


*In The Name Of God*

Shaheed Beheshti University of
Medical sciences and Health Services

Collaborating Center for Tuberculosis
East Mediterranean Region

Mycobacteriology
Research Center

National Research Institute
Tuberculosis and Lung Disease

Collaborating Center for Tuberculosis
Laboratory IUATLD

# تعیین هویت مایکوباکتریومها به روش کلاسیک

# Classical Identification of Mycobacteria

## Mycobacteriology Research Center (MRC)


**Dr. P. Farnia** — **دکتر پریسا فرنیا**

**Dr. M. Varahram** — **دکتر محمد ورهرام**

**F. Ghadiri Fard** — **فرهاد قدیری فرد**

**Dr. M. R. Masjedi** — **دکتر محمدرضا مسجدی**

**Dr. A. A. Velayati** — **دکتر علی اکبر ولایتی**

| | |
|---|---|
| **عنوان و نام پدیدآور** | تعیین هویت مایکوباکتریوم ها به روش کلاسیک = Classical Identification of Mycobacteria / نویسندگان پریسا فرنیا ... [و دیگران] ؛ [ به سفارش] مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی Mycobacteriology Research Center (MRC) ... [ و دیگران ] . |
| **مشخصات نشر** | : تهران: مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی دکتر مسیح دانشوری، ۱۳۸۹. |
| **مشخصات ظاهری** | : ۸۸ ص. : مصور، جدول، نمودار. |
| **شابک** | ۹۰۰۰۰ ریال: 978-600-5069-05-1 |
| **وضعیت فهرست نویسی** | : فیپا |
| **یادداشت** | : نویسندگان پریسا فرنیا، محمد ورهرام، فرهاد غدیری فرد، محمد رضا مسجدی، علی اکبر ولایتی. |
| **یادداشت** | : کتابنامه. |
| **موضوع** | : مایکوباکتریوم -- دستنامه های آزمایشگاهی |
| **موضوع** | : مایکوباکتریوم -- شناسایی |
| **شناسه افزوده** | : فرنیا، پریسا، ۱۳۴۳ - |
| **شناسه افزوده** | : مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی دکتر مسیح دانشوری |
| **شناسه افزوده** | : مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی |
| **شناسه افزوده** | : Mycobacteriology Research Center |
| **رده بندی کنگره** | : ۱۳۸۹ ۶ ت ۲ م/QR۸۲ |
| **رده بندی دیویی** | : ۵۷۹/۳۷۴ |
| **شماره کتابشناسی ملی** | : ۲۱۶۸۴۹۲ |


**مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشگاه سل و بیماری های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری های ریوی**

**تعیین هویت مایکوباکتریومها به روش کلاسیک**


مولفین: دکتر پریسا فرنیا، دکتر محمد ورهرام، فرهاد غدیری فرد، دکتر محمد رضا مسجدی، دکتر علی اکبر ولایتی

ویراستاری و صفحه آرایی: دکتر محمد ورهرام

طرح روی جلد: دکتر قاسم دانشور

مدیر فنی و ناظر چاپ: فائزه صفرعلی

چاپ اول: پاییز ۱۳۸۹ قیمت: ۹۰۰۰۰ ریال تیراژ: ۱۰۰۰ نسخه

لیتوگرافی، چاپ و صحافی: سازمان چاپ و انتشارات

ISBN: 978-600-5069-05-1

Contence

فهرست


| | | | |
|---|---|---|---|
| *Introduction* | 7 | ۷ | مقدمه |
| *Identification of Mycobacteria* | 11 | ۱۱ | تعیین هویت مایکوباکتریومها |
| *Identification procedures* | 19 | ۱۹ | مراحل تعیین هویت |
| *Slow grower Mycobacterium* | 21 | ۲۱ | مایکوباکتریومهای با رشد آهسته |
| *Rapid grower Mycobacterium* | 31 | ۳۱ | مایکوباکتریومهای سریع الرشد |
| *Niacin Test* | 37 | ۳۳ | تست نیاسین |
| *Nitrate reduction test* | 43 | ۳۹ | احیای نیترات به روش کلاسیک |
| *Catalase Test* | 53 | ۵۱ | فعالیت کاتالاز |
| *Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide (TCH)* | 57 | ۵۵ | تست حساسیت به Thiophen-2-carboxylic Hydrazide |
| *Tween Hydrolysis* | 61 | ۵۹ | تست هیدرولیز تواین ۸۰ |
| *Ureas* | 65 | ۶۳ | تست اوره آز (روش Wayne) |
| *Arylsulfatase test* | 73 | ۶۷ | تست آریل سولفاتاز |
| *Oxygen preference Test* | 79 | ۷۹ | تست ترجیحی اکسیژن |
| *Detection of Pyrazinamidase activit* | 83 | ۸۱ | تست پیرازین آمیداز |
| *References* | 85 | ۸۵ | منابع |

## مقدمه

متدهای که در اینجا آورده شده روشهایی است که برای تشخیص هویت کشت های مثبت در آزمایشگاه رفرانس سل کشوری مورد استفاده قرار می گیرد. روشهای قید شده از روی پروتکل های CDC، ASM و WHO استخراج شده است.

## Introduction

The procedures presented here are those that used at the Centers for Disease Control (CDC), American society of Microbiology (ASM), and world Health Organization (WHO).
They are not the only methods available, but they have proved to be reliable in Iranian National Reference TB Laboratory and in other public health laboratories for the identification of *M. tuberculosis*.

جدول گروه _ غیر کروموژنها
*Non-photochromogen table*

جدول گروه _ فتوکروموژنها
*Photochromogen- table*

جدول گروه _ اسکوتوکروموژنها
*Scotochromogen- table*

جدول گروه _ مایکوباکتریم های سریع الرشد
*Rapid-grower Mycobacterium*

تست نیاسین و احیای نیترات
*Nitrate reduction test, Niacin test, Niacin –test*

تست کاتالاز
*Catalase test*

تست تی. سی. اچ
*TCH test*

تست _ توین هیدرولیز
*Tween –hydrolysis*

تست آریل سولفاتاز
*Arylsulfatase*

تست اوره آز
*Urease test*

تست پیرازین آمید
*Pyrazinamidase test*

تست ترجیعی اکسیژن
*Oxygen preference test*

## تعیین هویت مایکوباکتریومها

غالب مایکوباکتریومهای بیماریزا ممکن است با تعیین دمای مناسب، سرعت رشد، واکنش در برابر تابش نور و ایجاد رنگدانه، آزمایش نیاسین، احیای نیترات و غیره شناخته شوند. به هر حال هرگز نباید برای تعیین هویت به نتیجه یک آزمایش اعتماد کرد، بلکه نتیجه چند آزمایش مختلف باید با هم موافقت داشته باشند.

## سرعت رشد، دمای متوسط، ایجاد رنگدانه

### سرعت رشد

رقت مناسبی از مایکوباکتری مورد مطالعه تهیه کنید. از این رقت بر سطح سه لوله محیط کشت تلقیح و در دمای۳۷ درجه انکوبه کنید. در صورت ظهور کلنی ها در کمتر از ۷ روز مایکوباکتریوم را سریع الرشد و در صورت ظهور کلنی ها در بیش از ۷ روز مایکوباکتریوم را کند رشد می گویند.

### تعیین دمای متوسط

گونه های مختلف مایکوباکتریومهای بیماریزا اختلافاتی از نظر قدرت و سرعت رشد در دماهای مختلف دارند. بعضی در دماهای ۳۰ تا ۳۲ درجه سانتیگراد و گروهی در ۴۲ تا ۴۵ درجه سانتیگراد به خوبی رشد می کنند. باسیل سل در ۳۷ درجه سانتیگراد بهتر رشد می کند.

### واکنش در برابر نور و ایجاد رنگدانه

بعضی از مایکوباکتری ها اگر در محیط عاری از نور رشد کنند پرگنه های بدون رنگدانه ایجاد می کنند، ولی اگر در معرض نور قرار گیرند پرگنه های رنگدانه دار تولید می نمایند. این گونه مایکوباکتریومها را Photochromogenic می گویند. بعضی از مایکوباکتریومها هم در تاریکی و هم در روشنایی پرگنه های رنگین ایجاد می کنند. این مایکوباکتریومها را Scotochromogenic می گویند. بعضی از مایکوباکتریومها خواه در روشنایی و خواه در تاریکی ایجاد پرگنه رنگین نمی کنند. این مایکوباکتریومها را Non-photochromogen می گویند.

Growth rate:

The mycobacterium grouped with slow-growing if it takes more than 7 days of incubation for mature colonies to be visible to the unaided eye. Rapid growers usually mature within 7 days.

Photo induction:

The mycobacteria may be divided into three groups on the basis of pigment production.

Photochromogens:

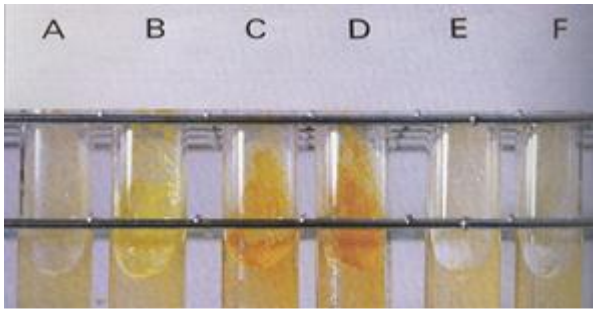
Cultures whose colonies are non-pigmented when grown in the dark, but become pigmented after they are exposed to light for 1 or more hours.

Scotochromogens:

Cultures whose colonies produce pigment when grown either in the dark or the light.

Non-photochromogens:

Cultures whose colonies are non-pigmented or possess only pale shades of pigment and whose color is unaffected by exposure to light.

