Archive of SID

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۷، صفحات ۲۰۱ تا ۲۰۶

مقاله پژوهشی
(Original Article)

استفاده از کریستال ویوله در محیط کشت جهت تشخیص نایسریاها

دکتر علی‌اکبر سلیمانی‌رهبر[1*]، دکتر محمد نیاکان[2]، دکتر فریبا فیاض[1]، سودابه طاهری[1]، جعفر محمودیان[2]، محمدرضا نژادمقدم[2]، دکتر علی‌اصغر کلاهی[3]

[1]گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[2]جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[3]گروه بهداشت و پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: از خصوصیات مهم نایسریاها، مقاومت در برابر ماده رنگی کریستال ویوله است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر کریستال ویوله بر رشد این باکتری‌ها، افزودن آن به محیط کشت جهت جداسازی این باکتری‌ها، و ساخت یک محیط کشت اختصاصی برای نایسریا است.

روش بررسی: اقدامات انجام شده عبارتند از: ۱) ترشحات مجرای ۱۰۶ بیمار مرد مبتلا به اورتریت، بر روی محیط‌های New York City Medium (NYC agar) Agar، آگار شکلاتی، و آگار شکلاتی دارای غلظت‌های کریستال ویوله در حد فاصل ۱:۱۰۰۰۰۰ تا ۱:۲۵۰۰۰۰ کشت داده و لام گرم تهیه شد. ۲) ترشح حلق ۲۳۰ فرد سالم، بر روی محیط‌های آگار خوندار، آگار شکلاتی و نیز آگار شکلاتی حاوی غلظت‌های متفاوت کریستال ویوله در حد فاصل ۱:۵۰۰۰۰ تا ۱:۵۰۰۰۰۰ کشت داده و لام گرم تهیه گردید. ۳) برای بررسی احتمال رشد سوش استاندارد ATCC گونوکوک در حضور کریستال ویوله، باکتری در محیط‌های آگارشکلاتی، آگارخوندار، مولرهینتون آگار، تایرمارتین آگار و نیز در همین محیط‌ها، همراه نسبت‌های ۱:۵۰۰۰۰ تا ۱:۲۰۰۰۰۰ کریستال ویوله کشت داده شد.

یافته‌ها: ۶۹ نفر از ۱۰۶ بیمار مبتلا به اورتریت، مشکوک به سوزاک بودند که کشت ۶۴ نفر از آنان در محیط NYC، از نظر گونوکوک، مثبت بود. حاصل رشد این نمونه‌ها، در محیط آگار شکلاته، ۵۴ مورد مثبت (با حساسیت ۸۴٪ نسبت به محیط NYC) همراه باکتری‌های مختلف فلور نرمال بود. بیشترین و مناسبترین رشد، در آگار شکلاتی حاوی کریستال ویوله به نسبت ۱:۱۵۰۰۰۰، ۵۸ مورد مثبت (با حساسیت ۹۱٪ نسبت به محیط NYC) و با حداقل رشد فلور نرمال همراه بود. ترشح حلق ۲۲۸ نفر از ۲۳۰ فرد سالم، از نظر نایسریا، مثبت بود. این نایسریاها، قادر به رشد در حداقل ۱:۵۰۰۰۰۰ و حداکثر ۱:۵۰۰۰۰ غلظت کریستال ویوله بودند. با این تفاوت که در غلظت ۱:۵۰۰۰۰۰، باکتری‌های فلور طبیعی نیز رشد کامل داشته و با افزایش تدریجی غلظت، از رشد آنها کاسته شد تا اینکه در غلظت نهایی ۱:۵۰۰۰۰، فقط نایسریا رشد کرده بود. در آزمایش مستقیم این نمونه‌ها نیز در ۲۲۸ مورد دیپلوکوک‌های گرم منفی نایسریا فرم مشاهده شده بود. نتیجه کشت *نایسریا گونوره‌آی* استاندارد بر روی محیط‌های آگار شکلاته، مولرهینتون و تایرمارتین، همراه مقادیر مختلف کریستال ویوله و نیز بدون آن عبارت است از: در همه محیط‌های بدون کریستال ویوله، رشد این نمونه بطور کامل و یکسان مشاهده شد؛ درحالی که در محیط‌های حاوی کریستال ویوله، حداقل تعداد کولونی، در غلظت ۱:۵۰۰۰۰ و حداکثر ۱:۲۰۰۰۰۰ مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: برای جداسازی و تشخیص نایسریاهای بیماریزایی مانند گونوکوک می‌توان از محیط اختصاصی کروموژن مانند آگار شکلاتی حاوی ۱:۱۵۰۰۰۰ کریستال ویوله یا یکی از محیط‌های تایر مارتین و مولرهینتون حاوی ۱:۲۰۰۰۰۰ کریستال ویوله استفاده نمود. نایسریاهای بی‌آزار، مقاومت زیادی به این ماده داشته و در غلظت ۱:۵۰۰۰۰، در هریک ازمحیط‌های فوق، قابل رشد و جداسازی هستند. برای ساخت انبوه محیط کروموژن، با توجه به وزن پودر و غلظت‌های ذکرشده می‌توان میزان پودر کریستال ویوله لازم را محاسبه و با پودر اولیه هریک ازاین محیط‌ها بطور هوموژن مخلوط نمود.

