گزارش ارزیابی اشکالات مطرح شده در سه دوره EQAP باکتری سال ۹۹

اشکالات گزارش شده در محیط های کشت میکروبی:

- محیط Blood Agar (بلاد آگار):

محیط تازه و با کیفیت مناسب در رشد باکتری ها تاثیر دارد. گزارش برخی مراکز عدم رشد باکتری روی محیط بلاد آگار بود که بعد از ارسال و مشاهده تصویر پلیت بلادآگار، محیط ها از کیفیت مناسب برخوردار نبودند (رنگ خیلی تیره، کهنه بودن محیط، افزودن خون به محیط خیلی کمتر از میزان استاندارد و ...).

- به طور استاندارد هنگام ساخت محیط بلاد آگار باید ٪۱۰-۵ خون به محیط پایه افزوده شود.
- کیفیت مناسب و تازه بودن محیط در رشد برخی باکتری ها از قبیل استرپتوکک ها و میزان رشد تاثیر دارد.

- محیط EMB Agar:

عدم رشد باکتری gr^- روی محیط: پیشنهاد داده شد محیط جدید و تازه ساخته شود که نتیجه درست بود و باکتری رشد کرد.

- رشد باکتری استاف اورئوس روی محیط EMB:

برخی از سویه های استافیلوکک ها روی محیط EMB رشد می کنند (Partial growth)

- محیط TSI واکنش ALK/ALK برای باکتری انتروباکتریاسه:

- درخواست ارسال تصویر محیط TSI شد که در عکس مشاهده شد محیط TSI عمق بسیار کمی دارد.
- اگر عمق محیط TSI کمتر از استاندارد باشد واکنش ALK/A به صورت ALK/ALK مشاهده خواهد شد.
- به طور استاندارد محیط TSI $\frac{۲}{۳}$ عمق و $\frac{۱}{۳}$ سطح باید باشد.
- در بیشتر تصاویر ارسالی از محیط TSI که واکنش محیط منجر به تشخیص اشتباه شده بود، محیط عمق کم و سطح زیاد داشت.

- محیط اوره:

بیشترین گزارش عدم انطباق محیط کشت ها، مربوط به محیط کشت اوره بود.

- اوره متغیر (یکبار مثبت شد و بار دیگر منفی)
- اوره مثبت در صورتی که باکتری ارسالی اوره منفی بود.

پاسخ: جهت اطمینان از صحت عملکرد محیط های کشت میکروبی به خصوص محیط های مهم و حساس مثل اوره حتما قبل از انجام تست های تشخیصی باید محیط ها را کنترل کیفی نمود (توصیه می شود حتی در خصوص محیط های کشت تجاری هم کنترل کیفی انجام شود).

- محیط کشت لایزین آیرون آگار: بطور کلی واکنشهای محیط لایزن آیرون آگار به روش زیر است.

- عمق محیط لایزین ← واکنش دکربوکسیلاسیون
- سطح محیط لایزین ← واکنش دامیناسیون
- LIA (لایزین دکربوکسیلاسیون) منفی یعنی عمق محیط زرد شود.
- لایزین دآمیناسیون منفی یعنی سطح محیط بنفش بماند.
- لایزین دآمیناسیون مثبت یعنی سطح محیط قرمز جگری شود.

Technical error گزارش خطاهای تکنیکی

- تست اکسیداز:

- گزارش عدم وجود تست های اولیه کلیدی مانند اکسیداز در برخی آزمایشگاه ها و به تبع آن عدم امکان تشخیص صحیح باکتری .
- گزارش تست اکسیداز مثبت برای باکتری اکسیداز منفی
- مشخص گردید که برخی اپراتورها و کارشناسان جهت انجام تست اکسیداز از روی محیط EMB و مک کانکی کلنی برداشته اند.

*انجام تست اکسیداز از روی محیط هایی مثل EMB، مک کانکی، SS و ... می تواند منجر به نتیجه مثبت کاذب (False Positive) شود.

- محیط کشت هایی که جهت انجام تست اکسیداز مجاز هستیم از روی آنها کلنی باکتری را برداریم شامل: بلاد آگار- شکلات آگار- مولرهینتون آگار- نوتریت آگار- BHI آگار و ...
- برای تست اکسیداز ترجیحا باید از محیط بلاد آگار یا شکلات آگار تازه استفاده شود.
- تست اکسیداز جزو تست هایی است که باید در هر بار انجام تست، هم زمان کنترل کیفی شود واز باکتری های اکسیداز مثبت و منفی به عنوان شاهد استفاده شود.
- تست اکسیداز در صورتی که بلافاصله تا ۱۰ ثانیه تغییر رنگ داد باید مثبت در نظر گرفته شود، در غیر این صورت در زمانی طولانی حتی در باکتری های اکسیداز منفی هم ممکن است تغییر رنگ خفیف مشاهده شود.

- گزارش عدم وجود جداول تشخیصی مناسب در برخی آزمایشگاه ها

- تعدادی از آزمایشگاه ها جداول تست های تشخیص باکتری Aeromonas را نداشتند.
- تعداد از آزمایشگاه ها جداول تست های تشخیصی باسیل های گرم مثبت و Listeria را نداشتند.
- استفاده از جداول -/+ و عدم استفاده از جداول درصدی
- برخی آزمایشگاه ها صرفا از جداول -/+ استفاده می کنند که گاهی موجب می شود به تشخیص صحیح نرسند.

- باکتری Morganella ارسالی، اندول منفی بود. بسیاری از آزمایشگاه ها به دلیل استفاده از جداول -/+ عنوان کرده بودند که مورگانلا اندول مثبت است. در صورتی که در کتاب های مرجع میکروب شناسی معتبر که جدول خانواده انتروباکتریاسه را به صورت درصدی گزارش کرده اند، تست اندول باکتری مورگانلا صددرصد مثبت نیست و بنابراین احتمال جدا کردن سویه های اندول منفی این باکتری هم وجود دارد.

