

New Tools Diagnostics in the Microbiology Laboratory

Instructor in Laboratory Med/Pathology,
College of Medicine

Microbiology Laboratory
Department of Laboratory Medicine & Pathology

Mayo Clinic Florida

USA

Medical Technologist II Microbiology Laboratory

Department of Laboratory Medicine & Pathology

Mayo Clinic Florida

USA

The development and implementation of diagnostic techniques has had a profound effect on microbiology laboratory in recent decades. Traditional microscopy, culture and biochemical testing techniques have been the main for identification and antimicrobial susceptibility. These tests remain the basis and standard practice in most laboratories, new techniques, such as nucleic acid-base assays and mass spectrometry, are increasingly being used. In some cases, these are enhancing existing diagnostic algorithms and, in others, they are replacing traditional testing approaches.

The Traditional Microbiology Laboratory:

Traditional microbiology testing has included microscopy, antigen detection, serology and culture. While in many cases it represent a “gold standard” for diagnosis, such as with malaria or stool patients. In most cases, microscopy only offers a presumptive diagnosis that requires further confirmation with other testing.

In the case of bacteria and fungi, clinical specimens are inoculated on a range of media and incubated. Use of selective and differential media may allow enhanced identification and suggest presumptive diagnosis. In most cases, biochemical testing is then performed to identify species, and plating or broth dilution is used to determine antimicrobial susceptibilities. Generally, when cultures are positive they represent a “gold standard” diagnosis. However, there is a problem when the culture shows poor

sensitivity. For example, blood cultures may only be positive in 10-15% of cases of severe pneumonia. Days of incubation are typically required for results for bacteria and yeast and frequently weeks or months for fungi and mycobacteria. In severe disease, even hourly delays in treatment may have significant adverse effects on outcome.

PNA-FISH:

PNA probes are synthetic pieces of DNA that have unique chemical characteristics in which the negative charged sugar-phosphate backbone of DNA is replaced by a neutral polyamide of repetitive units. Individual nucleotide bases can be attached, which then allows the PNA probe to hybridize to complementary nucleic acid targets. These probes have improved hybridization characteristics, providing faster and more specific results than traditional DNA probes.

PNA-FISH is a novel fluorescent in situ hybridization (FISH) technique that uses (PNA) probes to target species specific ribosomal RNA (rRNA) sequences. Upon penetration of microbial cell wall, the fluorescent labeled PNA probes hybridize multicopy rRNA sequences within the microorganisms, resulting in fluorescent cells. Recently, AdvanDX (Woburn, Massachusetts) introduced in vitro diagnostic kits (using PNA-FISH) which have been approved by the U.S. Food Drug Administration (FDA). These kits can be used to directly identify *S. aureus* and *C. albicans* and to differentiate *Enterococcus faecalis* from other enterococci in blood cultures.

Identification is based on the presence of bright green, fluorescent-staining organisms. For negative results, only slightly red-stained background material is observed. Multiple studies have done to evaluate the efficacy of the PNA-FISH kits for identifying *S. aureus* and *C. albicans* in positive blood cultures. The test have demonstrated high sensitivity and specificity.

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectroscopy

MALDI stands for matrix which assists in desorption and ionization of highly abundant bacterial and fungal proteins through energy from a laser. Although protein extraction may be performed, the most user friendly approach is to test colonies directly by moving whole cells from a bacterial or fungal colony (using a plastic or wooden stick, loop or pipette tip) to a "spot" on MALDI-TOF MS target plate (a disposable or reusable plate with test spots). Spots are overlaid with formic acid solution, which is allowed to dry, and then with matrix and dried, and the target plate is placed into a mass spectrometer. The matrix (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid dissolved in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid), protect isolates bacterial or fungal from fragmentation and enabling their desorption by laser energy; the majority of the laser energy is absorbed by the matrix, converting it to an ionized state.

