

การประเมินการตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียลิวาจิโนสิสในหญิงตั้งครรภ์โดยวิธี polymerase chain reaction

สรายุทธ์ ทยงสิทธิ์^{1, 2}, อูติมา ศรีสุนช่วง^{2*}, จุฬารัตน์ ปรีชาตกุล², โมตรี ปะการะสังข์², เจศฎา ก้นคำรพ³

Received: November 11, 2011

Revised & Accepted: January 19, 2012

บทคัดย่อ

แบคทีเรียลิวาจิโนสิส (Bacterial vaginosis: BV) เป็นโรคช่องคลอดอักเสบชนิดไม่จำเพาะ หากเกิดภาวะนี้ในระหว่างตั้งครรภ์จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนในระหว่างตั้งครรภ์ได้ โดยเฉพาะการเจ็บครรภ์คลอดก่อนกำหนด หากตรวจพบและรีบให้การรักษาโดยเฉพาะในผู้ที่เคยมีประวัติการคลอดก่อนกำหนดมาก่อน จะมีประโยชน์ในการช่วยลดการคลอดก่อนกำหนดหรือภาวะแทรกซ้อนต่อการตั้งครรภ์ได้ การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการได้แก่ วิธีย้อมสีแกรมและแปลผลตามเกณฑ์ของวิธี Nugent score ซึ่งผู้ตรวจต้องมีความชำนาญในการตรวจ จึงจะสามารถวินิจฉัยได้อย่างถูกต้อง อีกทั้งต้องใช้เวลานานกรณีตรวจเป็นจำนวนมาก ส่วนวิธีการเพาะเลี้ยงทำได้ยากและไม่มีประโยชน์ในการแปลผล ดังนั้นจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจโดยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรค BV การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียลิวาจิโนสิสในหญิงตั้งครรภ์โดยวิธี polymerase chain reaction ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 16S rRNA ของเชื้อ *Gardnerella vaginalis* และเชื้อ *Atopobium vaginae* เปรียบเทียบกับวิธี Nugent score ศึกษาในหญิงตั้งครรภ์ที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างเดือน กันยายน 2553 ถึงมีนาคม 2554 จำนวน 295 ราย ช่วงอายุระหว่าง 28.2 ± 6 ปี และช่วงอายุครรภ์ 21.3 ± 10 สัปดาห์ ผลการตรวจโดยวิธี Nugent score พบว่าปกติ 131 ราย (ร้อยละ 44.4) อยู่ระหว่างการพัฒนาไปเป็นโรค (intermediate) 44 ราย (ร้อยละ 15.0) และเป็นโรค BV 120 ราย (ร้อยละ 40.6) โดยรายที่เป็น BV พบภาวะแทรกซ้อนในระหว่างการคลอดของมารดาและทารก จำนวน 48 ราย (ร้อยละ 40.0) และ 15 ราย (ร้อยละ 34.1) ใน intermediate การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* กับวิธี Nugent score พบว่าวิธี PCR มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และความชุกของโรคเท่ากับร้อยละ 78.7, 68, 75.4, 71.8 และ 56.0 ตามลำดับ และวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* มีค่าเท่ากับ 49.0, 97.0, 95.3, 60.5 และ 29.0 ตามลำดับ วิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* อาจนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียลิวาจิโนสิสในงานประจำวันได้ เพราะมีความไวมากกว่า โดยพบความชุกเท่ากับร้อยละ 58 ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน (ร้อยละ 56) แต่เชื้อ *Atopobium vaginae* มีความจำเพาะต่อโรค BV มากกว่า อย่างไรก็ตามควรมีการพัฒนาให้สามารถตรวจหาปริมาณเชื้อได้เช่นวิธี real-time quantitative PCR เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะให้มากยิ่งขึ้น หรือทำ multiplex-PCR ต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* และ *Atopobium vaginae* เพื่อหาชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคเพื่อประโยชน์ในการรักษา เนื่องจากเชื้อ *Atopobium vaginae* มักดื้อต่อยา metronidazole ที่ใช้ในการรักษา BV โดยทั่วไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียลิวาจิโนสิส, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, การย้อมสีแกรม, Nugent score

¹นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Evaluation of the bacterial vaginosis in pregnant women by polymerase chain reaction techniques

Sarayut Hyongsit^{1,2}, Thitima Srilunchang^{2 *}, Chularut Prariyachatigul²,
Maitree Pakarasang², Jadsada Thinkhamrop³

Abstract

Bacterial vaginosis (BV) is the most common vaginal infection in women of reproductive age. Pregnancy with bacterial vaginosis is a higher risk for some complications of pregnancy especially of preterm delivery. Screening and treating in BV positive pregnant women, particularly those that have a history of previous preterm delivery, may help to reduce the rate of preterm delivery. The laboratory diagnosis of BV is Gram stain-based Nugent score. This method requires the microbiologist for accurate diagnosis. The fastidious growth of BV-associated microorganisms makes identification by culture method difficult and not valuable for interpretation. Therefore, PCR methods have been developed and identified novel fastidious bacterial species in BV. The aim of this study was to evaluate the bacterial vaginosis in pregnant women by polymerase chain reaction (PCR) techniques by use of species-directed 16S rRNA which specific to *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* compare with the Nugent score. This prospective study was conducted in Srinagarind Hospital from September 2010 to March 2011. A total of two hundred and ninety-five pregnant women attending an antenatal clinic. The pregnant women age between 28.2 ± 6 years and the gestational age between 21.3 ± 10 weeks. With using of Gram stain-based Nugent score, 131 (44.4 %) samples were classified as normal, 44 (15.0 %) were classified as intermediate, and 120 (40.6 %) were classified as BV. Moreover, the BV patients have association with the maternal/fetal complications outcome, the overall rate was 48 (40.0 %) samples in BV and 22 (18.3 %) samples in intermediate. Compared to the Nugent score method, PCR technique which specific to *Gardnerella vaginalis* had a sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and prevalence were of 78.7 %, 68.0 %, 75.4 %, 71.8 % and 58 %, respectively. Meanwhile the PCR technique which specific to *Atopobium vaginae*, had a sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and prevalence of 49.0 %, 97.0 %, 95.3 %, 60.5 % and 29.0 % respectively. In conclusion, the PCR technique which specific to *Gardnerella vaginalis* may be suitable for diagnosis of BV and could be considered for routine use in clinical laboratories because of higher sensitivity. The prevalence of BV was 58% found in this method similar to 56.0 % in the Nugent method. But *Atopobium vaginae* had more specific for BV than *Gardnerella vaginalis*. However, the improved detection for quantitative method such as the real-time PCR should be use for increase sensitivity and specificity, or multiplex PCR of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* will be helpful for identify the specific infection. Because *Atopobium vaginae* has also been reported to be highly resistant to metronidazole therapy.

