



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD (Opcionales)

I. INTRODUCCION

El medio de Lowenstein-Jensen se utiliza para el aislamiento y cultivo de micobacterias. El medio de agar profundo en tubo se utiliza para la prueba semicuantitativa de catalasa para facilitar la clasificación de micobacterias.

II. REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

A. Procedimiento de preparación de inóculos

1. Inocular medios inclinados de Lowenstein-Jensen con cultivos de referencia de las cepas micobacterianas correspondientes mediante bastoncillos de inoculación estériles.
2. Incubar los tubos con las tapas flojas en atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono a 35 ± 2 °C hasta obtener crecimiento denso (por lo general, dentro de las 2 – 3 semanas).
3. Obtener el crecimiento con un aplicador afilado estéril, extrayendo las células de la superficie del medio con cuidado de no incluir el medio de cultivo con la muestra de células.
 - a. Para *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Transferir el crecimiento a 5,0 mL de caldo Middlebrook 7H9 con glicerol en un tubo de vidrio estéril con tapa a rosca y microesferas de vidrio estériles.
 - (2) Agitar bien en vórtex (varios minutos) hasta que la suspensión no presente grumos grandes.
 - (3) Comparar esta suspensión con el patrón de nefelómetro N° 1 de McFarland. La suspensión debe ser más turbia que el patrón.
 - (4) Colocar el tubo en una gradilla durante 2 – 3 h a temperatura ambiente para permitir la precipitación de las partículas grandes al fondo.
 - (5) Transferir el sobrenadante a un recipiente estéril.
 - (6) Ajustar la turbidez de la suspensión al patrón N° 1 de McFarland, añadiendo lentamente caldo Middlebrook 7H9 con glicerol estéril. Agitar bien.
 - (7) Diluir a una concentración de 10^5 UFC/mL antes de su utilización. Mezclar bien y extender el inóculo en el medio de prueba utilizando un asa calibrada de 0,01 mL.
 - b. Para todas las demás cepas micobacterianas:
 - (1) Transferir el crecimiento a un tubo centrífugo estéril de 50 mL con tapa roscada con 8 – 12 microesferas de vidrio estériles (de 2 mm de diámetro) y 5 mL de diluyente para *Mycobacterium*, preparado de la manera siguiente:
 - Mezclar los elementos siguientes en un frasco de 1 L y ajustar el pH con hidróxido sódico 1N a 6,7 – 7,0.

Albúmina bovina (sin ácido graso).....	1,0 g
Polisorbato 80	0,1 mL
Agua purificada	500 mL
 - Esterilizar mediante filtración de membrana (filtro de 0,2 μ)
 - Dosificar asépticamente en alícuotas de 5,5 mL en tubos estériles con tapas roscadas.
 - (2) Emulsionar el crecimiento micobacteriano en la pared lateral de un tubo centrífugo con tapa roscada mediante un aplicador. Mezclar el crecimiento con el diluyente.
 - (3) Tapar el tubo y agitar en vórtex aproximadamente 10 min hasta que se produzca la suspensión del crecimiento y se eliminan los grumos grandes.
 - (4) Añadir 15 mL de diluyente para *Mycobacterium* estéril y mezclar bien.
 - (5) Comparar esta suspensión con el patrón de nefelómetro N° 1 de McFarland. La suspensión debe ser más turbia que el patrón.
 - (6) Colocar el tubo en una gradilla durante 2 – 3 h a temperatura ambiente para permitir la precipitación de las partículas grandes hasta el fondo.
 - (7) Aspirar el sobrenadante y transferirlo a un recipiente estéril. La suspensión debe estar más turbia que el patrón N° 1 de McFarland y libre de partículas grandes.

Si todavía se pueden observar partículas grandes, mezclar y dejar reposar durante 1 h más. Transferir el sobrenadante a un recipiente estéril.

- (8) Ajustar la turbidez de la suspensión a un patrón N° 1 de McFarland, añadiendo lentamente diluyente micobacteriano estéril. Agitar bien.
- (9) Dosificar alícuotas de la suspensión en frascos para congelador, etiquetados con la identificación del organismo y la fecha de preparación.
- (10) Congelar las suspensiones colocando los frascos en un congelador de baja temperatura a -60°C . Los frascos pueden conservarse durante un máximo de 6 meses.
- (11) Para su utilización, retirar el frasco congelado del congelador y descongelar rápidamente el contenido colocando el tubo en baño María de $30 - 35^{\circ}\text{C}$. Diluir a una concentración de 10^5 UFC/mL antes de su utilización. Mezclar bien y extender el inóculo en el medio de prueba utilizando un asa calibrada de 0,01 mL.

