



BBL Lowenstein-Jensen Medium
BBL Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride
L007464 • Rev. 11 • Listopad 2015.



POSTUPCI KONTROLE KVALITETE (Neobavezno)

I UVOD

Podloga Lowenstein-Jensen koristi se za izolaciju i uzgoj mikobakterija. Podloga je pakirana u epruvetama, a koristi se za polukvantitativno ispitivanje katalaze kao pomoć u razvrstavanju mikobakterija.

II POSTUPAK ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI

A. Postupak za pripremanje inokulata

1. Inokulirajte kosu podlogu Lowenstein-Jensen s koncentriranim kulturama odgovarajućih mikobakterijskih sojeva pomoću sterilnih štapića za inokulaciju.
2. Epruvete inkubirajte s djelomično otvorenim poklopcima na $35 \pm 2^\circ\text{C}$ u aerobnoj atmosferi kojoj je dodan ugljični dioksid sve dok se ne dobije jak rast (obično u roku od 2 do 3 tjedna).
3. Uklonite naraslu kulturu sa sterilnim naoštrenim štapićem za aplikaciju laganim uklanjanjem stanica s površine podloge i pazite da staničnim prinosom ne onečistite podlogu.
 - a. Za *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Prebacite rast u 5,0 mL bujona Middlebrook 7H9 s glicerolom u sterilnu staklenu epruvetu s navojnim čepom koja sadrži sterilne staklene kuglice.
 - (2) Dobro promiješajte mikserom (nekoliko minuta) sve dok iz otopine ne uklonite velike grude.
 - (3) Usporedite otopinu sa standardom nefelometra McFarland br. 1. Otopina treba biti mutnija od standarda.
 - (4) Epruvetu postavite u okvir na 2 – 3 h pri sobnoj temperaturi da biste omogućili da se veliki dijelovi slegnu na dno.
 - (5) Prebacite supernatant u sterilni spremnik.
 - (6) Prilagodite zamućenost otopine standardu McFarland br. 1 laganim dodavanjem sterilnog bujona Middlebrook 7H9 s glicerolom. Dobro protresite.
 - (7) Razrijedite na 10^5 CFU/mL prije korištenja. Dobro izmiješajte i razmažite inokulat na podlogu za ispitivanje pomoću kalibrirane ušice od 0,01 mL.
 - b. Za sve ostale sojeve mikobakterija:
 - (1) Prebacite dobiveno u sterilnu epruvetu od 50 mL za centrifugiranje s navojnim čepom koja sadrži 8 – 12 sterilnih staklenih kuglica (promjera 2 mm) i 5 mL mikobakterijske otopine koja je pripremljena na sljedeći način:
 - Izmiješajte sljedeće sastojke u boci od 1 L i prilagodite pH pomoću natrijevog hidroksida 1N, na 6,7 – 7,0
Govedi albumin (bez masnih kiselina) 1,0 g
Polisorbat 80 0,1 mL
Pročišćena voda 500 mL
 - Sterilizirajte membranskom filtracijom (filar od 0,2 μ)
 - Aseptički prenesite po 5,5 mL u sterilne epruvete s navojnim čepom.
 - (2) Emulgirajte mikobakterijski rast na bočnoj strani epruvete za centrifugiranje s navojnim čepom pomoću štapića za aplikaciju. Promiješajte soj i razrjeđivač.
 - (3) Zatvorite epruvetu i „promiješajte mikserom“ približno 10 min sve dok se ne dobije dobro izmiješana otopina bez grudica.
 - (4) Dodajte 15 mL sterilne mikobakterijske otopine i dobro izmiješajte.
 - (5) Usporedite otopinu sa standardom nefelometra McFarland br. 1. Otopina treba biti mutnija od standarda.
 - (6) Epruvetu postavite u okvir na 2 – 3 h pri sobnoj temperaturi da biste omogućili da se veliki dijelovi slegnu na dno.
 - (7) Aspirirajte supernatant i prebacite ga u sterilni spremnik. Otopina treba biti mutnija od standarda McFarland br. 1 i bez velikih neotopljenih dijelova. Ako su još prisutni veliki dijelovi, promiješajte i pričekajte da se slegne dodatnih 1 h. Prebacite supernatant u sterilni spremnik.
 - (8) Prilagodite zamućenost otopine standardu McFarland br. 1 laganim dodavanjem sterilne mikobakterijske otopine. Dobro protresite.
 - (9) Alikvote otopine stavite u epruvete za zamrzivač i označite ih s vrstom organizama koje sadrže i datumom pripreme.
 - (10) Zamrznite otopine na niskoj temperaturi u zamrzivaču na -60°C . Epruvete možete čuvati do 6 mjeseci.
 - (11) Za upotrebu izvadite zamrznute epruvete iz zamrzivača i brzo otopite sadržaj postavljanjem epruveta u vodenu kupelj na $30 - 35^\circ\text{C}$. Razrijedite na 10^5 CFU/mL prije korištenja. Dobro izmiješajte i razmažite inokulat na podlogu za ispitivanje pomoću kalibrirane ušice od 0,01 mL.

