



BBL Lowenstein-Jensen Medium



BBL Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

L007464 • Ver. 11 • Octombrie 2015

PROCEDURI PENTRU CONTROLUL DE CALITATE (Opțional)

I INTRODUCERE

Mediul Lowenstein-Jensen este utilizat pentru izolarea și cultivarea micobacteriilor. Flacoanele cu mediu neînclinat sunt utilizate pentru testul semi-cantitativ cu catalază și drept ajutor în clasificarea micobacteriilor.

II PROCEDURA TESTULUI DE PERFORMANȚĂ

A. Procedura de preparare a inoculilor

1. Inoculați mediile înclinate Lowenstein-Jensen utilizând aplicatoare sterile cu tulpini bacteriene relevante provenite din stocurile de cultură.
2. Incubați flacoanele cu capacele slăbite, la $35 \pm 2^\circ\text{C}$ în atmosferă aerobă suplimentată cu dioxid de carbon, până la obținerea unei creșteri substanțiale (de obicei în 2 până la 3 săptămâni).
3. Recoltați coloniile cu un aplicator ascuțit steril prin îndepărtarea blândă a acestora de pe suprafața mediului, fără a preleva și mediu de cultură.
 - a. Pentru *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Transferați coloniile recoltate într-un flacon de sticlă steril cu capac cu filet și perle de sticlă conținând 5,0 mL bulion Middlebrook 7H9 cu glicerol.
 - (2) Amestecați bine prin rotire (câteva minute) până când suspensia nu mai conține aglomerări mari.
 - (3) Comparați această suspensie cu un standard nefelometric McFarland #1. Turbiditatea suspensiei trebuie să fie mai mare decât a standardului.
 - (4) Lăsați flaconul într-un stativ timp de 2 până la 3 h la temperatura camerei pentru a permite sedimentarea particulelor mari.
 - (5) Transferați supernatantul într-un recipient steril.
 - (6) Ajustați turbiditatea suspensiei la standardul McFarland #1 prin adăugarea lentă de bulion Middlebrook 7H9 cu glicerol. Agitați bine.
 - (7) Înainte de utilizare diluați până la 10^5 UFC/mL. Amestecați bine și inoculați prin striere cu o ansă calibrată de 0,01 mL.
 - b. Pentru toate celelalte tulpini de micobacterii:
 - (1) Transferați coloniile recoltate într-un flacon steril de 50 mL pentru centrifugare, cu capac cu filet și cu 8 până la 12 perle de sticlă (cu diametru de 2 mm) conținând 5 mL de diluant pentru micobacterii preparat astfel:
 - Amestecați următoarele ingrediente într-un balon de 1 L și ajustați pH-ul, utilizând hidroxid de sodiu 1N, până la valori între 6,7 și 7,0
 - Albumină bovină (fără acizi grași) 1,0 g
 - Polisorbat 80 0,1 mL
 - Apă purificată 500 mL
 - Sterilizare prin filtrare membranară (filtru de 0,2 μ)
 - Repartizați aseptice câte 5,5 mL în flacoane sterile cu capace cu filet.
 - (2) Exprimați coloniile micobacteriene cu aplicatorul pe peretele lateral al tubului de centrifugare cu capac cu filet. Amestecați coloniile cu diluant.
 - (3) Astupați flaconul și amestecați prin rotire timp de aproximativ 10 min până la obținerea unei suspensii fără aglomerări mari.
 - (4) Adăugați 15 mL de diluant steril pentru micobacterii și amestecați bine.
 - (5) Comparați această suspensie cu standardul nefelometric McFarland #1. Turbiditatea suspensiei trebuie să fie mai mare decât a standardului.
 - (6) Lăsați flaconul într-un stativ timp de 2 până la 3 h la temperatura camerei pentru a permite sedimentarea particulelor mari.
 - (7) Aspirați supernatantul și transferați-l într-un recipient steril. Suspensia trebuie să aibă o turbiditate mai mare decât standardul McFarland #1 și să nu conțină particule mari. În cazul prezenței unor particule mari, amestecați și lăsați pentru încă 1 h. Transferați supernatantul într-un recipient steril.
 - (8) Ajustați turbiditatea suspensiei la standardul McFarland #1 prin adăugarea lentă de diluant pentru micobacterii. Agitați bine.
 - (9) Distribuiți alicote din suspensie în fiole pentru congelare etichetate cu identitatea microorganismului și data preparării.
 - (10) Congelați suspensiile din fiole prin introducerea acestora într-un congelator pentru temperaturi scăzute la -60°C . Fiolele pot fi păstrate până la 6 luni.

