

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	-Esame culturale dell'escreato -Esame culturale liquido lavaggio bronchiale -Esame diretto dell'escreato	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

6.1. Sinonimi

Esame culturale dell'escreato, esame culturale liquido di lavaggio bronchiale.

6.2. Principio del Test

Semina previo riconoscimento dell'idoneità del campione, delle secrezioni del tratto respiratorio inferiore, opportunamente fluidificate, per l'isolamento dei principali patogeni di infezioni respiratorie comunitarie e ospedaliere.

6.3. Preparazione del Paziente

Per i pazienti in grado di produrre espettorato, si raccomanda la raccolta previa esecuzione di un lavaggio orale eseguito con acqua e con l'ausilio di uno spazzolino. Infatti la contaminazione con le vie aeree superiori comporta il ritrovamento di una abbondante flora batterica saprofita. Il tratto profondo dell'apparato respiratorio (bronchi, bronchioli, alveoli) risulta invece, in condizioni normali, esente da flora batterica. Poiché è praticamente impossibile evitare questa contaminazione troveremo sempre una flora saprofita nell'escreato mentre il broncoaspirato può anche risultare negativo.

6.4. Campione

Per escreato si intende il secreto proveniente dalla trachea e dai bronchi (espettorato propriamente detto) che si unisce alla secrezione del cavo orale (saliva), delle cavità rinofaringee e dell'orecchio medio. Con il termine broncoaspirato si definisce la secrezione prelevata direttamente dai bronchi mediante apposito sondino (broncoscopio). La raccolta dell'espettorato, previo lavaggio delle cavità orali con soluzione fisiologica sterile, va fatta su appositi recipienti sterili ad ampia apertura e con tappo a tenuta. Vanno bene anche quelli per la urinocoltura.

Data la particolare viscosità delle secrezioni bronchiali e dell'espettorato è sempre consigliabile la fluidificazione dell'espettorato da eseguirsi con omogenizzatori o con l'utilizzo di mucolitici previa separazione della parte più densa del campione (quest'ultimo accorgimento è particolarmente importante per l'esecuzione corretta della conta batterica).

Quale mucolitico di prima scelta è consigliato il Ditiotreitolo, mentre per quanto riguarda l'acetilcisteina (fluimucil) anch'essa mucolitico di largo uso, esistono alcune evidenze che

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

indicherebbero una certa sua attività inibente sulla crescita batterica .L'omogenizzazione con mezzi meccanici si esegue con apposito omogenizzatore (Stomacher della PBI).

Il Broncoaspirato e il liquido di lavaggio bronchiale vanno preventivamente centrifugati a 2500 rpm per 5 minuti. Eliminare il sovrantante con attenzione in quanto si può trascinare anche la parte vischiosa .Trattare il sedimento come per l'espettorato.

OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

E' consigliato l'esame microscopico dei campioni di espettorato, in quanto oltre a consentire la valutazione dell'idoneità del campione, permette anche l'identificazione presuntiva dei microrganismi presenti .

L'osservazione va fatta a basso ingrandimento (obiettivo x10) di 20-30 campi microscopici, valutare, campo per campo, il numero di cellule epiteliali e di neutrofili presenti.Viene assegnato quindi un punteggio positivo per i neutrofili , indice di infezione in atto, negativo per le cellule epiteliali, indice di contaminazione orofaringea nell'espettorato.Sommando i singoli punteggi e dividendo la cifra ottenuta per il numero di campi esaminati, si ottiene un valore finale.Se questo è ≤ 0 , l'espettorato viene considerato inaccettabile in quanto presenta eccessiva contaminazione orofaringea e/o mancano i segnali d'infezione in atto. Accertata la buona qualità dell'espettorato, si può procedere alla osservazione microscopica a maggiore ingrandimento per individuare i diversi morfotipi presenti;di grande importanza è il rilevamento di una popolazione microbica dominante Gram-positiva o Gram negativa o della forte riduzione del numero di batteri rilevabili.

