



BBL Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

L007464 • Ver. 11 • oktober 2015

PROCEDURER FÖR KVALITETSKONTROLL (Valfritt)

I INTRODUKTION

Lowenstein-Jensen Medium används för isolering och odling av mykobakterier. Mediet i form av fördjupningar i rör används för semikvantitativ katalastest som ett hjälpmedel för klassificering av mykobakterier.

II PRESTANDATESTFÖRFARANDE

A. Beredning av inokulat

1. Ympa Lowenstein-Jensen Medium-skivor med stamkulturer av de relevanta mykobakteriestammarna med hjälp av sterila odlingspinnar.
2. Inkubera rör med löst påsatt lock i aerob atmosfär med tillsats av koldioxid vid $35 \pm 2^\circ\text{C}$ tills kraftig tillväxt erhålls (vanligtvis inom 2 till 3 veckor).
3. Skörda växten med en steril formerad applikatorpinne genom att försiktigt avlägsna cellerna från mediets yta. Var noga med att inte odlingsmedium får följa med cellskörden.
 - a. För *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:
 - (1) Överför växten till 5,0 mL Middlebrook 7H9-buljong med glycerol i ett sterilt glaströr med skruvlock innehållande sterila glaspärlor.
 - (2) Vortexblanda väl (flera minuter) tills suspensionen är fri från större klumpar.
 - (3) Jämför denna suspension med en McFarland-standard nr. 1 med hjälp av en nefelometer. Suspensionen ska vara grumligare än standarden.
 - (4) Placera röret i ett ställ vid rumstemperatur i 2 till 3 timmar så att stora partiklar kan sjunka till botten.
 - (5) Överför supernatanten till en steril behållare.
 - (6) Justera suspensionens grumlighet till McFarland-standard nr. 1 genom att långsamt tillsätta steril Middlebrook 7H9-buljong med glycerol. Skaka väl.
 - (7) Späd till 10^5 CFU/mL före användning. Blanda väl och inokulera testmediet genom utstryk med hjälp av en 0,01 mL kalibrerad ögla.
 - b. För alla övriga mykobakteriestammar:
 - (1) Överför växten till ett sterilt 50 mL centrifugrör med skruvkork innehållande 8 till 12 sterila glaspärlor (2 mm diameter) och 5 mL spädningsvätska för mykobakterier som beretts enligt nedan:
 - Blanda följande ingredienser i en 1-litersflaska och justera pH-värdet med hjälp av 1N natriumhydroxid till 6,7 till 7,0
Bovint albumin (fettsyrafritt) 1,0 g
Polysorbat 80..... 0,1 mL
Aqua purif. 500 mL
 - Sterilisera genom membranfiltrering (0,2 μ filter)
 - Dispensera aseptiskt mängder om 5,5 mL i sterila rör med skruvkork.
 - (2) Emulgera med hjälp av en applikatorpinne mykobakterieväxten på sidoväggen av ett centrifugrör med skruvkork. Blanda växten med spädningsvätskan.
 - (3) Skruva på korken på röret och vortexblanda i ungefär 10 min tills växten är väl suspenderad och fri från stora klumpar.
 - (4) Tillsätt 15 mL steril spädningsvätska för mykobakterier och blanda noga.
 - (5) Jämför denna suspension med en McFarland-standard nr. 1 med hjälp av en nefelometer. Suspensionen ska vara grumligare än standarden.
 - (6) Placera röret i ett ställ vid rumstemperatur i 2 till 3 timmar så att stora partiklar kan sjunka till botten.
 - (7) Aspirera supernatanten och för över den till en steril behållare. Suspensionen ska vara grumligare än en McFarland-standard nr. 1 och fri från stora partiklar. Om det fortfarande finns stora partiklar, blanda och låt stå i ytterligare 1 timme. Överför supernatanten till en steril behållare.

- (8) Justera suspensionens grumlighet till McFarland-standard nr. 1 genom att långsamt tillsätta steril spädningssväska för mykobakterier. Skaka väl.
- (9) Dispensera aliquoter av suspensionen i frysflaskor märkta med identifiering av organismen och beredningsdatum.
- (10) Frys suspensionen genom att placera flaskorna i lågtemperaturfrys vid -60°C . Flaskorna kan förvaras i upp till 6 månader.
- (11) Vid användning tas den frusna flaskan ut ur frysen och innehållet snabbtinas genom att röret placeras i 30 till 35°C varmt vattenbad. Späd till 10^5 CFU/mL före användning. Blanda väl och inokulera testmediet genom utstryk med hjälp av en 0,01 mL kalibrerad ögla.

B. Förfarande för testning av medier

Lowenstein-Jensen Medium Deep

1. Ympa ändytor med en steril 0,01 mL ympögla för engångsbruk med odlingar som förberetts enligt ovanstående beskrivning.
2. Inkubera rör med löst påsatt kork vid $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i aerob atmosfär med tillsats av koldioxid.
3. Efter 14 dagars inkubering tillsätts till varje odling 1,0 mL blandning av polysorbat 80-peroxid som beretts enligt följande:
 - a. 30 % väteperoxid. Förvaras i kylskåp.
 - b. 10 % polysorbat 80 beredd enligt följande:
 - (1) Blanda 10 mL polysorbat 80 med 90 mL aqua purif.
 - (2) Autoklavera vid 121°C i 10 min.
 - (3) Förvaras i kylskåp.
 - c. Blanda lika delar av de båda lösningarna omedelbart innan testet utförs.
4. Förvara odlingarna i upprätt läge i 5 min vid rumstemperatur.
5. Mät (mm) höjden på bubblapelaren ovanför mediets yta.
6. Förväntade resultat

Bubblapelaren överstiger 45 mm i höjd.

**Mycobacterium kansasii*, grupp I

ATCC 12478

Mycobacterium scrofulaceum, grupp II

ATCC 19981

Mycobacterium fortuitum, grupp IV

ATCC 6841

Bubblapelaren understiger 45 mm i höjd.

**Mycobacterium tuberculosis*

H37Ra ATCC 25177

Mycobacterium intracellulare, grupp III

ATCC 13950

*Rekommenderad organismstam för kvalitetskontroll utförd av användaren.

Lowenstein-Jensen Medium Slants och Bottles

1. Ympa representativa prover med de odlingar som anges nedan.
 - a. Använd sterila 0,01 mL ympöglor för engångsbruk och ympa skivorna eller flaskorna med mykobakterieodlingar som beretts enligt ovanstående beskrivning.
 - b. Inkubera behållare med löst påsatt kork vid $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i aerob atmosfär med tillsats av koldioxid.
2. Undersök rören eller flaskorna efter 7, 14 och 21 dagar med avseende på tillväxt, selektivitet och pigmentering.
3. Förväntade resultat
 - a. För Lowenstein-Jensen Medium
CLSI-kontrollorganismer (ATCC-stammar)

<i>*Mycobacterium tuberculosis</i>	Växt
H37Ra (25177)	
<i>*Mycobacterium kansasii</i> ,	Växt
Grupp I (12478)	
<i>*Mycobacterium scrofulaceum</i> ,	Växt
Grupp II (19981)	
<i>*Mycobacterium intracellulare</i> ,	Växt
Grupp III (13950)	
<i>*Mycobacterium fortuitum</i> ,	Växt
Grupp IV (6841)	

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

**Mycobacterium fortuitum*..... Växt

ATCC 6841

**Mycobacterium kanasii*..... Ingen växt

ATCC 12478

*Rekommenderad organismstam för kvalitetskontroll utförd av användaren.

III YTTERLIGARE KVALITETSKONTROLL

1. Undersök rören eller flaskorna enligt beskrivningen i avsnittet "Produktförsämring".
2. Undersök representativa rör eller flaskor visuellt för att säkerställa att inga existerande fysiska defekter kommer att interferera på användningen.
3. Fastställ pH potentiometriskt vid rumstemperatur så att värdet på $7,0 \pm 0,2$ enligt specifikationen följs.
4. Inkubera oinokulerade representativa rör eller flaskor vid 20 till 25 °C och 30 till 35 °C och undersök dem efter 7 och 14 dagar med avseende på mikrobiell kontamination.

PRODUKTINFORMATION

IV AVSEDD ANVÄNDNING

Lowenstein-Jensen Medium används för odling av *Mycobacterium tuberculosis* och andra mykobakteriearter.

V SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Lowenstein tog ursprungligen fram ett medium för odling av mykobakterier i vilket kongorött och malakitgrönt ingick för partiell inhibering av andra bakterier.^{1,2} Dessa färgämnen användes på liknande sätt av andra undersökare, i synnerhet Sonnenschein³ och Hohn.⁴ I USA var gentianviolettmediet enligt Corper⁵ och Petroff⁶ populärt, tillsammans med mediet enligt Petagnani, som innehöll malakitgrönt. Den föreliggande formeln, som utvecklats av Jensen,⁷ har ett något annorlunda citrat- och fosfatinnehåll, innehåller inte kongorött och har en högre koncentration av malakitgrönt.

BBL-beredda produkter av Lowenstein-Jensen Medium inbegriper skivor i rör för allmänt bruk vid odling av *Mycobacterium*-arter, flaskor som används när en större yta önskas och fördjupningar i rör för utförande av semikvantitativt katalastest. Det senare förfarandet utvecklades av Wayne⁸ och är användbart för klassificering av mykobakterier.

Dessutom finns mediet med tillsats av 5 % natriumklorid eftersom förmågan att tolerera 5 % natriumklorid är karakteristisk för vissa mykobakteriestammar (t.ex. *M. fortuitum* och *M. chelonae* subsp. *abscessus*).⁹ De flesta snabbväxare, de långsamt växande *M. triviale* och vissa stammar av *M. flavescens* växer också på medier som innehåller NaCl. Oförmågan hos *M. chelonae* subsp. *chelonae* att växa underlättar differentiering av denna stam från andra medlemmar av *M. fortuitum*-komplexet (t.ex. *M. chelonae* subsp. *abscessus*).^{9,10}

VI PRINCIPER FÖR METODEN

Lowenstein-Jensen Medium Base är en relativt enkel formulering som måste kompletteras för att underlätta tillväx av mykobakterier. Glycerol- och äggblandning tillsätts före förtjockningen. Dessa ämnen ger fettsyror och protein som krävs för mykobakteriernas metabolism. Koagulationen av äggalbumin under steriliseringen ger ett fast medium för ympning.

VII REAGENSER

Lowenstein-Jensen Medium

Ungefärlig sammansättning* per 600 mL aqua purif.

Monokaliumfosfat	2,5	g
Magnesiumsulfat	0,24	g
Natriumcitrat	0,6	g
L-asparagin	3,6	g
Potatismjöl	30,0	g
Malakitgrönt	0,4	g
Glycerol	12,0	mL
Ägg	1 000,0	mL

*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride innehåller ovanstående ingredienser med 80 g natriumklorid per 600 mL.

Varningar och försiktighetsbeaktanden

Avsedd för *in vitro*-diagnostik.

Rör och flaskor med lock som sitter åt hårt ska öppnas försiktigt så att inte skador inträffar på grund av att glaset går sönder.

Patogena mikroorganismer, inklusive hepatitvirus och humant immunbristvirus, kan förekomma i kliniska prover. "Allmänna försiktighetsbeaktanden"¹¹⁻¹⁴ och institutionens riktlinjer bör följas vid hantering av alla föremål som kontaminerats med blod eller andra kroppsvätskor. Efter användning ska alla preparerade rör, provbehållare och övrigt kontaminerat material steriliseras i autoklav innan de kasseras.

Rutiner och procedurer samt spridningsskyddande utrustning och anläggningar enligt biosäkerhetsnivå 2 krävs vid icke-aerosolproducerande hantering av kliniska prover som t.ex. vid preparering av syrafasta utstryk. Samtliga aerosolgenererande aktiviteter måste utföras i ett biologiskt säkerhetsskåp av klass I eller II. För laboratorieaktiviteter som innefattar propagation och hantering av kulturer av *M. tuberculosis* och *M. bovis* krävs rutiner samt spridningsskyddande utrustning och anläggningar enligt biosäkerhetsnivå 3. Djurstudier kräver också särskilda rutiner.¹³

Förvaringsanvisningar

Förvara rör och flaskor mörkt vid 2–8 °C efter mottagandet. Undvik frysning och överhettning. Får ej öppnas förrän omedelbart före användning. Aktas för ljus. Medier som förvarats enligt anvisningarna till precis före användning kan inokuleras fram till utgångsdatum och inkuberas under de rekommenderade inkubationstiderna. Låt mediet värmas till rumstemperatur före inokulation.

Produktnedbrytning

Rör eller flaskor får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning eller annan försämring.

VIII PROVTAGNING OCH -HANTERING

Prover som är lämpliga för odling kan hanteras med olika metoder. För detaljerad information hänvisas till lämplig litteratur.^{15,16} Prover skall tas före administrering av antimikrobiella medel. Åtgärder måste vidtas för snabb leverans till laboratoriet.

IX FÖRFARANDE

Tillhandahållt material:

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

Material som krävs men ej medföljer

Extra odlingsmedier, reagenser, organismer för kvalitetskontroll och laboratorieutrustning efter behov.

Testförfarande

Använd aseptisk teknik.

Testförfarandena är de som rekommenderas av Centers for Disease Control and Prevention (CDC) för primärisolering från prover som innehåller mykobakterier.¹⁰ En lösning av N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid (NALC-NaOH) rekommenderas som ett skonsamt men effektivt medel för enzymbehandling och dekontaminering. Dessa reagenser tillhandahålls i **BBL MycoPrep Mycobacterial Specimen Digestion/Decontamination Kit**. För noggranna anvisningar om dekontaminering och odling hänvisas till lämplig litteratur.^{10, 16-18}

Efter inokulering ska testbehållarna skyddas mot ljus och placeras i ett lämpligt system med aerob atmosfär som är berikad med koldioxid. Inkubera ympade skivor och flaskor vid 35 ± 2 °C.

Medier i skivor och flaskor ska inkuberas horisontellt tills inokulatet absorberats. Rör och flaskor ska alltid ha löst påskruvat lock de första 3 veckorna så att koldioxid kan cirkulera och tillväxten starta. Dra sedan åt locket för att förhindra dehydrering. Lossa kortvarigt en gång i veckan. Ställ rören upprätt om detta krävs av utrymmeskäl.

OBS! Odlingar från hudlesioner som misstänks vara orsakade av *M. marinum* eller *M. ulcerans* måste inkuberas vid 25 to 33 °C för primärisolering, medan kulturer som misstänks innehålla *M. avium* eller *M. xenopi* uppvisar optimal växt vid 40 till 42 °C.¹⁰ Inkubera en extra odling vid 35 till 37 °C.

Det rekommenderade förfarandet för semikvantitativ katalastest med hjälp av agarfördjupningar av Lowenstein-Jensen Medium är följande:¹⁰

1. Ympa ytan av mediet med antingen 0,1 mL av en 7-dagars buljongodling eller växt motsvarande en full ögla från en aktivt växande skiva av varje teststam. Ympa även rör med en kraftigt katalasbildande odling, t.ex. *M. kansasii*, och en svag enzymstam, t.ex. *M. intracellulare*, som kontroller.
2. Inkubera med löst påsatt lock vid 35 ± 2 °C i 2 veckor.
3. Bered en blandning av polysorbat 80-peroxid genom att tillsätta lika delar av:
 - a. En autoklaverad 10-procentig lösning av polysorbat 80 i destillerat vatten eller en spädning av 1 mL steril polysorbat 80 i 9 mL destillerat vatten.
 - b. Väteperoxid (30 %).
4. Tillsätt 1 mL av polysorbat 80-peroxid-blandningen till varje odling. Mät höjden i mm på bubblpelaren efter 5 min.

Nedanstående förfarande rekommenderas för toleranstestet för natriumklorid:^{10,17}

1. Gör en suspension av en aktivt växande fortsatt odling i Middlebrook 7H9-buljong med grumlighet motsvarande McFarland-standard nr. 1.
2. Ympa 0,1 mL av den standardiserade odlingen på en skiva Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride. Ympa på samma sätt en skiva av mediet utan NaCl som tillväxtkontrollrör.
3. Inkubera med löst påsatt lock i CO₂-berikad atmosfär, i början i ett plant ställ i 1 vecka vid 28 till 30 °C för snabbväxare eller 35 ± 2 °C för långsamma växare.
4. Undersök tillväxten varje vecka. Fortsätt inkuberingen i ytterligare tre veckor vid behov.

Kvalitetskontroll utförd av användaren

Se "Kvalitetskontroll".

Varje sats av media har testats med lämpliga kvalitetskontrollorganismer, och denna testning uppfyller produktspecifikationerna och CLSI-standarderna, där detta är relevant. Som alltid måste kvalitetskontroll utföras i enlighet med gällande lokala, statliga, regionala eller nationella bestämmelser eller ackrediteringskrav och/eller laboratoriets fastställda rutiner för kvalitetskontroll.

X RESULTAT

Odlingar ska läsas av inom 5 till 7 dagar efter ympning och en gång i veckan därefter i upp till 8 veckor.

Anteckna observationer:

1. Antal dagar som krävts för att kolonierna ska bli makroskopiskt synliga. Snabbväxare har mogna kolonier inom 7 dagar. Långsamma växare behöver mer än 7 dagar för att bilda mogna kolonier.
2. Pigmentbildning
Vit, krämfärg eller mattgul = icke-kromogen (NC)
Citron, gul, orange, röd = kromogen (Ch)

Färgade utstryk kan visa syrafasta bakterier, vilka rapporteras endast som "syrafasta bakterier", såvida inte definitiva tester utförs.

Flaskor kan undersökas genom att flaskorna vänds uppochner på stativet till ett dissektionsmikroskop. Läs av vid 10–60x med transmitterat ljus. Skanna snabbt vid 10–20x med avseende på förekomst av kolonier. Högre förstoring (30–60x) underlättar vid observation av kolonimorfologi, dvs. kolonier med spiralformade strängar.

I det semikvantitativa katalastestet delas de flesta mykobakterier upp i två grupper.^{8,10,16}

1. Bubblpelaren överstiger 45 mm i höjd.
M. chelonae
M. fortuitum
M. gordonae
M. kansasii (kliniskt signifikant)
M. scrofulaceum
2. Bubblpelaren understiger 45 mm i höjd.
M. avium
M. bovis
M. gastri
M. haemophilum

M. intracellulare
M. kansasii (kliniskt signifikant)
M. malmoense
M. marinum
M. tuberculosis
M. xenopi

Förekomst eller frånvaro av växt i röret med medium som innehåller 5 % NaCl underlättar differentiering av mykobakteriella isolat. Salttoleranstestet är positivt när flera kolonier syns på kontrollmediet och över 50 kolonier växer på mediet som innehåller 5 % NaCl.^{10,17} Om kolonier förekommer på kontrollmediet men det inte finns någon synlig tillväxt på testmediet efter totalt 4 veckors inkubation anses det som ett negativt test.^{10,16,17}

XI METODENS BEGRÄNSNINGAR

För identifiering måste organismer vara i renkultur. Morfologiska, biokemiska och/eller serologiska tester bör utföras för fullständig identifiering. Se lämplig litteratur för noggrann information och rekommenderade förfaranden.^{15,16,19}

XII KLINISKA PRESTANDA

Lowenstein-Jensen Medium

I en studie av Palaci et al. inokulerades 85 prover från luftvägarna på Lowenstein-Jensen-skivor (LJ) och i BBL MGIT-rör med vanligt förfarande. Tjugofem (25) prover befanns vara positiva för *M. tuberculosis*. Odlingssensitiviteten för såväl LJ som MGIT var 96,1 % (25 av 26 positiva odlingar). Trots att tiden till detektion var betydligt kortare i MGIT-rören fanns ingen signifikant skillnad i detektionssensitiviteten för *M. tuberculosis* mellan de båda metoderna.²⁰

Lowenstein-Jensen Medium Deeps

Samtliga partier Lowenstein-Jensen Medium Deeps testas med avseende på specifika produkttegenskaper innan de släpps för försäljning. Prover testas med *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. scrofulaceum* ATCC 19981 och *M. tuberculosis* ATCC 25177 genom ympning med 0,2 mL Middlebrook 7H9-buljongssuspensioner. Rör inkuberas med löst sittande lock i upp till 3 veckor vid 35–37 °C. En blandning av polysorbat 80-peroxid bereds och 1 mL tillsätts till varje odling. Efter 5 min antecknas höjden i mm på bubblpelaren. En positiv katalasreaktion är en bubblpelare som överstiger 45 mm i höjd. En negativ reaktion är en bubblpelare som understiger 45 mm i höjd. En positiv katalasreaktion iakttas med *M. fortuitum*, *M. kansasii* och *M. scrofulaceum*. En negativ katalasreaktion observeras med *M. intracellulare* och *M. tuberculosis*.

Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride

Samtliga partier Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride testas med avseende på specifika produkttegenskaper innan de släpps för försäljning. Prover testas med cellsuspensioner av *M. fortuitum* ATCC 6841 och *M. kansasii* ATCC 12478 spädda i BBL Middlebrook 7H9-buljong så att 10³ till 10⁴ CFU erhålls. Rör inkuberas med löst sittande lock vid 35–37 °C i 7 till 14 dagar i en CO₂-berikad atmosfär. Måttlig till kraftig växt iakttas med *M. fortuitum*. *M. kansasii* hämmas.

XIII TILLGÄNGLIGHET

Kat. nr.	Beskrivning
221116	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Mycoflask, kartong med 100 flaskor
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, förpackning med 10 rör i storlek A
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, kartong med 100 rör i storlek A

XIV REFERENSER

1. Lowenstein, E. 1931. Die Zachtung der Tuberkelbazillen aus dem strömenden Blute. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung I. Original. 120:127.
2. Lowenstein, E. 1933. Der kulturelle Nachweis von Tuberkelbazillen in Milch auf Malachitgrün-Einährboden. Ann. Inst. Pasteur. 50:161.
3. Sonnenschein. 1930. Dtsch. tierärztliche Wochenschrift. 38:115.
4. Hohn, J. 1931. Der Z-Einährboden zur Kultur des Tuberkelbazillus. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung I. Original. 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. Rinzucht und Typenbestimmung von Tuberkelbazillensammlungen. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Infektionskrankheiten. Hygiene. Abteilung I. Original. 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. Tenover, M.A. Tenover, 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 teknisk service: Kontakta närmaste BD-representant eller besök 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