

POSTUPY KONTROLY KVALITY (Nepovinné údaje)

I ÚVOD

Lowenstein-Jensen Medium (Lowenstein-Jensenovo médium) se používá pro izolaci a kultivaci mykobakterií. Médium v hlubokých zkumavkách se používá pro semikvantitativní katalázový test jako pomůcka při klasifikaci mykobakterií.

II POSTUPY TESTU ÚČINNOSTI

A. Postup pro přípravu inokula

1. Naočkejte šikmé Lowenstein-Jensenovo médium zásobními kulturami příslušnými kmeny mykobakterií pomocí sterilních očkovačích tyček.
2. Zkumavky inkubujte s povolenými víčky v aerobní atmosféře s obohaceným oxidem uhličitým při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$, dokud nezískáte rozsáhlý růst (obvykle během 2 – 3 týdnů).
3. Sejměte nárůst sterilní ostrou aplikační tyčkou opatrným odstraněním buněk z povrchu média a dávejte pozor, abyste neodebrali spolu s buňkami i kultivační médium.
 - a. Pro *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Přeneste nárůst do 5,0 mL bujónu Middlebrook 7H9 s glycerolem ve sterilní skleněné zkumavce se šroubovacím víčkem obsahujícím skleněné kuličky.
 - (2) Dobře promíchejte (několik minut), aby se v suspenzi nevyskytovaly velké shluky.
 - (3) Porovnejte tuto suspenzi s nefelometrickým standardem č. 1 dle McFarlanda. Suspenze musí být více zakalená než standard.
 - (4) Vložte zkumavku do držáku na 2 – 3 hodiny při pokojové teplotě a umožněte usazení velkých částic na dně.
 - (5) Přeneste supernatant do sterilní nádoby.
 - (6) Upravte zakalení suspenze na McFarlandův standard č. 1 pomalým přidáváním sterilního bujónu Middlebrook 7H9 s glycerolem. Řádně protřepejte.
 - (7) Před použitím nařed'te na koncentraci 10^5 CFU/mL. Dobře promíchejte a naočkejte rozetřením na testovací médium pomocí 0,01 mL kalibrované kličky.
 - b. Pro všechny ostatní kmeny mykobakterií:
 - (1) Přeneste narostlé kolonie do sterilní 50 mL centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem, která obsahuje 8 – 12 sterilních skleněných kuliček (průměr 2 mm) a 5 mL diluentu pro mykobakteria, připraveného následujícím způsobem:
 - Promíchejte následující složky v láhvi o objemu 1 L a upravte pH pomocí 1N hydroxidu sodného na hodnotu 6,7 – 7,0.

Hovězí albumin (bez obsahu mastných kyselin)	1,0 g
Polysorbát 80	0,1 mL
Deionizovaná voda	500 mL
 - Sterilizujte membránovou filtrací (filtr o velikosti 0,2 μ)
 - Asepticky rozdělte na objemy po 5,5 mL do sterilních zkumavek se šroubovacím víčkem.
 - (2) Zhotovte emulzi narostlých mykobakterií na boční stěně centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem pomocí aplikační tyčky. Promíchejte nárůst s diluentem.
 - (3) Zavičkejte zkumavku a promíchejte ve vortexu přibližně po dobu 10 minut, dokud nedojde k dobré suspenzi nárůstu a rozpuštění velkých shluků.
 - (4) Přidejte 15 mL sterilního diluentu pro mykobakteria a pečlivě promíchejte.
 - (5) Porovnejte tuto suspenzi s nefelometrickým standardem č. 1 dle McFarlanda. Suspenze musí být více zakalená než standard.
 - (6) Vložte zkumavku do držáku na 2 – 3 hodiny při pokojové teplotě a umožněte usazení velkých částic na dně.
 - (7) Aspirujte supernatant a přeneste jej do sterilní nádoby. Suspenze musí být více zakalená než McFarlandův standard č. 1 a nesmí obsahovat velké částice. Pokud jsou stále přítomny velké částice, promíchejte a nechte odstát další 1 hodinu. Přeneste supernatant do sterilní nádoby.
 - (8) Upravte zakalení suspenze na McFarlandův standard č. 1 pomalým přidáváním sterilního diluentu pro mykobakteria. Řádně protřepejte.
 - (9) Rozdělte stejnoměrné podíly suspenze do mrazicích zkumavek s vyznačeným identifikovaným organismem a datem přípravy.
 - (10) Zmrazte suspenzi vložením zkumavek do nízkoteplotního mrazicího boxu při teplotě -60°C . Zkumavky je možné skladovat až 6 měsíců.
 - (11) Před použitím vyjměte zmrzlé zkumavky z mrazicího boxu a rychle rozmrazte obsah vložením zkumavky do vodní lázně s teplotou $30 - 35^\circ\text{C}$. Před použitím nařed'te na koncentraci 10^5 CFU/mL. Dobře promíchejte a naočkejte rozetřením na testovací médium pomocí 0,01 mL kalibrované kličky.

