



BBL Lowenstein-Jensen Medium
BBL Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride



L007464 • Rev. 11 • Octobre 2015

PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE (Facultatif)

I INTRODUCTION

Le Lowenstein-Jensen Medium sert à l'isolement et à la culture des mycobactéries. Sous forme de gélose en tube, le milieu sert à réaliser le test semi-quantitatif de la catalase qui facilite la classification des mycobactéries.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

A. Préparation des inoculums

1. A l'aide d'écouvillons stériles, ensemercer des géloses inclinées Lowenstein-Jensen avec des cultures mères des souches de mycobactéries concernées.
2. Incuber les tubes, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone, jusqu'à obtention d'une croissance bactérienne importante (habituellement en 2 à 3 semaines).
3. Récolter les colonies à l'aide d'un écouvillon à bout vif en veillant à ne pas emporter de milieu de culture avec les cellules.
 - a. *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 :
 - (1) Transférer les colonies dans 5,0 mL de bouillon Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol dans un tube de verre à bouchon à vis stérile, contenant des billes de verre stériles.
 - (2) Homogénéiser la suspension à l'agitateur à vortex (pendant plusieurs minutes) jusqu'à disparition des agrégats de grande taille.
 - (3) Comparer la turbidité de cette suspension à celle d'un standard de turbidité néphélométrique McFarland n° 1. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard.
 - (4) Laisser reposer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour faire sédimenter les particules de grande taille.
 - (5) Transférer le surnageant dans un récipient stérile.
 - (6) Ajouter lentement du Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol stérile pour ajuster la turbidité de la suspension à celle du standard McFarland n° 1. Bien agiter.
 - (7) Diluer à 10^5 UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemercer par striage le milieu de test à l'aide d'un ensementeur à anse calibrée de 0,01 mL.
 - b. Autres souches de mycobactéries :
 - (1) Transférer les colonies prélevées dans un tube à centrifuger à bouchon à vis de 50 mL, contenant 8 à 12 billes de verre stériles (2 mm de diamètre) et 5 mL de diluant Mycobacterium Diluent préparé comme suit :
 - Mélanger les ingrédients qui suivent dans une fiole de 1 L et ajuster le pH à 6,7 à 7,0 avec de l'hydroxyde de sodium 1 N

Albumine bovine sans acide gras	1,0 g
Polysorbate 80	0,1 mL
Eau purifiée	500 mL

 - Stériliser par filtration sur membrane (porosité de 0,2 µ)
 - Distribuer en conditions aseptiques 5,5 mL de solution dans des tubes à bouchon à vis stériles.
 - (2) Emulsifier les colonies de mycobactéries sur la paroi d'un tube à centrifuger à bouchon à vis à l'aide d'un écouvillon. Mélanger les colonies avec le diluant.
 - (3) Boucher le tube et mélanger à l'agitateur à vortex pendant environ 10 min jusqu'à disparition des agrégats de grande taille dans la suspension.
 - (4) Ajouter 15 mL de Mycobacterium Diluent stérile et bien mélanger.
 - (5) Comparer la turbidité de cette suspension à celle d'un standard de turbidité McFarland n° 1. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard.
 - (6) Laisser reposer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour faire sédimenter les particules de grande taille.

- (7) Aspirer le surnageant et le transférer dans un récipient stérile. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard McFarland n° 1, sans particules de grande taille. S'il reste de telles particules, mélanger et laisser reposer pendant encore 1 h. Transférer le surnageant dans un récipient stérile.
- (8) Ajouter lentement du Mycobacterium Diluent stérile pour ajuster la turbidité de la suspension à celle du standard McFarland n° 1. Bien agiter.
- (9) Aliquoter la suspension dans des flacons supportant la congélation. Reporter l'identité du microorganisme et la date de préparation sur l'étiquette.
- (10) Congeler les flacons à -60 °C. Les suspensions se conservent jusqu'à 6 mois.
- (11) Pour décongeler la suspension, placer le flacon congelé au bain-marie à une température comprise entre 30 et 35 °C. Diluer à 10⁵ UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemercer par striage le milieu de test à l'aide d'un ensemenceur à anse calibrée de 0,01 mL.

