ارزیابی نتایج باکتری شناسی دوره EQAP-45

چالش های تشخیصی و راهکارها

دکتر شهروز همتی

عناوین مورد بحث

- مقدمه
- گزارش آماری نتایج باکتریها
- ملاحظات کلی درشناسایی باکتریهای پلزیوموناس, شیگلا و اشریشیا کولای
- نکات کلیدی درتفسیر تستهای بیوشیمیایی

هدف از ارسال نمونه های کنترل کیفی خارجی

- متاسفانه آزمایشگاهها در مورد نتایج نمونه های باکتری شناسی با روشهای مختلف و حتی تبادل نظر ?با همکاران میخواهند به جواب درست برسندوثبت نتایج را تا روزهای پایانی به تاخیر می اندازند گرچه مشاوره امری پسندیده است ولی وجودنمونه های مختلف موجب میشود که این مشاوره ها گاهی نتایج عکس در پی داشته باشد.
- ارسال نمونه های خارجی روشی جهت ارزیابی و افزایش توان تشخیصی آزمایشگاههای میکروبشناسی بوده و استفاده ازاین توان درشناسایی طغیان های عفونت های باکتریال در کشور بسیار مهم است.
- آزمایشگاهها بایستی با مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج مورد انتظار به بررسی علل اشتباهات تستهای تشخیصی ورفع آن پرداخته تا در دوره بعد و مهمتر از آن در شناسایی عفونت های باکتریال بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه از این نتایج استفاده نمود.
- در نهایت یافتن منابع خطا در محیط ها ی کشت و روشهای تشخیصی وبعضا جداول مورد استفاده موجب ارتقا و بهبود کیفیت روشهای تشخیصی در میکروبشناسی خواهد شد.

- ۱-زمان گزارش
- ارسال نمونه های دوره ۴۵از ۲۹مرداد آغاز و در ۱۲مرداد پایان یافت و تا ۲۲شهریور تا ۲۰ شهریور ادامه یافت.
- از مجموع جوابهای دریافتی (۵۸٪) تا پایان مهلت ارسال جواب و ۴۲٪ در زمان تمدید جوابهایشان ثبت شده است.
- ۲-نحوه ثبت گزارش
- الف)بدون تشخیص
- ب) دارای تشخیص
- ج)تشخیص درست با تستهای کلیدی کاملا اشتباه
- د)انتخاب تستها درست ولی تشخیص اشتباه
- ه)تشخیص درست با چند تست ساده
- ۳-نوع باکتریهای ارسالی : در ۱۲ دوره گذشته هر کدام از باکتریهای بیش از یک بار برای همکاران ارسال شده و این نکته را بایستی همکاران توجه کنند و اشتباهات گذشته را تکرا نکنند.
- ۴-با توجه به زمان جوابدهی کشت مدفوع در آزمایشگاهها که به طور معمول ۲-۳ روز طول می کشد و نمونه های ارسالی کشت خالص باکتریست و احتیاجی به به محیطهای انتخابی افتراقی و محیطهای غنی کننده ندارد این بازه زمانی طولانی جهت ثبت جواب ها قابل توجیه نیست.

بررسی نتایج باکتری پلزیوموناس شیگلوئیدس

	تعداد	درصد		تعداد	درصد
نمونه های فرستاده شده	۸۹۸		تشخیص های درست	۲۳۰	۲۷/۲۵
جوابهای دریافتی(تعداد موارد ثبت شده)	۸۶۰	۹۵/۷۷	تشخیص های نیمه درست	۰	۰
جوابهای دارای تشخیص	۸۴۴	۹۸/۱۴	تشخیص های اشتباه	۶۱۴	۷۲/۷۵
جوابهای بدون تشخیص	۱۷	۱/۹۸			
تشخیص پانل M1-1 زیرگروه یک					]Plesiomonas shigeloides

پلزیوموناس شیگلوئیدس

- پلزیوموناس شیگلوئیدس یکی از عوامل عفونت های دستگاه گوارشی است.باکتری گرم منفی و تنها عضو اکسیداز مثبت خانواده انتروباکتریاسه و روی محیطهای EMBرشد ضعیف یا بدون رشد و روی مک کانکیرشد مناسب وروی XLD (کلنی های قرمز)رشد میکند.روی SBA بدون همولیز است.تست کلیدی برای تشخیص این باکتری اکسیداز است. بایستی از سایر باکتریهای گرم منفی اکسیداز مثبت (آئروموناس ویبریو وغیر تخمیر کننده ها) افتراق داده شود.روی TCBS رشد نمیکند
- تست های ODC,LDC,ADH هرسه مثبت است
- تست Dnase منفی است.
- برروی محیط TSI و KIAبه صورت K/A G- است
- اندول منفی لاکتوز منفی و ONPG منفی است.
- با آنتی سرم های شیگلا ممکن است کراس ری اکشن داشته باشد.

بررسی نتایج باکتری شیگلا سونه ای سروگروپ د

	تعداد	درصد		تعداد	درصد
نمونه های فرستاده شده	۹۴۳		تشخیص های درست	۴۶۱	۵۴/۴۳
جوابهای دریافتی(تعداد موارد ثبت شده)	۸۶۸	۹۲/۰۵	تشخیص های نیمه درست	۲۳۹	۲۹/۴۰
جوابهای دارای تشخیص	۸۴۷	۹۷/۵۸	تشخیص های اشتباه	۱۳۷	۱۶/۱۷
جوابهای بدون تشخیص	۲۰	۲/۳۰			
تشخیص پانل M1-1 زیرگروه یک			Shigella soneii sero group D		

در مقایسه نتایج با دوره ۴۲(شیگلا فلکسنری) به نظر می رسد که :

درصد تشخیص های درست افزایش یافته و درصد تشخیص های اشتباه و درصد تشخیص های نیمه درست نیز کاهش یافته است.

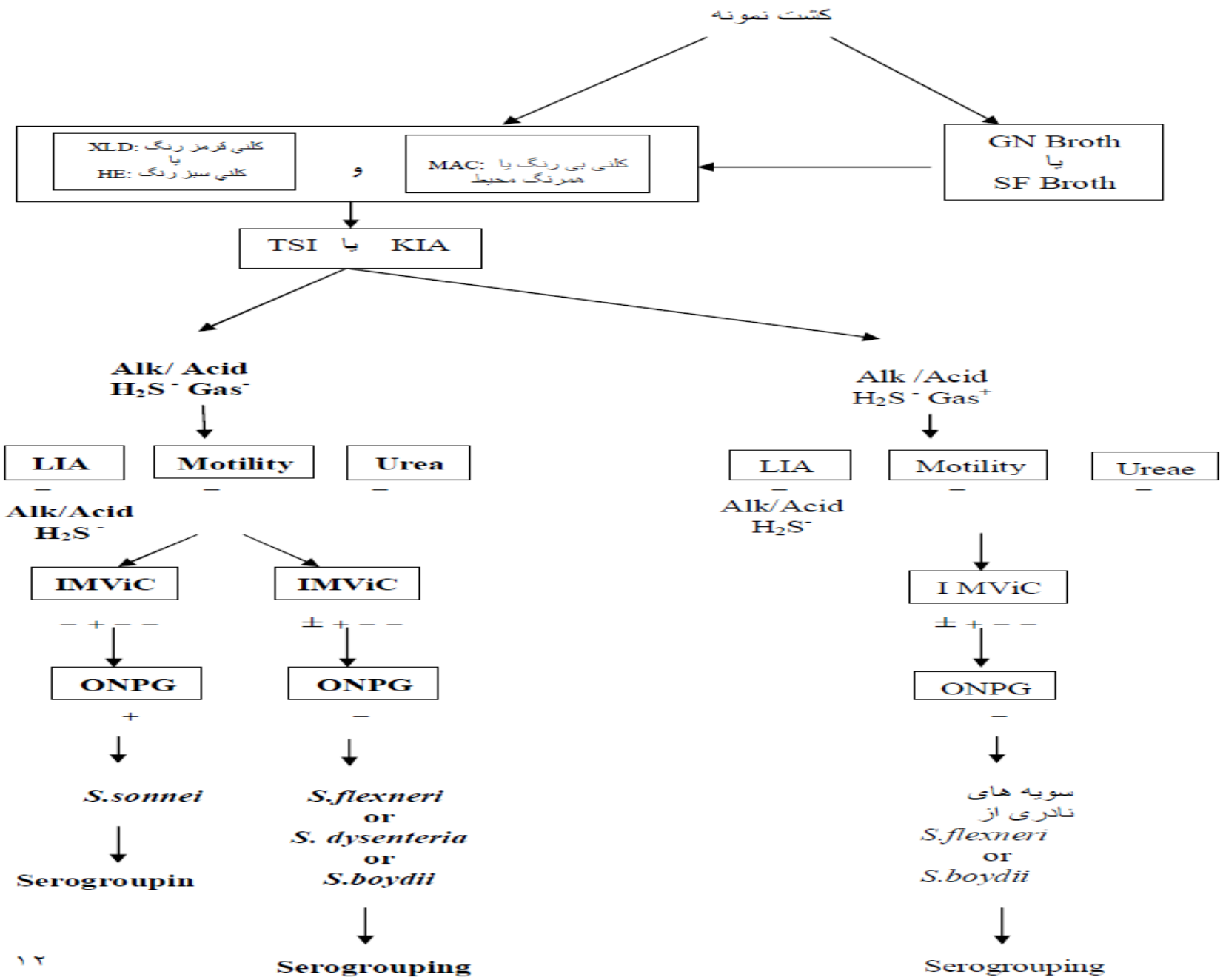
	تعداد	درصد		تعداد	درصد
نمونه های فرستاده شده	906		تشخیص های درست	309	36.48
جوابهای دریافتی(تعداد موارد ثبت شده)	860	94.92	تشخیص های نیمه درست	379	44.75
جوابهای دارای تشخیص	847	98.49	تشخیص های اشتباه	159	18.77
جوابهای بدون تشخیص	13	1.51			
تشخیص پانل M1 -2 دوره42			*Shigella flexneri* (serogroup B)		

نتایج دوره ۴۲

Shigella flexneri (serogroup B)

- ازمجموع آزمایشگاههایی که جوابشان دارای تشخیص درست بوده و سروگروه شیگلا را گزارش کرده اند. فقط ۴۰آزمایشگاه ۴/۷۳درصد از تست سروگروپینگ استفاده کرده و نتایج راگزارش نموده اند.
- علل
- فقط بر اساس تستهای شیمیایی نتیجه را گزارش کرده اند.
- آنتی سرم استفاده کرده ولی جواب ثبت نکردند.
- استفاده نکرده ولی جواب ثبت کرده اند.
- در شناسایی شیگلا استفاده از جداول استاندارد کتب مرجع و سایت معتبر تشخیصی انلاین و آنتی سرم توصیه میشود.
-

فلوچارت ۱ : جداسازی، غربالگری و تشخیص بیوشیمیایی شیگلا



واکنشهای بیو شیمیایی تشخیصی شیگلا [3]:

BIOCHEMICAL TEST	*S. DYSENTERIAE*	*S. FLEXNERI*	*S. BOYDII*	*S. SONNEI*
Serogroup	A	B	C	D
ONPG	−	−	−	+
Ornithine decarboxylase	−	−	−	+
Fermentation of:				
Lactose	−	−	−	−
Mannitol	−	+	+	+
Raffinose	−	D	−	−
Sucrose	−	−	−	−
Xylose	−	−	D	−
Indole production	D	D	D	−

+, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; D, different strains positive/negative.

