



การตรวจเอนไซม์ sialidase ใน vaginal fluid เพื่อวินิจฉัยภาวะ bacterial vaginosis Detection of sialidase in vaginal fluid for diagnosis of bacterial vaginosis

สุภาภรณ์ พัวเพิ่มพูลศิริ¹, โฉมพิลาส จงสมชัย², กนก สีจร², ยุทธพงศ์ วีระวัฒน์ตระกูล²,
ลำไย วงลกร³, สุกัญญา ศรีกุลบุตร³, ภิศก ลุมพิกานนท์²

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ประเมินวิธีตรวจหาเอนไซม์ sialidase ใน vaginal fluid ด้วยวิธี filter paper spot เพื่อวินิจฉัยภาวะ bacterial vaginosis (BV) โดยเปรียบเทียบกับวิธีย้อมสีแกรมจาก vaginal smear และแปลผลตามวิธีของ Nugent พบว่าในหญิงตั้งครรภ์ที่ทำการศึกษา 263 รายมีภาวะของช่องคลอดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ภาวะปกติ ภาวะ intermediate และภาวะ BV ร้อยละ 58.9, 24.7 และ 16.4 ตามลำดับ จากการตรวจ vaginal fluids พบเอนไซม์ sialidase ร้อยละ 79.1 และ 4.1 ของหญิงที่มีและไม่มีภาวะ BV ตามลำดับ การตรวจพบเอนไซม์นี้มีความสัมพันธ์กับการวินิจฉัยภาวะ BV ที่มีค่าคะแนนสูงตั้งแต่ 7-10 และตรวจพบได้บ้างในภาวะ intermediate แต่ตรวจไม่พบในภาวะปกติ พบว่าวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัย BV ร้อยละ 79.1 และ 95.9 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับภาวะ BV ได้แก่ *Prevotella bivia*, *Prevotella melaninogenicus*, *Bacteroides fragilis* group และ *Bacteroides vulgatus* สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ การตรวจหาเอนไซม์ sialidase ใน vaginal fluid ด้วยวิธี filter paper spot เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ได้ผลเร็วใช้เวลาเพียง 15 นาทีเท่านั้น ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้ชำนาญการในการอ่านและแปลผล จึงควรที่จะได้รับการพัฒนาต่อไปเพื่อใช้ในตรวจกรองและศึกษาภาวะ BV ในประชากรกลุ่มใหญ่

คำรหัส: bacterial vaginosis ● sialidase ● vaginal fluid ● หญิงตั้งครรภ์

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract

Detection of sialidase in vaginal fluid for diagnosis of bacterial vaginosis

Supaporn Puapermpoonsiri¹, Chompilas Chongsomchai², Kanok Seejoin²,
Yuthapong Werawatrakul², Lumyai Wonglacorn³, Sukanya Srigulbutr³,
Pisake Lumbiganon²

We evaluated the sialidase activity in the vaginal fluid for the diagnosis of bacterial vaginosis (BV). The vaginal fluids from 263 pregnant women were investigated for the presence of BV and the sialidase activities. BV was diagnosed by Gram-stained scoring system of the Nugent method and the sialidase activity was determined by a filter paper spot test. The Gram stained-vaginal smears revealed that the pregnant women had normal vaginal flora, intermediate flora and BV in 58.9%, 24.7% and 16.4 %, respectively. The sialidase activities were detected in vaginal fluids from women with and without BV in 79.1% and 4.1 %, respectively. These activities were highly associated with Gram stained -vaginal smears with the score of 7-10. Overall, the vaginal sialidase test for diagnosis of BV had a sensitivity of 79.1 % and a specificity of 95.9 %. The sialidase production from BV -associated anaerobic vaginal flora was also tested. All isolates of *Prevotella bivia*, *Prevotella melaninogenica*, *Bacteroides fragilis* group and *Bacteroides vulgatus* were positive for sialidase activity. The detection of sialidase in vaginal fluid by filter paper spot test is simple, rapid and easy to perform for the diagnosis of BV. Further studies are needed for future use in diagnosis or screening of BV in a large population.