- (11) În scopul utilizării, scoateți fiolele din congelator și dezghețați conținutul rapid prin introducerea flacoanelor în băi de apă la 30 până la 35°C. Înainte de utilizare diluați până la 10⁵ UFC/mL. Amestecați bine și inoculați prin striere cu o ansă calibrată de 0,01 mL.

B. Proceduri pentru testarea mediilor

Flacoane cu mediu neînclinat Lowenstein-Jensen

1. Inoculați suprafețele orizontale cu o ansă de inoculare de 0,01 mL utilizând culturi preparate așa cum este descris mai sus.
2. Incubați flacoanele cu capetele slăbite la 35 ± 2°C în atmosferă aerobă suplimentată cu dioxid de carbon.
3. După 14 zile de incubație adăugați fiecărei culturi câte 1,0 mL de mixtură de polisorbant 80 și peroxid preparată astfel:
 - a. 30% peroxid de hidrogen. Păstrați în frigider.
 - b. 10% polisorbant 80 preparat în felul următor:
 - (1) Amestecați 10 mL de polisorbant 80 cu 90 mL de apă purificată.
 - (2) Autoclavați timp de 10 min la 121°C.
 - (3) Păstrați în frigider.
 - c. Imediat înainte de efectuarea testului amestecați cele două soluții în părți egale.
4. Lăsați culturile în poziție verticală la temperatura camerei timp de 5 minute.
5. Măsurați înălțimea (mm) coloanei de bure aflate deasupra suprafeței mediului.
6. Rezultate estimate

Coloană de bure mai înaltă de 45 mm.

**Mycobacterium kansasii*, Grup I

ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, Grup II

ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, Grup IV

ATCC 6841

Coloană de bure mai mică de 45 mm înălțime.

**Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, Grup III

ATCC 13950

*Tulpină recomandată pentru controlul calității efectuat de utilizator.

Mediile înclinate și sticlele de mediu Lowenstein-Jensen

1. Inoculați eșantioane reprezentative în culturile enumerate mai jos.
 - a. Cu anse sterile de unică folosință, calibrate la 0,01 mL, inoculați mediile înclinate sau sticlele utilizând culturile micobacteriene preparate așa cum este descris mai sus.
 - b. Incubați la 35 ± 2°C recipientele cu capacele slăbite în atmosferă aerobă suplimentată cu dioxid de carbon.
2. Examinați flacoanele sau sticlele la 7, 14 și 21 zile în vederea evaluării creșterii, selectivității și pigmentării.
3. Rezultate estimate
 - a. Pentru mediul Lowenstein-Jensen
Organisme de control CLSI (tulpini ATCC)
**Mycobacterium tuberculosis* Creștere
H37Ra (25177)
**Mycobacterium kansasii*, Creștere
Grup I (12478)
**Mycobacterium scrofulaceum*, Creștere
Grup II (19981)
**Mycobacterium intracellulare*, Creștere
Grup III (13950)
**Mycobacterium fortuitum*, Creștere
Grup IV (6841)
 - b. Pentru mediul Lowenstein-Jensen cu 5% clorură de sodiu
**Mycobacterium fortuitum* Creștere
ATCC 6841
**Mycobacterium kansasii* Nu există creștere
ATCC 12478
*Tulpină recomandată pentru controlul calității efectuat de utilizator.