Escherichia coli

	تعداد	درصد		تعداد	درصد
نمونه های فرستاده شده	۱۸۴۷		تشخیص های درست	۱۵۷۰	۹۲/۵۲
جوابهای دریافتی(تعداد موارد ثبت شده)	۱۷۳۳	۹۳/۸۳	تشخیص های نیمه درست	۵۸	۳/۴۲
جوابهای دارای تشخیص	۱۶۹۷	۹۷/۹۲	تشخیص های اشتباه	۶۹	۴/۰۷
جوابهای بدون تشخیص	۳۶	۲/۰۸			
تشخیص پانل 3 دوره۴۵			Escherichia coli		

سروگروپینگ

- تعیین سروگروه با آنتی سرم های پلی والان Oانجام میشود
- تعیین سروتایپ با آنتی سرم های منووالان انجام می گیرد.
- بروشور کیت به دقت مطالعه شود.
- از محیطهای انتخابی مانندMAC,XLD استفاده نشود.
- اگر در قطره کنترل(سرم فیزیولوژی) اتوآگلوتیناسیون مشاهده شد به دلیل کلنی های خشن یا استفاده از محیطهای TSI,KIAاست از SBAاستفاده شود.
- اگر از نظر بیوشیمی به باکتری مورد نظر شک داشتیم ولی واکنش با آنتی سرم منفی یا ضعیف بود به دلیل وجود آنتی ژن کپسولی است.بدین منظور سوسپانسیونی غلیظ از باکتری تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه قرار داده پس از سرد شدن مجددا آزمایش انجام شود.

	پلزیوموناس	شیگلا	اشریشیا کولای	%
تعداد جوابهای ثبت شده	868	868	1733	----
Gam satin	GNB 789(%77.95)	GNB 802(%81.67)	GNB 1619(%85.85)	%77.3
Oxidase	POS 381(%65.35)	NEG 309(%82.02)	NEG 491(%94.7)	%30.1
Catalase	POS 233(%75)	POS 157(%88.54)	POS 279(%68.82)	%19.2
Motiliy	POS 668(%46.86)	NEG 709(%87.31)	POS 1420(%90.56)	%63.4
Indole	POS 714(%67.09)	NEG 774(%87.21)	POS 1427(%83.6)	%67.4
MR	POS 618(%89.97)	POS 681(%95.45)	POS 1386(%98.34)	%67.3
VP	NEG 552(%94.75)	NEG 536(%95.25)	NEG 1233(%97.89)	%47.8
Citrate	NEG 740(%97.16)	NEG 784(%97.58)	NEG 1579(%94.81)	%80.4
TSI	K/AG- 741(%76.38)	K/AG- 808(%83.91)	A/AG+ 1616(%51.9)	%45.7
H2S(TSI)	NEG 425(%98.12)	NEG 461(%97.4)	NEG 905(%98.01)	%56.8
ONPG	POS 250(%73.6)	POS 271(%81.55)	POS 453(%84.99)	%27.8
Urease	NEG 689(%95.07)	NEG 712(%97.33)	NEG 1397(%96.41)	%76.9
LIA	K/K 231(%51.52)	K/A 343(%84.55)	K/K 528(%66.29)	%17.5
LDC	POS 230(%56.09)	NEG 210(%82.38)	POS 412(%85.44)	%21.2
ODC	POS 102(%87.25)	POS 74(%77.03)	POS115(%82.61)	%8.7
PAD	NEG 96(%97..92)	NEG 78(%97.44)	NEG 154(%98.7)	%10.5
Serogrouping	? 14(%92.86)	YES38(%4.41)	YES 7 (%28.57)	%3.93

نکات کاربردی در تستهای افتراقی

- Gram stain
- Oxidase
- Catalase
- Indole
- MRVP
- Citrate
- TSI
- LIA
- LDC
- urea
- ONPG

رنگ آمیزی گرم

اصول:

رنگ آمیزی گرم یک روش تشخیصی مهم در میکروبشناسی جهت تشخیص احتمالی و سریع عوامل عفونی است. این آزمایش برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل ، اندازه و مورفولوژی سلول بر اساس واکنش گرم آنها به کار میرود.

نمونه:

محیط های کشت جامد ، مایع و نمونه های بالینی

نمونه های بالینی تازه باید جوان بوده و کمتر از ۲۴ ساعت عمر داشته باشد.

نمونه برداشت شده از محیطهای غیر انتخابی بهترین نتیجه را میدهد .

اساس:

واکنش ترکیبات دیواره سلولی با رنگ های مورد استفاده

رنگ آمیزی گرم

دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت دارای یک لایه ضخیم پپتیدوگلیکان بوده(۹۰٪ دیواره سلولی) در صورتی که دیواره سلولی باکتری های گرم منفی یک لایه نازک پپتیدوگلیکان(حدود ۱۰ درصد)و مقدار زیادی لیپید دارد.

در هنگام رنگ آمیزی ابتدا یون های مثبت کریستال ویوله وارد دیواره سلولی باکتری شده و به ترکیباتی که دارای شارژ منفی هستند متصل میشود

ید که اضافه شدبه همراه ضخامت چند لایه پپتید و گلیکان دیواره سلولی موجب می‌شود که در دیواره سلولی باقی مانده و در اثر رنگ بر شسته نشده و بنابراین ارغوانی باقی می ماند

رنگ برموجب تخریب غشای خارجی باکتری های گرم منفی می شود

در هنگام رنگ آمیزی دیواره چند لایه پپتیدوگلیکان باکتری های گرم مثبت به وسیله الکل دهیدراته شده و این موضوع به همراه ضخامت چند لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی با مقادیر زیادی کمپلکس در دیواره سلولی باقی مانده و در اثر رنگبری خارج نشود. بنابراین ارغوانی باقی می ماند

رنگ زمینه که اضافه شد(سافرانین وکربول فوشین) باکتری های گرم مثبت ارغوانی و باکتری گرم منفی رنگ زمینه را به خود میگیرد

رنگ آمیزی گرم

تهیه گسترش:گسترش مناسب باید با تراکم مناسب از میکروارگانیسم باشد تا آرایش آنها مشخص شود. از لام های تمیز و نوکه ترجیحابا الکل تمیز شده اند استفاده شود

ثابت کردن گسترش :

حرارت:ابتدا اجازه می دهید تا گسترش در مجاورت هوا خشک شود(در محیط آزمایشگاه یا انکوباتور)لام را از روی شعله عبور دهید.حرارت دادن زیادموجب سوختگی و تغییر شکل سلول‌ها می‌شود.

متانول:بعد از خشک شدن لام چندقطره متانول راروی گسترش ریخته و اجازه میدهیم یک دقیقه بماندو خشک شود

بهترین روش ثابت کردن لام خصوصاً در نمونه های بالینی استفاده ازمتانول است زیرا موجب حفظ مورفولوژی باکتریها و گلبولهای سفید و قرمزمیشود

به علت عدم لیز شدن گلبول های قرمززمینه لام واضح تر می گردد.

رنگ آمیزی گرم

- توصیه ها:
- تطابق نتایج رنگ آمیزی گرم با سایر یافته های آزمایشگاهی
- پیروی دقیق از دستورالعمل های رنگ آمیزی جهت کسب نتایج صحیح

- مشاهده میکروارگانیسم در صورت منفی بودن کشت :
- حضور عوامل ضد میکروبی
- باکتری هایی که در شرایط معمول رشد نمی کنند
- آلودگی معرف ها و لوازم

- نتایج نادرست ممکن است ناشی از نامناسب بودن کیفیت نمونه ها باشد
- نتایج واکنش گرم در نمونه های تازه ممکن است با نمونه های کهنه کاملا متفاوت باشد.
- انجام آزمایش بر روی نمونه های تازه(۱۸ تا ۲۴ ساعته) زمانی که باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد بوده و مورفولوژی و سایر خصوصیات آنها در بهترین شرایط می باشد.
- رنگ ها، آب یا رنگ برها را مستقیماً روی اسمیر نریزید. قطره های معرف را نزدیک انتهای لام ریخته و اجازه دهید معرف روی سطح اسمیر را بپوشاند

رنگ آمیزی گرم

- عوامل رایجی که موجب رنگ آمیزی نامناسب می شوند
- لام های شیشه ای چرب و کثیف(اتانول ٪۹۵)
- گسترش خیلی ضخیم
- حرارت دادن زیاد هنگام فیکساسیون لام
- آبکشی زیاد در حین شستشو
- رنگبری زیاد

رنگ آمیزی گرم

- روش هوکراستفاده از سافرانین
- روش کوپلوف استفاده از کربول فوشین :
- این روش برای مشاهده و افتراق بهتر باکتری های بی هوازی، کمپیلوباکتر، پیشنهاد می شود که ممکن است با روش هوکر به آسانی و خیلی زیاد تحت تأثیر رنگ بر، رنگ خود را از دست داده و کمرنگ رنگ بگیرند. این روش همچنین برای اسمیرهای واژن در تشخیص واژینوزیس باکتریایی پیشنهاد می شود
- نتایج مورد انتظار
- باسیل های گرم منفی صورتی
- باکتری های گرم مثبت بنفش
- کنترکیفی
- Escherichia coli (ATCC 25922) صورتی
- Staphylococcus aureus(ATCC 25923) بنفش پررنگ

رنگ آمیزی گرم

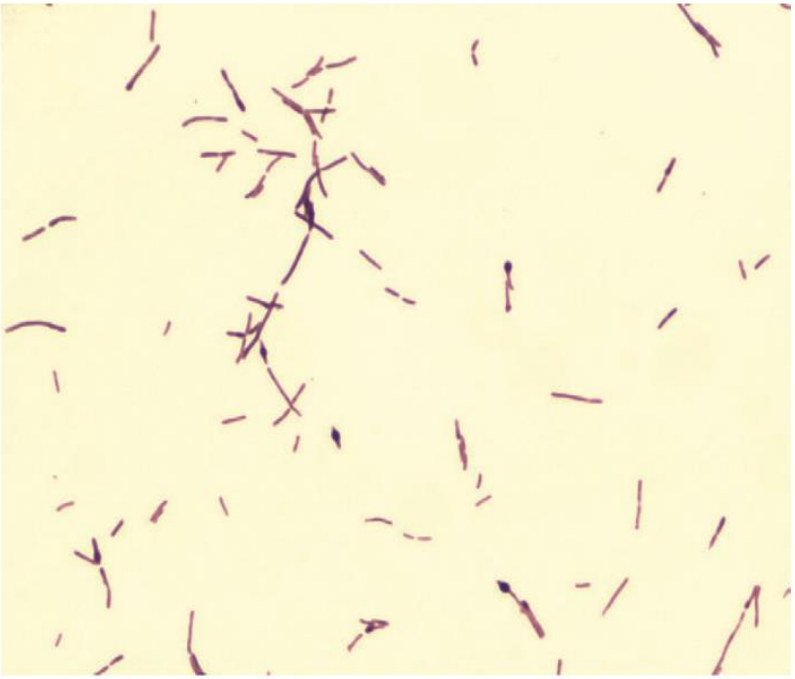


Figure 22-2 Gram stain of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in culture. Note the variable lengths of the rods and the "gram-negative" appearance.