B. Milieux de test

Lowenstein-Jensen Medium Deep

1. A l'aide d'ensemenceurs à anse de 0,01 mL stériles jetables, ensemercer les culots avec les cultures préparées comme ci-dessous.
2. Incuber les tubes, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
3. Après 14 jours d'incubation, ajouter à chaque culture 1,0 mL d'un mélange de polysorbate 80 et de peroxyde d'hydrogène préparé comme suit :
 - a. Peroxyde d'hydrogène à 30 %. Conserver au réfrigérateur.
 - b. Polysorbate 80 à 10 % préparé comme suit :
 - (1) Mélanger 10 mL de polysorbate 80 à 90 mL d'eau purifiée.
 - (2) Autoclaver à 121 °C pendant 10 min.
 - (3) Conserver au réfrigérateur.
 - c. Juste avant le test, mélanger les deux solutions à parts égales.
4. Conserver les cultures en position verticale pendant 5 min à température ambiante.
5. Mesurer (en mm) la hauteur de la colonne de bulles au-dessus de la surface du milieu.
6. Résultats attendus

Hauteur de la colonne de bulles supérieure à 45 mm.

**Mycobacterium kansasii*, Groupe I

ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, Groupe II

ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, Groupe IV

ATCC 6841

Hauteur de la colonne de bulles inférieure à 45 mm.

**Mycobacterium tuberculosis*

H37Ra ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, Groupe III

ATCC 13950

**Souche de microorganisme recommandée pour le contrôle de qualité par l'utilisateur.*

Lowenstein-Jensen Medium Slants et Lowenstein-Jensen Medium Mycoflasks

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
 - a. A l'aide d'ensemenceurs à anse calibrée de 0,01 mL stériles jetables, ensemercer les géloses inclinées ou les flacons avec les cultures de mycobactéries préparées comme ci-dessous.
 - b. Incuber les récipients de culture, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
2. Examiner les tubes ou les flacons après 7, 14 et 21 jours pour déceler une éventuelle croissance ou l'apparition d'une pigmentation et en apprécier la sélectivité.
3. Résultats attendus
 - a. Lowenstein-Jensen Medium

Souches de contrôle CLSI (souches ATCC)

**Mycobacterium tuberculosis* Croissance

H37Ra (25177)

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

b. **BBL Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride**

**Mycobacterium fortuitum* Croissance
 ATCC 6841
 **Mycobacterium kansasii* Aucune croissance
 ATCC 12478
 *Souche de microorganisme recommandée pour le contrôle de qualité par l'utilisateur.

III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

1. Examiner les tubes ou les flacons comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Inspecter visuellement des tubes ou des flacons représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. S'assurer que la pH mesuré par potentiométrie à température ambiante est conforme à la spécification ($7,0 \pm 0,2$).
4. Incuber des tubes ou des flacons représentatifs non ensemencés à une température comprise entre 20 et 25 °C et 30 et 35 °C, et les examiner après 7 et 14 jours pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

INFORMATIONS PRODUIT

IV APPLICATION

Le Lowenstein-Jensen Medium sert à la culture de *Mycobacterium tuberculosis* et d'autres espèces de mycobactéries.

V RESUME ET EXPLICATION

Lowenstein a initialement formulé un milieu de culture des mycobactéries incorporant du rouge Congo et du vert malachite pour inhiber partiellement la croissance d'autres bactéries.^{1,2} Ces colorants ont été utilisés aux mêmes fins par d'autres chercheurs, notamment Sonnenschein³ et Hohn.⁴ Aux Etats-Unis, les milieux à base de violet de gentiane de Corper⁵ et Petroff⁶ étaient fréquemment employés, ainsi que le milieu de Petragnani, qui contient du vert malachite. La formule mise au point par Jensen,⁷ a un contenu légèrement différent en citrate et en phosphate ; elle ne contient pas de rouge Congo, mais une concentration plus importante de vert malachite.

Les produits préparés BBL de Lowenstein-Jensen Medium comprennent les géloses inclinées en tube destinées à la culture de routine de *Mycobacterium* spp., les flacons qui offrent une surface de culture plus étendue et les géloses en tube qui s'utilisent pour réaliser le test semi-quantitatif de la catalase. Mis au point par Wayne⁸, ce dernier facilite la classification des mycobactéries.

