



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



PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ (Facoltativo)

I INTRODUZIONE

Lowenstein-Jensen Medium viene utilizzato per l'isolamento e la coltivazione di micobatteri. Il terreno dispensato a cilindro (deeps) in provetta viene impiegato per il test semi-quantitativo della catalasi come ausilio nella classificazione dei micobatteri.

II PROCEDURA DEL TEST

A. Procedura per la preparazione degli inoculi

1. Inoculare gli slant di Lowenstein-Jensen Medium con colture in stock dei ceppi micobatterici pertinenti utilizzando applicatori a bastoncino sterili per inoculo.
2. Incubare a 35 ± 2 °C le provette con i tappi non completamente avvitati, in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica, fino ad ottenere una crescita sostenuta (di solito entro 2 o 3 settimane).
3. Raccogliere la crescita con un applicatore a bastoncino sterile e affilato, rimuovendo delicatamente le cellule dalla superficie del terreno e facendo attenzione a non prelevare con le cellule anche il terreno di coltura.
 - a. Per *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177.
 - (1) Trasferire la crescita su 5,0 mL di brodo Middlebrook 7H9 con glicerolo in una provetta sterile di vetro con tappo a vite contenente microsfere di vetro sterili.
 - (2) Vortexare accuratamente (diversi minuti) finché la sospensione non risulta priva di grossi grumi.
 - (3) Paragonare tale sospensione allo standard del nefelometro di McFarland n. 1. La sospensione dovrà essere più torbida dello standard.
 - (4) Posizionare la provetta in un portaprovette per 2 o 3 h a temperatura ambiente, in modo da far depositare sul fondo le particelle grandi.
 - (5) Trasferire il sovranatante in un contenitore sterile.
 - (6) Regolare la torbidità della sospensione allo standard McFarland n. 1 aggiungendo lentamente il brodo sterile Middlebrook 7H9 con glicerolo. Agitare accuratamente.
 - (7) Prima di utilizzare, diluire a 10^5 UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare con striscio il terreno per test utilizzando un'ansa calibrata da 0,01 mL.
 - b. Per tutti gli altri ceppi micobatterici, procedere come segue.
 - (1) Trasferire la crescita in una provetta da centrifuga sterile con tappo a vite da 50 mL contenente da 8 a 12 microsfere di vetro sterili (diametro 2 mm) e 5 mL di Mycobacterium Diluent preparato come segue.
 - Mescolare i seguenti ingredienti in un matraccio da 1 L e regolare il pH a 6,7 – 7,0 utilizzando idrossido di sodio 1N.
Albumina bovina (priva di acidi grassi)..... 1,0 g
Polisorbato 80 0,1 mL
Acqua purificata 500 mL
 - Sterilizzare con filtrazione a membrana (filtro da 0,2 μ)
 - Dispensare asepticamente in provette sterili piccole con tappo a vite, in aliquote da 5,5 mL.
 - (2) Emulsificare la crescita micobatterica sulla parete laterale di una provetta da centrifuga con tappo a vite utilizzando un applicatore a bastoncino. Mescolare la crescita con il diluente.
 - (3) Tappare la provetta e "vortexare" per 10 min circa, finché la crescita non risulta ben sospesa e priva di grossi grumi.
 - (4) Aggiungere 15 mL di Mycobacterium Diluent e mescolare accuratamente.
 - (5) Paragonare tale sospensione allo standard del nefelometro di McFarland n. 1. La sospensione dovrà essere più torbida dello standard.
 - (6) Posizionare la provetta in un portaprovette per 2 o 3 h a temperatura ambiente in modo da far depositare sul fondo le particelle grandi.