B. Postup pro testovací média

Hluboké zkušavky s Lowenstein-Jensenovým médiem

1. Naočkejte tlustší povrchy sterilní jednorázovou 0,01 mL očkovací kličkou pomocí kultur připravených výše popsaným způsobem.
2. Inkubujte zkušavky s povoleným víčkem při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$ v aerobním prostředí s obohaceným oxidem uhličitým.
3. Po 14 dnech inkubace přidejte ke každé kultuře 1,0 mL směsi peroxidu a polysorbátu 80, připravené následujícím způsobem:
 - a. 30% peroxid vodíku. Skladujte v chladničce.
 - b. 10% polysorbát 80, připravený následujícím způsobem:
 - (1) Smíchejte 10 mL polysorbátu 80 s 90 mL čištěné vody.
 - (2) Sterilizujte v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 10 minut.
 - (3) Skladujte v chladničce.
 - c. Těsně před provedením testu promíchejte stejné díly obou roztoků.
4. Udržujte kultury v kolmé poloze po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
5. Změřte (v mm) výšku sloupce bublinek nad povrchem média.
6. Očekávané výsledky

Sloupec bublinek vyšší než 45 mm.

**Mycobacterium kansasii*, skupina I
ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, skupina II
ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, skupina IV
ATCC 6841

Sloupec bublinek nižší než 45 mm.

**Mycobacterium tuberculosis* H37Ra
ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, skupina III
ATCC 13950

*Doporučený kmen organismu pro kontrolu kvality uživatelem.

Šikmé Lowenstein-Jensenovo médium a láhve

1. Naočkejte reprezentativní vzorky níže uvedenými kulturami.
 - a. Pomocí sterilních jednorázových 0,01 mL kalibrovaných kliček naočkejte šikmé půdy nebo láhve pomocí mykobakteriálních kultur připravených výše popsaným způsobem.
 - b. Naočkejte nádoby s povoleným víčkem při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$ v aerobním prostředí s obohaceným oxidem uhličitým.
2. Po 7, 14 a 21 dnech růstu zkontrolujte u zkumavek a láhví růst, selektivitu a pigmentaci.
3. Očekávané výsledky
 - a. Pro Lowenstein-Jensenovo médium

Organismy CLSI	ATCC	Výtěžnost
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Růst
* <i>Mycobacterium kansasii</i> , skupina I	12478	Růst
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , skupina II	19981	Růst
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , skupina III	13950	Růst
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , skupina IV	6841	Růst

- b. Pro Lowenstein-Jensenovo médium s 5% chloridem sodným

Organismy	ATCC	Výtěžnost
* <i>Mycobacterium fortuitum</i>	6841	Růst
* <i>Mycobacterium kansasii</i>	12478	Žádný růst

*Doporučený kmen organismu pro kontrolu kvality uživatelem.

III DODATEČNÁ KONTROLA KVALITY

1. Zkontrolujte zkumavky nebo láhve podle pokynů v části „Zhoršování kvality produktu“.
2. Vizualně zkontrolujte reprezentativní zkumavky nebo láhve pro zajištění, že existující fyzikální defekty neinterferují s použitím.
3. Potenciometricky stanovte pH při pokojové teplotě pro soulad se specifikací o hodnotě $7,0 \pm 0,2$.
4. Inkubujte nenačkované reprezentativní zkumavky nebo láhve při teplotě $20 - 25^\circ\text{C}$ a $30 - 35^\circ\text{C}$ a po 7 a 14 dnech zkontrolujte mikrobiální kontaminaci.