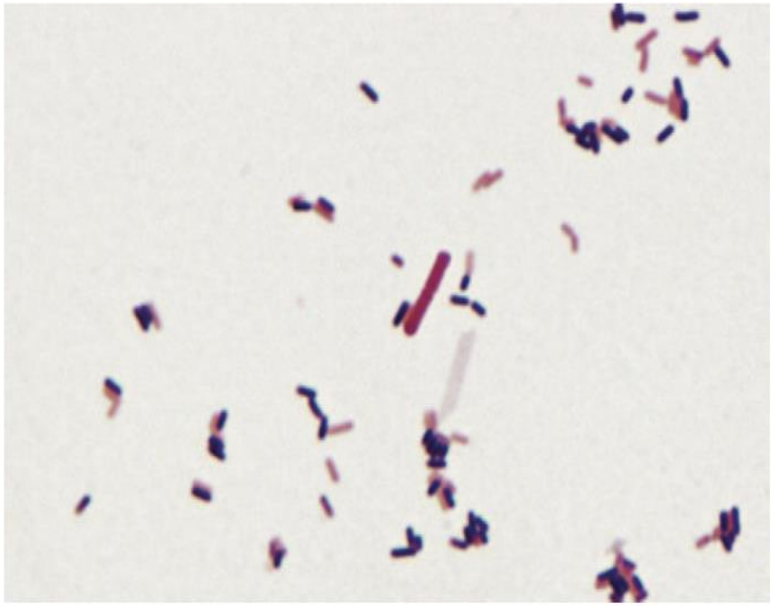


Figure 22-1 Gram stain of *Listeria monocytogenes* in culture. *Listeria* appear as small gram-positive rods; some readily decolorize and appear gram-negative. The much larger gram-negative rod in the center of the photograph is *Escherichia coli*.

نکات کاربردی رنگ آمیزی گرم

- گرم مثبت گرم منفی رنگ بگیرد:
- ۱-عدم حفظ کریستال ویوله توسط دیواره سلولی باکتری به دلیل آسیب به دیواره سلولی باکتری
- الف)آنتی بیوتیک درمانی
- ب) فیکساسیون حرارتی بیش از حد
- لوگل کهنه

- گرم متغیر:
- الف)دکلره کردن بیش از حد(در باکتریهای گرم مثبت یا گرم منفی)
- ب) باکتریها در فاز رشد لگاریتمی نیستند(کشت کهنه)ونازک شدن پپتیدوکلیکان دیواره سلولی.

- گرم منفی گرم مثبت رنگ بگیرد:
- الف)ضخیم بودن بیش از حد اسمیر
- ب)فیکساسیون نامناسب

عواملی که بر موفولوژی باکتریها تاثیر می گذارند

- الف) کشت کهنه
- ب)باکتریهای دارای آنزیم های اتولیتیک
- ج)اسمیر گرفته شده از محیط حاوی آنتی بیوتیک
- د)نمونه های گرفته شده از بیماران تحت آنتی بیوتیک تراپی
- ه)وجود آرتیفکت :در رنگ سافرانین وجود اجسام کوکوئید گرم مثبت ذاتی است
- و) آلودگی معرفها
- ز)برخی باکتریها با رنگ گرم رنگ نمی گیرند(لژیونلا)
- ح)وجود تعداد کم باکتری در نمونه(کشت خون)

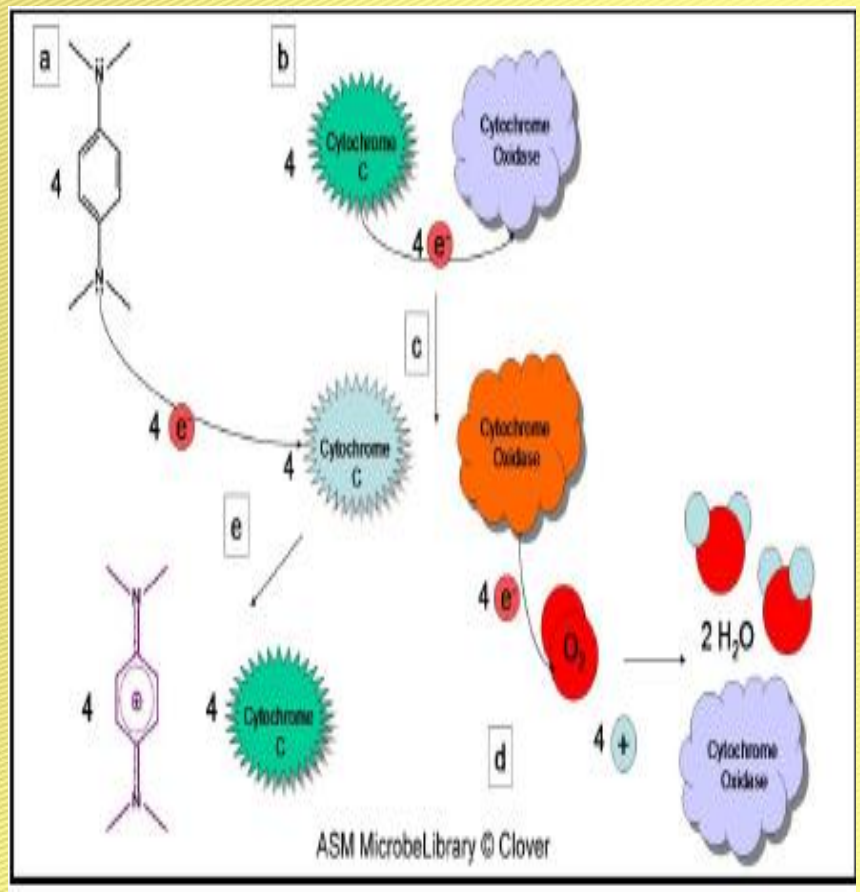
اکسیداز

- در سال ۱۹۲۸ گوردون و مک لئود از محلول دی متیل پارافنیلن دی آمین دی هیدرو کلراید جهت بررسی حضور اکسیداز در باکتری ها استفاده نمودند.(نایسریا گنوره مثبت و استافیلوکوک و استرپتوکوک منفی) به سرعت حساسیت این آزمایش با استفاده از محلول کوآکس (تترا متیل پارا فنیلن دی آمین دی هیدروکلراید) افزایش یافت.
- Gaby&Hadely از روش تغییر یافته اکسیداز (از پارا دی متیل آنیلین اگزالات به همراه آلفا نفتول)استفاده نمودند

اکسیداز

- هدف:
- بررسی وجود آنزیم سیتوکروم اکسیداز (ایندو فنل اکسیداز)در باکتری است. باکتری های دارای این آنزیم موجب تغییر رنگ معرف از حالت بی رنگ به ارغوانی یا بنفش می شوند.
- اساس:
- آخرین مرحله در زنجیره انتقال الکترون در تنفس سلولی استفاده از آنزیم سیتوکروم اکسیداز است. آنزیم سیتوکروم Cرا اکسیدو اکسیژن را احیا و به آب تبدیل می کند. در این آزمایش تترامتیل پارافنیلن دی آمین دی هیدروکلراید به جای سیتوکروم c به عنوان گیرنده الکترون عمل نموده و رنگ آن ازمحلول بی رنگ به آبی پررنگ یا ارغوانی تغییر می کند.

اکسیداز



- معرف اکسیداز (TMPD)در حالت احیا غنی از الکترون بوده و بی رنگ است.
- در باکتریهای اکسیداز مثبت به طور موقت یک الکترون از چهار سیتوکروم c گرفته شده و به آنزیم منتقل می شود
- بنابراین ۴ سیتوکروم c و فقیر از الکترون و یک آنزیم سیتوکروم اکسیداز غنی از الکترون ایجاد میشود در مرحله نهایی تنفس سلولی آنزیم سیتوکروم c اکسیداز الکترون خودش را به اکسیژن مولکولی منتقل نموده و دو مولکول آب تشکیل می شود در نهایت سیتوکروم c اکسیداز حالت پایه بر میگردد
- سیتوکروم c به جای کسب یک الکترون از سایر اجزا در زنجیره انتقال الکترون الکترون خودش را از TMPDگرفته به حالت پایه برمیگردد در انتها TMPDاکسید شده و رنگ آن آبی تیره می گردد.

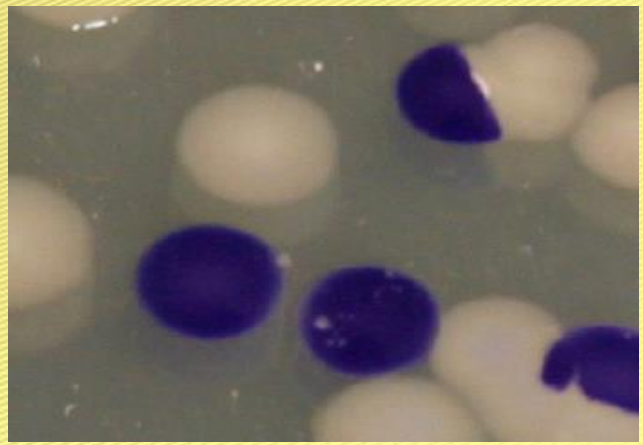
اکسیداز

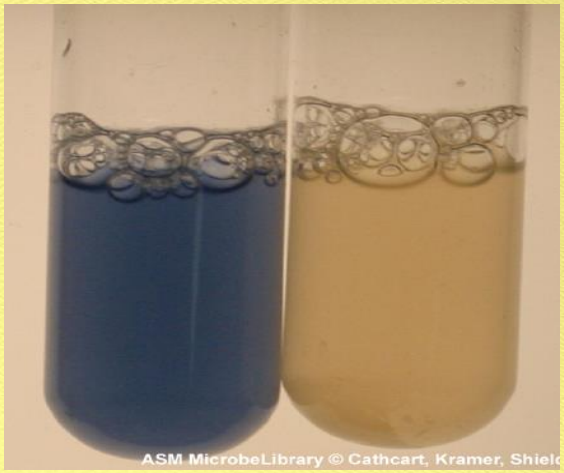
- معرفها:
- الف) معرف کواکس: محلول یک درصد TMPDدر آب
- در شیشه قهوه ای و در یخچال به مدت یک هفته پایدار است
- ب) معرف : Gordon&MC leodمحلول یک درصد DMPDدر آب
- در شیشه قهوه ای و یخچال به مدت یک هفته پایدار است.
- می‌گردد.هردو معرف سمی هستند ولی مشتقات تترا متیل حساس تر است.
- روش:
- این آزمایش به چهار روش انجام می شود
- روش کاغذ صافی یا دیسک آغشته به معرف
- روش نقطه ای
- روش مستقیم بر روی پلیت
- روش لوله ای

اکسیداز

ASM MicrobeLibrary © Cathcart, Kramer, Shields

ASM MicrobeLibrary © Cathcart, Kramer, Shields




ASM MicrobeLibrary © Cathcart, Kramer, Shiel

اکسیداز

- اکسیداز مثبت: تغییر رنگ کاغذ صافی بعد از ۵ تا ۱۰ ثانیه
- اکسیداز مثبت تاخیری: تغییر رنگ ۶۰ تا ۹۰ثانیه
- اکسیداز منفی: تا دو دقیقه تغییر رنگ مشاهده نشود
- کنترل کیفی
- کنترل مثبت سودوموناس آئروجینوزا
- کنترل منفی اشیریشیا کولای
- هرگز در روش دیسک اکسیداز , دیسک را با آب مقطر مرطوب نکنید .رطوبت کلنی ها برای انجام واکنش کفایت میکند.

