پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی
سال ۲۲، شماره ۳، صفحات ۳۵-۴۰ (مهر-آذر ۱۳۷۷)

استفاده از ویوله دوژانسیان جهت جداسازی نیسریا در مبتلایان به اورتریت

دکتر علی‌اکبر سلیمانی رهبر*، دکتر حسین گودرزی* و دکتر رضاهادی بیداخویدی*
* گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی

خلاصه

با توجه به اثر وقفه دهنده ماده رنگی ویوله دو ژانسیان بر رشد بعضی از باکتریها بخصوص میکروارگانیسم‌های موجود در فلور طبیعی مجاری تناسلی و بی‌اثر بودن غلظت مناسب این ماده روی نیسریاگونوره (۱ و ۲) این بررسی، جهت تهیه محیطی مناسب، ارزان و قابل دسترس انجام گرفت. در این پژوهش، از ۱۰۶ مرد مبتلا به اورتریت نمونه ترشح مجرا گرفته شد. این نمونه‌ها روی محیطهای I NewYork city agar (NYC)، آگار شکلاتی و آگار شکلاتی همراه با غلظت‌های مختلف ویوله دوژانسیان کشت داده، طی ۴۸ ساعت داخل جار محتوی CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از بررسی نتایج کشت و مشاهده پرگنه‌های (کولونیهای) نیسریا با انجام آزمایشهای تشخیص بیوشیمیائی و مقایسه نتایج به‌دست آمده با آزمایش مستقیم (رنگ آمیزی گرام) رشد در محیطهای یاد شده مورد مقایسه قرار گفت. در نتیجه مشخص شد که برای جداسازی این باکتری می‌توان بجای محیط NYC از محیط آگار شکلاتی حاوی $\frac{1}{150000}$ ویوله

مقدمه

نیسریا گونوره‌آ عامل بیماری سوزاك است که یک نوع عفونت اپی‌تلیوم مخاطی و بافت پوششی مجرای ادرار و دستگاه تناسلی بوده، از بیماریهای آمیزشی شایع می‌باشد. علاوه بر دستگاه ادراری - تناسلی مناطق دیگر مانند حلق، مقعد، ملتحمه چشم و آندوسرویکس را نیز گرفتار می‌کند. عفونت تقریبا" همیشه در نتیجه آمیزش جنسی بروز می‌کند. با توجه به شیوع این بیماری کشت و جداسازی این باکتری دارای اهمیت است.

نتایج

از بین ۱۰۶ نمونه در محیط NYC ۶۴ مورد (۶۰/۳۷ درصد) گنوکوك مثبت مشاهده شد. در محیط آگار شکلاتی ۵۴ مورد (۵۰/۹۴ درصد) مثبت همراه با رشد باکتریهای دیگر داشتیم. از بین غلظت‌های ویوله دوژانسیان مناسبترین رشد گنوکوك در آگار شکلاتی حاوی $\frac{۱}{۱۵۰۰۰۰}$ ویوله به‌دست آمد که ۵۸ مورد (۵۴/۷ درصد) مثبت مشاهده شد؛ در حالی‌که در این محیط از رشد باکتریهای آلوده کننده نیز جلوگیری شده بود. در نتیجه با وجود باکتریهای مختلف در فلور نرمال مجرای ادرار (۸) به نظر می‌رسد آگار شکلاتی محتوی $\frac{۱}{۱۵۰۰۰۰}$ ویوله دوژانسیان بعد از محیط NYC (که در حال حاضر تهیه آن در داخل کشور مشکل و مقرون به صرفه نیست) برای جداسازی نیسریاگونوره محیطی مناسب باشد. از این ۱۰۶ نمونه که مورد آزمایش قرار گرفتند ۶۹ بیمار (۶۵/۰۹ درصد) دارای گسترش مستقیم مثبت بودند (حضور تعداد زیاد پلی‌مرفونوکلئر همراه با دیپلوکوکهای گرام منفی درون سلولی). به‌طور کلی نتایج به دست آمده در جدولهای ۱، ۲، ۳ و ۴ خلاصه شده است.

در پنج مورد که آزمایش مستقیم مثبت داشتند رشد روی محیط NYC مشاهده نشد. دو مورد از آنها روی محیطهای شکلاتی و محیطهای شکلاتی حاوی $\frac{۱}{۱۵۰۰۰۰}$، $\frac{۱}{۲۰۰۰۰}$ و $\frac{۱}{۲۵۰۰۰۰}$ ویوله دوژانسیان رشد کرده بودند که به نظر می‌رسد علت عدم رشد این دو نمونه در محیط NYC حساسیت احتمالی آنها نسبت به آنتی‌بیوتیکهای ونکومایسین، کلی‌ستین و نیستاتین باشد (۹). سه مورد دیگر که آزمایش مستقیم مثبت داشتند و در هیچ‌کدام از محیطها رشد آنها مشاهده نشد، احتمالا" در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک قبل از آزمایش بوده و یا آنتروکوکها که بسیاری از موارد گرام منفی دیده می‌شوند، در ترشح دیده شده‌اند (۱۰).

