa. SGs were visualized at the ultrastructural level through the application of Spicer's High Iron Diamine (HID) technique followed by a post-fixation with potassium ferrocyanide-reduced osmium tetroxide. SGs were mainly localized in basement membranes of epithelium and capillary wall and along collagen fibers. The morphology of the reactive sites depended on the presence of cetylpyridinium chloride, SGs being granular

in absence of the salt and more or less elongated when cetylpyridinium chloride was added to the fixative. We suggest that the use of cetylpyridinium chloride during fixation may help to preserve SG molecule at the ultrastructural level.

Malorni W, Arancia G, De Martino C, Nista A, Accinni L, Masella R, Cantafora A. On the mechanism of action of Lonidamine: a study on human erythrocyte membrane. *Exp Mol Pathol* 1988;49(36):1-372.

The incubation of human erythrocytes with increasing levels of the antineoplastic drug Lonidamine clearly indicated a dose-dependent effect on the lipid composition of the plasma membranes. A selective transfer of phosphatidylcholine and cholesterol from membrane to incubation medium and the consequent enrichment in phosphatidylethanolamine of the membrane itself was observed. Moreover, the membranes were found to contain increasing levels of the drug which was incorporated at a constant membrane/medium partition ratio. The changes in composition appeared to be consistent with morphological alterations observed by scanning and freeze-fracture electron microscopy demonstrating changes in cell shape, the presence of numerous intracellular vesicles, and a membrane protein rearrangement. The analysis of intact red cells by nuclear magnetic resonance ruled out the possibility that the alterations described above could be due to an ATP depletion. This further confirmed that cell membranes were the primary target of the Lonidamine action, the previously described energy metabolism impairment being a consequence of a selective damage of cellular membranes, probably originating from the incorporation of the drug into the lipid bilayer.

Malorni W, Formisano G, Iosi F. *In vitro* effects of styrene on cytoskeletal apparatus an immunocytochemical study. *Drug Chem Toxicol* 1988; 11:419-31.

Styrene is known as an organic solvent implicated in neurological disorders occurring in exposed workers. Our studies were focused on the effects of styrene on the cytoskeletal apparatus, involved in several toxic neuropathies. The cultured cells were considered as living systems useful to investigate the mechanisms of cytotoxicity. Preliminary results reported here were obtained on two different epithelial cell lines (CG5 and HEp-2) by immunocytochemical methods. Treatment with styrene at 0.04% and 0.08% for 24 and 48 hours, induced changes in cytoskeletal elements. In particular, styrene seemed to induce a decrease in number of cells adhering to the substrate and some alterations in microtubule assembly. Moreover, a rearrangement of the keratin filaments was observed while styrene did not seem to induce noticeable changes in actin filament network. Data obtained seem to confirm *in vitro* studies as a useful tool in toxicity assessment of xenobiotic compounds at subcellular levels.

Martino P, Gentile G, Caprioli A, Baldassarri L, Donelli G, Arcese G, Fenu S, Micozzi A, Venditti M, Mandelli R. Hospital acquired Cryptosporidiosis in a bone marrow transplantation unit. *The Journal of Infectious Diseases* 1988; 158:647-8.

Molinari A, Donelli G. Structure and physiopathology of human eosinophils. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1988;8:25-32.

Molinari A, Orefici G, Donelli G, Von Hunolstein C, Paradisi S, Arancia G. Preservation of capsular material of streptococcal cells by specific lectins determined by immunoelectron microscopy. *Histochem J* 1988;20:526-30.

We describe the use of lectins as specific stabilizing agents for the polysaccharide capsular components of two Gram-positive bacteria, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus bovis*. Treatment of bacterial suspensions with wheatgerm agglutinin and concanavalin A allowed better morphological preservation as well as immunoelectron microscopic localization of a capsular component (lipoteichoic acid) by employing specific antibodies and the protein A-gold technique. Data obtained indicate that lectins are useful agents in preserving highly water-soluble capsular components during the electron microscopy procedures for both unembedded and embedded samples.

Molinari A, Rosati F, Donelli G, Santini G, Sorice F, De Simone C. Expression of receptors for C3b and IgG-Fc in human eosinophil subpopulations. *EOS J Immunol Immunopharmacol* 1988;8:42-6.

Sirianni MC, Soddu S, Malorni W, Arancia G, Aiuti F. Mechanism of defective natural killer cell activity in patients with AIDS is associated with defective distribution of tubulin. *J Immunol* 1988;140:2565-8.

Previous studies have demonstrated the importance of some cytoskeleton components in killing mechanisms. In fact, a microtubule and microfilament (MF) rearrangement in the lytic sequence of CTL and NK cells has been observed. In particular, MF seem to be related to the binding phase, because MF inhibitors suppress the binding of NK cells to the target, whereas microtubule inhibitors suppress only the killing phase. In this paper, the distribution of two cytoskeleton components, actin and alpha- and beta-tubulin, has been studied in PBL from AIDS patients, who maintain the capacity to bind to the target cell line K562 but are not able to kill it. PBL were labeled with mAb to these two cytoskeleton components, and then indirect immunofluorescence was used to visualize their distribution in the conjugates. A normal polarization of actin in the effector PBL was found, whereas no tubulin rearrangement was evident in the effector and target cells. On the contrary, in conjugates of PBL or large granular lymphocytes from normal donors and K562, a polarization of actin in the effector cell and a polarization of tubulin both in the effector and in the target cells, at the site of the attachment, was evident. These data suggest that a deficiency of tubulin rearrangement may underlie the inability of the NK cells from AIDS patients to kill their target.

Zupi G, Marangolo M, Arancia G, Greco C, Laudonio N, Iosi F, Formisano G, Malorni W. Modulation of the cytotoxic effect of 5-fluorouracil by N-methylformamide on a human colon carcinoma cell line. *Cancer Res* 1988;48:6193-6200.

The cytotoxic effect of the combination of N-methylformamide (NMF) with 5-fluorouracil (5-FU) on cell survival of the human colon cancer line HT29 was assessed. The differentiating activity of NMF was evidenced by morphological maturation and conversion of cell culture characteristics to those consistent with a more benign phenotype. In combination experiments, the noncytotoxic concentration of 1% NMF was chosen and doses of 5-FU ranging from 5 to 25 micrograms/ml were employed. Two main schedules were tested either on exponentially or stationarily growing cells: (a) 1% NMF for 72 h followed by 12-h exposure to 5-FU; (b) 5-FU for 12 h followed by 72-h exposure to 1% NMF. The results obtained demonstrated that the 5-FU----NMF sequence determined a powerful reduction in the surviving fraction of HT29 cells, while the reverse sequence did not increase the killing effect of 5-FU given alone. Immunocytochemical and scanning electron microscopy studies seemed to confirm that the association in which the differentiating agent followed the 5-FU treatment strongly impaired cellular integrity and function and that cytoskeletal elements, particularly microfilaments, and

surface structures could play an essential role in the mechanisms of cytotoxicity. Furthermore, the results of this work indicate that drug sequence is a critical factor for the optimal combination of 5-FU and NMF.

### 1989

Arancia G, Crateri Trovalusci P, Mariutti G, Mondovì B. Ultrastructural changes induced by hyperthermia in Chinese hamster V79 fibroblasts. *Int J Hyperthermia* 1989;5:341-50.

The effects of hyperthermic treatment on some intracellular components and on the general morphology of Chinese hamster V79 fibroblasts have been studied. After 1 h of heating at 42 degrees C cells show small interruptions of the plasma membrane, dilation of the mitochondrial cristae and dissociation of the polyribosomes. These modifications become progressively more pronounced after 1 or 3 h treatment at 43 degrees C. Severe alterations in the general morphology of the cells are evident after 1 h heating at 45 degrees C.

Arancia G, Malorni W, Iosi F, Grossi CE, Zarcone D, Donelli G. An SEM analysis of the interaction between lymphokine-activated killer cells and tumor targets. *Int J Cancer* 1989;4(suppl.):58-61.

The interaction between lymphokine-activated killer (LAK) cells and two types of target cells with different susceptibility to natural killer (NK) activity was investigated by scanning electron microscopy (SEM). In NK-susceptible tumor cells (K562) a different mode of conjugation with the effector was observed as compared with NK-resistant targets (THP-1-0). In LAK-K562 pairs, the contact region was characterized by the presence of long microvilli, blebs and ruffled membranes forming an intertwined and interdigitated binding site. Conversely, when LAK cells were conjugated with THP-1-0 cells, the surface structures of the target cell did not undergo significant modification and the interacting cells did not appear to establish close contact. In addition, cell lysis of the sensitive target was often characterized by plasma membrane blebbing, leading to cell death. In contrast, in the low percentage of resistant targets which underwent lysis after conjugation, cell death always occurred without formation of bulb- or bleb-like structures.

Baldassarri L, Pantosti A, Caprioli A, Mastrantonio P, Donelli G. Haemagglutination and surface structures in strains of *Clostridium spiroforme*. *FEMS Microbiol Lett* 1989;60:1-4.

Five strains of *Clostridium spiroforme* were examined for their surface properties. All strains were able to agglutinate human erythrocytes. Electron microscopy showed a ruthenium red-positive capsule mediating the attachment of bacteria to erythrocytes. Two strains, showing the lowest degree of haemagglutination, exhibited an additional external layer of filamentous structures, possibly interfering with the agglutinating activity. In spite of their agglutinating ability, the *C. spiroforme* strains did not show surface hydrophobicity, thus suggesting the possible existence of a new type of clostridial adhesion.

Baldassarri L, Pantosti A, Caprioli A, Mastrantonio P, Donelli G. Ultrastructural observations in *Clostridium spiroforme*. *Microecol Ther* 1989;18: 271-4.

Two toxigenic strains of *Clostridium spiroforme*, one isolated from a human subject and another from a rabbit, were studied by transmission electron microscopy. Both strains showed unusual cytoplasmic lamellar structures which might be involved in the main-

taining of the curved shape of the microorganism. Single cells were shown to remain joined end-to-end after fission giving rise to the helically coiled forms. A ruthenium red positive extracellular layer was present in both strains whereas additional filamentous structures were seen on the surface of the rabbit strain only. Both strains were able to agglutinate human erythrocytes at different degrees, probably due to the observed difference in surface structures.

Caprioli A, Falbo V, Minelli F, Famiglietti M, Donelli G. Production of hemolysin and cytotoxic necrotizing factor by uropathogenic *Escherichia coli* belonging to different serogroups. *Microecol Ther* 1989;18:335-8.

We examined the relationship between serotype and cytotoxic necrotizing factor production in 117 hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. The 89 strains producing both hemolysin and CNF belonged to seven serogroups and 58 of them (67%) were of serogroup O4 and O6. The 28 *E. coli* producing Hly only belonged to 4 different O groups, serogroups O18ac accounting for 78% of strains examined. Generally, CNF+ and CNF- hemolytic isolates were assigned to different O serogroups, with the exception of O6 strains, often present in both group. Serological typing further confirms that hemolytic isolates of *E. coli* may grossly be divided into two main populations on the basis of the ability to produce CNF. Examination of hemolytic *E. coli* for this property may also be useful to achieve a more detailed characterization of pathogenic clones.

Caprioli A, Falbo V, Ruggeri FM, Minelli F, Orskov I, Donelli G. Relationship between cytotoxic necrotizing factor production and serotype in hemolytic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989;27:758-61.