INFORMACE O PRODUKTU

IV ÚČEL POUŽITÍ

Lowenstein-Jensenovo médium se používá pro kultivaci *Mycobacterium tuberculosis* a dalších kmenů mykobakterií.

V SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ

Lowenstein původně vyvinul médium pro kultivaci mykobakterií, ve kterém byla obsažena kongočerveň a malachitová zeleň pro částečnou inhibici ostatních bakterií.^{1,2} Tato barviva byla obdobně použita i dalšími výzkumníky, jmenovitě Sonnenscheinem³ a Hohnem.⁴ V USA byla populární média s genciánovou violetí autorů Corpera⁵ a Petroffa⁶, spolu s Petraganiho médiem, které obsahovalo malachitovou zeleň. Současné složení, vyvinuté Jensenem,⁷ má lehce odlišný obsah citrátu a fosfátu, neobsahuje kongočerveň a má zvýšenou koncentraci malachitové zeleně.

Připravené produkty **BBL** Lowenstein-Jensenova média obsahují šikmé půdy ve zkumavkách pro obecné použití při kultivaci kmenů *Mycobacterium*, láhve pro použití při větším požadovaném povrchu a hluboké zkumavky pro provedení semikvantitativního katalázového testu. Poslední postup vyvinul Wayne⁸ a je užitečný při klasifikaci mykobakterií.

Dále je k dispozici médium s přidavkem 5% chloridu sodného, neboť schopnost tolerovat 5% chlorid sodný je charakteristická pro určité kmeny mykobakterií (např. *M. fortuitum* a *M. chelonae* subsp. *abscessus*).⁹ Většina rychle rostoucích mykobakterií, pomalu rostoucí *M. triviale* a některé kmeny *M. flavescens* rovněž rostou na médiích s obsahem NaCl. Neschopnost *M. chelonae* subsp. *chelonae* růst napomáhá při jeho odlišení od ostatních členů komplexu *M. fortuitum* (např. *M. chelonae* subsp. *abscessus*).^{9,10}

VI ZÁSADY POSTUPU

Základ pro Lowenstein-Jensenovo médium je relativně jednoduchým složením, které vyžaduje suplementaci pro podporu růstu mykobakterií. Glycerol a vaječná směs se přidává před postupem zahušťování. Tyto látky poskytují mastné kyseliny a proteiny vyžadované pro metabolismus mykobakterií. Koagulace vaječného albuminu v průběhu sterilizace poskytuje pevné médium pro účely naočkování.

VII ČINIDLA

Lowenstein-Jensen Medium

Přibližné složení* na 600 mL čišťené vody

Fosforečnan draselný	2,5 g	Bramborový škrob	30,0 g
Sulfát hořčíku	0,24 g	Malachitová zeleň	0,4 g
Citrát sodný	0,6 g	Glycerol	12,0 mL
L-asparagin	3,6 g	Vejce	1000,0 mL

*Upraveno anebo doplněno dle požadavků tak, aby byla splněna kritéria účinnosti.

Lowenstein-Jensenovo médium s 5% chloridem sodným obsahuje výše uvedené složky na 600 mL a 80 g chloridu sodného.

Varování a bezpečnostní opatření: Pro diagnostiku *in vitro*.

Zkumavky a láhve s utěsněnými víčky je nutné otvírat opatrně pro prevenci zranění rozbitým sklem.

V klinických vzorcích se mohou nacházet patogenní mikroorganismy včetně virů hepatitidy a virů lidského imunodeficitu (HIV). Proto dodržujte při práci s veškerým materiálem kontaminovaným krví a jinými tělními tekutinami standardní bezpečnostní opatření a předpisy vaší instituce.¹¹⁻¹⁴ Zkumavky s preparáty, nádoby se vzorky a další kontaminované materiály je nutné po jejich použití sterilizovat autoklárováním a poté zlikvidovat.