Charge is transferred from matrix to microbial molecules; ionized microbial molecules are then accelerated through a positively charged electrostatic field into a time of flight or TOF, tube. Inside the tube, which is under vacuum, the ions travel toward an ion detector, with small analytes traveling the fastest, followed by increasingly larger analytes; a mass spectrum is produced, representing the number of ions of a given mass impacting the detector over time. It is highly abundant (predominantly ribosomal) proteins which generate the mass spectrum. They provide a profile unique to individual types of microorganisms, with peaks specific to genera and species. Computer software compares the generated mass spectrum to a database reference spectra, generating a list of the most closely related organisms with numeric rankings. Depending on how high the value (percent of score), the organisms is identified at the family, genus, or species level.

Misidentifications are unusual but occur with closely related organisms; *Echerichia coli* and *Shiguella* species are not well differentiated by MALDI-TOF MS.

Commercial MALDI-TOF MS systems are available from bioMérieux, Inc. (Durham, NC) and Bruker Daltonics, Inc. (Billerica, MA).

While having high initial acquisition costs for the machine, MALDI-TOF has the benefit that day to day consumable are of minimal cost and the need to refer strains to reference laboratories is markedly reduced.

Syndromic Panels:

The recent development of multiplex syndromic panels that can be applied to respiratory tract: blood culture, stool and cerebrospinal fluid (CSF) specimens represent a major advance toward addressing this need.

Syndromic panels are particularly attractive, as they reduce the need for multiple specimen collection: simplify the testing algorithm; reduce the time to result; improve sensitivity over many conventional methods; and, in some cases, allow testing for pathogens that are not detectable by conventional methods. In addition, rapid diagnostic information can increase both clinician and patient satisfaction.

1. Biofire (Diagnostics, Salt Lake City, UT)

Blood culture identification panel are available to identify the genus and species of common bloodstream pathogens, and as common antimicrobial resistance determinants with a turnaround time of a few hours instead of the 1 to 2 days required for conventional sub-culture, identification and susceptibility testing.

Clostridioides (Clostridium) difficile :

C. difficile infection, is the major cause of the antibiotic associated pseudomembranous colitis, and the most frequently cause of hospital-acquired diarrhea and is responsible for >250,000 cases of diarrheal disease per year in the U.S.

Only strains that carry the pathogenicity locus (PaLoc) possess the genetic information for the *C. difficile* enterotoxin, *TcdA* and cytotoxin, *TcdB*. Only strains producing *TcdA* and/or *TcdB* cause CDI. *TcdC* is a regulatory protein that control toxin expression. The *tcdC* gene has gain diagnostic attention since is endemic hypervirulent ribotype 027/NAPI (North American pulsotype 1) isolates, now called ribotype 027 isolates

Use of a test algorithm may improve diagnostic sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, while increasing overall accuracy in TCD detection. This algorithm utilizes the Alere C. Diff Quick Chek™ Complete (TechLab, Blacksburg, VA) a rapid membrane enzyme immunoassay (ICA) for simultaneous detection of CD common antigen and Toxins A and B, followed by the *C. difficile tcdC* LDT (CDT-PCR). Nucleic acid is released from the bacteria in the stool specimen and tested for the presence of the *tcdC* gene of toxin positive *C. difficile* using real-time PCR on a LightCycler instrument with FRET hybridization probe detection. Primers and probes are specific to the *tcdC* gene target currently used by Mayo Clinic Rochester. This will allow for enhanced *C. difficile* Toxin A and B detection in a clinically timely manner.

When compared to a gold standard consisting of combined results from EIA, ICA, CDT-PCR and cell culture cytotoxicity assay, the ICA/CDT-PCR algorithm has a sensitivity, specificity and positive and negative predictive value of 100%, 99.4%, 91.6%, 100% respectively.

Other Tools:

1. Total Laboratory Automatization (TLA): Aims to improve quality. Reduce time to result, better manage an increasing number of specimens, compensate for reduction in skilled staff, and economically effective.

Three companies provide different solutions for TLA in microbiology: BD-Kiestra, bioMérieux and Copan. More methods and devices are expected to be automated in the near future. These include automated colony picking for MALDI-TOF MS identification a preparation of dilution for susceptibility testing.