We examined the relationship between serotype and cytotoxic necrotizing factor (CNF) production in 123 hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from both stools and extraintestinal infections. Of 76 strains producing both hemolysin (Hly) and CNF, 66 (87%) belonged to one of six serogroups (O2, O4, O6, O22, O75, and O83). In contrast, 47 *E. coli* strains producing Hly only belonged to 21 different O serogroups, and only 2 of these (O6 and O18ac) were widely represented. Generally, CNF-positive and CNF-negative hemolytic isolates were assigned to different O serogroups, with the exception of O6, often present in both categories of isolates. Serogroups O4 and O18ac were significantly more prevalent among strains from extraintestinal infections than among those from stools. In contrast, the Hly-positive, CNF-negative isolates, belonging to numerous less common serogroups, were hardly ever isolated from extraintestinal infections. Serological typing further confirmed that hemolytic isolates of *E. coli* may grossly be divided into two main populations on the basis of the ability to produce CNF. Examination of hemolytic *E. coli* for this property may also be useful in achieving a more detailed characterization of pathogenic clones.

Caprioli A, Gentile G, Baldassarri L, Bisicchia R, Romoli E, Donelli G. Cryptosporidium as a common cause of childhood diarrhoea in Italy. *Epidemiol Infect* 1989;102:537-40.

*Cryptosporidium* oocysts were observed in the stools of 9 (7.2%) of 124 Italian children with diarrhoea, examined during the period 1 January-31 December 1984. In two children, the parasite was associated with other enteric pathogens. The duration of diarrhoea was 2-30 days, with a median of 6 days. In all cases the infection was self-limiting. The mean age of the *Cryptosporidium*-positive children was 34 months, and all cases occurred in the warm season. *Cryptosporidium* was found to be the third most common enteric pathogen after rotavirus and *Salmonella* spp.

Castellani Pastoris M, Collins MT, Baldassarri L, Maggio A. An unusual strain of *Legionella micdadei*. *J Clin Microbiol* 1989;27:158-61.

A microorganism antigenically identified as *Legionella micdadei* but showing a cellular fatty acid profile distinct from that described previously for this species and more similar to that of *L. bozemanii* has been studied by phenotypic characterization, crossed immunoelectrophoresis, gas-liquid chromatography, and transmission electron microscopy. Although the phenotypic characters, the crossed immunoelectrophoresis, and the ultrastructural features were similar to those of *L. micdadei*, the fatty acid composition differed significantly from this species; moreover it differed also from *L. bozemanii*, even though it was quantitatively more similar.

De Simone C, De Marco F, Arancia G, Tzantzoglou S, Paradisi S, Sorice F. Influence of methisoprinol (Isoprinosine) on HIV-infected human lymphocytes: *in vitro* immunological, virological and ultrastructural studies. *J Clin Lab Anal* 1989;3:26-33.

Methisoprinol (isoprinosine) is a synthetic compound with reported antiviral and immunomodulating properties. Results of the present study showed that methisoprinol at concentrations greater than or equal to 200 micrograms/ml reduces the p24 and gp120 viral antigen expression on the surface of human immunodeficiency virus (HIV)-infected lymphocytes and the reverse transcriptase levels. In addition, cell viability, the number of the CD4+ cells, and the CD4+/CD8+ cell ratio are higher in methisoprinol-pretreated cell suspensions than in untreated HIV-infected cell cultures. A quantitative freeze-fracture study on the density of the intramembranous particles (IMP) present on both fracture faces of the plasma membrane of lymphocytes has shown that pretreatment with methisoprinol induces a different molecular organization resulting in a nearly three times increase of IMP density.

Diociaiuti M, Picozzi P, Santucci S, Paoletti L. The crystalline structure of ultrathin Au granular films. *Thin Solid Films* 1989;173:67-75.

Researchers generally imagine a granular metal film as being constituted by a single type of stable spherical shaped particles with a mean diameter  $\bar{d}$ . Indeed, even the most homogeneous films are made up by particles of various diameters  $d$  with different shapes and with stable or unstable crystalline structure. Recently, it has been shown that gold particles of diameter of 2 nm are in a "quasi-solid" state. In this paper the authors show the experimental results we obtained by selected area electron diffraction (SAED) from ultrathin ( $\bar{d} < \text{nm}$ ) gold films. The authors show that with gold particles of mean diameter less than 3 nm and electrons of 250keV, the dynamic effects can be neglected and the kinematic theory can be used in the data analysis. The authors conclude that, for films with  $\bar{d} > 1.5 \text{ nm}$ , SAED data can be well interpreted by means of a simple phenomenological model of the particles taking into account the effect on the diffraction patterns due to the particle size distribution. On the contrary, SAED data obtained from films of  $\bar{d} < 1.5 \text{ nm}$  are in disagreement with the same model suggesting the occurrence in these films of "quasi-solid" particles.

Donelli G, Gentile G, Caprioli A, Baldassarri L, Martino P, Mandelli F. Cryptosporidiosis in patients with haematologic malignancies in Rome: results of a two-year survey and case-report of a pulmonary infection. *Microecol Ther* 1989;18:57-63.

In 1986-1987, we have examined 294 patients with haematologic malignancies attending the Department of Haematology of the University of Rome and 47 patients undergoing bone marrow transplantation for *Cryptosporidium* infections. *Cryptosporid-*

*ium* oocysts in faeces were found in 9 of 63 patients with diarrhoea (17.5%) and in 3 of 231 patients without enteric symptoms (1.3%). In 4 patients diarrhoea was prolonged (23-71 days), with dehydration and weight loss (> 5 kg). Two of these patients died, although the deaths could not be directly attributable to cryptosporidiosis. One of these patients also developed a pulmonary infection by the parasite. Cryptosporidiosis was less severe in 10 patients, whose diarrhoea resolved completely within two weeks. Asymptomatic carriage of the parasite was observed in 4 patients and lasted up to 31 days. These findings indicate that cryptosporidiosis is not an uncommon complication in patients with haematologic malignancies. The clinical spectrum of this syndrome include not only life-threatening infections usually occurring in patients with AIDS, but also mild infections and even asymptomatic carriage of the parasite. Rapid identification of asymptomatic carriers might be useful to prevent nosocomial infections.

Fiorentini C, Arancia G, Paradisi S, Donelli G, Giuliano M, Piemonte F, Mastrantonio P. Effects of *C. difficile* toxin A and B on cytoskeleton organization: a comparative morphological study. *Toxicon* 1989;27:1209-18.

A comparative study on the effects of toxin A and toxin B from *Clostridium difficile* on HEP-2 cells was carried out. Both toxins caused cell retraction and rounding and seemed to exert their effect on cell morphology via a rearrangement of actin and alpha-actinin microfilaments. Such a rearrangement occurred at an early stage, when no change in microtubular and cyokeratin systems was detectable. Nevertheless, several structural modifications accompanying the cytopathological process induced by toxins A and B appeared to be quite different. In particular, toxin B-treated cells showed an arborized phenotype as a result of cell retraction and rounding, whereas toxin A caused cell rounding without arborization. Moreover, nuclear polarization following disorganization of the microfilament system was only observed in toxin A-treated cells. The structural features distinguishing intoxication processes induced by the two toxins probably reflect a different mechanism of action and suggest the presence of a distinct subcellular component as a primary target for each toxin.

Fiorentini C, Paradisi S, Malorni W, Donelli G, Piemonte F, Giuliano M, Mastrantonio P. Cytoskeletal changes in cultured cells induced by toxin A from *C. difficile*. *Microecol Ther* 1989;18:213-6.

The cytopathogenic effect of toxin A from *Clostridium difficile* on mouse fibroblasts in primary culture, rat myogenic cells and a human epithelial cell line were investigated. In all cell types considered, toxin A induced the same cell changes represented by cell retraction, cell rounding and nuclear displacement. Our data suggest that these changes could mainly ascribed to an impairment of some cytoskeletal elements.

Malchiodi Albedi F, Cassano AM, Ciaralli F, Taruscio D, Donelli G. Ultrastructural identification of sulphated glycoconjugates in the Golgi apparatus in human colonic absorptive cells. *Histochemistry* 1989;92:73-9.

The subcellular localization of sulphated glycoconjugates was determined at the ultrastructural level by using the high iron diamine (HID) technique for sulphate groups in the absorptive cells of human colonic mucosa. Stained material was observed on the apical plasma membrane, in intracytoplasmic vesicles and in the Golgi complex. In this organelle, the last two or three cisternae of the trans side and the trans-Golgi network (TGN) were labelled, as well as a variable number of coated and noncoated vesicles facing the trans side and surrounding trans-Golgi network. These findings point to the trans side of the Golgi apparatus and trans-Golgi network as the subcompartments functionally involved in the sulphation of glycoconjugates.

Malchiodi Albedi F, Ciaralli F, Taruscio D, Giuliani A. Ultrastructure of the absorptive cell glycocalyx in hyperplastic colonic polyps after staining with Alcian Blue and high iron diamine. *Histochem J* 1989;21:285-8.

The glycocalyx of absorptive cells in large intestinal hyperplastic polyp was characterized histochemically at the electron microscope level by the use of the Alcian Blue pH 2.5 and high iron diamine techniques with the aim of comparing their ability in preserving the fine reticular network of the structure. Both the reagents stained glyco-calyx, indicating the presence of sulphated acidic glycoconjugates. However, they showed different degrees of condensation of the reactive sites. Alcian Blue preserved its filamentous appearance better.

Malorni W, Arancia G, Iosi F, Donelli G, Zarccone D, Moretta A, Grossi CE. A scanning electron microscopy analysis of human cytotoxic cell subsets and of their mode of conjugation with tumor cell targets. *Scanning Microsc* 1989;3:919-27.

In this study we describe the surface features of non-MHC (Major Histocompatibility Complex)-restricted cytotoxic cells isolated from human peripheral blood. Purified populations of CD3-, natural killer (NK) cells were allowed to interact with NK-sensitive (K562) and NK-resistant (THP-1-0) tumor cell targets. The type of effector to target cell binding was investigated by scanning electron microscope (SEM) analysis. A different interaction with the effectors is described for NK-resistant targets in comparison with NK-susceptible tumor cells. SEM was also used to investigate the relationship between interleukin 2 (IL2)-activated cytotoxic cells (lymphokine-activated killer, LAK, cells) and the tumor targets. We also describe the unique growth features of certain clones of cytotoxic T cells expressing gamma delta antigen receptors which support the contention that these cells may have a special ability of homing into tissues. We conclude that non-specific cytotoxic cells constitute a diverse population of effectors which differ not only for the expression of surface antigens, but also for their ability to interact with tumor cell targets and to home into the peripheral tissues where they may exert their lytic functions.

Malorni W, Fiorentini C, Paradisi S, Donelli G, Piemonte F, Giuliano M, Mastrantonio P. Cell surface blebbing induced by toxin B from *C. difficile*: an *in vitro* study. *Microecol Ther* 1989;18:185-8.

Toxin B from *Clostridium difficile* has been reported to be able to induce morphological and structural changes in cultured cell systems. In this study we describe the cytopathological effects of toxin B on the surface morphology and on the cytoskeleton of cultured HEP-2 cells. The main changes are represented by cytoplasm reaction, cell rounding and the formation of bulb-like structures on the plasma membrane. The blebbing phenomenon may be related to modifications of the microfilament system. In intoxicated cells showing surface blebs the actin was positive in the cytoplasm but completely absent in these surface structures. Our observations on the blebbing phenomenon induced by toxin B can provide further evidence that cytopathological mechanisms underlying cell injury could be ascribed to an impairment of cytoskeletal apparatus.