Criteri di Bartett per l'idoneità del campione di espettorato (Bartett et. Al, 1978,Murray et al., 1995)

Tipi cellulari e numero per campo microscopico (obiettivo 10 x)	Punteggio
Neutrofili < 10	0
Neutrofili 10-25	+1
Neutrofili > 25	+2
Presenza di muco	+1
Cellule epiteliali	
10-25	-1
> 25	-2

6.5. Modalità di conservazione e trasporto

Tutti i campioni devono essere immediatamente consegnati al laboratorio, qualora non sia possibile processarli immediatamente si consiglia di conservarli a 4°C. Qualora vengano ricevuti campioni che hanno soggiornato in frigorifero o a temperatura ambiente per tempi più lunghi è consigliata l' indicazione nel referto delle limitazioni di un

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

esame eseguito su tali campioni .Il limite fra prelievo del campione e processamento non deve superare le 4 ore poiché alcune specie batteriche (soprattutto pneumococco) sopravvivono solo per poche ore nell'ambiente.

6.6. Strumentazione

Non applicabile

6.7. Metodologia

Le specie batteriche responsabili di infezioni delle vie aeree inferiori di piu' facile riscontro, escludo i micobatteri, si possono dividere in :

-agenti di infezione comunitaria CAP (polmonite comunitaria) e BPCO (bronco pneumopatia cronica ostruttiva riacutizzata) :

- Haemophilus influenzae*
- Branhamella (sin. Moraxella) catharralis*
- Streptococcus pneumoniae*
- Klebsiella pneumoniae*
- Legionella pneumophila*
- Nocardia asteroides*

-agenti di infezione ospedaliera:

- Pseudomonas aeruginosa*
- Stenotrophomonas maltophilia*
- Acinetobacter spp.*
- Burkholderia cepacia sin. Pseudomonas cepacia*
- Staphylococcus aureus MR e MS*
- Enterobacteriacee (Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens)*

La valutazione della patogenicità di questi microorganismi isolati in coltura dovrà essere effettuata in base a:

- idoneità del campione
- carica batterica del batterio in coltura e nel campione
- riscontro della stessa specie batterica in successivi campioni esaminati.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

La presenza della candida nell'espettorato in genere è indice di contaminazione della flora salivare soprattutto in corso di antibiotico terapia e non va segnalata. Maggiore attenzione va posta nell'isolamento della Candida nel broncoaspirato. Specie di miceti sicuramente responsabili di micosi polmonare negli immunodepressi sono *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* (difficilmente isolabile nel materiale mucopurulento).

6.8. Reagenti Utilizzati

6.8.1 Reagenti, concentrazioni

AGAR SANGUE 5% sangue di montone :

Si usa come base il Muller Hinton o la base Columbia a cui si addiziona il 5% di sangue defibrinato di montone (preferibilmente). Ha un colore rosso caratteristico. La sua abbondante base nutritiva offre condizioni ottimali di crescita. Il valore di pH di 6.8 è specialmente favorevole alla conservazione degli eritrociti e per la formazione di aloni di emolisi ben chiari. Non usare la formula con addizionato CNA che inibisce la crescita delle moraxelle. Gli pneumococchi sono evidenziati come colonie piccole, alfa emolitiche a pedana di dama in quanto tendono a una rapida autolisi al centro della colonia (zona dove le cellule batteriche sono più vecchie). Le moraxelle sono colonie ben evidenti di colore biancastro che tendono a non aderire al terreno e si spostano facilmente se colpite dall'ansa sul terreno, sono difficilmente stemperabili.

AGAR MacCONKEY:

Agar selettivo per l'isolamento degli enterobatteri e dei batteri gram negativi. Ossidasi positivi e non fermentanti quali *Ps. aeruginosa*, dal nome del suo inventore MacConkey (1905). I sali biliari e il cristal violetto inibiscono la flora Gram (+). Il lattosio, assieme all'indicatore di pH rosso neutro, serve per evidenziare la fermentazione di questo zucchero.

