**9. دستگاه تناسلی**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل نمونه های دستگاه تناسلی** | |
| **کد سند:** | D-006-0009 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل های تفسیر کشت های مختلف بدن | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **تصدیق و امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

**(1) هدف:**

تشریح روش انجام نمونه های دستگاه تناسلی شامل نمونه گیری، انتقال، نحوه کشت و تفسیر کشت ها.

**(2) تعاریف و اصطلاحات:**

**سرویسیت یا التهاب گردن رحم**: سرویسیت یک التهاب سلول های اپیتلیال و ستونی اندوسرویکس است که با عفونت و یا عدم عفونت همراه است. عوامل اصلی رایج این عفونت کلامیدیا تراکوماتیس و نایسریا گنوره آ و میکروارگانیسم های کمتر رایج شامل مایکوپلاسما و اوره آپلاسما هستند.

**ولوو واژینیت**: التهاب مخاط واژن، به نام واژینیت، یک سندرم بالینی شایع است که تقریباً 10 میلیون مراجعه سالانه به مطب را منجر می شود. زنانی که دارای علائم واژینیت هستند، اغلب از ترشحات غیرطبیعی و علائم اضافی مانند بوی تند یا خارش شکایت می کنند.

سه دلیل شایع واژینیت در زنان عبارتند از: کاندیدیازیس ولوواژینیت (VVC)، واژینوز باکتریایی (BV) و واژینیت تریکومونیازیس (TV). اخیراً سندرم جدید به نام واژینیت هوازی (AV) هم اضافه شده است.

**کاندیدیازیس**: کاندیدیازیس ولوواژینیت یک عفونت واژینیت علامت دار است که به وسیله کاندیدا ایجاد می شود. کاندیدا آلبیکنس حدود 80٪ تا 90٪ موارد کاندیدیازیس واژن را ایجاد می کند.

**تریکومونازیس**: واژینیت تریکوموناسی (TV) یا تریکومونازیس که توسط انگل تک یاخته تریکوموناس واژینالیس ایجاد می شود، براساس گزارش WHO رایجترین عامل بیماری منتقل شونده جنسی با تقریباً 174 میلیون مورد در هر سال در سراسر جهان است.

**واژینوز باکتریایی (**BV**)**: علاوه بر واژینیت ناشی از تریکوموناس واژینالیس و کاندیدا، یک نوع سوم وجود دارد که از آن به عنوان واژینوز باکتریایی یاد می شود. در ابتدا، تصور می شدBV با عفونت گاردنرلا واژینالیس همراه است، اما این باکتری از 40٪ از زنان بدون علامت به عنوان فلور طبیعی از واژن جدا شد. بنابراین حضور آن نباید تشخیصی برایBV در نظر گرفته شود.BV از نظر علت چند میکروبی است و شامل گاردنرلا واژینالیس و سایر موجودات هوازی اختیاری و بیهوازی است.

**واژینیت هوازی (**AV**)**:در سال 2002،Donders وAss لغت واژینیت هوازی (AV) را بر اساس خصوصیات باکتریولوژیکی، ایمونولوژیکی و بالینی پیشنهاد کردند. اگر در واژن باکتریهای هوازی مانند اشریشیاکلی (و گاهی بقیه انتروباکتریالها)، گروهB استرپتوکوک یا استافیلوکوکوس اورئوس و همینطور انتروکوک غالب شوند، حالت نگران کننده ای به نام واژینیت هوازی اتفاق می افتد. عدم وجود لاکتوباسیل مانند BV‌ هم یک ویژگی ازAV است. AV بر اساس معیارDonders تعیین می شود: ترشح زرد افزایش یافته، مقدارpH بیشتر از 5/4، تست منفی وایف (آزمایش منفی بوی ماهی)، افزایش تعداد لکوسیت ها بیشتر از 10، عدم وجود لاکتوباسیل و جداسازی باکتری های بیماریزای اشاره شده.

**لاکتوباسیلوز** (lactobacillosis) یا **لاکتوباسیلوز** **واژینال**:(VL) علائم شبیه به کاندیدیازیس دارد و اغلب بعد از درمان ضد قارچی اتفاق می افتد. لام گرم یا قطره مرطوب به طور معمول تعداد زیادی از لاکتوباسیل های بسیار دراز را نشان می دهد. این لاکتوباسیل های عمدتاً بیهوازی با طول 40 تا 75 میکرومتر هستند و به طور قابل توجهی درازتر از میانگین متوسط لاکتوباسیلوس های ​​میکروبیوتای طبیعی (5 تا 15 میکرومتر) هستند.

**بیماری فوزی فرم-اسپیروکت**: یک بیماری با میکروبیوتای بیهوازی مخلوط از فوزوباکتری ها و اسپیروکت ها است که به صورت ثانویه به ضایعات موجود ناشی از سایر بیماری ها ایجاد شود که می تواند به سرعت پیشرفت کند.

جدول 1. عفونت های تناسلی بر اساس زمان عفونت، مسیر عفونت و عامل عفونت.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **زمان عفونت** | **مسیر عفونت** | **عامل عفونت** |
| قبل از تولد | عبور از طریق جفت | **باکتریها**: لیستریا مونوسیتوژنز، ترپونما پالیدوم، بورلیا بورگدورفری،  **ویروس** ها: سیتومگالوویروس(CMV) ، سرخچه، انتروویروس، HIV ، Parvovirus B19 ،  **انگل**: توکسوپلاسما گوندی ، پلاسمودیوم. |
| مسیر صعودی | **باکتریها**: استرپتوکوک گروه B، اشریشیاکلی، کلامیدیا تراکوماتیس، مایکوپلاسمای ژنیتال، لیستریا مونوسیتوژنز، **ویروسها**: سیتومگالوویروس و هرپس ویروس |
| زمان تولد | عبور از کانال زایمان | **باکتریها**: استرپتوکوک گروه B، اشریشیاکلی، کلامیدیا تراکوماتیس، گنوکوک، لیستریا مونوسیتوژنز، **ویروسها**: سیتومگالوویروس و هرپس، انتروویروس، هپاتیت B، HIV |
| بعد از تولد | تمام مسیرهای ذکر شده، از محیط مهد کودک، یا از تماس مادر (به عنوان مثال، شیردهی) | همه عوامل ذکر شده قبل و ارگانیسم های مختلف از محیط مهد کودک، از جمله باکتری ها و ویروس های گرم منفی، مانند ویروس سنسیشیال تنفسی |