Un milieu complémenté de 5 % de chlorure de sodium est également disponible car la capacité à tolérer 5 % de chlorure de sodium est une caractéristique de certaines souches de mycobactéries (p. ex., *M. fortuitum* et *M. chelonae* subsp. *abscessus*).⁹ La plupart des mycobactéries à croissance rapide, la souche à croissance lente *M. triviale* et certaines souches de *M. flavescens* se développent également sur les milieux contenant du NaCl. L'incapacité de *M. chelonae* subsp. *chelonae* à se développer aide à la différencier des autres membres du complexe *M. fortuitum* (p. ex., *M. chelonae* subsp. *abscessus*).^{9,10}

VI PRINCIPES DE LA METHODE

La base du Lowenstein-Jensen Medium est une formulation relativement simple qui doit être complémentée pour permettre la croissance des mycobactéries. Le glycérol et le mélange d'œuf sont ajoutés avant le processus d'épaississement par évaporation. Ces substances apportent les acides gras et les protéines indispensables au métabolisme des mycobactéries. L'albumine de l'œuf, qui coagule pendant la stérilisation, fournit un milieu solide pour l'ensemencement.

VII REACTIFS

Lowenstein-Jensen Medium

Formule approximative* par 600 mL d'eau purifiée

Phosphate monopotassique	2,5	g
Sulfate de magnésium	0,24	g
Citrate de sodium	0,6	g
L-asparagine	3,6	g
Fécule de pomme de terre	30,0	g
Vert malachite	0,4	g
Glycérol	12,0	mL
Œuf entier	1000,0	mL

*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performances imposés.

Le Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride contient les ingrédients répertoriés ci-dessous ainsi que 80 g de chlorure de sodium pour 600 mL.

Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ouvrir avec précaution les tubes et les flacons étroitement bouchés pour ne pas risquer d'être blessé par un bris de verre.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »¹¹⁻¹⁴ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

Les manipulations non susceptibles de produire des aérosols d'échantillons cliniques, comme la préparation de frottis acido-résistants, nécessitent des pratiques et des méthodes de sécurité biologique de niveau 2, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Toutes les manipulations susceptibles de produire des aérosols doivent être effectuées sous hotte biologique de sécurité de classe I ou II. Les activités de laboratoire impliquant la propagation et la manipulation de cultures de *M. tuberculosis* et *M. bovis* nécessitent des pratiques de sécurité biologique de niveau 3, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Les études chez l'animal nécessitent également des procédures particulières.¹³

Instructions pour la conservation

Dès réception, conserver les tubes et les flacons dans l'obscurité, à une température comprise entre 2 et 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Maintenir à l'abri de la lumière. Ne pas ouvrir prématurément. Conservés comme indiqué sur l'étiquette, les milieux peuvent être ensemencés jusqu'à la date de péremption et incubés pendant les durées d'incubation recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

Détérioration du produit

Ne pas utiliser les tubes ou les flacons s'ils présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

VIII PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons adaptés à la culture peuvent être préparés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.^{15,16} Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

IX METHODE

Matériaux fournis

Lowenstein-Jensen Medium ou
Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Matériaux requis mais non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis.

Mode opératoire du test

Respecter les techniques d'asepsie.

Le mode opératoire du test est celui recommandé par le CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) pour réaliser un isolement primaire à partir d'échantillons contenant des mycobactéries.¹⁰ La N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) est l'agent recommandé pour obtenir une digestion et une décontamination douces mais efficaces. Ces réactifs sont fournis dans la trousse de décontamination/digestion d'échantillons **BBL MycoPrep**. Pour plus d'informations sur la méthode de décontamination et de culture, consulter les publications citées en référence.^{10, 16-18}

Incuber les tubes ensemencés en atmosphère aérobie, enrichie en dioxyde de carbone, en les maintenant à l'abri de la lumière. Incuber les géloses inclinées et les flacons ensemencés à 35 ± 2 °C.

Ensemencer les milieux en géloses inclinées et en flacons sur un plan horizontal et laisser l'inoculum s'absorber. Desserrer les bouchons à vis des tubes et des flacons pendant les 3 premières semaines d'incubation pour permettre une circulation du dioxyde de carbone et la mise en route de la culture. Visser ensuite les bouchons pour éviter la déshydratation ; les desserrer brièvement une fois par semaine. Incuber les tubes verticalement si l'espace est limité.