اکسیداز

- نکات کاربردی:
- معرف های اکسیداز تمایل به اکسیداسیون داشته بنابراین بایستی تازه تهیه شوند. محلول آماده شده بیش از یک هفته پایدار نیست روند اکسیداسیون را می‌توان با اضافه کردن محلول یک درصد آسکوربیک اسید کند نمود
- لوپهای آهنی نیکل ویا سایر فلزات ممکن است نتایج مثبت کاذب ایجاد نمایند
- بنابراین بهتر است از نوع پلاتینیوم یا اپلیکاتور های چوبی یا پلاستیکی استفاده نمود
- فعالیت آنزیم اکسیداز دررشد باکتری بر روی محیط های غنی از گلوکز مهار TSIمی شود بنابراین بهتر است از محیطهایی که غلظت قند آنها بالا نیست مانند نوترینت آگار و تریپتیکیس سوی آگاراستفاده نمود
- باکتری هایی که روی محیط های انتخابی رشد نموده اند به دلیل ایجاد رنگ نتایج گمراه کننده ایجاد می کنند(MCA,EMB)
- معرف اکسیداز منجر به کشته شدن باکتری می گردد بنابراین از روی محیطی که تست اکسیداز بر روی آن انجام شده نباید کشت مجدد تهیه نمود.

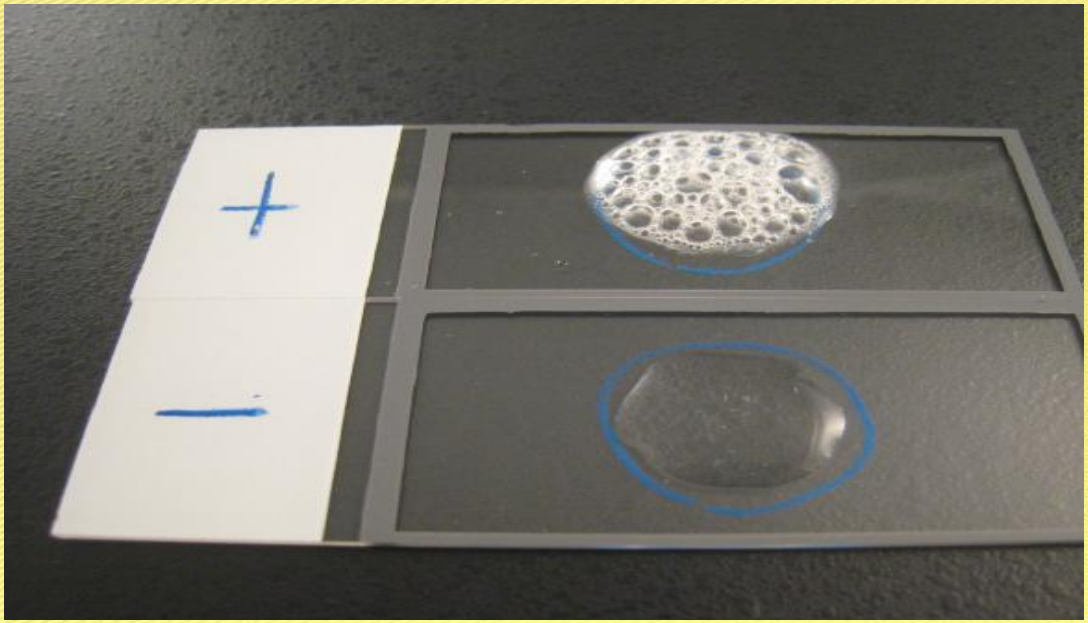
- تمام زمان های گفته شده بر اساس معرفهای تازه بدون مواد پایدار کننده است
- اگر از معرف های تجاری استفاده می شود بایستی آزمایش را بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده **انجام داده و تفسیر نمود.
- استفاده از کلنی هایی که ۱۸-۲۴ ساعته توصیه می شود. کلنی های مسن تر واکنش های ضعیف تری ایجاد می کنند.
- رعایت زمان قرائت
- کهنه شدن و تغییر رنگ دیسک یا معرفها

کاتالاز

- تاریخچه: باکتریها برای بقا خود احتیاج به یک سیستم دفاعی برای فرار از تاثیر مخرب H_2O_2 دارند. برخی از باکتری ها دارای کاتالاز هستند که باکتری را از تاثیر مخرب و کشنده پراکسید هیدروژن محافظت می کند. آزمایش کاتالاز یکی است روش های مهم تشخیصی در شناسایی باکتری ها می باشد. در Got۱۸۹۳ به اهمیت وجود کاتالاز در باکتریها پی برد
- هدف: شناسایی باکتری های کاتالاز مثبت(میکروکوکاسیه) از کاتالاز منفی(استرپتوکوکاسیه).
- اساس: کاتالاز آنزیمی است که آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تجزیه می کند H_2o_2 یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات ها می باشد .
- معرف کاتالاز : آب اکسیژنه ۳٪ **

کاتالاز

- روشهای انجام کاتالاز
- اسلایدی!

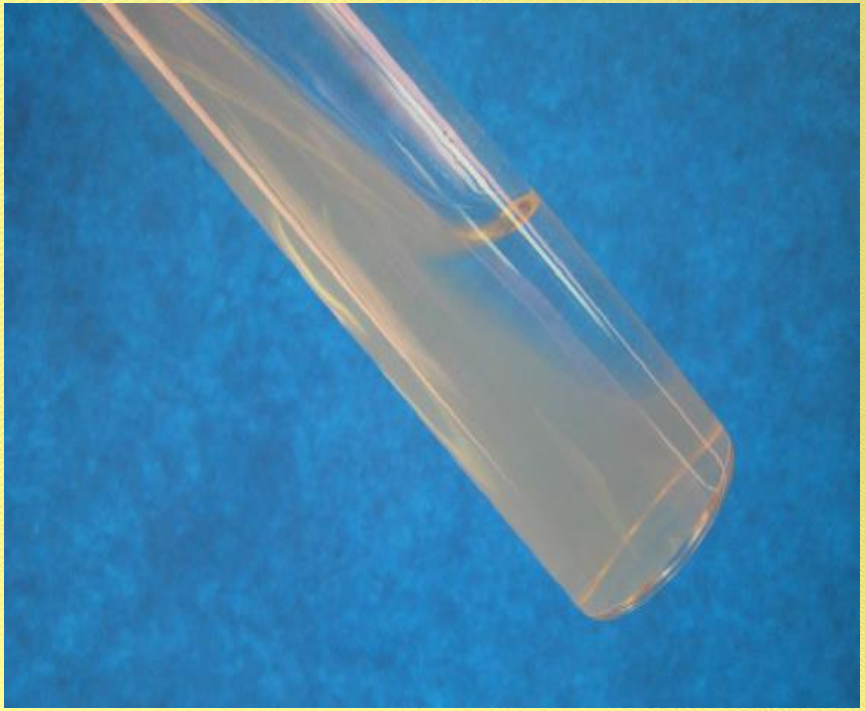


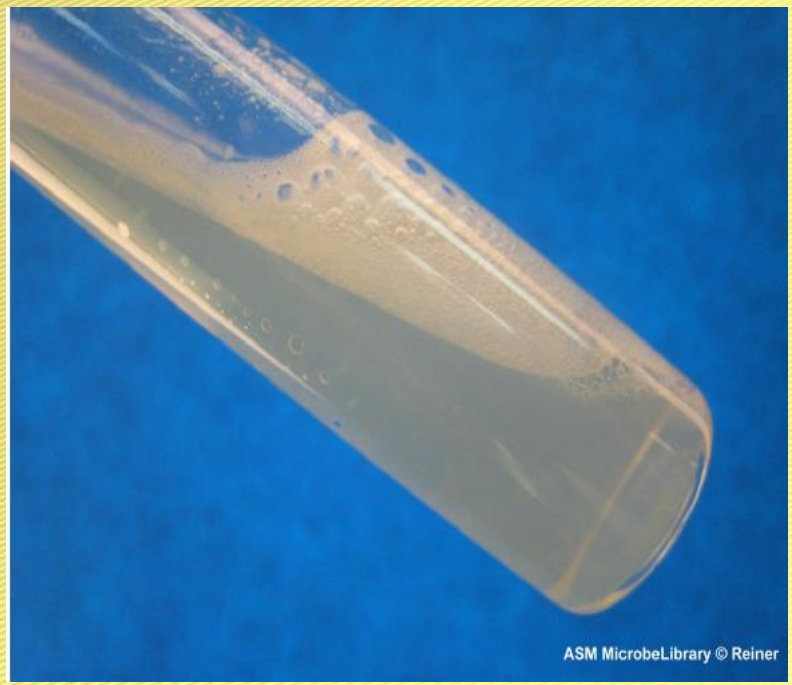
کاتالاز

روش لوله ای

کاتالاز

- روش لوله ای(اسلنت)





کاتالاز

- توصیه ها :
- همیشه از دستکش عینک و روش‌های آسپتیک استفاده کنید.
- در صورت امکان آزمایش را در زیر هود انجام دهید.
- واکنش های ضعیف را می توانیدبا استفاده از ذره بین بررسی نمایید.
- روش اسلایدی را بهتر است در پتری دیش انجام دهید.(باکترهای پاتوژن).
- جهت تایید نتایج منفی یک لامل را روی اسلاید گذاشته و با بزرگنمایی ۱۰ بررسی کنید نباید حباب ایجاد شود.
- از آگار خوندار با احتیاط استفاده کنید (نوترینت آگار یاشکلات آگار).
- ترجیحا از لوپهای فلزی استفاده نکنید(اپلیکاتورپلاستیکی یا چوبی).

کاتالاز

- نکات کاربردی:
- پراکسید هیدروژن ناپایدار است و باید هر روز قبل از استفاده تحت کنترل قرار گیرد.
- رشد برای آزمایش کاتالاز باید از کشت ۱۸-۲۴ ساعته گرفته شود. ارگانیسم ها با افزایش سن فعالیت کاتالاز خود را از دست می دهند و در نتیجه واکنش منفی کاذب ایجاد می شود.
- فعالیت کاتالاز تابعی از فرآیند هوازی است. ارگانیسم هایی که به صورت بی هوازی انکوبه می شوند باید حداقل ۳۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش کاتالاز در معرض اکسیژن اتمسفر قرار گیرند. عدم تکمیل این مرحله ممکن است نتایج منفی کاذب ایجاد کند.
- واکنش مثبت کاتالاز با ارگانیسم های بی هوازی ممکن است تا یک دقیقه پس از افزودن معرف به تاخیر بیفتد.
- واکنش ضعیف کاتالاز یا شبه کاتالاز (Pseudocatalase)ممکن است توسط برخی از سویه‌های گونه‌های Aerococcus و گونه‌های Enterococcusایجاد شود.