جدول 2. مقایسه واژینوز باکتریایی (BV) و واژینیت هوازی (AV).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ویژگی** | **BV** | **AV** |
| pH | بیشتر از 5/4 | بیشتر از 5/4 و معمولاً بیشتر از 6 |
| ترشحات | سفید و یکدست | زرد |
| التهاب اپیتلیال | ندارد | دارد |
| ریختن سلول های اپیتلیال | کلوسل | سلول های پاربازال |
| تست وایف (بوی آمین ماهی) | مثبت | منفی |
| حضور لاکتوباسیلها | نیست | نیست |
| پاتوژنها | گاردنرلا واژینالیس، موبیلونکوس و بیهوازی های دیگر | استرپتوکوک گروه B، اشریشیاکلی، انتروکوک فکالیس و استافیلوکوک آرئوس |
| سیتوکین های التهابی | بالا | متوسط |
| واکنش ایمنی (سیتوکین ها) | راکتیو | غیر راکتیو |
| درمان | کلیندامایسین، مترونیدازول | کانامایسین، کلیندامایسین موضعی و فلوروکوئینولونها مثل سیپروفلوکساسین و افلوکساسین |

**(3) شرح دستورالعمل:**

**تشخیص آزمایشگاهی عفونت های دستگاه تناسلی**

**جمع آوری نمونه**

* از سواب کوچک که با پنبه یا رایون (ابریشم مصنوعی) ساخته شده و با زغال چوب آغشته شده برای نمونه گیری استفاده می شود تا مواد سمی برای جداسازی بهتر گونوکوک، مایکوپلاسما و کلامیدیا را جذب کند.
* سواب‌های آلژینات کلسیم معمولاً برای HSV، گونوکوک‌، کلامیدیا و مایکوپلاسما نسبت به سواب‌های پنبه‌ای سمی‌تر هستند.
* از آنجایی که سواب داکرون کمترین سمیت را دارد، برای نمونه های ویروسی توصیه می شود. این سواب ها برای کلامیدیا و مایکوپلاسماهای تناسلی و غالب پاتوژن های سیستم تناسلی قابل قبول هستند.
* دو سواب جداگانه برای لام مستقیم و کشت باید تهیه شود.

**نمونه مجرا:**

* حذف مخاط حاوی سلول های اپیتلیال از مجرای ادرار مهم است اما در مورد باکتری کلامیدیا چون یک باکتری داخل سلولی است مهم است که سلول های اپیتلیال داخل نمونه باشند و باید همراه ترشحات موکوسی مجرا با کمک سواب برداشته شوند.
* برای بررسی عفونت های مجرا، اپیدیدیم و بیضه مردان، ترشحات جمع آوری شده از طریق مجرای ادرار نمونه انتخابی است. اگر آبسه وجود دارد بهتر است با جراحی یا با سوزن و سرنگ تخلیه و نمونه گرفته شود (آسپیراسیون).
* هنگامی که ترشحات فراوان از مجرای ادرار وجود دارد، به ویژه در مردان، ترشحات ممکن است از خارج بدون ورود سواب به مجرای ادرار جمع آوری شود (بجز برای کلامیدیا که برای جمع آوری سلول های اپیتلیال بهتر است سواب وارد مجرا هم بشود).
* در مردان اگر ترشحات واضح چرکی خارج می شود، بعد از استریل کردن نوک مجرا با پنبه الکل ۷۰ درصد اجازه می دهیم الکل خشک شود و سپس از بیمار می خواهیم پوست ناحیه تناسلی را از قسمت پایین به سمت بالا فشار دهد تا ترشحات جدید خارج شده و با کمک یک سواب نمونه را برداشت می کنیم. اگر نمونه خارج نشد سواب را چند سانتی متر وارد سوراخ مجرا کرده و با اندکی چرخش نمونه را بگیرید.
* چند قطره از اولین تخلیه ادرار نیز با موفقیت برای تشخیص گنوکوک در مردان استفاده شده است.
* برای نمونه پروستات از ماساژ استفاده می شود که نحوه صحیح آن و تفسیر کشت در دستورالعمل کشت های ادرار آمده است.

**نمونه سرویکس یا دهانه رحم:**

* این نمونه برای جداسازی تبخال، گنوکوک، مایکوپلاسما و کلامیدیا مفید است.
* برای نمونه گیری ابتدا مخاط با مالش آرام ناحیه با پنبه پاک می شود، سواب از مجرای ادرار به کانال دهانه رحم وارد می شود و قبل از برداشتن به مدت 30 ثانیه چرخانده ​​و از یک طرف به سمت دیگر حرکت می دهیم.
* نمونه های اندوسرویکال با حذف موکوس اکتوسرویکال پس از قرار گرفتن اسپکولوم در دهانه رحم به دست می آیند که امکان دیدن ساختار واژن و دهانه رحم را فراهم می کند. اسپکولوم بهتر است برای نرم شدن با آب گرم مرطوب شود، زیرا بسیاری از روان کننده ها حاوی عوامل ضد باکتری هستند.
* از آنجایی که ترشحات طبیعی واژن حاوی مقادیر زیادی باکتری است، باید مراقب بود تا از آلودگی سواب های کشت در اثر تماس با این ترشحات جلوگیری شود یا به حداقل برسد.
* برای اطمینان از جمع آوری مواد سلولی، می توان از یک برس سیتولوژی کوچک نایلونی یا سیتوبراش استفاده کرد. جمع آوری ممکن است منجر به ناراحتی و خونریزی بیمار شود.