B. Postupci za ispitivanje podloga

Podloga Lowenstein-Jensen

1. Inokulirajte površinu sa sterilnom jednokratnom petljom za inokulaciju od 0,01 mL pomoću kultura pripremljenih prema prethodno opisanom postupku.
2. Inkubirajte epruvete s djelomično otvorenim poklopcima na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi kojoj je dodan ugljični dioksid.
3. Nakon 14 dana inkubacije u svaku kulturu dodajte 1,0 mL polisorbata 80-peroksidnu otopinu koja se priprema na sljedeći način:
 - a. 30% vodikovog peroksida. Pohranite u hladnjak.
 - b. 10% polisorbata 80 koji je pripremljen na sljedeći način:
 - (1) Izmiješajte 10 mL polisorbata 80 i 90 mL pročišćene vode.
 - (2) Stavite u autoklav na 121 °C na 10 min.
 - (3) Pohranite u hladnjak.
 - c. Neposredno prije ispitivanja izmiješajte dva jednaka dijela otopine.
4. Kulture držite u uspravnom položaju 5 min na sobnoj temperaturi.
5. Izmjerite (mm) visinu stupca mjehurića iznad površine podloge.
6. Očekivani rezultati

Stupac mjehurića viši od 45 mm.

**Mycobacterium kansasii*, grupa I
ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, grupa II
ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, grupa IV
ATCC 6841

Stupac mjehurića niži od 45 mm.

**Mycobacterium tuberculosis* H37Ra
ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, grupa III
ATCC 13950

*Preporučeni soj organizama za korisničku kontrolu kvalitete.

Kosa podloga Lowenstein-Jensen i boce

1. Inokulirajte reprezentativne uzorke dolje navedenim kulturama.
 - a. Inokulirajte kose podloge ili boce sterilnom jednokratnom kalibriranom ušicom od 0,01 mL pomoću mikobakterijskih kultura pripremljenih prema prethodno opisanom postupku.
 - b. Inkubirajte spremnike s djelomično otvorenim poklopcima na 35 ± 2 °C u aerobnoj atmosferi kojoj je dodan ugljični dioksid.
2. Pregledajte epruvete i boce nakon 7, 14 i 21-og dana i provjerite rast, selektivnost i pigmentaciju.
3. Očekivani rezultati

- a. Za podlogu Lowenstein-Jensen

CLSI organizmi	ATCC	Izolacija
<i>*Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Rast
<i>*Mycobacterium kansasii</i> , grupa I	12478	Rast
<i>*Mycobacterium scrofulaceum</i> , grupa II	19981	Rast
<i>*Mycobacterium intracellulare</i> , grupa III	13950	Rast
<i>*Mycobacterium fortuitum</i> , grupa IV	6841	Rast

- b. Za podlogu Lowenstein-Jensen s 5% natrijevog klorida

Organizam	ATCC	Izolacija
<i>*Mycobacterium fortuitum</i>	6841	Rast
<i>*Mycobacterium kansasii</i>	12478	Nema rasta

*Preporučeni soj organizama za korisničku kontrolu kvalitete.

III DODATNA KONTROLE KVALITETE

1. Provjerite epruvete ili boce prema objašnjenju iz poglavlja „Pogoršanje kvalitete proizvoda”.
2. Vizualno pregledajte reprezentativne epruvete ili boce da biste utvrdili kako nemaju fizičkih oštećenja koja će utjecati na upotrebu.
3. Odredite pH potenciometrijski na sobnoj temperaturi kako biste provjerili pridržava li se propisanih vrijednosti $7,0 \pm 0,2$.
4. Inkubirajte neinokulirane reprezentativne epruvete ili boce na $20 - 25$ °C i $30 - 35$ °C pa pregledajte nakon 7 i 14 dana jesu li onečišćene mikrobima.