B. Procedimientos de análisis de los medios

Lowenstein-Jensen Medium Deep

1. Con un asa de inoculación de 0,01 mL estéril desechable, inocular cultivos preparados según descripción anterior en la superficie de la base de los tubos.
2. Incubar los tubos con las tapas flojas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
3. Después de 14 días de incubación, añadir a cada cultivo 1,0 mL de una mezcla de polisorbato 80 y peróxido preparada de la siguiente manera:
 - a. 30% peróxido de hidrógeno. Conservar en frigorífico.
 - b. 10% polisorbato 80 preparado de la siguiente manera:
 - (1) Mezclar 10 mL de polisorbato 80 con 90 mL de agua purificada.
 - (2) Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 min.
 - (3) Conservar en frigorífico.
 - c. Justo antes de realizar la prueba, mezclar cantidades iguales de las dos soluciones.
4. Mantener los cultivos en posición vertical durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Medir (mm) la altura de la columna de burbujas por encima de la superficie del medio.
6. Resultados previstos

Columna de burbujas con altura superior a 45 mm.

**Mycobacterium kansasii*, grupo I

ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, grupo II

ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, grupo IV

ATCC 6841

Columna de burbujas con altura inferior a 45 mm.

**Mycobacterium tuberculosis*

H37Ra ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, grupo III

ATCC 13950

*Tinción de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

Medios inclinados y frascos de medio de Lowenstein-Jensen

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Con asas calibradas de 0,01 mL estériles desechables, inocular los medios inclinados o frascos con cultivos micobacterianos preparados según descripción anterior.
 - b. Incubar los tubos con las tapas flojas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
2. Examinar los tubos o frascos después de 7, 14 y 21 días para determinar el crecimiento, la selectividad y la pigmentación.
3. Resultados previstos
 - a. Para Lowenstein-Jensen Medium

Organismos de control de CLSI (cepas ATCC)

**Mycobacterium tuberculosis*Crecimiento
H37Ra (25177)

**Mycobacterium kansasii*Crecimiento
grupo I (12478)

**Mycobacterium scrofulaceum*Crecimiento
grupo II (19981)

**Mycobacterium intracellulare*Crecimiento

grupo III (13950)

**Mycobacterium fortuitum*Crecimiento

grupo IV (6841)

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

**Mycobacterium fortuitum*Crecimiento

ATCC 6841

**Mycobacterium kanasii* Sin crecimiento

ATCC 12478

*Tinción de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

III. CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar los tubos como se describe en la sección "Deterioro del producto".
2. Examinar a simple vista los tubos o frascos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de $7,0 \pm 0,2$.
4. Incubar los tubos o frascos representativos inoculados a una temperatura de 20 a 25 °C y de 30 a 35 °C y examinar después de 7 días de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV. USO PREVISTO

Lowenstein-Jensen Medium se utiliza para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies micobacterianas.

V. RESUMEN Y EXPLICACION

Lowenstein formuló originalmente un medio para el cultivo de micobacterias en el que se incorporaron rojo Congo y verde malaquita para obtener la inhibición parcial de otras bacterias^{1,2}. Estos colorantes fueron utilizados de manera similar por otros investigadores, en particular Sonnenschein³ y Hohn⁴. En Estados Unidos, los medios con violeta de genciana de Corper⁵ y Petroff⁶ eran de uso generalizado, junto con el medio de Petragnani, que contenía verde malaquita. La presente fórmula desarrollada por Jensen⁷ tiene un contenido de citrato y fosfato un poco diferente, no contiene rojo Congo y presenta una mayor concentración de verde malaquita.

Los productos con medio de Lowenstein-Jensen preparados por BBL incluyen agares inclinados en tubo para uso general en el cultivo de la especie *Mycobacterium*, frascos para utilizar cuando se desee cubrir una superficie más extensa y agares profundos en tubo para realizar la prueba semicuantitativa de catalasa. Este último procedimiento fue desarrollado por Wayne⁸ y es útil para la clasificación de micobacterias.