تولید ایندول

- هدف: این تست بر اساس توانایی ارگانیسم در تولید آنزیم تریپتوفاناز است
- اساس آزمایش: تریپتوفان در کازئین و پروتئین های حیوانی وجود دارد باکترهای دارای آنزیم تریپتوفاناز قادر به هیدرولیز تریپتوفان به پیروات و آمونیاک و ایندول است معرف کواکس (دی متیل آمینو بنزالدهید و اسید کلریدریک) وقتی به محیط کشت مایع اضافه شود با ایندول واکنش داده و رنگ قرمز ایجاد میکند . معرف حساس‌تر استفاده از محلول ارلیخ است که برای بررسی مقدار کم ایندول مناسب می باشد
- ارلیخ چون حاوی اتانول مطلق است ممکن است قابل اشتعال باشد
- معرف ارلیخ دارای دی متیل آمینوبنزآلدئیداست
-

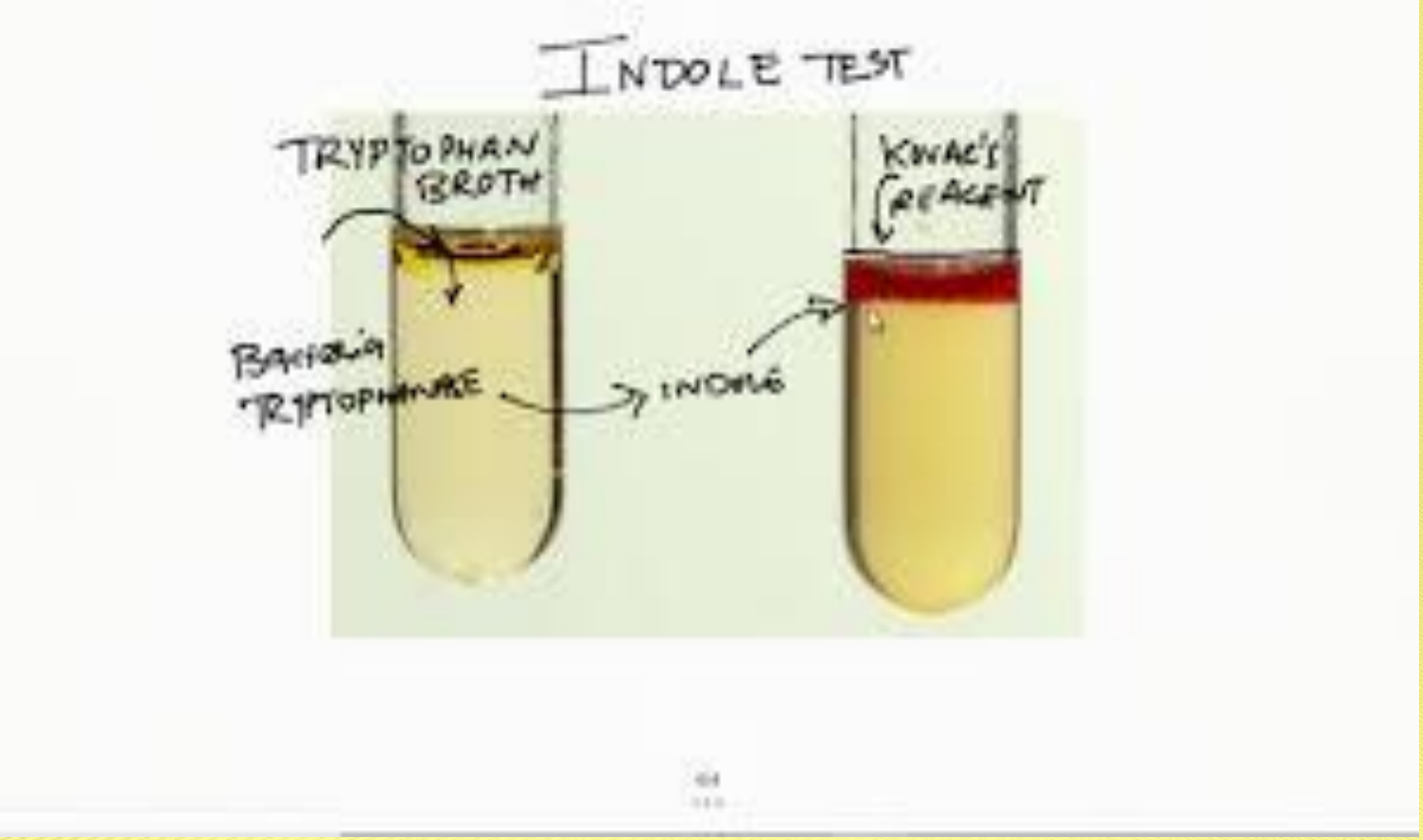
تولید ایندول

- روش(انتروباکتریاسه)
- باکتری راروی محیط تریپتوفان براث تلقیح می کنیم
- لوله را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید
- نیم میلی لیتر معرف کواکس را بِه محیط براث اضافه کنید
- روش(سایر باسیل های گرم منفی)
- تریپتوفان براث را با یک قطره از کشت باکتری که رشد کرده و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شده تلقیح کنید
- لوله را به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد در هوای اتاق انکوبه نمایید
- یک میلی لیترگزیلول به محیط اضافه کنید لوله را تکان داده تا اندول استخراج شود اجازه دهید لوله مدتی به حالت عمودی بماند تا گزیلول تشکیل یک لایه در بالای فاز آبی ایجاد نماید
- نیم میلی لیتر معرف ارلیخ از کنار لوله به آن اضافه کنید
- نتایج
- مثبت: تشکیل یک حلقه قرمز شرابی بعد از افزودن معرف
- منفی: عدم تغییر رنگ بعد از اضافه کردن معرف

تولید ایندول

- نکات کاربردی:
- تست لوله ای روش حساس تری برای تشخیص ایندول نسبت به تست نقطه ای است.
- Kovacs Indole Reagentبرای استفاده باکتری های بی هوازی توصیه نمی شود.
- از آنجایی که نشان داده شده است که پپتون ها با توجه به مناسب بودن آنها برای استفاده با آزمایش ایندول متفاوت هستند، محیط های انتخاب شده برای تعیین ایندول باید با ارگانیسم های مثبت و منفی شناخته شده آزمایش شوند تا از مناسب بودن اطمینان حاصل شود.
- به دلیل تشکیل محصولات نهایی اسیدی که تولید ایندول را کاهش می دهند،
- نباید از محیط های حاوی گلوکز برای آزمایش ایندول استفاده کرد. مولر هینتون آگار نیز نباید برای این آزمایش استفاده شود زیرا تریپتوفان در طی هیدرولیز اسیدی کازئین از بین می رود.
- محیط های حاوی رنگ، مانند MacConkey وEMB ، به دلیل انتقال احتمالی رنگ و تداخل بعدی در تفسیر رنگ ایندول، نامناسب هستند.

تولید ایندول



MRVP

- ارگانیسم ها دارای برخی از آنزیم های متابولیک هسند که محصولات متفاوتی را از گلوکز تولید می کنند محصولاتی با خاصیت اسیدی که در مسیر های تخمیر مختلط اسیدی تولید میشود.
- که در حضور متیل رد رنگ محیط قرمز میشود.
- محصولاتی با خاصیت قلیایی که در مسیر تخمیر بوتاندیول تولید می شود.در حضور آلفا نفتول رنگ صورتی یا قرمز ایجاد میکند .

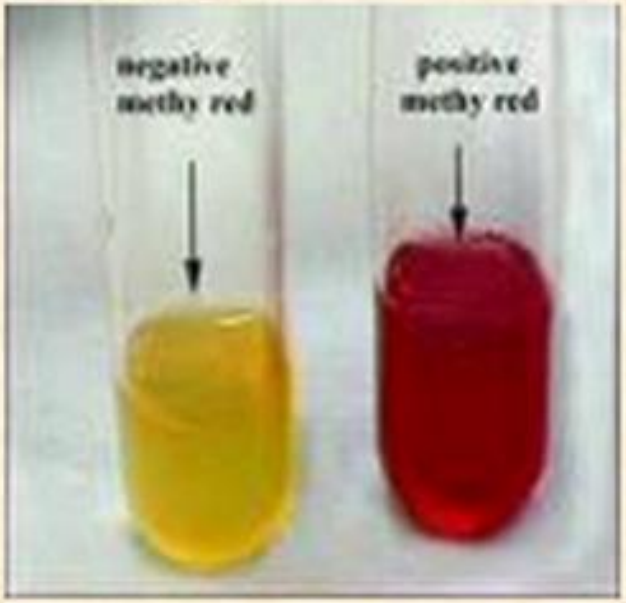
- اغلب اعضای خانواده انتروباکتریاسه یکی از این مسیر های متابولیک را نشان می دهند اما به ندرت هر در مسیرتخمیری را استفاده می کنند
- روش انجام:
- کلنی خالص باکتری را در لوله کشت حاوی ۵ میلی لیتر از آبگوشت پایه MRVPتلقیح کرده و به مدت حداقل ۴۸ ساعت انکوبه نمایید
- محتویات لوله و به دو قسمت مساوی تقسیم کنید. به لوله اول ابتدا یک دهم میلی لیتر آلفا نفتول اضافه کرده مخلوط می کنیم و سپس دو دهم میلی لیتر از محرف هیدروکسید پتاسیم را اضافه نموده می‌گذاریم به مدت ۱۵ دقیقه بماند از نظر تشکیل رنگ صورتی تا قرمز بررسی می‌کنیم این رنگ نمایشگر حضور استیل متیل کاربینول و مثبت بودن آزمایش VP
- به لوله دوم نیم میلی لیتر محرف MRاضافه کرده و از نظر تغییر رنگ محیط بررسی میکنیم اگر رنگ محیط قرمز باقی بماند نتیجه مثبت بودن آزمایش است اما اگر رنگ محیط زرد شد نشان دهنده بالا بودن پی هاش محیط بیشتر از ۶ بوده و در این حالت آزمایش MRمنفی است اگر رنگ محیط پرتقالی شد باید آزمایش را بعد از انکوباسیون طولانی‌تری تکرار کرد
- کنترل کیفی کنترل مثبت اشریشیا کلایATCC25922
- کنترل منفی کلبسیلا پنومونیه ATCC13883

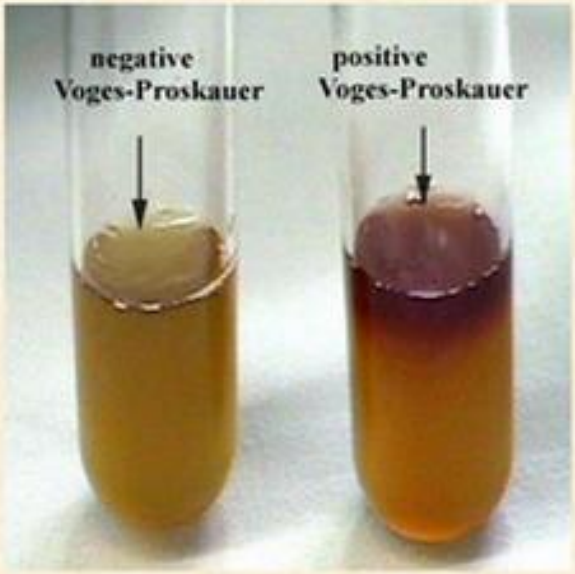
MRVP

- در لوله شل بسته شود.
- آزمایش متیل رد حداقل بایستی در ۴۸ ساعت قرائت شود کمتراز این زمان ممکن است باکتری نتواند مقدار اسید لازم برای مثبت شدن را تولید کند و نتایج منفی کاذب ایجاد میشود.
- باکتریهای MRمنفی نیز ممکن است زمان کافی برای تبدیل محصولات را را نداشته باشند بنابر این MRمثبت به نظر می رسندو نتایج مثبت کاذب ایجاد کند.
- توصیه می شود که تلیقح سبک انجام شود.تلیقح سنگین با ممانعت از رشد باکتری نتایج را نامعتبر میکند.
- تغییر رنگ محیط به نارنجی مثبت تلقی نمیشود در اینگونه موارد میتوانیدیک لوله دیگررا به مدت
- ۴-۵ روز انکوبه نموده و آزمایش را قرائت نمود.
- رنگ مسی در آزمایش VPمنفی در نظر گرفته میشود.
- دربرخی از گونه های سراشیا انترو باکتروکلبسیلا و آئرومونا‌س هردو آزمایش MRVPاست.
- موارد زیر بایستی استاندارد شوند:میزان تلیقح باکتری حجم محیط براث برای هر دو تست
- در مورد آزمایش VPترتیب ریختن معر فها و مقدار آنها بایستی رعایت شود.زیرا معکوس ریختن معرفها یا حجم زیاد هیدروکسید پتاسیم نتایج کاذب ایجاد میکند.