واژگان کلیدی: نایسریا؛ کریستال ویوله؛ ویوله دوژانسیان؛ محیط کشت.

مقدمه

استفاده از رنگ‌ها در میکروبشناسی، سابقه دیرینه دارد. بعضی از مواد رنگی، منجمله کریستال ویوله، اثر ضد میکروبی داشته و در نتیجه می‌توانند از رشد بعضی از میکروب‌ها جلوگیری کنند. در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و تشخیص طبی، از کریستال ویوله، در رنگ‌آمیزی میکروب‌ها به روش گرم استفاده می‌شود (۱). بسیاری از باکتری‌ها، بویژه گرم مثبت‌ها، در برابر این ماده، حساس بوده و در حضور آن قادر به رشد نیستند. باکتری‌های گرم منفی از جمله نایسریاها، نسبت به این رنگ، مقاوم بوده و بنابراین، در صورت افزودن غلظت‌های

***نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر علی‌اکبر سلیمانی رهبر؛ تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی؛ **پست الکترونیک:** draasrahbar@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۹/۱۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۴/۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

مناسب از این مادهٔ رنگی به محیط کشت می‌توان از رشد باکتری‌های حساس، جلوگیری کرده و باعث رشد خالص باکتری‌های مقاوم به ویژه نایسریاها و جداسازی آنها شد (۲).

در جنس نایسریا، دو باکتری بیماریزای مهم شناخته شده‌اند که شامل نایسریا گونوره‌آ و نایسریا منتژیتیدیس می‌باشند. نایسریا گونوره‌آ یا گونوکوک، در بزرگسالان، ایجاد سوزاک و التهاب حاد لگنی (PID)، و در نوزادان، ایجاد کونژونکتیویت می‌کند. این باکتری، در سن بلوغ، به ویژه در افراد فعال از نظر جنسی، از علل شایع آرتریت چرکی تک‌مفصلی و چندمفصلی می‌باشد (۳). نایسریا منتژیتیدیس هم در ایجاد منتژیت و منگوکوکسمی دخالت دارد (۴و۵). باکتری‌های جنس نایسریا به صورت دیپلوکوک‌های گرم منفی قلوه‌ای‌شکل هستند. منگوکوک، دارای کپسول پلی‌ساکاریدی، ولی گونوکوک، بدون کپسول می‌باشد. این باکتری‌ها، در رنگ‌آمیزی گرم، از یکدیگر قابل شناسایی نیستند و برای تفکیک آنها باید از خواص آنتی‌ژنیک، بیوشیمیایی، کشت و سایر روش‌های پیشرفته استفاده نمود (۶).