III CONTROLUL SUPLIMENTAR DE CALITATE

1. Examinați flacoanele și sticlele așa cum este descris în „Deteriorarea produsului”.
2. Examinați vizual flacoanele sau sticlele reprezentative pentru a vă asigura că eventualele defecte fizice nu împiedică în utilizare.
3. Determinați pH-ul la temperatura camerei prin metoda potențimetrică în scopul respectării specificațiilor de pH $7,0 \pm 0,2$.
4. Incubați flacoanele sau sticlele neinoculate reprezentative la 20 până la 25°C și la 30 până la 35°C și examinați după 7 și, respectiv, 14 zile în vederea determinării contaminării microbiene.

INFORMAȚII DESPRE PRODUS

IV UTILIZARE SPECIFICĂ

Mediul Lowenstein-Jensen este utilizat pentru cultivarea *Mycobacterium tuberculosis* și a altor specii de micobacterii.

V REZUMAT ȘI EXPLICAȚII

Inițial, Lowenstein a formulat un mediu pentru cultivarea micobacteriilor, în care erau încorporate roșu de congo și verde malachit pentru inhibiția parțială a altor bacterii.^{1,2} Acești coloranți erau utilizați în mod asemănător de către alți cercetători, dintre care trebuie menționați Sonnenschein³ și Hohn.⁴ În Statele Unite erau populare mediile cu violet de gențiană imitate de Corper⁵ și Petroff⁶, împreună cu mediul Petragnani care conținea verde malachit. Formula actuală, dezvoltată de către Jensen,⁷ are un conținut ușor diferit de citrat și de fosfat, nu conține roșu de congo și are o concentrație crescută de verde malachit.

Preparatele **BBL** de mediu Lowenstein-Jensen includ flacoane cu medii înclinate utilizate pentru cultivarea speciilor *Mycobacterium*, sticle de utilizat în cazul necesității unei suprafețe mai mari și flacoane cu mediu solid neînclinat pentru realizarea testelor semi-cantitative cu catalază. Această procedură a fost dezvoltată ulterior de Wayne⁸ și este utilă în clasificarea micobacteriilor.

În plus, mediul este disponibil cu un adaos de 5% clorură de sodiu, având în vedere capacitatea de a tolera 5% clorură de sodiu, caracteristică anumitor tulpini de micobacterii (cum ar fi *M. fortuitum* și *M. chelonae* subsp. *abscessus*).⁹ Majoritatea tulpinilor cu creștere rapidă, *M. triviale* care are creștere lentă și unele tulpini de *M. flavescens*, cresc, de asemenea, pe medii care conțin NaCl. Incapacitatea tulpinilor *M. chelonae* subsp. *chelonae* de a crește în acest mediu le diferențiază de membrii complexului *M. fortuitum* (de ex., *M. chelonae* subsp. *abscessus*).^{9,10}

VI PRINCIPIILE PROCEDURII

Substratul de mediu Lowenstein-Jensen este o formulă relativ simplă care necesită suplimentare pentru a susține creșterea bacteriană. Anterior procesului de îngroșare sunt adăugate glicerol și mixtură de ou. Aceste substanțe furnizează acizii grași și proteinele necesare metabolismului micobacteriilor. Coagularea albuminei din ou în cursul procesului de sterilizare furnizează un mediu solid potrivit pentru inoculare.

VII REACTIVI

Mediu Lowenstein-Jensen

Formula aproximativă* pentru 600 mL de apă purificată

Fosfat de monopotasiu	2,5 g
Sulfat de magneziu	0,24 g
Citrat de sodiu	0,6 g
L-Asparagină	3,6 g
Făină de cartofi	30,0 g
Verde malachit	0,4 g
Glicerol	12,0 mL
Ou integral	1000,0 mL

*Ajustată și/sau suplimentată după cum este necesar pentru a îndeplini criteriile de performanță.

Mediul Lowenstein-Jensen cu 5% clorură de sodiu conține ingredientele de mai sus și, la 600 mL, 80 g de clorură de sodiu.

Avertismente și precauții

În scopul diagnosticului *in vitro*.

Flacoanele și sticlele cu capace bine fixate trebuie deschise cu atenție pentru a evita rănirea ca urmare a spargerii sticlei.