- (7) Aspirare il sovrantante e trasferirlo in un contenitore sterile. La sospensione deve presentarsi più torbida dello standard McFarland n. 1 e priva di particelle grandi. Nel caso siano ancora presenti particelle grandi, mescolare e lasciar depositare per un'altra ora. Trasferire il sovrantante in un contenitore sterile.
- (8) Regolare la torbidità della sospensione allo standard McFarland n. 1. aggiungendo lentamente Mycobacterium Diluent. Agitare accuratamente.
- (9) Dispensare le aliquote di sospensione in flaconi da congelatore con etichetta adatta a riportare l'identificazione del microrganismo e la data di preparazione.
- (10) Congelare le sospensioni posizionando i flaconi in un congelatore a bassa temperatura a -60 °C. I flaconi possono essere conservati per un massimo di 6 mesi.
- (11) Per l'utilizzo, prelevare i flaconi congelati e scongelare rapidamente il contenuto mettendo la provetta a bagnomaria a 30 – 35 °C. Prima di utilizzare, diluire a 10⁵ UFC/mL. Mescolare accuratamente e inoculare con striscio il terreno per test utilizzando un'ansa calibrata da 0,01 mL.

B. Procedure per testare i terreni

Lowenstein-Jensen Medium Deep

1. Inoculare le superfici coniche con un'ansa da inoculazione sterile monouso da 0,01 mL, utilizzando colture preparate nel modo descritto sopra.
2. Incubare a 35 ± 2 °C le provette con i tappi non completamente avvitati, in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica.
3. Dopo un'incubazione di 14 giorni, aggiungere ad ogni coltura 1,0 mL di miscela di perossido e di polisorbato 80 preparata come segue.
 - a. 30% di perossido d'idrogeno. Conservare in frigorifero.
 - b. 10% di polisorbato 80 preparato nel modo seguente.
 - (1) Mescolare 10 mL di polisorbato 80 con 90 mL di acqua purificata.
 - (2) Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 10 min.
 - (3) Conservare in frigorifero.
 - c. Immediatamente prima di eseguire il test, mescolare parti uguali delle due soluzioni.
4. Tenere le colture in posizione verticale per 5 min a temperatura ambiente.
5. Misurare l'altezza (mm) della colonna di bolle d'aria sopra la superficie del terreno.

6. Risultati attesi

Colonna di bolle d'aria di altezza superiore a 45 mm.

**Mycobacterium kansasii*, Gruppo I

ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, Gruppo II

ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, Gruppo IV

ATCC 6841

Colonna di bolle d'aria di altezza inferiore a 45 mm.

**Mycobacterium tuberculosis*

H37Ra ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, Gruppo III

ATCC 13950

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

Lowenstein-Jensen Medium - slant e flaconi

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
 - a. Utilizzando anse calibrate sterili monouso da 0,01 mL, inoculare gli slant o i flaconi con colture micobatteriche preparate nel modo descritto sopra.
 - b. Incubare a 35 ± 2 °C i contenitori con i tappi non completamente avvitati, in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica.
2. Esaminare la crescita, la selettività e la pigmentazione nelle provette o nei flaconi dopo 7, 14 e 21 giorni.
3. Risultati attesi
 - a. Per Lowenstein-Jensen Medium

Organismi di controllo CLSI (ATCC Strains)

**Mycobacterium tuberculosis*Crescita
H37Ra (25177)

**Mycobacterium kansasii*,Crescita
Gruppo I (12478)
**Mycobacterium scrofulaceum*,Crescita
Gruppo II (19981)
**Mycobacterium intracellulare*,Crescita
Gruppo III (13950)
**Mycobacterium fortuitum*,Crescita
Gruppo IV (6841)

b. Per Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

**Mycobacterium fortuitum*Crescita
ATCC 6841
**Mycobacterium kansasii* Nessuna crescita
ATCC 12478

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette o i flaconi come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette o dei flaconi rappresentativi per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $7,0 \pm 0,2$.
4. Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette o i flaconi rappresentativi non inoculati ed esaminarli dopo 7 e 14 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Lowenstein-Jensen Medium viene utilizzato per la coltivazione di *Mycobacterium tuberculosis* ed altre specie micobatteriche.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il terreno formulato originalmente da Lowenstein per la coltivazione di micobatteri conteneva rosso congo e verde malachite per l'inibizione parziale di altri batteri.^{1,2} Tali coloranti sono stati utilizzati in modo simile da altri ricercatori, in particolare Sonnenschein³ e Hohn.⁴ Negli Stati Uniti era molto diffuso il terreno con violetto di genziana di Corper⁵ e Petroff⁶, unitamente al terreno di Petragnani, che conteneva verde malachite. La formula pronta all'uso, sviluppata da Jensen,⁷ ha un contenuto di citrato e di fosfato leggermente differente, non contiene rosso congo e presenta una concentrazione più elevata di verde malachite.