همراه با نیسریا گونوره‌آ باکتریهای فلور طبیعی مجرا و یا در اورتریت‌های غیرگنوکوکی باکتریهای دیگری در محیطهای فوق رشد کردند که عبارت بودند از استافیلوکوك، استرپتوکوك، کورینه باکتریوم و سراشیا که میزان رشد کلیه باکتریها در محیطهای یاد شده در جدول ۱ مشخص شده است.

با توجه به ارقام به‌دست آمده در جدول ۱ مشاهده می‌شود که حداکثر رشد نیسریا در محیط NYC ۶۴ مورد (۶۰/۳۷ درصد) بوده است. از سایر باکتریها ۸ مورد (۷/۵۴ درصد) استافیلوکوك و ۵ مورد (۴/۷۱ درصد) استرپتوکوك رشد داشته‌اند؛ در حالی‌که از رشد کورینه باکتریومها و سراشیاها جلوگیری شده است.

بحث

یکی از مشکلات جداسازی نیسریاهای بیماریزا از جمله نیسریا گونوره‌آ حساس بودن این باکتری به عوامل مختلف محیطی می‌باشد که این امر باعث از بین رفتن سریع باکتری و عدم رشد آن می‌شود (۱۱). از طرفی در مجاری ادراری و تناسلی باکتریهای مختلف فلور طبیعی وجود دارند که در موقع برداشت ترشح با گنوکوك همراه خواهند بود و با توجه به مقاومت رشد سریع این باکتریها

جدول ۱) درصد موارد رشد و عدم رشد گنوکوك در ۶۹ مورد اورتریت گنوکوکی

محیط	درصد رشد مثبت	درصد رشد منفی
NYC	۹۳	۷
شکلات آگار	۷۸	۲۲
شکلات ویوله آگار $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$	۹	۹۱
شکلات ویوله آگار $\frac{۱}{۱۵۰۰۰۰}$	۸۴	۱۶
شکلات ویوله آگار $\frac{۱}{۲۰۰۰۰۰}$	۸۱	۱۹
شکلات ویوله آگار $\frac{۱}{۲۵۰۰۰۰}$	۸۱	۱۹

جدول ۲) تعداد موارد ارگانیسم‌های جدا شده در کل نمونه‌ها

ارگانیسم محیط	نیسریا گونوره‌آ	استافیلوکوك SPP	استرپتوکوك SPP	کورینه باکتریوم SPP	سراتیا SPP
NYC	۶۴ (۶۰/۳۷)	۸ (۷/۵۴)	۵ (۴/۷۱)	—	—
شوکولات آگار	۵۴ (۵۰/۹۴)	۶۱ (۵۷/۵۴)	۲۸ (۲۶/۴۱)	۱۶ (۱۵/۰۹)	۱ (۰/۹۴)
شوکولات ویوله آگار $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$	۶ (۵/۶۶)	۱ (۰/۹۴)	—	۲ (۱/۸۸)	—
$\frac{۱}{۱۵۰۰۰۰}$	۵۸ (۵۴/۷)	۱۱ (۱۰/۳۷)	—	۵ (۴/۷۱)	—
$\frac{۱}{۲۰۰۰۰۰}$	۵۶ (۵۲/۸۳)	۳۷ (۳۴/۹۱)	۵ (۴/۷۱)	۱۱ (۱۰/۳۷)	۱ (۰/۹۴)

جدول ۳) تعداد موارد ارگانیسم‌های جدا شده در اورتریت‌های گونوکوکی (۶۹ نمونه)

ارگانیسم محیط	نیسریا گونوره‌آ	استافیلوکوک SPP	استرپتوکوک SPP	کورینه باکتریوم SPP	سراتیا SPP
NYC	۶۴ (۹۲/۷۵)	۵ (۷/۲۴)	۳ (۴/۳۴)	—	—
شکلات آگار	۵۴ (۷۸/۲۶)	۴۶ (۶۶/۶۶)	۱۹ (۲۷/۵۳)	۱۰ (۱۴/۴۹)	—
شکلات ویوله آگار $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$	۶ (۸/۱۹)	—	—	—	—
$\frac{۱}{۱۵۰۰۰۰}$	۵۸ (۸۴/۰۵)	۷ (۱۰/۱۴)	—	۲ (۲/۸۹)	—
$\frac{۱}{۲۰۰۰۰۰}$	۵۶ (۸۱/۱۵)	۲۸ (۴۰/۵۷)	۳ (۴/۳۴)	۷ (۱۰/۱۴)	—
$\frac{۱}{۲۵۰۰۰۰}$	۵۶ (۸۱/۱۵)	۴۰ (۵۷/۹۷)	۱۴ (۲۰/۲۸)	۸ (۱۱/۵۹)	—

* اعداد درون پرانتز نشانگر درصد است.