**نمونه ترشحات واژن:**

* علاوه بر نمونه دهانه رحم، نمونه های ترشحات واژن نیز ممکن است با سواب جمع آوری شوند.
* ارگانیسم هایی که احتمال ایجاد ترشحات واژن را دارند عبارتند از تریکوموناس، مخمر و عوامل BV و AV.
* برای تشخیص BV سواب‌ در مایعی که در قسمت خلفی واژن جمع می‌شود فرو می‌رود.
* برای بررسی وجود استرپتوکوک های گروهB ، نمونه با سواب از پایین واژن و به دنبال آن رکتوم با استفاده از همان سواب (یا سواب جداگانه) در هفته های 35 تا 37 بارداری، استفاده می شود.
* عفونت های دستگاه تناسلی ناشی از عوامل مقاربتی در کودکان (نوجوانان) اغلب نتیجه سوء استفاده جنسی است. به دلیل پیامدهای پزشکی-حقوقی، آزمایشگاه باید نمونه‌های چنین بیمارانی را با دقت فوق‌العاده بررسی کند و همه جدایه‌ها را با دقت شناسایی و مستند کند. اگرچه روش های آزمایش مبتنی بر اسید نوکلئیک برای شناسایی ارگانیسم‌های مرتبط با موارد سوء استفاده جنسی در دسترس هستند، کشت همچنان روش ارجح برای تشخیص گونوکوک و کلامیدیا در موارد پزشکی قانونی است.
* **بررسی لام از نظر تریکوموناس:** نمونه واژن برای کشت و لام مستقیم تریکوموناس باید توسط دو سواب جمع آوری شود، نمونه اول به صورت لام مرطوب (لام وت: Wet-mount) باید بررسی شود که نمونه گرفته شده با سواب در یک لوله حاوی 5/0 میلی لیتر سرم فیزیولوژیک استریل قرار گرفته و بعد از همزدن سواب در سرم، بلافاصله (زیر ده دقیقه) با عدسی 40 میکروسکوپ دیده می شود. اینجا باید در جستجوی تروفوزیتهای متحرک با اندازه تقریبی سلول WBC‌ باشیم. نمونه سواب دوم برای کشت استفاده می شود.
* چند قطره اول ادرار خالی شده، در صورتی که فوراً در محیط کشت تلقیح شود هم نمونه مناسبی برای جداسازی تریکوموناس از مردهای آلوده است. متناوباً، ممکن است مواد روی یک لام برای رنگ آنتی بادی فلورسنت قرار گیرند.
* محیط های تجاری برای کشت تریکوموناس در دسترس هستند.

**ترشحات غده بارتولین:**

* از آنجا که حذف آلودگی با میکروبیوتای واژن غیرممکن است، تهیه سواب از ترشح غده بارتولین توصیه نمی شود و تشخیص اغلب بر اساس علائم و نشانه ها انجام می شود.
* در صورت نمونه گیری، نمونه ها باید به گونه ای جمع آوری شوند که از آلودگی میکروبیوتای واژن جلوگیری شود.
* مواد آسپیره شده (جمع آوری شده توسط سوزن و سرنگ) از غدد بارتولین آلوده پس از آماده سازی دقیق پوست، بهترین نمونه را نشان می دهد.
* اگر در زمان جراحی یا لاپاراسکوپی نتوان نمونه را به دست آورد، جمع آوری محتویات داخل رحمی با استفاده از یک دستگاه ساکشن کورت محافظت شده یا دستگاه نمونه برداری دو لومن که از طریق دهانه رحم وارد می شود نیز قابل قبول است.
* کولدوسنتز (آسپیراسیون مایع در کول-د-ساک)، پس از ضد عفونی واژن توسط پوویدون ید، رضایت بخش است اما امروزه به ندرت انجام می شود.
* مواد آسپیره شده باید در یک ظرف حمل و نقل بیهوازی قرار داده شوند و کشت ها باید از نظر باکتری های بیهوازی و هوازی ارزیابی شوند.

**انتقال نمونه های تناسلی**

* سواب‌های جمع‌آوری‌شده برای جداسازی گنوکوک‌ها باید در محیط های انتقال زغال استوارت یا آمیس اصلاح ‌شده به آزمایشگاه منتقل و تا زمانی که به محیط کشت تلقیح شوند، در دمای اتاق نگهداری شوند.
* اگر سواب ها در عرض 12 ساعت پس از جمع آوری کشت داده شوند، بازیابی خوب گنوکوک امکان پذیر است. نمونه های که باید بیش از 12 ساعت نگه داشته شوند باید مستقیماً به یکی از سیستم های تجاری طراحی شده برای بازیابی گنوکوک تلقیح شوند.
* سواب‌های جداسازی کلامیدیا و مایکوپلاسما در محیط های انتقال ویژه حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر اجزای ضروری منتقل می‌شوند.
* نمونه های کشت کلامیدیا باید روی یخ حمل شوند (نمونه های حمل شده در دمای اتاق باید طی 15 دقیقه پس از جمع آوری تلقیح شوند). نمونه ها را می توان تا 24 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری کرد. اگر تلقیح کشت بیش از 24 ساعت به تعویق بیفتد، نمونه ها باید سریعاً در حمام یخ خشک و اتانول 95 درصد منجمد شوند و تا زمان کشت در دمای 70- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
* در صورت جمع آوری و انتقال در محیط های انتقال خاص، نمونه های کشت مایکوپلاسمای تناسلی ممکن است روی یخ یا در دمای اتاق حمل شوند. اگر محیط های انتقالی مایکوپلاسمای تناسلی وجود ندارد، نمونه ها باید روی یخ حمل شوند تا رشد میکروبیوتای آلوده را سرکوب کنند.
* سواب برای استرپتوکوک های گروهB باید در یک محیط حمل و نقل غیرمغذی، مانند آمیس یا استوارت، بدون زغال چوب به آزمایشگاه منتقل شود.