I preparati BBL di Lowenstein-Jensen Medium comprendono slant in provetta per uso generico nella coltivazione di specie *Mycobacterium*, flaconi per uso quando è richiesta una superficie maggiore e cilindri (deeps) in provetta per l'analisi semiquantitativa della catalasi. Quest'ultima procedura è stata sviluppata da Wayne⁸ ed è utile per la classificazione dei micobatteri.

Inoltre, il terreno è disponibile anche in versione arricchita con il 5% di cloruro di sodio, in quanto la capacità di tollerare il 5% di cloruro di sodio è una peculiarità di alcuni ceppi di micobatteri (es., *M. fortuitum* e *M. chelonae* ssp. *abscessus*).⁹ Anche la maggior parte dei batteri a crescita rapida, *M. triviale* a crescita lenta ed alcuni ceppi di *M. flavescens* crescono su terreni contenenti NaCl. L'incapacità di crescita di *M. chelonae* ssp. *chelonae* ne agevola la differenziazione da altri membri del complesso *M. fortuitum* (es., *M. chelonae* ssp. *abscessus*).^{9,10}

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Lowenstein-Jensen Medium Base è una formulazione relativamente semplice che richiede un supplemento per poter sostenere la crescita dei micobatteri. Prima del processo di ispessimento vengono aggiunti glicerolo e miscela di uovo. Tali sostanze apportano gli acidi grassi e le proteine necessarie al metabolismo dei micobatteri. La coagulazione dell'albumina di uovo durante la sterilizzazione offre un terreno solido ai fini dell'inoculazione.

VII REAGENTI

Lowenstein-Jensen Medium

Formula approssimata* per 600 mL di acqua purificata

Fosfato monopotassico	2,5	g
Solfato di magnesio	0,24	g
Citrato di sodio	0,6	g
L-asparagina	3,6	g
Fecola di patate	30,0	g
Verde malachite	0,4	g
Glicerolo	12,0	mL
Uovo intero	1000,0	mL

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride contiene gli ingredienti di cui sopra con 80 g di cloruro di sodio per 600 mL.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Aprire con estrema cautela le provette e i flaconi con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e il virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle linee guida dell'istituto e alle "Precauzioni standard".¹¹⁻¹⁴ Dopo l'uso, le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Per le manipolazioni di campioni clinici (es. preparazione di strisci acido-resistenti) che non comportano produzione di aerosol, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 2. Tutte le procedure che comportano la generazione di aerosol devono essere eseguite sotto cappa di sicurezza biologica di Classe I o II. Per le attività di laboratorio che comportano la propagazione e manipolazione di colture di *M. tuberculosis* e *M. bovis*, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 3. Anche gli studi su animali richiedono procedure speciali.¹³

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette e i flaconi al buio a 2 – 8 °C. Evitare di congelare e surriscaldare. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per i tempi di incubazione raccomandati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto

Non usare le provette o i flaconi se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni specifiche, consultare la documentazione appropriata.^{15,16} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito

Lowenstein-Jensen Medium, oppure
Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Materiali necessari ma non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test

Adottare tecniche asettiche.

Le procedure dei test sono quelle consigliate dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) per l'isolamento primario da campioni contenenti micobatteri.¹⁰ Si raccomanda una soluzione di N-acetil-L-cisteina e idrossido di sodio (NALC-NaOH) come agente – delicato ma efficace – sia per la decontaminazione che per la digestione. Questi reagenti sono forniti nel **BBL MycoPrep Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit**. Per istruzioni dettagliate sulla decontaminazione e la coltivazione, consultare la bibliografia appropriata.^{10, 16-18}

Dopo l'inoculazione, conservare i contenitori per test al riparo dalla luce e posizionarli in un sistema adatto con atmosfera aerobica arricchita di anidride carbonica. Incubare gli slant e i flaconi inoculati a 35 ± 2 °C.