Postupy a vybavení odpovídající 2. stupni biologické bezpečnosti jsou požadovány při laboratorní práci s klinickými vzorky, při nichž nedochází ke vzniku aerosolů, například příprava nátěrů k testu acidorezistence. Všechny činnosti, při nichž vznikají aerosoly, je nutné provádět v místnosti zabezpečené proti biologické nákaze třídy I nebo II. Postupy a vybavení odpovídající 3. stupni biologické bezpečnosti jsou požadovány při laboratorních činnostech při propagaci kultur *M. tuberculosis* a *M. bovis* a manipulaci s nimi. Také studie na zvířatech vyžadují speciální postupy.¹³

Pokyny ke skladování: Po přijetí uchovávejte misky v temnu při teplotě 2 – 8 °C. Zabraňte zmrazení nebo přehřátí. Otevřete až bezprostředně před použitím. Minimalizujte vystavení slunečnímu záření. Média uchovávaná správným způsobem až do doby těsně před použitím je možné naočkovat až do uplynutí doby expirace a inkubovat po doporučené doby inkubace. Před inokulací počkejte, až se médium ohřeje na pokojovou teplotu.

Zhoršování kvality výrobku: Pokud zkumavky nebo láhve vykazují známky mikrobiální kontaminace, změny zabarvení, vysoušení nebo jiné známky poškození, nepoužívejte je.

VIII ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE S NIMI

Pro manipulaci se vzorky vhodnými ke kultivaci lze využít několik různých metod. Detailní informace naleznete v příslušné literatuře.^{15,16} Vzorky by měly být získány ještě předtím, než jsou aplikována antibiotika. Je nutné zajistit jejich promptní přepravu do laboratoře.

IX POSTUP

Dodaný materiál: Lowenstein-Jensenovo médium nebo Lowenstein-Jensenovo médium s 5% chloridem sodným

Potřebný materiál, který není součástí dodávky: Pomocná kultivační média, činidla, organismy pro kontrolu kvality a laboratorní vybavení dle potřeby.

Provedení testu: Dodržujte aseptické postupy.

Provedení jednotlivých testů je doporučeno Středisky pro kontrolu a prevenci onemocnění (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) pro primární izolaci ze vzorků obsahujících mykobakteria.¹⁰ Roztok N-acetyl-L-cystein-hydroxidu sodného (NALC-NaOH) je doporučuje jako jemné, ale účinné rozrušovací a dekontaminační činidlo. Tato činidla jsou obsažena v sadě pro rozrušení/dekontaminaci vzorků mykobakterií **BBL MycoPrep**. Podrobné pokyny pro dekontaminaci a přípravu kultur naleznete v příslušných odkazech na literaturu.^{10,16-18}

Po naočkování udržujte testovací nádoby chráněné před světlem a uložte je do vhodného systému poskytujícího aerobní atmosféru obohacenou oxidem uhličitým. Inkubujte naočkované šikmé půdy a láhve při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Šikmá média a média v láhvích je nutné inkubovat v horizontální poloze, dokud nedojde k absorpci inokula. Zkumavky a láhve musí mít odšroubovaná víčka po první 3 týdny, aby byla umožněna cirkulace oxidu uhličitého pro umožnění počátečního růstu. Poté, pro prevenci dehydratace, utáhněte víčka; krátce uvolněte víčka jednou týdně. Pokud máte problém s místem, postavte zkumavky do kolmé polohy.

POZNÁMKA: Kultury z kožních lézí s podezřením na přítomnost *M. marinum* nebo *M. ulcerans* je nutné inkubovat při teplotě $25 - 33^\circ\text{C}$ pro primární izolaci; kultury s podezřením na přítomnost *M. avium* nebo *M. xenopi* vykazují optimální růst při teplotě $40 - 42^\circ\text{C}$.¹⁰ Inkubujte duplicitní kulturu při teplotě $35 - 37^\circ\text{C}$.