**بررسی مستقیم میکروسکوپی نمونه های تناسلی**

* اگر فقط یک سواب برای لام مستقیم و کشت ارسال شده است، پس از تلقیح به محیط کشت، سواب بر روی سطح یک لام شیشه ای قرار می گیرد به گونه ای مساحت حداقل 1 سانتی متر مربع را بپوشاند.
* نمونه های جمع آوری شده از داخل مجرای ادرار ممکن است حاوی سلول های اپیتلیال مکعبی کوچک با یک هسته بزرگ باشد.
* ترشحات مجرای ادرار و دهانه رحم ممکن است با رنگ آمیزی گرم از نظر وجود دیپلوکوک های درون سلولی گرم منفی، که معمولاً نشان دهنده عفونت **نایسریا گنوره آ (سوزاک)** در مردان است، بررسی شود.
* اورتریت می تواند بر اساس حضور چرک موکوسی مجرای ادراری و حضور میانگین پنج یا بیشتر لکوسیت (5 ≤) در عدسی روغنی میکروسکوپ در یک اسمیر اگزودای مجرای ادراری یا بیشتر ازWBC/hpf 10 در قسمت اول ادرار و تست لکوسیت استراز مثبت روی رسوب اول ادرار تشخیص داده شود.
* یک رنگ آمیزی گرم اگزودا در یک مرد مبتلا به اورتریت کهWBC با دیپلوکوک گرم منفی داخل سلولی را نشان می دهد تأیید کننده نایسریا گنوره آ (اورتریت گنوکوکی) در مردان علامت دار است (بیشتر از 90% اختصاصیت و 89% حساسیت).
* رنگ آمیزی گرم که حاویPMN های متعدد بدون دیپلوکوک های گرم منفی درون سلولی است نیز ممکن است نشان دهنده اورتریت غیرگنوکوکی (NGU یا اورتریت غیراختصاصی NSU) باشد.
* اسمیر مجرای ادرار از زنان نیز ممکن است مورد بررسی قرار گیرد. دیپلوکوک های خارج سلولی در زنان نشانه ای از میکروبیوتای تناسلی طبیعی است و میکروب شناس باید به بررسی اسمیر از نظر دیپلوکوک های داخل سلولی ادامه دهد که وجود ارگانیسم های بیماری زا را نشان می دهد. تشخیص قطعی در زنان باید شامل تأیید از طریق کشت یا PCR باشد.
* تشخیص سرویسیت معمولاً به شکل بالینی انجام می شود اما آنالیز میکروسکوپی بیشتر ازWBC/hpf 10 نشان دهنده عفونت اگزودای سرویکس با عوامل عفونی مانند کلامیدیا و گنوکوک است.
* رنگ آمیزی گرم اگزودای سرویکس در 50% موارد صحیح است و بنابراین به شکل رایج مورد استفاده قرار نمی گیرد. اینجا نیز کشت تأییدی یا یک روش غیرکشتی جایگزین مثل PCR همیشه باید بر روی نمونه های زنان انجام شود.
* به دلیل اینکه علائم ولوواژینیت و سرویسیت هم پوشانی دارد بنابراین اگر ضروری باشد هر فرد باید برای باکتری های واژینوز (BV) و تریکومونازیس هم مورد ارزیابی قرار گیرد.
* **نایسریا مننژیتیدیس** زمانی که یک رنگ آمیزی گرم مجرای ادرار نشان دهنده وجود دیپلوکوک های داخل سلولی گرم منفی باشد و یک آزمایش مبتنی بر غیرکشت مانند PCR برای حضور گنوکوک منفی باشد باید در نظر گرفته شود.
* معرف های آنتی بادی مونوکلونال کونژوگه با فلورسین برای دیدن انکلوزین های **کلامیدیا تراکوماتیس** در کشت های سلولی یا اجسام ابتدایی در نمونه های مجرای ادرار و دهانه رحم حساس و اختصاصی هستند. معرف‌های رنگ‌آمیزی مستقیم نمونه‌ها به صورت تجاری در سیستم‌های جمع‌آوری و آزمایش کامل موجود هستند. در برخی از مطالعات، حساسیت تشخیص کلامیدیا با این معرف‌ها مشابه حساسیت کشت بوده است. اگر حداقل 10 اجسام ابتدایی فلورسنت سازگار مورفولوژیکی روی اسمیر دیده شوند، نتایج مثبت واقعی است و کاذب نیست.
* هیچ روش دیدن مستقیمی برای تشخیص مایکوپلاسما وجود ندارد، اما سنجش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک حساس‌ترین روش‌ها برای تشخیص این ارگانیسم‌های سخت‌گیر هستند.
* بررسی مستقیم میکروسکوپی آماده سازی مرطوب ترشحات واژن، ساده ترین تست تشخیصی سریع برای **تریکوموناس واژینالیس** است که می تواند بلافاصله مورد بررسی قرار گیرد. تروفوزوئیت های متحرک تریکوموناس را می توان در یک آماده سازی معمولی مرطوب در دو سوم موارد مشاهده کرد یا از رنگ آنتی بادی فلورسنت مستقیم (DFA) یا از میکروسکوپ فاز کنتراست استفاده کرد. یافته‌های مثبت روی مانت مرطوب علیرغم آسان بودن این تست حساسیت بین 60-70 % دارد. همچنین روش پروب اولیگونوکلئوتیدی Affirm VPIII هم برای تشخیص مستقیم این انگل وجود دارد.
* تشخیص **عفونت مخمری** معمولاً براساس علائم بالینی انجام می شود اما ترشحات برای بررسی میکروسکوپیک و کشت استفاده می شود و با حضور مخمرها سایر عوامل واژینوز رد می شود. سلول های جوانه زده و شبه‌هیف‌های مخمر را می‌توان با افزودن 10 درصد هیدروکسید پتاسیم که پروتئین های سلول میزبان را حل کرد و دیدن عناصر قارچی را افزایش می دهد، به راحتی در آماده‌سازی‌های مرطوب شناسایی کرد یا به روش گرم رنگ کرد. pH مایع واژن بدون تغییر باقی می ماند که با ارزیابیpH در تریکومونازیس وBV متفاوت است.
* **بیماریBV** : با رنگ آمیزی گرم از سایر عفونت های واژن متمایز می شود. یک سیستم درجه بندی برای لام های گرم ترشحات واژن به نام سیستم امتیاز دهی یا شمارش Nugent ایجاد شده است که یک روش استاندارد تفسیر رنگ آمیزی گرم برای اسمیرهای واژن با کمک رنگ آمیزی گرم است که برای تشخیص واژینوز باکتریایی از کشت دقیق تر است. در این سیستم اسمیر رنگ آمیزی گرم برای حضور و شمارش لاکتوباسیل، گاردنرلا و موبیلونکوس بررسی می شود. نحوه محاسبه عدد Nugent برای عفونت واژینوز در جدول 3 آمده است. طبق این جدول مجموع امتیازات سه کادر جدول عدد Nugent خواهد بود که کمترین عدد برای BV عدد صفر و بیشترین احتمال عدد 10 است. تفسیر نتایج به این ترتیب است که عدد 0-3 نشانه میکروبیوتای طبیعی واژن، عدد 4-6، مشکوک و عدد 7-10 تأییدکننده واژینوز باکتریایی می باشد.