Malorni W, Formisano G, Donelli G. Morphological differentiation induced *in vitro* by 2,5 hexanedione. *In vitro Cellul Dev Biol* 1989;25: 82-90.

The effects of 2,5 hexanedione (2,5 HD), a metabolite of n-hexane, were investigated in different *in vitro* systems. A human mammary carcinoma cell line, a human melanoma

cell line, and fetal mouse neuronal cells in primary culture were considered. Light and electron microscopic observations demonstrated clearly that changes in cell proliferation can be detected. Furthermore, morphologic differentiative phenomena characterized by a noticeable increase in cell protrusions and dendriticlike processes can occur. Differences in the features of these processes were also detected between the different cell lines. These data can indicate non-neuronal cells as possible further targets of the toxicant. The possibility could be hypothesized that toxic neuropathies are generalized disorders, being neuronal system exceptionally vulnerable to 2,5 HD. Moreover, results obtained suggest that the sensitivity of *in vitro* systems could represent a useful tool in studying the mechanisms of action of the neurotoxicant 2,5 HD.

Malorni W, Iosi F, Formisano G, Arancia G. Cytoskeletal changes induced *in vitro* by 2,5-hexanedione: an immunocytochemical study. *Exp Mol Pathol* 1989;50:50-68.

The effects of 2,5-hexanedione, the main metabolite of the solvents hexane and methyl butyl ketone, have been explored in different *in vitro* epithelial (CG5 and HEP-2) and melanoma (JR8) cells by means of immunocytochemistry and electron microscopy. The administration of the toxicant to the cell monolayers at noncytolytic concentrations for 24 and 48 hr exerted several effects on the cell lines studied. Most epithelial and melanoma cells detached from the substrate were in the mitotic phase, whereas cells adhering to the substrate showed time-dependent organelle changes. In fact, after treatment with 2,5-hexanedione, mitochondria appeared swollen, with distorted cristae and rarefied matrix; changes in intracytoplasmic vesicles were also detected. Cytoskeletal components were also investigated. A remarkable rearrangement of microfilaments and intermediate filaments (keratin and vimentin) was detected in a time-dependent manner. In particular, actin ruffles and intermediate filament aggregates were observed. Furthermore, the microtubular apparatus seemed to be less affected. The results here reported seem to indicate cytoskeletal components as probable targets of 2,5-hexanedione cytotoxicity in cultured cells.

Paoletti L. Air-dispersed dust of environmental origin as carcinogenic risk factor. *Arch Monaldi Mal Torace* 1989;44:651-9.

Paoletti L, Eibenschutz L, Cassano AM, Falchi M, Batisti D, Ciallella C, Donelli G. Mineral fibres and dusts in the lungs of subjects living in an urban environment. In: Bignon J, Peto I, Saracci R. (Ed). *Non-occupational exposure to mineral fibres*. IARC Scientific Publications. 1989;90:354-60.

We have undertaken a study on 200 autopsy lung samples collected from subjects who lived in the Rome urban area and were not occupationally exposed to mineral dusts. The samples belonged to subjects who died aged between 15 and 65, both male and female. Subjects suffering from diseases and drug addicts were excluded. The purpose of this investigation was to determine whether any correlation existed between subjects' life-style, in particular smoking habits, and the presence of mineral fibres and dusts in their lungs. The data obtained were compared with those on airborne mineral dusts in the environment of the subjects themselves, particularly data on the concentration and types of mineral fibres present in that environment.

Paoletti L, Falchi M, Viviano G, Ziemacki G, Batisti D, Pisani D. Features of airborne breathable particulate in a remote rural and in an urban area. *Water Air Soil Pollut* 1989;43:85-94.

In order to define the atmosphere pollution role in the lung cancer etiology it is necessary to carefully measure the composition of airborne pollutants. The evaluation of

atmosphere pollution by analytic electron microscopy technique has made it possible to analyze the morphology and composition of airborne breathable particulate and to characterize the sources. The comparative study of a rural area and a downtown area in Rome has shown qualitative and quantitative differences in the pollution pattern. In the urban area the data we have obtained point out motor vehicle traffic as the greatest source of pollution. A large amount of heavy metals and mineral fibers, potentially noxious for health, was observed.

Ruggeri FM, Marziano ML, Tinari A, Salvatori E, Donelli G. Change in electrophoretic patterns of rotavirus from infant diarrhea in Rome during four years of observation. *Microecol Ther* 1989;18:347-50.

Rotavirus infection was diagnosed in 210 children with acute diarrhea admitted to a pediatric hospital in Rome from 1982 through 1985. Winter epidemics of disease were revealed in 1982 and 1985, whereas in the two intermediate years cases were admitted in all months. Fourteen distinct electrophoretic types of rotavirus were identified from 84 cases examined; two of these were largely predominant in each of the two epidemic years, respectively. The observed succession of viral strains together with the changing epidemiologic pattern of infection through years support the view of a change in the immune status of the population at risk.

Ruggeri FM, Marziano ML, Tinari A, Salvatori E, Donelli G. Four-year study of rotavirus electropherotypes from cases of infantile diarrhea in Rome. *J Clin Microbiol* 1989;27:1522-6.

Rotavirus infections were detected in 210 of 675 children with acute diarrhea admitted to a major pediatric hospital in Rome from January 1982 through December 1985. Most of the patients with rotavirus infections were admitted during the winter season in both 1982 and 1985, whereas during the two intermediate years, cases occurred in all months. Among 84 rotavirus samples examined, 14 different electropherotypes were recognized, 2 of which largely predominated over the others. The two electropherotypes were particularly frequent in the 2 epidemic years, altogether accounting for 70.2% of the samples typed, and circulated in distinct periods. None of the viruses showed a short pattern of electrophoretic migration of the genome, indicating a minor involvement of subgroup I rotaviruses in hospitalization-requiring diarrheas occurring in the area surveyed.

Superti F, Tinari A, Donelli G. A new approach for laboratory diagnosis of astrovirus infections. *Microecol Ther* 1989;18:275-8.

Infections by astroviruses are accounting for a significant fraction of viral infantile diarrhoea in developed countries. Current diagnosis of this infection is relying on electron microscopic analysis of infected stools. Until now, direct astrovirus cultivation from faeces was not utilized in the diagnosis of this infection because primary human cell cultures are required for this purpose. To provide an alternative cell system, we investigated whether the established human cell line 293 can support viral replication. For this purpose, a faecal suspension containing astroviruses was used to infect confluent 293 cell monolayers. A cell culture indirect immunofluorescence test was used to quantitate viral production at subsequent passages. Results of this study have shown that virus propagated on 293 cells and gut virulent virus, from which it was derived, are antigenically and morphologically identical as revealed by indirect immunofluorescence, immunosorbent electron microscopy and direct electron microscopy. These findings indicate that 293 cells represent an adequate substrate for astrovirus growth, thus providing a new useful tool for laboratory diagnosis of astrovirus infections by indirect immunofluorescence.

Tinari A, Ruggeri FM, Divizia M, Panà A, Donelli G. Morphological changes in HAV-infected Frp/3 cells and immunolocalization of HAAg. *Arch Virol* 1989;104:209-24.

Electron and immunoelectron microscopic studies were carried out on HAV-infected Frp/3 cells. The infection led to a distinctive cytopathic effect (CPE) arising on day 3 up to the complete detachment of monolayers on day 7. Infected cells exhibited progressive modifications, beginning from the formation of long helical polyribosomes. Subsequently, hypertrophy, cisternal dilatation and degranulation of the RER could be observed. Furthermore, the formation of concentric membranous bodies (CMB), large myelin-like structures and annulate lamellae could be revealed at later times of infection. 24-27 nm virus-like particles were observed within cytoplasmic vesicles or outside extensively degenerated cells. Indirect immunoperoxidase staining were used to localize HAV antigen (HAAg) in thin sectioned infected Frp/3 cells. Vesicular inclusion bodies, often seen to contain electron-lucent particles, resulted darkly stained as well as tracts of the RER and myelin-like structures. Negatively stained preparations from cell lysates revealed small clusters of HAV particles which sometimes appeared to be still associated with residual membrane fragments. Our findings seem to suggest that HAV replication occurs in close association with cytoplasmic membranes and a direct involvement of the RER seems to be demonstrated.

## 1990

Arancia G, Malorni W, Donelli G. Cellular mechanisms of lymphocyte-mediated lysis of tumor cells. *Ann Ist Super Sanità* 1990;26:369-84.

Both branches, humoral and cellular, of the immune response have specialized mechanisms to lyse tumor cells, virus-infected cells and other targets. The effector components of the humoral response are antibodies and complement, while cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells are among the potent effector agents of the cell-mediated immune response. The past few years have witnessed remarkable progress in defining the effector molecules and mechanisms involved in lymphocyte-mediated killing. The recognition of target cells by CTL is antigen specific and restricted through the major histocompatibility complex (MHC). The molecular structure involved in the recognition function is the T cell receptor (TCR), associated with CD3 polypeptides. Conversely, the activity of NK cells is non antigen specific and non MHC restricted. Several surface molecules of cytotoxic lymphocytes have been identified as adhesion-mediating structures. A particular role seems to be played by a family of molecules named lymphocyte function-associated antigens (LFA) and by CD2, CD4 and CD8 antigens. Once the binding between effector and target cell has occurred, a cascade of events can be triggered leading the killer lymphocyte to deliver the lethal hit against the target cell. At least two categories of cytolytic molecules are produced by CTL and NK cells. Perforin is a protein stored in the cytoplasmic granules which forms pores in the plasma membrane of target cell leading to osmotic lysis. The other category of cytolytic factors is the group of soluble mediators which includes lymphotoxin (LT), tumor necrosis factor (TNF) and NK cytotoxic factor (NKCF). Their exact mechanism of action is presently unclear. Several cellular components are involved in the cytolytic mechanism. In particular, the cytoplasmic granules which, upon activation, release a number of cytotoxic factors by directed exocytosis and the cytoskeletal components which, modifying their organization, participate in the binding and killing processes. A growing body of evidence has recently supplied proof that target cells may play an active role in their own lysis supporting the challenging opinion of an induced suicide mechanism.

Bellomo G, Mirabelli F, Richelmi P, Malorni W, Iosi F, Orrenius S. Cytoskeleton as a target in quinone toxicity. *Free Radic Res Commun* 1990;8:391-9.

The exposure of mammalian cells to toxic concentrations of redox cycling and alkylating quinones causes marked changes in cell surface structure known as plasma membrane blebbing. These alterations are associated with the redistribution of plasma membrane proteins and the disruption of the normal organization of the cytoskeletal microfilaments which appears to be due mainly to actin cross-linking and dissociation of alpha-actinin from the actin network. The major biochemical mechanisms responsible for these effects seem to involve the depletion of cytoskeletal protein sulfhydryl groups and the increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration following the alkylation/oxidation of free sulfhydryl groups in several Ca<sup>2+</sup> transport systems. Depletion of intracellular ATP is also associated with quinone-induced plasma membrane blebbing. However, ATP depletion occurs well after the onset of the morphological changes, and thus it does not seem to be causatively related to their appearance. Thiol reductants, such as dithiothreitol, efficiently prevent the oxidation of cytoskeletal protein thiols, the increase in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration and cell blebbing induced by redox cycling, but not alkylating, quinones. These results demonstrate that alkylating and redox cycling quinones cause similar structural and biochemical modifications of the cytoskeleton by means of different mechanisms, namely alkylation and oxidation of critical sulfhydryl groups.