Composizione : peptone di carne, peptone di caseina, NaCl, lattosio, miscela di sali biliari, rosso neutro, cristal violetto, agar.

Interpretazione: Colonie lattosio (-) sono incolore e le colonie lattosio (+) sono rosse, con un alone torbido, dovuto all'abbassamento di pH e precipitazione dei sali biliari.

AGAR SABOURAUD

(Nota: l'uso di tale terreno non è da ritenersi routinario, ma può essere limitato al caso in cui esista una specifica richiesta)

Questo terreno è impiegato per l'isolamento dei lieviti. Gli antibiotici aggiunti, generalmente CAF cloramfenicolo 5% e gentamicina 10%, servono il primo per aumentare la selettività del terreno verso le specie che possono essere resistenti alla Gentamicina (streptococchi, *Proteus*), il secondo inibisce la maggior parte dei batteri Gram + e Gram (-). La selettività del terreno è inoltre dovuta al suo pH acido (5.5) che inibisce parzialmente la crescita dei batteri, tranne quelli acidofili.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Composizione:Peptocomplex, Glucosio, agar.

Interpretazione:colonie bianche , cremose , ben evidenti già dopo incubazione overnight appartengono a Candida spp.

AGAR CIOCCOLATO + PolyViteX (Biomerieux)

L'Agar cioccolato serve per l'isolamento degli emofili perché contiene emoglobina che apporta il fattore X. Il fattore V (NAD nicotinamide dinucleotide fosfato) è compreso nel supplemento poliViteX che è una miscela chimicamente definita. La composizione è leggibile nelle scatole. Gli emofili sono le colonie grigio ceroso , non emolitiche . Crescono bene anche senza CO₂

AGAR SALE MANNITE (CHAPMAN)

E' il noto terreno selettivo e differenziale per l'isolamento degli stafilococchi formulato da Chapman nel 1945. L'elevata concentrazione di cloruro di sodio permette l'inibizione della maggior parte degli altri germi.

Composizione in gr/Litro :Estratto di carne di bue (1), Caseina ed estratto di carne (10), Cloruro di sodio (75) , D mannitolo (10) , Agar (15), Rosso fenolo (25 mg) .

Interpretazione:le colonie di *Staphylococcus aureus* che fermentano il mannitolo sono circondate da una zona gialla .Gli stafilococchi che non fermentano il mannitolo sono circondate da una zona rossa o porpora.

Nella tabella riassumiamo i vari terreni in uso:

Terreno	Ricerca	Atmosfera di incubazione	T °C	Tempo
Sabouraud dextrose agar + gentamicina + CAF	Lieviti	aerobia	37°C	24 h
Mac Conkey agar	Enterobatteri Ps. Aeruginosa e altri batteri NF	aerobia	37°C	24 h
Columbia 5% sangue di montone	Pneumococco, B. catharralis	Aerobia o in CO ₂ 5%	37°C	24 h
Agar cioccolato +PolyViteX	Haemophilus spp.		37°C	24 h
Agar Sale mannite (<i>Chapmann</i>)	Stafilococchi Spp. Corinebatteri saprofiti	<i>aerobiosi</i>	37°C	24 h

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

6.8.3 Magazzino e stabilità dei reagenti

Se preparati in laboratorio, i mezzi di coltura devono essere tenuti in frigorifero (4-8 °C), avvolti in buste di plastica per evitare la rapida disidratazione. In questo modo, i terreni preparati in laboratorio hanno una validità di 14 giorni. L'agar sangue e l'agar cioccolato va tenuto in frigorifero (4-8°C).

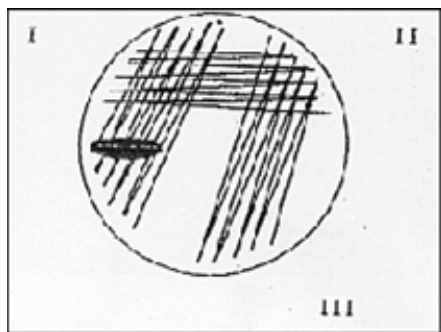
6.9. Procedimento dettagliato

L'indicazione quantitativa della carica batterica è ritenuta indispensabile per il clinico in quanto indice dell'efficacia della terapia antibiotica, si ritiene tuttavia sufficiente una semplice indicazione semiquantitativa della carica.