Además, el medio se encuentra disponible con adición de cloruro sódico al 5%, dado que la capacidad de tolerar cloruro sódico al 5% representa una característica de determinadas cepas de micobacterias (por ejemplo, *M. fortuitum* y *M. chelonae* subsp. *abscessus*)⁹. Los organismos de crecimiento más rápido, *M. triviale* de crecimiento lento y algunas cepas de *M. flavescens* también crecen en medios con NaCl. La incapacidad de crecimiento de *M. chelonae* subsp. *chelonae* favorece su diferenciación de otros miembros del complejo *M. fortuitum* (por ejemplo, *M. chelonae* subsp. *abscessus*)^{9,10}.

VI. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El medio base de Lowenstein-Jensen es una fórmula relativamente sencilla que requiere enriquecimiento para facilitar el crecimiento de micobacterias. La mezcla de huevo y glicerol se añade antes del proceso de espesamiento. Dichas sustancias proporcionan los ácidos grasos y proteínas necesarios para el metabolismo de las micobacterias. La coagulación de la albúmina de huevo durante la esterilización proporciona un medio sólido para la inoculación.

VII. REACTIVOS

Lowenstein-Jensen Medium

Fórmula aproximada* por 600 mL de agua purificada

Fosfato monopotásico2,5 g

Sulfato magnésico	0,24	g
Citrato sódico	0,6	g
L-asparagina	3,6	g
Fécula de patata	30,0	g
Verde malaquita	0,4	g
Glicerol	12,0	mL
Huevo entero	1000,0	mL

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride contiene los elementos mencionados anteriormente con 80 g de cloruro sódico por cada 600 mL.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los tubos y frascos con tapas ajustadas deben abrirse con cuidado para evitar lesiones por la rotura del vidrio.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"¹¹⁻¹⁴ y las directrices del centro. Después de su utilización, los recipientes para muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Se requiere la utilización de prácticas y procedimientos de seguridad biológica de nivel 2 y equipo e instalaciones para contención cuando se manipulen muestras clínicas sin producir aerosoles, como en la preparación de frotis acidorresistentes. Todas las actividades que generen aerosoles deben llevarse a cabo en un gabinete de seguridad biológica de clase I o II. Se requiere la utilización de prácticas de seguridad biológica de nivel 3 y equipo e instalaciones para contención en las actividades de laboratorio que incluyan la propagación y manipulación de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Los estudios en animales también requieren la implementación de procedimientos especiales¹³.

Instrucciones para el almacenamiento

En el momento de recibir los tubos y frascos, guardarlos en un lugar oscuro a una temperatura de 2 – 8 °C. Evitar la congelación y el sobrecalentamiento. No abrir hasta que vayan a utilizarse. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Los medios almacenados como se indica en sus etiquetas hasta momentos antes de su utilización pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados durante los períodos recomendados de incubación. Dejar que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto

No utilizar los tubos ni los frascos si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII. RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo pueden manipularse mediante diversas técnicas. Para obtener información detallada, consultar los textos correspondientes^{15,16}. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX. PROCEDIMIENTO

Material suministrado

Lowenstein-Jensen Medium o

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Materiales necesarios pero no suministrados

Medios de cultivo auxiliares, reactivos, organismos de control de calidad y el equipo de laboratorio según se requiera.

Procedimiento de análisis

Emplear técnicas asépticas.

Los procedimientos de prueba son los recomendados por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para el aislamiento primario de muestras que contengan micobacterias¹⁰. Se recomienda la solución de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH) como agente

descontaminante y digestivo suave pero eficaz. Estos reactivos se suministran en el equipo de digestión/descontaminación de muestras **BBL MycoPrep**. Para obtener las instrucciones detalladas de descontaminación y cultivo, consultar el texto correspondiente^{10, 16-18}.

Después de la inoculación, mantener los recipientes de prueba protegidos de la luz y colocados en un sistema adecuado que suministre atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono. Incubar los agares inclinados y frascos inoculados a 35 ± 2 °C.