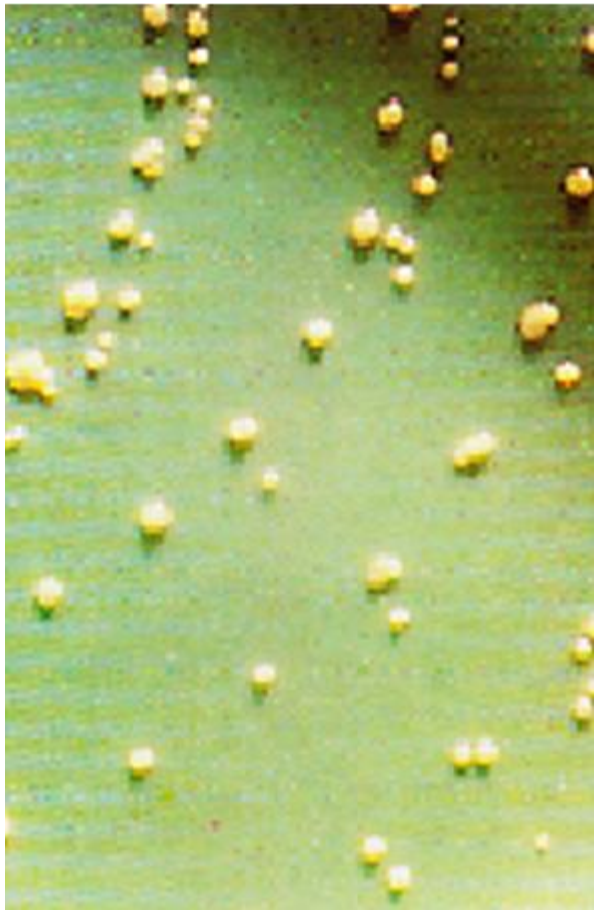



A, B = photochromogen C, D= Scotochromogen E, F = Non-photochromogen

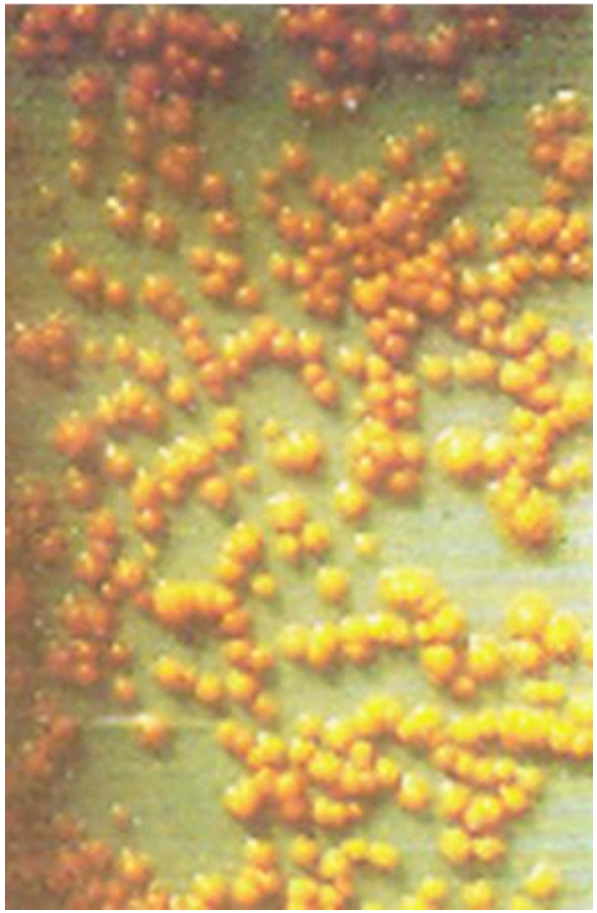
## Photo induction test:

1) Inoculate 3 tubes of agar or egg – base mediun with a suspension of organisms that will yield isolated colonies when grown.
2) Shield 2 tubes from light by wrapping with black paper or aluminum foil.
3) Incubate all tubes at 35-37°C until visible growth is observed on unshield culture.
4) Remove shield from one of the culture tube an record any pigment observed, then exposed to light from a 60 W lamp at a distance of 20-25 cm for 1 hour. Be certain cap of tube is loosened during light exposure.
5) Replace shield (with cap still loose), re incubat culture for 6-12 h or overnight.
6) Take all culture tubes (in light, in dark and in dark and light) and records the pigment production in them.

برای ایجاد رنگدانـه و تعیـین گونـه مایکوباکتریومهـا، رقت مناسبی تهیه و در سطح ۳ لوله محـیط کشـت تلقـیح می گردد. ۲ لوله از این محیطهـا را در غـلاف آلومینیـومی گذاشته و در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. بعد از ظهـور کلنی ها در لوله بـدون غـلاف، یکـی از لولـه هـای دارای غلاف را زیر نور مستقیم (چراغ مطالعه) برای حداقل یـک ساعت گذاشته و سپس لوله محیط کشـت را بـه انکوبـاتور منتقل و بعد از ۲۴ ساعت، در هر ۳ لوله کلنی ها را از نظر رنگدانه بررسی کنید. (لوله در تـاریکی، لولـه در تـاریکی و روشنایی، لوله در روشنایی مطلق)