REMARQUE : Si l'on suspecte la présence de *M. marinum* ou *M. ulcerans* dans des échantillons provenant de lésions cutanées, l'isolement primaire doit s'effectuer par incubation des cultures entre 25 et 33 °C ; dans le cas de *M. avium* ou *M. xenopi*, la température idéale de croissance est de 40 à 42 °C.¹⁰ Incuber un double de la culture à une température comprise entre 35 et 37 °C.

La méthode recommandée pour le test semi-quantitatif de la catalase sur gélose en tube de Lowenstein-Jensen Medium est la suivante :¹⁰

1. Ensemencer la surface du milieu avec 0,1 mL d'une culture en bouillon âgée de 7 jours ou une anse de culture en phase exponentielle de croissance prélevée sur une gélose inclinée de chaque souche de test. A titre de contrôles, ensemencer également des tubes avec une culture de souche fortement productrice de catalase (comme *M. kansasii*) et de souche ne produisant que peu cet enzyme (comme *M. intracellulare*).
2. Incuber, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C pendant 2 semaines.
3. Préparer un mélange de polysorbate 80 et de peroxyde d'hydrogène en mélangeant à parts égales :
 - a. une solution stérilisée à l'autoclave de polysorbate 80 à 10 % dans l'eau distillée ou une dilution d'1 mL de polysorbate 80 stérile dans 9 mL d'eau distillée
 - b. du peroxyde d'hydrogène à 30 %.
4. Ajouter 1 mL du mélange de polysorbate 80 et de peroxyde d'hydrogène à chaque culture. Après 5 min, noter la hauteur de la colonne de bulles en mm.

La méthode recommandée pour réaliser le test de tolérance au chlorure de sodium est la suivante :^{10,17}

1. Réaliser une suspension d'un repiquage en phase exponentielle de croissance dans du bouillon Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol de turbidité équivalente à celle d'un standard McFarland n° 1.
2. Ensemencer 0,1 mL de la culture standardisée sur une gélose inclinée de Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride. Ensemencer de même une gélose inclinée du milieu sans NaCl comme tube de contrôle de croissance.
3. Incuber avec les bouchons desserrés en atmosphère enrichie en CO₂, initialement dans un portoir plat pendant 1 semaine, à une température comprise entre 28 et 30 °C pour les souches à croissance rapide ou à 35 ± 2 °C pour les souches à croissance lente.
4. Examiner chaque semaine pour déceler une croissance éventuelle. Prolonger l'incubation jusqu'à trois semaines si nécessaire.

Contrôle de qualité par l'utilisateur

Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Chaque lot de milieu a été testé à l'aide des organismes de contrôle de qualité adaptés et ces tests sont conformes aux spécifications du produit, ainsi qu'aux normes CLSI, lorsqu'elles sont applicables. Comme toujours, les tests de CQ doivent être réalisés conformément aux réglementations locales, régionales, nationales ou internationales, aux exigences d'accréditation et/ou aux protocoles de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement.

X RESULTATS

Examiner les cultures dans les 5 à 7 jours suivant l'ensemencement, puis une fois par semaine jusqu'à 8 semaines.

Consigner les observations :

1. Nombre de jours nécessaires à l'observation macroscopique des colonies. Les souches à croissance rapide présentent des colonies matures dans les 7 jours ; il faut plus de temps aux souches à croissance lente pour former des colonies matures.
2. Production de pigment
Blanc, crème ou chamois = non chromogène (NC)
Citron, jaune, orange, rouge = chromogène (Ch)

Les frottis colorés peuvent présenter des bacilles acido-résistants, rapportés uniquement comme « bacilles acido-résistants » à moins de réaliser des tests d'identification définitive.

Les flacons peuvent être examinés par basculement sur la platine d'un microscope à dissection. Lire à un grossissement de 10 à 60x en lumière transmise. Balayer rapidement le champ d'observation au grossissement de 10 à 20x pour déceler la présence de colonies. Un grossissement plus important (30 à 60x) facilite l'observation de la morphologie des colonies, c'est-à-dire des colonies ayant la forme d'un cordon en serpent.