جدول 3. سیستم امتیاز دهی Nugent برای اسمیر واژن رنگ آمیزی گرم.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| کادر 1: مورفوتایپ لاکتوباسیل (جعبه ای و باسیل گرم مثبت فیلامنته) | | کادر2: مورفوتایپ گاردنرلا و باکتریوئید (پلئومورفیک، گرم متغیر و گرم منفی و باسیل های کوتاه) | | کادر 3: مورفوتایپ موبیلونکوس(باسیل گرم متغیر منحنی مانند) | |
| کمیت | امتیاز BV | کمیت | امتیاز BV | کمیت | امتیاز BV |
| +4 : بیشتر از 30 عدد در عدسی روغنی | 0 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 |
| +3 : بین 30-5 عدد در عدسی روغنی | 1 | +1: کمتر از 1 عدد در عدسی روغنی | 1 |  |  |
| +2 : بین 4-1 عدد در عدسی روغنی | 2 | + 2: بین 4-1 عدد در عدسی روغنی | 2 | +1تا +2 : ین 4-1 عدد در عدسی روغنی | 1 |
| +1: کمتر از 1 عدد در عدسی روغنی | 3 | +3 : بین 30-5 عدد در عدسی روغنی | 3 |  |  |
| 0 (0) | 4 | +4 : بیشتر از 30 عدد در عدسی روغنی | 4 | + 3 تا +4 بیشتر از 5 عدد در عدسی روغنی | 2 |

* به طور خلاصه این سیستم بر اساس وجود یا عدم وجود مورفولوژی های باکتریایی خاص است. به طور معمول، در بیماران مبتلا به BV، لاکتوباسیل ها یا وجود ندارند یا تعداد کمی دارند، در حالی که باسیل های منحنی (موبیلونکوس)، گرم متغیر (گاردنرلا واژینالیس) و مورفوتیپ های باکتروئیدها غالب هستند.
* BV که با ترشحات بدبو مشخص می شود، می تواند به صورت میکروسکوپی یا بالینی تشخیص داده شود. این ترشحات عمدتاً حاوی سلول های اپیتلیال خرد شده هستند که بسیاری از آنها به طور کامل توسط باسیل های ریز گرم متغیری و کوکوباسیل ها پوشیده شده اند. این سلول ها سلول های کلو یا سرنخ نامیده می شوند. سلول اپیتلیال اسکواموس طبیعی دارای حاشیه ای غیردانه ای هستند در حالی که سلول های کلو لایه ای از ارگانیسم های کوکوباسیل را نشان می دهند که در دسته هایی روی سطح سلول متصل هستند و مرز نامعلوم یا دانه دار را می سازد و به وسیله آزمایش میکروسکوپیک از آماده سازی یک لام مرطوب سالین واژن یا رنگ آمیزی گرم تشخیص داده می شوند.
* رنگ‌آمیزی گرم حساس‌تر و اختصاصی‌تر از لام مرطوب و کشت گاردنرلا واژینالیس است. عدم وجود سلول های التهابی در ترشحات واژن یکی دیگر از علائمBV است.
* اگرچه گاردنرلا واژینالیس از لحاظ تاریخی با این سندرم مرتبط بوده است و می توان آن را در یک پلیت دو لایه خون انسان کشت داد، کشت برای تشخیصBV توصیه نمی شود.
* تشخیص بالینیBV به وجود سه یا بیشتر از معیارهای زیر بستگی دارد: ترشحات همگن و خاکستری، حضور سلول های سرنخ، pH بالاتر از 5/4 و بوی آمین یا ماهی گندیده (تست آمین یا whiff) که با افزودن یک یا دوقطره KOH 10درصد به ترشحات روی لام یا روی اسپکولوم ایجاد می شود. برای بررسی اینکه طیفpH واژن طبیعی است از نوارهای تست کنندهpH استفاده می شود.