Doporučený postup pro semikvantitativní katalázový test s použitím hlubokých agarových zkumavek s Lowenstein-Jensenovým médiem je následující:¹⁰

1. Naočkujte povrch média buď 0,1 mL sedmidenní bujónové kultury nebo plnou kličkou nárůstu ze šikmé půdy s aktivním růstem pro každý testovaný kmen. Rovněž naočkujte zkumavky kulturou se silnou produkcí katalázy, např. *M. kansasii*, a kmenem se slabou produkcí enzymu, např. *M. intracellulare*, jako kontrolu.
2. Inkubujte s odšroubovaným víčkem při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$ po dobu 2 týdny.
3. Připravte si směs polysorbátu 80 a peroxidu smícháním stejnoměrných částí následujících složek:
 - a. Autoklávovaný 10% roztok polysorbátu 80 v destilované vodě nebo roztoku 1 mL sterilního polysorbátu 80 v 9 mL destilované vody.
 - b. Peroxid vodíku (30%).
4. Přidejte 1 mL směsi polysorbátu 80 s peroxidem ke každé kultuře. Po 5 minutách zaznamenejte výšku sloupců bublinek v mm.

Doporučený postup pro toleranční test chloridu sodného je následující:^{10,17}

1. Zhotovte suspenzi aktivně rostoucí subkultury v bujónu Middlebrook 7H9, která se rovná zákalovému standardu č. 1 dle McFarlanda.
2. Naočkujte 0,1 mL standardizované kultury na šikmou půdu Lowenstein-Jensenova média s 5% chloridem sodným. Obdobně naočkujte šikmou půdu média bez NaCl jako zkumavku pro kontrolu růstu.
3. Inkubujte s odšroubovaným víčkem v atmosféře s obohaceným CO_2 , nejdříve v plochem držáku po dobu 1 týdne při teplotě $28 - 30^\circ\text{C}$ pro rychle rostoucí kmeny nebo při teplotě $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pro pomalu rostoucí kmeny.
4. Týdně kontrolujte růst. V případě potřeby pokračujte v inkubaci po další tři týdny.

Kontrola kvality uživatelem: Viz „Postupy kontroly kvality“.

Každá šarže médií prošla testováním příslušnými organizmy ke kontrole kvality a výsledky odpovídají produktovým specifikacím a normám CLSI v relevantních případech. Jako obvykle je nutné kontrolu kvality provést v souladu s platnými místními, státními a federálními zákony nebo požadavky pro akreditaci a se standardními postupy kontroly kvality vaší laboratoře.

X VÝSLEDKY

Během 5 – 7 dní po inokulaci zkontrolujte kultury a totéž poté provádějte jednou týdně po dobu až 8 týdnů.

Sledování záznamů:

1. Počet dní vyžadovaných pro kolonie, aby se staly makroskopicky viditelné. Rychle rostoucí kmeny mají zralé kolonie během 7 dní; pomalu rostoucí kmeny vyžadují více než 7 dní pro vytvoření zralých kolonií.
2. Produkce pigmentu
Bílé, krémové nebo žlutohnědé = nechromogenní (NC)
Citronové, žluté, oranžové, červené = chromogenní (Ch)

Obarvené kmeny mohou ukazovat acidifikující bacily, které jsou hlášeny pouze jako „acidifikující bacily“, dokud nejsou provedeny definitivní testy.

Láhve je možné zkontrolovat jejich převrácením na stojanu mikroskopu. Odečítejte při zvětšení 10 – 60x s přenášeným světlem. Rychle prohlédněte při zvětšení 10 – 20x pro zjištění přítomnosti kolonií. Větší zvětšení (30 – 60x) je užitečné při sledování morfologie kolonií, tj. vlnité provazcovité kolonie.

