



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

PFA

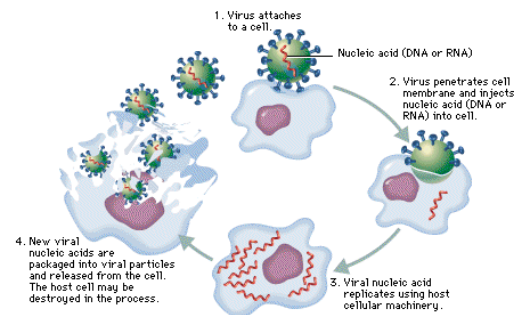
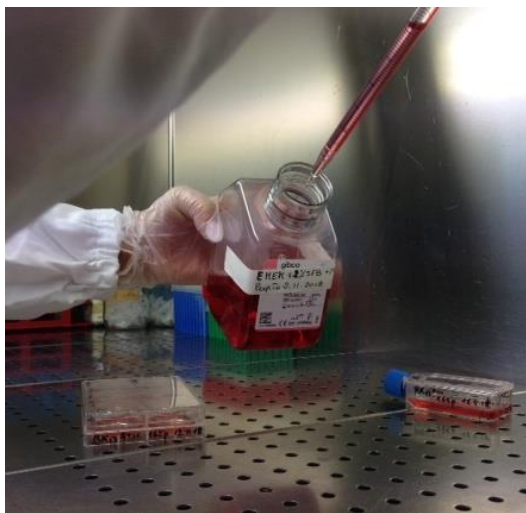
Formazione Interdisciplinare su Attività di Sanità Animale presso le Strutture di Biotecnologie e Diagnosi delle Malattie Virali

2° Modulo

Caratteristiche Fondamentali del Laboratorio di Virologia Pratica

29 novembre – 11 dicembre 2018

Isolamento dei Virus su Colture cellulari: Principi, Strumentazione e Metodiche



Giusy Cardeti

Lab. Microscopia elettronica e Virologia speciale



Indice degli argomenti trattati

- ✓ Diagnostica virologica e coltivazione dei virus animali
- ✓ Isolamento dei virus su colture cellulari
- ✓ Matrici e lavorazione per l'inoculo: regole e criticità
- ✓ Agenti virali ed Effetti citopatici
- ✓ Colture cellulari ed Ittiovirologia
- ✓ Vantaggi e svantaggi delle colture cellulari
- ✓ IZSLT: approccio combinato delle tecniche diagnostiche e struttura del Laboratorio di ME - Virologia sp.

Diagnosi di laboratorio delle infezioni virali

Approccio Generale

1. Presuppone un'adeguata diagnosi clinica

- Corretto inquadramento differenziale sul piano clinico per restringere lo spettro delle indagini da eseguire

2. Buona conoscenza della patogenesi delle infezioni sospette

- Corretto prelievo ed invio di un adeguato campione clinico

3. Diagnosi di laboratorio indispensabile quando:

- Sia prospettabile uno specifico intervento profilattico o di polizia veterinaria
- Il quadro clinico può essere sostenuto da più virus non correlati (forme esantematiche, infezioni respiratorie)
- Si ricerchi l'agente eziologico di nuove o gravi patologie
- Si eseguano indagini a carattere epidemiologico su una determinata popolazione



Diagnostica Virale in Laboratorio

Può essere eseguita in maniera:

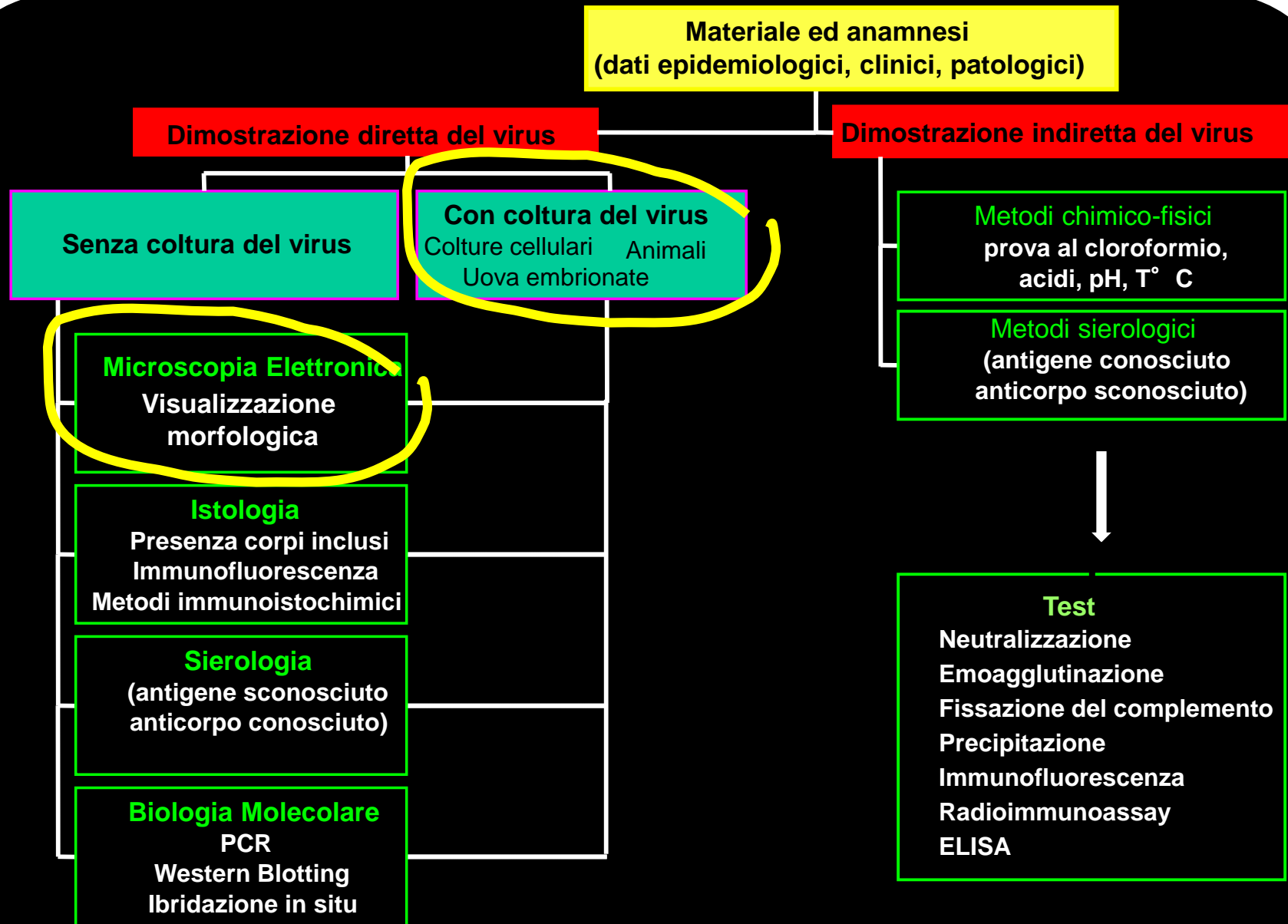
- **DIRETTA**: ricerca ed identificazione del virus o dei suoi componenti nel materiale patologico
- **INDIRETTA**: dimostrando una risposta immunitaria specifica e significativa

Fino agli anni '80-90: tecniche limitate a colture cellulari e metodi sierologici

Con l'avvento di tecniche biomolecolari molto sensibili (PCR e derivati), di reagenti biotecnologici (sonde, mAbs) -> analisi più veloci, affidabili, in massima sicurezza



Schema di lavoro nella diagnostica virologica



Dimostrazione diretta del virus

Isolamento o Coltivazione virale

*E' il **GOLD STANDARD** tra le metodiche utilizzate in diagnosi virologica.*

*I virus sono patogeni "**intracellulari obbligati**",*

quindi:

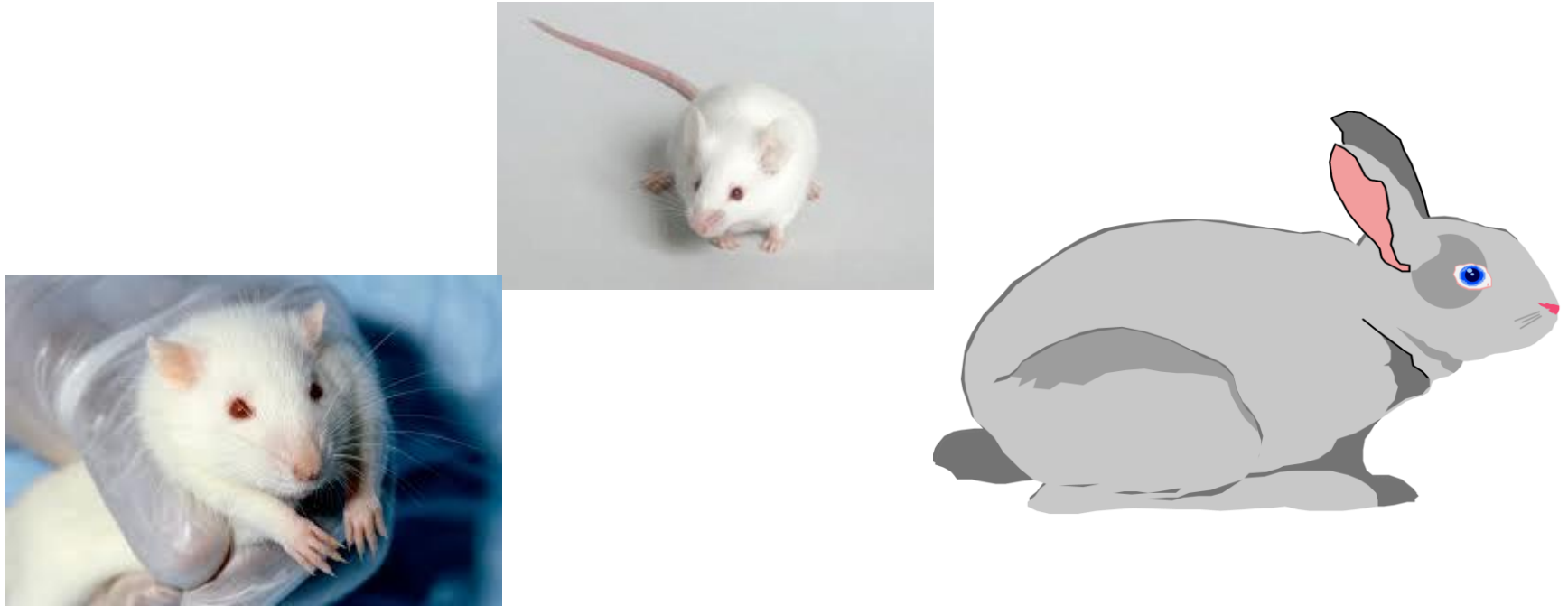
*richiedono l'inoculazione in ospiti viventi **adeguati** (cioè: **sensibili** e **permissivi**)*

OSPITI PER L'ISOLAMENTO DI:

- Fagi (batteriofagi o virus batterici)
 - Batteri
- **Virus animali**
 - Animale
 - Uova embrionate
 - Coltura cellulare animale
- Virus vegetali
 - Pianta
 - Coltura cellulare vegetale