1) Carica semiquantitativa:

-Diluire il materiale più purulento del campione 1:1(v/v) con Ditiotreitolo (sputolisina), lasciando il campione per 60 minuti a temperatura ambiente o per 30 minuti in termostato a 35-37°C, oppure agitando vigorosamente per 20-30 secondi e lasciando riposare il preparato per 15 minuti a temperatura ambiente. Si può usare in alternativa l'acetil cisteina (Fluimucil®). Ogni fiala da aprire al momento dell'uso contiene 300 mg di principio attivo. È noto che l'acetil cisteina a differenza del ditiotreitolo tende a decadere nel tempo piuttosto velocemente.

-Seminare le piastre usando la tecnica delle "tre zone", depositando 20 µl del campione e strisciare 5 linee avanti e 5 linee indietro per ogni quadrante come indicato in figura:



-Quantificare la crescita come indicato nella tabella:

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Carica semiquantitativa	I quadrante	II quadrante	III quadrante	Carica approssimativa (CFU/ml) seminando 20 µl (dopo fluidificazione)
+	<10			103
++	<10	<10		104
+++	>10	>10	<10	105
++++	>10	>10	>10	106

2) Carica quantitativa:

Dopo fluidificazione del campione 1:1 con ditiotreitolo o N acetil cisteina come sopra,

- diluire 10 µL di materiale così fluidificato 1:100 con soluzione fisiologica sterile,
- inseminare le piastre di agar con 100 µL ,
- spatolare su tutta la piastra come se si stesse facendo un antibiogramma Kirby Bauer
- dopo incubazione, contare le colonie sospette e moltiplicare il risultato mediante la seguente formula:
- Carica batterica UFC /mL=N (colonie contate dopo le varie diluizioni) x10 x100 x 2 cioè Carica batterica UFC /mL= N x 2000.

Vediamo in dettaglio le specie di più frequente riscontro:

STAFILOCOCCI METICILLINO-RESISTENTI

Cocchi gram positivi, catalasi positivi.

Gli stafilococchi meticillino resistenti sono patogeni nosocomiali isolati con frequenza crescente . Tali microrganismi costituiscono un notevole problema clinico in quanto sono sensibili solo a pochissimi agenti chemioterapici: è quindi di fondamentale importanza effettuare, oltre ad una corretta identificazione, anche una altrettanto corretta valutazione della meticillino resistenza. Tale resistenza può essere valutata con metodi diversi, infatti oltre alle metodiche classiche agar e brodo diluizione, attualmente sono disponibili anche test di screening su piastra e test qualitativi rapidi con lettura in fluorescenza.

E' noto che l'espressione della meticillino resistenza è notevolmente influenzata dalle condizioni con cui il test è eseguito, ed in particolare: il tipo di antibiotico con cui la resistenza è valutata che preferibilmente deve essere oxacillina ad una concentrazione di 6 µg/ml se si utilizzano test di screening su piastra; l'incubazione, che deve essere protratta per 24 h a una temperatura di 30-35 °C; la concentrazione di NaCl che deve essere 2% (w/v) per agar e brodo diluizione e 4% (w/v) per i test di screening su piastra; il terreno di coltura utilizzato che deve essere CAMHB per brodo diluizione, MHA per agar diluizione e test di screening su piastra. Soltanto il rispetto di tutte queste condizioni è infatti in grado di evidenziare la resistenza in tutti i ceppi di stafilococchi . Interpretazione degli aloni di inibizione osservati :S >= 13 mm, I=11-12 mm, R <=10 mm.