INFORMACIJE O PROIZVODU

IV NAMJENA

Podloga Lowenstein-Jensen koristi se za uzgoj *Mycobacterium tuberculosis* i ostalih vrsta mikobakterija.

V SAŽETAK I OBJAŠNJENJE

Lowenstein je originalno formulirao podlogu za uzgoj mikobakterija u koju su inkorporirani kongo-crvenilo i malahitno zelenilo za djelomičnu inhibiciju ostalih bakterija.^{1,2} Te su boje na sličan način koristili i drugi istraživači, posebice Sonnenschein³ i Hohn.⁴ U SAD-u su popularne gencijana violet podloge Corper⁵ i Petroff⁶, kao i podloga Petragnani, koja sadrži malahitno zelenilo. Postojeća formula koju je razvio Jensen,⁷ ima ponešto drugačiji sadržaj citrata i fosfata, ne sadrži kongo-crvenilo i ima povećanu koncentraciju malahitnog zelenila.

BBL-ovi pripremljeni proizvodi podloge Lowenstein-Jensen uključuju kosu podlogu u epruveti za opću primjenu u uzgoju vrsta *Mycobacterium*, boce za upotrebu ako je potrebna veća površina i podloge u epruvetama za provođenje polukvantitativnog ispitivanja katalaze. Taj zadnje navedeni postupak razvio je Wayne⁸ i koristan je razvrstavanje mikobakterija.

Nadalje, podloga je dostupna uz dodavanje 5% natrijevog klorida jer je karakteristika određenih mikobakterija da toleriraju 5% natrijevog klorida (npr., *M. fortuitum* i *M. chelonae* podskupine *abscessus*).⁹ Većina brzorastućih organizama, spororastućih *M. triviale* i nekih sojeva *M. flavescens* također rastu na podlozi koja sadrži NaCl. Nemogućnost da raste *M. chelonae* subsp. *chelonae* olakšava diferencijaciju od ostalih članova niza *M. fortuitum* (npr., *M. chelonae* podvrste *abscessus*).^{9,10}

VI NAČELA POSTUPKA

Baza podloge Lowenstein-Jensen relativno je jednostavna formulacija koja zahtijeva dodatke za rast mikobakterija. Mješavina glicerola i jaja dodaje se prije postupka kondenzacije. Te tvari osiguravaju masne kiseline i proteine koji su potrebni za metabolizam mikobakterija. Koagulacija albumina iz jaja tijekom sterilizacije osigurava krutu tvar koja je potrebna za postupak inokulacije.

VII REAGENSI

Podloga Lowenstein-Jensen

Približna formula* po 600 mL pročišćene vode

Monokalijev fosfat	2,5 g	Krumpirovo brašno	30,0 g
Magnezijev sulfat	0,24 g	Malahitno zelenilo	0,4 g
Natrijev citrat	0,6 g	Glicerol	12,0 mL
L-asparagin	3,6 g	Cijelo jaje	1000,0 mL

*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

Podloga Lowenstein-Jensen s 5% natrijevog klorida sadrži prethodno navedene sastojke uz 600 mL, 80 g natrijevog klorida.

Upozorenja i mjere opreza: Za *in vitro* dijagnostiku.

Epruvete i bočice s pričvršćenim poklopcima trebaju se oprezno otvarati kako ne bi došlo do ozljeda pri pucanju stakla.

U kliničkim uzorcima mogu biti prisutni patogeni mikroorganizmi, uključujući viruse hepatitisa i virus humane imunodeficiencije. Pri rukovanju svim predmetima kontaminiranim krvlju i drugim tjelesnim tekućinama treba se pridržavati „Standardnih mjera opreza“¹¹⁻¹⁴ i institucionalnih smjernica. Nakon upotrebe, pripremljene epruvete, spremnici za uzorke i ostali kontaminirani materijali moraju se sterilizirati u autoklavu prije odlaganja.