IMViC test: MR/VP test

❖ *Results*





Methyl Red test

Voges-Proskauer test

✓*Pink: Positive VP (Klebsiella)*

✓*Red: Positive MR (E. coli)*

✓*No pink: Negative VP (E. coli)*

✓*Yellow or orange: Negative MR (Klebsiella)*

آزمایش مصرف سیترات

- مصرف سیترات
- هدف از انجام این آزمایش شناسایی میکروارگانیسم هایی است که قادر به استفاده از سیترات به عنوان منبع کربن و نمکهای آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن هستند
- این آزمایش در سری MViC اجهت شناسایی انتروباکتریاسه ها وسایر باسیل های گرم منفی کاربرد دارد
- اساس
- باکتری هایی که میتوانند روی این محیط رشد کنند قاشدر به تولید آنزیم سیترات پرمئاز بوده و قادرند سیترات را به پیروات تبدیل کنند پیروات وارد سیکل متابولیت باکتری جهت تولید انرژی می شود . این باکتری ها فسفات آمونیوم را به آمونیاک و هیدروکسید آمونیوم تبدیل می‌کنند و موجب قلیایی شدن محیط می گردند
- این تغییر پ هاش موجب تغییر رنگ بروموتیمول بلو از سبز به آبی می گردد

سیترات

نکات کاربردی:

- در پوش لوله بایستی شل بسته شود.
- باکتری باید به صورت سبک روی محیط کشت برده شود (نتایج مثبت کاذب).
- نوک آنس را به سطح کلنی جوان آغشته کرده وفقط درسطح محیط شیب دار محیط به صورت زیگزاگ کشت میدهیم.
- از محیط کشت براث و محیطهای حاوی قند جهت تلقیح نباید استفاده نمود.
- رشد قابل توجه روی سطح شیبدار بدون تغییر رنگ ممکن است نشان دهنده مثبت بودن تست باشد. با این حال، اگر آگار در طی انکوباسیون بیشتر آبی نشود، آزمایش باید با تلقیح سبکتر تکرار شود
- تا هفت روز میتوان محیط را در ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه نمود.

آزمایش مصرف سیترات

- نتایج
- مثبت :رشد روی محیط با یا بدون تغییر رنگ معرف از سبز به آبی
- منفی: عدم رشد باکتری
- کیفی
- کنترل مثبت *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (growth; blue color)
- کنترل منفی *Escherichia coli* ATCC 25922 (no growth or trace of growth)
-

TSI

- تفکیک باسیل های روده ای گرم منفی (بر اساس تخمیر کربوهیدرات و تولید سولفید هیدروژن)
-
- **۲- اساس آزمایش:**
- در این محیط کشت، ساکاروز به دو قندی (دکستروز و لاکتوز) که در محیط کلایگلر آیرون آگار (KIA) وجود دارد، اضافه می شود. افزودن ساکاروز، با تسهیل در جداسازی باسیل های تخمیر کننده ساکاروز و نیز تخمیر کننده های لاکتوز و یا دکستروز، حساسیت محیط را افزایش می دهد. تخمیر کربوهیدرات، با تغییر رنگ قابل مشاهده معرف pH یعنی فنل رد (از قرمز به زرد) نشان داده می شود. تولید سولفید هیدروژن با ایجاد رسوبی که محیط را در عمق لوله سیاه می کند و نتیجه افزودن سولفات فروس به محیط است، نشان داده می شود.
- برای تسهیل در جداسازی ارگانیسم هایی که فقط دکستروز را تخمیر می کنند، غلظت دکستروز (۰/۱) غلظت لاکتوز یا ساکاروز است. مقدار کم اسید تولید شده در سطح شیب دار لوله در طی تخمیر دکستروز، به سرعت اکسید می شود و باعث می شود محیط به pH قلیایی(قرمز) برگردد. در مقابل، بدلیل فشار پایین تر اکسیژن در عمق، واکنش اسیدی (زرد) حفظ می شود.
- **توجه:** به هنگام تهیه محیط کشت باید دقت نمود که طول سطح شیب دار و عمق محیط کشت در لوله، حدوداً ۳ سانتی متر باشد.

TSI

- **روش انجام کار:**
- با استفاده از آنس سوزنی استریل خنک، رشد را از مرکز یک کلونی که به تازگی روی پلیت محیط مورد استفاده برای کشت انتروباکتریاسه رشد کرده است، به سطح شیب دار TSI Agar انتقال دهید و آن را با حرکت آنس در امتداد سطح شیب دار، کشت دهید و سپس عمق را با سوراخ کردن محیط، تلقیح نمایید. لوله ها را با در پوش های شل شده به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ ±۲C° در اتمسفر هوازی انکوبه نمایید.
- واکنش های تولید شده توسط ایزوله مجهول را با ارگانیسم های کنترل، مقایسه نمایید. تخمیر کربوهیدرات با رنگ زرد محیط نشان داده می شود.

TSI

- رنگ زرد (اسیدی) در سطح شیب دار و عمق نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، دکستروز، لاکتوز و یا ساکاروز را تخمیر می کند.
- رنگ قرمز (قلیایی) در سطح شیب دار و عمق، نشان می دهد که ارگانیسم تحت بررسی، یک غیر تخمیر کننده Nonfermenter است.
- تولید سولفید هیدروژن سبب تولید رسوب سیاه در عمق لوله می شود.
- تولید گاز با شکاف و ترک خوردگی محیط نشان داده می شود.

TSI

نکات کاربردی:

- برای حفظ شرایط قلیایی سطح شیب دار باید در لوله شل بسته شود، بایداجازه داد که تبادل آزاد هوا صورت گیرد. اگردر لوله محکم بسته شود، واکنش اسیدی (ایجاد شده فقط با تخمیر دکستروز) سطح شیب دار را درگیر خواهد کرد(A/A).
- بعضی از ارگانیسم ها ممکن است تولید سولفید هیدروژن را روی KIA نشان دهند، اما روی TSIنشان ندهند، چون استفاده از ساکاروز در TSI Agar، مکانیسم آنزیمی را که در تولید H_2Sاثر می گذارد مهار می کند بویژه سالمونلای تولید کننده H_2Sو بعضی از اعضاء انتروباکتریاسه نمی توانند روی TSI Agar ، H_2S تولید کنند.
- سولفات فرو موجود در این محیط(به عنوان معرف H_2S) گاهی دارای حساسیت کمتری نسبت به سایر نمک های فریک می باشد. بنابراین ممکن است در ایجاد H_2S در TSI و KIA با سایر محیط های کشت مثل SIM مغایرت هایی دیده شود.
- چون عمق لوله های KIA و TSI، با تخمیر گلوکز اسیدی می شود ، سیاه شدن اغلب در ته لوله وجود دارد یا به همان جا محدود می شود (بویژه با باکتریهای غیر تخمیر کننده لاکتوز) بنابراین اگر عمق سیاه است باید آن را اسیدی در نظر گرفت.
-
-

TSI

نکات کاربردی

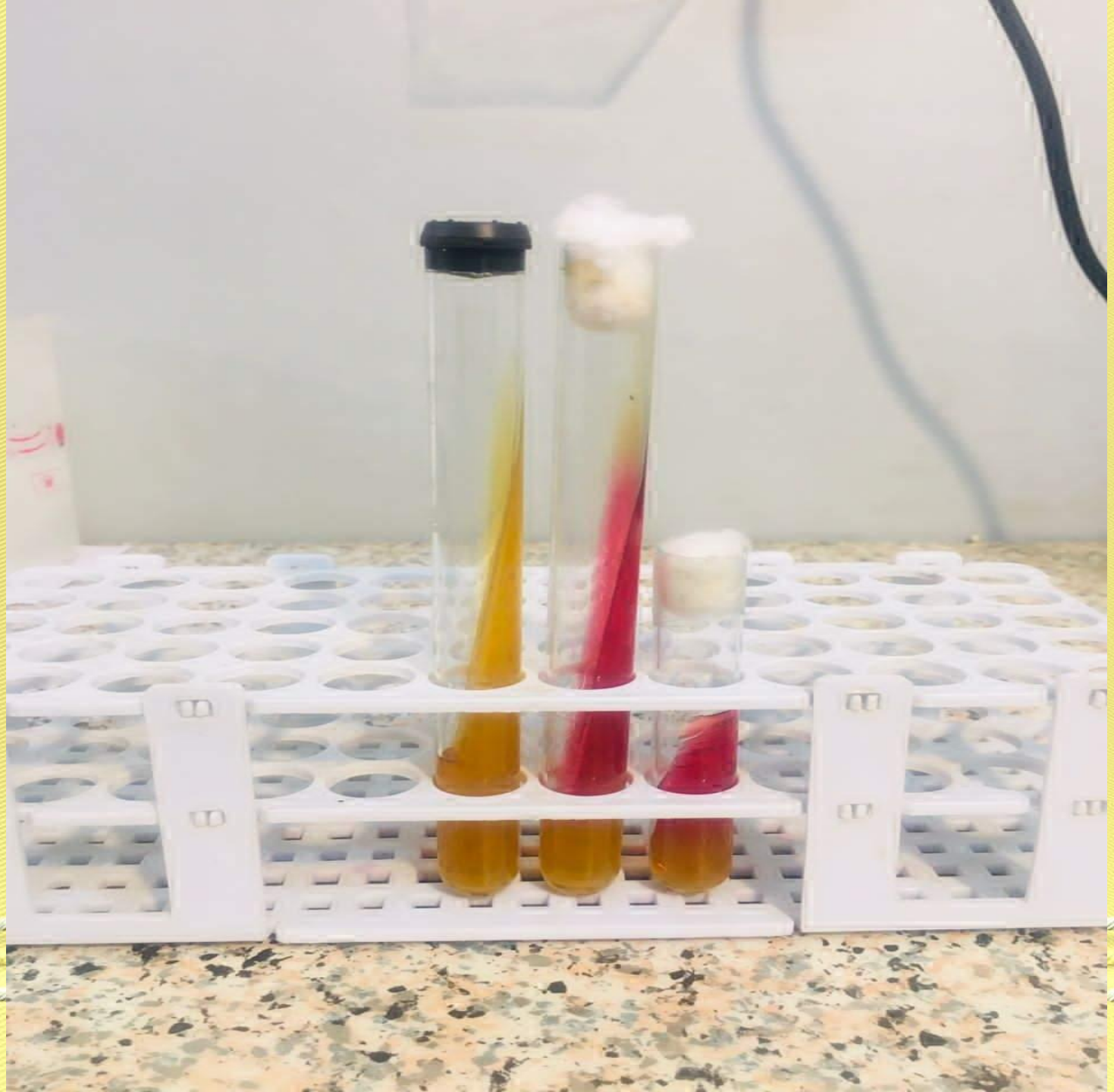
-آزمایش TSI را قبل از ۱۸ ساعت مطالعه نکنید، زیرا ممکن است قرائت اشتباه اسید در شیب انجام شود(A/A) .