În eșantioanele clinice pot fi prezente microorganisme patogene, inclusiv virusurile hepatice și virusul imunodeficienței umane. La manevrarea articolelor contaminate cu sânge sau cu alte lichide biologice trebuie respectate „Precauțiile standard”¹¹⁻¹⁴ și regulamentul instituției. Flacoanele preparate, recipientele pentru probe și celelalte materiale contaminate trebuie sterilizate prin autoclavare după utilizare, înainte de a fi aruncate.

Practicile și procedurile conforme nivelului 2 de siguranță biologică, echipamentul de siguranță și facilitățile sunt necesare în timpul manipulărilor care nu produc aerosoli ale probelor clinice, precum prepararea frotiurilor acido-rezistente. Toate activitățile producătoare de aerosoli trebuie realizate într-o boxă cu siguranță biologică de clasă I sau II.

Pentru activitățile care implică propagarea și manipularea *Mycobacterium tuberculosis* și a *Mycobacterium bovis* crescute în cultură, sunt necesare conduita, echipamentul și facilitățile de izolare pentru siguranța biologică de nivel 3. Studiile pe animale necesită, de asemenea, proceduri speciale.¹³

Instrucțiuni de depozitare

La recepție, depozitați flacoanele și sticlele la întuneric la 2–8°C. Evitați congelarea și temperaturile ridicate. Deschideți numai înainte de utilizare. Reduceți la minim expunerea la lumină. Mediile păstrate până la utilizare în condițiile specificate pe etichetă pot fi inoculate până la data de expirare și incubate pentru duratele recomandate de incubare. Lăsați mediul să ajungă la temperatura camerei înainte de inoculare.

Deteriorarea produsului

Nu utilizați flacoanele sau sticlele care prezintă evidența contaminării microbiene, decolorare, deshidratare sau alte semne de deteriorare.

VIII COLECTAREA ȘI MANEVRAREA PROBELOR

Probele adecvate pentru cultivare pot fi manevrate utilizând tehnici variate. Pentru informații detaliate consultați textele corespunzătoare.^{15,16} Probele trebuie obținute înainte de administrarea agenților antimicrobieni. Trebuie să se asigure livrarea promptă la laborator.

IX PROCEDURA

Material furnizat

Mediu Lowenstein-Jensen sau

Mediu Lowenstein-Jensen cu 5% clorură de sodiu

Materiale necesare dar nefurnizate

Medii de cultură auxiliare, reactivi, organisme pentru controlul de calitate și echipamentul de laborator necesar.

Procedură de testare

Utilizați tehnici aseptice.

Procedurile de testare sunt cele recomandate de către Centers for Disease Control and Prevention (CDC) pentru izolarea primară din probe care conțin micobacterii.¹⁰ Soluția de N-acetil-L-cisteină - hidroxid de sodiu (NALC-NaOH) este recomandată ca fiind un agent de digestie și decontaminare blând, dar eficient. Acești reactivi sunt furnizați cu **BBL MycoPrep** Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit. Pentru instrucțiuni detaliate privind decontaminarea și cultivarea consultați bibliografia corespunzătoare.^{10,16-18}

Uterior inoculării, păstrați recipientele de analiză ferite de lumină și amplasați-le într-un sistem adecvat care să furnizeze o atmosferă aerobă îmbogățită cu dioxid de carbon. Incubați mediile înclinate și sticlele inoculate la 35 ± 2°C.

Mediile înclinate și cele din sticle trebuie incubate în plan orizontal până la absorbirea inoculului. În primele 3 săptămâni flacoanele și sticlele trebuie să aibă capacele slăbite pentru a permite circulația dioxidului de carbon în vederea inițierii creșterii. Uterior strângeți capacele pentru a preveni deshidratarea; slăbiți-le pentru perioade scurte o dată pe săptămână. Dacă spațiul reprezintă o problemă flacoanele pot sta vertical.

NOTĂ: Culturile provenite din leziuni ale tegumentului și suspectate a fi *M. marinum* sau *M. ulcerans* trebuie incubate la 25 până la 33°C în vederea izolării primare; culturile suspecte a conține *M. avium* sau *M. xenopi* prezintă creșterea optimă la 40 până la 42°C.¹⁰ Incubați un eșantion din aceeași cultură la 35 până la 37°C.