2. Telemicrobiology: The most common modes of telemicroscopy include using static capture techniques, whole slide imaging (WSI), video telemicroscopy (VT). This technology is inexpensive and easy to implement to store and forward. Static capture telemicroscopy only requires a microscope with an attached digital camera. More sophisticated equipment is required for WSI and VT

- **Digital Plate Reading (DPR):** May involve the remote analysis of digital images of culture media. DPR systems require a component that simultaneously incubate culture plates while employing automation to move the plates on image capture station at defined time points. The images are analyzed and interpreted by microbiologists who view the, on a computer using proprietary software provide by the manufacturer.
- **Mobile:** Many cellular telephones are now equipped with high resolution digital cameras a cellular Internet connectivity. Mobile telemicrobiology offers hope of affordable, accurate and rapid teleconsultation for developing communities worldwide.
- **Telemicroscopy for Expert Consultation:** The Centers for Disease Control and Prevention's Division for Parasitic Disease and Malaria Diagnostic Assistance Service (DPDx) offers worldwide tediagnosis of parasitic infections. DPDx has received more than 3,300 request for tediagnosis from more than 60 different countries since it began accepting tediagnostic request in 1999. Images received by DPDX for consultation include mostly digital phomicrographs of blood and stool specimens, tissue sections, arthropods, and worms have also been analyzed.

Bibliography

1. Van Belkum, A et al. 2013 *Ann Lab Med*.33:14-27
2. De la Maza, Color Atlas of Medical Bacteriology.ASM, 2004. P. 103, 107
3. Tile, P. 2014. *Diagnostic Microbiology*.13th Ed. P. 113
4. Ramsey-Walker, D., Meza, D., and Hata, D.J. (2010) *Detection of Toxigenic Clostridium difficile: Are Two Tests Better than One?* 110th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, San Diego, Abstract C-1148
5. Meza, D., Ramsey-Walker, D., and Hata, D.J. (2010) *Performance Assessment of Four Methods for Detection of A and B Toxins of Clostridium difficile with Comparison to a Consensus Gold Standard.* 110th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, San Diego, Abstract C-1147.
6. Harris, D. Hata, J. 2013.*Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **12**:2
7. Runic M, Wilcox MH, Gerding DN.. Clostridium difficile infection: New Developments in Epidemiology and Pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7: 526-536
8. Patel, Robin.2015.*Clinical Chemistry*.61:1:100-111
9. Kolecka, T. Boekhout.CBS-KNAW. Fungal Biodiversity. Neth, 2016

10. Clark a E et al. Clin Micrbiol. Rev. 2013;26:547-603
11. Lee, W et al. Ann Lab Med 2015;35:69-75
12. Rhoads DD.et al.2016. Arch Pathol Lab Med, 140:362-370
13. Rhoads, DD et al. 2015. Pathol Inform. 6:23
14. Sullivan, K. et al. 2017. Clinical Microbiology Newsletter. 39:16:125-129
15. Abbott, A. et al. 2017. Clinical Microbiology Newsletter. 39:17:133-142
16. Laupland, K. et al. 2013. J. Infect Dis Med Microbiol. 24:3:125-128
17. Novack, SM, Marlowe, E.2013. Clin Lab Med 33:567-588
18. Ledebner NA and Dallas SD. 201. J. Clin Microbiol.52:3140-3146
19. Jorgensen, J. et al.2015. Manual of Clinical Microbiology. 11th Ed. Vol 1.
20. Department of Laboratory Medicine and Pathology – Procedures. Mayo Clinic Florida

Nuevas Herramientas Diagnosticas en el Laboratorio de Microbiología

El desarrollo e implementación de técnicas diagnósticas han tenido un profundo efecto en el laboratorio de la microbiología en las últimas décadas. La microscopia tradicional, cultivo y técnicas bioquímicas han sido lo principal para la identificación y susceptibilidad antimicrobiana. Estas técnicas permanecen en la mayoría de los laboratorios. Nuevas técnicas, tales como ensayos basados en ácidos nucleicos y espectrofotometría de masa, han incrementado su uso y están reemplazando las técnicas tradicionales.

El Laboratorio de Microbiología Tradicional:

Las pruebas de microbiología tradicional han incluido el microscopio, reacción antígeno-anticuerpo, serología y cultivo. Mientras en muchos casos esto representa el “Gold standard” para el diagnóstico, por ejemplo como en malaria o muestras de heces de pacientes. En la mayoría de los casos, el microscopio solamente ofrece un diagnostico presuntivo que requiere futura confirmación con otras pruebas.