Bellomo G, Mirabelli F, Vairetti M, Iosi F, Malorni W. Cytoskeleton as a target of menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. I. Biochemical and immunocytochemical features. *J Cell Physiol* 1990;143:118-28.

Cytoskeletal abnormalities occurring during oxidative stress generated by the metabolism of the redox cycling compound 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) have been investigated in different mammalian cells in culture. Extraction of the whole cytoskeleton as well as the intermediate filament- and the microtubule-enriched fractions from menadione-treated cells revealed a marked depletion of protein sulfhydryl groups. The analysis of the whole cytoskeletal fraction by PAGE showed a menadione-dependent and thiol-sensitive oxidation of actin, leading to the formation of high-molecular-weight aggregates. In addition, the extraction of this fraction with high concentrations of KCl entailed only a partial solubilization of actin. The comparative cytochemical analysis performed on treated cells showed a menadione-dependent clustering of actin microfilaments. The metabolism of menadione induced microtubule depolymerization and inhibition of GTP-induced microtubule assembly from soluble cytosolic components. The latter phenomenon was prevented by previously treating the cytosolic fraction with thiol reductants such as dithiothreitol. Menadione increased the protein content of the intermediate-size filament fraction, partially purified by one or more cycles of disassembly/assembly, and particularly enriched in polypeptides reacting with antikeratin antibodies. Furthermore, a reversible and oxidation-dependent change of the electrophoretic mobility of some polypeptides in this fraction was detected. The immunocytochemical investigation of intermediate-size filament distribution in menadione-treated cells, however, revealed only minor modifications mainly consisting of perinuclear condensation of cytokeratin structures. These findings suggest that cytoskeletal structures (actin microfilaments, microtubules, and intermediate-size filaments) are actually significant targets in quinone-induced oxidative stress.

Caiazza S, Falcinelli G, Pintucci S. Exceptional case of bone resorption osteo-odonto-keraprosthesi: ASEM and X-ray microanalysis study. *Cornea* 1990;9:23-7.

This article reports the findings of investigations on an osteo-odonto-keratoprosthesis in an eye that was enucleated owing to severe complications 12 years after implantation. Scanning electron microscopy and electron probe X-ray microanalysis showed extensive resorption of the bone that was used as a supporting element in the kind of transcorneal prosthesis developed by Strampelli. The destructive process, in addition to surgical trauma, has been associated with the early and recurrent bacterial infections relating to the presence of *Staphylococcus epidermidis*. The need to control the occurrence of primary bacterial infections in traumatized tissues during operations as well as further infectious situations, given the enhanced antibiotic-resistance of bacteria, is emphasized.

De Crescenzi M, Diociaiuti M, Lozzi L, Picozzi P, Santucci S. Investigation on electronic structure of Cu clusters on graphite by EELS and XPS spectroscopy. *Solid State Commun* 1990;74:115-8.

We have applied electron energy loss (EELS) and X-ray photoemission (XPS) spectroscopies to study the electronic structure of copper clusters deposited in situ on clean graphite. The XPS results show an increase in the binding energy of both valence band and core levels when the cluster size decreases. Furthermore the EELS results show a sizeable increase in energy loss for the feature located at about 4 eV involving  $3d \rightarrow Ef$  states when the cluster size decreases. The observed shifts in the EELS spectrum are the same as those measured for the  $3d$  valence band shifts in the XPS spectra. Since the electrostatic charging effects, suggested in the past as the explanation for the variation in electronic properties occurring in the XPS of small clusters, cannot be invoked in EELS measurements we interpret the reported shifts as a genuine effect caused by band structure variation due to a redistribution of the states within the cluster d-band.

Fiorentini C, Malorni W, Paradisi S, Giuliano M, Mastrantonio P, Donelli G. Interaction of *C. difficile* toxin A with cultured cells: cytoskeletal changes and nuclear polarization. *Infect Immun* 1990;58:2329-36.

Experiments done on *in vitro*-cultured cells exposed to toxin A from *C. difficile* showed a series of cytopathologic changes leading to cell retraction and rounding accompanied by the marginalization of the nucleus, which localized at one pole of the cell. Cytoskeleton appeared to be strongly involved in such modifications. In particular, the microfilament system seemed to be involved in cell retraction, while microtubule network integrity and function seemed to be necessary for the nuclear displacement. The carboxylic ionophore monensin completely blocked the cytopathic effect when added with the toxin. The serine protease inhibitor chymostatin appeared to be protective also upon addition long after the end of the binding step. The  $Ca^{2+}$ -dependent cytosolic protease inhibitors antipain and leupeptin were ineffective in protecting cells. Thus, our results suggest the involvement of an acidic compartment and the action of a serine protease in toxin A-induced cytopathic effect.

Laudonio N, Marcocci L, Arancia G, Calcabrini A, Del Bufalo D, Greco C, Zupi G, Mavelli I, Pedersen JZ, Bozzi, A, Mondovì B. Enhancement of hyperthermic damage on M14 cells by liposome pre-treatment. *Cancer Res* 1990;50:5119-26.

Exponentially growing human melanoma cells (M14 cell line) were pretreated with various amounts of dipalmitoylphosphatidylcholine-containing multilamellar liposomes and then exposed to heat treatment (42.5 degrees C). Cell damage produced by the treatments, given separately or in combination, was evaluated in terms of cell

survival. Our results demonstrate that the cell survival at 37 degrees C was not affected by liposome concentrations up to 1000 nmol of phospholipid/ $2.5 \times 10^6$  cells, while liposome treatment of cells before heat exposure determined a marked damaging effect even at 100 nmol of phospholipid/ $2.5 \times 10^6$  cells. The mechanisms of liposome-cell interaction have been investigated by electron microscopy or by electron spin resonance measurements of spin-labeled membranes of intact cells. Evidence has been obtained that liposomal lipids are either taken up by M14 cells or become incorporated in the cell membrane. The present data suggest the possibility that liposome treatments per se could be of potential value as a therapeutic approach, by increasing the effect of heat therapy.

Malchiodi Albedi F, Cassano AM, Ciaralli F, Taruscio D, Giuliani A, Donelli G. Ultrastructural immunolocalization of laminin and fibronectin in human large intestinal mucosa. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1990;22:153-8.

The ultrastructural expression of laminin and fibronectin was studied in human colonic mucosa with a pre-embedding immunoperoxidase technique. Both antigens were present in epithelial basement membrane. The lamina densa was uniformly and homogeneously immunostained by both fibronectin and laminin, while the lamina rara showed discrete, positive sites occasionally connecting the lamina densa with the epithelial plasma membrane. In the lamina reticularis, fibronectin was diffusely positive, while laminin showed a discontinuous positivity only in the uppermost region in vicinity of the lamina densa. Collagen fibrils were regularly decorated by fibronectin-positive material. Basement membranes in the capillary wall showed a similar pattern of reactivity both with laminin and fibronectin. These results point out that laminin as well as fibronectin are integral components of intestinal mucosa basement membranes.

Malorni W, Fiorentini C, Mastrantonio P, Donelli G. Mechanisms underlying the cytoskeletal changes induced by *Clostridium difficile* toxins. In: Rappuoli et al. (Ed.). *Bacterial Protein Toxins*. Stuttgart: Gustav Fischer. *Zentralblatt Bakteriologie* Suppl. 19. p. 277-8.

Malorni W, Fiorentini C, Paradisi S, Giuliano M, Mastrantonio P, Donelli G. Surface blebbing and cytoskeletal changes induced *in vitro* by toxin B from *Clostridium difficile*: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Exp Mol Pathol* 1990;52:340-56.

*Clostridium difficile* toxin B is a powerful cytopathic agent without enterotoxic activity which is believed to be involved in the pathogenesis of pseudomembranous colitis. Up until today, the mechanisms of toxin B cytotoxicity have not been elucidated. The results of *in vitro* studies performed on different cell lines by means of immunocytochemical and ultrastructural methods are reported here. Low doses (0.15 ng/ml) of toxin B cause cell rounding and arborization. Higher doses (up to 15 micrograms/ml) induce cell rounding and appearance of numerous surface protrusions with blister or bulb-like features. These "blebs" belong to the potocytotic type, the bleb matrix being devoid of cytoplasmic organelles and filled with ribosomes only. Furthermore, a peculiar role of cytoskeletal apparatus in this phenomenon has been detected. In fact, morphological rearrangement occurs in cytoskeletal elements, mainly represented by the presence, in the blebs, of tubulin and of the actin-binding proteins alpha-actinin, filamin, and calmodulin, while actin and intermediate filaments, keratin and vimentin, appear to be absent. Moreover, beta 2-microglobulin, considered as a surface protein marker, seems to undergo changes in its expression, being absent over the blebbing

surface. The results of this study may support the view that *C. difficile* toxin B affects one or more subcellular components that regulate the structure and function of the actin cytoskeleton.

Malorni W, Indovina PL, Arancia G, Meschini S, Santini MT. Effects of Cesium on *in vitro* myoblast differentiation: an electron microscopy study. *In vitro Cell Dev Biol* 1990; 26:399-410.

This paper describes the microscopic evidence supporting a cesium-induced delay in the fusion of chick embryo myoblast membranes during *in vitro* myogenic differentiation. We have recently demonstrated that the sharp decrease in the conductivity and permittivity of the membranes of these myogenic cells at the time of fusion is delayed 30 h by the addition of cesium to the culture medium (Santini *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1988;945:56-64). We report here that this delay in fusion is substantiated by direct microscopic observation and that cesium also induces ultrastructural changes in the myoblast cells themselves. Possible mechanisms by which cesium may cause both the delay in fusion as well as the ultrastructural changes observed are discussed.

Malorni W, Iosi F, Falchi M, Donelli G. On the mechanism of cell internalization of chrysotile fibers : an immunocytochemical and ultrastructural study. *Environ Res* 1990;52:164-77.

Human breast carcinoma cells (CG5) and human laryngeal carcinoma cells (HEp-2) were exposed to 10 and 50 micrograms/ml of small (about 5 microns) chrysotile asbestos fibers. Morphological and ultrastructural changes were evaluated by means of immunocytochemistry and by scanning and transmission electron microscopy. Our attention was focused on the mechanisms of cell internalization and on transport of chrysotile fibers. The fibers appeared to penetrate the cell cytoplasm and to be translocated in proximity of the nucleus. Small chrysotile fibers could also be found inside the nucleus of interphase cells. Involvement of the main cytoskeletal components, i.e., microfilaments, intermediate filaments, and microtubules, in the cytotoxicity of chrysotile fibers was also evaluated. Our findings suggest that after fiber penetration, a rearrangement of the cytoskeletal apparatus occurs. It has also been observed that small fibers remain associated with the cytoskeletal framework, which can thus play a role in asbestos intracytoplasmic translocation in epithelial cells. Furthermore, after the cell has completely recovered its morphology, fiber internalization ultimately seems to lead to the formation of giant multinucleated cells. These data could be indicative of an interaction occurring between asbestos fibers and the normal mitotic process. The disturbance of the cell cytoskeleton and the close morphologic contact between asbestos fibers and the cell's nuclear region may be of importance in explaining the well-known carcinogenic effects of asbestos mineral fibers.

Molinari A, Calcabrini A, Crateri Trovalusci P, Arancia G. Interaction of anthracyclinc antibiotics with cytoskeletal components of cultured carcinoma cells (CG5). *Exp Mol Pathol* 1990;53:11-33.