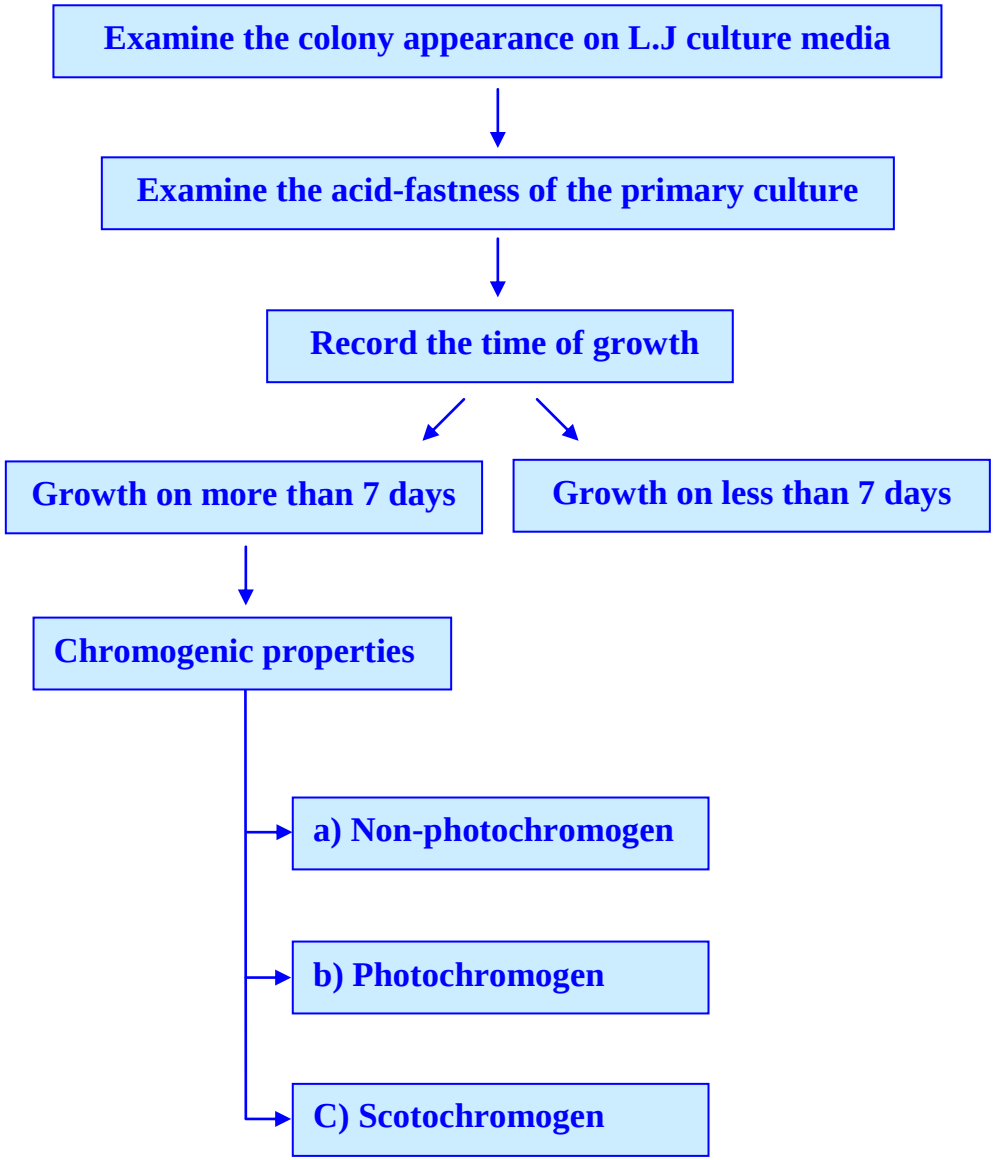


Smooth and non-photochromogenic mycobacterium



Smooth and photo-chromogenic mycobacterium

## Identification procedures



## Slow grower Mycobacterium

### a) Non-photochromogens:

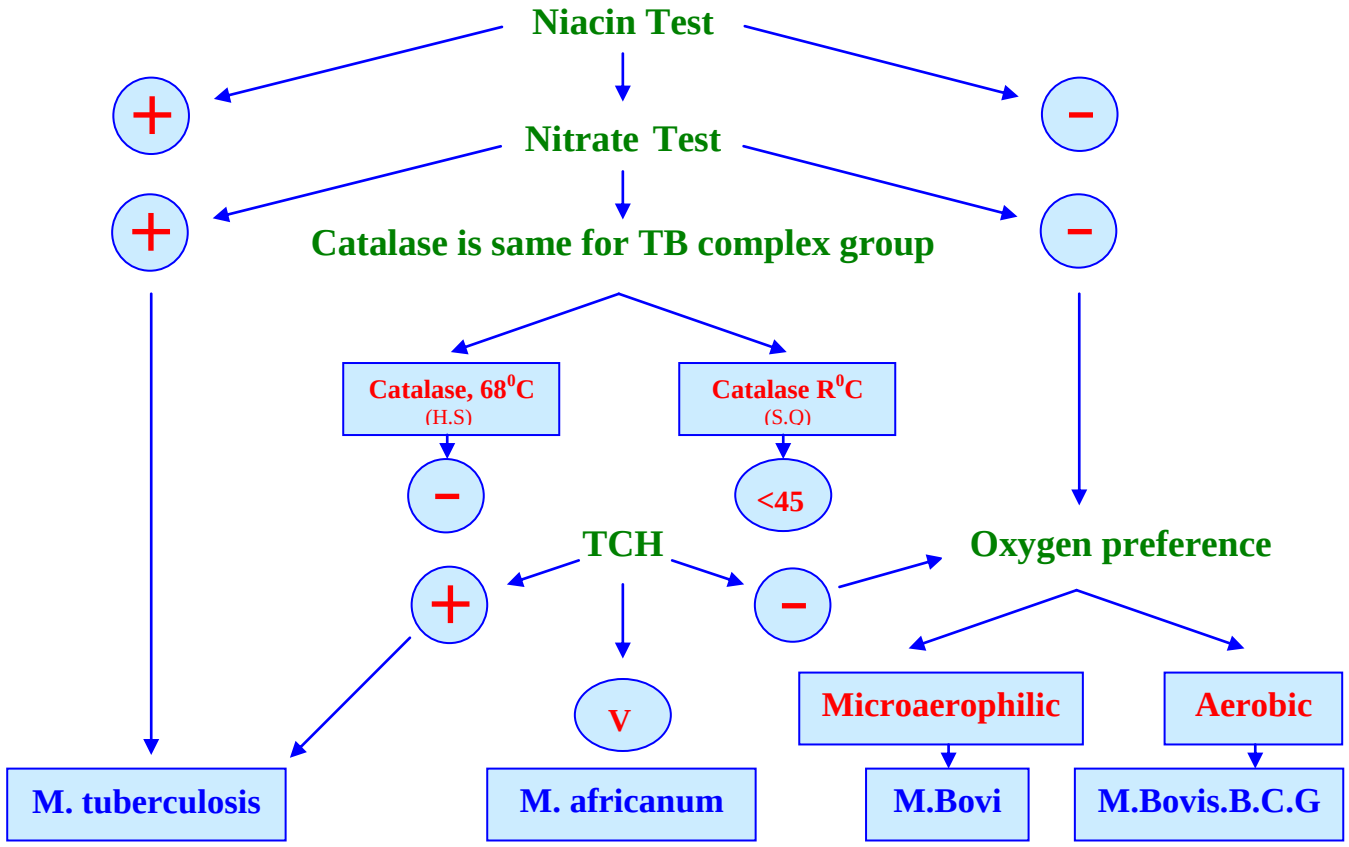
a.1: TB complex
a.2: Non-TB complex

| a.1: TB complex |
| --- |
| M.Tuberculosis |
| M.Bovis |
| M.Bovis.B.C.G |
| M.africanum |
| M.Microti |
| (Murine type of tuberculosis) |

| a.2: Non-TB complex |
| --- |
| M. avium complex |
| M. Xenopi |
| M. gastri |
| M. terrae complex |
| M. malmoense |
| M. triviale |
| M. haemophilum |
| M. shimoidei |

# Slow grower Mycobacterium
## A. Non-photochromogens

| a.1: TB complex | Temp .range |
|---|---|
| M.Tuberculosis. | 33-39 |
| M.Bovis | 35-38 |
| M.Bovis.B.C.G | 35-38 |
| M.africanum | 35-38 |



# Slow grower Mycobacterium
## A. Non-photochromogens

**a.2: Non-TB complex Temp .range**

| | |
|---|---|
| M. avium complex | 22-45 |
| M. Xenopi | 35-45 |
| M. shimoidei | 30-45 |
| M. gastri | 25-40 |
| M. terrae complex | 22-37 |
| M. malmoense | 22-37 |
| M. triviale | 22-37 |
| M. haemophilum | 25-35 |

**Niacin is negative for this group**

**Nitrate Test**

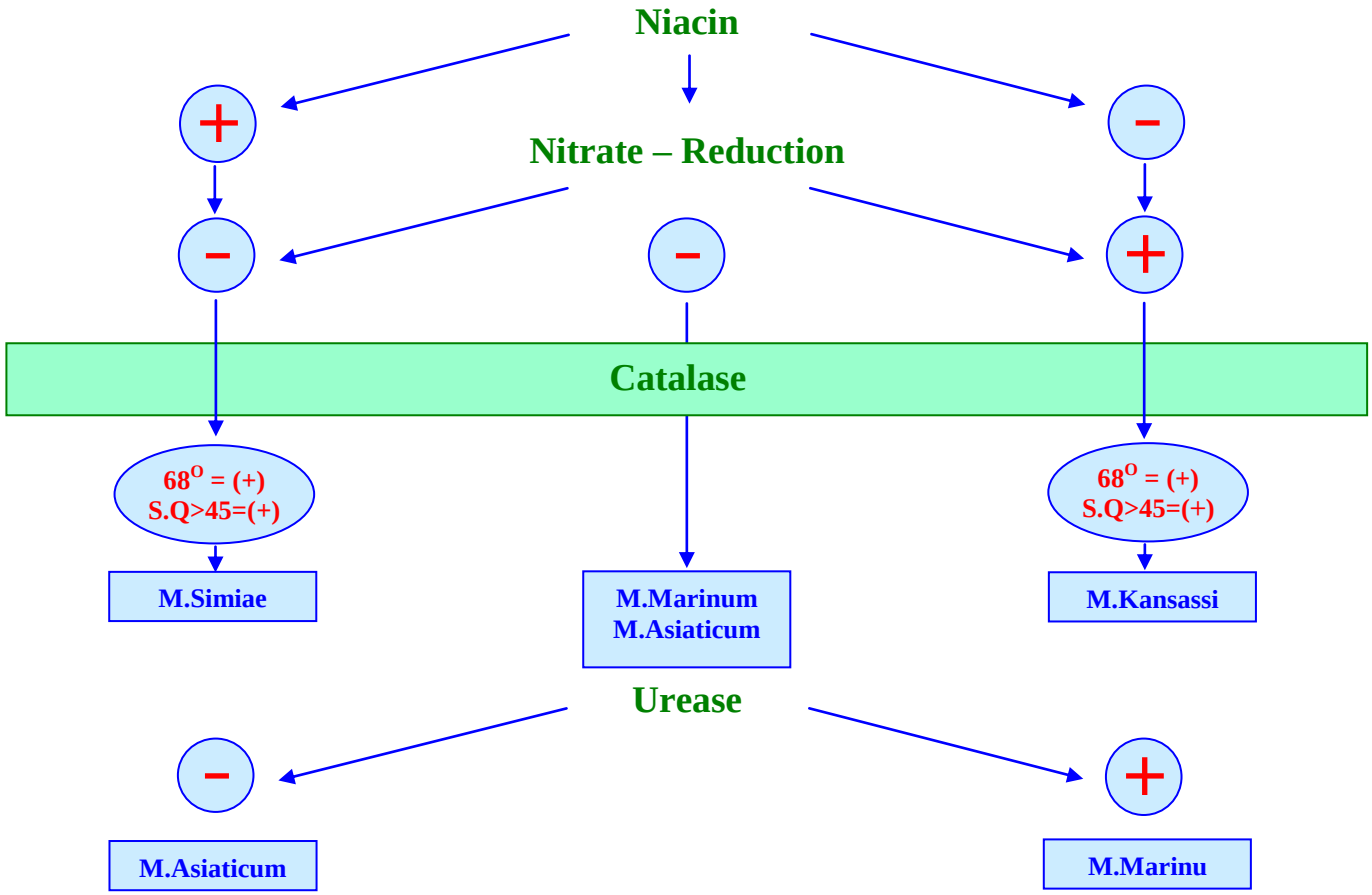
(+) ← Nitrate Test → (−)

**Catalase**

- 68° = (+) S.Q>45=(+) → NaCL Tolerance
  - (−) M.terrae
  - (+) M.triviale
- 68° = (+) S.Q<45=(-) → M.avium, M. Xenopi → Tellurite Reduction
  - (−) M. Xenopi
  - (+) M.avium
- 68° = (V) S.Q<45=(-) → M.Malmoense
- 68° = (-) S.Q<45=(-) → M.gastri, M.hemophilum, M.shimoidei → Urease, Tween hydrolsis
  - (−) M.hemophilm
  - (+) M.gastri

# Slow grower Mycobacterium
## B. photochromes

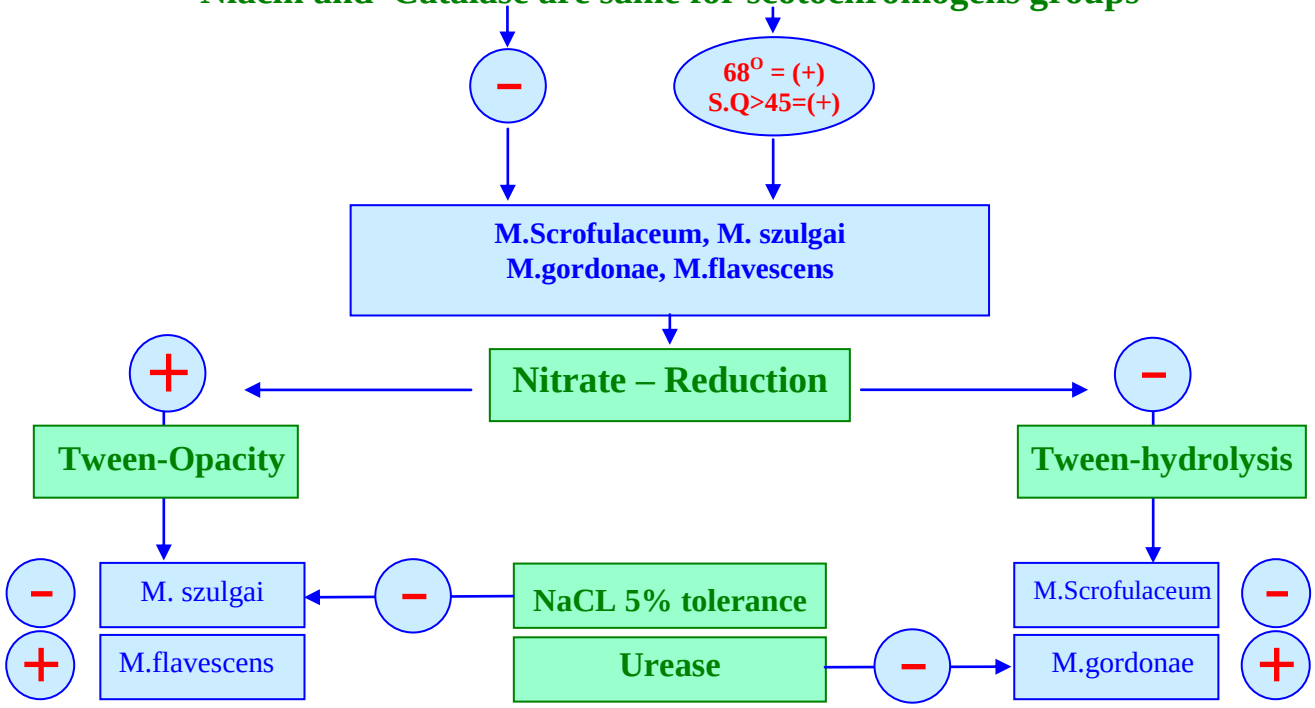
| | Temp .range |
|---|---|
| M.Kansasii | 25-40 |
| M.Marinum | 25-35 |
| M.Simiae | 22-37 |
| M.Asiaticum | 33-37 |