En el caso de bacterias y hongos, las muestras clínicas se inoculan en medios de cultivo selectivos y diferenciales y se incuban y esto ayuda a una identificación preliminar. Luego pruebas bioquímicas para identificar y la utilización de caldos de dilución para determinar las susceptibilidades.

Generalmente, cuando los cultivos son positivos, ellos representan un diagnóstico "Gold standard". Sin embargo, hay un problema cuando el cultivo muestra poca sensibilidad. Por ejemplo los cultivos de sangre pueden ser solamente positivos entre 10 a 15% de casos de severa neumonía. Varios días de incubación se requieren para obtener crecimiento de bacterias y levaduras y frecuentemente semanas o meses para hongos filamentosos y micobacterias. En caso de enfermedad severa, aún horas de retraso en el tratamiento puede tener significativos efectos adversos en los resultados.

PNA-FISH:

Las sondas de PNA son piezas sintéticas de ADN con características químicas únicas en las cuales la cadena de azúcar fosfato de DNA cargada en forma negativa, es reemplazada por una poliamida neutral de unidades repetitivas. Las bases de nucleótidos individuales pueden adherirse, lo que permite que la prueba de PNA se hibridice a unos blancos complementarios de ácidos nucleicos. Estas pruebas han mejorado las características de hibridación suministrando resultados más rápidos y más específicos que las pruebas de DNA tradicionales.

El PNA-FISH es una nueva técnica de hibridación in situ fluorescente. Al penetrar la pared de la célula microbiana, la prueba de PNA marcados hibridizan secuencias de RNAr multicopias con los microorganismos resultando en células fluorescentes.

Recientemente, AdvanDx (Woburn, Massachusetts) introdujo pruebas diagnósticas in vitro (usando PNA-FISH) el cual ha sido aprobado por la Federación de Drogas y Alimentos (FDA). Estas pruebas pueden ser usadas directamente para identificar *S. aureus* and *C. albicans* y diferenciar de *Enterococcus faecalis*.

La identificación está basada en la presencia de organismos que fluorescen con un color verde brillante. Para resultados negativos, el fondo del material se observa de un color rojo claro. Múltiples estudios se han hecho para evaluar la eficacia del PNA-FISH con el fin de identificar *S. aureus* and *C. albicans* en cultivos de sangre positivos. El test ha demostrado tener alta sensibilidad y especificidad.

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectroscopy Un espectro de masa: que representa el número de iones en una masa dada que impactan el detector a través del tiempo.

MALDI posiciona una matriz que asiste en la desorción e ionización de abundantes proteínas bacterianas y fúngicas a través de energía laser. Aunque, se puede hacer la extracción de proteína, lo más frecuente es realizar la prueba, tomando directamente las colonias bacterianas o fúngicas (usando un asa plástica o un palillo de madera) y se coloca una pequeña muestra sobre una plataforma metálica "target" MALDI-TOF MS (desechable o reusable). Luego se cubre con una solución de ácido fórmico, se deja secar y se añade con una solución matrix. La plataforma metálica (target) se sitúa dentro de un espectrofotómetro de masa. La solución matrix (alfa-ciano-4-acido-hydroxiccinamico, es disuelta en un 50% de acetonitrilo y 2.5 de ácido trifluoroacético). Esto protege las bacterias y los hongos de la fragmentación y lo activa para la desorción a través de la energía laser; la mayoría de esta energía es absorbida por la solución matrix, convirtiéndose en un estado ionizado.

La carga es transferida desde la solución matrix a las moléculas microbianas; estas, luego son aceleradas a través de un campo cargado electrostáticamente positivo dentro de un tubo en un tiempo de fuga (flight) o TOF. En el tubo, el cual es sometido a un vacío, los iones viajan hacia un detector de iones, los pequeños analitos viajan rápidamente, seguido por los analitos más grandes; así se produce un espectro de masa. Ellos proveen un único perfil para cada tipo de microorganismos, con unos picos específicos para generar sus especies.

Son estas proteínas altamente abundantes (predominantemente ribosomales) las que generan el espectro de masa. Ellas suministran un perfil único para tipos individuales de microorganismos con pasos específicos para géneros y especies. El software del computador compara el espectro de masa generado con una base de datos de referencia del espectro, generando una lista de los organismos relacionados más cercanos con rangos numéricos.