The effects of doxorubicin (adriamycin, ADR) and daunorubicin (daunomycin, DAU), two anthracyclinc antibiotics, on a human breast carcinoma cell line (CG5) were studied by cytochemical and morphological methods. Both ADR and DAU were capable of inducing the multinucleation and spreading phenomena, associated with a decrease of the cell growth rate. DAU appeared to be more effective than ADR at the tested concentrations (10(-5), 5 x 10(-5) mM), in affecting the cell growth as well as in inducing multinucleation. As revealed by scanning electron microscopy, spreading and multinucleation were accompanied by a remarkable redistribution of surface structures. Moreover, a dose- and

time-dependent rearrangement of the underlying cytoskeletal components was clearly detected. In addition, both ADR and DAU at  $5 \times 10^{-5}$  mM seemed to favor the rebuilding of microtubules after treatment with colcemid, while a higher dose ( $10^{-4}$  mM) exerted the opposite effect. Furthermore, both anthracyclines prevented the action of the anti-microtubular agent. When recovered after treatment with cytochalasin B, in presence of ADR (or DAU) ( $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  mM), cells showed a microfilament pattern rearranged differently as compared to that of cells recovered in anthracycline-free medium. The results reported here strongly suggest the involvement of actin and tubulin in CG5 cell response to ADR and DAU treatments. Thus, the cytoskeletal apparatus is confirmed as another target involved in the mechanism of action of anthracyclines.

Paoletti L, Falchi M, Batisti D, Carrieri MP, Petrelli MG, Ciallella C, Donelli G. Mineral particulate in the lung parenchima of subjects not occupationally exposed to dust. In: Bignon J. (Ed). *Health related effects of phyllosilicates*. NATO ASI Series G 21. Berlin Heidelberg 1990;273-7.

Superti F, Seganti L, Orsi N, Desideri N, Stein ML, Tinari A, Marziano ML, Donelli G. *In vitro* effect of synthetic flavanoids in astrovirus infection. *Antiv Res* 1990;13:201-8.

In this study we investigated the activity of halogeno-, cyano- and amidino-isoflavones, isoflavans and flavans on the multiplication of human astroviruses. These are naked small round viruses which have been recognized as causative agents of human gastroenteritis, and whose capsid proteins are similar to those of picornaviruses. Although all drugs tested caused a dose-dependent reduction of viral antigen synthesis as monitored by immunofluorescence, the chloro derivatives were the most effective.

## 1991

Aranca G. Individuation of subcellular targets of antitumor agents by ultrastructural methods. *Cytotechnology* 1991;5:S19-22.

Aranca G, Donelli G. Cell membranes as target for anticancer agents. *Pharmacol Res* 1991;24:205-17.

Aranca G, Leonetti C, Malorni W, Greco C, Formisano G, Marangolo M, Zupi G. Different effects of sequential combinations of N-methylformamide with 5-fluorouracil on human colon carcinoma cells growing in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991;117:351-8.

The effects of the combination of N-methylformamide (NMF) with 5-fluorouracil (5-FU) on tumor growth and morphological features of human colon carcinoma cells (HT29) implanted in nude mice were assessed. Both agents were administered i.p. at tolerable doses: 5-FU at 19 mg/kg for 5 days and NMF at 200 mg/kg for 12 days. Four main schedules were tested: 5-FU alone, NMF alone, NMF followed by 5-FU and 5-FU followed by NMF. The last sequence was the most effective, as compared with the other treatment regimens. In particular, the 5-FU---NMF combination induced a tumor inhibition of about 75% at the end of the treatments (17th day) versus an inhibition of 23%-43% in the other schedules. Morphological observations, carried out by light and electron microscopy, indicated a possible relationship between the presence of structural changes and tumor growth inhibition. The results of this study renew interest in the use of NMF in sequential combination confirming sequence as a critical factor for the optimal combination of NMF and 5-FU.

Arancia G, Malorni W, Iosi F, Zarccone D, Cerruti G, Favre A, Zeromski J, Grossi CE, Moretta A. Morphological features of cloned lymphocytes expressing  $\gamma/\delta$  T cell receptors. *Eur J Immunol* 1991;21:173-8.

We have analyzed the morphological characteristics of human T lymphocytes bearing CD3-associated T cell receptor (TcR) gamma and delta chains. BB3 and delta-TCS1 monoclonal antibodies (mAb) were used to identify two distinct, nonoverlapping populations of TcR gamma/delta + cells which express the products of V delta 2 and V delta 1 gene segments, respectively. In the peripheral blood, most V delta 1+ (delta TCS-1+) lymphocytes express the non-disulfide-linked form of receptor whereas V delta 2+ (BB3+) cells express the disulfide-linked form. The majority of cloned TcR gamma/delta + cells exhibit a growth pattern different from that of conventional TcR alpha/beta + cells as they adhere promptly to surfaces and undergo morphological changes which can be summarized as follows: cells spread on the surface, form a distinct uropod and, in the final phase of adherence, emit long filopodia ending with adhesion plaques. Immunofluorescence studies of TcR gamma/delta + clones demonstrated the presence of submembraneous actin microfilaments and actin-binding protein confirming that these cells are capable of active motility which is related to the propensity of TcR gamma/delta + cells to home to epithelia. Scanning electron microscope analyses of effector/target cell conjugates showed that in TcR gamma/delta + cells the region of the uropodia next to the cell body is responsible for the binding to tumor target cells. Interestingly, immunofluorescence analyses revealed that LFA-1 molecules are predominantly distributed in the uropodium whereas they are virtually absent in the cell bodies. These morphological characteristics of TcR gamma/delta + cells may pertain to defensive mechanisms the mucosal level.

Arancia G, Malorni W, Iosi F, Zarccone D, Cerruti G, Moretta A, Grossi CE. Growth features of T-cell receptor  $\gamma/\delta$ -positive cell clones. *Immunol Res* 1991;10:331-3.

Arancia G, Sirianni MC, Malorni W, Soddu S, Crateri Trovalusci P, Fiorentini C, Aiuti F, Donelli G. Suicide behaviour of target cells after binding with natural killer cells. *Blood Cells* 1991;17:159-72.

Human natural killer (NK) cell activity seems to be related to the integrity and function of the cytoskeletal apparatus. It has been hypothesized that microfilaments and microtubules play a pivotal role. In particular, the binding of the NK cell to the target cell requires microfilament integrity, and the lysis of bound targets seems to depend on microtubule assembly. We focused on the changes occurring in cytoskeletal elements and surface structures of NK cells and of target cells highly sensitive to NK activity (K562). Our observations, performed by fluorescence and scanning electron microscopy, besides confirming a rearrangement of the cytoskeletal apparatus in the effector cell, provide evidence that target cell cytoskeletal elements are involved in NK cell function. In K562 cells, after binding with NK cells, there is marginal rearrangement of actin and polarization of tubulin and vimentin in the contact regions, accompanied by modification of surface structures. These findings suggest that the target cell plays an active role in its own death by participating in the formation of an extended area of intimate contact with the killer cell. In addition, they lend credence to the surprising proposal that NK cells may induce a suicide mechanism in target cells.

Baldassarri L, Donelli G, Cerquetti M, Mastrantonio P. Capsule-like structures in *C. difficile* strains. *Microbiologica* 1991;14:295-300.

Fourteen strains of *Clostridium difficile*, previously characterized by SDS-PAGE, were examined for the presence of surface structures. None of the strains were fimbriated but, when grown in the presence of glucose, all exhibited a thin ruthenium red-positive layer.

Two strains, belonging to different electrophoretic groups, were also observed after treatment with homologous and heterologous antisera. The strain belonging to the electrophoretic group 2, usually associated with the disease, showed a 30-80nm thick capsule in ultrathin sections. The strains belonging to group 5, mainly observed in isolates from healthy children, exhibited a thinner polysaccharide layer (10-20 nm). No stabilization was observed when these strains were treated with heterologous antisera. This capsule-like material did not seem to be associated with adhesive properties of *C. difficile* strains.

Caiazza S, Chistolini P, Bedini R, Formisano G, Colangelo P. Caratteristiche meccaniche ed aspetti ultrastrutturali di un supporto sperimentale per implantologia dentale. *Biomateriali* 1991;5:239-46.

Quale contributo al superamento delle limitazioni biologiche e meccaniche alla affidabilità a lungo termine degli impianti dentali, è stato realizzato un supporto sperimentale costituito da un nucleo cilindrico di titanio tornito, incluso in polimetilmetacrilato (PMMA) e ricoperto con tessuto filamentoso di Dacron. Oltre alla già verificata osteointegrabilità del tessuto di Dacron, sono stati estesi gli studi già intrapresi sulla resistenza di opportuni provini a sforzi di taglio alle interfacce Dacron-PMMA e PMMA-titanio ed a fatica all'interfaccia Dacron-PMMA. Gli effetti sui provini in funzione delle sollecitazioni applicate sono stati studiati al microscopio elettronico a scansione (SEM). Le curve relative agli sforzi di taglio e a fatica hanno dimostrato un comportamento dei materiali del tutto incoraggiante e tale da giustificare lo studio *in vivo* del dispositivo sperimentale.

Caiazza S, Donelli G. Infezioni associate ai biomateriali: situazione attuale e prospettive di controllo nei cateteri. *Biomateriali* 1991;3/4:257-62.

La presente rassegna considera il problema delle infezioni associate alla presenza di cateteri nell'organismo, alla luce di recenti acquisizioni sul ruolo svolto dai biomateriali costituenti i dispositivi nella insorgenza degli eventi infettivi. Dopo una descrizione dei cateteri endocavitari (in particolare di quelli per dialisi peritoneale) e dei cateteri intravasali (in particolare di quelli intravenosi), viene delineata una strategia di ricerca volta al controllo delle infezioni; sono inoltre definiti alcuni aspetti operativi della ricerca, specificandone le principali fasi ed evidenziandone l'aspetto interdisciplinare.

Caiazza S, Taruscio D, Ciaralli F, Crateri P, Chistolini P, Bedini R, Colangelo P, Pintucci S. Evaluation of an experimental parodontal ligament for dental implants. *Biomaterials* 1991;12:474-8.

To improve the devices used in dental implantology, a new experimental supporting element has been developed. The device, made of titanium, poly(methylmethacrylate) and Dacron tissue, has been tested for the osteointegrability of its outer Dacron coat by implants in mandibular bone of rabbits. The Dacron filamentous tissue became incorporated by the bone at 3 month post-implantation. This might provide a reliable mechanical anchorage of the device and a barrier against epithelial proliferation and microbial contamination. Preliminary results relating to *in vitro* evaluation of the poly(methyl methacrylate)-Dacron fixation strength predict favourable mechanical behaviour at this interface and in the complete implanted device.

Diociaiuti M, Molinari A, Calcabrini A, Arancia G. Electron energy-loss spectroscopy analysis of adriamycin-plasma membrane interaction. *J Microsc* 1991;164:95-106.

Our previous studies on the mechanism of cytotoxic action of the anti-tumour drug adriamycin (ADR) indicated that this anthracyclinic antibiotic strongly modified the

molecular architecture of the plasma membrane of human erythrocytes, presumably becoming incorporated within both lipid layers. In order to verify this hypothesis, electron energy-loss spectroscopy (EELS) has been used to compare the P content in control and ADR-treated erythrocyte ghosts. EELS measurements allowed us to reveal a significant reduction in the P/C ratio in erythrocyte ghosts after ADR treatment. This finding seems to reflect a phospholipid 'dilution' produced by the incorporation of the drug molecules in the membrane layers. A structural model of the ADR-membrane interaction is proposed.