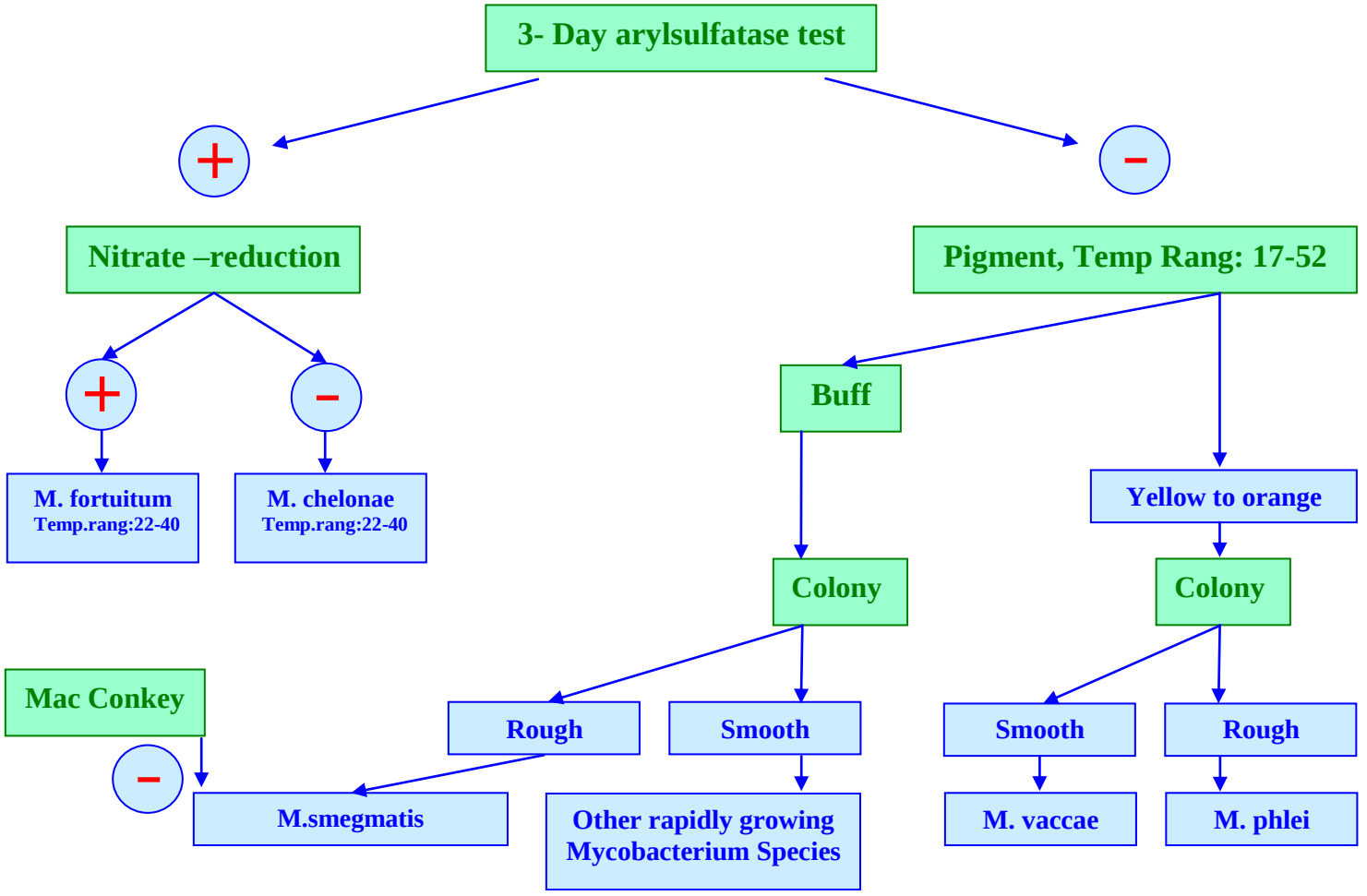
# Slow grower Mycobacterium
## C. Scotochromogens

| | Temp .range |
|---|---|
| M.Scrofulaceum | 22-37 |
| M. szulgai | 22-37 |
| M.gordonae | 22-37 |
| M.flavescens | 25-42 |

**Niacin and Catalase are same for scotochromogens groups**



# Rapid grower Mycobacterium




NaCl tolerance, Nitrate reduction, Iron uptake is positive for M.smegmatis, M.phlei and M.vaccae, M.fortuitum

## تست نیاسین

نیاسین به عنوان یک محصول متابولیک توسط همه مایکوباکتریومها ایجاد می شود، ولی غالب مایکوباکتریومها دارای آنزیمی هستند که نیاسین را به نیاسین ریبونوکلئوتید تبدیل می کند. یکی از مایکوباکتریومهای فاقد این آنزیم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است و لذا نیاسین در محیط کشت آن تجمع پیدا می کند، که مقدار آن با تعداد پرگنه ها و عمر کشت ارتباط دارد. در آزمایش شیمیایی برای تجسس وجود نیاسین، این ماده در حضور یک آمین اولیه مانند آنیلین با برومورسیانوژن تشکیل یک ماده زرد رنگ می دهد.

مواد

آنیلن ۴٪ ، سیانوژن برومید ۱۰٪ ، اتانول ۹۵٪ ، سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ ٪

محلولها

(انیلین ۴٪)

به ۹۶میلی لیتر اتانول ۹۵٪ ، ۴ میلی لیتر محلول بی رنگ انیلین اضافه کنید. محلول انیلین در بطری قهو ه ای رنگ در داخل یخچال نگهداری می شود.

( سیانوژن برومید ۱۰٪ )

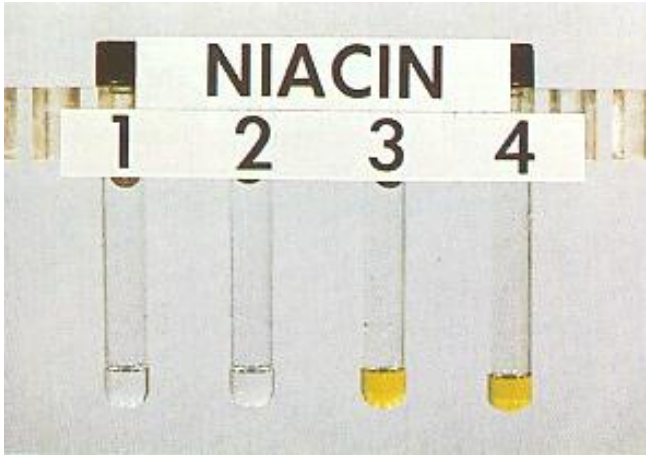
۵ گرم برومید سیانوژن را در ۵۰ میلی لیتر اب مقطر حل نمایید. برومید سیانوژن در بطری قهوه ای رنگ در یخچال نگهداری می شود.

(سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ ٪)

۰/۸۵ گرم از سدیم کلرید را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و برای ۱۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو کنید.

روش کلاسیک

به محیط کشت باسیلهای اسید فاست، ۱ تا ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه کنید. اگر کلنی ها کاملاً سطح محیط را پوشانیده است، سطح آن را با آنس پاره کنید تا مایع در تماس با محیط قرار گیرد (لوله را در وضعیت مایل قرار دهید). پس از حداقل ۱۵ دقیقه، ۰/۵ میلی لیتر از عصاره مایع را از از سطح کشت برداشته و در یک لوله دیگر بریزید. سپس به آن ۰/۵ میلی لیتر ۴ درصد انیلین و ۰/۵ سیانوژن برومید ۱۰٪ اضافه کنید. پیدایش فوری رنگ زرد دلیل بر وجود نیاسین است. جهت خنثی نمودن برمید سیانوژن، به داخل لوله آزمایش، یک ماده ضد عفونی کننده قلیایی حاوی ۲ تا ۴ درصد سود اضافه کنید.







## روش تست های نواری

به محیط کشت باسیلهای اسید فاست، ۱ تا ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه کنید. لو له ها را در وضعیت مایل قرار دهید. پس از حداقل ۱۵ دقیقه، ۰/۵ میلی لیتر از عصاره مایع را از سطح کشت برداشته ودر یک لوله دیگر بریزید. با استفاده از پنس یک نوار نیاسین در آن فرو ببرید. نوار باید در تماس با محلول ته لوله باشد و به کناره های لوله نچسبد. در لوله را بسته و بعد از ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، رنگ محلول را در یک زمینه سفید بررسی کنید. جهت خنثی نمودن برمید سیانوژن، به داخل لوله آزمایش، یک ماده ضد عفونی کننده قلیایی حاوی ۲تا ۴ درصد سود اضافه کنید.

## Niacin Test

This is one of the most reliable *in-vitro* tests for the identification of M.tuberculosis.

## Materials

4% aniline, 10% cyanogens bromide, DW or 0.85% saline 95% ethanol.

## Preparation

(4% aniline solution)

To 96.0 ml of 95% ethanol, add 4ml of colorless aniline. Store it in a brown bottle in the refrigerator. If solution turns yellow, discard

(10% cyanogens bromide)

Dissolve 5 g cyanogens bromide in 50 ml D.W. Store in a tightly capped brown bottle in the refrigerator.

(0.85% saline)

Dissolve 0.85 g sodium chloride in 100 ml D.W. Sterilize by autoclaving.