در بین این باکتری‌ها، دو گونه گونوکوک و منگوکوک، مشکل‌پسند بوده و برای رشد، نیاز به محیط‌های ویژه و غنی‌شده دارند؛ در حالی که سایر گونه‌های نایسریا و جنس‌های دیگر این خانواده، در محیط‌های ساده و معمولی رشد می‌کنند (۷). از طرفی، این دو گونه، در برابر عوامل محیطی، بسیار حساس بوده، جداسازی و نگهداری آنها مشکل است (۸).

برای تشخیص این دو گونه باکتری، در مورد گونوکوک، از ترشحات دستگاه تناسلی، و در مورد منگوکوک، از ترشحات حلق، مایع مغزی- نخاعی و گاهی خون می‌توان بر روی محیط‌های کشت انتقال داد. محیط‌های متداول عبارتند از:

۱) محیط آگار شکلاتی که برای رشد این دو گونه باکتری مناسب است؛ ولی جداسازی آنها از این محیط، به علت رشد باکتری‌های فلور طبیعی از گروه نایسریا، مشکل است.

۲) محیط تایر مارتین که همراه با مواد غنی‌کننده (Supplements) می‌باشد و نیز در ترکیب آن، از سه نوع آنتی‌بیوتیک ونکومایسین، کلیستین و نیستاتین برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچها استفاده شده است.

۳) محیط JC Agar (با تغییراتی، مشابه محیط تایرمارتین است.)

۴) محیط NYC agar (با تغییراتی، مشابه محیط تایر مارتین است.)

۵) محیط مولر هینتون آگار که به طور معمول، برای آنتی‌بیوگرام به کار می‌رود، یک محیط غنی‌شده است و بعضی از باکتری‌های مشکل‌پسند از جمله نایسریاهای بیماری‌زا هم در آن رشد می‌کنند (۹).

به هر یک از محیط‌های ردیف ۲ الی ۵ می‌توان خون اضافه کرده و به صورت آگار خوندار و یا آگار شکلاتی از آنها استفاده نمود.

در این تحقیق، غلظت مناسب کریستال ویوله را جهت افزودن به محیط آگار شکلاتی و یا هریک از محیط‌های نامبرده و ساخت یک محیط کروموژن برای تشخیص و جداسازی نایسریاها به دست آوردیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه، در سه مرحله متفاوت انجام شد:

مرحله اول: بررسی اثر غلظت‌های مختلف کریستال ویوله بر رشد نایسریا گونوره‌آ در محیط آگار شکلاتی و مقایسه رشد آن با محیط‌های آگار شکلاتی بدون کریستال ویوله و محیط اختصاصی NYC Agar با استفاده از ترشح مجرای مردان مبتلا به اورتریت؛

مرحله دوم: بررسی اثر غلظت‌های مختلف کریستال ویوله بر رشد نایسریاهای جداشده از ترشح حلق افراد سالم با استفاده از محیط آگار شکلاتی حاوی کریستال ویوله؛

مرحله سوم: بررسی رشد نایسریا گونوره‌آی استاندارد در محیط‌های آگار خوندار، آگار شکلاتی، تایرمارتین، مولر هینتون و نیز بررسی رشد این باکتری استاندارد در محیط‌های فوق، همراه با غلظت‌های مختلف کریستال ویوله.

مرحله اول تحقیق، بر روی ۱۰۶ نمونه ترشح مجرای گرفته‌شده از مردان مبتلا به اورتریت انجام شد. ترشحات چرکی این بیماران بر روی محیط‌های کشت شامل آگار شکلاتی، آگار شکلاتی حاوی غلظت‌های مختلف کریستال ویوله به نسبت‌های ۱:۱۰۰۰۰۰، ۱:۱۵۰۰۰۰، ۱:۲۰۰۰۰۰، ۱:۲۵۰۰۰۰، و نیز در محیط NYC برده شد. پس از قراردادن محیط‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد با حضور گاز دی‌اکسید کربن به نسبت ۵ درصد و بعد از مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت، با بررسی محیط‌ها، کولونی‌های مشکوک به گونوکوک، با آزمایش اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم، مورد شناسایی قرار می‌گرفتند. در ضمن، از ترشحات این بیماران، گسترش مستقیم و رنگ‌آمیزی گرم انجام می‌شد که در بررسی میکروسکوپی، درصورت مشاهده نوتروفیل‌های زیاد همراه دیپلوکوک‌های گرم منفی داخل آنها تشخیص اولیه این عفونت