Diociaiuti M, Paoletti L. Structural characterization of air-oxidized chromium particles by extended energy-loss fine-structure spectroscopy. *J Microsc* 1991;162:279-89.

Extended energy-loss fine-structure spectroscopy (EXELFS) and electron energy-loss spectroscopy (EELS) microanalysis have been used to study the structural and chemical modifications caused by interaction with the atmosphere of small, very reactive chromium (Cr) particles whose diameters range from 150 to 1300 Å. Analysis of the data allows us to deduce that the particles consist of a Cr core with a body-centered cubic structure and with a lattice parameter reduced by about 4% with respect to the bulk value by surface stresses (for the smallest diameter), surrounded by a Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> shell of about 15-Å width.

Fiorentini C, Thelestam M. *Clostridium difficile* toxin A and its effects on cells. *Toxicon* 1991;29:543-67.

*Clostridium difficile* toxin A in its native form is a high molecular weight (520-540 K) aggregate with five major biological activities. It is lethal, enterotoxic, cytotoxic and cytotoxic, and induces hemagglutination of rabbit red blood cells. Possibly these activities are contained in separate components. A major subunit of c. 230-310 K has been defined but lower molecular weight components cannot be excluded. The major component has been cloned, and sequence analysis indicated a complicated pattern of repeating sequences in the C-terminal third of the molecule. This review deals mainly with the effects of toxin A on cultured cells. Most mammalian cells are sensitive to toxin A whose major effect is to stop cell division irreversibly. The toxin binds via its repeat sequences to a trisaccharide receptor expressed on rabbit red cells and on brush border membranes from hamster intestine. This receptor seems to be functional in the hemagglutination reaction and the enterotoxicity. Its role in the cytotoxic effect of the toxin is not clear, but no other receptor structure has as yet been identified. In order to exert its cytotoxic (antiproliferative) effect toxin A must first be internalized by endocytosis. Thus a latency period of at least 30 min after toxin binding to cells is consistently observed, and all cytotoxic effects can be prevented by blocking the endocytosis pathway. The first microscopically visible signs of cytotoxicity consist in retraction and rounding of intoxicated cells. In addition the nucleus becomes polarized to one side of the cell while other cell organelles are not significantly affected. These morphological changes seem to be the consequence of a cytoskeletal rearrangement, mainly involving some components of the microfilament system. Inhibition of macromolecular syntheses as well as permeabilization of the plasma membrane may follow the early cytoskeletal effects and finally lead to cell death. Attempts to identify metabolic pathways of significance in the cytotoxicity suggest that the cytosolic level of Ca<sup>2+</sup> is not important, thus excluding certain mechanisms for cell killing. In this respect the cytotoxic mode of action of toxin A clearly differs from that of toxin B. However, the biochemical basis for the antiproliferative effect of toxin A remains unknown.

Gentile G, Venditti M, Micozzi A, Caprioli A, Donelli G, Tirindelli C, Meloni G, Arcese W, Martino P. Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. *Rev Infect Diseases* 1991;13:842-6.

The clinical features of cryptosporidial infection in 20 patients with hematologic malignancies were assessed. Five patients had severe diarrhea, 10 had moderate diarrhea, and five were asymptomatic carriers of *Cryptosporidium*. Extraintestinal cryptosporidiosis with pulmonary involvement was observed in one case and relapse of cryptosporidiosis in four. All but one patient recovered from cryptosporidiosis whether or not spiramycin was administered. Cryptosporidiosis in T cell-depleted recipients of allogeneic bone marrow transplants did not appear more severe than that in patients undergoing autologous bone marrow transplantation or conventional chemotherapy.

Malchiodi Albedi F, Ciaralli F, Giuliani A. Increased osmiophilia of glycosaminoglycan-like structures after fixation with cetylpyridinium chloride in human colonic mucosa. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1991;23:415-8.

The effects on tissue ultrastructural appearance of fixation with cetylpyridinium chloride (CPC)-added formaldehyde were studied at the ultrastructural level in human colonic mucosa. We found that CPC did not impair tissue morphology and induced a remarkable osmiophilia in glycosamino-glycan-like structures, which did not require further staining.

Malchiodi Albedi F, Ciaralli F, Giuliani A. Sulphated glycosaminoglycans expression in the basement membranes of colorectal adenocarcinomas. Correlation with histological grading. *Histochem J* 1991;23:229-34.

The expression of sulphated glycosaminoglycans was studied at the ultrastructural level by the high iron diamine technique in the basement membranes of 26 colorectal adenocarcinomas (10 well-differentiated, 7 moderately-differentiated, 9 poorly-differentiated). Sulphated glycosaminoglycan expression was highly variable. It was scored as regular (5 cases), slightly irregular (6 cases), highly irregular (15 cases). In general, poor histological differentiation could be correlated with absent or highly irregular expression. However, in a limited number of cases, severe alterations of basement membranes were also present in well-differentiated (2 cases) and moderately-differentiated (4 cases) tumours. Such a variability shows up a heterogeneity which is not revealed by histological grading.

Malorni W, Iosi F, Meschini S, Paradisi S, Donelli G. Cytopathological features of cell suffering and death: role of plasma membrane and cytoskeleton. *Cyto-technology* 1991;5:S67-70.

Morphological and ultrastructural modifications related to the cell injury and leading to cell death have been investigated by using different compounds. Data obtained by treating various cultured cells with a quinone (menadione), a polar solvent (NMF) and a bacterial protein toxin (toxin B from *Clostridium difficile*) are here reported. Differences seem to exist between such injuries, but changes in plasma membrane structure, called surface blebbing phenomenon, represent a common feature which can be in any case detected. Our results also allow to hypothesize an important role of cytoskeleton in such a process.

Malorni W, Iosi F, Mirabelli F, Bellomo G. Cytoskeleton as a target of menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. II. Alterations underlying surface bleb formation. *Chem Biol Interact* 1991; 80(2):17-236.

Several *in vitro* and *in vivo* studies have suggested that surface bleb formation during oxidative cell injury is related to alteration in cytoskeleton organization. Various cell lines different in origin and growth characteristics were exposed to 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) which is known to induce bleb formation and cytotoxicity by generating considerable amounts of oxygen-reactive species. Treated cells were analyzed by means of immunocytochemistry and electron microscopy in order to investigate the morphological and molecular features underlying bleb generation. The results obtained indicate that menadione-induced bleb formation is a widely observed phenomenon present mainly in round or mitotic cells. Surface blebs appear free of organelles and contain only few ribosomes and amorphous material. Occasionally, they undergo detachment from the cell surface as large cytoplasmic vesicles. Bleb surfaces with protein clusters as well as bald blisters with an almost exclusive localization of intramembrane particles on their narrow base were detected using freeze-fracture techniques. Immunocytochemical investigations performed on menadione-exposed cells revealed that some surface proteins (collagen IV, sialo-proteins, beta 2 microglobulin and fibronectin) and adhesion molecules (vinculin) underwent changes in their expression over the bleb surface. Moreover, different behavioural characteristics of actin microfilaments, vimentin and keratin intermediate filaments and microtubules was observed. Alpha-actinin, vimentin and microtubular proteins (tubulin, MAPs and tau) were detected within the blebs. On the other hand, actin and keratin filaments appeared to be absent. The results presented here demonstrate that cytoskeletal structures and the microfilament system in particular, represent important targets in menadione-induced morphological changes in cultured cells. These changes appear to lead to the redistribution of several cytoskeletal and membrane proteins as well as dissociation of the cytoskeleton network from its anchoring domains in the plasma membrane thus generating sites of structural weakness where blebs would arise and progressively grow. Experimental evidence supporting a crucial role of thiol oxidation and elevation of cytoplasmic calcium concentration in bleb formation is also provided.

Malorni W, Paradisi S, Dupuis ML, Fiorentini C, Ramoni C. Enhancement of cell-mediated cytotoxicity by *Clostridium difficile* toxin A: an *in vitro* study. *Toxicon* 1991;29:417-28.

Cells from the immune system exhibiting cytotoxic activity are able to kill tumor or infected cells in a major histocompatibility complex-restricted (cytotoxic lymphocytes) or non-restricted (natural killer cells) manner. In order to exert such a cytotoxicity they have to bind the target cell and release cytotoxic factors able to induce target cell death. Treatment of human peripheral blood mononuclear cells with toxin A from *Clostridium difficile* induced an enhancement of the cytotoxic efficiency of these effector cells. Morphological analysis of effector/target cell pairs seems to suggest that this could be related to an increased ability of cytotoxic effectors to establish close and intertwined contacts with target cells. These contacts involve adhesion molecules and lead to the formation of a "closed chamber" which probably improves the efficacy of lytic factors and results in an increased cytotoxicity.

Mingazzini PL, Scucchi L, Di Stefani D, Malchiodi Albedi F, Ciaralli F, Falchi M, Marinuzzi V. Expression of interphasic nucleolar organizer regions in normal, dysplastic and neoplastic colorectal mucosa. *Virchows Arch A Pathol Anat Histo* 1991;419:487-91.

Silver-binding nucleolar organizer region (Ag-NOR) expression in interphasic nuclei was studied in normal, dysplastic and neoplastic colorectal mucosa at the light microscope level and by means of an image analyser (IBAS II). Both methods showed a progressive

increase in the mean number of Ag-NOR sites per nucleus from mild dysplasia to invasive carcinoma. Ag-NOR counts differed significantly in the various classes of lesions ( $P$  less than 0.001), except between moderate and severe dysplasia ( $P$  greater than 0.05). Severe dysplasia showed a mean number of NORs lower than that for invasive carcinoma though an overlap in the respective frequency distributions was observed. The mean of the variances of the mean dot areas per cell nucleus (pooled variance) also showed a step-wise increase from normal to neoplastic lesions, indicating a greater variability in NOR size as a characteristic of malignant cells. A similar increase was observed in the percentage of nuclear area occupied by Ag-NORs. The mean area per silver-stained dot was also measured in the different classes of lesions by IBAS II. Data obtained showed no significant differences among the values. In conclusion, the wide overlap between the frequency distributions does not allow consideration of the Ag-NOR count alone to be a reliable marker of malignant transformation in a single cell. It appears that the study of Ag-NOR number needs to be evaluated together with dot anisometry in order to be a useful criterion in distinguishing the biological behaviour of neoplastic lesions in colorectal mucosa.

Molinari A, Calcabrini A, Crateri P, Arancia G. Effects of daunomycin on the microtubular network: a cytochemical study on a human melanoma cell line. *Eur J Cell Biol* 1991;54:291-8.

The interaction of daunomycin (DAU), an anthracyclenic antibiotic employed as antitumoral agent, with microtubules, has been investigated by cytochemical and morphological methods on a human melanoma cell line (H14). Results obtained indicated that DAU was able to modulate the microtubule reassembly in cells treated with colcemid; such an effect proved to be dose-dependent. In particular, it has been observed that a low dose of DAU (0.05  $\mu\text{M}$ ) seemed to favor the microtubule reassembly whereas a higher dose (0.10  $\mu\text{M}$ ) impaired this process. In addition, when the anthracyclenic antibiotic was employed together with colcemid, both the cell detachment and the depolymerization of microtubules induced by the mitotic poison were hampered. These effects were dose-dependent and were better accomplished when DAU was used at an equimolar or at higher dose than that employed for the antimicrotubular agent. Moreover, the treatment of cells with DAU alone induced the stabilization of the microtubules, making them more resistant to the action of antimicrotubular agents. This effect could in part explain the antagonistic action exerted by DAU against colcemid. These observations seem to confirm that the microtubular network is an important target involved in the mechanism of action of the anthracyclenic antibiotics.

