

## ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOK SUŞLARINDA KRİSTAL VİYOLE REAKSİYONU

### CRYSTAL VIOLET REACTIONS OF STAPHYLOCOCCUS STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS CLINICAL SAMPLES

Birsel ERDEM<sup>\*</sup>, Derya AYSEV<sup>\*\*</sup>, Devran GERÇEKER<sup>\*</sup>  
Füsün ERLER<sup>\*</sup>

**Özet:** Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 118 Stafilococcus suşunda kristal viyole reaksiyonu (KVR) incelenmiştir. 118 suşun 83'ü *Staphylococcus aureus*, 35'i koagülaz negatif stafilocok (KNS); 41'i hastane, 77'si toplum kaynaklı; 37'si derin dokulardan, 81'i yüzeysel bölgelerden izole edilen suşlardır. *S.aureus* suşlarının KVR pozitifliği, KNS suşlarının KVR pozitifliğinden 1.71 kat daha fazla bulunmuştur (Odd's: 1.71, Odd's oranının % 95 güvenirlilik sınırı; 0.72-4.10). KNS suşlarında slime reaksiyonu ile KVR arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır. Hastane kaynaklı *S.aureus* suşlarında ve derin dokulardan izole edilen *S.aureus*'larda KVR'unun önemi vurgulanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Stafilocok, Kristal viyole reaksiyonu.*

**Summary:** Crystal violet reaction was investigated in 118 *Staphylococcus* strains isolated from various clinical samples at the Bacteriology Laboratory of Pediatric Clinic of Ankara University, Faculty of Medicine. The strains were composed of 83 *S.aureus* and 35 coagulase negative staphylococci (CNS); of which 41 were hospital originated, 77 were community originated; 37 strains from deep tissues and 81 strains from superficial areas. Crystal violet reaction (CVR) positivity ratio of *S.aureus* was found to be higher than that of CNS (Odd's: 1.71% 95 confidence limit for Odd's ratio 0.72-4.10). There was no statistical correlation between slime reaction and CVR in CNS. In this article, the importance of CVR in *S.aureus* strains of hospital origin and in *S.aureus* strains isolated from deep tissues have been emphasized.

**Key words:** *Staphylococci, Crystal violet reaction.*

\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

## G İ R İ Ő

Stafilokoklar dünyada ve ülkemizde en yaygın hastane enfeksiyonu etkenlerindedir ve özellikle 1980'li yıllardan başlayarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının ve koagülaz negatif stafilokokların (KNS) hastane enfeksiyonlarında büyük pay sahibi olduğu görülmektedir (1, 2, 3). Stafilokoklar yıllardır en çok incelenen bakteri cinslerindedir ve stafilokoklar için pekçok identifikasyon ve patojenlik özelliği tanımlanmıştır (4, 5, 6, 7).

Meyer 1966'da *S.aureus* suşlarını pekçok özelliklerini gözönüne alarak üç varyeteye ayırmıştır. *S.aureus* var.*humanis* suşlarının kristal viyole (KV) besiyerinde mor, *S.aureus* var.*bovis* suşlarının sarı ve *S.aureus* var.*canis* suşlarının ise beyaz renkli koloniler oluşturması ayırırda kullanılan en önemli özellik olmuştur (8).

Freeman ve ark. 1990'da yaptıkları çalışma sonunda kristal viyole reaksiyonunun (KVR) hastane kaynaklı *S.aureus* suşları için güvenilir bir işaret olabileceğini bildirmişlerdir (9).

Bu çalışma çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarında kristal viyole reaksiyonunu araştırmak, KVR'nu hastane enfeksiyonuna neden olan suşlarda ve derin dokulardan izole edilen suşlarda incelemek, KNS'larda KVR'nun slime testi ile ilişkisini araştırmak üzere planlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarında Ocak 1994 ile Ağustos 1994 ayları arasında enfeksiyon tablosu olan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 118 stafilokok suşu incelenmiştir. Bu klinik örnekler sayılarıyla şunlardır: 39 boğaz sürüntüsü, 30 kan, 14 idrar, 7 apse, 6 kulak, 5 göbek akıntısı, 3 periton, 4 yara, 2 kesiyeri, 2 fistül, 1 tırnak, 1 burun, 1 kateter, 1 vagen, 1 göz ve 1 dışkı.

Hastaneye yatırıldıktan 3 gün sonra ya da invaziv girişimlerden sonra izole edilen suşlar hastane kaynaklı, diğer suşlar ise toplum kaynaklı kabul edilmiştir.