www.SID.ir

Archive of SID

داده می‌شد. هدف ما در این مرحله از تحقیق، مقایسه میزان جداسازی گونوکوک در محیط دارای کریستال ویوله با محیط‌های آگار شکلاتی و NYC و تعیین غلظت مناسب کریستال ویوله برای جداسازی این باکتری بود.

در مرحله دوم این تحقیق، از ترشحات حلق ۲۳۰ نفر از افراد سالم که حداقل از یک هفته قبل، آنتی‌بیوتیک و یا داروی دیگری استفاده نکرده بودند، برداشت نموده و جهت جداسازی نایسریاهای فلورنرمال حلق، کشت در محیط آگار شکلاتی و نیز آگار شکلاتی محتوی غلظت‌های متفاوت کریستال ویوله انجام گردید. کمترین غلظت این ماده رنگی، ۱:۵۰۰۰۰۰ و بیشترین غلظت آن، ۱:۵۰۰۰۰ انتخاب شده بود. این محیط‌ها هم بعد از کشت، مانند مرحله اول، در همان شرایط به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار می‌گرفتند. بعد از این زمان، محیط‌ها از نظر ظهور کولونی‌های مشکوک به نایسریا مورد بررسی قرار گرفته و در صورت لزوم، آزمایش اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم برای تشخیص میکروسکپی بر روی آنها انجام می‌شد. از این گروه سالم که از بین دانشجویان رشته‌های گروه پزشکی انتخاب شده بودند نیز گسترش مستقیم ترشح حلق جهت رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکپی تهیه می‌شد.

در سومین مرحله تحقیق، از سوش استاندارد گونوکوک برای بررسی امکان رشد آن در شرایط حضور ماده رنگی کریستال ویوله استفاده شد. در این مرحله نیز از محیط آگار خوندار و یا شکلاتی و نیز از آگار شکلاتی دارای غلظت‌های مختلف کریستال ویوله استفاده شد. محیط‌های کشت‌شده نیز در همان شرایط قرار گرفته و بعد از زمان لازم مورد بررسی قرار گرفتند. نکته مهم آنکه در این مرحله، علاوه بر کارهای ذکرشده کشت گونوکوک استاندارد در محیط‌های مولر هینتون آگار، تایرمارتین آگار و نیز بر روی همین محیط‌ها همراه با غلظت‌های ۱:۵۰۰۰۰، ۱:۱۰۰۰۰۰، ۱:۱۵۰۰۰۰، و ۱:۲۰۰۰۰۰ کریستال ویوله انجام شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل ازاین تحقیق در سه مرحله به شرح زیر می‌باشد:

در مرحله اول، ۱۰۶ مرد مبتلا به اورتریت مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج مرحله اول، در جداول شماره ۱ الی ۳ خلاصه شده است.

از ۱۰۶ بیمار فوق‌الذکر، ۶۹ نفر در آزمایش مستقیم ترشح، دیپلوکوک‌های نایسریا فرم داشتند. نتایج کشت این گروه، در جداول شماره ۵ و ۳ نشان داده شده است. ۳۷ نفر دیگر، به عنوان اورتریت غیر گونوکوکی شناخته شدند که نتایج آنها از آمار خارج شد. جدول شماره ۲، نشان‌دهندهٔ کل نمونه‌ها و ارگانیزم‌های جداشده می‌باشد.