Los medios inclinados y en frasco deben incubarse en posición horizontal hasta que se absorba el inóculo. Los tubos y frascos deben tener las tapas roscadas flojas durante las primeras 3 semanas, para permitir la circulación de dióxido de carbono para el inicio del crecimiento. Posteriormente, ajustar las tapas para evitar la deshidratación; aflojarlas brevemente una vez por semana. Colocar los tubos en posición vertical si no se dispone de espacio suficiente.

NOTA: Los cultivos de lesiones cutáneas presuntivas de *M. marinum* o *M. ulcerans* deben incubarse a 25 – 33 °C para lograr un aislamiento primario; los cultivos presuntivos de *M. avium* o *M. xenopi* presentan un crecimiento óptimo a una temperatura de 40 – 42 °C¹⁰. Incubar un cultivo equivalente a 35 – 37 °C.

El procedimiento recomendado para la prueba semicuantitativa de catalasa con agares profundos con medio de Lowenstein-Jensen se detalla a continuación¹⁰:

1. Inocular la superficie del medio con 0,1 mL de un cultivo de caldo de 7 días o un asa llena de crecimiento de un agar inclinado de crecimiento activo procedente de cada cepa de prueba. Asimismo, inocular tubos con un cultivo con alta producción de catalasa, por ejemplo, *M. kansasii*, y una cepa enzimática débil, por ejemplo, *M. intracellulare*, como controles.
2. Incubar, con las tapas flojas, a 35 ± 2 °C durante 2 semanas.
3. Preparar una mezcla de polisorbato 80 y peróxido, dosificando partes iguales de:
 - a. Una solución al 10%, esterilizada en autoclave, de polisorbato 80 en agua destilada o una dilución de 1 mL de polisorbato 80 estéril en 9 mL de agua destilada.
 - b. Peróxido de hidrógeno (30%).
4. Añadir 1 mL de la mezcla de polisorbato 80 y peróxido a cada cultivo. Después de 5 min, registrar la altura (en mm) de las columnas de burbujas.

El procedimiento recomendado para la prueba de tolerancia a cloruro sódico se detalla a continuación^{10,17}:

1. Crear una suspensión de un subcultivo de crecimiento activo en caldo Middlebrook 7H9 equivalente a un patrón de turbidez N° 1 de McFarland.
2. Inocular 0,1 mL del cultivo normalizado en un agar inclinado con Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride. De manera similar, inocular un agar inclinado del medio sin NaCl como tubo de control de crecimiento.
3. Incubar con las tapas flojas en una atmósfera enriquecida con CO₂, primero en una gradilla plana durante 1 semana a 28 – 30 °C para organismos de crecimiento rápido y a 35 ± 2 °C para los de crecimiento lento.
4. Examinar semanalmente para determinar el crecimiento. Continuar la incubación durante tres semanas más en caso necesario.

Control de calidad del usuario

Véase "Procedimientos de control de calidad".

Cada lote de medios se ha probado con los microorganismos de control de calidad adecuados mediante una prueba que cumple las especificaciones del producto y los criterios aplicables del CLSI. Como siempre, las pruebas de control de calidad se deben llevar a cabo conforme a la normativa local, estatal, federal o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y/o a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio.

X. RESULTADOS

Debe efectuarse la lectura de los cultivos a los 5 – 7 días después de la inoculación y una vez por semana después, durante un máximo de 8 semanas.

Registrar las observaciones:

1. Número de días necesarios para que las colonias sean visibles a simple vista. Los organismos de crecimiento rápido presentan colonias maduras a los 7 días; los de crecimiento lento requieren más de 7 días para mostrar colonias maduras.
2. Producción de pigmentación

Color blanco, crema o beige = No cromógena (NC)

Color limón, amarillo, anaranjado, rojo = Cromógena (Ch)

Los frotis con tinción pueden mostrar bacilos acidorresistentes, que se reseñan sólo como “bacilos acidorresistentes” a menos que se realicen pruebas definitivas.

Se pueden examinar los frascos invirtiéndolos sobre la plataforma de un microscopio de disección. Efectuar la lectura con un aumento de 10–60x con luz transmitida. Explorar rápidamente con un aumento de 10–20x para determinar la presencia de colonias. Es útil emplear un aumento mayor (30–60x) para observar la morfología de las colonias, es decir, las colonias espirales como cuerdas.

En la prueba semicuantitativa de catalasa, la mayoría de las micobacterias se clasifican en dos grupos^{8,10,16}.