Keywords: Bacterial vaginosis, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, Gram staining, Nugent score

¹Graduate School, ²Centre for Research and Development of Medical Diagnosis Laboratories,
Faculty of Associated Medical Sciences,

³Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

* Corresponding author: (e-mail: maysri@kku.ac.th)

บทนำ

โรคการอักเสบติดเชื้อของช่องคลอดชนิดไม่จำเพาะ หรือโรคแบคทีเรียลวาจิโนสิส (bacterial vaginosis: BV) เป็นโรคที่ยังไม่ทราบกลไกการก่อโรคโดยเป็นโรคที่พบเชื้อประจำถิ่น ได้แก่ เชื้อแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* spp.) ในช่องคลอดลดลง และมีการเข้ามาแทนที่ด้วยเชื้อก่อโรคในกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) และใช้ออกซิเจนบางส่วน (facultatively anaerobic bacteria) ได้แก่ *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma species* และ *Atopobium vaginae*⁽¹⁾ โดยเชื้อก่อโรคที่สามารถพบได้มากที่สุด คือ *Gardnerella vaginalis* อย่างไรก็ตามพบว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นของหญิงวัยเจริญพันธุ์ได้⁽²⁾ ในปัจจุบันพบเชื้อชนิดใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับโรคนี้ คือ *Atopobium vaginae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนและพบได้มากในกลุ่มที่เป็นโรค สูงถึงร้อยละ 95⁽³⁾ สำหรับความชุกของโรคแบคทีเรียลวาจิโนสิสพบประมาณ ร้อยละ 30 ในหญิงวัยเจริญพันธุ์ และพบมากขึ้นเป็นร้อยละ 50 ในหญิงตั้งครรภ์⁽⁴⁾ ลักษณะอาการที่พบในการเปลี่ยนแปลงของช่องคลอดคือ การมีกลิ่นเหม็นหรือกลิ่นคล้ายปลาเน่า เป็นอาการที่พบได้ทั่วไป การเกิดโรคแบคทีเรียลวาจิโนสิสระหว่างการตั้งครรภ์อาจทำให้เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์กับการตั้งครรภ์ได้ เช่น เด็กแรกคลอดมีน้ำหนักตัวน้อยกว่าปกติ (low birth weight)⁽⁵⁾ การคลอดก่อนกำหนด (preterm labor)^(6, 7) น้ำเดินก่อนการเจ็บครรภ์คลอด^(7, 8) การอักเสบของถุงน้ำคร่ำหรือเยื่อโพรงมดลูกในระยะหลังคลอด (postpartum endometritis)⁽⁹⁾ และเพิ่มความไวต่อการติดเชื้อ HIV⁽¹⁰⁻¹²⁾ และ หนองในแท้จากเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae*⁽¹³⁾ ได้

การวินิจฉัยในปัจจุบันที่นิยมใช้กันมี 2 วิธี คือ 1) วิธีการทางคลินิกโดย Amsel และคณะ⁽¹⁴⁾ โดยการที่จะวินิจฉัยว่าเป็นแบคทีเรียลวาจิโนสิส โดยถ้ามีข้อบ่งชี้ อย่างน้อย 3 ใน 4 ประการดังต่อไปนี้ สามารถให้การวินิจฉัยว่าเป็น bacterial vaginosis ได้ คือ ลักษณะตกขาวเป็นน้ำเหลวสีนีนขาวปนเทา มีค่า pH สูงกว่า 4.5 พบ clue cells หมายถึงเซลล์เยื่อช่องคลอดที่มีแบคทีเรียไปเกาะอยู่ จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ตรวจดู และ Whiff test positive ซึ่งคือตกขาวมีกลิ่นคาวปลาเมื่อหยดผสมกับ 10% โพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งวิธีนี้ประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการวินิจฉัยกลุ่มที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกของโรคซึ่งมีโอกาสในการผิดพลาด

สูงถึงร้อยละ 50⁽¹²⁾ และเป็นวิธีที่ต้องตรวจโดยสูตินรีแพทย์ ส่วนวิธีที่นิยมใช้ตรวจวิธีที่ 2 คือวิธีของ Nugent criteria⁽¹⁵⁾ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของการใช้ตรวจวินิจฉัยโรคนี้⁽¹⁶⁾ โดยการย้อมสีแกรมจากสิ่งส่งตรวจจากช่องคลอดและนำไปตรวจหาเชื้อชนิดต่างๆด้วยกล้องจุลทรรศน์ และแปลผลตามเกณฑ์ที่กำหนด แต่ต้องใช้เวลานานในการตรวจวินิจฉัยและต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์ในการดูรูปร่างลักษณะของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ สำหรับวิธีการเพาะเชื้อมักไม่ค่อยได้รับประโยชน์มากนัก เนื่องจากพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อหลายชนิดปะปนกันและบางชนิดเพาะเลี้ยงได้ยาก โดยเฉพาะในกลุ่มที่เจริญโดยไม่อาศัยออกซิเจน ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการใช้วิธีการตรวจทางด้านโมเลกุลเข้ามาตรวจวินิจฉัยมากขึ้น เช่น วิธี polymerase chain reaction⁽¹⁷⁾, denaturing gradient gels⁽¹⁸⁾, real-time PCR⁽¹⁹⁾ และวิธี DNA probe analysis⁽²⁰⁾ และปัจจุบันได้มีการพัฒนาการใช้น้ำยาสำเร็จรูป เพื่อใช้ในการตรวจได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เช่น BV Blue test⁽²¹⁾, Fem exam⁽²²⁾ และ colorimetric card tests⁽²³⁾ แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความไม่จำเพาะกับการตรวจและมีราคาแพง อย่างไรก็ตามการจะนำวิธีการตรวจใดมาใช้ในการตรวจในงานประจำวัน จำเป็นต้องมีการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการตรวจนั้นๆ กับวิธีมาตรฐาน ในด้านของค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และค่าความสอดคล้อง เพื่อให้การวินิจฉัยถูกต้อง แม่นยำ เป็นประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยมากยิ่งขึ้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียลวาจิโนสิสในหญิงตั้งครรภ์โดยวิธี polymerase chain reaction โดยเปรียบเทียบกับวิธี Nugent score

วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างจากสารคัดหลั่งจากช่องคลอด (vaginal swab) ของหญิงที่มาใช้บริการฝากครรภ์หรือตรวจครรภ์ ไม่จำกัดช่วงอายุ และอายุครรภ์ จำนวน 295 ราย ระหว่างเดือนกันยายน 2553 ถึง มีนาคม 2554 โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE531311 และอาสาสมัครทุกรายได้ลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจ

ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อเข้าไปหมุนภายในช่องคลอด แล้วนำไปป้ายลงบนสไลด์แก้ว และนำไปย้อมด้วยสีแกรม ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100X การแปลผลใช้ระบบของ Nugent และคณะ^(15, 24) โดยมีการแบ่งรูปร่างลักษณะของเชื้อออกเป็น 3 แบบ คือ 1. รูปร่างแท่งขนาดใหญ่ติดสีแกรมบวก (*Lactobacillus* spp.) 2. รูปร่างขนาดเล็กติดสีแกรมลบ (*Prevotella* / *Bacteroides* morphotypes.) หรือติดสีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (*G. vaginalis* morphotype) และ 3. รูปร่างโค้งงอติดสีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (*Mobiluncus* morphotypes) และคิดเป็นค่าคะแนนที่พบเชื้อแต่ละลักษณะและจำนวนที่พบดังแสดงใน ตารางที่ 1 รวมคะแนนที่พบเชื้อแต่ละลักษณะทั้งหมด แล้วแปลผลตามวิธีการของ Nugent และคณะ โดยค่าคะแนนรวมอยู่ที่ 0 – 3 หมายถึงปกติ ค่าคะแนนที่ 4 – 6 เป็น intermediate-grade bacterial colonization และค่าคะแนนที่ 7 – 10 เป็น BV

สำหรับเทคนิค polymerase chain reaction ดัดแปลงวิธีการจากวิธีของ Ferris MJ และคณะ⁽²⁵⁾ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสารคัดหลั่งจากช่องคลอดโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปในการสกัด คือ QIAamp DNA MINI Kit ไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของ 16S rRNA gene ต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis*⁽²⁶⁾ และ *Atopobium vaginae*⁽²⁵⁾ จำนวน 2 คู่ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* คือ 5'-GGGCGGGCTAGAGTGCA-3' และ 5'-GAACCCGTGGAATGGGCC-3' ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ต่อเชื้อ *Atopobium*

vaginae คือ 5' -TAGGTCAGGAGTTAAATCTG-3' และ 5'-TCATGGCCCAGAAGACCGCC-3' ตามลำดับ สารเคมีในปฏิกิริยา ประกอบไปด้วย 1X PCR buffer, 0.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mixture, 1 unit *Taq* DNA polymerase, 0.1 μM ของ forward และ reverse primers และ template DNA 1 μl ปรับปริมาตรให้ได้ 25 μl ด้วยน้ำกลั่น โดยสภาวะในการทำ PCR ต่อเชื้อทั้งสองชนิดแตกต่างกันเฉพาะจำนวนรอบที่ทำ PCR โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ คือ 95°C 4 นาที (initial denaturation), การตรวจหาเชื้อ *Gardnerella vaginalis* ทำ PCR จำนวน 35 รอบโดย 95°C 1 นาที (denaturation), 55 °C 30 วินาที (annealing) และ 72°C 1 นาที (extension) และรอบสุดท้าย 72°C 10 นาที (final extension) ส่วนการตรวจหาเชื้อ *Atopobium vaginae* ทำ PCR จำนวน 40 รอบโดย 95°C 1 นาที, 55 °C 30 วินาที และ 72°C 1 นาที และรอบสุดท้าย 72°C 10 นาที ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วย ethidium bromide ดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ซึ่งจะได้ผลของแถบดีเอ็นเอขนาด 155 เบส ต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* และขนาด 210 เบส ต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* และทำการตัดเจลในตำแหน่งที่จำเพาะ นำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อส่งตรวจหาลำดับเบสเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ ในการทำ PCR ครั้งนี้ได้ทำ PCR controls ประกอบด้วย template-free PCR (negative control), positive control ใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อควบคุมผลบวกและ beta-globin DNA (internal control) เพื่อยืนยันตัวอย่างว่ามีสารคัดหลั่งจากช่องคลอดจริง

ตารางที่ 1 รูปร่างและระบบการให้คะแนนตามวิธีของ Nugent และคณะ⁽²⁴⁾

คะแนน	Lactobacilli morphotype per oil field	Gardnerella morphotype per oil field	Curved bacteria (Mobiluncus) per oil field
0	> 30	0	0
1	5-30	< 1	1-5
2	1-4	1-4	> 5
3	< 1	5-30	-
4	0	> 30	-