Animali -> animali da laboratorio

Storicamente, il primo metodo per studiare la propagazione dei virus

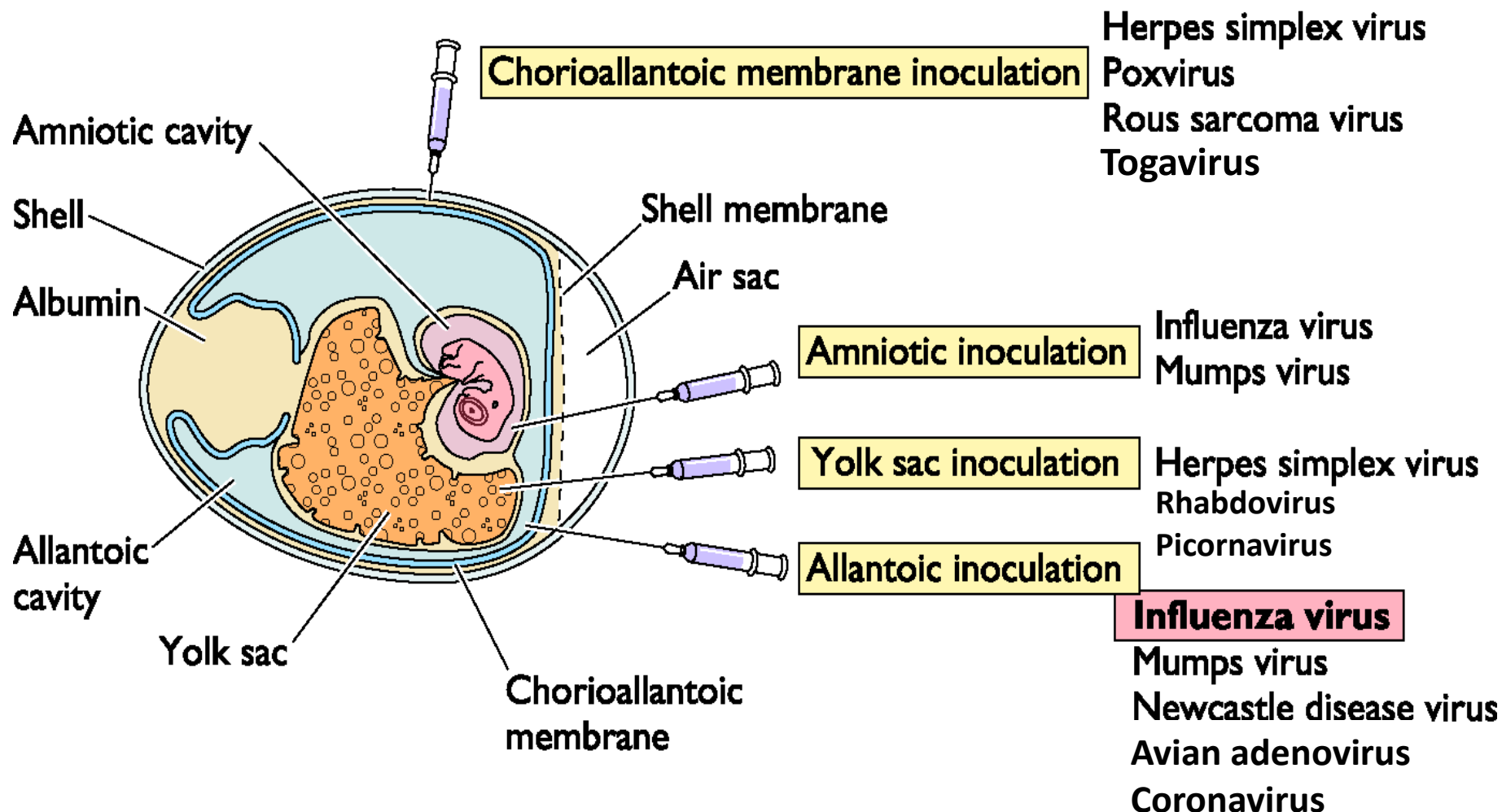


Svantaggi: 1) costoso; 2) non omogeneo; 3) generazione di mutanti virali;
4) problemi etici

Vantaggi: 1) informazioni sui meccanismi patogenetici del virus;
2) alcuni virus possono essere studiati solo *in vivo*

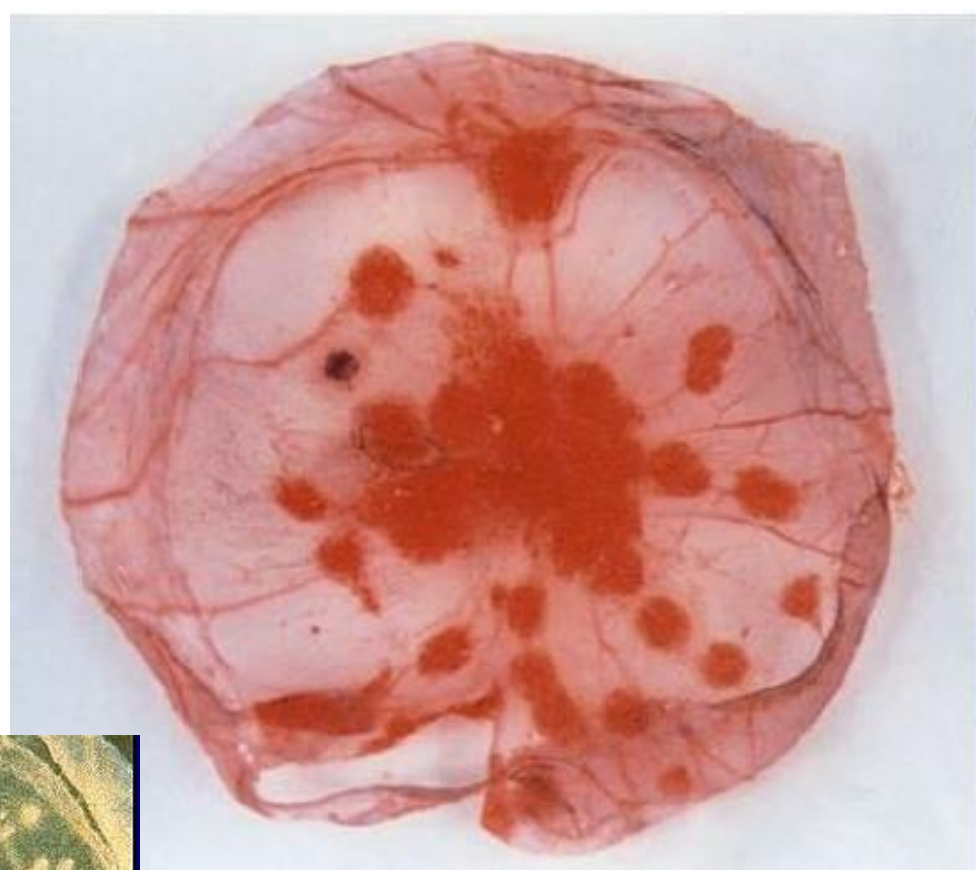


Uovo Embrionato



Davis, Duylbecco, Eisen, Ginsberg "Microbiology" 4th ed, J.B. Lippincott 1990, Fig. 48-1

“Pocks” emorragici da Cowpox virus sulla membrana corion-allantoidea (CAM) di embrioni di pollo (incubazione x 3 gg a 37,5°C)



“Pocks” virus della pseudorabbia su CAM di embrioni di pollo



Field's Virology.
Fifth edition, 2007

www.helmholtz-muenchen.de



Colture cellulari

Caratteristiche principali:

- Metodo di elezione per la **coltivazione dei virus** animali
- Coltivazione del virus su **larga scala** (infezione sincrona e condizioni chimico-fisiche standard) x produzione vaccini

1949: prima volta che un virus, il **poliovirus**, è stato propagato con successo in colture di cellule eucariote.

Enders, Weller, Robbins: premio Nobel, 1954

Presso il Laboratorio di Microscopia elettr.ca e Virologia sp.

- Diagnostica virus degli animali domestici e selvatici e di alcuni virus di pesci, anfibi, rettili e zanzare
- Produzione di antigeni virali da usare in test sierologici
- Ricerca

attività di isolamento su colture cellulari con successiva identificazione dei ceppi virali isolati

Particelle virali vs. virioni infettanti

Non tutte le particelle virali sono infettanti: in molti casi, la maggior parte dei virioni non è infettante (rapporto particelle infettanti/totali 1:200)

Rapporto tra n° totale di particelle virali e virioni infettanti -> definito come rapporto **Particelle/PFU**

Table 2.2 Particle/plaque-forming unit ratios of some animal viruses

Virus	Particle/PFU ratio
<i>Picornaviridae</i>	
Poliovirus	30–1,000
<i>Alphaviridae</i>	
Semliki Forest virus	1–2
<i>Orthomyxoviridae</i>	
Influenza virus	20–50
<i>Reoviridae</i>	
Reovirus	10
<i>Papovaviridae</i>	
Polyomavirus	38–50
Simian virus 40	100–200
Papillomavirus	10,000
<i>Adenoviridae</i>	20–100
<i>Poxviridae</i>	1–100
<i>Herpesviridae</i>	
Herpes simplex virus	50–200

Fields Virology, 4th ed, Knipe & Howley, eds, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, Fig. 2-4

Molteplicità di infezione (Molteplcity Of Infection, MOI): rapporto tra numero di agenti infettanti (batteri, virus) e numero di cellule infettate, presenti in un sistema sperimentale.

ISOLAMENTO DEL VIRUS IN COLTURE CELLULARI

INFEZIONI VIRALI

Allestimento delle colture *in vitro*

Inoculazione del campione

Incubazione

Identificazione e tipizzazione del virus



Sospensione virale

1 h a 37°C

cellule permissive

Presenza di recettori e fattori necessari al ciclo replicativo del virus

(infez. produttiva, persistente, latente, restrittiva)

ECP

cellule resistenti

Assenza di recettori e fattori essenziali per espressione del genoma e sintesi delle proteine virali

cellule non permissive

Mancano di fattori necessari al ciclo replicativo del virus
(infez. abortiva)

Tipologie di colture cellulari e grado di sensibilità all'infezione:

Coltivazione dei virus

I virus sono parassiti endocellulari obbligati pertanto devono:

- Entrare in contatto (aderire)
- Penetrare in una cellula ospite dentro la quale si possa svolgere il loro ciclo replicativo



Cellula sensibile e permissiva

Primarie: vita a breve termine (20-30 generazioni), **ampio spettro di infezione** virale. *Paramyxo, Entero, Adenovirus*. Ottime per isolamento di virus “wild”

Semicontinue o diploidi: vita più lunga (fino a 70 generazioni), **spettro di infezione** virale **simile** alle primarie. *Herpes, Cytomegalo, Adenovirus*. Utili per isolamento di virus “wild”

Continue: replicazione indefinita, **spettro di infezione** virale **ridotto**. Ottime per la coltivazione di ceppi virali adattati, produzione di antigeni e relativi test sierologici; produzione di vaccini

Nuovi sistemi di CC: Co-colture cellulari (più linee e più virus contemporaneamente)
Linee cellulari transgeniche (*Virus del Cimurro, HIV*).



Quali Colture cellulari scegliere

Specie animale	CC dalla stessa specie
Bovini	Aubek, MDBK, PEB, EBTr, FLK
Bufalini	Aubek, MDBK, PEB, Bu
Ovini, caprini	Aubek, MDBK, FLK
Suidi	PK-15, MPK, NSK, ST
Equini	ED, EDe, EEL
Cane	MDCK, DH-82, A72
Gatto	CRFK
Selvatici, esotici, pets	BHK-21, Vero
Serpenti	VH-2
Tartarughe terrestri	TH-1
Ciprinidi	EPC, CCB
Anguille	EK-2

Coltivazione dei virus

I virus sono parassiti endocellulari obbligati pertanto devono:

- Entrare in contatto (aderire)
- Penetrare in una cellula ospite dentro la quale si possa svolgere il loro ciclo replicativo



Cellula sensibile e permissiva

Virus	Coltura cellulare
Virus Schmallerberg	BHK-21
Virus Morbo di Audjeszky	RK-13
Virus Arterite virale equina	RK-13
Herpesvirus equini	RK-13
Orthomyxovirus	MDCK
Virus respiratorio sinciziale bovino	VERO
Morbillivirus	B95a
Parvovirus canino	CRFK
Rhabdovirus pesci - spp varie	BF-2, EPC
Betanodavirus pesci - spp varie	SSN-1

Procedura per Isolamento Virus su Colture cellulari

Matrici biologiche: liquidi biologici, escreti, secreti, tamponi, tessuti o organi (PG VIR 002)

Procedimento (POS VIR 012 INT, 027 NOR, 013 NOR, 014 NOR):

- Omogeneizzazione del campione in terreno antibiotato
- Centrifugazione 3000 g x 30' e/o filtrazione 0,22-0,45 μ
- Inoculazione dell'estratto su idonea coltura cellulare a seconda del tropismo virale
- Incubazione a 37°C e 5% di CO₂ x 7 gg
- Osservazione quotidiana al microscopio ottico
- Dopo 7 gg -> passaggio cieco oppure se ECP

identificazione del virus (PG VIR 005; POS VIR 014-015-016 INT; POS VIR 001 NOR)

Allestimento delle colture *in vitro*



Inoculazione del campione



Incubazione



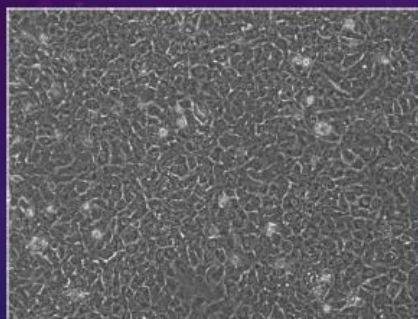
Identificazione e tipizzazione del virus



ISOLAMENTO (COLTIVAZIONE) VIRALE

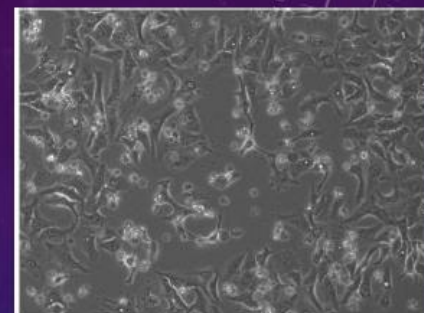
TECNICA DI ISOLAMENTO

C.I. Medicina di
Lab. Microbiologia
Clinica. CL Medicina e
Chirurgia-AA 2014-
2015. Mod.4:
DIAGNOSI DI
LABORATORIO
DELLE INFEZIONI
VIRALI
*Dr. Giovanni Di
Bonaventura*

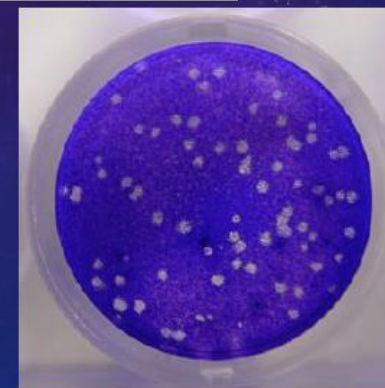


Normal human epithelial cells

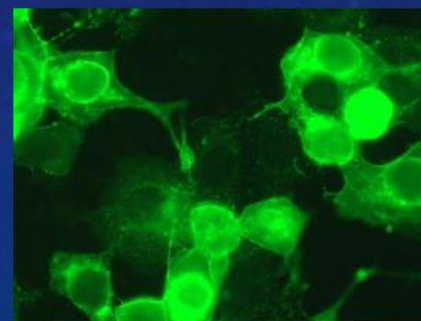
Esposizione del monostrato
cellulare al campione



Adenovirus infected human epithelial cells



Rilevazione di antigeni virali
(virus a crescita lenta o CPE-)



Effetto citopatico
(CPE o **placca**)

Cellule giovani

Materialie patologico

**Campione giusto al momento giusto.
Trasporto immediato.**

**Il materiale clinico deve essere raccolto
nei SITI di replicazione/eliminazione, in
fase ACUTA INIZIALE, considerando che il
picco della replicazione virale solitamente
precede di 2-3 giorni la sintomatologia.**



Campionamento: tipologia, invio e conservazione

Tamponi diagnostici: in 2 mL di solvente

(PBS; EMEM+SFB+Antibiotici-Antimicotici; appositi terreni)

Sangue con anticoagulante (EDTA): almeno 5 mL

Lesioni cutanee e Organi: prelievo degli organi target con/senza lesioni in azienda o in necropsia

Liquidi Seminali: stalloni sieropositivi per Arterite virale equina; almeno 15 mL



Condizioni di invio e conservazione:

Identificati e con verbale; in laboratorio a +4°C entro 24h o congelati a $\leq -20^{\circ}\text{C}$

Pesci: prelievo organi in azienda o entro poche ore in laboratorio (x IHN e VHS, vedi Dec. 2015-1554 UE); iniziare subito l'indagine virologica o congelare a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ (se organi) o $\leq -80^{\circ}\text{C}$ (se omogenato) x max 14 gg.