Procedura recomandată pentru testul semi-cantitativ cu catalază efectuată cu ajutorul flacoanelor cu agar neînclinat Lowenstein-Jensen este următoarea:¹⁰

1. Inoculați suprafața mediului fie cu 0,1 mL dintr-o cultură de 7 zile în bulion sau câte o ansă din culturile de pe un mediu înclinat cu creștere activă pentru fiecare tulpină de testat. De asemenea, inoculați flacoane cu o tulpină intens producătoare de catalază, cum ar fi *M. kansasii*, și cu o tulpină slab producătoare de catalază, cum ar fi *M. intracellulare*, drept martori.
2. Incubați, cu capacul slăbit, la 35 ± 2°C timp de 2 săptămâni.
3. Preparați o mixtură de polisorbant 80 și peroxid prin amestecarea în părți egale a:
 - a. O soluție 10% autoclavată de polisorbant 80 în apă distilată sau o diluție de 1 mL de polisorbant 80 steril în 9 mL apă distilată.
 - b. Peroxid de hidrogen (30%).
4. Adăugați la fiecare cultură câte 1 mL din mixtura de polisorbant 80 cu peroxid. După 5 minute înregistrați înălțimea în mm a coloanelor de bule.

Procedura recomandată pentru testul de toleranță la clorura de sodiu este descrisă în continuare:^{10,17}

1. Realizați o suspensie dintr-o subcultură cu creștere activă pe bulion Middlebrook 7H9 cu o turbiditate echivalentă standardului McFarland nr. 1.
2. Inoculați 0,1 mL din cultura standardizată pe un mediu înclinat Lowenstein-Jensen cu 5% clorură de sodiu. În mod asemănător, inoculați un mediu înclinat fără NaCl care să funcționeze ca martor de creștere.

3. Incubați cu capacele slăbite într-o atmosferă îmbogățită cu CO₂, inițial într-un stativ plan timp de 1 săptămână la 28 până la 30°C pentru tulpinile cu creștere rapidă sau la 35 ± 2°C pentru cele cu creștere lentă.
4. Evaluați săptămânal creșterea. Dacă este necesar puteți continua incubația încă trei săptămâni.

Controlul calității efectuat de utilizator

Consultați „Proceduri pentru controlul de calitate”.

Fiecare lot de medii a fost testat prin utilizarea de organisme corespunzătoare pentru controlul de calitate, această testare îndeplinind cerințele din specificațiile produsului și standardele CLSI, în măsura în care acestea sunt relevante. La fel ca întotdeauna, testarea de control al calității trebuie efectuată conform reglementărilor în vigoare la nivel local, statal, federal sau național, conform cerințelor de acreditare și/sau procedurilor de laborator standard pentru controlul de calitate.

X REZULTATE

Culturile trebuie interpretate în 5 până la 7 zile de la inoculare și în continuare săptămânal timp de până la 8 săptămâni.

Observații înregistrate:

1. Numărul de zile până când coloniile devin vizibile macroscopic. Coloniile cu creștere rapidă dezvoltă colonii mature în 7 zile; cele cu creștere lentă necesită mai mult de 7 zile pentru a forma colonii mature.
2. Producerea de pigmenți
Albe, alb-gălbui sau galben închis = necromogene (NC)
Citron, galbene, portocalii, roșii = cromogene (Cr)

Colorațiile frotiurilor pot indica bacili acido-rezistenți, care sunt raportați numai ca „bacili acido-rezistenți” dacă nu sunt efectuate teste definitive.

Sticlele pot fi examinate răsturnate la un microscop pentru disecție. Interpretați la 10–60x cu lumină transmisă. Scanați rapid la 10–20x pentru a detecta prezența coloniilor. Grosismențe mai mari (30–60x) sunt utile la observarea morfologiilor coloniilor, cum ar fi colonii în serpentină sau în cordoane.

În testul semi-cantitativ cu catalază, cele mai multe bacterii pot fi incluse în două grupuri.^{8,10,16}

1. Coloană de bule mai înaltă de 45 mm.
M. chelonae
M. fortuitum
M. gordonae
M. kansasii (semnificativă clinic)
M. scrofulaceum
2. Coloană de bule mai mică de 45 mm înălțime.
M. avium
M. bovis
M. gastri
M. haemophilum
M. intracellulare
M. kansasii (nesemnificativă clinic)
M. malmoense
M. marinum
M. tuberculosis
M. xenopi

Prezența sau absența creșterii în flacoane care conțin 5% NaCl ajută la diferențierea izolatelor micobacteriene.

Toleranța la sare este pozitivă când în mediul de control apar numeroase colonii și apar mai mult de 50 de colonii pe mediul care conține 5% NaCl.^{10,17} Colonii în mediul martor dar fără creștere vizibilă în mediul de testare după 4 săptămâni de incubație, constituie un test negativ.^{10,16,17}

XI LIMITĂRILE PROCEDURII

Pentru a fi identificate, microorganismele trebuie să provină din culturi pure. Pentru identificarea finală trebuie efectuate teste morfologice, biochimice și/sau serologice. Pentru informații detaliate și proceduri recomandate consultați textele corespunzătoare.^{15,16,19}

XII CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ

Flacoane cu mediu neîncălzit Lowenstein-Jensen

Într-un studiu efectuat de Palaci și colaboratorii, au fost inoculate 85 de probe provenite de la nivelul aparatului respirator pe medii încălzite Lowenstein-Jensen (LJ) și în flacoane **BBL MGIT** urmând procedurile standard. Douăzeci și cinci (25) de probe au fost găsite pozitive pentru *M. tuberculosis*. Sensibilitatea la cultivare atât pentru LJ cât și pentru **MGIT** a fost de 96,1% (25 din 26 de culturi pozitive). Deși timpul de depistare a fost semnificativ mai scurt în cazul flacoanelor **MGIT**, nu a existat nici o diferență de sensibilitate între cele două metode la detectarea *M. tuberculosis*.²⁰

Flacoanele cu mediu neînclinat Lowenstein-Jensen

Caracteristicile produselor sunt testate înainte de lansare pentru toate loturile de flacoane cu mediu neînclinat Lowenstein-Jensen. Eșantioanele sunt testate cu *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 și *M. tuberculosis* ATCC 25177 prin inocularea cu 0,2 mL suspensii de bulion Middlebrook 7H9. Flacoanele sunt incubate până la 3 săptămâni, cu capacele slăbite, la 35-37°C. Se prepară o mixtură de polisorbit 80 cu peroxid și se adaugă câte 1 mL fiecărei culturi. După 5 minute înregistrați înălțimea în mm a coloanelor de bure. Reacția catalazei este considerată pozitivă dacă înălțimea coloanei de bure este mai mare de 45 mm. O reacție negativă este indicată de o coloană cu înălțimea mai mică de 45 mm. Reacția catalazei este pozitivă la *M. fortuitum*, *M. kansasii* și la *M. scrofulaceum*. Reacția catalazei este negativă la *M. intracellulare* și la *M. tuberculosis*.

Mediu Lowenstein-Jensen cu 5% clorură de sodiu

Caracteristicile specifice produselor sunt testate înainte de lansare pentru toate loturile de medii Lowenstein-Jensen cu 5% clorură de sodiu. Eșantioanele sunt testate cu suspensii de *M. fortuitum* ATCC 6841 și *M. kansasii* ATCC 12478 diluate cu bulion BBL Middlebrook 7H9 pentru a obține între 10^3 și 10^4 UCF. Flacoanele sunt incubate la 35-37°C, cu capacele slăbite, timp de 7 până la 14 zile într-o atmosferă îmbogățită cu CO₂. La *M. fortuitum* se observă creștere moderată până la intensă. *M. kansasii* este inhibată.

XIII DISPONIBILITATE

Nr. cat.	Descriere
221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Mycoflask , cutie de 100 sticle
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, pachet de 10 flacoane mărimea A
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, cutie de 100 flacoane mărimea A

XIV REFERINȚE

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-bazilus. 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.

Service Tehnic și Suport BD Diagnostics: contactați reprezentantul local BD sau 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