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างทั้งหมด 295 ราย พบช่วงอายุของหญิงตั้งครรภ์อยู่ระหว่าง 28.2 ± 6 ปี (22 – 34 ปี) และช่วงอายุครรภ์อยู่ระหว่าง 21.3 ± 10 สัปดาห์ (11 – 31 สัปดาห์) (รูปที่ 2) ผลการตรวจด้วยวิธีย้อมสีแกรม (Nugent score) จากตัวอย่างทั้งหมด 295 ราย พบรายที่ให้ผลปกติ 131 ราย (ร้อยละ 44.4) กลุ่มที่อยู่ระหว่างการเกิดเป็นโรคแบคทีเรียลวากิโนสิส (intermediate) 44 ราย (ร้อยละ 14.9) และเป็นโรค 120 ราย (ร้อยละ 40.7) (ตารางที่ 2) โดยแต่ละตัวอย่างสามารถพบเชื้อได้มากกว่า 1 ชนิด (ตารางที่ 3) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในกลุ่มที่อยู่ระหว่างการเกิดเป็นโรค (intermediate) ถือว่ามีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นโรค BV ได้มาก⁽²⁷⁻²⁹⁾ การศึกษานี้จึงจัดให้กลุ่มนี้เป็นกลุ่มของโรคแบคทีเรียลวากิโนสิส และสรุปว่าเป็นโรคแบคทีเรียลวากิโนสิส จำนวน 164 ราย (ร้อยละ 55.3) และพบโรคแบคทีเรียลวากิโนสิสมากที่สุดในช่วงอายุ 30-35 ปี การกระจายตัวของภาวะต่างๆ ในแต่ละกลุ่มอายุหญิงตั้งครรภ์และอายุครรภ์ ดังแสดงในรูปที่ 2 และเมื่อทำการศึกษาอายุครรภ์และช่วงการตั้งครรภ์ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคแบคทีเรียลวากิโนสิส พบว่าช่วง อายุครรภ์ที่เกิดโรคแบคทีเรียลวากิโนสิสมากที่สุด คือ การตั้งครรภ์ในช่วงอายุครรภ์ 25-36 สัปดาห์ (G3) ดังแสดงใน ตารางที่ 4 และพบภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ในระหว่างการคลอดของมารดาและทารก ในกลุ่มที่อยู่ระหว่างการเกิดเป็นโรค (intermediate) และเป็นโรคแบคทีเรียลวากิโนสิส เช่น ทารกอยู่ในภาวะเครียด (fetal distress) คลอดก่อนกำหนด (preterm labor) การผิดสัดส่วนของขนาดทารกและอุ้งเชิงกราน (cephalopelvic disproportion; CPD) ทารกน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่าปกติ และการชักนำให้เกิดการเจ็บครรภ์ เป็นต้น (ตารางที่ 5) สำหรับการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี PCR จากตัวอย่างทั้งหมด 295 ราย พบว่าให้ผลบวกที่

จำเพาะต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* มีขนาดดีเอ็นเอ 155 เบส และจำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* มีขนาด 210 เบส ตัวอย่างบางรายดังแสดงใน รูปที่ 3 พบว่า PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* ให้ผลบวก 171 ราย (58 %) ให้ผลลบ 124 ราย (42 %) และ PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* ให้ผลบวก 85 ราย (28.8 %) ให้ผลลบ 210 ราย (71.2 %) (ตารางที่ 6) เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* กับวิธี Nugent score พบว่ามีจำนวน 218 ราย ให้ผลการตรวจที่สอดคล้องกัน ในขณะที่ 77 ราย ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน โดยพบว่า 42 รายให้ผลลบกับวิธี Nugent score แต่ให้ผลบวกกับวิธี PCR และ 35 รายให้ผลบวกกับวิธี Nugent score แต่ให้ผลลบกับวิธี PCR สำหรับค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และค่าความชุก เท่ากับร้อยละ 78.7, 68, 75.4, 71.8 และ 58 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) สำหรับวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* มีจำนวน 208 ราย ให้ผลการตรวจที่สอดคล้องกันกับวิธี Nugent score ในขณะ 87 ราย ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน โดยพบว่า 4 รายที่ให้ผลลบกับวิธี Nugent score แต่ให้ผลบวกกับวิธี PCR และมี 83 รายให้ผลบวกกับวิธี Nugent score แต่ให้ผลลบกับวิธี PCR สำหรับค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก ค่าการทำนายผลลบ และค่าความชุก เท่ากับร้อยละ เท่ากับ 49, 97, 95.3, 60.5 และ 29 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) และดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR (ลุ่มจากเชื้อแต่ละชนิดที่ให้ผลบวกจำนวนอย่างละ 2 ตัวอย่าง ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ ซึ่งผลพบว่ามีค่าความเหมือนกันร้อยละ 100 กับส่วน 16s rRNA ของเชื้อ *Gardnerella vaginalis* accession number AY738695 และร้อยละ 100 กับส่วน 16s rRNA ของเชื้อ *Atopobium vaginae*

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียลวากิโนสิสด้วยวิธีการย้อมแกรมและวิธี PCR

ภาวะการติดเชื้อ	ความถี่ (n = 295)		
	Nugent score (%)	PCR (%)	
		<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Atopobium vaginae</i>
Normal	131 (44.4)	124 (42)	210 (71.2)
Intermediate	44 (14.9)	171 (58)	85 (28.8)
Bacterial vaginosis	120 (40.7)		

ตารางที่ 3 ลักษณะของเชื้อแต่ละชนิดที่พบในตัวอย่างที่เป็นและไม่เป็นโรคแบคทีเรียลวาจิโนสิส ด้วยวิธีย้อมสีแกรม

Morphotype of organisms seen on Gram-stained smear	Diagnosis by Nugent score method		
	normal	intermediate	BV
Gram-positive cocci	3	1	1
<i>Lactobacillus</i> morphotype	131	42	0
<i>Gardnerella</i> morphotype	33	44	120
Curved rods	0	0	16