Materiale patologico

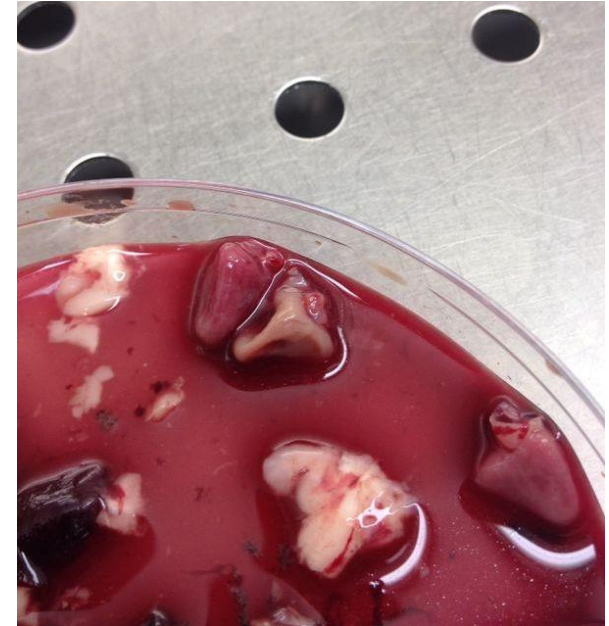
Intestino



Liquido seminale



Pesci



Tampone nasale



Organi

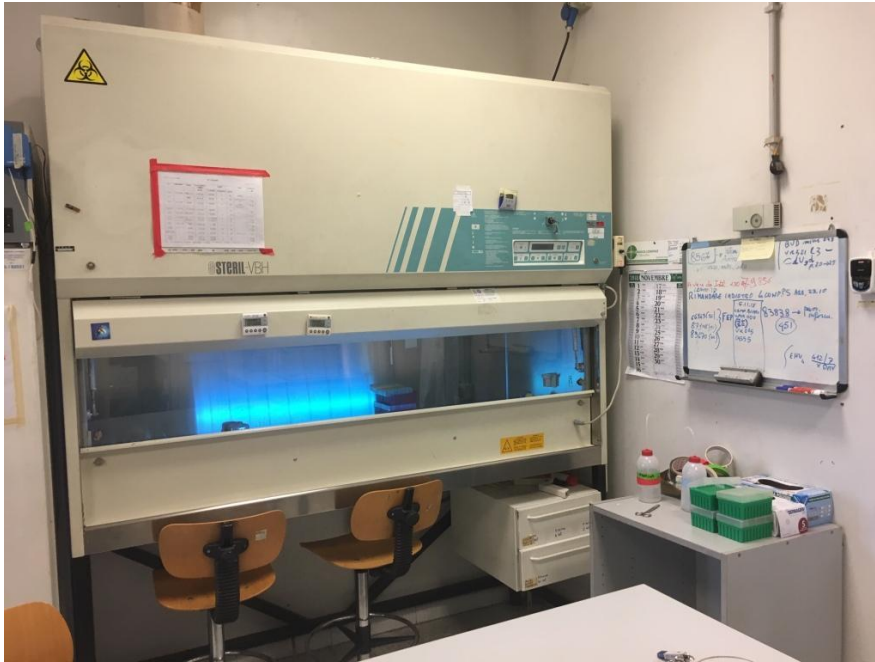


Zanzare

Campioni confezionati non correttamente



Preparazione Omogenati d'organo



in EMEM + 5%PSF α
+4°C o α -20°C

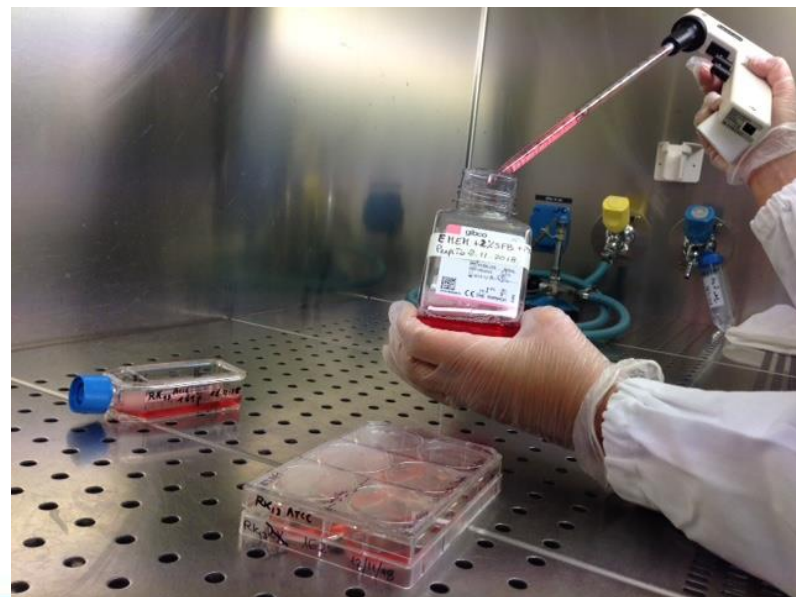


1. Omogenizzazione
1:10 p/v in terreno
antibiotato (filmato)
2. Centrifugazione a
3000 g x 30'
3. Filtrazione (camp. mal conservati)



Eliminazione
di cellule e
batteri

Preparazione subcoltura cellulare e inoculo di materiale biologico



L'infezione

- Asportare il terreno di coltura
- Lavare le cellule con terreno di coltura senza siero
- Inoculare il campione (pre-trattato)
- Incubare a temperatura indicata
- Asportare l'inoculo
- Aggiungere il terreno di mantenimento
- Incubare

Valutazione della crescita del virus nelle colture cellulari

- Effetti dello sviluppo del virus

- ECP (+/- specifico)

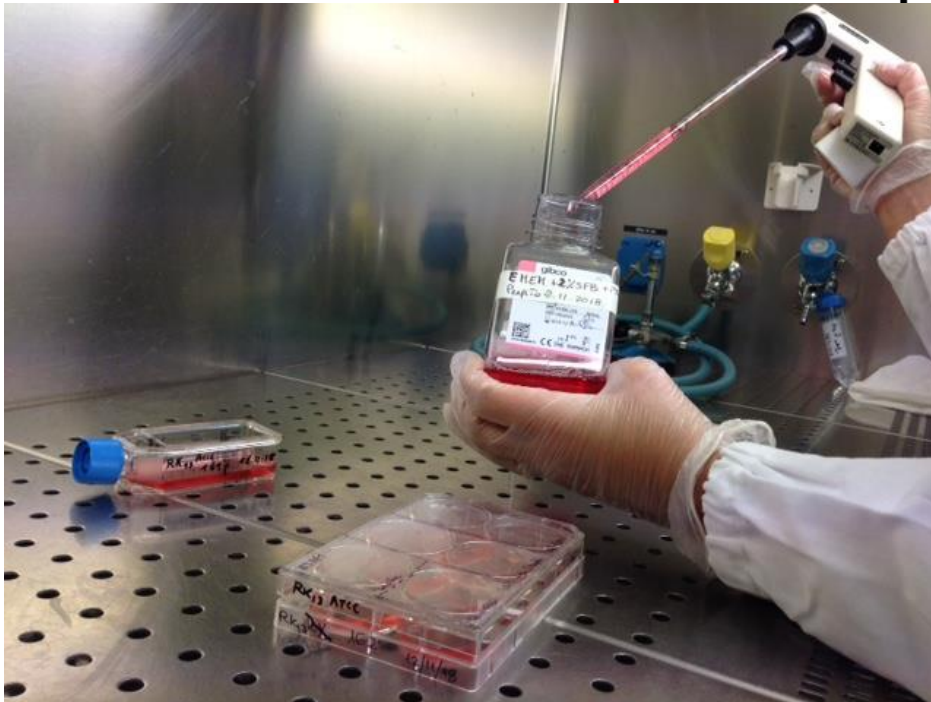
- Emoadsorbimento

- Emoagglutinazione

-

Necessità di test di identificazione del virus:
inibizione dell'emoagglutinazione,
neutralizzazione, IEA, IF, metodi molecolari
(PCR)

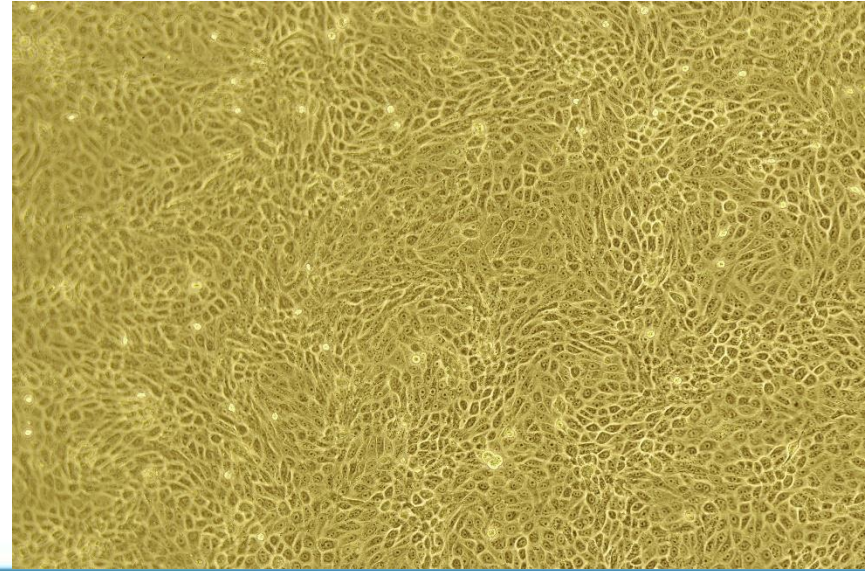
dal web



Osservazione del monostrato al MO rovesciato



MDBK 20X



Virus – Coltura cellulare - ECP

Definizione ECP

**alterazioni della morfologia
cellulare dovuta all'azione
del virus**

VIRUS

- a effetto citopatico
- senza effetto citopatico

Al microscopio ottico:

- disintegrazione cellulare -> **lisi** del tappeto
 - formazione di cellule multinucleate o **sincizi**
 - comparsa di cellule con **vacuoli**
 - formazione di **corpi inclusi**
- > **lisi** del tappeto

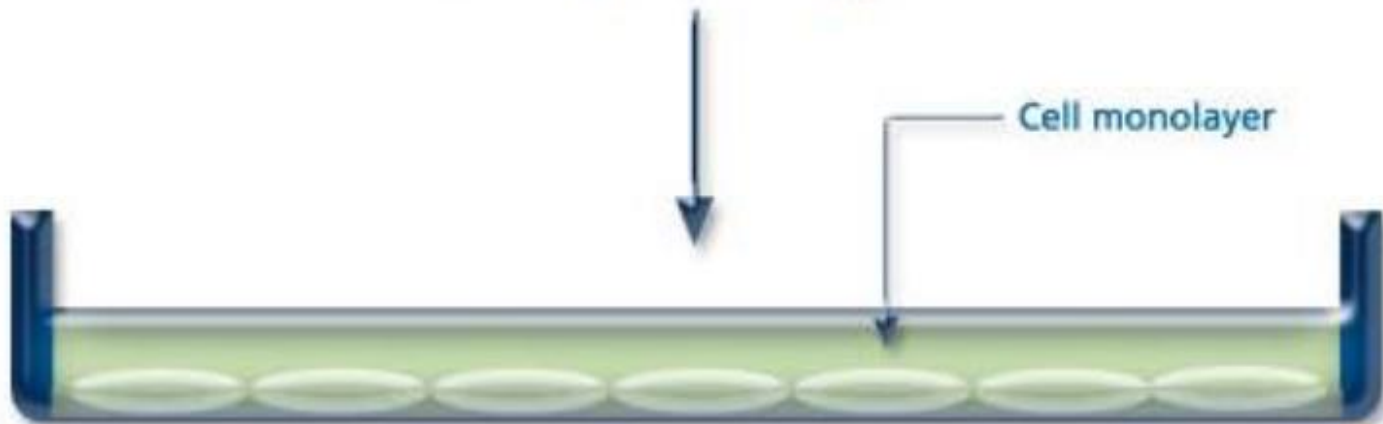
- **Tipo di ECP**
- **tempo di comparsa**
- **velocità di progressione**

dipendono da:

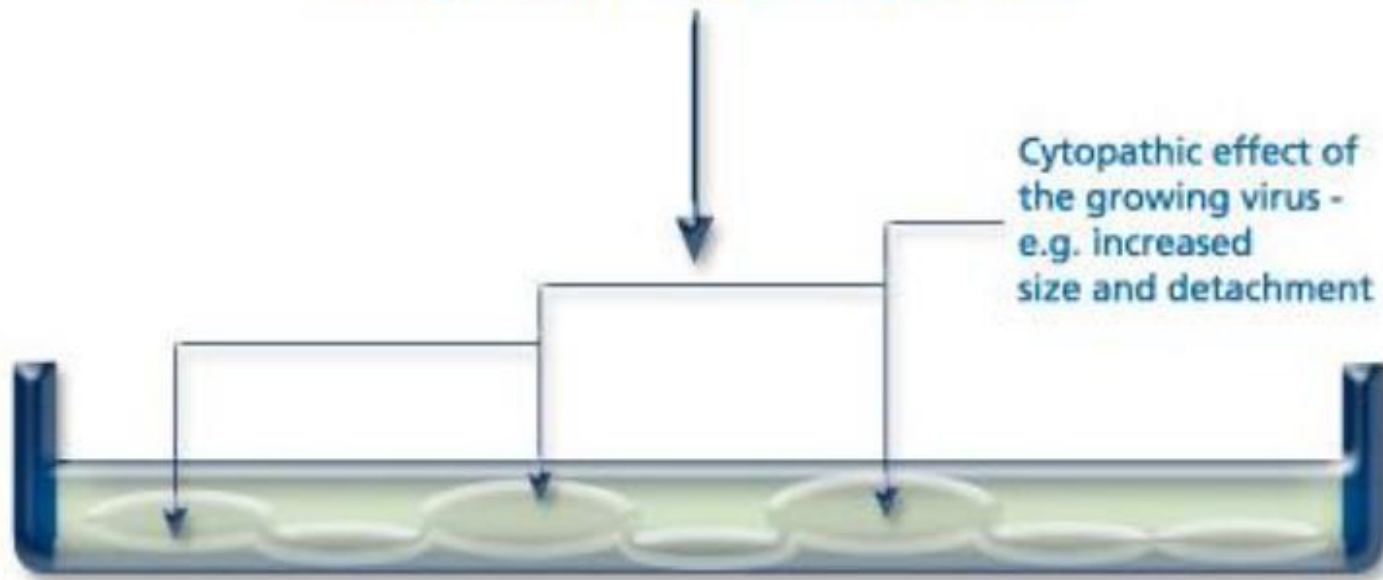
- tipo di cellule infettate
- tipo di virus infettante



Add sample containing virus



Virus grows in cells for a variable time



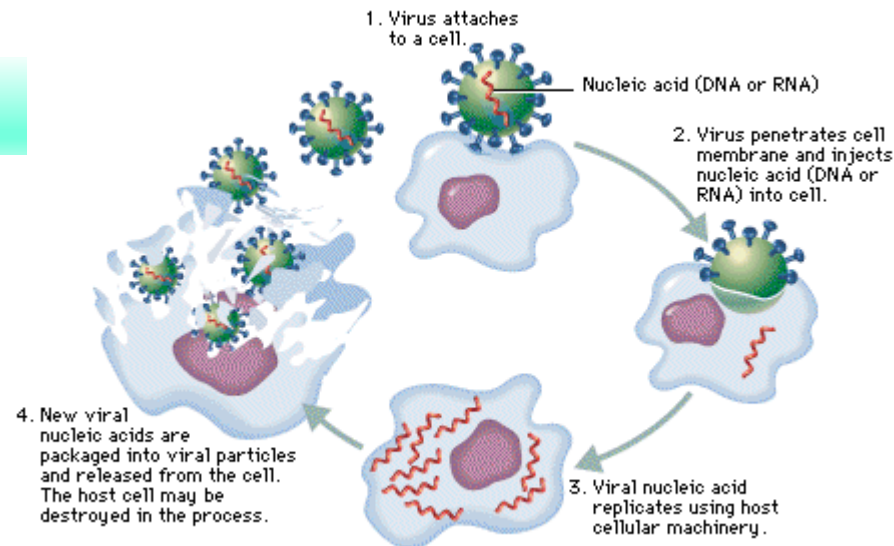
Presenza del virus rivelata dall' ECP



Comparsa tra 1 giorno e 2-3 settimane
in funzione del virus (tipo e quantità)

TIPI di ECP

caratteristico per molti virus

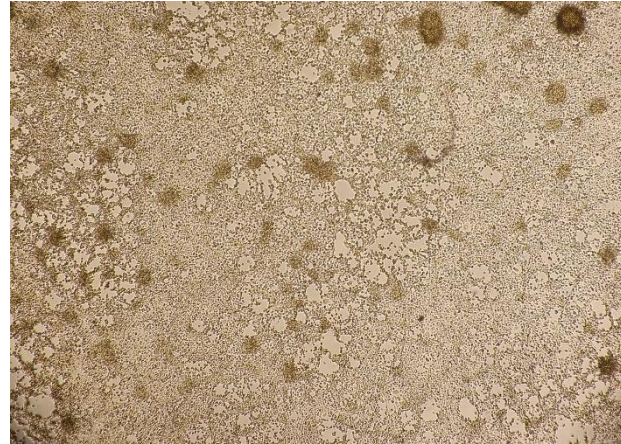


1. **Disgregazione cellulare:** *Picornavirus* (Entero, EMCV)
2. **Sincizi:** *Morbillivirus* (CDV), PI-3, *Herpesvirus* (SuHV-1, EHV-1)
3. **Vacuoli:** virus BVD
4. **Corpi inclusi:** Virus della rabbia, *Poxvirus*, *Adenovirus*

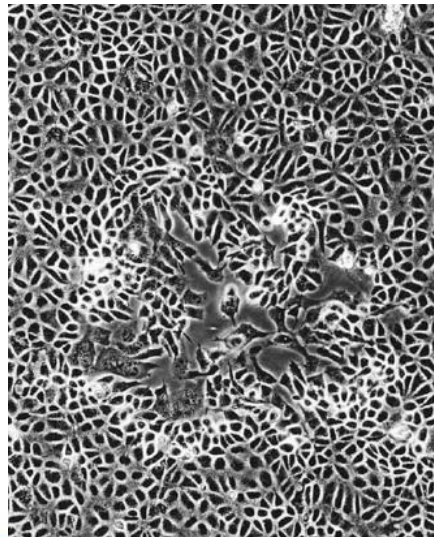
• Disgregazione cellulare

Degenerazione delle cellule, «cell rounding», cellule di volume diverso e traslucide -> successiva **lisi** = morte cellulare e distruzione del monostrato

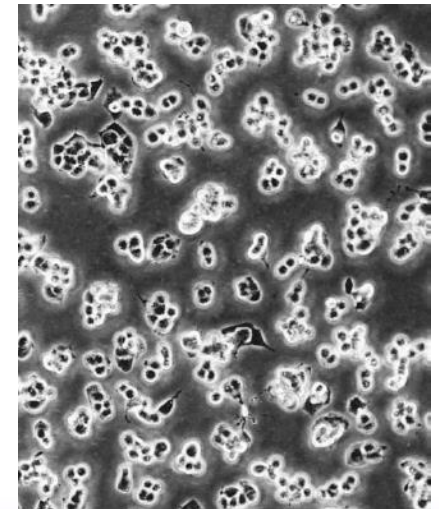
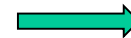
Virus VHS: Degenerazione cellulare con cellule arrotondate, minor volume, a focolai e poi lisi di tutto il monostrato



Poxvirus: lisi a placca e poi lisi di tutto il monostrato

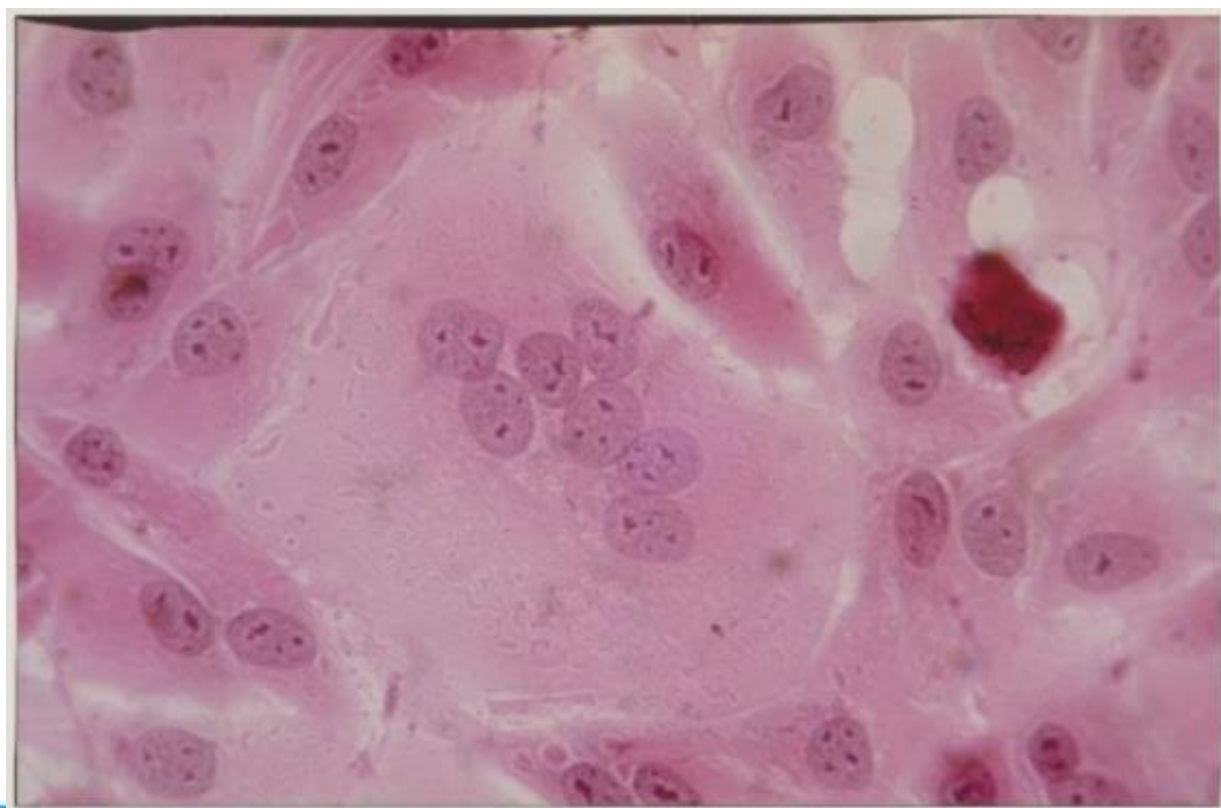
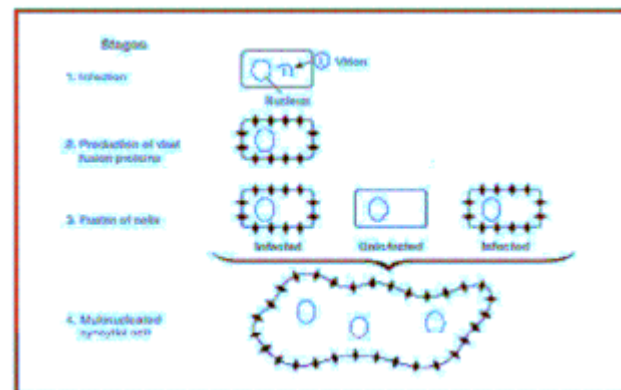