1. Columna de burbujas con altura superior a 45 mm.

M. chelonae

M. fortuitum

M. gordonae

M. kansasii (de importancia clínica)

M. scrofulaceum

2. Columna de burbujas con altura inferior a 45 mm.

M. avium

M. bovis

M. gastri

M. haemophilum

M. intracellulare

M. kansasii (sin importancia clínica)

M. malmoense

M. marinum

M. tuberculosis

M. xenopi

La presencia o ausencia de crecimiento en el tubo del medio con 5% NaCl favorece la diferenciación de aislados micobacterianos. La prueba de tolerancia a la sal da resultado positivo cuando aparecen numerosas colonias en el medio de control y crecen más de 50 colonias en el medio con NaCl al 5%^{10,17}. La presencia de colonias en el medio de control sin crecimiento visible en el medio de prueba después de un total de 4 semanas de incubación constituye un resultado negativo^{10,16,17}.

XI. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Para su identificación, los organismos deben encontrarse en un cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados^{15,16,19}.

XII. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Lowenstein-Jensen Medium

En un estudio realizado por Palaci et al, se inocularon 85 muestras respiratorias en medios inclinados de Lowenstein-Jensen (LJ) y en tubos **BBL MGIT** mediante los procedimientos estándar. 25 muestras dieron resultado positivo a *M. tuberculosis*. La sensibilidad de los cultivos para LJ y **MGIT** fue del 96,1% (25 de 26 cultivos positivos). Aunque el tiempo de detección fue significativamente más breve en los tubos **MGIT**, no se detectó diferencia significativa en la sensibilidad de detección de *M. tuberculosis* entre los dos métodos²⁰.

Lowenstein-Jensen Medium Deep

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Lowenstein-Jensen Medium Deep se analizan para determinar las características específicas del producto. Se analizan muestras con *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 y *M. tuberculosis* ATCC 25177 mediante inoculación con 0,2 mL de suspensiones de caldo Middlebrook 7H9. Los tubos se incuban con las tapas flojas durante un máximo de 3 semanas a 35–37 °C. Se prepara una mezcla de polisorbato 80 y peróxido y se añade 1 mL a cada cultivo. Después de 5 min, se registra la altura (en mm) de las columnas de burbujas. Una columna de burbujas con una altura superior a 45 mm representa una reacción positiva a la catalasa. Una

columna de burbujas con una altura inferior a 45 mm representa una reacción negativa. Se observa una reacción positiva a la catalasa con *M. fortuitum*, *M. kansasii* y *M. scrofulaceum*. Se observa una reacción negativa a la catalasa con *M. intracellulare* y *M. tuberculosis*.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride se analizan para determinar las características específicas del producto. Se analizan muestras con suspensiones de células de *M. fortuitum* ATCC 6841 y *M. kansasii* ATCC 12478 diluidas en caldo BBL Middlebrook 7H9 hasta una concentración de $10^3 - 10^4$ UFC. Los tubos se incuban con las tapas flojas a 35–37 °C durante 7 – 14 días en una atmósfera enriquecida con CO₂. Se observa crecimiento de moderado a denso con *M. fortuitum*, *M. kansasii* se encuentra inhibido.

XIII. DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium, caja de 100 frascos Mycoflask
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño K
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, caja de 100 tubos de tamaño A

XIV. REFERENCIAS

- Lowenstein, E. 1931. Die Zachtung der Tuberkelba zillen aus dem stramenden Blute. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 120:127.
- Lowenstein, E. 1933. Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbakterien in Milch auf Malachitgrün Einährboden. Ann. Inst. Pasteur. 50:161.
- Sonnenschein. 1930. Dtsch. tierartze. Wehnschr. 38:115.
- Hohn, J. 1931. Der Z-Einährboden zur Kultur des Tuberkel-bazillus. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. 127:488-506.
- 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.
- Petroff, S.A. 1918. J. Inf. Dis. 23:267.
- Jensen, K.A. 1932. Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillentammen. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 125:222-239.
- Wayne, L.G. 1962. Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. Am. Rev. Resp. Dis. 86:651-656.
- 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.
- Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
- Isenberg, H. (ed.). 2004. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1, 2 and 3, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 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.
- 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.
- 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.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD o visite 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