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของการตั้งครีกรักกับภาวะ bacterial vaginosis

การตั้งครีกรัก (สัปดาห์)	ความถี่		
	normal (n = 131)	intermediate (n = 44)	BV (n = 120)
G1 (12)	34	9	38
G2 (13 – 24)	48	17	30
G3 (25 – 36)	38	12	44
G4 (> 36)	11	6	8

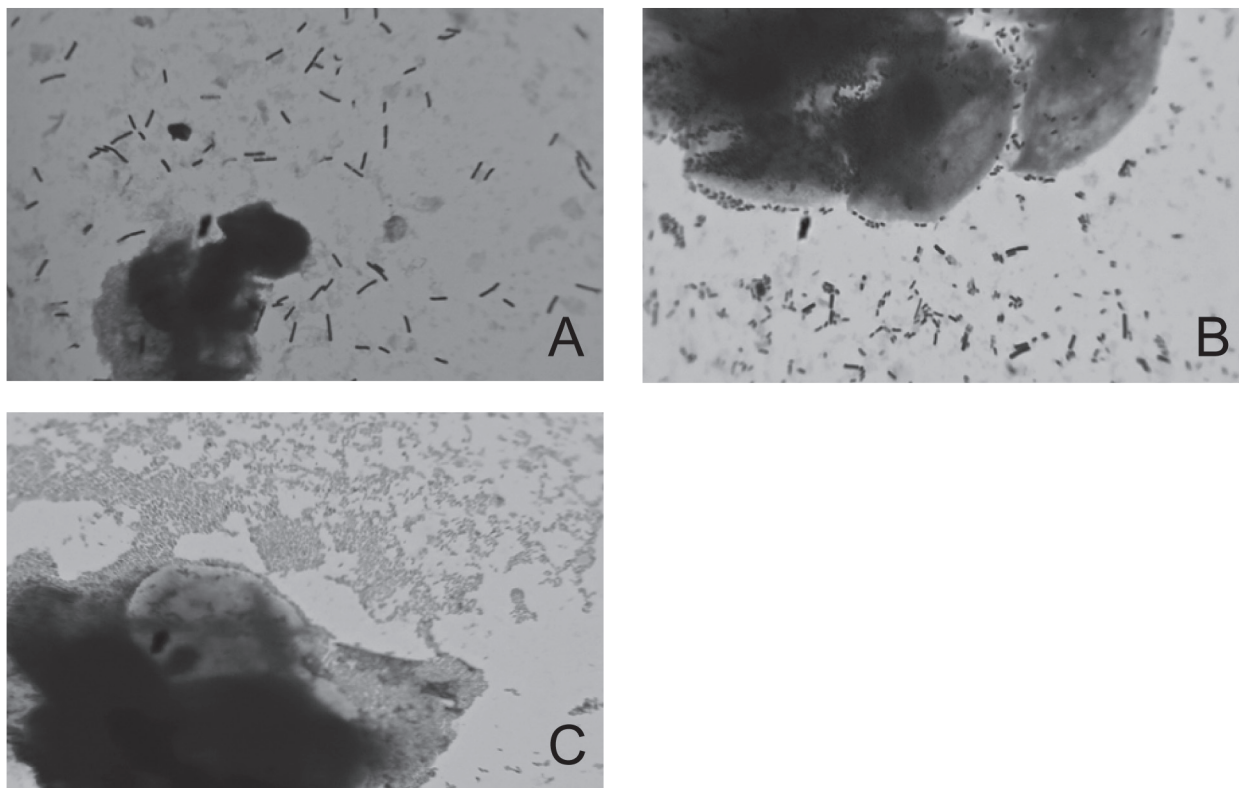
ตารางที่ 5 ภาวะแทรกซ้อนในระหว่างการคลอดของมารดาและทารก ของหญิงตั้งครีกรักที่มีภาวะ intermediate และ bacterial vaginosis

	คะแนน	ความถี่ (ราย)	ภาวะแทรกซ้อนในระหว่างการคลอดของมารดาและทารก
Intermediate	4	8	ทารกอยู่ในภาวะเครียด, การคลอดก่อนกำหนด, การติดเชื้อส่วนองขนาดทารกและอวัยวะสืบพันธุ์, ทารกน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่าปกติ
	5	7	การคลอดก่อนกำหนด, ทารกน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่าปกติ
	7	7	ทารกคลอดเกินกำหนด, การคลอดก่อนกำหนด, การติดเชื้อส่วนองขนาดทารกและอวัยวะสืบพันธุ์, ทารกน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่าปกติ
	8	26	ภาวะความดันโลหิตสูงในหญิงตั้งครีกรัก, ทารกมีความพิการแต่กำเนิด, ทารกคลอดเกินกำหนด, ภาวะน้ำคร่ำแตกก่อนการเจ็บครรภ์, การคลอดก่อนกำหนด, ทารกอยู่ในภาวะเครียด, การติดเชื้อส่วนองขนาดทารกและอวัยวะสืบพันธุ์, ทารกน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่าปกติ
	9	6	การติดเชื้อส่วนองขนาดทารกและอวัยวะสืบพันธุ์, ทารกน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่าปกติ
BV	10	9	การคลอดก่อนกำหนด, ทารกมีความพิการแต่กำเนิด, ทารกน้ำหนักแรกคลอดน้อยกว่าปกติ