Field's Virology.
Fifth edition,
2007



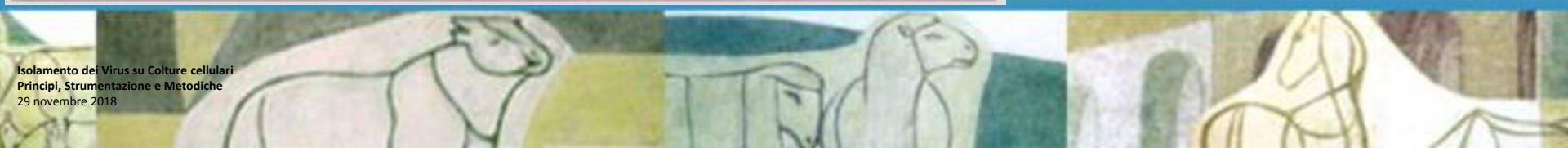
• Sincizi

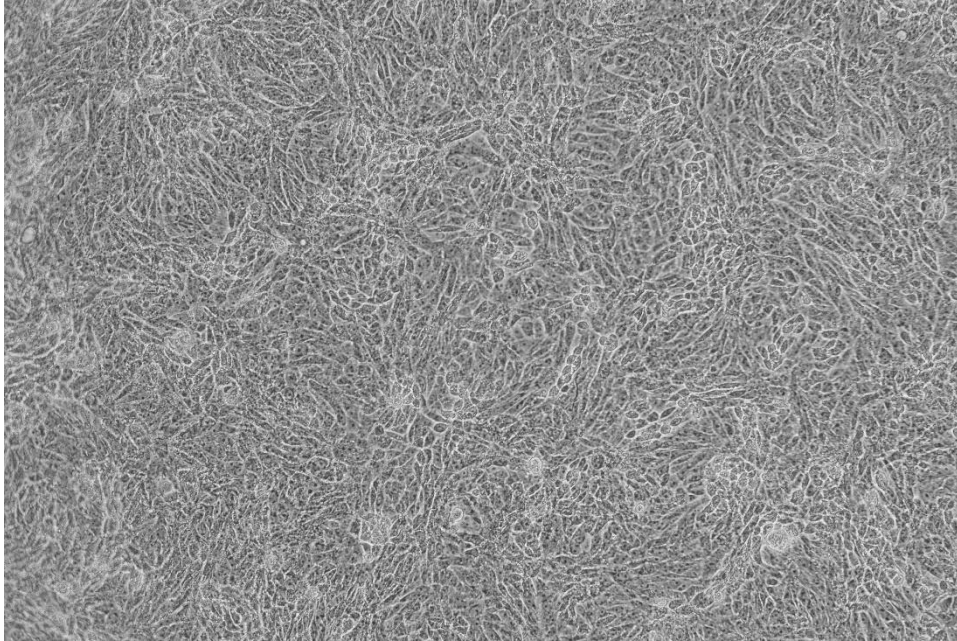
Esteriorizzazione di **proteine F** di fusione sulla membrana cellulare -> fusione delle membrane cellulari di cellule contigue -> cellule multinucleate



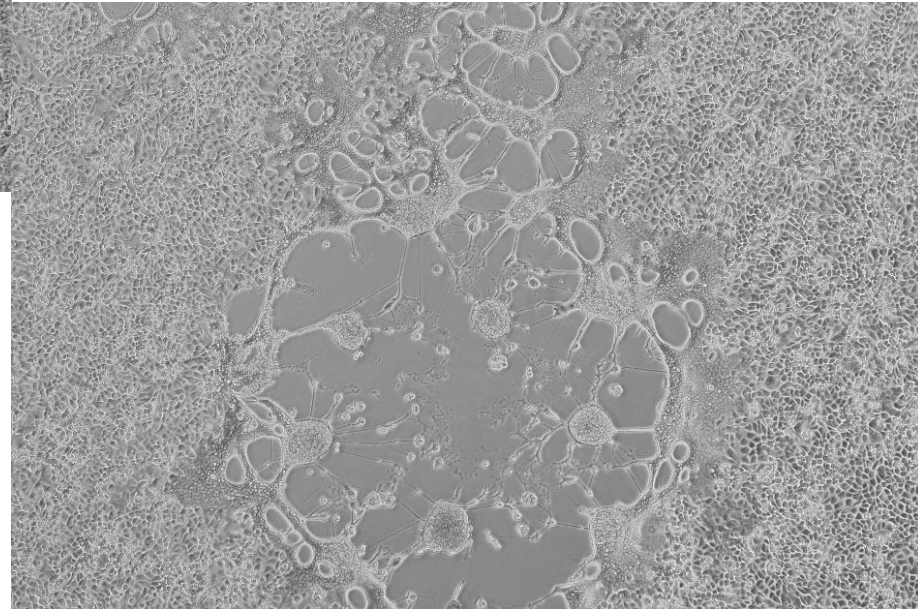
Virus Cimurro

(colorazione EE, 40x)



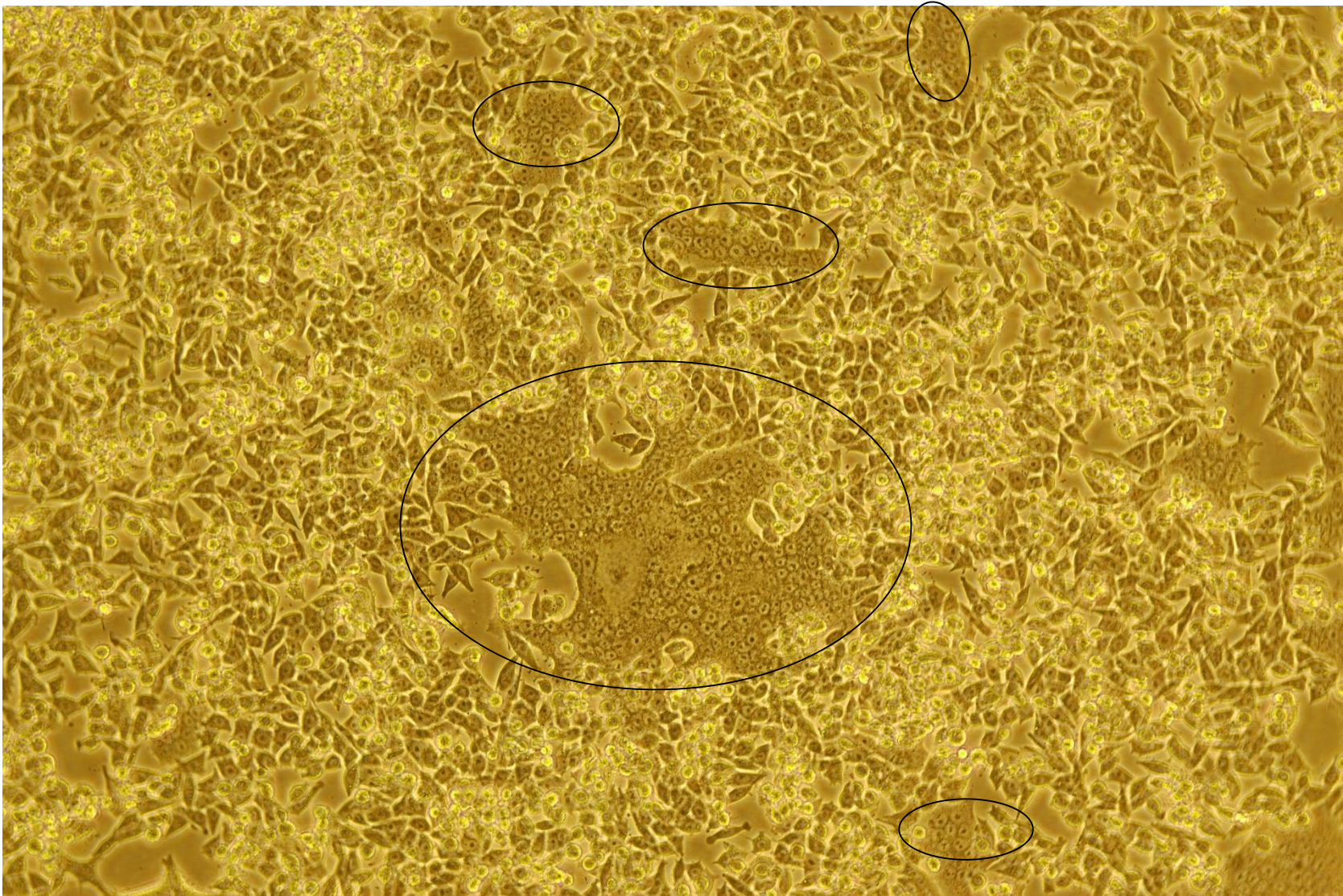


**A confronto:
tappeto di RK-13 non
infette e con ECP**



EHV-1: Degenerazione
palloniiforme, sincizi, distacco del
monostrato (aspetto a ruota di
carro)



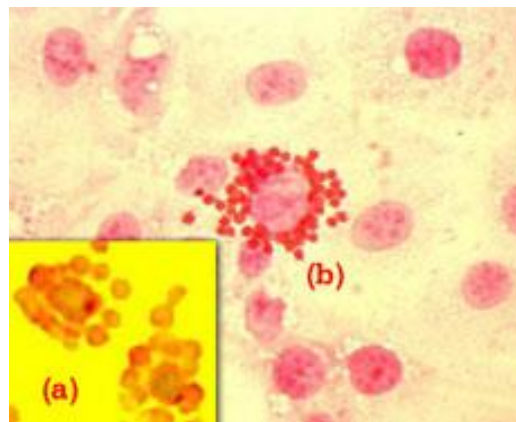
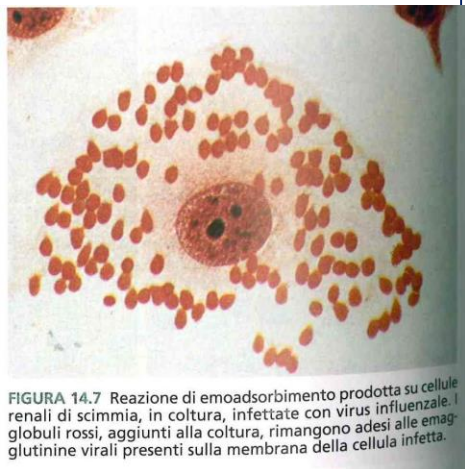


Virus Cimurro: Sincizi su cellule Vero (MO, 20x)



Alterazione della membrana cellulare

Esteriorizzazione di **glicoproteine** virali sulla membrana cellulare = emoagglutinine
-> capacità di adsorbire e trattenere i globuli rossi



Virus PSA

(colorazione EE, 20x)

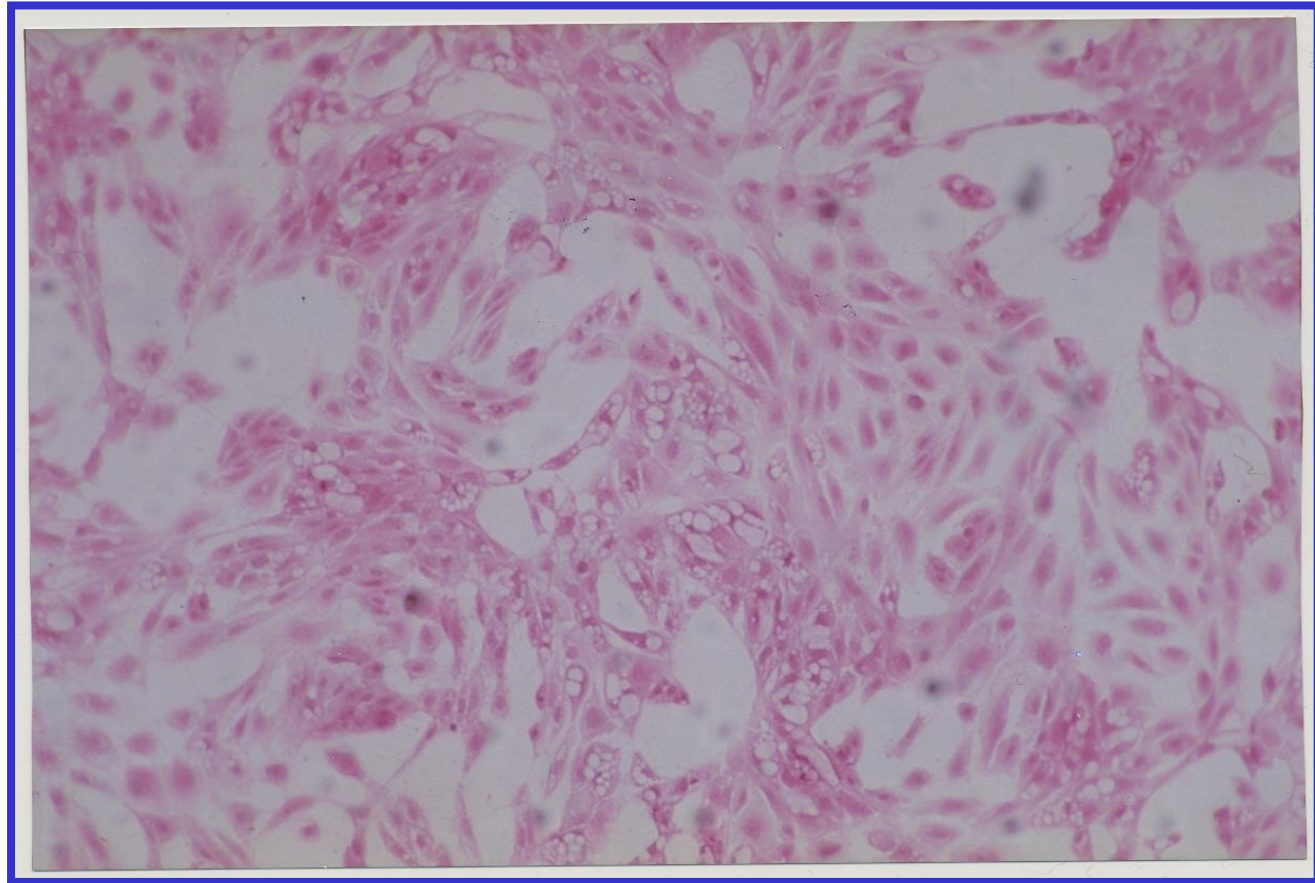
Formazione di **rosette** =
cellule circondate da
eritrociti