-اگر بعد از ۲۴ ساعت خوانده شود، ممکن است واکنش کاذب مشاهده شود.

-از محیطهای کشت خشک استفاده نکنید.

-طول سطح شیبدار و عمق بایستی ۳ سانتی متر باشد.

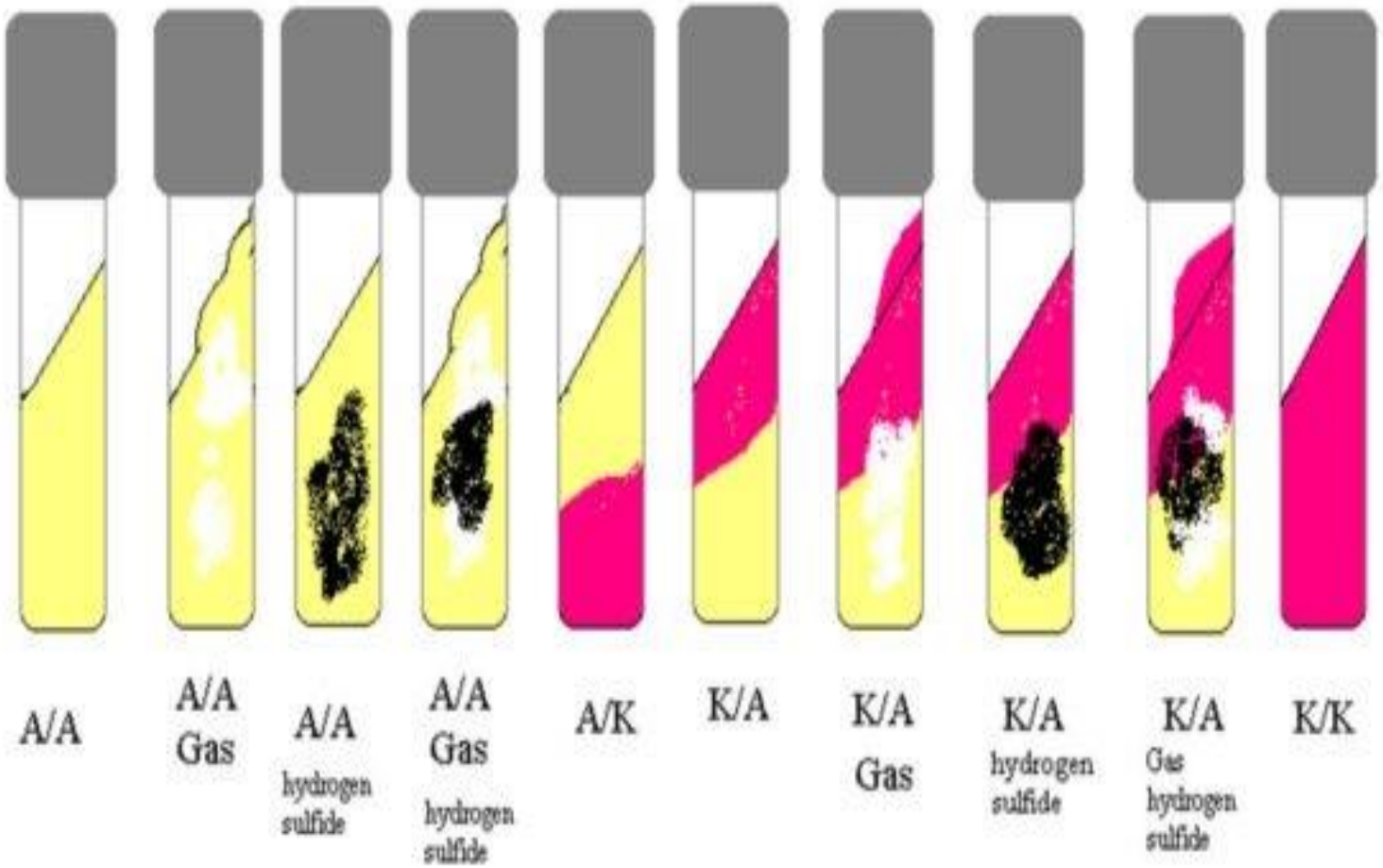
-کشت در قسمت عمقی محیط بایستی تا ۳ میلی متر قبل از انتهای لوله خاتمه یابد(خروج گاز).



S.N.	Result (slant/butt)	Symbol	Interpretation
1	Red/Yellow	K/A	Glucose fermentation only, peptone catabolized.
2	Yellow/Yellow	A/A	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation.
3	Red/Red	K/K	No fermentation, Peptone catabolized under aerobic and/or anaerobic conditions.
4	Yellow/Yellow with bubbles	A/A,G	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation, Gas produced.
5	Red/Yellow with bubbles	K/A,G	Glucose fermentation only, Gas produced.
6	Red/Yellow with bubbles and black precipitate	K/A,G,H2S	Glucose fermentation only, Gas produced, H2S produced.
7	Yellow/Yellow with bubbles and black precipitate	A/A,G,H2S	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation, Gas produced, H2S produced.
8	Red/Yellow with black precipitate	K/A,H2S	Glucose fermentation only, H2S produced.
9	Yellow/Yellow with black precipitate	A/A,H2S	Glucose and lactose and/or sucrose fermentation ,H2S produced.

Triple Sugar Iron (TSI) test

TSI Reactions



Urea

- **نکات کاربردی:**
- برای تسهیل رشد و واکنش هیدرولیز اوره، برای تلقیح از سوسپانسیون باکتری در محیط براث استفاده نکنید.
- پس از انکوباسیون طولانی مدت واکنش قلیایی مثبت کاذب ممکن است دیده شود. برای بررسی این حالت، آزمایش را با یک کنترل (لوله اوره آگار تلقیح نشده) همراه با لوله تلقیح شده در طول مدت انکوباسیون بررسی کنید.
- برای شناسایی گونه‌های پروتئوس، در محیط اوره آگار، اسلنت باید ظرف ۶ ساعت پس از تلقیح برای واکنش بررسی شوند..
- در هنگام انکوباسیون درپوش‌های لوله بایستی شل بسته شود.
- -اوره براث یک محیط با خاصیت بافری بسیار بالا است که برای بالا بردن pH بالای ۸، به مقادیر زیادی آمونیاک نیاز دارد و رنگ آن تغییر می کند .
- محیط اوره در صورت قرار گرفتن در معرض نور ممکن است پراکسید ایجاد کند که ممکن است در آزمایش اوره آز اختلال ایجاد کند.
- محیط اوره تحت اتو هیدرولیز قرار می گیرد. بنابراین توصیه می شود که محیط را در یخچال در دمای ۴-۸ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری کنید.

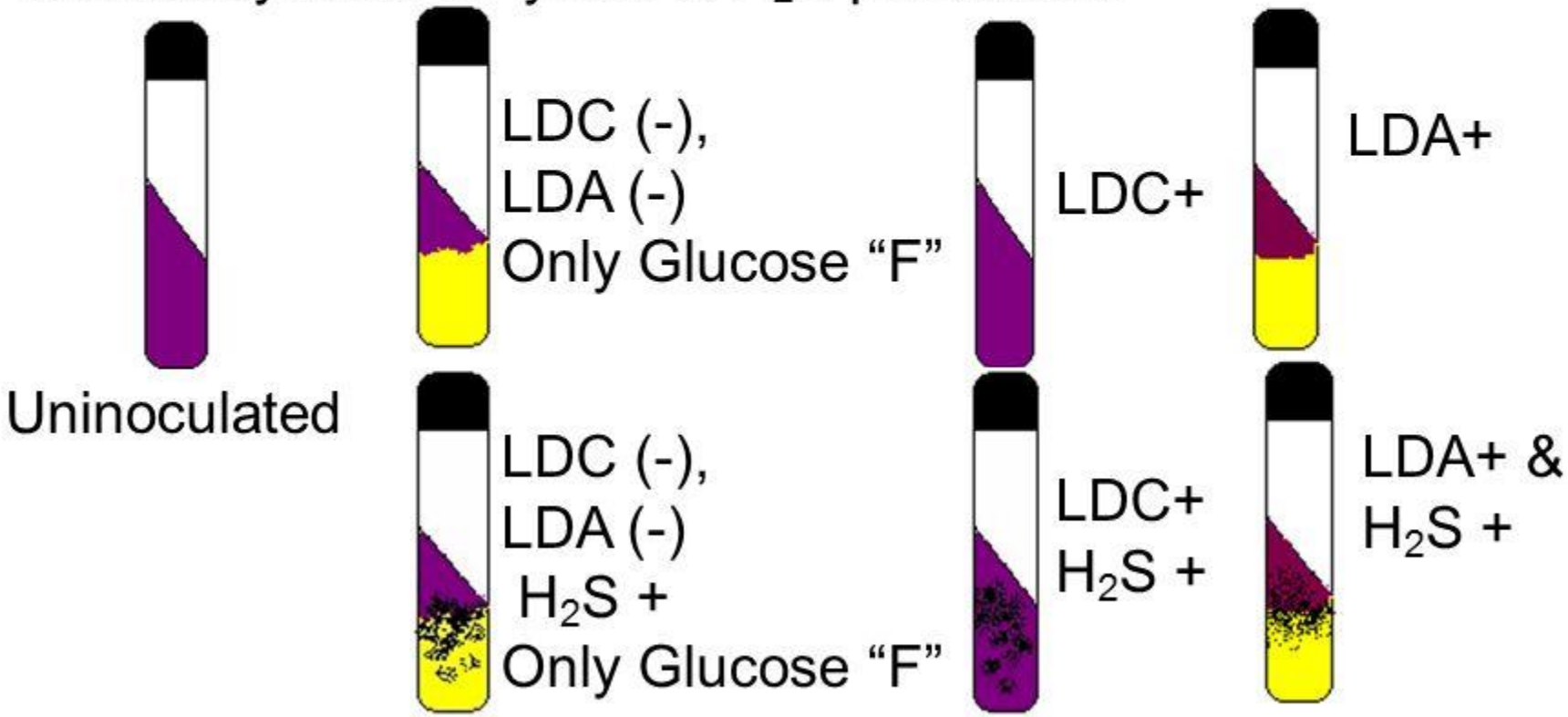
LIA

- نکات کاربردی:
- سالمونلا پاراتیفیA ، بر خلاف سایر سالمونلاها، لیزین دکربوکسیلاز تولید نمی‌کند و در نتیجه یک شیب قلیایی و یک عمق اسیدی ایجاد می‌کند.
- Proteus sppتولید کنندهH2S محیط راسیاه نمی کند.
- پیشنهاد می شود که LIAهمراه TSIبرای استفاده شود.مخصوصا در تشخیص سالمونلا
- واکنش مورگانلا مورگانی ممکن است پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون متغیر باشد و ممکن است به انکوباسیون طولانی تری نیاز داشته باشد.
- کشت باید در سطح و عمق لوله انجام شود.
- درب لوله بایستی شل بسته شودتا واکنش های دکربوکسیلاسیون و دآمیناسیون قابل بررسی باشد.
- اگر درب لوله سفت بسته شود یا دارای درپوش لاستیکی باشد فقط واکنش دکربوکسیلاسیون قابل گزارش است.
- LIAدر تشخیص سولفید هیدروژن در مقایسه با سایر محیطهای حاوی آهن، مانند (SIM)و TSIA حساس نیست.
- LIAجایگزینی برای محیط های TSIیا Moeller Decarboxylase نیست
- تولید گاز ممکن است نامنظم باشدویا سرکوب شود، به غیر از غیر از سیتروباکتر.
- واکنش لیزین دآمیناسیون به صورت رنگ قرمز پر رنگ روی سط شیب دار محیط دیده میشود.