I terreni in slant e in flacone dovranno essere incubati in piano orizzontale fino al completo assorbimento dell'inoculo. Per le prime 3 settimane sarà necessario non serrare completamente i tappi a vite delle provette e dei flaconi per consentire la circolazione di anidride carbonica per la crescita iniziale. Successivamente, serrare i tappi per evitare la disidratazione e allentarli per un breve periodo una volta alla settimana. Tenere le provette in posizione orizzontale in caso di limitazioni di spazio.

N.B. Le colture provenienti da lesioni cutanee dovute presumibilmente a *M. marinum* o *M. ulcerans* dovranno essere incubate a 25 – 33 °C per l'isolamento primario; le colture con presenza sospetta di *M. avium* o *M. xenopi* presenteranno una crescita ottimale a 40 – 42 °C.¹⁰ Incubare una coltura duplicata a 35 – 37 °C.

La procedura consigliata per il test semi-quantitativo della catalasi con cilindri di agar (deeps) di terreno Lowenstein-Jensen è la seguente.¹⁰

1. Inoculare la superficie del terreno con 0,1 mL di coltura in brodo di 7 giorni o con un'ansa completa di crescita proveniente da uno slant in crescita attiva per ogni ceppo di prova. Inoculare le provette anche con una coltura ad elevata produzione di catalasi, es. *M. kansasii*, e con un ceppo di enzima debole come controllo, es. *M. intracellulare*.
2. Incubare, senza avvitare completamente i tappi, a 35 ± 2 °C per 2 settimane.
3. Preparare una miscela di perossido e polisorbato 80 mescolando parti uguali di:
 - a. una soluzione sterilizzata in autoclave al 10% di polisorbato 80 in acqua distillata o una diluizione di 1 mL di polisorbato 80 sterile in 9 mL di acqua distillata;
 - b. perossido d'idrogeno (30%).
4. Aggiungere 1 mL della miscela di perossido e polisorbato 80 ad ogni coltura. Dopo 5 min, registrare l'altezza in mm delle colonne di bolle d'aria.

La procedura consigliata per il test di tolleranza al cloruro di sodio è la seguente.^{10,17}

1. Preparare una sospensione di una subcoltura a crescita attiva in brodo Middlebrook 7H9 con torbidità equivalente allo standard McFarland n. 1.
2. Inoculare 0,1 mL della coltura standardizzata su uno slant di Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride. Inoculare in maniera simile uno slant del terreno privo di NaCl come provetta di controllo della crescita.
3. Incubare senza serrare completamente i tappi, in atmosfera arricchita di CO₂, inizialmente in un portaprovette in piano per 1 settimana a 28 – 30 °C per i micobatteri a crescita rapida e a 35 ± 2 °C per quelli a crescita lenta.
4. Esaminare la crescita una volta alla settimana. Continuare l'incubazione per altre tre settimane, se necessario.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Vedere "Procedure di Controllo di qualità".

Ciascun lotto di terreno è stato testato utilizzando organismi per il controllo di qualità appropriati, e tali test soddisfano le specifiche di prodotto e gli standard CLSI, ove opportuno. Come di consueto, i test di controllo qualità devono essere eseguiti in ottemperanza alle normative locali, statali, federali o nazionali vigenti, nonché ai requisiti di certificazione e/o alle procedure standard di controllo di qualità del laboratorio specifico.

X RISULTATI

I risultati delle colture dovranno essere letti entro 5 – 7 settimane dall'inoculo e successivamente una volta alla settimana per un massimo di 8 settimane.

Registrare le osservazioni.

1. Numero di giorni necessari alle colonie per diventare macroscopicamente visibili.

I micobatteri a crescita rapida presentano colonie mature entro 7 giorni; quelli a crescita lenta richiedono più di 7 giorni per la formazione di colonie mature.

2. Produzione di pigmento

Bianco, crema o giallo-marrone = Non cromogenico (NC)

Limone, giallo, arancio, rosso = Cromogenico (Ch)

È possibile che gli strisci colorati mostrino bacilli acido-resistenti, che vengono registrati come "bacilli acido-resistenti" solo nel caso in cui non vengano effettuati test definitivi.

È possibile esaminare i flaconi capovolgendoli sulla stazione di un microscopio disseccante. Leggere a 10 – 60x con luce trasmessa. Effettuare la scansione rapida a 10 – 20x per ricercare la presenza di colonie. Per osservare la morfologia delle colonie – es. colonie a serpentina – può risultare utile un ingrandimento più elevato (30 – 60x).