Načini rada i postupci, oprema i sredstva biološke sigurnosti razine 2 potrebni su za rukovanje kliničkim uzorcima koji ne stvaraju aerosol kao što je priprema razmaza otpornih na kiselinu. Sve radnje kojima se stvara aerosol moraju se raditi u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu klase I ili II. Postupci, oprema i sredstva biološke sigurnosti razine 3 potrebni su za laboratorijske radnje vezane za množenje i rukovanje kulturama *M. tuberculosis* i *M. bovis*. Za istraživanja na životinjama također su potrebni posebni postupci.¹³

Upute za čuvanje: Epruvete i bočice po primitku pohranite na tamnom mjestu na temperaturi od 2 °C do 8 °C. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Otvorite neposredno prije upotrebe. Smanjite izlaganje svjetlosti na najmanju moguću mjeru. Podloge pohranjene prema uputama prije same upotrebe mogu se inokulirati sve do isteka roka valjanosti i inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije. Prije inokulacije pričekajte da se podloga zagrije do sobne temperature.

Pogoršanje kvalitete proizvoda: Ne upotrebljavajte epruvete niti bočice ako imaju vidljive znakove kontaminacije mikrobima, promjene boje, sušenja ili ostale znakove pogoršanja kvalitete.

VIII PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE

Uzorci pogodni za podlogu mogu se obraditi raznim tehnikama. Detaljne informacije potražite u odgovarajućim tekstovima.^{15,16} Uzorke treba uzeti prije obrade protumikrobnih agensa. Potrebno je izraditi propise za brzu dostavu u laboratorij.

IX POSTUPAK

Priloženi materijal: Podloga Lowenstein-Jensen Medium ili podloga Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Potreban materijal koji se nabavlja zasebno: podloga za dodatne kulture, reagensi, organizmi za kontrolu kvalitete i laboratorijska oprema prema potrebi.

Postupak ispitivanja: Primjenjujte aseptične tehnike.

Koriste se postupci ispitivanja koje preporučuje Centar za kontrolu i prevenciju (CDC) za primarnu izolaciju iz uzoraka koji sadrže mikobakterije.¹⁰ Preporučuje se otopina N-acetil-L-cistein-natrijevog hidroksida (NALC-NaOH) kao blagi, ali učinkoviti agens za digestiju i dekontaminaciju. Ti reagensi dio su mikobakterijskog kompleta za digestiju/dekontaminaciju **BBL MycoPrep**. Za detaljne upute o dekontaminaciji i uzgoju provjerite odgovarajuće reference.^{10,16-18}

Nakon inokulacije zaštitite spremnike za ispitivanje od svjetlosti i postavite u odgovarajući sustav uz aerobnu atmosferu obogaćenu ugljičnim dioksidom. Inkubirajte inokulirane kose podloge i boce na 35 ± 2 °C.

Kose podloge i podloge u boci trebete inkubirati u vodoravnom položaju sve dok se inokulum ne apsorbira. Epruvete i boce trebaju imati odvijene navojne čepove u prva 3 tjedna kako bi se omogućila cirkulacija ugljičnog dioksida za pokretanje rasta. Nakon toga zatvorite čepove da biste spriječili dehidraciju; jednom tjedno na kratko ih odvijte. Postavite epruvete u uspravan položaj ako nemate dovoljno prostora.

NAPOMENA: Kulture kožnih lezija za koje se sumnja na *M. marinum* ili *M. ulcerans* treba inkubirati na 25 – 33 °C za primarnu izolaciju; kod kultura za koje se sumnja na *M. avium* ili *M. xenopi* provjerite optimalni rast na 40 – 42 °C.¹⁰ Inkubirajte dvostruku kulturu na 35 – 37 °C.

Preporučeni postupak za polukvantitativno ispitivanje katalaze pomoću agara podloge Lowenstein-Jensen provodi se na sljedeći način:¹⁰

1. Inokulirajte površinu podloge s 0,1 mL 7-dnevne kulture soja ili ušicom s aktivno rastuće kose podloge svakog ispitnog soja. Također inokulirajte epruvete kulturom koja stvara puno katalaze, npr., *M. kansasii* i slabim sojem koji stvara enzim, npr., *M. intracellulare*, za kontrolu.
2. Inkubirajte uz odvijeni čep na 35 ± 2 °C u roku od 2 tjedna.
3. Pripremite mješavinu polisorbitat 80-peroksida dodavanjem jednakih dijelova:
 - a. 10% otopine polisorbitata 80 iz autoklava u destiliranoj vodi ili otopinu od 1 mL sterilnog polisorbitata 80 u 9 mL destilirane vode.
 - b. Vodikovog peroksida (30%).