Reazione dell'**emoadsorbimento**
= virus non citopatici o a lenta
comparsa di ECP

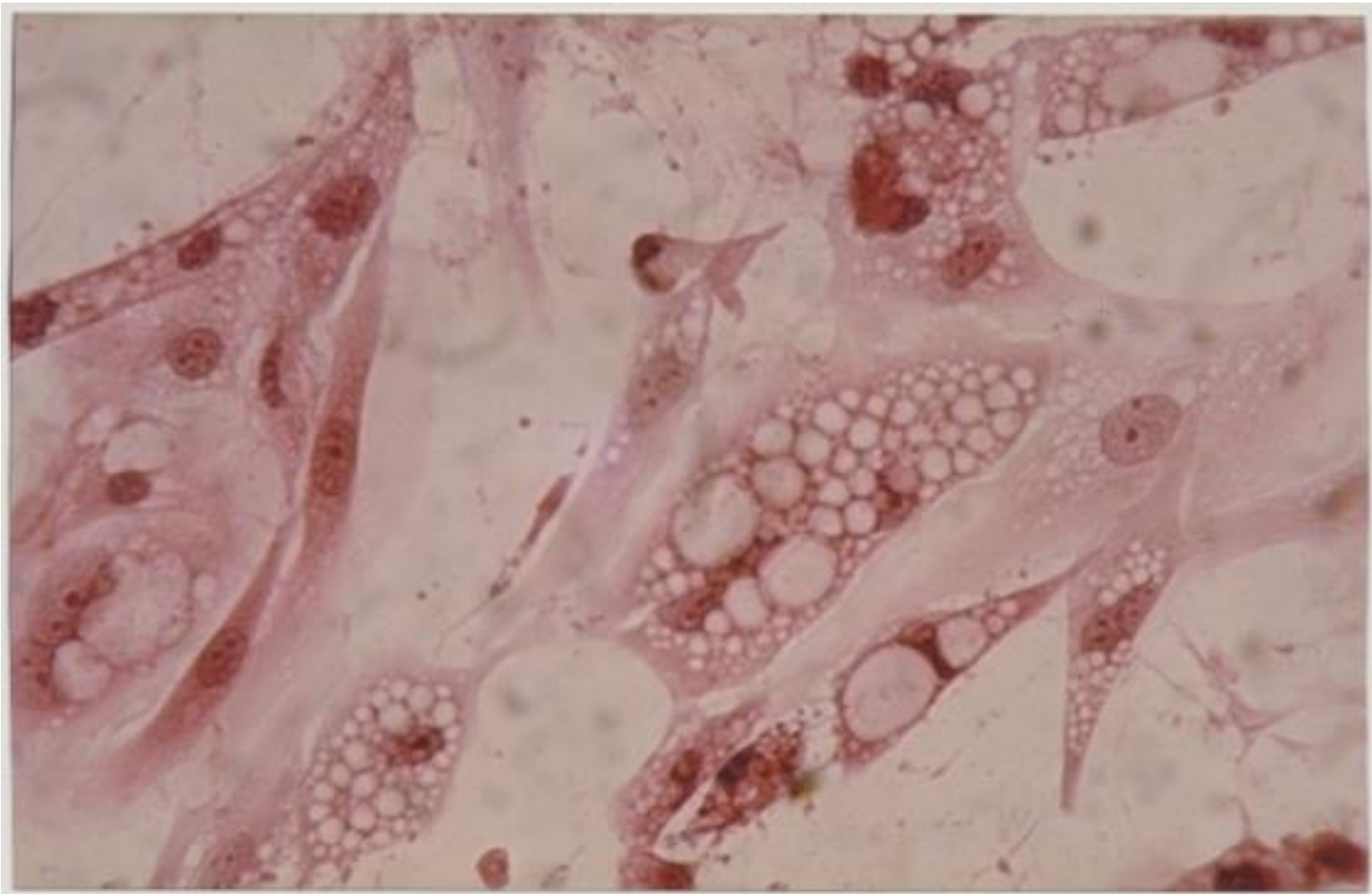
•Vacuoli

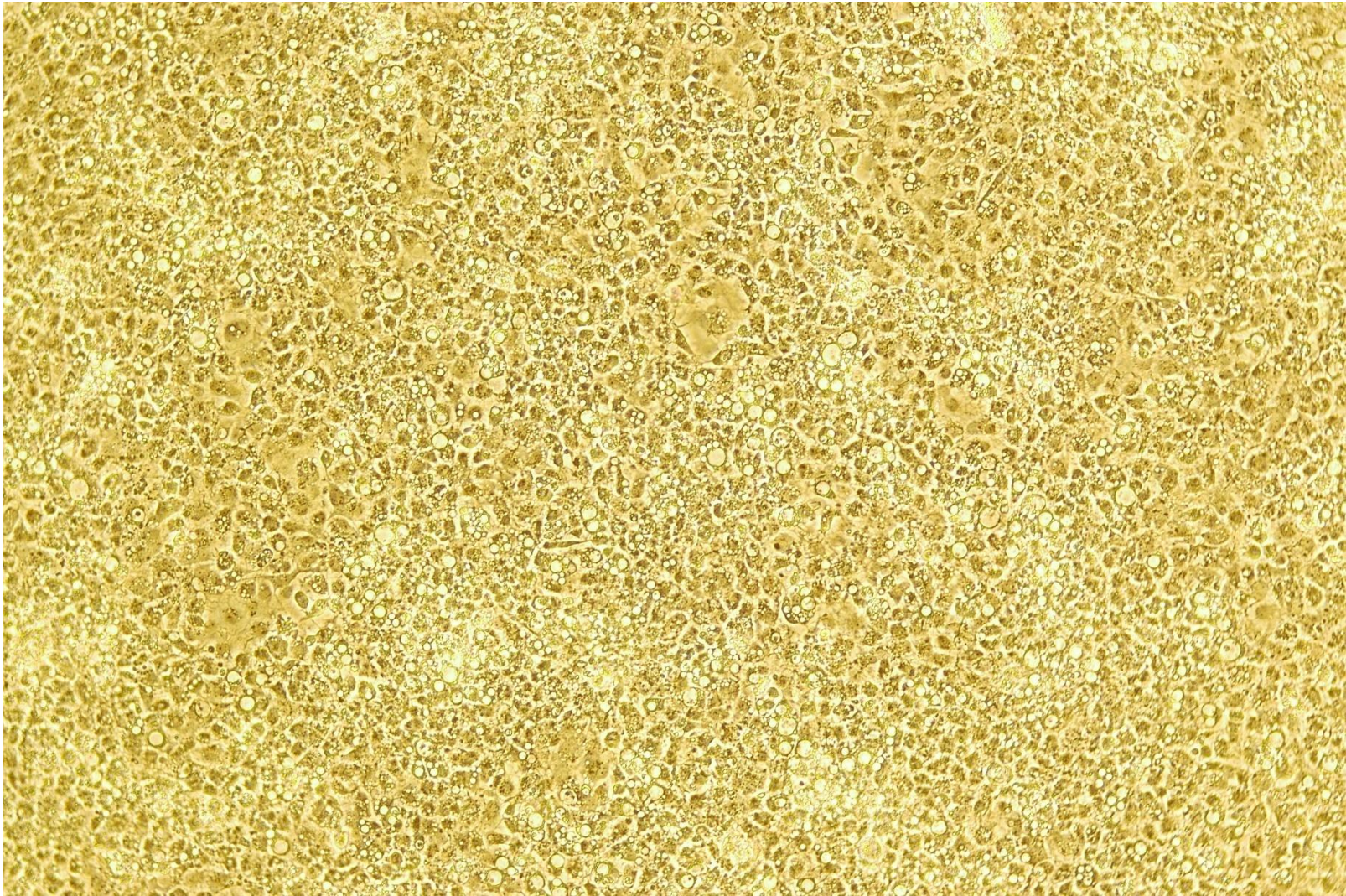
Zone otticamente vuote in sede citoplasmatica o nucleare

Virus BVD: vacuoli
intracitoplasmatici
(colorazione
ematossilina-eosina; 10x)



Virus BVD: vacuoli intracitoplasmatici (colorazione ematossilina-eosina; 20x)





Betanodavirus: cellule vacuolizzate (SSN-1 al MO, 20x)



• Corpi inclusi = Zone dense dovute alla replicazione virale

Osservazione al MO in contrasto di fase 20x-40x o mediante colorazione EE

Localizzazione

- Nucleo (adenovirus, herpesvirus)
- Citoplasma (rhabdovirus, reovirus; poxvirus)
- N. e C. (CMV, morbillovirus)

Tipo

- Ammassi di virioni (papovavirus)
- Proteina virale (poxvirus)
- Cromatina nucleare degenerata e marginata (herpesvirus)

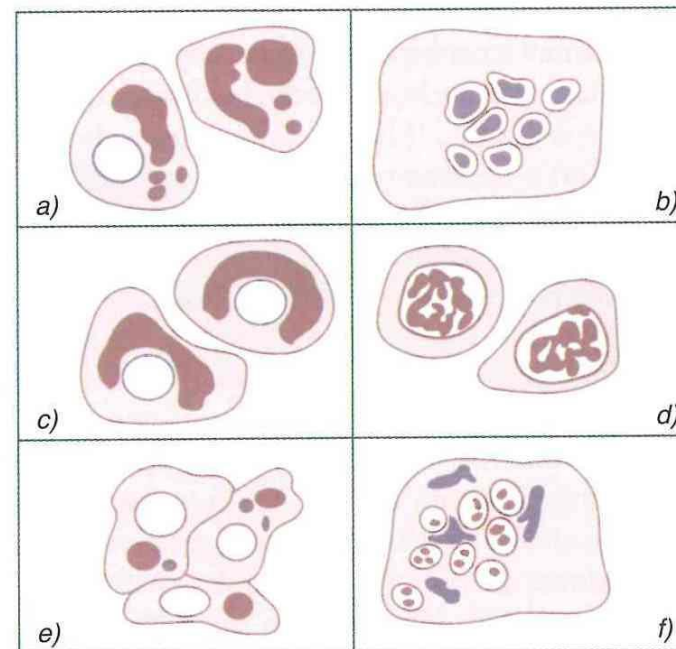
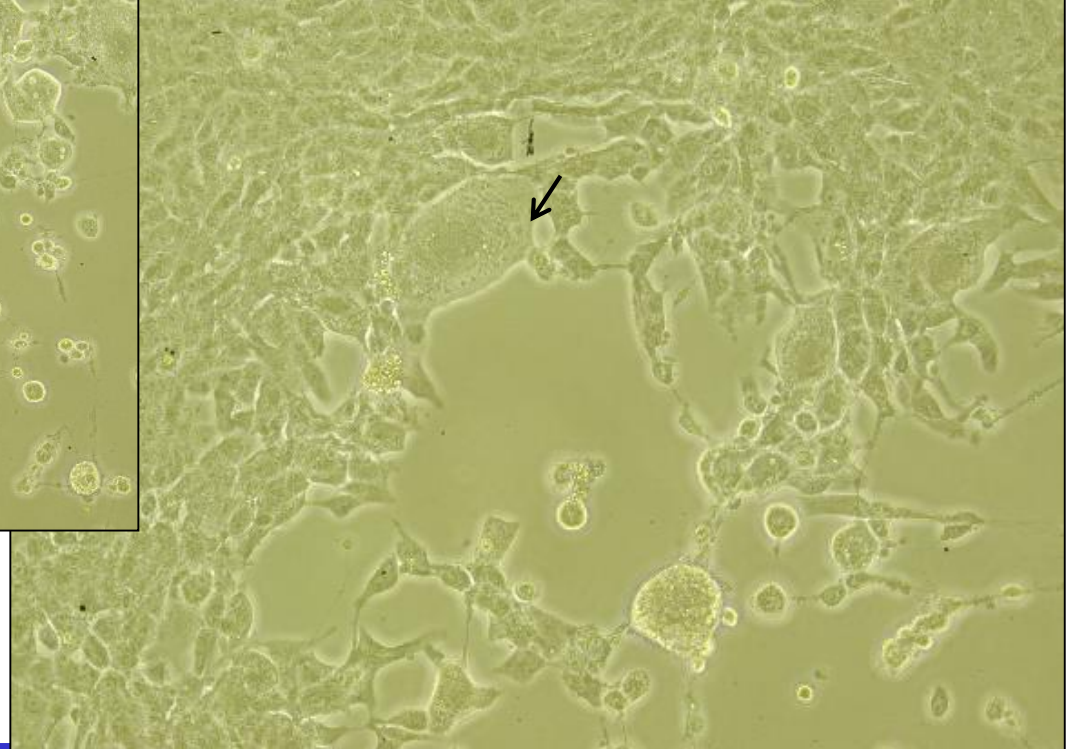
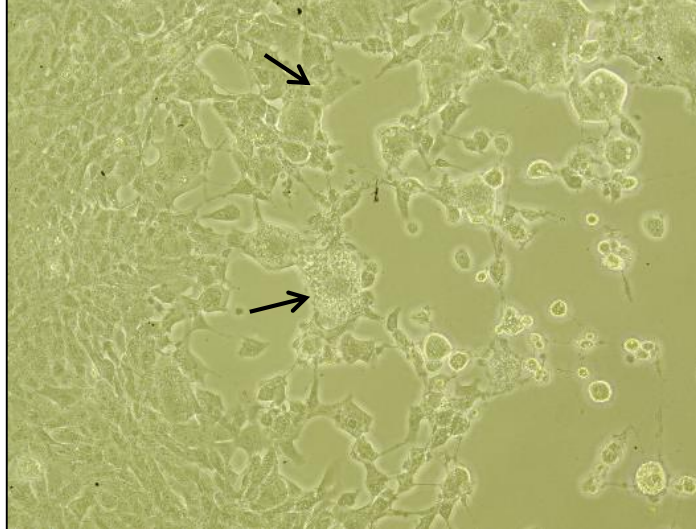
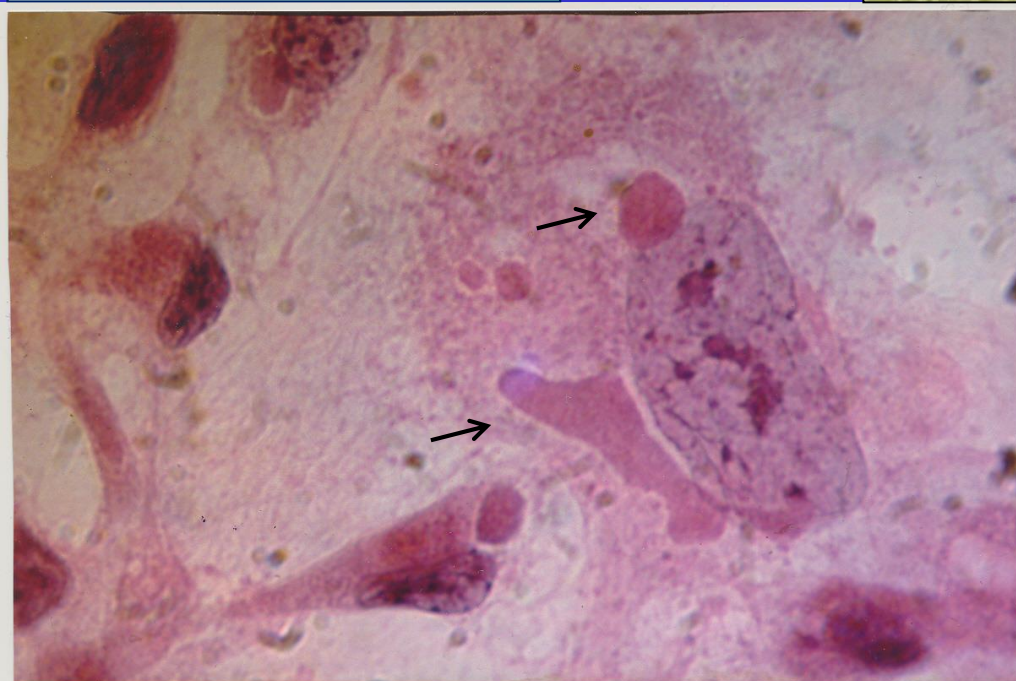


