بهارافشان

معرف متیل‌رد
Methyl Red Reagent
(MR Test)

اصول

الف) آزمایش توانایی ارگانیسم برای تولید و پایدار نگه‌داشتن محصولات اسیدی نهایی از تخمیر گلوکز و غلبه‌کردن بر ظرفیت بافری سیستم.

ب) این تست یک تست کمی برای تولید اسید (تعیین pH) می‌باشد. بعضی از ارگانیسم‌ها نسبت به سایر ارگانیسم‌ها اسیدهای بیشتری تولید می‌کنند.

متیل‌رد یک معرف pH با محدودهٔ بین ۶ (زرد) و ۴/۴ (قرمز) می‌باشد. pH اسیدی در متیل‌رد پایین‌تر از pH سایر معرف‌های مورد استفاده در محیط‌های کشت باکتری‌شناسی است. بنابراین برای تغییر رنگ به قرمز، ارگانیسم مورد آزمون باید مقدار زیادی اسید از کربوهیدرات تولید کرده باشد.

هدف

انجام آزمایش متیل‌رد برای تشخیص سویه‌های باکتریایی که از گلوکز اسیدهای قوی تولید می‌کنند، به‌کار می‌رود.

الف) افتراق بین جنس‌ها یا افتراق بین گونه‌ها در یک جنس در خانواده انتروباکتریاسه. آزمایش متیل‌رد بخشی از تست‌های IMViC (Indole- Methylred- Voges- Proskauer- Citrate) می‌باشد.

۱. اشریشیا کلی (+MR) از انتروباکتر آئروژنز (-MR) و انتروباکترکلوآکه (-MR).

انجام شود. احتمال دارد که استوئین (در آزمایش VP) تخریب شود، و نتایج این دو آزمایش برای تشخیص بی‌اعتبار گردد.

د) واکنش متیل‌رد را نمی‌توان با بالا بردن غلظت گلوکز در محیط تسریع نمود.

هـ) نتیجه آزمایش متیل‌رد نباید کمتر از ۴۸ ساعت انکوباسیون تفسیر شود. اعتبار آزمایش MR بستگی به انکوباسیون کافی برای متابولیسم گلوکز دارد. اگر آزمایش MR خیلی زود انجام شود، نتایج اغلب بینابینی یا مثبت کاذب خواهند بود، زیرا ارگانیسم‌های MR مثبت زمان کافی برای متابولیسم کامل محصولات اسیدی اولیه که از تخمیر گلوکز ایجاد شده‌اند، ندارند. بعد از ۲۴–۱۸ ساعت انکوباسیون نتایج MR مثبت کاذب دیده می‌شود.

و) از انجام آزمایش در براث تلقیح شدهٔ خیلی کدر خودداری نمایید. اگر مقدار تلقیح از حداکثر حدود 10^9 سلول زنده در هر میلی‌لیتر بیشتر باشد، رشد باکتریایی مهار می‌شود. هر افزایش لگاریتی در مقدار تلقیح، زمان مورد نیاز برای ارگانیسم‌های MR مثبت را جهت ایجاد محصولات اسیدی کافی برای غلبه‌کردن بر سیستم بافری، افزایش می‌دهد.

ز) آزمایشگاه برای بدست‌آوردن نتایج مناسب و تکرارپذیر باید موارد ذیل را استاندارد نماید: (a) غلظت تلقیح (b) حجم براث و (c) اندازهٔ لولهٔ آزمایش. واکنش نارنجی رنگ اغلب زمانی اتفاق می‌افتد که حجم براث زیاد باشد و تفسیر را مشکل می‌سازد.

مراجع

1. Murray , P.R., et al. 2003. Manual of clinical Microbiology, 8th ed. American society for Microiology, Washington, D.C.

2. Koneman, E.W., et al. 1997.coler Atlas and Textbook of Diagnostic Microbology, 5th ed ,J.B. Lippincott company, Philadelphia, PA.

3. MacFaddin, J.f.2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, th ed. Williams 8 wilkins, Baltinore, MD.

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار
شماره ۱۶۲۷، صندوق پستی: ۷۶۸–۱۴۱۸۵
تلفن: ۸۸۹۶۶۲۳۶–۸۸۹۶۱۸۶۹ نمابر: ۸۸۹۶۰۳۴۵

۲. گونه‌های یرسینیا (V، اغلب +MR) از سایر باسیل‌های گرم منفی غیرروده‌ای (-MR).
۳. افتراق بین کلبسیلا اکسی توکا و کلبسیلا پنومونیه زیرگونه پنومونیه (معمولاً -MR) و کلبسیلا تریجنا (V) از سایر کلبسیلاها (+MR).