دراین قسمت از تحقیق، طبق آمار مربوط به جداول، مناسب‌ترین غلظت کریستال ویوله برای جداسازی نایسریا گونوره‌آ در محیط آگار شکلاتی، ۱:۱۵۰۰۰۰نشان داده شده است. در این غلظت از ۶۴ مورد مثبت گونوکوک در محیط NYC، ۵۸ کشت مثبت داشتیم (با حساسیت ۹۱٪). در غلظت بالاتر، یعنی ۱:۱۰۰۰۰۰، میزان موارد مثبت، کم یعنی ۶ مورد بود (با حساسیت ۹٪). البته میزان رشد باکتری‌های فلورنرمال هم دراین غلظت، کاهش شدیدی نشان می‌داد. توضیح آنکه میزان حساسیت رشد گونوکوک در این محیط نسبت به محیط NYC بر طبق آزمون‌های آماری محاسبه‌شده و بر همین مبنا، به علت عدم وجود جواب کشت کاذب، ویژگی این روش در این مطالعه، برابر ۱۰۰٪ می‌باشد.

در دومین مرحله این طرح که ترشح حلق ۲۳۰ فرد سالم مورد آزمایش مستقیم و کشت قرار گرفت، نتایج مربوط به این مرحله از مطالعه، در جداول شماره ۴ و ۵ خلاصه گردیده است. طبق جدول شماره ۵، در لام مستقیم ۲۲۸ نفر از آنها، کوکسی گرم منفی مشاهده شد. نتایج کشت این نمونه‌ها نیز در جدول شماره ۴ مشخص شده است که نتیجه مهم این قسمت از تحقیق آن است که در غلظت ۱:۵۰۰۰۰ کریستال ویوله از ۲۳۰ مورد، ۲۲۸ مورد کشت مثبت نایسریا داشتیم که با حضور ۲۲۸ مورد کوکسی‌های گرم منفی در لام مستقیم، مطابق جدول شماره ۵، همخوانی دارد. در حالی که در این غلظت، رشد کلیه باکتری‌های فلور نرمال حلق، متوقف شده بود. در سومین مرحله این تحقیق که از سوش استاندارد ATCC گونوکوک استفاده کرده و آن را بر روی محیط‌های مختلف آگار خوندار، آگار شکلاتی، مولرهینتون، تایرمارتین و نیز در همین محیط‌ها در حضور غلظت‌های مختلف کریستال ویوله کشت دادیم. نتیجه آنکه در تمامی محیط‌های نامبرده و بدون حضور کریستال ویوله، کولونی‌های نایسریا، بطور کامل و یکدست رشد کردند؛ در حالی که در همین محیط‌ها و در حضور رنگ کریستال ویوله، میزان رشد این باکتری در نسبت ۱:۵۰۰۰۰ حداقل و در نسبت ۱:۲۰۰۰۰۰، حداکثر نشان داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱) درصد موارد رشد و عدم رشد گونوکوک در ۶۹ مورد اورتریت گونوکوکی

محیط	رشد مثبت (٪)	رشد منفی (٪)
NYC	۹۳	۷
شکلات آگار	۷۸	۲۲
شکلات ویوله آگار ۱:۱۰۰۰۰۰	۹	۹۱
شکلات ویوله آگار ۱:۱۵۰۰۰۰	۸۴	۱۶
شکلات ویوله آگار ۱:۲۰۰۰۰۰	۸۱	۱۹
شکلات ویوله آگار ۱:۲۵۰۰۰۰	۸۱	۱۹

جدول شماره ۲) تعداد موارد ارگانیزم‌های جداشده در ۱۰۶ نمونه ترشح مجرا جهت مقایسه اثر وقفه‌دهنده کریستال‌ویوله بر رشد ارگانیزم‌های فلور نرمال مجرا