FIGURA 14.3 Corpi inclusi in cellule infettate da virus. a) Poxvirus: inclusioni acidofile intracitoplasmatiche (corpi del Guarneri). b) Herpesvirus: inclusioni acidofile intranucleari (tipo A di Cowdry); fusione cellulare con produzione di sincizi. c) Reovirus: inclusioni acidofile intracitoplasmatiche perinucleari. d) Adenovirus: inclusioni basofile intranucleari. e) Virus della rabbia: inclusioni acidofile intracitoplasmatiche (corpi del Negri). f) Morbillivirus: inclusioni acidofile intracitoplasmatiche e intranucleari; fusione cellulare con produzione di sincizi.



Paramyxovirus: corpi inclusi intracitoplasmatici (colorazione ematossilina-eosina)



OrthopoxVirus:
Corpi inclusi intracitoplasmatici
(Vero al MO, 20x)



Se ECP -> Identificazione VIRUS Isolati

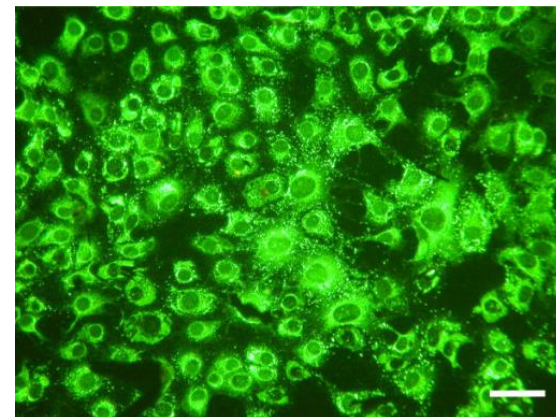
Dopo crescita su colture cellulari con ECP si procede all'Identificazione su criolisato o surnatante cellulare mediante:

- Microscopia Elettronica



- PCR

- IF diretta o indiretta
(su monostrato fissato)



(es. Virus WND su Vero, 50μ)

- Reazioni immunoenzimatiche
(ELISA x Pestivirus)

- Emodsorbimento
(x es. Paramyxovirus)

Se non ECP

Cause:

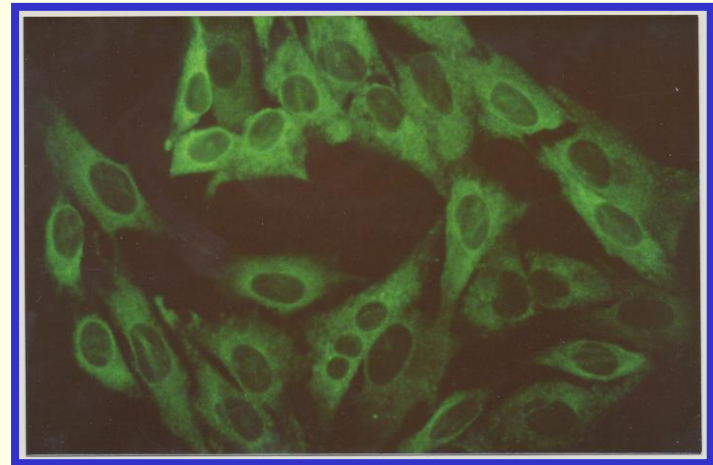
- ✓ Virus a basso titolo o che necessita di adattamento
- ✓ Virus non citopatico (BVD, PSC)
- ✓ Presenza di Ac neutralizzanti nel campione

Passaggi ciechi
(materiale dalla prima
coltura inoculato su
coltura fresca)



•PCR

•IF diretta o indiretta
(su monostrato fissato)



(es. Peste Suina Classica)

•Reazioni immunoenzimatiche
(ELISA x Pestivirus)

•Emoadsorbimento
(x es. Paramyxovirus)

Attività del laboratorio di ME-VS nel settore dell'ITTIOLOGIA:

- applicazione del **D.Lgs. 148/2008** e patologie non normate -> **Dec.1554/2015 UE**
- progetto «Piattaforma mare e acque interne», **Delibera DG 145 del 28/03/2017**



Diagnostica Malattie Infettive Virali dei pesci



Elenco Malattie dei Pesci, notificabili secondo D.Lgs. 148/2008

MALATTIE NON ESOTICHE		
	MALATTIA	SPECIE SENSIBILI
PESCI	(Viremia primaverile della carpa)	Carpa testa grossa (<i>Aristichthys nobilis</i>), carassio dorato (<i>Carassius auratus</i>), carassio comune (<i>Carassius carassius</i>), carpa erbivora (<i>Chemosipharyngodon idellus</i>), carpa comune e carpa koi (<i>Cyprinus carpio</i>), carpa argentata (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>), siluro (<i>Silurus glanis</i>) e tinca (<i>Tinca tinca</i>)
	SETTICEMIA EMORRAGICA VIRALE	Aringa (<i>Clupea</i> spp.), coregoni (<i>Coregonus</i> sp.), luccio (<i>Esox lucius</i>), eglefino (<i>Gadus aeglefinus</i>), merluzzo del Pacifico (<i>Gadus macrocephalus</i>), merluzzo bianco (<i>Gadus morhua</i>), salmone del Pacifico (<i>Oncorhynchus</i> spp.), trota iridea (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) motella (<i>Onos mustelus</i>), salmotrota (<i>Salmo trutta</i>), rombo (<i>Scophthalmus maximus</i>) spratto (<i>Sprattus sprattus</i>) e temolo (<i>Thymallus thymallus</i>)
	NECROSI EMATOPOIETICA INFETTIVA	Salmone keta (<i>Oncorhynchus keta</i>), salmone argentato (<i>O. kisutch</i>), salmone giapponese (<i>O. masou</i>), trota iridea (<i>O. mykiss</i>), salmone rosso (<i>O. nerka</i>), salmone rosa (<i>O. rhodurus</i>), salmone reale (<i>O. tshawytscha</i>) e salmone atlantico (<i>Salmo salar</i>)
	HERPESVIROSI DELLA CARPA KOI	Carpa comune e carpa koi (<i>Cyprinus carpio</i>)
	ANEMIA INFETTIVA DEL SALMONE	Trota iridea (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) salmone atlantico (<i>Salmo salar</i>) e salmo trota (<i>Salmo trutta</i>).