4. U svaku kulturu dodajte mješavinu 1 mL polisorbitat 80-peroksida. Nakon 5 minuta u mm zabilježite visinu stupaca u boci.

Preporučeni postupak za ispitivanje tolerancije natrijevog klorida je sljedeći:^{10,17}

1. Izradite otopinu aktivno rastuće potkulture u bujonu Middlebrook 7H9 jednakom standardu mutnoće McFarland br. 1.
2. Inokulirajte 0,1 mL standardizirane kulture na kosoj podlozi Lowenstein-Jensen s 5% natrijevog klorida. Na sličan način inokulirajte kosu podlogu bez NaCl-a u epruveti za kontrolu rasta.
3. Inkubirajte s odvjanim čepom u atmosferi obogaćenoj s CO₂, početno u polegnutom okviru 1 tjedan na 28 – 30 °C za brzorastuće ili 35 ± 2 °C za spororastuće organizme.

4. Tjedno provjeravajte rast. Nastavite s inkubacijom tri tjedna, prema potrebi.

Korisnička kontrola kvalitete: Pogledajte poglavlje „Postupci kontrole kvalitete”

Svaka serija podloga ispitana je pomoću odgovarajućih organizama za kontrolu kvalitete, a ta su ispitivanja, kada je to bitno, usklađena sa specifikacijama i standardima instituta CLSI. Kao i uvijek, ispitivanja za kontrolu kvalitete moraju se provoditi u skladu s važećim lokalnim, državnim, saveznim ili nacionalnim propisima, uvjetima akreditiranja i/ili standardnim postupcima kontrole kvalitete vašeg laboratorija.

X REZULTATI

Kulture treba očitati u roku 5 – 7 dana nakon inokulacije i jednom tjedno nakon toga u trajanju od maksimalno 8 tjedana.

Zabilježite zapažanja:

1. Broj dana potreban da bi se kolonije postale makroskopski vidljive. Brzorastući organizmi imaju zrele kulture u roku 7 dana; spororastućima treba više od 7 dana za formiranje zrelih kolonija.
2. Stvaranje pigmenta
Bijeli, bež ili prljav = Nekromogenski (NC)
Limunasto, žuto, narančasto, crveno = Kromogenski (Ch)

Razmazi bojenja mogu pokazati bacile otporne na kiseline koje bilježe samo kao „bacili otporni na kiseline” osim u slučaju izvođenja konačnih ispitivanja.

Boce možete pregledati invertiranjem boca u stanju mikroskopskog seciranja. Očitajte pri povećanju 10-60x s transmissijskom svjetlošću. Brzo skenirajte na 10-20x i provjerite prisutnost kolonija. Veće povećanje (30-60x) korisno je za provjeru morfologije kolonije, odnosno u slučaju krivudavih kolonija nalik na užad.

Za polukvantitativno ispitivanje katalaze većina mikobakterija spada u dvije grupe.^{8,10,16}

1. Stupac mjehurića viši je od 45 mm.
M. chelonae
M. fortuitum
M. gordonae
M. kansasii (klinički značajno)
M. scrofulaceum

2. Stupac mjehurića niži je od 45 mm.

M. avium
M. bovis
M. gastri
M. haemophilum
M. intracellulare
M. kansasii (klinički beznačajno)
M. malmoense
M. marinum
M. tuberculosis
M. xenopi

Prisutnost ili odsutnost rasta u epruveti podloge koja sadrži 5% NaCl-a pomaže u diferencijaciji mikobakterijskih izolata. Ispitivanje tolerancije na sol pozitivno je ako se pojavi više kolonija na kontrolnoj podlozi i ako više od 50 kolonija raste na podlozi koja sadrži 5% NaCl-a.^{10,17} Kolonije na kontrolnoj podlozi, ali bez vidljivog rasta na ispitivanoj podlozi nakon ukupno 4 tjedna inkubacije znače negativno ispitivanje.^{10,16,17}

XI OGRANIČENJA POSTUPKA

Za identifikaciju organizmi moraju biti u čistoj kulturi. Za konačnu identifikaciju potrebno je provesti morfološka, biokemijska i/ili serološka ispitivanja. U odgovarajućim poglavljima potražite dodatne informacije i preporučene postupke.^{15,16,19}