## Classical Procedure

1) To the culture slant, add 1.0 ml of DW or saline.
2) Place the tube in slant position, so that the fluid covers the entire surface of the medium. Allow the extraction to proceed for at least 15 minutes
3) Remove 0.5 ml of the fluid extract and transfer to a fresh scerwcap tubes.
4) Add 0.5 ml of the aniline solution
5) Add 0.5 ml of the cyanogens bromide solution
6) Observe for the formation of a yellow color, which should develop immediately.

## Paper strip Procedure

Into 0.6 ml of the culture extract (obtained as above), insert the strip with identification ends –up.
Allow the test system to react at room temperature for 15 to 20 minutes.
Observe the color of the liquid in the bottom of the tube.

## احیای نیترات به روش کلاسیک

آنزیم نیترو ردوکتاز یکی از اختصاصات مهم برای تعیین هویت مایکوباکتری هاست.

مواد

نیترات سدیم:NaNo3، فسفات منو پتاسیم: KH2Po4، فسفات دی سدیم Na2HPo4,12H20، اسید کلریدریک، سولفانیل آمید، نافتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید.

محلولها

محلول نیترات 0.01M (در تامپون فسفات0.022M) به شرح زیر مخلوط و اتوکلاو می گردد:

| | | |
|---|---|---|
| نیترات سدیم: | NaNo3 | 0.085g |
| فسفات منو پتاسیم: | KH2po4 | 0.117g |
| فسفات دی سدیم: | Na2Hpo4,12H20 | 0.485g |
| آب مقطر استریل: | 100 D.W | |

(محلول اسید کلریدریک)

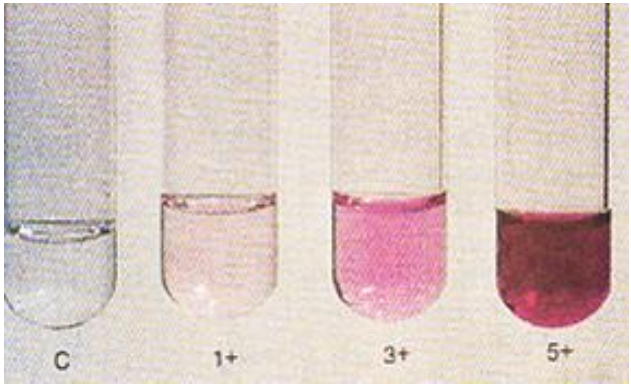
اسید کلریدریک رقیق :۵۰ سی سی اسید کلریدریک به ۵۰ سی سی اب مقطر اضافه کنید

(محلول سولفانیل آمید)

| | | |
|---|---|---|
| سولفانیل آمید | sulfanilamide 0.2 g | |
| آب مقطر استریل | 100D | |

(نافتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید)

| | |
|---|---|
| نافتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید | 0.1g |
| آب مقطر استریل | 100D |




## روش کار

یک لوپ پر از کلنی های محیط جامد را در آب به حالت تعلیق در آورید. ۲ میلی لیتر از محلول نیترات در تامپون فسفات به هر لوله آزمایش اضافه کنید. لوله ها را ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. به هر لوله یک قطره ازمحلول HCL و ۲ قطره از محلول سولفانیل آمید و دو قطره از محلول نافتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلرید اضافه کنید.

واکنش مثبت با پیدایش رنگ قرمز در ۳۰ تا ۶۰ ثانیه مشخص می شود. اگر تغییر رنگی رخ نداد، نتایج را تایید نکنید. برای تایید منفی بودن کمی پودر روی (ZN) اضافه کنید. بروز رنگ قرمز به دنبال اضافه کردن روی تایید می کند که عدم تغییر رنگ قبلی یک نتیجه منفی بوده است. اگر به دنبال اضافه کردن روی تغییر رنگی رخ نداد، واکنش مثبت بوده و نیتراتها بیشتر از نیتریت ها به اجزا بی رنگ احیا شده اند.

## احیای نیترات با استفاده از نوارهای آماده

یک لوپ پر از کلنی های محیط جامد را در آب به حالت تعلیق در آورید. ۲ میلی لیتر از محلول نیترات در تامپون فسفات به هر لوله آزمایش اضافه کنید. لوله ها را ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. سپس یک نوار به داخل آن فرو برده به طوریکه قسمت انتهای نوار ابتدا داخل لوله شود. لوله ها ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به طور عمودی انکوبه نگهداری می شود. بعد از ۱۰ دقیقه از قرار دادن لوله در درجه حرات اتاق، رنگ نوار قرائت می گردد.

## Nitrate reduction test

### Materials

Screwcap test tubes (16 x 125 mm), Water bath at $37^0$C, Loop or applicator sticks, $NaNo_3$, $KH_2PO_4$, $Na_2HPO_4.12H_2o$, HCL, Sulfanilamide, N-naphthylethylenediamine dihydrochloride
Distilled water, Zinc powder

### Preparation

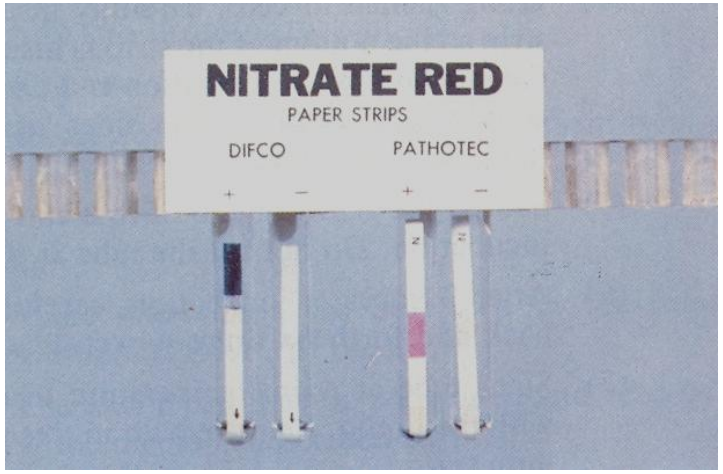
1) Substrate 0.01M sodium nitrate in 0.022 M phosphate buffer, pH= 7.0
Dissolve the following chemicals in order in 100 ml distilled water

| | |
|---|---|
| $NaNO_3$ | 0.085g |
| $KH_2PO_4$ | 0.117g |
| $Na_2HPO_4.12H_20$ | 0.485g |

Sterilize by autoclaving
2) Carefully add 50.0 ml concentrated HCL to 50.0ml distilled water
3) Dissolve 0.2 g sulfanilamide in 100.0 ml distilled water
4) Dissolve 0.1 g N-naphthylethylenediamine dihydrochloride in 100.0 ml D.W. Store the substrate and reagents in the dark under refrigeration.

### Procedure

Using sterile loop or applicator stick, emulsify 2 spadesful of growth into the water.
Add 2.0 ml of $NaNO_3$ substrate solution. Shake by hand and incubate in upright position in $37^0$C water bath for 2 hours.
Remove from the temperature bath.
Add one drop of HCL reagent, Two drop of Sulfanilamide reagent and add two drop of N-naphthylethylenediamine dihydrochloride reagent.




**Results**

Positive = red color development, which may range from positive pale pink (±) to deep red (5+)
Negative = no color development.
To confirm, add a small amount of powdered zinc to the mixture the zinc catalytically reduces nitrat to nitrite, and therefore a true negative test becomes red when zinc is added. If there is no colc change, repeat the test.

**Nitrite Test Strips for detection of nitrate reduction**

Remove two spadesful of growth from culture and add to the saline.
Carefully insert a nitrite test strip so the bottom of the strip is inserted first. Hold the tube in a vertical position and incubate at $37^0$C for 2 hours.
After 2 hours, carefully, tilt the tube back and forth six times to wet the entire strip.
Keep at room temperature for 10 minutes with the liquid covering the strip. Read the results.
Results: Positive = Top portion of strip changing to light blue or dark blue (difco); central portion of strip changing to pink (General diagnostics)
Negative = No color change

## فعالیت کاتالاز

اکثر مایکوباکتریومها دارای آنزیم کاتالاز هستند و قادرند آب اکسیژنه را تجزیه کنند. مقدار این انزیم در مایکوباکتریومهای مختلف متفاوت است و علاوه بر این کاتالاز مایکوباکتریومها از نظر پایداری در برابر دما تفاوت دارند. بعضی در درجه حرارت ۶۸ درجه سانتیگراد غیر فعال و بعضی قدرت خود را حفظ می نمایند.

مواد

آب اکسیژنه ۳۰٪ ، توین – ۸۰ ، ۱۰٪ ، تامیون فسفات 0.076M با PH= 7

تهیه محلولها :

۱) ۱۰ میلی لیتر از توین ۸۰ را با ۹۰ میلی لیتر اب مقطر استریل حل نموده و ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۱درجه سانتیگراد اتوکلاو می نماییم.

بلافاصله قبل از انجام هر آزمایش قسمتهای مساوی (یک میلی لیتر) از آب اکسیژنه ۳۰ درصد و (یک میلی لیتر) تواین– ۸۰ ده درصد را با هم مخلوط کرده و مورد استفاده قرار می دهیم.

۲) تامیون فسفات 0.076M با PH 7

| | |
|---|---|
| Na2HPO4 | 9.47g/1000ml D.W |
| KH2PO4 | 9.07 /1000ml D.W |

مقدار ۶۱/۱ میلی لیتر از محلول ۱ و ۳۸/۹ میلی لیتر از محلول ۲ را با هم مخلوط نمایید تا تامیون فسفات 0.076M با PH 7 بدست آورید.

## روش نیمه کمی

در روش نیمه کمی بر پرگنه های کشت دو هفته‌ای مایکوباکتریوم که محیط کشت آن به طور عمودی منعقد شده است مقدار یک میلی لیتر از مخلوط هم حجم آب اکسیژنه ۳۰ درصد و تواین ۸۰ ده درصد افزوده می گردد و ارتفاع حبابهای اکسیژن در لوله بعد از پنج دقیقه بر حسب میلیمتر اندازه گیری می گردد. اگر بیش از ۴۵ میلیمتر باشد مثبت قوی و اگر حباب اکسیژن مشاهده نشود نتیجه آزمایش منفی خواهد بود.

## کاتالاز ۶۸ درجه با PH=7

با یک پیپت استریل، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات، (PH=7) به لوله اضافه کنید.