Vengono consigliate le piastre "MRSA screen" che sono un esempio di test di screening su piastra, e il più affidabile ma ben più costoso "Crystal MRSA ID" un test qualitativo che

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

avvalendosi di un indicatore fluorescente sensibile all'Ossigeno è in grado di identificare con precisione in 4 ore i ceppi di stafilococchi meticillino resistenti . Entrambi i tipi di test sono commercializzati dalla Ditta Becton Dickinson. Il Muller Hinton agar addizionato con il 4% di cloruro di sodio e contenete 6 ug di oxacillina/ ml.

Per l'identificazione della specie di Stafilococco aureo si ritiene utile il test della coagulasi libera:

- si prende una parte di pool di plasma umano (preferibilmente acquistare il plasma di coniglio)
- si aggiungono 3 parti di brodo BHI
- si fa una sospensione densa delle colonie sospette che si suppone siano in coltura pura
- si incuba in termostato a 37°C per almeno 4 ore. Si può lasciare anche overnight per una conferma.

In presenza di *S. aureus* (coagulasi positivo) il plasma coagula.

Si può utilizzare anche il test della coagulasi legata Staph latex kit Prolex (vedi metodica in allegato)

PSEUDOMONAS AERUGINOSA E BURKHOLDERIA CEPACIA

Batteri gram negativi, ossidasi positivi, non fermentanti, mobili per flagello polare.

E' noto che i ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati presentano una notevole variabilità fenotipica (sono stati differenziati fino a 6 morfotipi), e che tali varianti possono manifestare una diversa sensibilità agli agenti chemioterapici. E' quindi di fondamentale importanza differenziare almeno i due morfotipi "rugoso" e "mucoide" ed eseguire gli antibiogrammi separatamente in quanto ogni morfotipo può presentare una diversa chemiosensibilità. Per quanto riguarda l'identificazione di *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* vengono consigliati i seguenti metodi: il sistema ATB expression, le gallerie API (API 20 NE) entrambi della ditta Biomerieux e il sistema Cristal della Becton Dickinson. L'identificazione di *Burkholderia cepacia* presenta maggiori difficoltà rispetto a quella di *Pseudomonas aeruginosa* e si consiglia pertanto di ripetere l'identificazione utilizzando due metodi diversi o di eseguire test biochimici supplementari quali: lisina e ornitina decarbossilasi e liquefazione della gelatina. Attualmente utilizziamo i pannelli NPCombo associati all'apparecchio Microscan Walk away della Dade Behring alle 16-18 ore.

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Diplococchi gram positivi, catalasi positivi.

Dati recenti riportano in Italia una percentuale di ceppi resistenti alla penicillina G intorno al 5%, si raccomanda pertanto di saggiare la resistenza alla penicillina di *Streptococcus pneumoniae* in agar diffusione su MHA supplementato con sangue di montone al 5% con un dischetto di oxacillina da 1ug in atmosfera capnofila (CO₂ al 5-10%) : i ceppi che presentano una zona di inibizione >20 mm (MIC <0.06 mg/ml) sono da considerarsi sensibili alla penicillina e a tutte le altre β-lattamine. Per i ceppi che presentano un alone di inibizione <19 mm è consigliabile la determinazione delle MIC con il metodo della microdiluizione in brodo secondo le direttive del NCCLS: MIC 0.12- 1 il ceppo è intermedio, MIC > 1 il ceppo è resistente. Questo test può essere

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

fatto con i pannelli Microstrep Dade Behring dopo aver sciolto le colonie in brodo MH piu' sangue laccato di cavallo.

Per l'identificazione delle tipiche colonie alfa emolitiche di forma a pedina di dama usiamo il kit Slidex pneumo kit della Biomerieux (metodica in allegato).