Key words: bacterial vaginosis ● sialidase ● vaginal fluid ● pregnant women

¹ Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

² Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

³ Division of Clinical Microbiology Laboratory, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

บทนำ

ภาวะ bacterial vaginosis (BV) หรือเดิมเรียกว่า non-specific vaginitis เป็นภาวะที่พบได้บ่อยที่สุดในหญิงวัยเจริญพันธุ์^{1,2} ปัจจุบันมีรายงานว่าหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะ BV มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น การติดเชื้อในโพรงมดลูก การคลอดก่อนกำหนด ดุจน้ำคร่ำแตกก่อนการเจ็บครรภ์คลอด และทารกแรกเกิดน้ำหนักน้อย เป็นต้น มากกว่าหญิงตั้งครรภ์ที่ไม่มีภาวะนี้³⁻⁷ ในต่างประเทศพบอุบัติการณ์ของภาวะ BV ได้ร้อยละ 32-64 ของผู้ป่วยที่คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์³ และร้อยละ 12-25 ของผู้ป่วยที่คลินิกทั่วไป และพบได้ร้อยละ 10-33 ของหญิงที่มาฝากครรภ์^{2,8-10} จากการศึกษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น พบภาวะนี้ในหญิงตั้งครรภ์ร้อยละ 15.9¹¹ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาภาวะนี้กันน้อย อาจเนื่องจากปัญหาในการวินิจฉัยภาวะ BV ซึ่งวิธีวินิจฉัยยังไม่ค่อยแน่นอนและมีหลายวิธีด้วยกัน ทำให้มีปัญหาในการเปรียบเทียบผลการศึกษา การวินิจฉัยภาวะ BV ส่วนใหญ่ยังใช้การวินิจฉัยทางคลินิกโดยอาศัยการตรวจสิ่งขับจากช่องคลอด พบลักษณะ 3 ใน 4 ข้อต่อไปนี้ได้แก่ 1) มีลักษณะใสเนื้อละเอียด 2) มี pH มากกว่า 4.5 3) มีกลิ่นเหม็นคาวปลาเมื่อหยด 10% KOH และ 4) ตรวจพบ Clue cells แต่การวินิจฉัยทางคลินิกมักมีปัญหาในการอ่านผลและต้องอาศัยความชำนาญ ส่วนการเพาะเชื้อ *Gardnerella vaginalis* มีความไวในการวินิจฉัยภาวะนี้สูง แต่เนื่องจากพบเชื้อ *G. vaginalis* ได้ร้อยละ 36-55 ของหญิงปกติ^{12,13} ดังนั้นจึงไม่แนะนำให้ใช้ในงานตรวจประจำวัน การวินิจฉัยโดยการย้อมสีแกรมตามวิธีของ Nugent และคณะ¹⁴ ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกและผลการเพาะเชื้อ มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ต้องอาศัยผู้ชำนาญการอ่านผลจากกล้องจุลทรรศน์ ส่วนการตรวจวิเคราะห์ metabolic

product ใน vaginal fluids โดยวิธี Gas Liquid Chromatography¹⁵ ต้องอาศัยเครื่องมือซึ่งมีราคาแพง ต่อมาได้มีการนำวิธีตรวจหาเอนไซม์ proline aminopeptidase¹⁶ และ เอนไซม์ sialidase ใน vaginal fluids¹⁷ มาใช้ในการวินิจฉัยภาวะนี้ ซึ่งพบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการตรวจหาเอนไซม์ sialidase ใน vaginal fluid ด้วยวิธี filter paper spot เพื่อวินิจฉัยภาวะ BV เปรียบเทียบกับวิธีการย้อมสีแกรมและแปลผลตามวิธีของ Nugent และคณะ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ได้ทำการศึกษาและเก็บตัวอย่างจากหญิงตั้งครรภ์ที่มารับการตรวจและฝากครรภ์ที่แผนกผู้ป่วยนอกห้องตรวจสูติ-นรีเวชศาสตร์ โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2537 ถึง เมษายน 2538 จำนวนทั้งหมด 263 คน ซึ่งได้รับการชี้แจงเกี่ยวกับโครงการวิจัยและยินยอมให้ทำการศึกษา

การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากช่องคลอดใช้ swabs ที่ปราศจากเชื้อป้าย vaginal discharge ตรงบริเวณ posterior fornix เก็บตัวอย่าง 2 swabs อันหนึ่งใส่หลอดแก้วที่มี phosphate buffered saline 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะทำการทดสอบหาเอนไซม์ sialidase และอีก swab หนึ่งสำหรับป้ายบนแผ่นสไลด์เพื่อย้อมสีแกรม

แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่นำมาทดสอบหาเอนไซม์ sialidase ตามรายชื่อในตารางที่ 3 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากช่องคลอดจากการศึกษา ก่อน¹¹ ซึ่งได้เก็บรวบรวมไว้ใน skim milk และเก็บที่ -80 °C