Las identificaciones erróneas son poco usuales pero ocurren con organismos relacionados cercanamente; por ejemplo *Escherichia coli* y especies de *Shigella* no están bien diferenciadas por MALDI-TOF MS.

Dos sistemas comerciales de MALDI-TOF MS están disponibles y provienen de bioMérieux, Inc. (Durham, NC) and Bruker Daltonics, Inc. (Billerica, MA).

Se requiere de un alto costo de adquisición de la máquina, MALDI-TOF MS, pero tiene el beneficio que los costos de consumo diario son mínimos y las necesidades de referir cepas a laboratorios de referencia, se reducen notablemente.

Dependiendo de qué tan alto sea el valor(puntaje porcentual) los organismos son identificados a nivel de genero y especie.

Syndromic Panels:

La reciente introducción de “multiplex syndromic panels” pueden ser aplicados para cultivos de sangre, heces y líquido cefalorraquídeo y representan un gran avance hacia esta necesidad.

Los “Syndromic Panels” son particularmente atractivos. Ellos reducen la necesidad de múltiples muestras, simplifica el algoritmo, reduce el tiempo de resultado; mejora la sensibilidad comparado con otros métodos convencionales; y en algunos casos permite identificar patógenos que no son detectables por otros métodos convencionales. Además, la información diagnóstica puede incrementar tanto la satisfacción del médico como del paciente.

1. Biofire (Diagnostics, Salt Lake City, UT)

Los paneles para cultivos de sangre están disponibles para identificar el género y la especie de patógenos y determinantes comunes de resistencia antimicrobiana en unas pocas horas en vez de 1 a 2 días que se requieren para sub-cultivar y obtener la identificación y susceptibilidad.

Clostridiodes (Clostridium) difficile:

La infección por *C. difficile* es la principal causa de colitis pseudomembranosa asociada a antibióticos y la causa más frecuente de diarrea adquirida en el hospital, responsable de más de 250,000 casos de enfermedad diarreica por año en los Estados Unidos.

Solamente cepas que portan el locus de patogenicidad (PaLoc) poseen la información genética para la entero toxina de *C. difficile*, el *TcdA* y la citotoxina, *TcdB*. Solamente las cepas productoras de *TcdA* y/o *TcdB*, causan Infección por *C. Difficile*. El *TcdC* es una proteína regulatoria que controla la expresión de la toxina. El gen *tcdC* ha ganado atención diagnóstica desde que apareció el tipo hipervirulento 027/NAPI (North American pulsotype 1), ahora llamado ribotipo 027.

El uso de un test algoritmo puede mejorar la sensibilidad diagnóstica, especificidad, valor predictivo y negativo, mientras incrementa en general la exactitud en la detección del gen *TcdC*. Este algoritmo utiliza el alero *C. Diff Quick Chek TM Complete* (TechLab, Blacksburg, Va) un inmunoensayo para la detección simultánea del antígeno de CD y las toxinas A y B seguido por el gen *tcdC* LDT del *C. difficile* (CDT-PCR).

El ácido nucleico es liberado de la bacteria en las heces y la presencia del gen *tcdC* de la toxina es positiva para *C. difficile*, usando un PCR en tiempo real en un instrumento *LighCycler con FRET hybridization probe*.

Los *primers y probes* son específicos al gen *tcdC* usado por Clínica Mayo de Rochester. Esto permite aumentar la detección de la Toxina A y B del *C. difficile* en una manera oportuna.

Cuando se comparó con una prueba “Gold standard” los resultados combinados de EIA, ICA, CDT-PCR y citotoxicidad para cultivo celular, el algoritmo ICA/CDT-PCR tiene una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de 100%, 99.4%, 91.6% y 100% respectivamente.