XII RADNA SVOJSTVA

Podloga Lowenstein-Jensen Medium

U studiji koje je izradio Palaci i suradnici, 85 respiratornih uzoraka inokulirano je na kosim podlogama Lowenstein-Jensen (LJ) i u epruvetama **BBL MGIT** standardnim postupcima. Dvadeset i pet (25) uzoraka pokazalo se kao pozitivno na *M. tuberculosis*. Osjetljivost kulture za LJ i **MGIT** bila je 96,1% (25 od 26 pozitivnih kultura). Premda je vrijeme za detekciju bilo značajno kraće u **MGIT** epruvetama, nije bilo značajne razlike u osjetljivosti detekcije *M. tuberculosis* između te dvije metode.²⁰

Podloga Lowenstein-Jensen Medium Deep

Prije izdavanja sva pakiranja podloga Lowenstein-Jensen ispitana su kako bi se utvrdilo imaju li određena svojstva proizvoda. Uzorci su ispitivani s organizmima *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 i *M. tuberculosis* ATCC 25177 inokulacijom s 0,2 mL otopine bujona Middlebrook 7H9. Epruvete se inkubiraju s odvojenim čepovima 3 tjedna na 35 – 37 °C. Treba pripremiti mješavinu polisorbit 80-peroksida i u svaku kulturu treba dodati 1 mL. Nakon 5 minuta bilježi se visina stupaca u boci u mm. Pozitivnu reakciju katalaze predstavlja stupac mjehurića viši od 45 mm. Negativnu reakciju katalaze predstavlja stupac mjehurića niži od 45 mm. Pozitivna reakcija katalaze promatra se za *M. fortuitum*, *M. kansasii* i *M. scrofulaceum*. Negativna reakcija katalaze promatra se za *M. intracellulare* i *M. tuberculosis*.

Podloga Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Prije izdavanja sva pakiranja podloga Lowenstein-Jensen s 5% natrijevog klorida ispitana su kako bi se utvrdilo imaju li određena svojstva proizvoda. Uzorci su ispitani staničnom otopinom *M. fortuitum* ATCC 6841 i *M. kansasii* ATCC 12478 razrijeđenom s bujonom **BBL** Middlebrook 7H9 kako bi se dobilo 10³–10⁴ CFU-a. Epruvete se inkubiraju s odvojenim čepovima na 35 – 37 °C 7 – 14 dana u atmosferi obogaćenoj s CO₂. Uočen je umjeren do jak rast za *M. fortuitum*. *M. kansasii* je inhibiran.

XIII DOSTUPNOST

Kat. br.	Opis
221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Mycoflask , pakiranje od 100 boca
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, pakiranje od 10 epruveta veličine A
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, pakiranje od 100 epruveta veličine A

XIV REFERENCE

1. Lowenstein, E. 1931. Die Zachtung der Tuberkelbazillen aus dem strömenden Blute. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung I. Original. 120:127.
2. Lowenstein, E. 1933. Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch auf Malachitgrün-Einährboden. Ann. Inst. Pasteur. 50:161.
3. Sonnenschein. 1930. Dtsch. tierärztliche Wehnschr. 38:115.
4. Hohn, J. 1931. Der Z-Einährboden zur Kultur des Tuberkelbazillus. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung I. Original. 121:488-506.
5. Corper, H.J. 1919. The cultivation of recently isolated and laboratory strains of human tubercle bacilli on artificial media. Am. Rev. Tuberc. 3:461-472.
6. Petroff, S.A. 1918. J. Inf. Dis. 23:267.
7. Jensen, K.A. 1932. Rinzucht und Typenbestimmung von Tuberkelbazillensammen. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung I. Original. 125:222-239.
8. Wayne, L.G. 1962. Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. Am. Rev. Resp. Dis. 86:651-656.
9. Silcox, V.A., R.C. Good, and M.M. Floyd. 1981. Identification of clinical significant *Mycobacterium fortuitum* complex isolates. J. Clin. Microbiol. 14:686-691.
10. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
12. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53-80.
13. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
14. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
15. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller and R.H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
16. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
17. Isenberg, H. (ed.). 2004. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1, 2 and 3, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Carnoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Soubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
19. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
20. Palaci, M., S.Y.M., Ueki, D.N. Sato, M.A. Da Silva Tellis, M. Curcio, and E.A.M. Silva. 1996. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube of recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 34:762-764.

Tehnički servis i podrška na BD Diagnostics: obratite se lokalnom predstavniku tvrtke BD ili posjetite www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD