

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'İN ANTİTÜBERKÜLOZ İLAÇLARA DUYARLILIĞINI SAPTAMADA LÖWENSTEIN-JENSEN BESİYERİNİN ETKİNLİĞİNİN, MIDDLEBROOK 7H10 BESİYERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK MODİFİYE PROPORSİYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF LOWENSTEIN-JENSEN MEDIUM FOR SENSITIVITY TESTING OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TO ANTITUBERCULOSIS DRUGS COMPARING WITH MIDDLEBROOK 7H10 MEDIUM BY MODIFIED PROPORTION METHOD

*Hakan ÖZTÜRKERİ**

ÖZET: Mycobacterium tuberculosis'in antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını saptamada ülkemizde yaygın olarak kullanılan fakat etkinliği ve standardizasyonu konusunda soru işaretleri bulunan Löwenstein-Jensen (LJ) besiyeri, standart ve önerilen bir besiyeri olan Middlebrook 7H10 besiyeriyle, modifiye proporsiyon yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Erlich-Ziehl-Neelsen boyama yöntemiyle aside dirençli basilli pozitif olarak saptanan 47 hastanın balgam örneği; streptomisin, rifampin, izoniazid ve ethambutol olmak üzere toplam dört antibiyotik altı farklı konsantrasyonu kullanılarak direk antibiyotik duyarlılık testiyle çalışılmıştır. Yapılan karşılaştırmalı antibiyotik duyarlılık testinde; rifampin, izoniazidin iki farklı konsantrasyonu ve ethambutolün yüksek konsantrasyonunda LJ ile Middlebrook 7H10 arasında mükemmel bir uyum saptanmıştır. Streptomisin duyarlılık testinde iki ve ethambutolün düşük konsantrasyon duyarlılık testinde ise bir suş Middlebrook 7H10 besiyeriyle duyarlı LJ besiyeri ile dirençli saptanmıştır. Middlebrook 7H10'da dirençli olup, LJ'de duyarlı olan herhangi bir suş görülmemiştir. Sonuç olarak her iki besiyeri arasında % 98.9'luk bir uyum saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Mycobacterium tuberculosis, antibiyotik duyarlılık testi, Löwenstein-Jensen, Middlebrook 7H10.

SUMMARY: Lowenstein-Jensen (LJ) medium is commonly used in our country to evaluate the sensitivity of Mycobacterium tuberculosis to chemotherapeutic drugs but the efficiency and the standardization of which is doubtful. In this study, LJ medium was compared with a standart and a recommended medium -Middlebrook

* GATA Çamlıca Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

7H10 agar- by using modified proportion method. Fourty-seven sputum specimens taken from tuberculosis patients, which were acid fast bacilli positive with Erlich-Ziehl-Neelsen staining method, were tested against six different concentrations of a total of four antibiotics -streptomycin, rifampin, isoniazid and ethambutol- by direct antibiotic susceptibility test. In the comparatively evaluated antibiotic susceptibility test; the effects of rifampin (5.0 mg), isoniazid (1.0 and 5.0 mg) and ethambutol (50.0 mg) showed excellent correlation both in LJ and Middlebrook 7H10 media. For streptomycin (10.0 mg), two strains and for ethambutol (25.0 mg), one strain were found susceptible in Middlebrook 7H10 agar but resistant in LJ medium. None of the isolates were found resistant in Middlebrook 7H10 agar and susceptible in LJ medium. The correlation rate between the two media was found 98.9 percent. As a result it is concluded that LJ medium can be used for antituberculosis drug sensitivity testing especially in countries with low economical efforts.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, antibiotic susceptibility test, Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10.

GİRİŞ

1800' lerin başında Avrupa ve Amerika'da epidemik bir hastalık olan ve yıllık mortalite oranı bazı toplumlarda %1'e ulaşan tüberkülozun insidansı, yaşam koşullarının düzelmesiyle azalmaya başlamıştır. 1950'lerde anti-tüberküloz tedavinin kullanılmaya başlaması ve ucuz görüntüleme testlerinin geliştirilmesi tüberkülozun eradike edilebileceği umudunu vermesine rağmen bugün için özellikle gelişmekte olan ülkelerde ölümün en büyük nedeni olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir¹. Dolayısıyla tüberkülozun hızlı tanısı ve uygun tedavisi büyük önem taşımaktadır.

Tüberkülozda antibiyotik duyarlılık testleri, hem yöntemlerin uygulama şekli açısından hem de sonuçların yorumlanması sırasında, farklı laboratuvarlar arasında büyük değişiklikler göstermektedir. Güvenilir bir duyarlılık testi yöntemi, duyarlı veya dirençli olarak, minimum düzeyde hatalı sonuç vermelidir².

Bu çalışmada, Mycobacterium tuberculosis'in çeşitli antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını saptamak için ülkemizde yaygın olarak kullanılan fakat etkinliği ve standardizasyonu tam olarak bilinmeyen Löwenstein-Jensen (LJ) besiyerinin, önerilen standart bir besiyeri olan Middlebrook 7H10 (7H10) besiyeriyle, modifiye proporsiyon yöntemi kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada GATA Çamlica Göğüs Hastalıkları Hastanesi tüberküloz laboratuvarına gönderilen ve Erlich-Ziehl-Neelsen (EZN) boyama yöntemi ile aside dirençli basil (ARB) pozitif olarak saptanan 56 hastaya ait balgam örneği direk antibiyotik duyarlılık testiyle ve modifiye proporsiyon yöntemi ile yumurta bazlı LJ ve agar bazlı 7H10 besiyerlerinde çalışılmıştır.

Akciğer tüberkülozlu hastalardan sabah alınan ilk balgam örneği N-Asetil-L-Sistein sodyum hidroksit yöntemiyle oda sıcaklığında 15 dakika süreyle homojenize ve dekontamine edildikten sonra 2400 g'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatant döküldükten sonra sediment % 0.2' lik "bovin albümin fraksiyon V" ile tamponlanarak, hazırlanan yayma EZN boyasıyla boyanmış ve balgam örneğindeki basil sayısı kantitatif olarak belirlenmiştir. Tüm yaymada 1-2 ARB veya hiç ARB görülmeyen balgam örnekleri çalışmaya alınmamış olup; yayma sonucu 1+ ile 4+ arasında olan örneklerle çalışılmıştır (100x objektifte, total büyütme 1.000x, her 100 mikroskop sahasında 1-9 ARB görülürse 1+; her 10 mikroskop sahasında 1-9 ARB görülürse 2+; her sahada 1-9 ARB görülürse 3+; her sahada 9'dan fazla ARB görülürse 4+)^{3,4}.

Yaymanın yapılan mikroskopik incelemesinde her mikroskop sahasındaki basil sayısına göre sediment steril distile suyla iki farklı dilüsyonda şu şekilde sulandırılarak besiyelerine ekilmiştir⁵: Her sahada <1 ARB görülmüşse direk olarak ve 1/100, her sahada 1-10 ARB görülmüşse 1/10 ve 1/100, her sahada >10 ARB görülmüşse 1/100 ve 1/1.000.

Antibiyotik duyarlılık testinin 7H10 besiyeriyle hazırlanması: Farklı renklere boyalı 6.35 mm çapında Whatman 17 numara kağıt disklerle emdirilen 6 farklı konsantrasyonda antibiyotik (ethambutol 25.0 ve 50.0 µg, izoniazid 1.0 ve 5.0 µg, streptomisin 10.0 µg, rifampin 5.0 µg) içeren diskler iki adet 4 kadranlı Falcon plastik petri kutusunun her bir kadrannın ortasına konulmuş, antibiyotik diski konmayan iki kadrana ise inokulum kontrol olarak kullanılmıştır. Daha sonra her bir kadrana oleik asit-albumin-dekstroz-katalaz (OADC) ile suplemante edilmiş 5 ml Middlebrook 7H10 agar dökülmüştür.^{5,6}

Antibiyotik duyarlılık testinin LJ besiyeriyle hazırlanması: Besiyerindeki son ilaç konsantrasyonu ethambutol için 2.0 ve 6.0 µg/ml, izoniazid için 0.2 ve 1.0 µg/ml, streptomisin için 4 µg/ml ve rifampin için 40.0 µg/ml olacak şekilde sulandırmış ve LJ besiyelerine karıştırılarak, 16x160 mm ebatlarındaki tüplere dökülmüştür⁷.

Çalışmada her bir balgam örneğinin her bir dilüsyonu için toplam 4 antibiyotiğin 6 farklı konsantrasyonu ile iki antibiyotiksiz kontrol besiyeri olmak üzere; Middlebrook 7H10'da 8 kadrana yani iki Falcon petri kutusu besiyeri, LJ'de ise 8 tüp besiyeri inoküle edilmiştir. Her iki besiyerinde kullanılan antibiyotiklerin eşdeğer son ilaç konsantrasyonları Tablo 1'de görülmektedir.

Balgam örneğindeki basil sayısına göre sulandırılıp hazırlanan dilüsyonlar ayrı ayrı 7H10 ve LJ besiyelerine, her bir Falcon petri kutusu kadrannına ve her bir tüp besiyerine, ikişer damla (100 µl)' lik inokulumlar halinde pastör pipeti yardımıyla ekilmiştir. Ayrıca bir kanlı agar besiyeri inokulumun saf olup olmadığını kontrol etmek için kullanılmıştır. Ekilen besiyerleri inokulumun besiyerine absorbe olması için yaklaşık 1 saat süreyle besiyeri yüzleri aşağıya gelecek şekilde bekletilmiştir. Tüm besiyerleri yüksek düzeyde CO₂ geçirgen polietilen torbalara konarak, % 5-10 CO₂'li ortam sağlayan kavanozlarda 35°C'de 4 hafta süreyle inkübe edilmişlerdir ^{8,9}.

Tablo I: Middlebrook 7H10 ve LJ Besiyerlerindeki Eşdeğer Son İlaç Konsantrasyonları

Antibiyotik	Konsantrasyon (µg/ml besiyeri)	
	7H10	LJ
Streptomisin	2.0	4.0
Rifampin	1.0	40.0
İzoniazid	0.2	0.2
	1.0	1.0
Ethambutol	5.0	2.0
	10.0	6.0

İnkübasyonun 4. haftasında antibiyotik içeren besiyerlerindeki koloni sayısı, antibiyotiksiz kontrol besiyerlerindeki koloni sayısına oranlanarak, direnç yüzde olarak ifade edilmiştir. Antibiyotikli besiyerinde kontrol besiyerlerindeki koloni sayısının % 1'inden daha az sayıda koloni varsa mikroorganizma o antibiyotik konsantrasyonuna duyarlı, % 1'i veya daha fazla sayıda koloni varsa o antibiyotik konsantrasyonuna dirençli olarak kabul edilmiştir^{5,10}.

Kontrol besiyerlerinde 50'den az koloni sayılan balgam örnekleri çalışmadan çıkarılmıştır. Kontrol besiyerlerindeki aşırı üremeden dolayı alttaki besiyerinin görülemediği durumlarda; mikroorganizma tüm antibiyotiklere duyarlı ise sonuç kabul edilmiş, fakat herhangi bir antibiyotiğe direnç sözkonusu ise test geçersiz olarak kabul edilmiştir⁵.

Çalışmada kontrol suşu olarak M.tuberculosis ATCC 27294 kullanılmış olup, bu suşun çalışılan antibiyotiklere duyarlı olduğu kontrol edilmiştir⁵. Mikobakteriler aside dayanıklı boyanmaları, üreme hızı, koloni morfolojisi, pigment oluşturma ve biyokimyasal özelliklerine (nitrat redüksiyon testi) göre idantifiye edilmişlerdir¹¹.

SONUÇLAR

Antibiyotik duyarlılığı test edilen 56 balgam örneğinden; 5'i kontrol besiyerlerinde yetersiz üreme olduğundan, 3'ü aşırı üremeden ve 1'i kontaminasyondan dolayı çalışmadan çıkarılmış olup, toplam 47 balgam örneğinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Yetersiz üreyen 5 balgam örneği yayması 1+ olarak yorumlanan, aşırı üreme olan 3 örnek ise yayması 4+ olarak yorumlanan örnekler aitti. Değerlendirmeye alınan 47 örneğin ARB yayma sonuçları; 4'ü (++++), 17'si (+++), 18'i (++) ve 8'i (+) şeklindedir. Antibiyogram sonrası üreyen 47 suş M.tuberculosis olarak idantifiye edilmiştir.

Tablo II'de streptomisin ve rifampin, Tablo III'de izoniazidin iki farklı konsantrasyonu ve Tablo IV'de ethambutolün iki farklı konsantrasyonu ile karşılaştırmalı olarak yapılan antibiyotik duyarlılık testinde, duyarlı ve dirençli olarak belirlenen izolatların dağılımı görülmektedir.

Tablo II: Streptomisin ve Rifampin İçin İki Farklı Besiyeri ile Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

Referans Besiyeri	Karşılaştırılan Besiyeri			
	LJ'de SM (4.0 µg/ml)		LJ'de RMP (40.0 µg/ml)	
	Du (37)	Dir (10)	Du (45)	Dir (2)
<u>7H10'da SM (2.0 µg/ml)</u>				
Du (39)	37	2		
Dir (8)	0	8		
<u>7H10'da RMP (1.0 µg/ml)</u>				
Du (45)			45	0
Dir (2)			0	2

* Du, duyarlı; Dir, dirençli; SM, streptomisin; RMP, rifampin.

Tablo III: İki Farklı Besiyeri ile Elde Edilen, İzoniazidin İki Farklı Konsantrasyonuna İlişkin, Sonuçların Karşılaştırılması

Referans Besiyeri	Karşılaştırılan Besiyeri			
	LJ'de INH (0.2 µg/ml)		LJ'de INH (1.0 µg/ml)	
	Du (40)	Dir (7)	Du (42)	Dir (5)
<u>7H10'da INH (2.0 µg/ml)</u>				
Du (40)	40	0		
Dir (7)	0	7		
<u>7H10'da INH (1.0 µg/ml)</u>				
Du (42)			42	0
Dir (5)			0	5

* Du, duyarlı; Dir, dirençli; INH, izoniazid.

Tablo IV: İki Farklı Besiyeri ile Elde Edilen, Ethambutolün İki Farklı Konsantrasyonuna İlişkin Sonuçların Karşılaştırılması

Referans Besiyeri	Karşılaştırılan Besiyeri			
	LJ'de EMB (2.0 µg/ml)		LJ'de EMB (6.0 µg/ml)	
	Du (42)	Dir (5)	Du (47)	Dir (0)
<u>7H10'da EMB (5.0 µg/ml)</u>				
Du (43)	42	1		
Dir (4)	0	4		
<u>7H10'da EMB (10.0 µg/ml)</u>				
Du (47)			47	0
Dir (0)			0	0

* Du, duyarlı; Dir, dirençli; EMB, ethambutol.

T A R T I Ş M A

Tüberküloz basilinin kemoterapötik ilaçlara duyarlılığını saptamada kullanılan laboratuvar testleri üç amaca hizmet eder. Birincisi hastaya verilecek ilk kemoterapötik kombinasyonunun seçiminde yardımcı olması, ikincisi hasta tedaviye yeterli bir bakteriyolojik cevap veremediğinde ilaç direnci oluştuğunun doğrulanması ve buna bağlı olarak farklı ilaç tedavisi rejimlerinin seçimi ve son olarak da toplumdaki primer ve edinilmiş ilaç direnci prevalansının belirlenmesidir. Bu nedenlerden dolayı antibiyotik duyarlılık testini yaparken güvenilir bir teknik kullanmanın önemi büyüktür².

Antitüberküloz ilaçların kritik konsantrasyonları, tüberküloz kemoterapisini görüntülemeye, M.tuberculosis izolatlarının invitro duyarlılık testi için kriter olarak kullanılmaktadır. Her ilaç için saptanan bu kritik konsantrasyonlar; farklı konsantrasyonların invitro inhibe edici aktiviteleri ve hastaların kemoterapiye cevapları arasındaki ilişki temeline dayanarak geliştirilmişlerdir. Bu modelde hastadan izole edilen suş, test edilen antibiyotiklerin kritik konsantrasyonuna duyarlı ise hastanın kemoterapiye cevap vereceği düşünülmüştür. Farklı besiyerlerindeki kritik konsantrasyon değerlerinin farklılığı; bazı besiyeri içeriklerine farklı absorpsiyon ve bağlanma, besiyeri hazırlanması esnasında ilacın inaktivasyonu ve inkübasyonun farklı evreleri esnasında ilacın etkisinin azalması gibi nedenlere bağlıdır¹².

M.tuberculosis'in antibiyotik duyarlılığını saptamada OADC eklenerek hazırlanan Middlebrook 7H10 agar, 7H11 agar ve 7H12 buyyonu (radyometrik teknik) ile yumurta bazlı LJ besiyerleri kullanılmaktadır. 7H10 agar besiyeri basit bileşimi ve hazırlama kolaylığı nedeniyle tercih edilmektedir. M.tuberculosis'in bazı dirençli suşları 7H11 agarda daha iyi üreyebilmektedir. Fakat NCCLS'in 7H10 agar kullanımına dayalı standart bir modifiye proporsiyon yöntemi yerleştirmeye yönelik çabalarından dolayı 7H11 besiyerinin rutin kullanımından kaçınılmalıdır¹³.

Yumurta bazlı besiyerlerinin, agar bazlı besiyerleriyle kıyaslandığında dezavantajı, duyarlılık testi için doğru ve uygun ilaç konsantrasyonları sağlayamamasıdır. Antibiyotikleri bağlayan yüksek moleküler ağırlıklı yumurta proteinlerinin varlığının yanısıra, ısı ile yapılan solidifikasyon da bazı antitüberküloz ilaçları inaktive etmektedir⁸.

Çalışmamızdaki sonuçlar incelendiğinde, 7H10 ve LJ besiyerleriyle yapılan karşılaştırmalı antibiyotik duyarlılık testinde, rifampin, izoniazidin iki farklı konsantrasyonu ve ethambutolün yüksek konsantrasyonlarında her iki yöntem arasında mükemmel bir uyum olduğu, duyarlı ve dirençli olarak belirlenen izolatların birbirlerine paralel sonuçlar verdiği görülecektir.

7H10 agar besiyeriyle yapılan streptomisin duyarlılık testinde, toplam 47 izolatın 39'u duyarlı, 8'i ise dirençli olarak saptanmış olup, duyarlı 39 izolatın 2'si LJ besiyeriyle yapılan antibiyotik duyarlılık testinde dirençli olarak görülmüştür. Bu iki izolat 7H10 agar besiyeriyle tamamen duyarlı iken, LJ besiyerinde % 2 ve % 5 oranında direnç göstermişlerdir. Yine 7H10 agar besiyeriyle yapılan

ethambutolün düşük konsantrasyonuna ilişkin antibiyotik duyarlılık testinde, 47 izolatın 43'ü duyarlı, 4'ü ise dirençli bulunmuş olup, duyarlı 43 izolatın 1'i LJ besiyeriyle yapılan antibiyotik duyarlılık testinde dirençli olarak görülmüştür. Bu izolat 7H10 agar besiyeriyle % 1'den daha az oranda direnç gösterirken, LJ besiyerinde % 2 oranında direnç göstermiştir. 7H10 agar besiyeriyle duyarlı, LJ besiyeriyle dirençli olarak saptanan izolat sayısı 3 olup, aralarında belirgin bir direnç yüzdesi farkı görülmemiştir. 7H10 besiyeriyle dirençli, LJ besiyeriyle duyarlı olan herhangi bir suşa ise rastlanmamıştır.

1985 yılında Sıddıqı ve arkadaşları¹⁴ tarafından yapılan çalışmada; Bactec, 7H10 ve LJ besiyerleri kullanılarak üç farklı antibiyotik duyarlılık testi karşılaştırılmış ve uyumsuzlukların çoğunun streptomisin ve ethambutolde görüldüğü, ayrıca ethambutol sonuçlarındaki farklılıkların özellikle düşük antibiyotik konsantrasyonlarında sorun olduğu bildirilmiştir. Fakat bu çalışmadaki örnekler, bizim çalışmamızda olduğu gibi randomize olarak değil, 219 adet dirençli ve duyarlı suş seçilerek yapılmıştır. Bizim çalışmamızda da 7H10'da duyarlı, LJ'de dirençli 3 suşun 2'si streptomisinde, 1'i ise ethambutolün düşük konsantrasyonunda belirlenmiştir. Bu araştırmacılar, 7H10'da dirençli olup LJ'de duyarlı olan suşlar bildirmelerine karşın, bizim çalışmamızda saptanmamıştır. Yazarlar LJ ve 7H10 besiyerlerinin karşılaştırılmasıyla duyarlılık ve özgüllük değerleri olarak sırasıyla streptomisinde %95 ve %92, rifampinde %95 ve %99, izoniazidin düşük konsantrasyonunda %94 ve %98, etambutolün düşük konsantrasyonunda %69 ve %97 oranlarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise LJ besiyerinin duyarlılığı streptomisin için %94.8 ve ethambutolün düşük konsantrasyonu için %97.6 olarak bulunurken, test edilen diğer tüm antibiyotiklerde duyarlılık ve özgüllük değerleri %100 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, 47 M. tuberculosis suşunun 6 farklı antibiyotik konsantrasyonuna karşı test edilmesiyle yapılan antibiyotik duyarlılık testinde toplam olarak 282 adet antibiyotik duyarlılığı çalışılmış olup, bunların 279 (% 98.9)'unda LJ ile 7H10 besiyerleri arasında mükemmel bir uyum saptanmıştır. Üç suş ise 7H10 agarda duyarlı, LJ'de dirençli olarak saptanmıştır. Dolayısıyla, M. tuberculosis'in antitüberküloz ilaçlara duyarlılığını saptamada LJ besiyerinin kullanımı, klasik mikrobiyoloji kitaplarında önerilen 7H10 besiyeri ile kıyaslandığında, % 98.9 oranında doğru ve güvenilir sonuç vermiştir. Ayrıca yumurta bazlı LJ besiyeri, OADC ile zenginleştirilmiş 7H10 besiyeriyle kıyaslanamayacak düzeyde düşük maliyetli olup, tüberkülozun oldukça yaygın olduğu ülkemiz için ekonomik bir duyarlılık testi besiyeridir. LJ besiyeriyle hatalı olarak duyarlı saptanan suş bulunmaması nedeniyle hastaların tedavisine olumsuz etki edecek veya tedavi başarısızlıklarına yol açacak bir durum söz konusu olmayacaktır. Fakat bu araştırmada çalışılan dirençli suş sayısı düşük olduğundan dolayı, bu çalışmanın dirençli suş sayısı daha yüksek benzeri

çalışmalarla desteklenmesi uygun olacaktır. %1.1 oranında saptanan hatalı dirençlilik ise, hatalı olarak dirençli saptanan antibiyotikler yerine alternatif antibiyotiklerin kullanımını gündeme getirecektir.

Ülkemiz için antitüberküloz ilaçlara direnç profilini daha sağlıklı belirleyebilmek için yaygın olarak kullanılan LJ besiyeriyle çalışmaya güvenle devam edilebilir. Fakat radyometrik yöntem, agar bazlı besiyerleri ve yumurta bazlı LJ besiyeri arasındaki eşdeğer son ilaç konsantrasyonlarına uyularak bir standartın getirilmesi ve duyarlılık testi yapan kurumların mümkünse altın standart olarak tanımlanan modifiye proporsiyon yöntemi ile çalışmalarını uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Salyers AA, Whitt DD: Tuberculosis, pp: 307-321. In: Bacterial Pathogenesis. 1994, Amer Soc Microb, Washington DC.
2. Canetti G, Froman S, Grosset J, et al: Mycobacteria; laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull Wld Hlth Org 1963, 29: 565-78.
3. Isenberg HD: Digestion-decontamination procedures, pp: 3.4.1-3.4.14. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook 1992, Amer Soc Microb, Washington DC.
4. Howard BJ, Damato JJ: Mycobacteria, pp: 479-502. In: Howard BJ (Ed), Clinical and Pathogenic Microbiology. 1987, The CV Mosby Co, St. Louis.
5. Isenberg HD: Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria, pp: 5.13.1.-5.13.15. Clinical Microbiology Procedures Handbook 1992, Amer Soc Microb, Washington DC.
6. Hawkins JE, Wallace RJ, Brown BA: Antibacterial susceptibility tests; mycobacteria, pp: 1138-1152. In: Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 1991, 5th ed. Amer Soc Microb, Washington DC.
7. Isenberg HD: Radiometric (Bactec) tests for slowly growing mycobacteria, pp: 5.14.1.-5.14.25. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook 1992, Amer Soc Microb, Washington DC.
8. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium, pp: 304-339. In: Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Eds), Manual of Clinical Microbiology. 1991, 5th ed. Amer Soc Microb, Washington DC.
9. Kent PT, Kubica GP: Public Health Mycobacteriology. 1985, Publication no PB 86-21654, 6: 22-55.
10. American Thoracic Society: Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1990, 142: 725-35.
11. Isenberg HD: Identification of mycobacteria, pp: 3.11.1.-3.11.11. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook 1992, Amer Soc Microb, Washington DC.
12. Lee CN, Heifets LB: Determination of minimal inhibitory concentrations of antituberculosis drugs by radiometric and conventional methods. Am Rev Respir Dis 1987, 136: 349-52.
13. Inderlied CB: Antimycobacterial agents; in vitro susceptibility testing, spectrums of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biological fluids, pp: 134-197. In: Lorian V (ed), Antibiotics in Laboratory Medicine. 1991, 2nd ed. Williams & Wilkins Co, Baltimore MD.
14. Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A: Interlaboratory drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by a radiometric procedure and two conventional methods. J Clin Microbiol 1985, 22: 919-23.