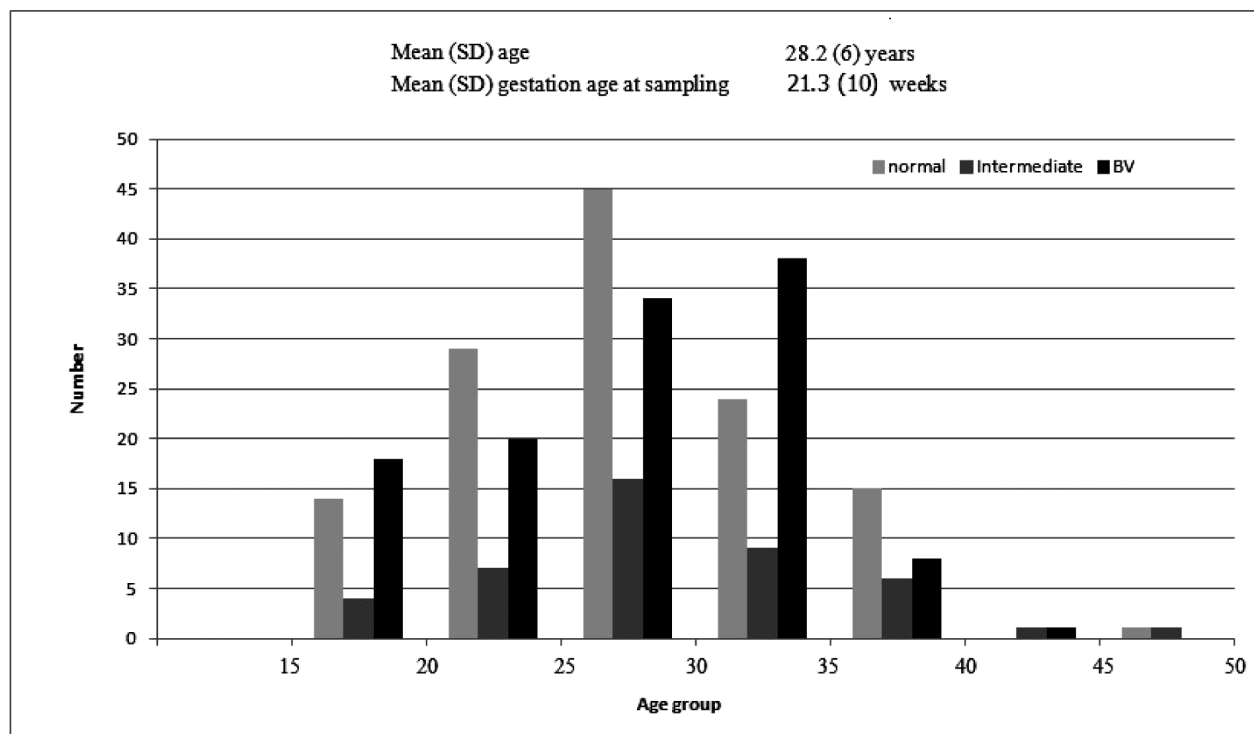
ตารางที่ 6 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก (PPV) ค่าการทำนายผลลบ (NPV) และความชุกของภาวะ BV ระหว่างวิธี PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Nugent score)

Test	BV	Normal	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Prevalence (%)
Nugent score	164	131	100	100	100	100	56.0
PCR (<i>G. vaginalis</i>)	171 *	124	78.7	68.0	75.4	71.8	58.0
PCR (<i>A. vaginae</i>)	85 *	210	49.0	97.0	95.3	60.5	29.0

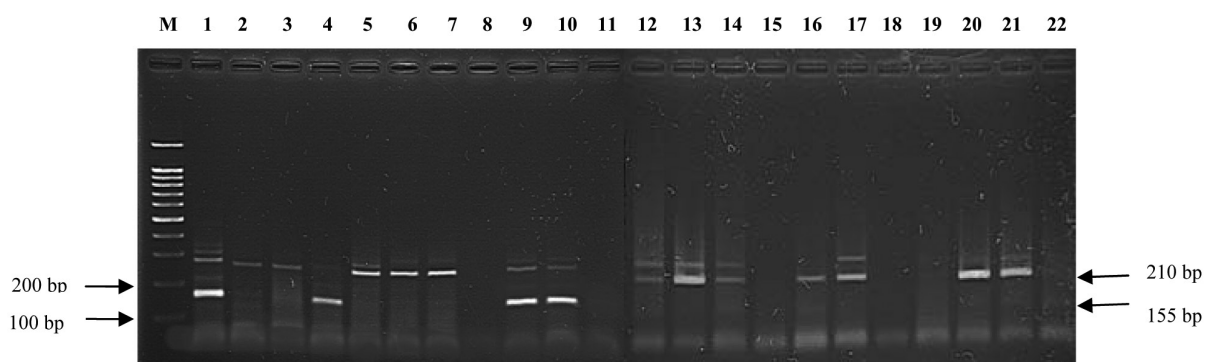
* หมายเหตุ รวมภาวะ intermediate และ BV เข้าด้วยกัน เนื่องจาก intermediate มีโอกาสพัฒนาไปเป็น BV ได้



รูปที่ 1 การย้อมสีแกรมจากสิ่งส่งตรวจจากสารคัดหลั่งในผนังช่องคลอดของหญิงตั้งครรภ์ A คือ ภาวะปกติ ที่สามารถพบเชื้อประจำถิ่นได้จำนวนมาก B เป็นภาวะที่มีทั้งเชื้อประจำถิ่นและเชื้อที่ก่อโรค ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็นโรคได้ (intermediate) C เป็นภาวะการเกิดโรคแบคทีเรียลวาจิโนสิส (BV)



รูปที่ 2 การกระจายตัวช่วงอายุของหญิงตั้งครรภ์ที่พบการเกิดโรคแบคทีเรียลวากิโนสิส



รูปที่ 3 Lane 1-11: ตัวอย่างผลการตรวจโดยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อ เชื้อ *Atopobium vaginiae* (ขนาด 155 bp) M: 1 kb DNA ladder, lane : 1, 4, 9 ให้ผลบวก lane 2, 3, 5, 6, 7 : ให้ผลลบ lane 10 : ผลบวกควบคุม และ lane 11: ผลลบควบคุม Lane 12-22 : ตัวอย่างผลการตรวจโดยวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* (ขนาด 210 bp) lane 12, 13, 14, 16, 17, 20 : ให้ผลบวก lane 15, 18, 19 : ให้ผลลบ, lane 21: ผลบวกควบคุม และ lane 22: ผลลบควบคุม แลบดีเอ็นเอขนาด > 210 bp คือ internal control