Paci E, Zappa M, Paoletti L, Buiatti E, Chellini E, Merler E, Seniori Costantini A. Further evidence of an excess of risk of pleural malignant mesothelioma in textile workers in Prato (Italy). *Br J Cancer* 1991;64:377-8.

Paoletti L, Diociaiuti M, Falchi M, Ziemacki G, Pisani D. Quantitative analysis of airborne breathable particles: a comparison between different analytical techniques. *Atmos Environ* 1991;25B:237-42.

Air samples, collected over 6 months, have been analysed by scanning electron microscopy (SEM) with the aim to characterize quantitatively the airborne particulate in an urban area. Total suspended particulate (TSP) and Pb concentrations (in  $\mu\text{g m}^{-3}$ ) were estimated by inserting into a simple model the particulate data obtained by SEM. Daily concentration trends were compared with trends measured by gravimetric (TSP) and atomic absorption spectroscopy (Pb) techniques. The correlation coefficients resulted to be 0.8 for TSP and 0.85 for Pb. These results indicate that SEM can be used to have a good evaluation on pollution by airborne breathable particles.

Paoletti L, Donelli G. Inquinamento ambientale da amianto. In: Habitat costruito, inquinamento e salute, Maroni M. Milano: Franco Angeli Edizioni. 1991; p. 211-9.

Paoletti L, Falchi M, Batisti D, Carrieri MP, Petrelli MG, Ciallella C, Donelli G. Mineral lung burden of an urban population. *Atmos Environ* 1991;25B:381-5.

A study was carried out on mineral lung burden in 85 autopsy cases who died accidentally. Subjects of both sexes aged from 15 to 70 years were selected from all the autopsies performed at the Institute of Forensic Medicine in Rome. These subjects were living in an urban area and were not affected by neoplasm diseases. All selected subjects were residing in Rome at the time of their death. Information on years of legal residence in urban areas, smoking habits and occupational history were obtained by interviews with relatives. Lung parenchyma samples were obtained from the right upper lobe. The mineral particulate matter present in the tissue samples was studied by means of analytical transmission electron microscopy (ATEM) techniques: 16 mineral varieties and 22 metallic elements were identified. Smoke, age and residence seem to have influence on the lung burden.

Paradisi S, Arancia G, Donelli G. Principi e possibilità applicative della crioultramicrotomia. *Ann Ist Super Sanità* 1991;27:249-64.

Questo lavoro prende in esame gli aspetti tecnici ed applicativi della crioultramicrotomia. Sono analizzate le varie fasi di preparazione di campioni biologici quali la fissazione, il congelamento, il taglio e la colorazione delle sezioni. Sono inoltre passate in rassegna le applicazioni di questa tecnica negli studi morfologici, immunocitochimici di microscopia elettronica analitica.

Santini M T, Cametti C, Indovina PL, Malorni W, Benassi M, Gentile FP, Castiglione S, Floridi A. Effects of Ionidamine on the membrane electrical properties of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett* 1991;291:169-72.

The effects of Ionidamine on membrane electrical properties of Ehrlich ascites tumor cells are investigated. Using a dielectric relaxation technique based on the Maxwell-Wagner effect and elaborated by a 'single-shell' fitting procedure, the data indicate that both membrane conductivity and membrane permittivity increase after treatment of these cells with Ionidamine while the conductivity of the cytosol remains unchanged. Changes in membrane proteins and/or lipids are suggested which lead to altered membrane structure and/or function.

Seganti L, Superti F, Sinibaldi L, Marchetti M, Bianchi S, Orsi N. Rabies virus infection in *Aedes pseudoscutellaris* cells: a study on receptorial structures. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1991;14: 265-75.

Rabies virus is able to infect *in vitro* a wide range of homeothermic and poikilothermic cells but little is known about its multiplication in arthropod cells. In this research the infection of rabies virus in *Aedes pseudoscutellaris* cells, a mosquito cell line susceptible to mosquito-borne viruses, was studied. After 60 days of incubation at 26°C up to 70% of infected cells showed the synthesis of both viral nucleocapsid and envelope antigens, although viral yield and cell damage could not be detected. Research performed in order to investigate the role of membrane carbohydrate moieties in rabies virus-mosquito cell interaction suggested the participation of galactose and N-acetylglucosamine whereas sialic acid, known to be a rabies binding site in many homeothermic cell lines, was not involved.

Superti F, Donelli G. Gangliosides as binding sites in SA-11 rotavirus infection of LLC-MK2 cells. *J Gen Virol* 1991;72:2467-74.

The chemical nature of receptors involved in the attachment of simian rotavirus (SA-11) to a monkey kidney cell line (LLC-MK2) was investigated. Enzymic treatment of cells before virus infection indicated that membrane proteins and phospholipids are not involved in virus attachment, whereas sialic acid and galactose participate in the receptor structure to differing extents. Incubation of SA-11 with bovine brain gangliosides before infection strongly reduced its ability to bind to cell membranes. Similar experiments with individual purified gangliosides from bovine brain showed that virus infection was prevented by preincubation with GM1. Moreover, desialylated cells regained susceptibility to virus infection when coated with whole gangliosides or GM1 immediately after *Clostridium perfringens* neuraminidase treatment. The binding of SA-11 to whole gangliosides or GM1 was quantified by an ELISA procedure. The results suggest that gangliosides, mainly GM1, are part of the receptor structure for SA-11 of susceptible LLC-MK2 cells.

Superti F, Marchetti M, Seganti L, Conte MP, Orsi N. Human serum non antibody inhibitors towards SA-11 rotavirus hemagglutination. *Microbiologica* 1991;14:25-30.

In the present work the non-antibody inhibitory activity of human serum towards SA-11 rotavirus hemagglutination (HA) has been studied. Among human serum protein components, inhibitory activity was recovered in fractions III (beta-globulin), IV (alpha-globulin) and V (glycoprotein). Additional experiments performed with purified lipoprotein sub-classes and their lipid and apolipoprotein moieties demonstrated the ability of HDL and HDL1 to prevent SA-11 HA.

Superti F, Tinari A, Baldassarri L, Donelli G. HT-29 cells: a new substrate for rotavirus growth. *Arch Virol* 1991;116:159-73.

Susceptibilities of a continuous rhesus monkey kidney cell line (MA-104) and that of a human colon carcinoma cell line (HT-29) to infection by different human and animal rotavirus strains were compared. HT-29 cells appeared to be more sensitive to human rotavirus infection than MA-104 cells, whereas the latter cell line was more susceptible to animal rotavirus replication. The greater sensitivity to human rotavirus infection of HT-29 cells was confirmed by the successful, direct isolation of these viruses from faecal specimens. Human rotavirus infection of HT-29 cells was also followed by transmission electron microscopy. In ultra-thin sections, unenveloped particles of rotaviruses, representing infectious mature virions, were observed in large number. Moreover, many "double-shelled" particles were detected in negative-stained supernatants from infected cultures. Scanning electron microscopy of uninfected HT-29 cells showed that in the presence of Ca<sup>++</sup>, required for rotavirus growth, they are able to express some of the features of mature intestinal cells. In view of these results, HT-29 cells appear to be a useful *in vitro* model for the study of rotavirus infection.

Taruscio D, Malchiodi Albedi F, Bagnato R, Pauluzzi S, Francisci D, Cavaliere A, Donelli G. Increased reactivity of laminin in the basement membranes of capillary walls in AIDS brain cortex. *Acta Neuropathol* 1991; 81:552-6.

To verify how the components of the capillary wall are modified in the course of AIDS we studied the brain cortex from nine cases with AIDS. Cellular and extracellular components were delineated using antibodies for laminin and collagen IV for basement membranes and glial fibrillary acidic protein for astrocyte foot processes. We found a

marked increase in reactivity for laminin in the basement membranes of capillary walls and hypertrophy and hyperplasia of astrocyte foot processes around vessels, when compared to control cortical tissue. We suggest that modifications of brain capillary wall may have a role in the pathogenesis of neurological dysfunction in AIDS.

Thelestam M, Caspar Shoshan M, Fiorentini C. On the cytotoxic modes of action of *Clostridium difficile* toxins. In: Molecular pathogenesis of gastrointestinal infections, Wädstrom T., Svennerholm AM, Wolf-Watz H, Klemm P. New York: Eds. Plenum Press. 1991;169-73.

Zupi G, Citro G, Cucco C, Molinari A, Calcabrini A, Marangolo M, Arancia G. Effects of the association of adriamycin with the polar solvent N-methylformamide on human melanoma cultured cells. *Cytotechnology* 1991;5:S30-1.

## 1992

Caspar Shoshan M, Fiorentini C, Thelestam M. Cellular signalling pathways involved in intoxication with *Clostridium difficile* toxins A and B. In: Witholt *et al.* (Ed). *Bacterial Protein Toxins*. Stuttgart Gustav Fischer. *Zentralbl Bakteriol* 1992; suppl. 23:146-7.

Diociaiuti M, Bascelli AL, Paoletti L. Extended energy-loss fine-structure and selected area electron diffraction combined study of Cu cluster oxidation. *Vacuum Technology Applications and Ion Physics* 1992;43:575-81.

Donelli G, Fiorentini C. Cell injury and death caused by bacterial protein toxins. *Toxicol Lett* 1992;64/65(Spec No):695-9.

Bacterial protein toxins, such as *Clostridium difficile* toxin A and the Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 are known to exert their cytotoxic action via a modification of some cytoskeletal components. The changes in actin organization caused by these toxins appear to be the primary events in the mechanism leading to cell death.

Donelli G, Fiorentini C, Mastrantonio P, Thelestam M. Cytotoxicity of *Clostridium difficile* toxin A on a rat intestinal cell line. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK (Ed). *Recent Advances in Toxinology Research*. Singapore: National University of Singapore 1992;3:401-6.

*Clostridium difficile* toxin A causes the rounding up and the formation of surface blebs in normal rat intestinal crypt cells (IEC-6). These phenomena appeared to be dependent on the integrity and function of the cytoskeleton. The cytoskeletal changes seem to be the primary event leading to cell injury and death.

Donelli G, Fiorentini C, Thelestam M. Cytotoxic effects induced by *Clostridium difficile* toxin A on rat intestinal IEC-6 cells. In: Witholt *et al.* (Ed). *Bacterial Protein Toxins*. Stuttgart Gustav Fischer. *Zentralbl Bakteriol* 1992;suppl. 23:83-4.

Donelli G, Superti F, Tinari A, Marziano ML. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. *J Med Virol* 1992;38:271-7.

Astroviruses are intestinal pathogens associated with gastroenteritis in man and animals. The mechanism of internalization into host cells has not been reported pre-

viously. The cell entry pathway of serotype 1 human astrovirus into 293 cell line was studied biochemically and morphologically. Viral infection was monitored by indirect immunofluorescence. Infected cells were treated with the lysosomotropic agents ammonium chloride, methylamine, and dansylcadaverine or the ionophore monensin to raise the intraendosomal and intralysosomal pH. All drugs tested inhibited the early stages of infection whereas they did not interfere with the viral binding to the plasma membrane. The presence of astrovirus particles was detected by electron microscopy in coated pits and later in coated vesicles. The data indicate adsorptive endocytosis as the most probable mechanism by which astroviruses enter susceptible cells.

Fiorentini C, Chen Chow S, Mastrantonio P, Jeddi-Tehrani M, Thelestam M. *Clostridium difficile* toxin A induces multinucleation in the human leukemic T cell line JURKAT. *Eur J Cell Biol* 1992;57:292-7.