Kan kültürlerinden izole edilen 30 suş, peritondan izole edilen 3 suş, abseden izole edilen 1 suş, fistülden izole edilen 2 suş ve kateterden izole edilen 1 suş olmak üzere 37 suş, derin dokulardan izole suşlar, kalan 81 suş ise yüzeysel bölgelerden izole suşlar olarak kabul edilmiştir.

Kültürler ve izolasyon klasik mikrobiyolojik yöntemlere göre yapılmıştır. Kanlı agarda 24-48 saatte yuvarlak düzgün, 1-3 mm çapında, hemolizli veya hemolizsiz, altın sarısı veya porselen beyazı koloniler oluşturan, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve gram boyalı preparatta tipik görünümlü bakteriler *Staphylococcus* cinsine ait kabul edilmiş ve bunlardan plazma koagülazı olanlar *Staphylococcus aureus*, plazma koagülazı olmayanlar ise koagülaz negatif stafilokok (KNS) şeklinde tanımlanmıştır (5, 6, 10).

## STAFİLOKOKLARDA KRİSTAL VİYOLE REAKSİYONU

KNS suşlarının slime testi incelenmiş, reaksiyonlar "+, ++, +++" olarak derecelendirilmekle birlikte bu çalışmada her üç derece de pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir (7).

İzole edilen tüm stafilokokların kristal viyole reaksiyonu Meyer tarafından açıklanan, Freeman ve ark.nın da uyguladıkları yöntemle göre araştırılmıştır (8, 9). Suşların nutrient agar plaklarında bir gecelik inkübasyonlarından sonra bir öze ile alınan kolonileri 1/100.000 oranında kristal viyole içeren nutrient agar plaklarına 5-6 mm çapında inoküle edilmiş ve 37 °C'de iki gün inkübasyondan sonra mor, beyaz ve sarı koloniler oluştuğu, besiyerine bu renklerin yayıldığı gözlenmiştir. Mor renk oluşturan suşların kristal viyole reaksiyonu (KVR) pozitif kabul edilmiştir.

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bilim Dalında Ki-kare testi ve Ridit Analizi kullanılarak yapılmış ve Odd's oranları hesaplanmıştır.

### B U L G U L A R

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen Stafilokok suşlarının türüne, kaynağına ve izolasyon bölgesine göre dağılımı Tablo 1'de görülmektedir. İncelenen toplam 118 Stafilokok suşunun 83'ü S.aureus, 35'i KNS; 41'i hastane, 77'si toplum kaynaklı; 37'si derin dokulardan, 81'i ise yüzeysel bölgelerden izole edilen suşlardır.

Tablo 1

#### Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Türüne, Kaynağına ve İzolasyon Bölgesine Göre Dağılımı

Klinik Örnekler	Sayı	Türü		Kaynak		İzolasyon Bölgesi	
		S.aureus	KNS	Hastane	Toplum	Derin Dokular	Yüzeysel Bölgeler
Boğaz	39	37	2	—	39	—	39
Kan	30	9	21	28	2	30	—
İdrar	14	8	6	1	13	—	14
Apse	7	5	2	1	6	1	6
Kulak	6	4	2	—	6	—	6
Göbek	5	4	1	—	5	—	5
Periton	3	3	—	2	1	3	—
Yara	4	4	—	4	—	—	4
Kesiyeri	2	2	—	2	—	—	2
Fistül	2	2	—	2	—	2	—
Tırnak	1	1	—	—	1	—	1
Burun	1	1	—	—	1	—	1
Kateter	1	1	—	1	—	1	—
Vagen	1	—	1	—	1	—	1
Göz	1	1	—	—	1	—	1
Dışkı	1	1	—	—	1	—	1
<b>Toplam</b>	<b>118</b>	<b>83</b>	<b>35</b>	<b>41</b>	<b>77</b>	<b>37</b>	<b>81</b>

Stafilokok suşlarında KVR sonuçları suş sayısı ve yüzdeleriyle Tablo 2'de görülmektedir. S.aureus suşları ile KNS suşları arasında KVR açısından istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ). S.aureus suşlarının KVR pozitifliği KNS suşlarının KVR pozitifliğinden 1.71 kat daha fazladır (Odd's: 1.71, Odd's oranının % 95 güvenirlilik sınırı 0.72-4.10).