ارگانیزم- محیط	نایسریا گونوره‌آ	استافیلوکوک spp	استرپتوکوک spp	کورینه باکتریوم spp	سراشیا spp
NYC	۶۴	۸	۵	_	_
	٪۶۰,۳۷	٪۷,۵۴	٪۴,۷۱		
شکلات آگار	۵۴	۶۱	۲۸	۱۶	۱
	٪ ۵۰,۹۴	٪ ۵۷,۵۴	٪ ۲۶,۴۱	٪ ۱۵,۰۹	٪ ۰,۹۴
شکلات ویوله آگار ۱:۱۰۰۰۰۰	۶	۱	_	۲	_
	٪۵,۶۶	٪ ۰,۹۴		٪ ۱,۸۸	
شکلات ویوله آگار ۱:۱۵۰۰۰۰	۵۸	۱۱	_	۵	_
	٪ ۵۴,۷	٪ ۱۰,۳۷		٪ ۴,۷۱	
شکلات ویوله آگار ۱:۲۰۰۰۰۰	۵۶	۳۷	۵	۱۱	۱
	٪ ۵۲,۸۳	٪ ۳۴,۹۱	٪ ۴,۷۱	٪ ۱۰,۳۷	٪ ۰,۹۴
شکلات ویوله آگار ۱:۲۵۰۰۰۰	۵۶	۵۳	۲۱	۱۲	۱
	٪ ۵۲,۸۳	٪ ۵۰	٪ ۱۹,۸۱	٪ ۱۱,۳۲	٪ ۰,۹۴

جدول شماره ۳) تعداد موارد ارگانیزم‌های جداشده در اورتریت‌های گونوکوکی (۶۹ نمونه) و مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کریستال ویوله بر رشد فلور طبیعی مجرا

ارگانیزم- محیط	نایسریا گونوره‌آ	استافیلوکوک spp	استرپتوکوک spp	کورینه‌باکتریوم spp	سراتیا spp
NYC	۶۴	۵	۳	_	_
	٪ ۹۲,۷۵	٪ ۷,۲۴	٪ ۴,۳۴		
شکلات آگار	۵۴	۴۶	۱۹	۱۰	_
	٪ ۷۸,۲۶	٪ ۶۶,۶۶	٪ ۲۷,۵۳	٪ ۱۴,۴۹	
شکلات ویوله آگار ۱:۱۰۰۰۰۰	۶	_	_	_	_
	٪ ۸,۱۹				
شکلات ویوله آگار ۱:۱۵۰۰۰۰	۵۸	۷	_	۲	_
	٪۸۴,۰۵	٪۱۰,۱۴		٪ ۲,۸۹	
شکلات ویوله آگار ۱:۲۰۰۰۰۰	۵۶	۲۸	۳	۷	_
	٪ ۸۱,۱۵	٪ ۴۰,۵۷	٪ ۴,۳۴	٪ ۱۰,۱۴	
شکلات ویوله آگار ۱:۲۵۰۰۰۰	۵۶	۴۰	۱۴	۸ _	
	٪ ۸۱,۱۵	٪ ۵۷,۹۷	٪ ۲۰,۲۸	۱۱,۵۹	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۴) میزان فراوانی رشد باکتری‌های فلور طبیعی حلق در محیط‌های آگار شکلاتی و آگار شکلاتی حاوی غلظت‌های مختلف کریستال ویوله در ۲۳۰ نمونه

فلور / غلظت ویوله	نایسریا	استافیلوکوک	استرپتوکوک	پنوموکوک	دیفتروییید	اکتینومایسس
۰	۲۲۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۶۱	۲۳	۱۲
۱/۵۰۰۰۰۰	۲۲۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۶۱	۲۳	۱۲
۱/۴۰۰۰۰۰	۲۲۸	۱۳۸	۱۳۸	۱۶۱	۲۳	۱۲
۱/۳۰۰۰۰۰	۲۲۸	۶۰	۴۸	۴۰	۱۸	۹
۱/۲۵۰۰۰۰	۲۲۸	۵۶	۴۸	۴۰	۱۶	۶
۱/۲۰۰۰۰۰	۲۲۸	۵۶	۴۴	۳۲	۱۵	۰
۱/۱۵۰۰۰۰	۲۲۸	۳۶	۲۴	۱۱	۸	۰
۱/۱۰۰۰۰۰	۲۲۸	۱۴	۴	۴	۰	۰
۱/۵۰۰۰۰	۲۲۸	۰	۰	۰	۰	۰