**کشت ترشحات تناسلی**

* برای احتمال بیشتر جداسازی گنوکوک‌ها نمونه‌ را می‌توان مستقیماً در محیط کشت تلقیح و نیاز به محیط انتقال را برطرف کرد و سیستم های تجاری تولید شده برای این منظور توسعه یافته اند.
* برای کشت محیط اصلاح شده تایرمارتین اغلب مورد استفاده قرار می گیرد، اگرچه محیط نیویورک سیتی (NYC) دارای مزیت اضافی حمایت از رشد مایکوپلاسماها هم هست.
* برخی از سویه های گنوکوک به مقدار وانکومایسین موجود در محیط های انتخابی حساس هستند. اگر ارگانیسم های مشکوکی که روی اسمیر دیده می شوند در کشت رشد نکنند، ممکن است کشت مجدد روی شکلات آگار بدون آنتی بیوتیک ضروری باشد.
* در صورت عدم وجود محیط های اختصاصی می توان بر روی شکلات آگار کشت خطی انجام شود.
* سواب نمونه با چرخش مداوم در سراسر محیط کشت کشت می شود تا تمام سطوح در معرض محیط قرار گیرند.
* محیطها سپس باید در یک محیط غنی ازCO2 (جار شمع دار یا انکوباتور CO2 دار) قرار گیرند.
* برای جداسازی مخمر، استرپتوکوک و مایکوپلاسما، نمونه ها باید به محیط های اضافی تلقیح شوند. مخمر روی پایه کلمبیا آگار با 5 درصد خون گوسفند حاوی کولیستین و نالیدیکسیک اسید (CNA) به خوبی رشد می کند، اگر چه محیط های انتخابی تری مانند SDA همراه آنتی بیوتیک های ضدباکتری در دسترس هستند. بیشتر مخمرها و استرپتوکوک ها نیز در آگار خوندار استاندارد رشد می کنند. بنابراین، افزودن محیط های قارچی خاص بی مورد است مگر اینکه به طور اختصاصی دنبال جداسازی مخمرها باشیم یا درخواست پزشک باشد.
* سواب برای تشخیص استرپتوکوک های گروهB باید به یک محیط براث انتخابی توصیه شده، مانند براث تاد-هویت حاوی جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید یا بهLIM براث تلقیح شود و بعد از یک روز انکوباسیون در محیط آگار کشت می شوند.
* تریکوموناس واژینالیس ممکن است در محیط تجاری دیاموند یا پاکت های پلاستیکی تلقیح شده با مواد ترشحی کشت شود.
* یک سیستم کشت مایکوپلاسمای ژنتیال دوفازی تجاری موجود می تواند برای کشت مایکوپلاسما و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم استفاده شود اگر چه محیط های تجاری تهیه شده به اندازه محیط های تازه حساس نیستند. مایکوپلاسما ژنیتالیوم ممکن است در محیط های تجاری به دلیل وجود تالیم استات رشد نکند.
* برای عفونت های پروستات، اپیدیدیم و بیضه مردان، محیط های کشت مختلفی برای حمایت از رشد باکتری های بیهوازی، بیهوازی اختیاری و هوازی و همچنین گنوکوک ها تلقیح می شوند. این نمونه ها و نمونه های مجرا، دهانه رحم و واژن بر روی محیط های بلادآگار بیهوازی، شکلات آگار، تایرمارتین آگار و در صورت شک به باکتریهای گرم منفی روی مک کانکی یا EMB کشت می شود.
* در نمونه های آسپیره شده که احتمال تعداد کم وجود دارد بهتر است از محیط غنی شده مثل BHI هم استفاده شود.
* همه نمونه های مشکوک برای عفونت لگن یا PID باید به محیط هایی تلقیح شوند که امکان بازیابی باکتری های بیهوازی، هوازی اختیاری و هوازی، گنوکوک ها، قارچ ها، مایکوپلاسماها و کلامیدیا را فراهم کند.
* تمام مواد جمع‌آوری‌شده از محل‌های بدن معمولاً استریل در دستگاه تناسلی باید به آگار شکلاتی تلقیح شود و علاوه بر سایر انواع محیط های ذکر شده در آبگوشت مناسبی مانند تیوگلیکولات قرار داده شوند.
* اگر فقط نمونه‌های به‌دست‌آمده از سواب‌های معمولی که از دهانه رحم وارد می‌شوند در دسترس باشند، باید کشت‌ها برای تشخیص گنوکوک و کلامیدیا انجام شود.
* محیط ها و فرایندهای لازم برای کشت نمونه های تناسلی در جدول 4 آمده است.

جدول 4. محیط ها و فرایندهای لازم برای کشت نمونه های تناسلی.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نمونه | رنگ آمیزی گرم | آگار خون دار با خون گوسفندی | شکلات آگار | مک کانکی یا ائوزین متیلن بلو | محیط کشت بیهوازی | محیط مایع تایوگلیکولات | تایر مارتین | سایر |
| ابزار داخل رحمی(IUD) | × |  |  |  |  | × |  |  |
| واژن/ دهانه رحم | × | × | × | × |  |  | × |  |
| مجرای ادرار | × | × | × |  |  |  | × |  |
| 1) غربال گری دستگاه تناسلی |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1-1) نایسریا گنوره آ |  |  | × |  |  |  | × |  |
| 1-2) استرپتوکوک گروه B |  | × |  |  |  |  |  | LIM broth و محیط Tod |

**تفسیر و گزارش کشت های تناسلی**

* قبل از ارسال گزارش، تمام پلیت ها را حداقل 48 ساعت نگه دارید. بررسی کشت نایسریا گونوره آ باید 72 ساعت انجام شود.
* وجود پاتوژن های عامل واژینیت هوازی مثل اشریشیاکلی و بقیه در تعداد بالا یا غالب مهم است و کار کامل (تشخیص نهایی و آنتی بیوگرام) باید روی آنها به انجام برسد.
* گزارش کمی، شناسایی و انجام تست حساسیت بر روی همه پاتوژن های بالقوه باید به انجام برسد.
* مقادیر و ارگانیسم های فلور طبیعی را به طور کلی بدون انجام تست حساسیت گزارش کنید. همه این ارگانیسمها نیمه کمی و به عنوان "فلور طبیعی واژن" گزارش می شوند. برای مثال در صورت رشد باکتری لاکتوباسیلوس در کشت واژن گزارش به صورت زیر خواهد بود:

Growth of many colonies of *Lactobacillus* sp. as “Normal vaginal flora.”

* نحوه گزارش لام مستقیم ناحیه تناسلی در 3 حالت عفونت گنوکوک و غیرگنوکوکی و در صورت عدم حضور علائم التهابی در لام مستقیم و کشت به صورت زیر خواهد بود:

**1. Gonococcus**: Intracellular and extracellular gram negative diplococci were seen.

**2. Non-gonococcal urethritis (NGU):** No gram negative diplococci were seen.

**Comment**: Presence of >5 WBC/oil field without bacterial observation, can recommend non-gonococcal urethritis (for example *Chlamydia trachomatis* or *Ureaplasma urealyticum*).

**3. Non- urethritis:** Presence of <5 WBC/oil field without bacterial observation indicate absence of urethritis syndrome.