ب) آزمایش‌های MR و VP در تشخیص موارد زیر نیز به کار می‌روند:
۱. آئروموناس هیدروفیلا (+VP/ +MR).
۲. گونه‌های لیستریا (+MR/+VP).
۳. همه شیگلاها و سیتروباکتر (+MR).

محیط کشت مورد استفاده

محیط کشت مورد استفاده برای این آزمایش محیط براث MR–VP می‌باشد، که حدود ۲/۵mL در هر لوله (۱۶×۱۲۵mm) تقسیم می‌گردد. این محیط باید در یخچال (۱۰°C–۴) نگهداری شود. نیمه عمر آن ۸ – ۶ هفته می‌باشد.

روش انجام آزمایش

۱. از کشت ۲۴–۱۸ ساعته خالص روی KIA،TSI، مک‌کانکی آگار یا بلادآگار به‌مقدار کم برداشته، در محیط MR-VP تلقیح نمایید.
۲. در پیچ لوله را شل نموده، حداقل به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵°C انکوبه نمایید. (پیشنهاد می‌شود لوله‌ها را به مدت ۵–۳ روز در ۳۰°C انکوبه کنید.)
۳. **۵ قطره اندیکاتور متیل‌رد به آن اضافه نمایید.** در موارد مثبت کاذب پس از ۲۴ ساعت، تا ۲۵ قطره بر روی کشت ۴۸ ساعته می‌توان اضافه کرد و تست منفی خواهد ماند.
۴. نتیجه را بلافاصله بررسی نمایید.

تفسیر نتایج

الف) MR مثبت: کشت کاملاً اسیدی شده و معرف متیل‌رد به‌طور مشخص و پایدار به‌رنگ قرمز روشن (pH=۴/۴) در سطح محیط باقی می‌ماند. میکروارگانیسم‌های MR مثبت اسیدهای بیشتری تولید کرده، بر سیستم فسفات بافر غلبه نموده و محیط را اسیدی نگه می‌دارند.

ب) MR منفی: ایجاد رنگ زرد (pH=۶) در سطح محیط.

ج) واکنش تأخیری (±): ایجاد رنگ تأخیری قرمز و نارنجی بیانگر تولید کم اسید از سوبسترا می‌باشد. آزمایش را تکرار نمایید و انکوباسیون را برای ۴ روز ادامه دهید.

کنترل کیفی

بعد از ساخت هر سری ساخت از محیط و هر batch از معرف باید کنترل‌های مثبت و منفی مورد آزمون قرار گیرند. شامل:

الف) سویهٔ کنترل MR مثبت / VP منفی: Escherichia coli ATCC29522

ب) سویهٔ کنترل MR منفی / VP مثبت: Enterobacter cloacae ATCC13097

انجام آزمایش به روش سریع

در این روش ارگانیسم‌های MR مثبت در مدت ۱۸ ساعت تعیین می‌شوند. از مرکز قلهٔ یک کلنی ایزوله از کشت خالص ۲۴–۱۸ ساعته روی EMB، مک‌کانکی یا بلادآگار برداشته، در ۰/۵mL براث MR-VP تلقیح کنید.

لوله را به‌مدت ۲۴–۱۸ ساعت در ۳۵°C انکوبه نمایید.

بعد از این زمان ۱ قطره معرف MR به لوله اضافه کنید. رنگ قرمز روشن بیانگر واکنش مثبت و رنگ کاملاً زرد بیانگر واکنش منفی می‌باشد.

مطالعات نشان داده که حجم براث کمتر باعث می‌شود ارگانیسم‌ها بهتر در معرض اکسیژن هوا قرار گیرند و ارگانیسم‌های منفی سریع‌تر به pH اسیدی اولیه برمی‌گردند.

محدودیت‌ها

الف) درصد پپتون موجود در محیط کشت روی نتایج متیل‌رد تأثیر می‌گذارد. هر سری ساخت از محیط کشت قبل از استفاده باید با ارگانیسم‌های شناخته شده MR مثبت و MR منفی کنترل شود.

ب) در طی استریلیزاسیون، لوله‌ها را باید برای محافظت از تماس با بخار در ظرفی قرار دهید که آنها را از مایعات میعانی جدا کند. در صورتی که به این موضوع توجه نشود، محیط زرد رنگ می‌شود. محیط باید به شفافیت آب باشد. محیط زرد رنگ، محیط نامناسبی است.

ج) در تشخیص روتین برای افتراق E.coli از اغلب میکروارگانیسم‌های گروه کلبسیلا – انتروباکتر نباید صرفاً به آزمایش‌های MR و VP اعتماد نمود. آزمایش‌های سیترات و اندول (IMViC) باید در ترکیب باتست‌های MR-VP

E-mail:bahar@bird-bahar.com
www.bird-bahar.com