*Clostridium difficile* toxin A is a cytotoxic enterotoxin known to be active on all mammalian cell lines tested up to now. It induces a disruption of the cytoskeleton, particularly the microfilament system, leading to inhibition of cell proliferation. Here, we describe some effects of toxin A on the leukemic T cell line JURKAT. Cells exposed to the toxin did not divide, as cell numbers remained constant for 3 days in the presence of 0.5 to 1.0 micrograms/ml of the toxin. However, these cells were found to become multinucleated, a phenomenon which was time- and dose-dependent. After treatment for 72 h with 0.5 micrograms/ml toxin A, 95% of the cells were multinucleated and had a considerably increased cell diameter. These effects in JURKAT cells were partially reversible upon removal of the toxin within 12 h after the beginning of toxin exposure, but irreversible after 24 h of toxin treatment. These results suggest a continuing nuclear division in the absence of cytoplasmic division, i.e., an effect of toxin A on contractile ring formation. The JURKAT cell is the first cell type reported to respond to toxin A with multinucleation.

Fiorentini C, Mastrantonio P, Donelli G, Thelestam M. Multinucleation induced by *Clostridium difficile* toxin A in the human leukemic T cell line JURKAT. In: *Bacterial Protein Toxins*. Witholt *et al.* (Ed). Stuttgart Gustav Fischer. *Zentralblatt Bakteriologie* 1992;suppl. 23:81-4.

Malorni W, Donelli G. Cell death: general features and morphological aspects. *Ann NY Acad Sci* 1992;663:218-33.

Malorni W, Meschini S, Arancia G. Cytoskeleton-dependent surface blebbing induced by the polar solvent N-methylformamide. *Exp Mol Pathol* 1992;57:85-104.

*In vivo* and *in vitro* studies performed on the polar solvent N-methylformamide (NMF), as well as on its association with chemotherapeutic agents or X rays, have clearly demonstrated that this compound is capable of inducing changes in biological characteristics of tumor cells, e.g., cell differentiation. However, the mechanism of action of NMF is far from being elucidated. Hence, in order to better clarify such a mechanism an *in vitro* study was carried out by using mouse fibroblasts in primary culture (MEF) and human melanoma cultured cells (M14). Results obtained by immunocytochemical and ultrastructural methods with doses of NMF ranging from 0.1 to 7% are reported here. As a general rule, a different sensitivity (in terms of cytopathologic changes induced by NMF) was found between the cell types considered. In fact, melanoma cells appeared to be highly susceptible to the action of the drug, undergoing severe morphological modifications represented mainly by a reversible dose and time-dependent cell

rounding and surface blebbing. In contrast, NMF-induced injury in MEF cells was characterized mainly by a simple retraction of the cell body. A cytochemical analysis of the expression of certain membrane antigens (e.g., glycoproteins, epidermal growth factor receptor, B2 microglobulin) in NMF-treated M14 cells undergoing blebbing was also carried out. A randomly distributed labeling of such molecules was observed. Accordingly, freeze-fracturing electron microscopic analysis also displayed a random distribution of intramembrane particles over the plasma membrane. When subcellular changes induced by the drug were investigated, a remarkable modification of cytoskeletal components was detected in both cell types. In particular, cross-linked actin microfilament bundles were easily observed in NMF-exposed MEF cells. Finally, when different experimental conditions which perturb calcium ion homeostasis or restore protein thiol group reduced state were analyzed, a noticeable impairment of the blebbing phenomenon was observed. Thus, a target effect of NMF on the microfilament system, probably leading, in turn, to several subcellular changes and cell surface blebbing, can be hypothesized. Such a cytoskeletal element-dependent cytopathology appears to be related to changes of the oxidized state of such molecules as well as to calcium ion perturbations.

Malorni W, Meschini S, Matarrese P, Arancia G. The cytoskeleton as a subcellular target of the antineoplastic-drug Lonidamine. *Anticancer Res* 1992;12(6B):2037-45.

Lonidamine (LND), a dichlorinated derivative of indazole-3-carboxylic acid, has proved to exert a powerful antiproliferative effect and to impair the energy metabolism of normal and neoplastic cells. A target effect of the drug on the cell membrane structure was hypothesized. Thus, in order to elucidate better the mechanism of action of LND, the drug effects on the cell surface as well as on main cytoskeletal elements, i.e. actin microfilaments, microtubules and intermediate filaments, were investigated. In particular, an immunocytochemical and ultrastructural study was performed using two different cell lines: epithelial squamous carcinoma (A431) and melanoma (M14) cells. Treatment with 0.8 mM LND for 8 hr induced a remarkable rearrangement of the F-actin molecules with the disappearance of the stress fibers. As far as microtubules are concerned, formation of perinuclear patches of tubulin were detected after LND treatment. Intermediate filaments appeared to be differently affected by LND in the two cell types. Such changes were detected as an early phenomenon and the extent of the effects observed was positively related to the cell surface alterations and to the loss of cell viability, suggesting that the cytoskeletal elements might represent an additional target in the mechanisms of cytotoxic action of LND.

Malorni W, Paradisi S, Straface E, Santini MT, Donelli G. An *in vitro* morphological investigation of subcellular effects of 50 Hz magnetic fields. Proceedings of IRPA8 (International Radiation Protection Association) 1992; 2:1109-12.

The effect of 50 Hz ELF electromagnetic field were investigated in cultured cells using morphological, ultrastructural and cytological techniques. Experiments conducted at different values of exposure intensity (2.5, 5 and 10 mT) and duration (from 24 to 96 hours) demonstrated that these fields seem to modify slightly surface morphology and intercellular relationship without affecting cell reproductive integrity.

Molinini R, Paoletti L, Albrizio M, Pennella A, Nardulli F, Caruso G. Occupational exposure to asbestos and urinary bladder cancer. *Environ Res* 1992;58:176-83.

By the use of transmission electron microscopy (TEM) and energy dispersion spectrometry the amount (mean value mean = 191 +/- 94 fibers/mg of tissue) and the type

(chrysotile and tremolite) of asbestos fibers have been determined in tissue samples of four bladder cancer patients affected by pulmonary asbestosis, working in the same plant producing asbestos-cement pipes and boards. Similar measurements were carried out on samples of bladder cancers of eight control patients not professionally exposed to asbestos. Only five of them also revealed chrysotile fibers (mean = 151 +/- 196 fibers/mg of tissue). The paucity of the study and control cases and the small quantitative difference between them regarding the presence of infraneoplastic asbestos fibers does not consent us to hypothesize a causal relationship between tumor and occupational exposure.

Superti F, Marziano ML, Tinari A, Donelli G. Effect of polyions on the infectivity of SA-11 rotavirus in LLC-MK2 cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1992;16:55-62.

We investigated the effect of different polyions on the early phases of SA-11 rotavirus infection in susceptible LLC-MK2 cells in order to clarify the influence of electrostatic interactions in rotavirus binding to cell membranes and to select antiviral compounds able to prevent viral attachment. When added during the viral attachment step, polymers having positive charge (protamine, protamine sulphate, DEAE-dextran, histone and poly-L-lysine hydrobromide) enhanced virus infection whereas those having negative charge (mucin, heparin, heparan sulphate,  $\alpha$ -1-acid glycoprotein and dextran sulphate) inhibited the viral replication. The effect of poly-anions on SA-11 rotavirus and on cell membrane receptors has also been examined. Results obtained indicated that while mucin and  $\alpha$ -1-acid glycoprotein act directly on virus particles, the target of heparin, heparan sulphate and dextran sulphate is the host cell membrane.

Superti F, Seganti L, Marchetti M, Marziano ML, Orsi N. SA-11 rotavirus binding to human serum lipoproteins. *Med Microbiol Immunol Infect Dis* 1992;181:77-86.

An investigation of SA-11 rotavirus binding to human serum lipoproteins was carried out. Various subclasses of lipoproteins, purified by ultracentrifugal flotation, and apoproteins were tested for their activity in inhibiting viral infectivity and hemagglutination. All tested lipoprotein subclasses (very low, low and high density, lipoproteins; VLDL, LDL, HDL, HDL1) were shown to interact with SA-11 rotavirus: VLDL and LDL were the most active in preventing rotavirus replication, whereas HDL and HDL1 inhibited viral hemagglutination to a greater extent. Moreover, A1 and A2 apoproteins were effective towards both viral infectivity and hemagglutination. Results obtained are in agreement with a preferential interaction of VP7 or VP4 proteolytic products with low density lipoproteins and of VP8\* with high density lipoproteins. Binding of SA-11 to lipoproteins or apoproteins was also quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay procedure and lipoproteins-virus interaction was visualized by electron microscopy.

Thelestam M, Florin I, Caspar Shoshan M, Fiorentini C. Interaction of *Clostridium difficile* toxin B with cellular functions. In: Witholt *et al.* (Ed). *Bacterial Protein Toxins*. Stuttgart Gustav Fischer. *Zentralbl Bakteriol* 1992;suppl. 23:122-3.

Zarcone D, Cerruti G, Tenca C, Arancia G, Malorni W, Iosi F, Grossi CE. Human NK cell adhesion molecules (CAM's). In: NK Cells, Lotzova E, Herberman RB (Ed). Boca Raton: CRC Press;1992. p. 77-83.

---

---

## INVENTARIO DEGLI STRUMENTI CONSERVATI

Per ogni strumento è riportato il nome principale dello strumento, la data di costruzione o acquisizione, il costruttore, il paese, i materiali, le misure (lunghezza x larghezza x altezza) e il numero di inventario.

### **MICROSCOPIO ELETTRONICO ISS**

1946

Istituto Superiore di Sanità

Italia

acciaio, ferro, bachelite, ottone, rame, vetro, ceramica, gomma

100 x 130 x 210 cm

Istituto Superiore di Sanità

1051

### **ULTRAMICROTOMO**

1954

Istituto Superiore di Sanità (?)

Italia

alluminio, ferro, ottone, acciaio

40 x 15 x 25 cm

Istituto Superiore di Sanità

1052

### **ULTRAMICROTOMO ROTATIVO**

1957

Reichert, Austria

ferro, ottone, acciaio

20 x 20 x 30 cm

Istituto Superiore di Sanità

1053

### **LASTRE FOTOGRAFICHE RELATIVE ALLE PRIME MICROGRAFIE ELETTRONICHE (n. 88) NEI LORO CONTENITORI IN LEGNO (2)**

1942

Kodak

vetro, nitrato di argento, collodio

9 x 12

Istituto Superiore di Sanità

1054

---

**Nella stessa collana**

*I Laboratori di Chimica Terapeutica.* A cura di Giorgio Bignami e Amilcare Carpi De Resmini, 2005 (Quaderno 1).

*Microanalisi elementare organica. Collezione di strumenti.* A cura di Anna Farina e Cecilia Bedetti, 2007 (Quaderno 2).

*Convegno. Storie e memorie dell'Istituto Superiore di Sanità. Roma, 4 febbraio 2008.* Atti a cura di Cecilia Bedetti, Paola De Castro e Sara Modigliani, 2008 (Quaderno 3).

*La microscopia elettronica all'Istituto Superiore di Sanità dal 1942 al 1992: dai Laboratori di Fisica al Laboratorio di Ultrastrutture.* Gianfranco Donelli, 2008 (Quaderno 4).

---

---

Finito di stampare nel mese di dicembre 2008 dal  
Centro Stampa De Vittoria srl  
Via degli Aurunci, 19 - Roma