V semikvantitativním katalázovém testu spadá většina mykobakterií do dvou skupin.^{8,10,16}

1. Sloupec bublinek vyšší než 45 mm.
M. chelonae
M. fortuitum
M. goodii
M. kansasii (klinicky významné)
M. scrofulaceum

2. Sloupec bublinek nižší než 45 mm.
M. avium
M. bovis
M. gastri
M. haemophilum
M. intracellulare
M. kansasii (klinicky nevýznamné)
M. malmoense
M. marinum
M. tuberculosis
M. xenopi

Přítomnost nebo absence růstu ve zkumavce s médiem obsahujícím 5% NaCl napomáhá při rozlišení izolátů mykobakterií. Test tolerance soli je pozitivní, když se na kontrolním médiu objeví velký počet kolonií a když na médiu obsahujícím 5% NaCl roste více než 50 kolonií.^{10,17} Kolonie na kontrolním médiu, ale bez viditelného růstu na testovacím médiu po celkem 4 týdnech inkubace, představuje definici negativního testu.^{10,16,17}

XI OMEZENÍ POSTUPU

Pro účely identifikace musí být organismy v čisté kultuře. Pro konečnou identifikaci je nutné provést morfologické, biochemické a/nebo serologické testy. Podrobné informace a doporučené postupy naleznete v příslušných publikacích.^{15,16,19}

XII SPECIFICKÉ VLASTNOSTI ÚČINNOSTI

Lowenstein-Jensen Medium (Lowenstein-Jensenovo médium)

Ve studii, kterou provedl Palaci et al., bylo naočkováno 85 respiračních vzorků na Lowenstein-Jensenovy (LJ) šikmé půdy a do zkumavek **BBL MGIT** pomocí standardního postupu. Dvacet pět (25) vzorků bylo shledáno jako pozitivní na *M. tuberculosis*. Citlivost kultury u LJ i **MGIT** byla 96,1 % (25 z 26 pozitivních kultur). Ačkoli čas detekce byl výrazně kratší u zkumavek **MGIT**, nebyly mezi těmito dvěma metodami významné rozdíly v citlivosti detekce *M. tuberculosis*.²⁰

Lowenstein-Jensen Medium Deep's (Hluboké zkumavky s Lowenstein-Jensenovým médiem)

Před uvedením na trh byly všechny šarže hlubokých zkumavek Lowenstein-Jensenova média testovány na specifické vlastnosti účinnosti. Vzorky jsou testovány s použitím *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 a *M. tuberculosis* ATCC 25177 naočkováním pomocí 0,2 mL suspenze bujónu Middlebrook 7H9. Zkumavky jsou inkubovány s odšroubovanými víčky po dobu až 3 týdnů při teplotě 35 – 37 °C. Připraví se směs polysorbátu 80 a peroxidu a 1 mL této směsi se přidá ke každé kultuře. Po 5 minutách se zaznamená výška sloupců bublinek v mm. Pozitivní katalázová reakce je sloupec bublinek vyšší než 45 mm. Negativní reakce je sloupec bublinek nižší než 45 mm. Pozitivní katalázovou reakci je možné pozorovat u *M. fortuitum*, *M. kansasii* a *M. scrofulaceum*. Negativní katalázovou reakci je možné pozorovat u *M. intracellulare* a *M. tuberculosis*.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride (Lowenstein-Jensenovo médium s 5% chloridem sodným)

Před uvedením na trh byly všechny šarže Lowenstein-Jensenova média s 5% chloridem sodným testovány na specifické vlastnosti účinnosti. Vzorky byly testovány s použitím buněčných suspenzí *M. fortuitum* ATCC 6841 a *M. kansasii* ATCC 12478 naředěných v bujónu **BBL Middlebrook 7H9** na koncentraci 10³ – 10⁴ CFU. Zkumavky se inkubují s odšroubovanými víčky při teplotě 35 – 37 °C po dobu 7 – 14 dní v atmosféře s obohaceným CO₂. Střední až intenzivní růst je pozorován u *M. fortuitum*. *M. kansasii* je inhibováno.

XIII DOSTUPNOST

Kat. č.	Popis
221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Mycoflask , kartón po 100 láhvích
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, balení po 10 zkumavkách velikosti A
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, kartón po 100 zkumavkách velikosti A

XIV ODKAZY

1. Lowenstein, E. 1931. Die Zachtung der Tuberkelba zillen aus dem stramenden Blute. Zentralbl. Bakteriologie. 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-bazilus. Zentralbl. Bakteriologie. 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 Typenbestim mung von Tuberkelbazillentammen. Zentralbl. Bakteriologie. 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.

BD Diagnostics Technická podpora: obraťte se na místního zástupce společnosti BD nebo navštivte 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