Tablo 2  
Stafilokoklarda KVR Pozitifliğinin Türlere Göre Dağılımı

KVR	S.aureus		KNS		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Pozitif suşlar	49	59.03	16	45.71	65	55.08
Negatif suşlar	34	40.96	19	54.28	53	44.91
<b>Toplam</b>	<b>83</b>		<b>35</b>		<b>118</b>	

Hastane kaynaklı stafilokoklarda KVR pozitifliğinin dağılımı Tablo 3'de, toplum kaynaklı stafilokoklarda KVR pozitifliğinin dağılımı ise Tablo 4'de görülmektedir. Hastane ve toplum kaynaklı S.aureus ve KNS suşlarında KVR pozitifliğine göre istatistiksel fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ). Hastane kaynaklı S.aureus suşlarında KVR pozitifliği KNS suşlarının KVR pozitifliğinden 3.11 kat daha fazladır (Odd's: 3.11, Odd's oranının % 95 güvenirlilik sınırı 0.72-14.01).

Tablo 3  
Hastane Kaynaklı Stafilokoklarda KVR Pozitifliğinin Dağılımı

KVR	S.aureus		KNS		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Pozitif suşlar	14	70	9	42.85	23	56.09
Negatif suşlar	6	30	12	57.14	18	46.34
<b>Toplam</b>	<b>20</b>		<b>21</b>		<b>41</b>	

Tablo 4  
Toplum Kaynaklı Stafilokoklarda KVR Pozitifliğinin Dağılımı

KVR	S.aureus		KNS		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Pozitif suşlar	35	55.55	7	50	42	54.54
Negatif suşlar	28	44.44	7	50	35	45.45
<b>Toplam</b>	<b>63</b>		<b>14</b>		<b>77</b>	

Derin dokulardan izole edilen stafilokoklarda KVR pozitifliği Tablo 5'de, yüzeysel bölgelerden izole edilen stafilokoklarda KVR pozitifliği ise Tablo 6'da görülmektedir. Derin dokulardan ve yüzeysel bölgelerden izole edilen S.aureus ve KNS'larda KVR pozitifliğine göre istatistiksel fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ). Derin dokulardan izole S.aureus suşlarında KVR pozitifliği KNS suşlarından 2.93 kat daha fazladır (Odd's: 2.93, Odd's oranının % 95 güvenirlilik sınırı 0.62-14.59).

Tablo 5  
Derin Dokulardan İzole Edilen Stafilokoklarda KVR Pozitifliğinin Dağılımı

KVR	S.aureus		KNS		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Pozitif suşlar	11	68.75	9	42.85	20	54.05
Negatif suşlar	5	31.25	12	57.14	17	45.94
<b>Toplam</b>	<b>16</b>		<b>21</b>		<b>37</b>	

Tablo 6  
Yüzeysel Bölgelerden İzole Edilen Stafilokoklarda KVR Pozitifliğinin Dağılımı

KVR	S.aureus		KNS		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Pozitif suşlar	38	56.71	7	50	45	55.55
Negatif suşlar	29	43.28	7	50	36	44.44
<b>Toplam</b>	<b>67</b>		<b>14</b>		<b>81</b>	

KNS suşlarında Slime testi ve KVR pozitifliği Tablo 7'de görülmektedir. Bu iki özellik arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ). Çalışma kayıtlarındaki test sonuçları tek tek incelendiğinde Slime testi +++ olan 3 suşta ve Slime testi ++ olan 3 suşta, toplam 6 KNS suşunun 6'sında da KVR pozitifliği görülmüştür.

Tablo 7  
KNS'da Slime Testi ve KVR Pozitifliği

KVR	Slime Pozitif Suşlar		Slime Negatif Suşlar		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Pozitif suşlar	6	54.54	10	41.66	16	45.71
Negatif suşlar	5	45.44	14	58.33	19	54.28
<b>Toplam</b>	<b>11</b>		<b>24</b>		<b>35</b>	

## TARTIŞMA

S.aureus'un insandan en sık izole edilen, en patojen stafilokok türü olduğu eskiden beri bilinmekte ve bu tür için koagülaz yapımı önemli bir identifikasyon özelliği olarak kabul edilmektedir (11).

Son yıllarda KNS'lar immünsüpresif hastalarda, ayrıca prostetik kalp kapağı veya prostetik eklem taşıyan hastalarda, damar içi kateter, serebrospinal sıvı şantları ve peritoneal diyaliz kateterlerinin enfeksiyonlarında en önemli etken olarak dikkati çekmektedir (12).

Çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen 118 stafilokok suşunun 83'ü S.aureus 35'i KNS'dur. 83 S.aureus izolatının başlıca 37'si boğazdan, 35 KNS'un ise 21'i kan kültürlerinden izole edilmiştir.