การวินิจฉัยภาวะ BV ด้วยวิธีการย้อมสีแกรม

ใช้วิธีการย้อมสีแกรมจาก vaginal smears

อ่านและแปลผลตามวิธีของ Nugent และคณะ¹⁴ ซึ่งกำหนดวิธีการอ่านและแปลผลการย้อมสีแกรม โดยรวมคะแนนที่ได้จากการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อ lactobacilli เชื้อ *Gardnerella vaginalis* เชื้อ *Bacteroides* spp. และเชื้อ *Mobiluncus* spp. ที่ตรวจพบ และแปลผลค่าคะแนนดังนี้ คะแนน 0-3 แปลผลว่ามีภาวะปกติ คะแนน 4-6 แปลผลว่าเป็นภาวะ intermediate และคะแนน 7-10 แปลผลว่ามีภาวะ BV

การตรวจหาเอนไซม์ sialidase

ใช้วิธี filter paper spot ตามวิธีของ Moncla และคณะ¹⁸ เตรียม stock solution ของ 2-(4-methylubelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid ความเข้มข้น 110 μ mol/ml ก่อนทำการทดสอบเติม 1.0 M sodium acetate buffer pH 4.6 จำนวน 20 μ l ลงใน stock solution 180 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วจุ่มกระดาษกรอง (ขนาด 6x40 มิลลิเมตร) ลงในสารละลายดังกล่าว ทำการทดสอบโดยหยด vaginal suspension ใน phosphate buffered saline solution จำนวน 5 μ l หรือปายโคโลนิของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบนกระดาษกรอง วางกระดาษกรองไว้ในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษชุบน้ำวางอยู่ด้วยเพื่อป้องกันการแห้งของสารในกระดาษกรอง แล้วนำไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที อ่านผลโดยนำกระดาษไปส่องดูใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 365 mm ถ้าเกิดจุดสีน้ำเงินเรืองแสงตรงบริเวณที่หยด vaginal fluid แสดงว่าให้ผลบวก ส่วนผลลบไม่เกิดจุดเรืองแสง

ผลการศึกษา

จากการตรวจ vaginal smears โดยการย้อมสีแกรมและแปลผลตามวิธีของ Nugent และคณะ พบว่าหญิงตั้งครรภ์กลุ่มที่ศึกษามีภาวะของช่องคลอดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ภาวะปกติซึ่งพบ lactobacilli จำนวนมาก ภาวะ intermediate

พบจำนวน lactobacilli ลดลงและมีเชื้อแบคทีเรียอื่นเพิ่มจำนวนขึ้น และภาวะ BV ไม่พบ lactobacilli หรือพบได้น้อยมากแต่พบเชื้อแบคทีเรียอื่นมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากมาย คิดเป็นร้อยละ 58.9, 24.7 และ 16.4 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตรวจพบเอนไซม์ sialidase ใน vaginal fluids จำนวน 34 ตัวอย่างจากผู้หญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะ BV จำนวน 43 ราย คิดเป็นร้อยละ 79.1 และพบเอนไซม์นี้ 9 ใน 220 ตัวอย่างจากผู้หญิงตั้งครรภ์ที่ไม่มีภาวะ BV ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 4.1 ความสัมพันธ์ของการตรวจพบเอนไซม์ sialidase กับการวินิจฉัยภาวะ BV ตามวิธีของ Nugent และคณะ แสดงในตารางที่ 2 พบว่าการตรวจพบเอนไซม์นี้มีความสัมพันธ์กับการวินิจฉัยภาวะ BV ที่มีคะแนนสูงตั้งแต่ 7-10 และตรวจพบได้บ้างในภาวะ intermediate แต่ไม่พบเอนไซม์นี้ในภาวะปกติเลย การตรวจหาเอนไซม์ใน vaginal fluid มีความไวในการบ่งชี้ภาวะ BV ร้อยละ 79.1 และมีความจำเพาะในการวินิจฉัยภาวะนี้สูงถึงร้อยละ 95.9 ให้ผลในการทำนายผลบวกและผลลบเท่ากับร้อยละ 79.1 และ 95.9 ตามลำดับ

ผลการตรวจหาเอนไซม์ sialidase ในแบคทีเรียแอนแอโรบส์ที่แยกได้จากช่องคลอดของหญิงตั้งครรภ์ ได้แสดงในตารางที่ 3 พบว่าเชื้อ *Prevotella bivia*, *Prevotella melaninogenica*, *Bacteroides fragilis* group และ *Bacteroides vulgatus* ทุกสายพันธุ์ที่แยกได้มีเอนไซม์นี้ ส่วนเชื้อแกรมบวกพบว่ามีเพียง *Acinomyces* spp. 2 ใน 4 สายพันธุ์ที่แยกได้สร้างเอนไซม์นี้ ส่วนเชื้อแกรมบวกอื่นๆไม่ให้ผลบวกต่อการทดสอบหาเอนไซม์นี้ด้วยวิธี filter paper spot