نحوه گزارش سندرم AV در صورت منفی بودن بقیه عوامل واژینیت به صورت زیر خواهد بود:

Gram stain typically reveals many PMN, parabasal cells, Gram negative bacilli/Gram positive cocci. It may indicate Aerobic vaginitis (AV) disease.

در بیماری لاکتوباسیلوز نحوه گزارش در صورت منفی بودن بقیه عوامل واژینیت به صورت زیر خواهد بود:

Gram stain/wet mount typically reveals many very long lactobacilli (40 to 75 µm in length that are significantly longer than the average normal microbiota *lactobacillus* with 5 to 15 µm in length). It may indicate Vaginal lactobacillosis (VL).

در بیماری فوزی فرم-اسپیروکت لام گرم، سلول های التهابی همراه با باکتری های گرم منفی و مارپیچ ها را نشان می دهد و نحوه گزارش در صورت منفی بودن بقیه عوامل واژینیت به صورت زیر خواهد بود:

Gram stain typically reveals many Spirochetes, Fusiform bacilli and Streptobacilli. It may indicate fusiform-spirochete disease.

**تشخیص آزمایشگاهی عوامل ایجاد زخم ناحیه تناسلی**

* بیشتر بیماران با زخم های تناسلی، شامل هرپس (تبخال دستگاه تناسلی ناشی از HSV)، زگیل دستگاه تناسلی (ناشی از HPV ها)، سیفلیس و یا شانکروئید (شانکر نرم توسط هموفیلوس دوکره ای) هستند و لنفوگرانولوم ونرومLGV) )، گرانولوما اینگوئینالیا یا آدنوویروس عوامل کمتر رایج هستند.
* عفونت های دستگاه تناسلی و عفونت های مخاطی اغلب چند میکروبی هستند و این تشخیص را دشوار می کند.

**تشخیص آزمایشگاهی هموفیلوس دوکره ای:**

* اینباکتری گرم منفی مشکل پسند، عاملشانکروئیدیا شانکر نرم بیماری منتقل شونده جنسی است.
* ترشحات ضایعات زخم و یا آسپیراسیون خیارک برای آزمایش مستقیم و کشت مورد استفاده قرار می گیرد.
* بسیار ضروری است که نمونه تا حد امکان به سرعت به آزمایشگاه برای کشت موفق ارسال شوند.
* در بررسی میکروسکوپی باکتری کوکوباسیل گرم منفی پلئومورفیک به شکل زنجیره ای که مدرسه ماهی نامیده می شود دیده می شود اما رنگ آمیزی گرم به تنهایی اختصاصیت و حساسیت برای تشخیص شانکروئید را ندارد چون آلودگی باکتریایی زیادی دارند.
* باکتری به شدت مشکل پسند بوده و برای رشد نیاز به محیط های گران دارد و حتی با وجود محیط کشت بسیار مناسب و ارسال به موقع نمونه به آزمایشگاه، کشت حساسیتی حدود 80% دارد. با این وجود محدودیت های تشخیصی روش های جایگزین باعث شده تا کشت به عنوان روش اول در تشخیص نمونه های مشکوک به شانکروئید استفاده می شود.
* بعضی از سویه ها به خوبی بر روی شکلات آگار رشد می کنند و محیط های غنی شده حساسیت کشت را افزایش می دهد.
* دو نوع محیط غنی شده تجاری که در دسترس هستند شامل آگارGC حاوی هموگلوبین، ایزوویتالیکس و سرم جنین گوساله و دیگری مولر هینتون حاوی ایزوویتالیکس که با خون اسب شکلاته شده هستند. بیشتر سویه ها به خوبی در 33 تا 35 درجه سانتی گراد در حضور 5%CO2 رشد می کنند.
* روش های جایگزین کشت مانندPCR و ایمنواسی برای بهبود حساسیت تشخیص شانکروئید گسترش یافته اند. روش مولتیپلکس PCR اختصاصی برای عوامل زخم تناسلی از جمله شانکروئید گسترش یافته اند که این روش ها سریع تر و حساس تر از کشت هستند.
* تشخیص سرولوژیک شانکروئید به وسیلهEIA که شامل آنتی بادی علیه لیپوساکارید هموفیلوس دوکره ای است و تشخیص آنتی ژن با استفاده از ایمنوفلئورسانس مستقیم به شکل گسترده در دسترس نیستند و مشکلات واکنش متقاطع وجود دارد.

**تشخیص آزمایشگاهی کلبسیلا گرانولوماتیس:**

* این باکتری یک باکتری داخل سلولی گرم منفی و عامل بیماری دونووانوزیس است که همچنین به عنوان گرانولوم اینگوئینال یا بیماری گوشتخوار تناسلی شناخته می شود که ایجاد زخم تناسلی می کند.
* عفونت به شکل مستقیم با زخم در طی تماس جنسی منتقل می شود، با این وجود انتقال غیرجنسی هم گزارش شده است.
* تشخیص دونوانوزیس براساس علائم بالینی و تاریخچه و یافته های فیزیکی ضایعه زخم در بیماران با تماس جنسی در مناطق اندمیک انجام می گیرد.
* تشخیص به وسیله گیمسا یا رنگ آمیزی رایت از بافت و شناسایی اجسام داخل سلولی دونووان (Donovan bodies) درون ماکروفاژ تأیید می شود. اسمیر به طور مستقیم از نمونه بافت یا بیوپسی مورد بررسی قرار می گیرد. اجسام دونوان اندازه ای بین mm 7/5-0/0×5/1-1 دارد و ممکن است کپسول دار یا بدون کپسول باشند.
* کلبسیلا گرانولوماتیس یک ارگانیسم شدیداً مشکل پسند است که بر روی محیط های معمول باکتریولوژی نمی تواند رشد کند اما بر روی تخم مرغ، سلول های تک هسته ای خون محیطی و کمی لاین سلولی رشد می کند بنابراین کشت در توانایی آزمایشگاه بالینی معمولی نیست.
* روشPCR برای تشخیص کلبسیلا گرانولوماتیس گسترش یافته است اماFDA هیچ تست تجاری در دسترس را تأیید نکرده است.
* روش ایمنوفلئورسانس غیرمستقیم با استفاده از آنتی ژن مشتق شده از زخم دونوانوزیس گسترش یافته است. این روش حساسیت پایینی برای تشخیص عفونت اولیه دارد و به شکل گسترده در دسترس نیست.
* گزارش لام مستقیم در صورت مشاهده اجسام دونوان و وجود علائم بالینی به صورت زیر خواهد بود:

Intracellular coccobacilli gram negative bacteria inside of macrophage resembling to Donovan bodies were seen. Possible Diagnosis: Granuloma inguinale (donovanosis) disease caused by *Klebsiella* *granulomatis*.