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Quando al Gram vediamo bacilli Gram negativi, molto pleomorfi (cioè a volte cocchi, a volte lunghi) dobbiamo pensare a *Haemophilus influenzae*. E' catalasi positivo. *H. influenzae*, quando c'è, cresce bene e facilmente. Cresce solo in agar agar cioccolato (per *Haemophilus*), incubato 24-48 ore a 37°C in aerobiosi o capnofilia. Le colonie traslucide sono ossidasi positive. Al Gram come detto cocchi o bastoncellini gram-negativi. Si puo' subcolture su agar triptosio con i fattori separati X, V e XV (ev. nte su 3 diverse piastre). *H. influenzae* cresce solo attorno al fattore XV (necessita di entrambi in contemporanea). Identificazione pannelli rapidi NHI della Dade Behring o il lattice per gli antigeni capsulari (solo per *H. influenzae* tipo b) dal kit della meningite. Antibiogramma HTM o con i pannelli Microstrep della Dade Behring e provettoni HTM broth.

BRANHAMELLA (MORAXELLA) CATHARRALIS

Diplococchi Gram negativi. Ossidasi positivi. Identificazione mediante pannelli rapidi alle 4 ore NHI della Dade Behring. Colonie bianche su agar cioccolato, non adese al terreno, difficilmente stemperabili. Al Gram sono diplococchi Gram negativi.

Per il saggio della produzione della β lattamasi si consiglia il test Nitrocefina. Il Nitrocefina è una cefalosporina cromogenica che, gialla quando l'anello beta lattamico è intatto, assume colorazione rossa quando l'anello viene idrolizzato. Il viraggio del colore avviene in circa 15 minuti.

6.10. Calibrazione della metodologia

Non applicabile

6.11. Controllo di qualità interno

Settimanalmente sono inoculati campioni batterici con profili fenotipici conosciuti per verificare l'efficacia dei mezzi di coltura utilizzati.

6.12. Criteri per la validazione dei risultati

Supervisione tecnica del responsabile del settore. E' importante valutare l'idoneità del campione. Un campione a forte componente salivare non andrebbe processato ma refertato subito come FBNS (Flora batterica mista eterogenea non significativa). E' importante anche dare almeno la carica semiquantitativa delle componenti batteriche piu' importanti.

6.14. Linearità

Non applicabile

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

6.15. Limite di rilevazione

Non applicabile

6.16. Applicazione clinica

Diagnosi microbiologica delle polmoniti comunitarie od ospedaliere e delle BPCO broncopneumopatie croniche ostruttive .

6.17. Limitazione del metodo

Paziente sotto terapia con antibiotici, raccolta impropria del campione, terreni disidratati , temperatura di incubazione differente da 35-37°C.

6.18. Biosicurezza

Vedi POP sulla Bio sicurezza

6.19. Referenze bibliografiche

La qualità in totale trasparenza.Terreni di coltura .Manuale Tecnico.Biomerieux edizione 2000.

F. De Benedetto, C.F. Donner, C. Sanguinetti, G. Schito, G. Nicoletti, E. Curti, M. Scatigna :Progetto Eolo.Studio epidemiologico delle infezioni delle basse vie respiratorie e di sorveglianza delle resistenze agli antibiotici in ambito comunitario.Bayer. 2001

R.Pozzoli, Chiodo F. :Il Laboratorio clinico di analisi microbiologiche.S.E.F. 1981

P. R. Murray, E.J. Baron, M. A. Pfaller, F.C. Tenover, R. H. Tenover:Manual of Clinical Microbiology –7th edition .American Society for Microbiology. 1999.

J. G. Bartlett, S.F. Dowell, L.A. Mandell, T.M. File , Jr., D. M. Musher , and M. J. Fine: Practice Guidelines for the management of Community –acquired Pneumonia.Clinical Infections Disease 2000; 31:347-382.

F. Mandler :Microbiologia dello sputo e delle vie aeree inferiori. Documenta. Edizioni scientifiche Mascia Brunelli-Biolife.

E.W. Koneman, S. D. Allen, W. M. Janda, P.C. Schreckenberger, W. C. Winn, Jr.: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology .Fifth edition .Lippincott Williams & Wilkins .1997.

R.J. Olds Microbiologia.Testom atlante a colori.Lombardo editore .1976

C.R. Mahon, G. Manuselis.Textbook of diagnostic Microbiology, second edition.W.B. Saunders Company.2000.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.