جدول شماره ۵) میزان فراوانی میکروارگانیزم‌های مشاهده‌شده در لام مستقیم ۲۳۰ نمونه

نام ارگانیزم	تعداد	درصد
کوکسی گرم منفی	۲۲۸	۹۵,۸
کوکسی گرم مثبت	۲۱۰	۹۱,۳
مخمر	۲	۰,۸
فوزیفورم	۲۷	۱۱,۷
باسیل گرم مثبت	۲۳	۱۰
باسیل گرم منفی	۱۱	۴,۷

بحث

گونوکوک و منگوکوک، از باکتری‌های حساس خانواده نایسریاسه هستند و برای رشد، به شرایط خاص نیاز دارند. در بیشتر آزمایشگاه‌ها، به دلیل عدم وجود امکانات لازم برای مطالعه بر روی چنین باکتری‌هایی، جداسازی و تشخیص قطعی آنها امکانپذیر نیست. تاکنون، مطالعات زیادی جهت دستیابی به محیط‌های کشت مناسب برای رشد و جداسازی این ارگانیزم‌ها انجام گرفته و محیط‌هایی مانند NYC agar, GC agar, Thayer Martin agar, Muller Hinton agar معرفی شده‌اند. سایر نایسریاها که اغلب، غیربیماریزا و به ندرت فرصت‌طلب هستند، بدون نیاز به محیط‌های غنی‌شده و در محیط‌های ساده رشد می‌کنند. بنابراین یک راه تشخیص و جداسازی آنها از نایسریاهای بیماریزا، رشد در محیط‌های ساده می‌باشد. اثر ضد میکروبی کریستال‌ویوله، سالیان دراز است که مشخص شده و هنوز هم از این ماده در ترکیب بعضی داروها استفاده می‌شود (۱۰). در تحقیقی که در سال ۱۹۸۷ توسط احمد یانگ و همکاران انجام شد، ۹۷ نمونه برانهاملاکاتارالیس (موراکسلا کاتارالیس) و ۱۶ نمونه نایسریای غیر پاتوژن، بر روی آگار خوندار محتوی کریستال ویوله به نسبت ۱:۵۰۰۰۰۰ کشت داده شدند که در نتیجه فقط نایسریاها در آن رشد کردند و برانهاملاها هیچگونه رشدی نشان ندادند. شباهت این پژوهش به تحقیق ما در تمام مراحل مطالعه مشهود بود که بهترین رشد برای نایسریای بیماریزا در آگار شکلاته محتوی کریستال ویوله در غلظت ۱:۱۵۰۰۰۰ بود و در مورد نایسریاهای غیر پاتوژن نیز در غلظت‌های بالارونده از ۱:۵۰۰۰۰۰ تا ۱:۵۰۰۰۰ در تمام محیط‌های پیشنهادی قابل رشد بودند (۱۱). در مطالعه دیگر که در سال ۲۰۰۳ توسط Jefferson و همکاران، در ویرجینیا انجام گرفت، اعلام شد که باکتری‌های گرم مثبت مانند استافیلوکوک و نیز قارچ‌ها و کاندیداها، نسبت به کریستال ویوله و سبز مالاشیت، حساس بوده و در عوض، مایکوباکتری‌ها به علت وجود جدار لیپیدی و نیز گرم‌منفی‌ها مانند سالمونلا و نایسریاها، در برابر این مواد، مقاوم هستند (۱۲). نتایج تحقیق این گروه نیز نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر را تأیید می‌نماید. در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۰۲ توسط مارتین و همکارانش بر روی دندان‌های پوسیده مربوط به ۶۵ بیمار به