Stafilokokların bilinen çeşitli virulans faktörlerinden hiçbirisinin tek başına virulansı belirleyen faktör olmadığı bazı çalışmalarda vurgulanmaktadır (4). Son yıllarda patojenliği farkedilen KNS suşlarının patojenliğinin in vitro incelenmesinde Slime testinin de yararlı olabileceği bildirilmiştir (7, 13).

KVR'nun 1966'da Meyer tarafından S.aureus suşlarının varyetelere ayırımı için kullanılmasından sonra S.aureus suşlarının KVR'u çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (9, 14, 15).

1990'da Freeman ve ark. (9), 168 klinik izolatta KVR'nu inceledikleri çalışmada S.aureus suşlarının % 50.6'sının mor, % 39.3'ünün beyaz ve % 10.1'inin sarı renkli koloniler oluşturduklarını belirlemişlerdir. Suşların faj gruplarını inceleyerek mor reaksiyonlu suşların faj grup III'e beyaz ve sarı reaksiyonlu suşların faj grup II'ye ait olabileceğini istatistiksel olarak göstermişlerdir. Ayrıca hastane enfeksiyonlarından izole edilen S.aureus suşlarının % 60.9 oranında, toplum kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen S.aureus suşlarının ise % 22.2 oranında mor renkli koloniler oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada mor renkli suşların derin S.aureus enfeksiyonlarından % 58.5, yüzeysel enfeksiyonlarda ise % 35.1 oranında olduğu gösterilmiştir.

1993'de Hudson ve ark. (14) tarafından doğumdan sonra bebeklerde kolonize olan S.aureus suşlarının KVR'nun incelendiği çalışmada 460 bebekten doğumdan hemen sonra hastaneden taburcu olurken ve doğumdan 6 hafta sonra izole edilen suşların yaklaşık % 60'ünün mor renk veren suşlar olduğu ve bu suşların daha kalıcı oldukları gösterilmiştir. Toplumda hastane kaynaklı S.aureus suşlarının yayılmasında Kadın-Doğum kliniklerinin önemli bir rol oynadığı vurgulanmıştır.

Literatürde KNS suşlarının KVR'nun incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır. KNS'ların son yıllarda artan klinik önemleri nedeniyle çalışmamızda klinik materyalden izole edilen tüm Stafilokok suşlarında KVR'nu araştırdık.

KVR'nun incelendiği diğer çalışmalarda insan biyotipi S.aureus suşlarının, hastane kaynaklı suşların ve derin dokulardan izole edilen suşların KV besiyerinde mor renk oluşturdukları gözlenmiştir (8, 9, 14). Bu nedenle çalışmamızda mor renk oluşmasını doğrudan KVR pozitif, sarı veya beyaz renk oluşmasını ise KVR negatif kabul ettik.

Çalışmamızda S.aureus suşlarında % 59.03, KNS suşlarında ise % 45.71 oranında KVR pozitifliği belirledik. S.aureus suşlarında KVR pozitifliği KNS suşlarından 1.71 kat daha fazla bulundu (Odd's: 1.71, Odd's oranının % 95 güvenilirlik sınırı 0.72-4.10).

Çalışmamızda KNS suşları için Slime özelliğini 35 suşun 11'inde (% 31.41) gösterdik. Bu suşlarda Slime reaksiyonu ile KVR arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır. Buna karşın Slime reaksiyonu +++ ve ++ olan 6 KNS suşunun tümünde KVR'unun pozitif olmasını ve Slime + veya - olan suşlarda ise KVR'nun negatif olmasını dikkat çekici bulmaktayız. Bu gözlemimiz nedeniyle bu iki test arasında bir ilişki olabileceğini düşünmekteyiz ve yapılacak moleküler çalışmaların konuya ışık tutabileceğini sanıyoruz.

1992'de Barer ve ark. (15) S.aureus suşlarında patojenite, kaynak ve biyotiple ilişkili görünen KVR'nun mekanizmasını çeşitli in vitro şartlarda incelemişlerdir, beyaz ve mor suşların metanol ekstratlarının ince tabaka kromatografisinde hücre ile ilişkili kristal viyole ürününü göstermişlerdir. Kristal viyoleyi yavaş veya hızlı bir şekilde modifiye etme yeteneğine göre insan biyotipi S.aureus suşlarının faj gruplarından bağımsız olarak belirlenebileceğini; mor reaksiyon veren suşların hastane kökenli enfeksiyonlarla daha fazla birlikte olduğunu ve bu özelliğin S.aureus suşlarının hastanelerde insan derisi üzerinde kolonize olma özelliği ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda hastane kaynaklı S.aureus suşlarının KVR pozitifliği, hastane kaynaklı KNS suşlarının KVR pozitifliğinden 3.11 kat daha fazladır (Odd's: 3.11, Odd's oranının % 95 güvenilirlik sınırı 0.72-14.01). Derin dokulardan izole edilen S.aureus suşlarının KVR pozitifliği, derin dokulardan izole edilen KNS suşlarının KVR pozitifliğinden 2.93 kat daha fazladır (Odd's: 2.93, Odd's oranının % 95 güvenilirlik sınırı 0.62-14.59).