Otras Herramientas:

1. **Total Laboratory Automatization (TLA):** Apunta a mejorar la calidad. Reduce el tiempo de resultados, mejora el manejo e incremento de número de muestras, reduce el número de empleados calificados y es económicamente efectivo.
Tres compañías proporcionan diferentes soluciones para un TLA en microbiología: BD-Kiestra, bioMérieux and Copan. Otros métodos y dispositivos automatizados vendrán en el futuro cercano. Estos incluyen tomar colonias por métodos automatizados para la identificación en MALDI-TOF MS y la preparación de pruebas de susceptibilidad.
2. **Telemicrobiología:** La forma más común de telemicroscopía incluye usando técnicas de captura estática. Whole Slide Imagin (WSI), video telemicroscopia (VT). Esta tecnología es económica y fácil de implementar y almacenar.
La telemicroscopia solo requiere un microscopio adherido a una cámara. Para el WSI y VT se requieren de equipo más sofisticado.
 - **Digital Plate Reading (DPR):** Puede involucrar el análisis remoto de imágenes digitales de medios de cultivos. Sistema DPR requiere un componente que simultáneamente incuba cultivos mientras emplea automatización para mover estos sobre una estación y capturar la imagen. Estas imágenes son analizadas e interpretadas por microbiólogos quienes las ven en un computador, usando el programa proporcionado por el fabricante.
 - **Teléfono Celular:** Muchos teléfonos celulares están ahora equipados con cámaras de alta resolución y conectados al internet. La telemicrobiología móvil ofrece una esperanza alcanzable, exacta y rápida para la teleconsulta en comunidades en desarrollo alrededor del mundo.

- **Telemicroscopia para Consultar con el Experto:** El Centro de Control y Prevención, División de Enfermedades parasitarias y Diagnostico en Malaria, Servicio de Asistencia (DPDx) ofrece alrededor del mundo telediagnóstico para infecciones parasitarias. DPDx, ha recibido más de 3,300 solicitudes para telediagnóstico de más de 60 diferentes países desde que comenzó aceptando telediagnóstico en 1999. Las imágenes recibidas por DPDx para consulta, incluyen la mayoría fotografías digitales de muestras de sangre y heces, secciones de tejidos, artrópodos y lombrices.

Bibliography

1. Van Belkum, A et al. 2013 Ann Lab Med.33:14-27
2. De la Maza, Color Atlas of Medical Bacteriology.ASM, 2004. P. 103, 107
3. Tile, P. 2014. Diagnostic Microbiology.13th Ed. P. 113
4. Ramsey-Walker, D., Meza, D., and Hata, D.J. (2010) *Detection of Toxigenic Clostridium difficile: Are Two Tests Better than One?* 110th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, San Diego, Abstract C-1148
5. Meza, D., Ramsey-Walker, D., and Hata, D.J. (2010) *Performance Assessment of Four Methods for Detection of A and B Toxins of Clostridium difficile with Comparison to a Consensus Gold Standard.* 110th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, San Diego, Abstract C-1147.
6. Harris, D. Hata, J. 2013. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials **12:2**

7. Runic M, Wilcox MH, Gerding DN.. Clostridium difficile infection: New Developments in Epidemiology and Pathogenesis. Nat Rev Microbiol 7: 526-536
8. Patel, Robin.2015.Clinical Chemistry.61:1:100-111
9. Kolecka, T. Boekhout.CBS-KNAW. Fungal Biodiversity. Neth, 2016
- 10.Clark a E et al. Clin Microbiol. Rev. 2013;26:547-603
- 11.Lee, W et al. Ann Lab Med 2015;35:69-75
- 12.Rhoads DD.et al.2016. Arch Pathol Lab Med, 140:362-370
- 13.Rhoads, DD et al. 2015. Pathol Inform. 6:23
- 14.Sullivan, K. et al. 2017.Clinical Microbiology Newsletter. 39:16:125-129
- 15.Abbott, A. et al. 2017. Clinical Microbiology Newsletter. 39:17:133-142
- 16.Laupland, K. et al. 2013.J. Infect Dis Med Microbiol. 24:3:125-128
- 17.Novack, SM, Marlowe, E.2013.Clin Lab Med 33:567-588
- 18.Ledeboer NA and Dallas SD. 201. J. Clin Microbiol.52:3140-3146
- 19.Jorgensen, J. et al.2015. Manual of Clinical Microbiology. 11th Ed. Vol 1.
- 20.Department of Laboratory Medicine and Pathology – Procedures. Mayo Clinic Florida