با یک آنس، چندین کلنی را از کشت در داخل بافر به حالت تعلیق در آورید.

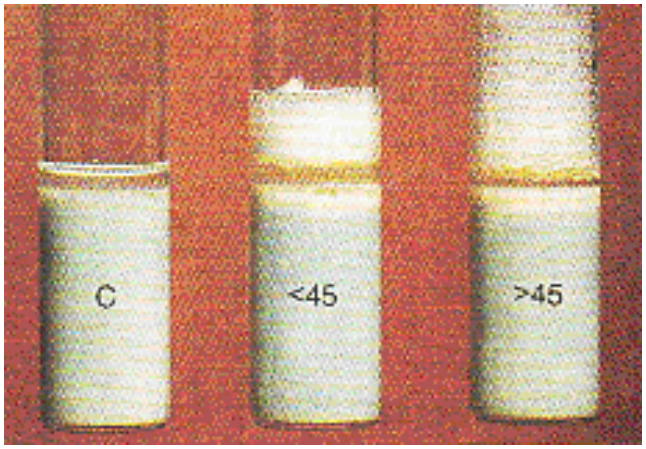
لوله های محتوی کلنی های تعلیق شده را در یک حمام آب با دمای ثابت در ۶۸ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه قرار دهید. (زمان و دما بسیار مهم می باشند)

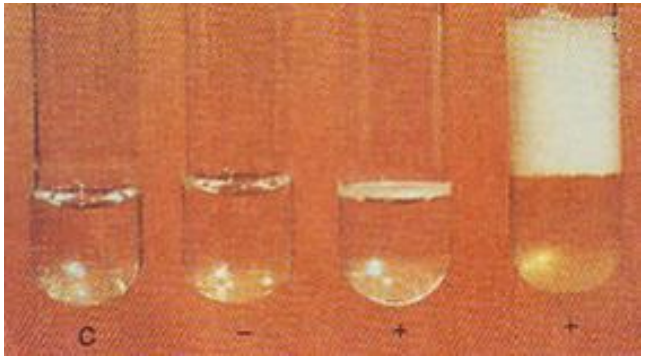
از حمام اب گرم خارج نموده و بعد از خنک شده، به هر لوله ۰/۵ میلی لیتر از محلول مساوی Tween-peroxidase اضافه کنید.

برای پیدایش حبابهای که بر روس سطح مایع ظاهر می شوند، بعد از ۲۰ دقیقه لو له ها را نظاره کنید.

## نتایج :

مثبت = پیدایش حباب  منفی = فقدان حباب



## Catalase Test

Catalase is an intracellular, soluble enzyme capable of splitting hydrogen peroxide into water an oxygen, $2H_2o_2$ 2 $H_20$+ $O_2$. The oxygen bubbles into the reaction mixture to indicate catalase activity The quantitative differences in catalase activity and differences in heat stability detected by the 68° have proven to be useful taxonomic tools.

## Materials

Water bath at $68^0$C
Loop or inoculating spade
30% hydrogen peroxide
10% Tween -80
0.067 M phosphate buffer, PH =7

## Preparation

10% Tween 80. Mix 10.0 ml of Tween- 80 with 90.0ml D.W .Autoclave for 10 minutes at $121^0$C. Immediately before performing the test, mix equal parts of superoxide and the tween -80 solution 0.067 M phosphate buffer, ph 7.0.

| | |
|---|---|
| Na2HPO4 | 9.47g/1000ml D.W |
| KH2PO4 | 9.07 /1000ml D.W |

Mix 61.1 ml of disodium phosphate with 38.9 ml of monopotassium phosphate. Check PH

**Procedure.1 (Heat stable Catalase)**

With a sterile pipette, dispense 0.5 ml of the PH= 7 phosphate buffer into sterile screwcap tes tubes.

With sterile loop or applicator stick, emulsify one spadeful of growth from culture into phosphate buffer

Place the tubes at $68^0$C for 20 minutes .Time and temperature is critical.

Remove from heat and cool to room temperature

Add 0.5 ml of the Tween-peroxide mixture .Recap tubes loosely.

**Results:**

Observe for the formation of bubbles at the surface of the liquid. Hold the tubes for 20 minutes before reporting

Positive: formation of bubbles

Negative: No bubbles

**Procedure.2 (Semiquantative test)**

Examine the 14 day-old L.J culture to ascertain that growth has occurred. (Instead of slant position L.J culture media should be made in upright position to provide a butt or deep of solid medium).

Add 1 ml of the freshly –prepared Tween-peroxide mixture (as mentioned above), replace caps loosely and allow to stand at room temperature for 5 minutes.

Measure the height of the foan column.

**Results:**

| | |
|---|---|
| Low catalase activity | less than 45mm of foam |
| High catalase activity | More than 45mm of foam |

## تست حساسیت به Thiophen-2-carboxylic Hydrazide

ممانعت TCH از رشد مایکوباکتریوم بویس کمک بسیار مفیدی در تشخیص آن از سایر مایکوباکتریوم ها و به خصوص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می کند.

### مواد

پودر hiophen-2-carboxylic hydrazide ، لوله های screwcaps

### طرز تهیه

ده میلی گرم پودر Thiophen-2-carboxylicدر۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و بعد از فیلتر نمودن یک سی سی از آن را به ۱۰۰سی سی محیط L.J اضافه نمایید. بدین ترتیب غلظت ۱۰ مایکروگرم در میلی لیتر بدست می آید.

### روش

با آب مقطر استریل سوسپانسیون $10^{-3}$ و $10^{-5}$ آماده نمایید. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون را روی محیط کشت حاوی ۱۰ مایکروگرم در میلی لیتر TCH و محیط شاهد بدون دارو تلقیح کنید. محیط ها به مدت ۲ تا ۳ هفته در گرمخانه نگهداری می شود. از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و مایکوباکتریوم بویس به عنوان شاهد مقاوم و حساس به ترتیب استفاده می شود.

## Thiophen-2-Carboxylic Acid Hydrazide (TCH)

### Susceptibility test

This test is valuable for distinguishing *M.Bovis* from *M.tuberculosis*. M.Bovis is susceptible to low-concentration of TCH.

### Method

L.J culture media or7H-10 Middle brook
Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide.

### Preparation

Prepare two batches of L.J culture media. One batch is drug-free control medium and the other contained 10 µg/ml.

### Procedures

Dilute a 7 day –old culture to $10^{-3}$ and $10^{-5}$ in sterile saline or water.
Inoculate one control and one drug –containing medium with 100 µl of each dilution.
Incubate for 3 weeks at $35^{0}$ C in an atmosphere of 10% carbon dioxide.

### Results

Record the organisms as resistant to TCH if growth on the drug- containing medium is equal to or greater than 1% of that observed on the drug –free control medium.

## تست هیدرولیز تواین ۸۰

اجزا آزمایش شامل تواین – ۸۰ و معرف رنگ خنثی در بافر خنثی می باشد. معمولا رنگ قرمز خنثی در PH=7 قرمز می باشد. ولی وقتی به لیپید یا تواین – ۸۰ متصل شد، معرف رنگ به رنگ زرد در می آید که PH آن قلیایی می باشد. وقتی آنزیم Esterases باکتری باعث باز شدن مولکول تواین – ۸۰ می گردد، دیگر به معرف رنگ نمی تواند بچسبد و معرف، رنگ قرمز خود را حفظ می کند که در این صورت تست مثبت تلقی می شود.

مواد

تواین – ۸۰

0.067 M تامپون فسفات PH 7، معرف رنگ خنثی (aqueous neutral red, 0.1%)

تهیه

تامپون فسفات 0.076M با PH 7

Na2HPO4 9.47g/1000ml D.W - KH2PO4 9.07 /1000ml D.W

مقدار ۶۱،۱ میلی لیتر از محلول ۱ و ۳۸،۹ میلی لیتر از محلول ۲ را با هم مخلوط نمایید تا تامپون فسفات 0.076M با PH= 7 بدست آورید.

ماده اولیه

به ۱۰۰ میلی لیتر تامپون فسفات، 0.5 میلی لیتر تواین – ۸۰ و۲ میلی لیتر از محلول 0.1٪ neutral red اضافه کنید. به مقادیر ۲ میلی لیتر از این محلول را در لوله های در پیچ دار 16x125 mm توزیع و اتوکلاو کنید.

روش

یک لوپ پر از پرگنه های مایکوباکتریوم به داخل لوله های ماده اولیه تلقیح و لوله ها را در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه کنید.

نتایج

لوله ها را برای تغییر رنگ مایع از کهربایی به صورتی یا قرمز نظاره کنید. بررسی لوله ها بعد از ۲۴ ساعت، ۵ روز و بعد از ۱۰ روز مجدد انجام می گیرد.

کنترل ها: مثبت – ماده اولیه تلقیح شده با M.Kansasii و ماده اولیه تلقیح نشده

## Tween Hydrolysis

The test medium contains tween 80 and the indicator neutral red in a buffered neutral solution.Normally, neutral red is red at PH 7, but when bound by lipids or by Tween 80, the indicator dye takes on the amber or straw color that it commonly has at more alkaline PH. When the bacterial esterases split the tween 80, it no longer acts to bind the indicator dye and the neutral

Red then reverts to its usual color at PH 7, which is red, and the test is called positive

### Materials

Tween -80

0.067M Phosphate buffer, PH=7. Aqueous neutral red, 0.1%, Screwcap tubes, 16x125 mm

### Preparation

Phosphate buffer, pH=7

$Na_2HPO_4$ (0.067 M) 9.47g/1000ml D.W (solution a)

$KH_2PO_4$ (0.067 M) 9.07 /1000ml D.W (solution b)

To prepare 100ml of PH= 7.0 buffer, mix 61.1 ml of solution "a" with 38.9 ml of solution" b". Check the PH of the final solution.

### Substrate medium

Add the following in order, to 100 ml of PH= 7.0 phosphate buffer; 0.5 ml of tween 80 and 2 ml of a 0.1% aqueous solution of neutral red.

Dispense the substrate in 2 ml amounts into 16X 125 –mm screwcap tubes. Autoclave at $121^0$C for 10 minutes .The substrate should be straw or amber color after autoclaving. Store in dark at $4^0$c for no more than 2 weeks.