جدول ۴) تعداد موارد ارگانیسم‌های جدا شده در اورتریت‌های غیرگونوکوکی (۳۷ نمونه)

ارگانیسم محیط	استافیلوکوک SPP	استرپتوکک SPP	کورینه باکتریوم SPP	سراتیا SPP
NYC	۳ (۸/۱)	۲ (۵/۴)	—	—
شکلات آگار	۵۱ (۴۰/۵۴)	۹ (۲۴/۳۲)	۶ (۱۶/۲۱)	۱ (۲/۷)
شکلات ویوله آگار $\frac{۱}{۱۰۰۰۰۰}$	۱ (۲/۷)	—	۲ (۵/۴)	—
$\frac{۱}{۱۵۰۰۰۰}$	۴ (۱۰/۸۱)	—	۳ (۸/۱)	—
$\frac{۱}{۲۰۰۰۰۰}$	۹ (۲۴/۳۲)	۲ (۵/۴)	۴ (۱۰/۸)	۱ (۲/۷)
۱	۱۳	۷	۴	۱

در محیطهای کشت معمولی نیسریا فرصت کافی برای رشد ندارد و اگر هم رشد نماید پرگنه‌های آنها احتمالا" همراه با کلنی‌های این گروه از باکتریها بوده، در نتیجه برداشت و جدا کردن کولونیهای گونوکوك نیز مشکل خواهد بود.

برای حل این مشکل از محیطهای اختصاصی استفاده می‌شود که در آنها موارد وقفه دهنده از جمله ونکومایسین، کلی‌ستین و نیستاتین (VCN) و غیره وجود دارد که تا حد زیادی از رشد باکتریهای مزاحم جلوگیری می‌کند. یکی از این محیطهای اختصاصی محیط NYC می‌باشد. معذالک به علت مشکلات تهیه این محیط در داخل کشور و گرانی آن، این تحقیق با هدف ارزیابی اثر ویوله دوژانسیان روی رشد نیسریاگونوره‌آ و سایر باکتریهای همراه آن انجام گرفت. در نتیجه طبق آمار به دست آمده و جداول و نمودارها معلوم شد که محیط آگار شکلاتی همراه با ویوله دوژانسیان به نسبت $\frac{1}{150000}$، تا حدود قابل قبولی از رشد باکتریهای دیگر جلوگیری کرده، در عوض روی گنوکوك اثر وقفه دهنده ندارد. از طرف دیگر همان طوری که در قسمت نتایج عنوان شد رشد گنوکوك در محیط آگار شکلاتی بدون ویوله دوژانسیان بسیار کم و محدود بود، در صورتی که سایر باکتریها در این محیط رشد چشمگیری داشتند.

در ضمن در این بررسی، دو مورد رشد گنوکوك در محیطهای آگار شکلاتی و نیز آگار شکلاتی همراه با غلظت‌های مختلف ویوله دوژانسیان (به استثنای محیط حاوی $\frac{1}{100000}$ ویوله) مشاهده شد که هیچ کدام در محیط NYC رشد نکرده بودند. دلیل آن را می‌توان مربوط به حساس بودن آنها نسبت به آنتی‌بیوتیکهای موجود در این محیط (VCN) دانست.

در پایان، برای کشت و جداسازی نیسریاگونوره‌آ پیشنهاد می‌شود که از محیطهای زیر استفاده شود:

۱) محیط آگار ساده که در آن گنوکوك رشد نمی‌کند ولی نیسریاهای غیربیماریزا رشد می‌کنند.

۲) آگار شکلاتی که ضمن رشد احتمالی گنوکوك در آن باکتریهای دیگری که در محیط آگار ساده قادر به رشد نیستند رشد خواهند کرد.

۳) آگار شکلاتی حاوی $\frac{1}{150000}$، ویوله دوژانسیان برای جداسازی گنوکوك که در آن احتمال رشد سایر باکتریها بسیار کم است.

مـــراجـــع

1) Docampo R, Moreno J. The metabolism and mode of action of Gentian violet. Drug Metabolism Review 1990; P 161.
2) Bakker, Van Doorne TT. Activity of Gentian violet and brilliant green against some microorganisms associated with skin infections. Int Y Dermatol 1992; 31:210-3.
3) Bonin P, et al. Isolation of Neisseria Gonorrhoeae on selective and nonselective media in a sexually transmitted disease. Clin J Microbiol 1984; 218.
4) Bernard D, Davis, et al. Microbiol. 4th edition, 1990, P 552.
5) Ellen JO, Baron and Sydney M. Fine Gold: Genital and sexually transmitted pathogenes bailey. Scotts Diagnostocs Microbiol 1990; 263.
6) David, Greenwood, et al. Identification of Gonococci. Medical Microbiology. 14th edition 1992, P 300.
7) Lansing M. Prescott John, Harley P, Donald Kein A. Microbiology. Second edition 1993; PP 125, 330-333.
8) Murray, et al. Medical Microbiol. 1990, P 93.
9) Bernard, Henry. Clinical diagnosis and management by Laboratory methods. 19th Edition. 1996, P 1144.
۱۰) دکتر همتی یحیی. باکتریهای بیماریزا. جهاد دانشگاهی، تهران، جلد اول، صفحه ۹۸.
11) Collins and Lynes. Microbiology methods. 7th edition 1995, P 110.