www.SID.ir

Archive of SID

منظور شمارش میکروارگانیزم‌های بی‌هوازی انجام گرفت، برای جداسازی و تشخیص فوزوباکتریوم نوکلئاتوم از محیط CVE (کریستال ویوله اریترومایسین) استفاده می‌شد (۱۳). در مطالعه ما نیز اثر وقفه‌دهندگی این ماده رنگی بر رشد بسیاری از باکتری‌ها و جداسازی گروهی از باکتری‌های مقاوم، یعنی نایسریاها، مد نظر بوده است. در یک مطالعه دیگر، که در سال ۲۰۰۲ توسط KJ Nye و همکاران انجام گرفت، این گروه، ۲۴۰۹ نمونه مدفوع ارسالی به آزمایشگاه‌ها را از یک طرف به روش کلاسیک غنی‌سازی با سلنیت و از طرف دیگر نمونه‌ها را روی محیط‌های KLD (گزیلوز لیزین دزوکسی کولات آگار)، DCA (دزوکسی کولات سیترات آگار)، MLCB (مانیتول لیزین کریستال ویوله بریلیان گرین) و ABC (آلفا بتا کروموژنیک آگار) به طور مستقیم، کشت دادند. در نتیجه، در روش غنی‌سازی کلاسیک، ۶۰ مورد سالمونلا انتریکا جدا شد. در پلیت‌های مستقیم مذکور، بیشترین حساسیت و اختصاصیت، مربوط به محیط MLCB اعلام گردید که توانستند ۴۶ مورد مثبت به دست آورند (۱۴).

گذشته از موارد ذکرشده، با توجه به فرمول‌های اکثر محیط‌های کشت انتخابی باکتری‌های گرم منفی مشاهده می‌کنیم که در ساخت آنها در بیشتر موارد از مواد رنگی از جمله کریستال ویوله استفاده شده است.

REFERENCES

1. Docampo R, Moreno J. The Metabolism and Mode of Action of Gentian Violet. Drug Metab Rev 1990;22(2-3):161-78.

2. Bakker, vane Doorne TT. Activity of Gentian Violet and Brilliant Green Against Some Microorganisms Associated with Skin Infections. Int J Dermatol 1992;31:210-13.

3. Strohl WA, Rouse H, Bruce DF. Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. 2001. p. 165-73.

4. Bauman RW. Microbiology. Benjamin Cummings 2004; p.567-70.

5. Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Maïnassara HB. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. Clin Infect Dis 2007;1;44(5):657-63. Epub 2007 Jan 25.

6. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 22nd ed. McGraw-Hill Book Company; 2004:295-304.

7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 5th ed. New York: Elsevier Press; 2005. P.311.

8. Cappuccino JG, Sherman N. Microbiology: A laboratory Manual. 7th ed. India: Dorling Kindersley; 2005.

9. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2000. p.2242-56.

10. Delgadillo-Gutiérrez HJ, Solis-Widmann A, Ramírez-González MD, Izquierdo T, Delgadillo-Saldana MY, et al. In vitro antibacterial activity of Germisol on bacterial strains isolated from dental patients. Proc West Pharmacol Soc 2003;46:121-4.

11. Ahmad F, Young H, McLeod DT, Croughan MJ, Calder MA. Characterisation of Branhamella catarrhalis and differentiation from Neisseria species in a diagnostic laboratory. J Clin Pathol 1987;40(11):1369–73.

12. Jones JJ, Falkinham JO. Decolorization of Malachite Green and Crystal Violet by Waterborne Pathogenic Mycobacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy 2003;47(7):2323-6.

13. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. J Clin Microbiol 2002;40(5):1698-1704.

14. Nye KJ, Fallon D, Frodsham D, Gee B, Graham C, Howe S, et al. An evaluation of the performance of XLD, DCA, MLCB, and ABC agars as direct plating media for the isolation of Salmonella enterica from faeces. J Clin Pathol 2002;55:286-8.

www.SID.ir