**تشخیص آزمایشگاهی تریپونما پالیدوم**

* این باکتری عامل بیماری سیفلیس یک بیماری مقاربتی است که از طریق تماس مستقیم با ضایعات عفونی در ناحیه تناسلی خارجی، واژن، مقعد یا رکتوم از فردی به فرد دیگر منتقل می شود.
* تشخیص مستقیم با میکروسکوپ میدان تاریک یا فلئورسنت آنتی بادی مستقیم DFA از یک ضایعه عفونی در سیفلیس اولیه یک روش تشخیص قطعی است. تست های سرولوژی متداول ترین تستهای تشخیصی این باکتری در جهان هستند.
* تست های سرولوژی برای تشخیص سیفلیس به دو نوع تقسیم می شود: تست های آنتی بادی غیرتریپونمایی و تست های آنتی بادی تریپونمایی. تست های آنتی بادی غیرتریپونمایی شامل موارد زیر هستند: تست پلاسمایی راژین سریع (RPR)، تست بررسی راژین (RST)، راژین سرم غیر حرارت دیده (USR)، تست سرمی تولوئیدین بلو غیر حرارت دیده (TRUST)، آزمایش بیماری های مقاربتی سیفلیس (VDRL) و تست های غربال گری و حضور آنتی بادی قلبی کاردیولیپین و سایر لیپوئیدال ها که آسیب بافتی را تشخیص می دهد. این تست ها اختصاصیت بالایی ندارند اما معمولاً با فعالیت بیماری مرتبط هستند. نتایج تست های غیر تریپونمایی بیماران با تست های آنتی ژن اختصاصی تریپونمایی برای تشخیص تأیید می شود. تست های تأییدی شامل تست آنتی بادی تریپونمایی مانند EIA، تست آنتی بادی فلئورسنت تریپونمایی جذب شده (FTA-ABS) و تست ذره ای آگلوتیناسیون تریپونما پالیدومTP-PA) ) هستند. EIA و TP-PA بیشترین تست های مورد استفاده در ایالات متحده آمریکا هستند.
* روش های ملکولی همچنین برای تشخیص سیفلیس توسعه یافته است. PCR، ایمنوبلات، light-based bead-capture assays روش های جدید و در دسترس هستند که مورد استفاده قرار می گیرند. بیشتر این روش ها تجربی (تحقیقاتی) هستند و در آزمایشگاه های بالینی مورد استفاده قرار نمی گیرد.

**(4) محدوديت ها و تداخلات:**

در کشت های تناسلی به خصوص کشت واژن احتمال آلودگی نمونه در حین نمونه گیری با فلور طبیعی بیمار زیاد است و بنابراین در صورت رشد باکتری های فلور طبیعی و عدم رشد بیماریزاها و وجود علائم عفونت در بیمار بهتر است نمونه تکرار شود.

**(5) موارد رد و تکرار نمونه:**

* اطلاعات روی برچسب با اطلاعات درخواست شده مطابقت نداشته باشد، یا برچسب ناقص یا نمونه اصلاً برچسب گذاری نشده باشد (نام بیمار یا منبع نمونه متفاوت است).
* زمان انتقال نمونه بیشتر از زمان توصیه شده پس از جمع آوری تا انجام باشد.
* نمونه سواب بدون محیط انتقالی ارسال شده باشد.
* نمونه بیوپسی با فرمالین ارسال شده باشد.
* کشت نمونه از نظر بیهوازی در محیط انتقالی بیهوازی ارسال نشده باشد.
* سواب برای استرپتوکوک های گروهB در یک محیط حمل و نقل مغذی با زغال چوب به آزمایشگاه منتقل شده باشد.

**(6) نتایج بحرانی:**

جداسازی استرپتوكوكوس آگالاكتيه در نمونه هاي ادرار، تناسلي و ركتوم در زنان باردار جزو نتایج بحرانی می باشد.

**(7) مستندات و سوابق:**

* مستندات مربوط به نحوه نمونه گیری و کشت و تفسیر کشت ها باید در بخش موجود باشد.
* مستندات مربوط به تکرار نمونه و دلایل تکرار و نوع باکتری های رشد کرده (به صورت توصیفی و اولیه) باید موجود باشد.
* مستندات مربوط به نتایج بحرانی گفته شده باید موجود باشد.

**(8) منابع**:

1. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد اول: تشخیص. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
2. کتاب آزمایشگاه باکتری شناسی پزشکی. جلد دوم: تفسیر کشت. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1402.
3. کتاب آنالیز و کشت مایعات بدن. دکتر داریوش شکری و همکاران. انتشارات تیمورزاده نوین و کیا. 1403.
4. Baron EJ، Thomson RB Jr: Specimen collection، transport، and processing: bacteriology. In Versalovic J، et al، editors: Manual of clinical microbiology، Ed 10، Washington، DC، 2011، ASM Press، p. 228.
5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009.
6. Committee on Infectious Diseases. 2006 red book: report of the Committed on Infectious Diseases. ed 27. Elk Grove Village، IL: American Academy of Pediatrics; 2006.
7. Isenberg D. Henry: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*، American Society for Microbiology. 2007.
8. Koneman، Elmer W، et al. Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. *Philedelphia: Lippincott-Raven Publishers. Seventh edition.* 2021.
9. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book: Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier Health Sciences; 2022 Nov 2.
10. Tille، Patricia. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book*. Elsevier Health Sciences، fifteenth edition. 2021.