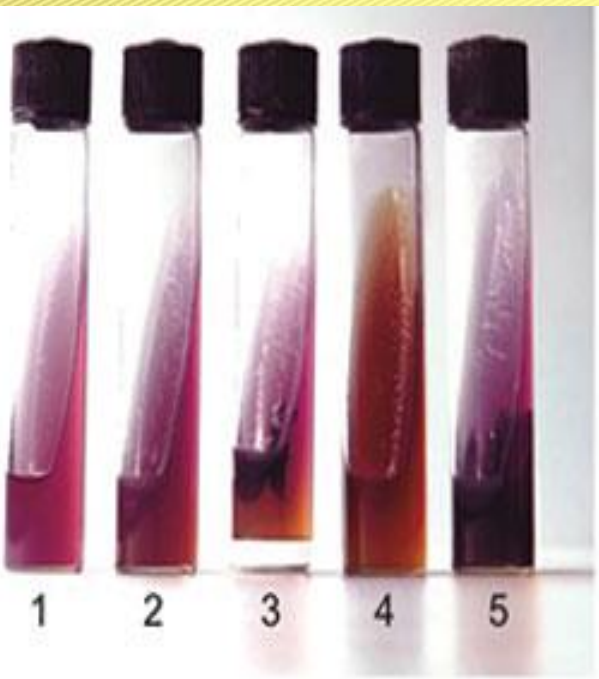
GNR: Enterobacteriaceae

Biochemical Tests: Lysine Iron Agar

Organism must ferment glucose; detects deamination or decarboxylation of lysine & H_2S production



LIA



Lysine Iron Agar (M377)

1. Control
2. Escherichia coli ATCC 25922
3. Citrobacter freundii ATCC 8090
4. Proteus mirabilis ATCC 25933
5. Salmonella Typhimurium ATCC 14028

Alkaline/yellow/H_2S: *Citrobacter*.

Alkaline/alkaline/H_2S: *Salmonella*.

ONPG

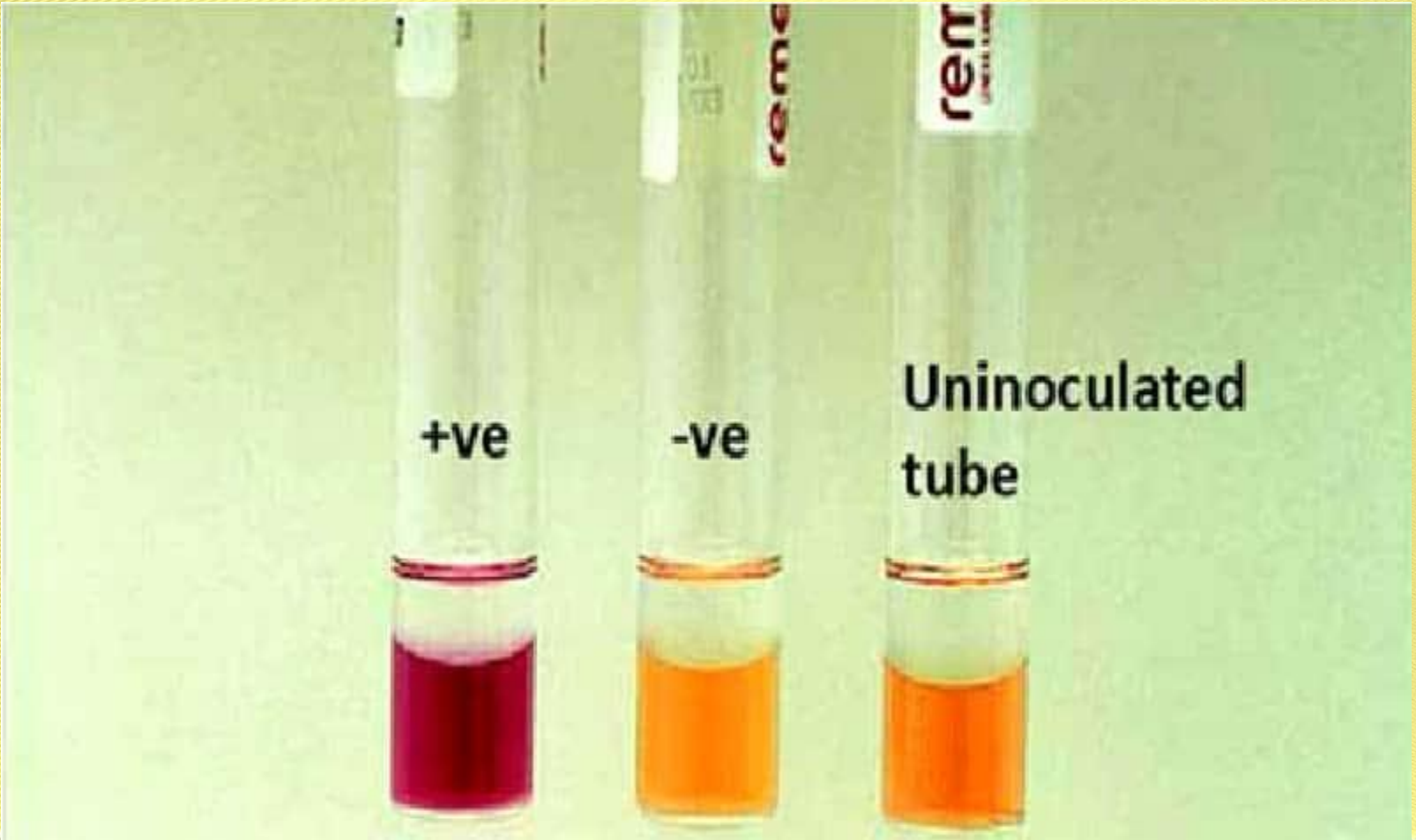
نکات کاربردی

- برای آزمایش سریع، یعنی روش دیسک، کلنی ها باید از محیط غنی از لاکتوز مانند (TSI)یا (MAC)باشند.
- کشتهایی که به طور طبیعی رنگدانه زرد تولید می کند را نمی توان با این محیط آزمایش کرد.
- اگر محیط به درستی بافر نشده باشد، نتایج ممکن است نامعتبر شوند.
- از آنجایی که گلوکز تخمیر لاکتوز را توسط باکتری ها مهار می کند، ارگانیسم هایی که در محیط حاوی گلوکز رشد می کنندفعالیت کمتری نسبت به حضور لاکتوز نشان میدهند.
- درلوله پنبه ای باشدو یا اگر درپیچ دار است شل بسته شود.
- سوسپانسیون باکتری روی محیط براث بایستی غلیظ و برابر استاندارد ۳ مک فارلند باشد.
-

LDC

- یک سوسپانسیون با کدورت نیم مک فارلند از یک کشت جوان (۱۸ تا ۲۴ ساعته) که درروی آگار خون گوسفند ۵ درصد رشد می کند، تهیه کنید.
- یک لایه ۴ میلی متری روغن معدنی استریل به هر لوله اضافه کنید.**
- کشت ها را در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید.
- لوله ها را در ساعت های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ بررسی کنید.
- مثبت: تغییر رنگ قلیایی (بنفش) در مقایسه با لوله کنترل
- منفی: بدون تغییر رنگ یا رنگ اسیدی (زرد) در لوله آزمایش و کنترل. رشد در لوله کنترل

LDC



محدودیت ها

- این آزمایش مقدار آنزیم داخل سلولی را اندازه گیری نمی کند و تنها زمانی آن را تشخیص می دهد که برای ایجاد تغییر pH در محیط مقدار آن کافی باشد.
- تغییر شرایط رشد (به عنوان مثال، غلظت گلوکز، لیزین و اسیدهای آمینه غیر از لیزین) ممکن است بر فعالیت لیزین دکربوکسیلاز در کلی فرم ها تأثیر زیادی بگذارد.
- تخمیر دکستروز در محیط باعث تغییر رنگ اسید می شود. با این حال، تغییر رنگ قلیایی ناشی از واکنش دکربوکسیلاسیون مثبت را پنهان نمی کند.
- تفسیر نتایج نباید قبل از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون انجام شود. تفسیر زود هنگام ممکن است منجر به نتایج اشتباه شود. تخمیر گلوکز در ۱۰ تا ۱۲ ساعت اول انکوباسیون اتفاق می افتد. محیط اسیدی حاصل از تخمیر برای تولید دکربوکسیلاز ضروری است.
- رنگ خاکستری در لوله ممکن است نشان دهنده کم بودن اندیکاتورباشد.
- اگر دو لایه با رنگ های مختلف ظاهر شد، قبل از تفسیر واکنش باید لوله را به آرامی تکان داد
- بگوشت تلقیح شده باید با افزودن یک لایه روغن معدنی استریل قبل از انکوباسیون از هوا محافظت شود. قرار گرفتن در معرض هوا ممکن است باعث قلیایی شدن سطح محیط شود که مثبت کاذب است.

- برای برخی از میکروارگانیسم ها، افزایش انکوباسیون تا ۱۰ روز ممکن است مورد نیاز باشد.
- روغن معدنی را فقط فیلتر کنید توصیه شده که اتوکلاو ننمایید

نکات کلی

- نظربه اینکه محیطهای تجاری را جهت جلوگیری از خشک شدن محیط های کشت با درهای لاستیکی عرضه میکنند آزمایشگاهها باید در آنها را با پنبه استریل تعویض نمایند.
- محیطهای خشک شده جوابهای قابل قبولی ندارند.
- میزان تلقیح باکتریها بسیار مهم است.
- ترتیب کشت دادن بسیار مهم است.
- کلنی انتخاب شده بایستی جوان بوده و از یک کلنی باید جهت کشت استفاده نمود.
- میزان تلیح باکتری
- زمان خوانش.
- استفاده از جداول استاندارد یا سایت های تشخیص آنلاین باکتری
- ABIS online- baceial idenificaion