- گزارش خطا در رنگ آمیزی گرم و مشاهده مورفولوژی باکتری

- بهترین گزینه کنترل کیفی رنگ گرم است.

- یک مورد گزارش باسیل gr^+ در حالی که باکتری ارسالی gr^- بود.

- گزارش عدم تشخیص باکتری:

تعدادی از آزمایشگاه ها گزارش کرده بودند که نمی توانند باکتری را تشیخص دهند بعد از بررسی مشخص گردید که تست ها درست جواب داده اند ولی کارشناسان نمی توانند تشخیص بدهند.

بعنوان مثال به علت عدم تشخیص صحیح باکتری Salmonella Paratyphi A را shigella تشخیص داده بودند در حالی که Salmonella حرکت مثبت و shigella حرکت منفی است.

- در یک مورد برای باکتری gr^- تست CAMP گذاشته بودند و علت آن را همولیز باکتری عنوان کرده بودند (بسیاری از باکتری های gr^- همولیز دارند بعلاوه تعداد زیادی از باکتری های gr^+ و این بدان معنی است که فقط استرپ آگالاکتیه همولیزدار نمی باشد.)
- عدم استفاده از تست بایل آسکولین برای باکتری های gr^- (ممکن است به اشتباه تصور شود که بایل آسکولین فقط برای باکتری های gr^+ از قبیل انتروکک کاربرد دارد.)
- برخی آزمایشگاه ها وقتی نمی توانند به تشخیص برسند، احتمال آلودگی نمونه را می دهند. جهت رفع این اشکال باید از ابتدا مرحله به مرحله تست هایی که انجام داده اند را مورد بررسی و ارزیابی قرار دهند و سپس با جداول مقایسه کنند.
- **در برخی گزارش ها قید شده بود که نمونه آلوده است. درخواست تکرار کشت شد که در کشت مجدد ایراد برطرف شد.**

- نمونه های باکتری که ارسال می شوند، قبل از ارسال در چندین مرحله کنترل می شوند و از نظر خلوص و عدم آلودگی مورد ارزیابی قرار می گیرند.

- در خیلی مواقع مشاهده دو نوع کلنی متفاوت در واقع Strain های مختلف همان باکتری است و ممکن است در اثر پاساژهای مکرر باکتری رخ دهد.

- در برخی موارد ممکن است در حین کار بعلت خطای تکنیکی نمونه ها آلوده شوند در تعدادی تصاویر ارسالی که گزارش آلودگی را داده بودند، کلنی ها یک دست و غالب با رشد زیاد در پلیت مشاهده می شد که در یک گوشه پلیت تعدادی به صورت تک تک کلنی ناخالصی رشد کرده بود. این مدل رشد باکتری کاملا بیانگر خطای تکنیکی در حین کار و موقع کشت دادن باکتری است.

- گزارش عدم رشد باکتری روی پلیت که درخواست تصویر پلیت شد. عکس پلیت مشاهده شد و باکتری روی پلیت رشد کرده بود. (اندازه کلنی در باکتری های مختلف متفاوت است و گاهی کلنی باکتری ها ریز هستند.)

- احتمال آلودگی باکتری M1 با باکتری M2 در حین کار

- گزارش مشاهده جلای فلزی در باکتری ولی گالری E.Coli نشد:

- جلای فلزی فقط در باکتری E.Coli مشاهده نمی شود و سایر باکتری ها از قبیل Citrobacter، Enterobacter، Yersinia و ... هم ممکن است کلنی هایی با جلای فلزی داشته باشند.
- **طبق گزارش برخی آزمایشگاه ها، باکتری ارسالی اکسیداز مثبت بود ولی کارشناسان در جدول انتروباکتریاسه به دنبال جواب بودند.**

گزارش تشخیص E.Coli بدون چک کردن تست اکسیداز باکتری:

- در بسیاری موارد گالری باکتری Aeromonans در صورت عدم انجام اکسیداز ممکن است با باکتری های اعضای خانواده انتروباکتریاسه مثل E.Coli، کلبسیلا و انتروباکتر اشتباه گرفته شود و تست ها افتراقی (۵ لوله) کاملا شبیه آنها واکنش دهد.
- در یک مورد گزارش تست اوره مثبت جواب داده بود ولی چون به هیچ باکتری در جدول نمی خورد، اوره را منفی در نظر گرفته بودند.

در یک مورد گزارش تست اوره قوی و شدید مثبت شده بود ولی تست دآمیناسیون باکتری منفی شده بود، که طبق بررسی مشخص شد از محیط فنیل آلانین تاریخ مصرف گذشته استفاده شده بود.

- در بین اعضای خانواده (انتروباکتریاسه جنس پروتئوس و مورگانلا جزو باکتری هایی هستند که اوره مثبت قوی هستند. (پروتئوس های آنزیم اوره آز قوی دارند) ولی تست فنین آلاین دآمیناز آنها باید مثبت شود.

- گزارش باکتری کاتالاز مثبت ولی در جدول استرپتوکک ها به دنبال تشخیص بودند.

- گزارش باکتری تست MR منفی در صورتی که باکتری ارسالی MR مثبت بود. توصیه میشود کنترل کیفی محیط ها انجام شود.

- گزارش تست CAMP منفی برای باکتری استرپ آگالاکتیه در حالی که کنترل مثبت CAMP جواب داده بود.

- توصیه می شود جهت انجام تست CAMP، باکتری مجهول و سویه کنترل مثبت این تست، هر دو روی یک محیط بلاد آگار گذاشته شود.