Sonuç olarak ülkemizde ilk defa incelendiğini sandığımız KVR kolay, pratik ve ekonomik bir testtir. Çalışmamızda hastane enfeksiyonlarına yol açan ve derin dokulardan izole edilen S.aureus suşlarında KVR sırasıyla % 70 ve % 68.75 oranında pozitif bulunmuştur. Diğer çalışma sonuçlarında da vurgulandığı gibi KVR'nun hastane kaynaklı S.aureus suşları için basit ve kolay bir işaret olabileceğini sanıyoruz. Bununla birlikte KVR'nun diğer epidemiyolojik ve moleküler özelliklerini ortaya koymak için farklı bakış açılarıyla üzerinde çalışılması gerektiğini de düşünmekteyiz.

### Teşekkür

Sonuçların istatistiksel değerlendirimi konusunda yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bilim Dalından Dr. Kenan KÖSE'ye teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

1. Wenzel R: Epidemiology of hospital-acquired infection. p. 147-50. In Balows A, Hausler WJ, Herrman KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (Ed). Manuel of Clinical Microbiology, 1991 5<sup>th</sup> ed. Amer Soc Microb, Washington DC.
2. Erdem B: Cerrahi enfeksiyonların mikrobiyolojisi. p. 37-50. In Baskan S, Willke A (Ed). Cerrahi enfeksiyonların önlenmesi simpozyumu 2-3 Nisan 1993 Ankara, Simpozyum kitabı, Ankara.
3. Karahan M, Karabiber N, Kılıç H: Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi 1993 yılı nozokomiyal enfeksiyon durumu. p. 246. In Wilke A, Ünal S, Doğanay M (ed). VII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 11-15 Eylül 1994 Ürgüp, Program ve Kongre Tutanakları, Ankara.
4. Eraksoy H: Stafilocok enfeksiyonları ve virulans faktörleri. *İnfeksiyon dergisi*, 1989, 3: 311-20.
5. Eraksoy H: Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında Staphylococcus aureus'un idantifikasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 1988, 18: 122-28.
6. İnanç D: Stafilocokların mikrobiyolojik tanı özellikleri. *İnfeksiyon dergisi*, 1990, 4: 685-91.
7. Akova M, Gür D, Akalın HE, Baykal M: Klinik önemi olan Staphylococcus epidermidis suşlarının saptanmasında slime testinin yeri. *İnfeksiyon dergisi*, 1989, 3: 321-26.
8. Meyer W: A proposal for subdividing the species Staphylococcus aureus. *Int J System Bact*, 1966, 17: 387-89.

9. Freeman R, Hudson SJ, Burdess D: Crystal violet reactions of fresh clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from two British hospitals. *Epidemiol Infect*, 1990, 105: 493-500.
10. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 1992, 4th ed, JB Lippincott company, Philadelphia.
11. Waldwagel FA: *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome) p. 1489-510. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (Ed), *Principles and Practise of Infectious Diseases*, 1990, 3<sup>rd</sup> ed. Churchill Livingstone Inc, Newyork.
12. Archer GL: *Staphylococcus epidemidis* and other coagulase negative staphylococci. p. 1511-18. In Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE (ed), *Principles and Practise of Infectious Diseases*, 1990, 3<sup>rd</sup> ed. Churchill Livingstone Inc, Newyork.
13. Christensen GD, Baddour LM, Madison BM, Parisi JT, Abraham WA: Colonial morphology of staphylococci on memphis agar: phase variation of slime production, resistance of betalactam antibiotics and virulence. *J Infect Dis*, 1990, 161: 1153-169.
14. Hudson SJ, Freeman R, Burdess D, Cookson BD: Crystal violet reactions of *Staphylococcus aureus* strains colonizing infants in the first six weeks. *Epidemiol Infect*, 1993, 110: 79-86.
15. Barer MR, Burdess D, Freeman R: A study in to the mechanism of the crystal violet reaction in *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol Infect*, 1992, 109: 87-96.