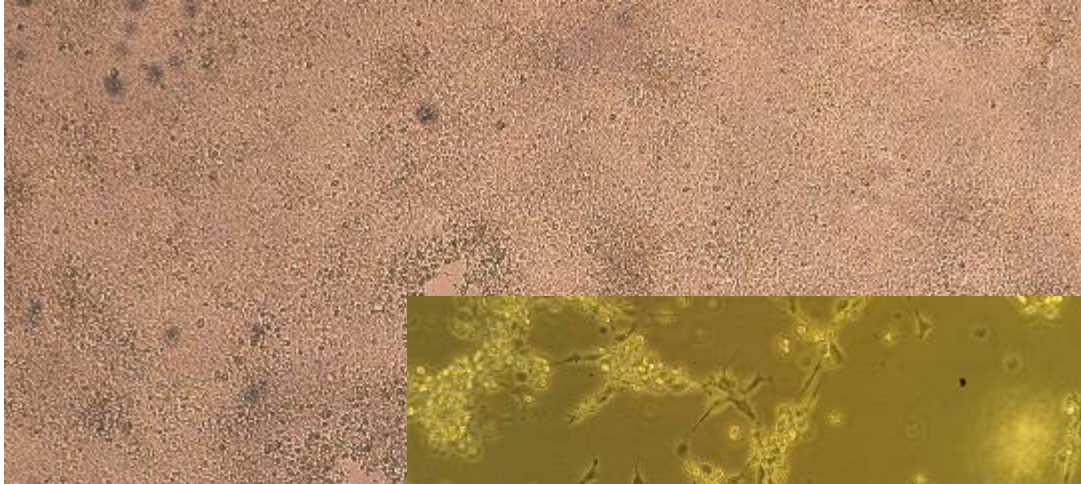
Diagnosi di Laboratorio

Malattie virali dei pesci non notificabili

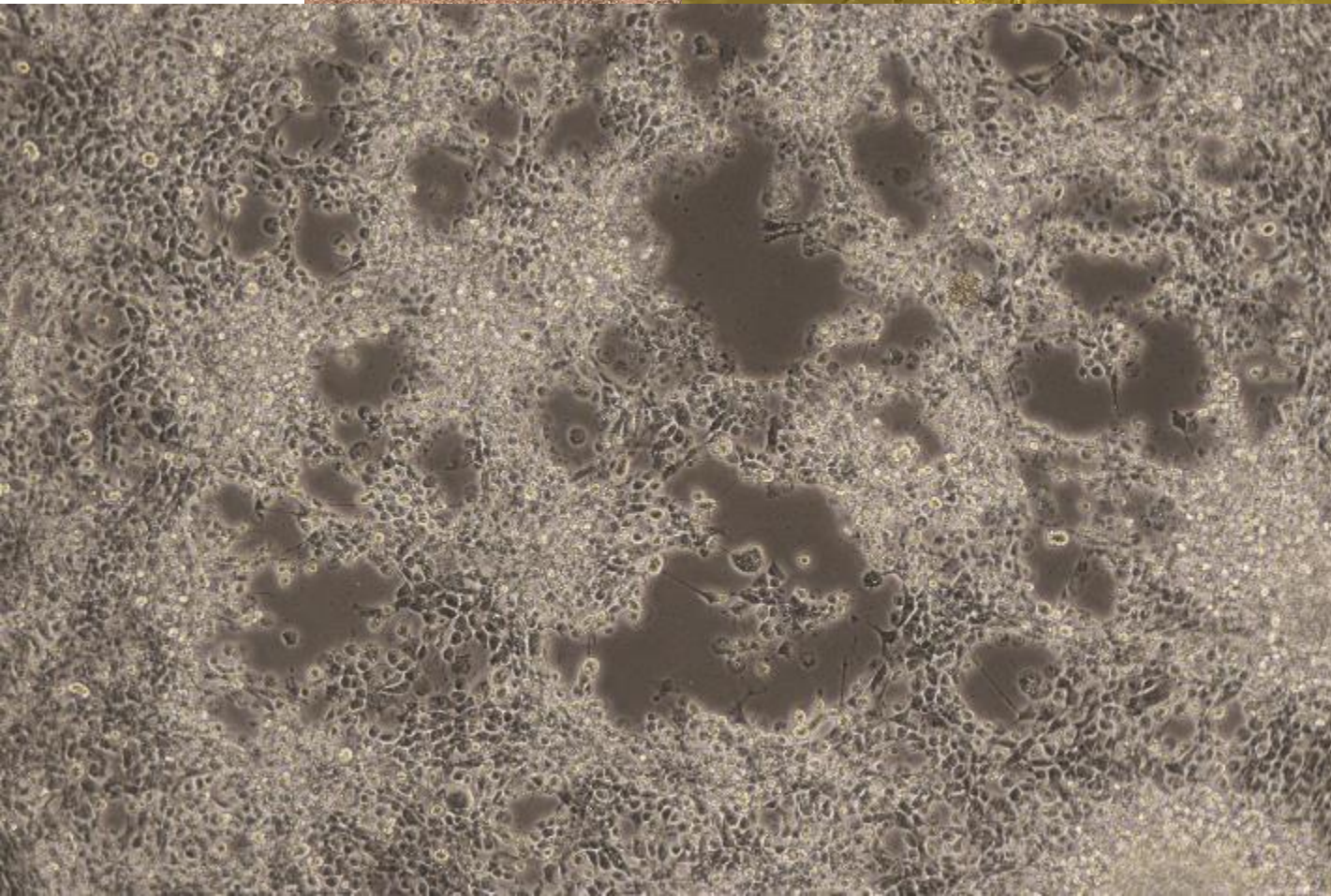
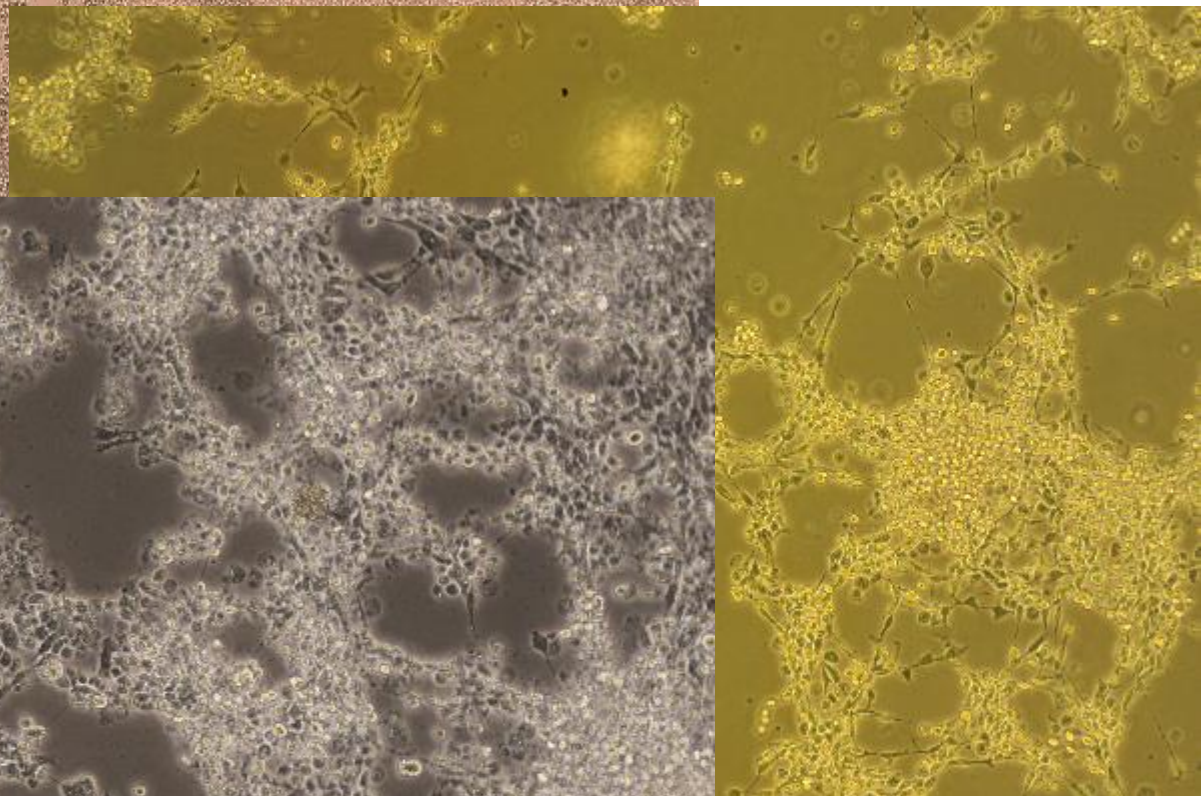
Virus	Specie	Tecnica
IPN	Salmonidi, pesci di lago, anguille, pesci ornamentali	CC (BF-2 e EPC; 15°C), ELISA, IFAT, rt-PCR
SVC	Ciprinidi	CC (BF-2 e EPC; 15°C), ELISA, IFAT, rt-PCR
CyHV 1-2-3	Ciprinidi	CC (CCB; 22°C), ME, Real Time PCR
Iridovirus	Pesce siluro, pesce gatto, cefalopodi, pesci marini	CC (BF-2 e EPC; 25°C), ME, PCR
Betanodavirus	Pesci marini, cefalopodi	Real Time PCR, CC (SSN-1; 25°C)
EVEX-EVE-AngHV-1	Anguilla	CC (EK-1; 22°C), ME; Real Time PCR, rt-PCR, PCR



Virus IHN: ECP su
BF2 (10x)

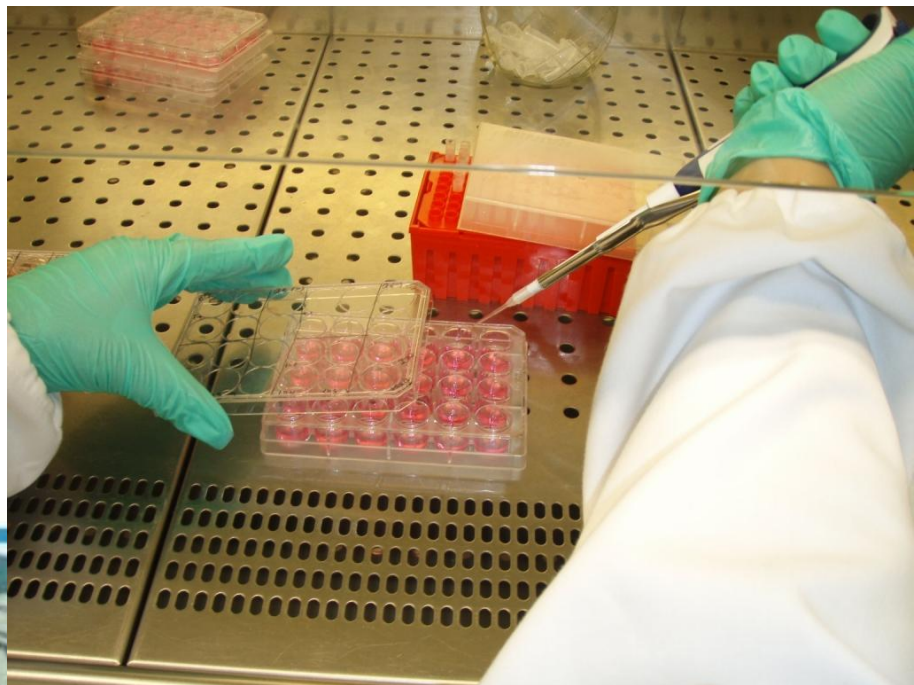
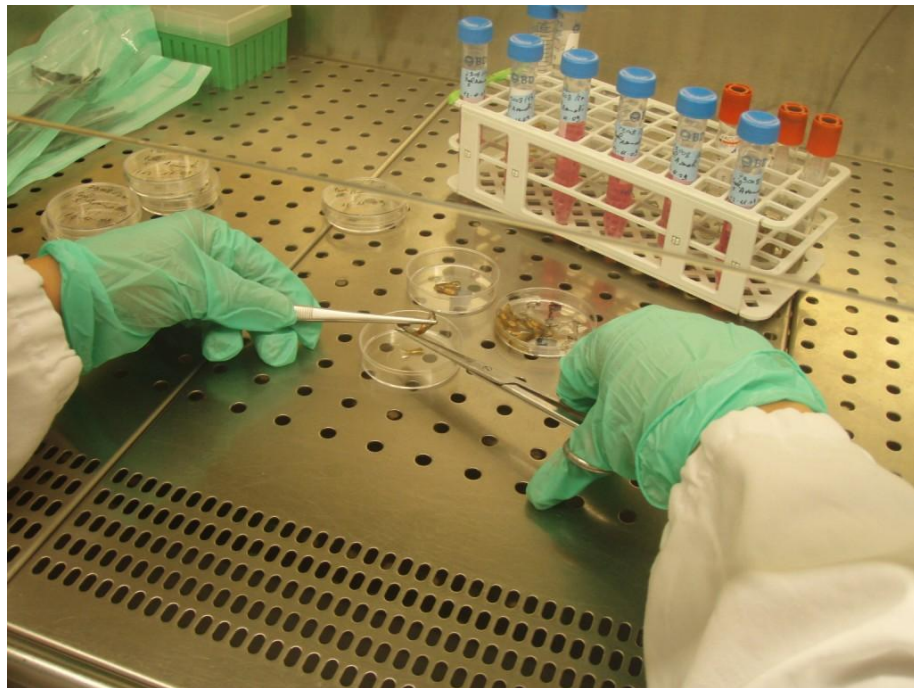


Virus SVC: ECP su
EPC (20x)



Virus VHS: ECP su
BF2 (20x)





VANTAGGI uso CC per Isolamento e Produzione Virus

- Evitare il sacrificio di animali e maggiore economicità rispetto a tale modello
- Materiale abbondante ed omogeneo
- Isolamento di virus non conosciuti
- Alta sensibilità e specificità se associata a ID sierologica
- Disponibilità di virus puro in grandi quantità, per tipizzazione e conservazione

Oggi usate per Ricerca e Produzione Vaccini



SVANTAGGI

Predisposizione a contaminazioni batteriche

- Sensibili alle sostanze tossiche, che possono essere presenti nel campione

Biosicurezza: BSL-2; BSL-3; BSL-4

- Spesso una scarsa sensibilità, la sensibilità dipende in gran parte dalle condizioni del campione

Personale
addestrato

Elevati costi dei
materiali di utilizzo

Molti virus non replicano nelle CC (circovirus, papillomavirus, Lumpy skin disease, virus Epatite E) o replicano poco (rotavirus, KHV)

Tempi lunghi di
Esecuzione (fino a 4 settimane)

Necessità di linee cellulari diverse per diversi virus e difficoltà nell'approvvigionamento di cellule primarie

Uso in diagnostica limitato sostituito da metodiche molecolari



Approccio Combinato degli strumenti diagnostici

EAV – Liquido Seminale

- PCR real time
- **CC**

Pesci

- **CC**
- PCR real time
- ME

Organi – Animali da reddito e Pets

- **CC**
- PCR real time, ELISA, ME, HA

Cetacei

- PCR herpesvirus; Morbillivirus
(2 protocolli)
- **CC**

Rettili

- PCR herpesvirus
- **CC** – ME (tamponi, contenuto intestinale)

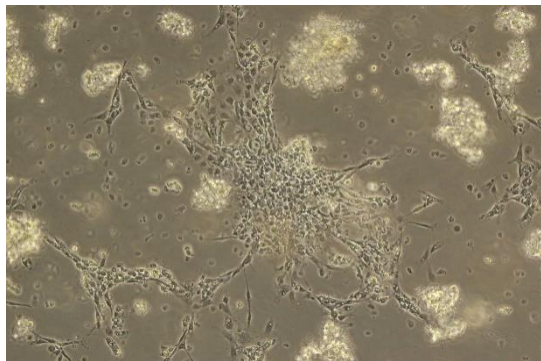


IL LABORATORIO x ISOLAMENTO VIRUS

DEVE ESSERE FORNITO DI:

- Incubatori a temperatura, umidità e atmosfera controllata
- Cappe sterili a flusso laminare verticale classe II
- Sistema di pipettamento automatico
- Bagno termostatico ad acqua
- Centrifughe
- Microscopio ottico rovesciato
- Materiale plastico sterile monouso
- Frigoriferi a +4°C e congelatori a -20°C e -80°C





**Isolamento dei Virus su
Colture cellulari:
Principi, Strumentazione e
Metodiche**