### Procedures:

Inoculate the substrate with a spadeful of test organisms from an actively growing young culture slant. Incubate at $35^0$C. Examine after 1, 5, and 10 days .Do not shake tubes while reading them.

### Results:

Positive = substrate turns pink to red

Negative = substrate remains amber – colored after 10 day.

### Controls:

Use an uninoculated tube of substrate for the negative color control

M.Kansasii server as a positive control.

## تست اوره آز (روش Wayne)

قدرت کشت مثبت برای هیدرولیز کردن اوره (آزاد سازی آمونیم) برای تشخیص مایکوباکتریومهای گروه اسکوتوکروموژنیک ها و غیر فتوکروموژنیک ها بکار می رود. برای انجام دو روش موجود می باشد:

### تهیه

یک بخش از کونسانتره پایه آگار اوره را با ۹ قسمت از آب مقطر استریل مخلوط کنید. (آگار اضافه نکنید).

به مقدار ۳ میلی لیتر در داخل هر لوله های سرپیچ دار استریل 100 × 12 میلی لیتر توزیع نمایید.

### روش

یک لوپ کامل از مایکوباکتریوم به داخل لوله تلقیح و در ۳۵ درجه انکوبه کنید.

برای تغییر رنگ به صورتی یا قرمز لوله ها را بعداز ۳،۱ و ۷ روز نظاره کنید.

### نتایج

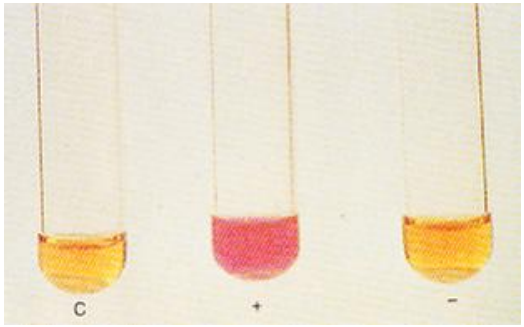
مثبت = تغییر رنگ محلول از زرد به قرمز پررنگ یا صورتی

منفی= هیچ تغییر رنگی رخ نداده

### کنترل ها:

مثبت: ماده اولیه تلقیح شده با M.Scrofulaceum or M.Bovis

: ماده اولیه تلقیح نشده یا M.gordonae




**Urease**

The ability of a culture to hydrolyze urea (releasing ammonia) is useful in identifying both scoto-chromogens and non photochromogens.

**Methods**

Wayne method

**Materials**

Difco – bacto concentrate urea

Sterile Water, Screwcap tubes (13 x 100-mm)

**Preparation**

Aseptically mix 1 part of Difco – bacto urea concentrate with 9 parts of Sterile –water.

Dispense 3ml amounts into sterile Screwcap tubes.

**Procedures**

Inoculate the liquid substrate with a spadeful of young actively growing culture slant

Incubate at 350C

Observe for a color change

**Results**

Positive = color change from amber to pink or red

Negative = no color change

**Controls**

M.Scrofulaceum or M.Bovis as a positive control. An uninoculated tube of substrate and a tube inoculated with M.gordonae serve as negative controls.

## تست آریل سولفاتاز

آنزیم آریل سولفاتاز قابلیت تجزیه پیوندهای بین گروه سولفات ها و ساختار آروماتیک حلقه ای فنل فتالئین دی سولفات و تـبدیل آن به فنل فتالئین را دارد. حضور فنل فتالئین با افزودن مواد قلیا مانند بیکربنات سدیم که تولید رنک قرمز می کند مشخص می شود.

مواد:

فنل فتالئین دی سولفات (نمک تری پتاسیم)، بیکربنات سدیم ADC، 7H-9 محیط

طرز تهیه:

۲/۶ گرم از فنل فتالئین دی سولفات را در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده، این یک محلول ۰/۰۸ مولار است. محلول بدست آمده را به وسیله فیلتر غشایی ۰/۲۲ استریل و در یخچال نگهداری کنید.

ماده اولیه :

دو فلاسک هر یک با ۲۰۰ میلی لیتر از محیط مایع استریل آماده کنید.

برای محیط تست ۳ روزه: ۲/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۰۸ مولار را به فلاسک ۲۰۰ میلی لیتری از محیط مایع اضافه کنید. بدین ترتیب ماده اولیه با ۰/۰۰۱ مولار برای تست ۳ روزه تهیه می گردد.

برای محیط تست ۱۴ روزه: ۷/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۰۸ مولار را به فلاسک ۲۰۰ میلی لیتری از محیط مایع اضافه کنید. بدین ترتیب ماده اولیه با ۰/۰۰۳ مولار تهیه می گردد.

از هر ماده اولیه ،۲ میلی لیتر درون لوله های آزمایش استریل سرپیچ دار توزیع کنید و در حرارت یخچال ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

قبل از انجام آزمایش، برای کنترل کیفیت ماده اولیه، چند قطره کربنات سدیم اضافه نمایید. ماده اولیه باید بی رنگ باقی بماند. اگر محلول صورتی شد، ماده اولیه باید دوباره تهیه شود.

**روش:**

یک لوپ پر از مایکوباکتریم های که در محیط جامد رشد کرده را به لوله های حاوی ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۳ مولار از ماده اولیه تلقیح کنید.

لوله ها را در درجه حررات ۳۵-۳۷ سانتیگراد انکوبه کنید.

پس از ۳ روز از انکوباسیون ماده اولیه ۰/۰۰۱ مولار، به لوله های آزمایش فقط ۶ قطره از محلول بیکربنات سدیم ۲ نرمال اضافه کنید.

پس از ۱۴ روز از انکوباسیون ماده اولیه ۰/۰۰۳ مولار، به لوله های آزمایش فقط ۶ قطره از محلول بیکربنات سدیم ۲ نرمال اضافه کنید.

**نتایج:**

مثبت = تغییر رنگ به صورتی تا قرمز

منفی= هیچگونه تغییر رنگ

نتایج را با تست استاندارهای رنگ مقایسه کرده و شدت رنگ ها را از (-) به عنوان منفی تا +۵ به عنوان مثبت ثبت کنید.

**کنترل:**

از لوله حاوی ماده اولیه به عنوان شاهد منفی

مایکوباکتریوم – فورتیوتوم به عنوان شاهد مثبت استفاده می شود. (M. Fortitum)

## جدول تهیه رنگ استاندار برای تست آریل سولفاتاز

| شماره لوله | بافر فسفات ( $Na_2HPO_4$=0.076M) | فنل رد-۰/۱ ٪ | قرائت |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۳ سی سی | ۱۰ قطره از فنل رد ۰/۱ ٪ | +۵ |
| ۲ | ۴ سی سی | ۱میلی لیتر از لوله شماره ۱ | +۴ |
| ۳ | ۳ سی سی | ۱میلی لیتر از لوله شماره ۲ | +۳ |
| ۴ | ۳ سی سی | ۱میلی لیتر از لوله شماره ۳ | +۲ |
| ۵ | ۳ سی سی | ۱میلی لیتر از لوله شماره ۴ | +۱ |
| ۶ | ۳ سی سی | ۱میلی لیتر از لوله شماره ۵ | ± |

طرز تهیه بافر فسفات

مواد :

تامیون فسفات 0.076M با PH 7

Na2HPO4 9.47g/1000ml D.W

KH2PO4 9.07 /1000ml D.W

مقدار ۶۱/۱ میلی لیتر از محلول ۱ و ۳۸/۹ میلی لیتر از محلول ۲ را با هم مخلوط نمایید تا تامیون فسفات 0.076M با PH =7 بدست آورید.

مقدار ۵۰ میلی لیتر از محلول ۱ و ۵۰ میلی لیتر از محلول ۲ را با هم مخلوط نمایید تا تامیون فسفات با PH= 6.8 بدست آورید.

مقدار ۳۷،۵ میلی لیتر از محلول ۱ و ۶۲،۵ میلی لیتر از محلول ۲ را با هم مخلوط نمایید تا تامیون فسفات با PH= 6.6 بدست آورید.

محلول ۰/۱٪ فنل –رد: ۰/۱ گرم phenolsulfonphthalein Sodium salt را در ۱۰۰ سی سی آب مقطر حل کنید. محلول را اتوکلاو و در یخچال نگهداری کنید.

## 3 and 14 days Arylsulfatase test

Arylsulfatase is an enzyme capable of hydrolyzing the bond between the sulfate group and the aromatic ring structure in compounds with the general formula $R\text{-}OSO_3H$ .When the substrate potassium phenolphthalein disulfate is incorporated into growth medium, the presence of free phenolphthalein liberated by enzymatic hydrolysis is indicated by a red color that develops when alkali is added.

## Materials

Phenolphthalein disulfate(tripotassium salt), Middle brook 7H9 broth or Dubos Tween-albumin, Alumin Dextrose Catalase (ADC) enrichment, Sodium-carbonate, D.W

## Preparation

a) Prepare stock substrate solution

Dissolve 2.6 g of phenolphthalein disulfate(tripotassium salt), in 50 ml of D.W to make a 0.08 M of stock solution. Sterilize by filtration through 0.22 µm pore size membrane filter and store at $5^0$C.

b) 2N sodium carbonate

Dissolve 10.6 g of a anhydrous, $Na_2CO_3$ in 100 ml of D.W. Sterilize by filtration through 0.22 µm pore size membrane filter and store at room temperature

c) Liquid medium

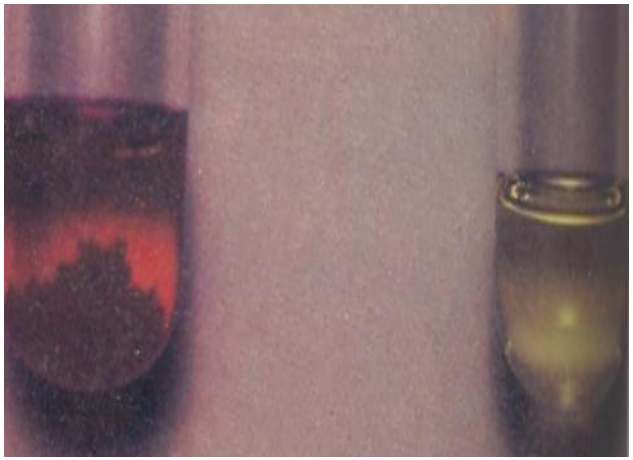
Use either Middlebrook 7H9 or Dubos broth .