Dans le test semi-quantitatif de la catalase, la plupart des mycobactéries se répartissent en deux groupes.^{8,10,16}

1. Hauteur de la colonne de bulles supérieure à 45 mm.

M. chelonae
M. fortuitum
M. gordonae
M. kansasii (cliniquement significatif)
M. scrofulaceum

2. Hauteur de la colonne de bulles inférieure à 45 mm.

M. avium
M. bovis
M. gastri
M. haemophilum
M. intracellulare
M. kansasii (non significatif au plan clinique)
M. malmoense
M. marinum
M. tuberculosis
M. xenopi

La présence ou l'absence de croissance bactérienne dans le tube de milieu contenant 5 % de NaCl facilite la différenciation des isolats de mycobactéries. Le test de tolérance au chlorure de sodium est positif lorsque de nombreuses colonies se développent dans le milieu de contrôle et plus de 50 colonies se développent dans le milieu contenant 5 % de NaCl.^{10,17} La présence de colonies dans le milieu de contrôle, sans croissance visible dans le milieu de test au bout de 4 semaines d'incubation, constitue un test négatif.^{10,16,17}

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Pour procéder à l'identification, les microorganismes doivent se trouver en culture pure.

L'identification définitive nécessite des tests morphologiques, biochimiques et/ou sérologiques.

Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations sur les méthodes recommandées.^{15,16,19}

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Lowenstein-Jensen Medium

Dans une étude par Palaci et al., 85 échantillons respiratoires ont été ensemencés sur des géloses inclinées de Lowenstein-Jensen (LJ) et en tubes **BBL MGIT** selon les méthodes standard. 25 échantillons étaient positifs pour *M. tuberculosis*. La sensibilité en culture de LJ et en tubes **MGIT** était de 96,1 % (25 cultures positives sur 26). Bien que le délai de détection soit significativement

plus court avec les tubes **MGIT**, les deux méthodes ne présentent aucune différence significative de sensibilité de détection de *M. tuberculosis*.²⁰

Lowenstein-Jensen Medium Deep

Les caractéristiques de performances de tous les lots de Lowenstein-Jensen Medium Deep sont testées en usine. Les échantillons sont testés par ensemencement avec 0,2 mL de suspensions de *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 et *M. tuberculosis* ATCC 25177 en bouillon Middlebrook 7H9 Broth. Les tubes sont incubés jusqu'à 3 semaines, avec les bouchons desserrés, à une température comprise entre 35 et 37 °C. 1 mL de mélange de polysorbate 80 et de peroxyde d'hydrogène est ajouté à chaque culture. Après 5 min, on note la hauteur de la colonne de bulles en mm. Un test de la catalase positif correspond à une hauteur de colonne de bulles supérieure à 45 mm. Un test de la catalase négatif correspond à une hauteur de colonne de bulles inférieure à 45 mm. Le test de la catalase est positif pour les souches *M. fortuitum*, *M. kansasii* et *M. scrofulaceum*. Le test de la catalase est négatif pour les souches *M. intracellulare* et *M. tuberculosis*.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Les caractéristiques de performances de tous les lots de Lowenstein-Jensen Medium with 5 % Sodium Chloride sont testés en usine. Des échantillons sont testés avec des suspensions de *M. fortuitum* ATCC 6841 et *M. kansasii* ATCC 12478 diluées dans du **BBL** Middlebrook 7H9 Broth pour une concentration finale de 10³ à 10⁴ UFC. Les tubes sont incubés, bouchons desserrés, à une température comprise entre 35 et 37 °C pendant 7 à 14 jours en atmosphère enrichie en CO₂. Une croissance modérée à importante est observée pour *M. fortuitum*. *M. kansasii* est inhibé.

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Mycoflask , carton de 100 flacons
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, coffret de 10 tubes de taille A
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, carton de 100 tubes de taille A

XIV REFERENCES

1. Lowenstein, E. 1931. Die Zuchtung 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 Typenbestim mung von Tuberkelbazillentammen. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 125:222-239.
8. Wayne, L.G. 1962. Two varieties of *Mycobacterium kanasii* 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.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site 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