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษานี้พบว่า การตรวจหา sialidase ใน vaginal fluids ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจวินิจฉัยภาวะ BV ด้วยวิธีการย้อมสีแกรมและแปลผลตามวิธีของ Nugent และคณะ ซึ่งปัจจุบันเป็น

ตารางที่ 1 ผลการวินิจฉัยภาวะ bacterial vaginosis ในหญิงตั้งครรภ์ จำนวน 263 คน โดยวิธีการย้อมสีแกรมและแปลผลตามวิธีของ Nugent และคณะ

ภาวะของช่องคลอด (คะแนน)	จำนวนหญิงตั้งครรภ์ (คน)	เปอร์เซ็นต์
normal flora (0-3)	155	58.9
intermediate (4-6)	65	24.7
bacterial vaginosis (7-10)	43	16.4
รวม	263	100

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์การวินิจฉัยภาวะ bacterial vaginosis ด้วยวิธีการย้อมสีแกรมแยกตามค่าคะแนนของวิธี Nugent และคณะ กับการตรวจพบเอนไซม์ sialidase จากตัวอย่างส่งตรวจจากช่องคลอด

ภาวะของช่องคลอด	ค่าคะแนน	จำนวนหญิงตั้ง ครรภ์ (คน)	จำนวนตัวอย่างที่ ตรวจพบ sialidase
normal flora	0	7	0
	1	47	0
	2	48	0
	3	53	0
intermediate	4	27	2
	5	26	4
	6	12	3
bacterial vaginosis	7	21	14
	8	12	10
	9	4	4
	10	6	6
	รวม	263	43

ตารางที่ 3 จำนวนและชนิดของเชื้อแอนแอโรบส์ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจากช่องคลอดของหญิงตั้งครรภ์ที่สร้างเอนไซม์ sialidase

แบคทีเรีย	จำนวนที่ทดสอบ	จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวก	เปอร์เซ็นต์
Gram Negative Bacteria			
<i>Prevotella bivia</i>	27	27	100
<i>Prevotella melaninogenica</i>	5	5	100
<i>Prevotella corporis</i>	11	0	0
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	18	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i> group	3	3	100
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	0	0
<i>Bacteroides vulgaris</i>	1	1	100
<i>Bacteroides ureolyticus</i> group	8	2	25
<i>Veillonella</i> spp.	7	0	0
Gram Positive Bacteria			
<i>Actinomyces</i> spp.	4	2	50
<i>Clostridium</i> spp.	7	0	0
<i>Mobiluncus</i> spp.	14	0	0
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	30	0	0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	8	0	0
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	30	0	0
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	2	0	0
<i>Gemella morbillirum</i>	4	0	0

วิธีที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายในการวินิจฉัยภาวะ BV ทางห้องปฏิบัติการ¹⁹ พบว่าวิธีการตรวจหา sialidase มีความไวในการวินิจฉัยภาวะ BV ร้อยละ 79 และมีความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 96 มีรายงานการตรวจหาเอนไซม์นี้ด้วยวิธี spectrophotometer พบว่าให้ผลบวกในหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะ BV เพียงร้อยละ 45 เท่านั้น²⁰ แต่ในรายงานของ Briselden และคณะ¹⁷ ที่ใช้วิธี filter paper spot ซึ่งเป็นวิธีเดียวกันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการศึกษาในหญิงไม่ตั้งครรภ์ให้ผลบวกถึงร้อยละ 84 ของหญิงที่มีภาวะ BV และตรวจไม่พบเอนไซม์นี้ในภาวะปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าหญิงที่ได้รับการรักษาและหายจากภาวะ BV นี้แล้ว ร้อยละ 95 ไม่พบเอนไซม์นี้เช่นกัน การตรวจเอนไซม์ sialidase ใน vaginal fluids ในการศึกษาครั้งนี้มีความไวน้อยกว่าในรายงานของ Briselden และคณะ¹⁷ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก vaginal fluids ถูกเจือจางด้วย phosphate buffered saline ในการเตรียม vaginal suspension ดังนั้นหากสามารถตรวจหาเอนไซม์นี้จาก vaginal fluid โดยตรงหรือเจือจางใน phosphate buffered saline น้อยกว่านี้อาจจะช่วยให้ตรวจพบเอนไซม์นี้ได้มากขึ้น นอกจากนี้อาจเนื่องจากการแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของภาวะ BV ไม่สร้างเอนไซม์ sialidase ซึ่งจากการทดสอบในแบคทีเรียแอนแอโรบส์ที่แยกได้จากช่องคลอด เช่น *Prevotella corporis* และ *Porphyromonas asaccharolytica* ก็ไม่สร้างเอนไซม์นี้ อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจหาเอนไซม์ sialidase จาก vaginal fluids เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ได้ผลรวดเร็ว ใช้เวลาเพียง 15 นาทีเท่านั้น ให้ผลเชื่อถือได้ ไม่จำเป็นต้องใช้ผู้ชำนาญการในการอ่านและแปลผลวิธีตรวจวินิจฉัยภาวะ BV ด้วยวิธีนี้จึงน่าที่จะได้มีการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการตรวจกรองเพื่อศึกษาภาวะ BV ในประชากรกลุ่มใหญ่รวมถึงติดตามผลการรักษาภาวะนี้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-ญี่ปุ่น)