Prepare two flasks, each with 200 ml of the sterile liquid medium

c.1) For the 3-day test medium: ascetically add 2.5 ml of the 0.08 M stock substrate to one flask of 200 ml of complete liquid medium to provide a 0.001 M substrate.

c.2) For the 14-day test medium; aseptically add 7.5 ml of the 0.08M stock substrate to the other flask of 200 ml of complete liquid medium to provide a 0.003 M substrate.

Dispense each working solution in 2-ml amounts into screw cap test tubes and store at room temperature or in the refrigerator.



**Procedures**

Inoculate spadeful of organisms taken from an actively growing subculture on solid medium into 0.001 M substrate and 0.003 M substrate tube.

Incubate at 35 to 37 $^{0}$C.

After 3 days of incubation, add only 6 drops of 2 N sodium carbonate to the 0.001 M substrate tube.

After 14 days of incubation, add only 6 drops of 2 N sodium carbonate to the 0.003 M substrate tube.

**Results**

A positive reaction = immediate color change to pink or red after addition of carbonate solution (compare results with a set of color standards and record intensity of color (- to 5+)

A negative reaction = no color change

**Controls**

A tube of uninoculated substrate medium (as negative)

A tube of each substrate inoculated with M.Fortuitum (as positive)

## Arylsulfatase test Results Standards

### a) M/15 Disodium phosphate buffer solutions

Buffer solutions are prepared by mixing two stock solutions in proportions to give the required PH.
Stock solutions
1) M/15 disodium phosphate:In a volumetric flask dissolve 9.47g of anhydrous Na2HPO4 in distilled water to make one liter (1000ml )
2) M/15 monopotassium phosphate: In a volumetric flask dissolve 9.07g of KH2PO4 in distilled water to make one liter (1000 ml)
PH 6.8 Buffered Solution
Mix 50.0 ml of (1) with 50ml of (2) .Check on PH meter.
PH7.0 Buffer Solution
Mix 61.1 ml of (1) with 38.9 ml of (2). Check on PH meter.
PH 6.6 Buffered Solution
Mix 37.5 ml of (1) with 62.5 ml of (2) .Check on PH meter.

### b) 0.1% stock phenol red

0.1 gm phenolsulfonphthalein sodium salt in 100 ml distilled water. Autoclave for storage in the refrigerator.

| Tube No | M/15 $Na_2HPO_4$ (phosphate buffer solution) | 0.1% phenol Red | Reading |
|---|---|---|---|
| 1 | 4 ml | 10 drops 0.1% stock | 5+ |
| 2 | 4 ml | 1 ml from tube 1 | 4+ |
| 3 | 3 ml | 1 ml from tube 2 | 3+ |
| 4 | 3 ml | 1 ml from tube 3 | 2+ |
| 5 | 3 ml | 1 ml from tube 4 | 1+ |
| 6 | 3 ml | 1 ml from tube 5 | ± |

## Oxygen preference Test

The medium is middle brook 7H9 or Kirchner broth rendered semisolid by the addition of 0.1% pure agar and dispensed in 10 ml amounts in screw-capped bottles. Pipette 0.2 ml of the bacterial suspension about 1 cm below the surface of the medium and mix carefully, avoiding bubbles and aeration.
Incubate at 370C for 18 days.
Aerobic strains grow at or near the surface, while microaerophilic strains grow as a band 10-20 mm below the surface, sometimes extending upwards.

Controls:
Microaerophilic: M.Bovis/M.africanum

Aerobic:
M.Bovis .B.C.G/ M.tuberculosis

## تست ترجیعی اکسیژن

محیط مایع میدل بروک7H9 یا محیط مایع Kirchner را با افزودن ۰/۱٪ آگار خالص به صورت نیمه جامد در آورید و سپس ۱۰ میلی لیتر از این محیط را داخل لوله در پیچ دار بریزید. برای انجام تست۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون مایکوباکتریوم را یک سانتیمتر زیر محیط جامد تلقیح کنید (دقت شود حباب تولید نشود). محیطهای تلقیح شده به مدت ۱۸ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می شوند. سویه های هوازی (Aerobic) در نزدیکی سطح محیط رشد می کنند ولی سویه های میکرو هوازی (microaerophilic) ۱۰-۲۰ میلی متر زیر سطح محیط رشد می کنند که در بعضی مواقع به طرف سطح هم گسترش می یابد.

**کنترل هوازی:** مایکوباکتریوم بویس (ب.س.ژ) یا مایکوباکتریوم توبرکولوزیس
**کنترل میکروهوازی:** مایکوباکتریوم بویس یا مایکوباکتریوم آفریکانوم

## تست پیرازین آمیداز

### محیط لازم برای تست پیرازین امیداز

7H9 محیط مایع = ۱۰۰۰ میلی لیتر　　پیرازین – آمید = ۱۰۰ میلیگرم

اسید پیرویک ، نمک سدیم= ۲ گرم　　آگار = ۱۵ گر م

آگار را گرم کنید تا ذوب شود. مقدار ۵ میلی لیتر از محلول فوق را در لوله های درپیچ دار تقسیم نمایید و در ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو کنید.

محیط ها باید در وضعیت عمودی و نه مایل سفت شوند.

سولفات فرو آمونیم ۱٪

یک گرم سولفات فروآمونیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل نمایید.

### روش

سوسپانسیون غلیظی روی لوله های محیط کشت قرار دهید. این سوسپانسیون باید با چشم غیر مسطح قابل رویت باشد. هر دو لوله را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه کنید. بعد از ۴ روز، یک لوله را از انکوباتور برداشته و ۱ میلی لیتر از محلول سولفات فرو آمونیوم تازه آماده شده را به آن اضافه کنید. لوله ها را برای جلوگیری از رشد مواد آلوده کننده داخل یخچال قرار دهید. بعد از ۴ ساعت لوله ها را برای بررسی نوار صورتی رنگ داخل آگار بررسی کنید. پس از ۷ روز انکوباسیون دومین لوله را از انکوباتور برداشته و طبق لوله اول با آن رفتار کنید.

نکته: آگر آزمون ۴ روزه مثبت شد، لازم نیست که لوله دوم را برای تست ۷ روزه نگهداری کنید.

### نتایج :

مثبت: وار صورتی در آگار

منفی: فقدان نوار صورتی در آگار

### کنترل استاندار

مثبت: مایکوباکتریوم – ثوبرکلوزیس/ اویوم / مارینیوم

منفی: مایکوباکتریوم – بویس / کانزاسی

**Detection of Pyrazinamidase activity**

**Medium for detection of pyrazinamidase activity**

| | |
|---|---|
| Middle brook 7H9 broth | 1000ml |
| Pyrazinamide | 100 mg |
| Sodium pyruvate | 2g |
| Agar | 15g |

Dissolve by steaming .Dispense in 5 ml amounts in screw-cap bottles and sterilize by autoclaving at 1150C minutes. Allow to cool in the upright position so that butts rather than slopes are formed.

**Procedures**

Inoculate a heavy inoculum from afresh culture slant onto the surface of each of 2 tubes of medium. So that the inoculums is visible to the naked eye.

Incubate at $37^{o}$C for 4 days

Remove one tube from incubator and add 1 ml of freshly prepared ferrous ammonium sulphate (Fe (NH4)2(SO4)2, 6H20) 1% to the tube.

Place the tubes in the refrigerator to prevent growth of contaminants.

After 4 hours, examine tubes for a pink band in the agar. To read hold the tubes against a white background and use incident room light.

After 7 days incubation, remove the second tube from incubator and develop as tube first.

Note: If 4 –day test is positive, it is not necessary to hold the second tube for 7-day test.

**Results:**

Positive =a pink band in the agar

Control = no pink band in the agar

**Test controls:**

Positive control = M.tuberculosis, M.Avium, M.Marinum

Negative control = M.Bovis neative at 4 and 7 days,

## References:

1) Isolation and Identification of Mycobacterium tuberculosis. A guide for the level II Laboratory CDC Manual. US department of Health and Human services/Public Health Service.
2) World Health Organization.WHO/TB/98.258.Laboratory services in TB Control.
3) World Health organization.WHO/EMC/ZOO/96.4.http:www.who.int/emc
4) Heidari F,FarniaP ,Nowroozi J, et al. Evaluating the sensitivity of three primers using PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for rapid identification of M. Simiae isolated from pulmonary tuberculosis patients. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases. 2010; 5:30-35.
5).Tabarsi P, Baghaei P, Farnia P, Mansouri N, Chitsaz E, Sheikholeslam F, Marjani M, Rouhani N, Mirsaeidi M, Alipanah N, Amiri M, Masjedi MR, Mansouri D. Nontuberculous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis-need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria. Am J Med Sci. 2009 Mar; 337(3):182-4
6)Velayati AA, Farnia P, Boloorsaze MR, Sheikholslami MF, Khalilzadeh S, Hakeeme SS, Masjedi MR. Monaldi Mycobacterium bovis infection in children in the same family: transmission through inhalation. Arch Chest Dis. 2007 Sep; 67(3):169
7).Mirsaeidi SM, Tabarsi P, Mardanloo A, Ebrahimi G, Amiri M, Farnia P, Sheikhleslami M, Bakayev V, Mohammadi F, Mansouri SD, Masjedi MR, Velayati AA. Pulmonary mycobacterium Simiae infection and HTLV1 infection: an incidental co-infection or a predisposing factor. Monaldi Arch Chest Dis. 2006 Jun; 65(2)
8)Farnia P, Masjedi MR, Nasiri B, Mirsaedi M, Sorooch S, Kazeampour M, Velayati AA. Instability of IS6110 patterns in multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis Epidemiol Infect. 2007 Feb; 135(2):346-52



Address: Mycobacteriology Research Centre, Iranian National Reference TB Laboratory, National Research Institute of Tuberculosis & Lung Disease (NRITLD), Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Shaheed Bahonar Ave, Daarabad, P.C: 19569/44413, P.O Box: 19575/154, Tehran, Iran.
Tel: +98(21) 27122571
Fax: +98(21) 26109505
E-mail: mrc @ nritld.ac.ir, pfarnia @ nritld.ac.ir, Website: www.mrc.ac.ir