Nel test semi-quantitativo della catalasi, la maggior parte dei micobatteri ricadono in due gruppi.^{8,10,16}

1. Colonna di bolle d'aria di altezza superiore a 45 mm.

M. chelonae

M. fortuitum

M. goodii

M. kansasii (clinicamente significativo)

M. scrofulaceum

2. Colonna di bolle d'aria di altezza inferiore a 45 mm.

M. avium

M. bovis

M. gastri

M. haemophilum

M. intracellulare

M. kansasii (clinicamente non significativo)

M. malmoense

M. marinum

M. tuberculosis

M. xenopi

La presenza o assenza di crescita nella provetta di terreno contenente il 5% di NaCl agevola la differenziazione degli isolati micobatterici. Il test di tolleranza al sale è positivo nel caso in cui appaiano numerose colonie sul terreno di controllo e crescano più di 50 colonie sul terreno contenente il 5% di NaCl.^{10,17} La presenza di colonie sul terreno di controllo, senza crescita visibile sul terreno di test dopo un totale di 4 settimane di incubazione, indica un risultato negativo del test.^{10,16,17}

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.^{15,16,19}

XII PERFORMANCE

Lowenstein-Jensen Medium

In uno studio condotto da Palaci et al., sono stati inoculati 85 campioni di tessuto respiratorio in slant di Lowenstein-Jensen (LJ) e in provette **BBL MGIT** con procedure standard. Venticinque (25) campioni sono stati riscontrati positivi al *M. tuberculosis*. La sensibilità della coltura è stata del 96,1% sia per LJ che per **MGIT** (25 delle 26 colture positive). Nonostante il tempo di rilevamento sia stato sensibilmente più breve per le provette **MGIT**, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella sensibilità di rilevazione del *M. tuberculosis* tra i due metodi.²⁰

Lowenstein-Jensen Medium Deeps

Prima dell'invio, tutti i lotti di Lowenstein-Jensen Medium Deeps vengono testati per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. I campioni vengono testati con *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 e *M. tuberculosis* ATCC 25177 inoculando 0,2 mL di sospensioni di brodo Middlebrook 7H9. Le provette, con i tappi non completamente avvitati, vengono incubate fino a 3 settimane a 35 – 37 °C. Si prepara quindi una miscela di perossido e polisorbato 80 di cui viene dispensato 1 mL in ogni coltura. Dopo 5 min, viene registrata l'altezza in mm delle colonne di bolle d'aria. Se la colonna di bolle d'aria ha un'altezza superiore a 45 mm, il risultato della reazione della catalasi è positivo. Se la colonna di bolle d'aria ha un'altezza inferiore a 45 mm, il risultato della reazione della catalasi è negativo. Una reazione positiva della catalasi viene osservata con *M. fortuitum*, *M. kansasii* e *M. scrofulaceum*. Una reazione negativa della catalasi viene osservata con *M. intracellulare* e *M. tuberculosis*.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Prima dell'invio, tutti i lotti di Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride vengono testati per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. I campioni vengono testati con sospensioni cellulari di *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. kansasii* ATCC 12478 diluite in BBL Middlebrook 7H9 Broth per produrre da 10³ a 10⁴ UFC. Le provette, con i tappi non completamente avvitati, vengono incubate a 35 – 37 °C per 7 – 14 giorni in atmosfera arricchita con CO₂. Con *M. fortuitum* è possibile osservare una crescita da moderata a sostenuta. *M. kansasii* è inibito.

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Mycoflask , scatola da 100 flaconi
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, confezione da 10 provette di misura A
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, scatola da 100 provette di misura A

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Lowenstein, E. 1931. Die Zachtung der Tuberkelba zillen aus dem stramenden Blute. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 120:127.
2. Lowenstein, E. 1933. Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch auf Malachitgrun Einahrboden. Ann. Inst. Pasteur. 50:161.
3. Sonnenschein. 1930. Dtsch. tierartze. Wehnschr. 38:115.
4. Hohn, J. 1931. Der Z-Einahrboden zur Kultur des Tuberkel-bazillus. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. 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. Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillentammen. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 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.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito 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