เอกสารอ้างอิง

1. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiological associations. *Am J Med* 1983; 74: 14-22.
2. Gardner H, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified 'non specific' vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 69: 962-76.
3. Gravett MG, Nelson HP, DeRouen T, Critchlow C, Eschenbach DA, Holmes KK. Independent associations of bacterial vaginosis and *Chlamydia trachomatis* infection with adverse pregnancy outcome. *JAMA* 1986; 256: 1899-903.
4. Gravett MG, Hummel D, Eschenbach DA, Holmes KK. Preterm labor associated with subclinical amniotic fluid infection and with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 229-37.
5. Hillier SL, Martius J, Krohn MA, Kiviat NB, Holmes KK, Eschenbach DA. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med* 1988; 319: 972-8.
6. Martius J, Krohn MA, Hillier SL, Stamm WE, Holmes KK, Eschenbach DA. Relationships of vaginal *Lactobacillus* species,

- cervical *Chlamydia trachomatis*, and bacterial vaginosis to preterm birth. *Obstet Gynecol* 1988; 71: 89-95.
7. McGregor JA, French JI, Richter R, et al. Antenatal microbiologic and maternal risk factors associated with prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1465-73.
 8. Eschenbach DA, Hillier SL, Critchlow C, Stevens CE, DeRouen T, Holmes KK. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158: 819-28.
 9. Hay PE, Taylor-Robinson D, Lamont RF. Diagnosis of bacterial vaginosis in a gynecology clinic. *Br J Obstet Gynecol* 1992; 99: 63-6.
 10. McGregor JA, French JI, Parker R, et al. Prevention of preterm birth by screening and treatment for common genital tract infections: results of a prospective controlled evaluation. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 157-67.
 11. Puapermpoonsiri S, Kato N, Watanabe K, Ueno K, Chongsomchai C, Lumbiganon P. Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in Japanese and Thai pregnant women. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 748-52.
 12. Scandinavian Journal Of Urology and Nephrology. Reports from working groups. The symposium on bacterial vaginosis (Stockolm). *Scand J Urol Nephrol* 1984; 86(Suppl): 259-66.
 13. Spiegel CA, Amsel R, Eschenbach DA, Schoenknech F, Holmes KK. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *N Engl J Med* 1980; 303: 601-7.
 14. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 297-301.
 15. Ison CA, Easmon CSF, Dawson SG, Southerton G, Harris JWR. Non-volatile fatty acids in the diagnosis of non-specific vaginitis. *J Clin Microbiol* 1983; 36: 1367-70.
 16. Thomason JL, Gelbart SM, Wilcoski LM, Peterson AK, Jilly BJ, Hamiton PR. Proline aminopeptidase activity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1988; 71: 607-11.
 17. Briselden AM, Moncla BJ, Stevens CE, Hillier SL. Sialidase (neuraminidases) in bacterial vaginosis and bacteria vaginosis-associated microflora. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 663-6.
 18. Moncla BJ, Braham P. Detection of sialidase (Neuraminidase) activity in *Actinomyces* species by using 2'-(4-methylumbelliferyl) α -D-N-acetylneuraminic acid in a filter paper spot test. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 182-4.
 19. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993; 16(Suppl 4): S273-81.
 20. McGregor JA, French JI, Jones W, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamycin cream. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 157-67.