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

โรคการอักเสบติดเชื้อของช่องคลอดชนิดไม่จำเพาะ หรือ โรคแบคทีเรียลวากิโนสิส (bacterial vaginosis: BV) ถือว่าเป็นความผิดปกติที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของช่องคลอด โดยเฉพาะในส่วนของเชื้อประจำถิ่นได้แก่ เชื้อแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* spp.) ในช่องคลอดลดลง และมีการเข้ามาแทนที่ด้วยเชื้อก่อโรคหลายชนิด วิธีการเพาะ

เลี้ยงเชื้อเพื่อหาเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ เช่น *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma* species และ *Atopobium vaginiae*⁽¹⁾ เป็นวิธีที่ยากต่อการวินิจฉัยเนื่องจากจะสามารถพบเชื้อหลายชนิดเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และบางชนิดเพาะเลี้ยงได้ยาก จึงยากแก่การแปลผล และการเพาะเลี้ยงต้องใช้เวลา นานและค่าใช้จ่ายสูง⁽³⁰⁾ สำหรับวิธีการย้อมสีแกรมและตรวจ

ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียลิวาจิโนสที่นั่นถูกคิดค้นครั้งแรกโดย Spiegel และคณะ⁽³¹⁾ ซึ่งวิธีเดิมบอกได้แค่ว่ามีเชื้อชนิดใดบ้างและปริมาณคร่าวๆ จึงเกิดปัญหาในการแปลผลสำหรับผู้ที่ทำการตรวจและมีโอกาสผิดพลาดได้มาก ต่อมา Nugent และคณะ⁽¹⁵⁾ ได้ปรับปรุงการแปลผลหรือการวินิจฉัยจากการย้อมสีแกรมโดยให้มีการใช้ระบบคะแนนเกรดตามลักษณะรูปร่างของเชื้อและปริมาณที่ตรวจพบ เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียลิวาจิโนสมาจนถึงปัจจุบัน สำหรับความชุกในประเทศไทย มีรายงานต่างๆ จากหลายวิธีในการวินิจฉัย เช่น การศึกษาของ Thanavuth และคณะ ในปี 2007 โดยการตรวจด้วยวิธี BV blue test ในหญิงตั้งครรภ์ พบความชุกร้อยละ 25.8⁽³²⁾ การศึกษาของ Puapermpoonsiri และคณะ ในปี 1996 ด้วยวิธีการย้อมสีแกรม ในหญิงตั้งครรภ์ พบความชุกร้อยละ 15.9⁽³³⁾ และการศึกษาของ Cohen และคณะ ในปี 1995 ด้วยวิธีการย้อมสีแกรมในหญิงขาบริการพบความชุกร้อยละ 33⁽¹⁰⁾ จากผลการศึกษาในครั้งนี้โดยวิธี Nugent และคณะพบความชุกของ BV ในหญิงตั้งครรภ์ของโรงพยาบาลศรีนครินทร์สูงถึงร้อยละ 56 โดยใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Nelson DB และคณะ⁽⁴⁾ ที่พบ BV มากขึ้นถึงร้อยละ 50 ในหญิงตั้งครรภ์ช่วงอายุที่พบมากที่สุดคือ 30-35 ปี สอดคล้องกับการศึกษาของ Eriksson และคณะ⁽³⁴⁾ ในปี 2003 และปี 2008 จากการเก็บตัวอย่าง 15 ปี ตั้งแต่ปี 1993-2008 ข้อดีสำหรับวิธีการย้อมแกรมคือทำได้ง่ายและราคาถูก เหมาะสำหรับนำมาใช้ในหองปฏิบัติการทั่วไปเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยในงานประจำวัน แต่ข้อเสียคือใช้เวลาในการตรวจนานและต้องอาศัยผู้ชำนาญในการตรวจโดยเฉพาะ ปัจจัยที่อาจมีผลต่อความผิดพลาดได้แก่ การดูกล้องในตำแหน่งที่มีจำนวนของเชื้อแตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากการป้ายสิ่งส่งตรวจลงบนแผ่นแก้วมีการกระจายตัวหนา บาง ไม่เท่ากัน การเก็บตัวอย่างจากตำแหน่งที่แตกต่างกัน การดูรูปร่างลักษณะของเชื้อแตกต่างกัน และมีความไม่ชัดเจนในตัวเชื้อที่พบซึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดจากการย้อมสีแกรม เชื้อแบคทีเรียที่อายุมากหรือตายแล้วอาจทำให้การติดสีผิดพลาดได้ หรือในส่วนของเชื้อที่มีขนาดเล็ก (*Gardnerella* และ *Prevotella*) อาจจะติดสีแกรมได้ไม่ค่อยดี และไม่ชัดเจน ทำให้วินิจฉัยผิดพลาดได้⁽³⁵⁾

การศึกษาในครั้งนี้ทำการตรวจวินิจฉัยโรคแบคทีเรียลิวาจิโนส ด้วยวิธี PCR โดยตรวจหาเชื้อเพียงสองชนิดคือ *Gardnerella vaginalis* และ *Atopobium vaginae*

เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นเชื้อที่สัมพันธ์กับการก่อโรค BV มากที่สุดโดยสาเหตุก่อโรคเกิดจากการสร้าง biofilm⁽³⁶⁾ โดยจากการศึกษาของ Pereira L และคณะ⁽³⁷⁾ เมื่อปี ค.ศ. 2005 ศึกษาในคนท้องที่เป็น BV จำนวน 1,756 ราย พบเป็นเชื้อ *Gardnerella vaginalis* จำนวน 1,745 ราย หรือ 99.37% โดยมักพบอยู่ร่วมกับเชื้อ *Prevotella/Bacteroides* เป็นส่วนใหญ่ (97 %) และพบร่วมกับ *Mobiluncus* spp. 40 % แต่ในรายที่ไม่พบ *Gardnerella vaginalis* เลยพบเฉพาะ *Prevotella/Bacteroides* มีน้อยเพียง 10 ราย (0.6 %) และพบเฉพาะ *Prevotella/Bacteroides* ร่วมกับ *Mobiluncus* spp. เพียงรายเดียว โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานอื่นๆ จากหลายประเทศในปัจจุบันที่พบเชื้อชนิดใหม่เพิ่มคือ *Atopobium vaginae* ที่พบว่าสัมพันธ์กับโรคนี้มากกว่าหรือเท่ากับเชื้อ *Gardnerella vaginalis*^(26,36,40-44) *Atopobium vaginae* เป็นแบคทีเรียชนิด strict anaerobe ลักษณะย้อมสีแกรมจัดเป็น gram positive cocco-bacilli ซึ่งแต่เดิมครั้งแรกจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. แต่ในปี 1996 จากการหาลำดับเบสใน 16s rRNA gene จึงจัดให้เป็นจีนัสใหม่ คือ *Atopobium vaginae*⁽⁴⁴⁾ ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อชนิดนี้มากยิ่งขึ้น⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ โดยมีรายงานการดื้อต่อยารักษา คือ metronidazole ด้วย⁽⁴⁸⁾ ซึ่งยังไม่มีรายงานการตรวจเชื้อชนิดนี้ในประเทศไทย ผลการศึกษา PCR ในครั้งนี้พบว่ามีความไวต่ำเมื่อเทียบกับหลายการศึกษาที่ผ่านมา^(29, 38) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Atopobium vaginae* มีความจำเพาะต่อโรคแบคทีเรียลิวาจิโนส มากกว่าเชื้อ *Gardnerella vaginalis* เนื่องจากมีค่าความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* เท่ากับร้อยละ 97 และ 95.3 ตามลำดับ มากกว่าค่าความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* เท่ากับร้อยละ 68 และ 75.4 ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Bradshaw และคณะ⁽²⁹⁾ และจากหลายการศึกษาพบว่าตรวจพบเชื้อ *Atopobium vaginae* เพียงชนิดเดียวในคนเป็นโรคพบได้ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการพบเชื้อ *Gardnerella vaginalis* และส่วนใหญ่จะตรวจพบร่วมกัน^(39, 40) ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อทั้งสองได้ในภาวะปกติและเป็นโรคโดยสามารถพบเชื้อ *Gardnerella vaginalis* ได้เป็นส่วนใหญ่ในขณะเกิดโรคและพบได้ในภาวะปกติประมาณร้อยละ 50 และสามารถพบเชื้อ *Atopobium vaginae* ในกลุ่ม

ที่เป็นโรคได้สูงถึงร้อยละ 95 แต่ที่พบได้บ้างในภาวะปกติ⁽⁴¹⁾ จากการเปรียบเทียบวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* กับวิธี Nugent และคณะ พบความสอดคล้องกัน 218 ราย (ร้อยละ 73.9) ผลบวกปลอม 42 ราย (ร้อยละ 14.2) อาจเกิดจากการตรวจ PCR สามารถตรวจพบได้ในรายที่ปกติแต่มีการติดเชื้อ *Gardnerella vaginalis* ในปริมาณที่น้อยๆ โดยยังมีเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นคือ *Lactobacillus* spp. อยู่ร่วมด้วยในปริมาณมากทำให้การย้อมแกรมแปลผลด้วยวิธี Nugent score ให้ผลปกติ ส่วนผลลบปลอม 35 ราย (ร้อยละ 11.9) อาจเกิดจากการผิดพลาดจากการแปลผลการย้อมสีแกรมผิดหรือจากวิธีการทำ PCR เช่นการใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยเกินไปหรือมากเกินไป สำหรับผล PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* กับวิธี Nugent และคณะ พบความสอดคล้องกัน 208 ราย (ร้อยละ 70.5) ผลบวกปลอมจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 1.4) อาจเกิดจากการตรวจ PCR สามารถตรวจพบได้ในรายที่ปกติแต่มีการติดเชื้อ *Atopobium vaginae* ในปริมาณที่น้อยๆ ซึ่งผลการทดลองนี้สัมพันธ์กับรายงานที่พบจากหลายๆการศึกษาที่พบว่าสามารถพบเชื้อนี้ได้บ้างในคนปกติแต่พบได้น้อยมากไม่เกินร้อยละ 5 ซึ่งไม่เหมือนกับ เชื้อ *Gardnerella vaginalis* ที่สามารถพบในคนปกติได้สูงถึงร้อยละ 50⁽⁴¹⁾ ส่วนผลลบปลอมจำนวน 83 ราย (ร้อยละ 28.1) อาจเกิดจากความผิดพลาดจากการแปลผลการย้อมสีแกรมผิด เนื่องจากเชื้อ *A. vaginae* ลักษณะย้อมสีแกรมจัดเป็น gram positive cocco-bacilli ซึ่งแต่เดิมครั้งแรกจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ทำให้การตรวจจากการย้อมสีแกรมคิดว่าเป็น *Lactobacillus* morphotype ทำให้แปลผลโดย Nugent score ได้ค่าเป็นปกติทั้งที่อาจเป็น BV หรืออาจผิดพลาดจากวิธีการทำ PCR เช่นการใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยเกินไปหรือมากเกินไป

อย่างไรก็ตามวิธี PCR ถือว่าเป็นวิธีที่ถูกต้องและรวดเร็วในการตรวจวินิจฉัยโรคอีกวิธีหนึ่ง จากผลการทดลองที่ได้สรุปได้ว่า สามารถนำวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Gardnerella vaginalis* เพียงอย่างเดียวมาใช้ในการวินิจฉัยโรค BV ได้ โดยความซุกที่ได้เท่ากับร้อยละ 58 ซึ่งใกล้เคียงกับการตรวจด้วยวิธี Nugent score ที่พบความซุกร้อยละ 56 วิธีนี้มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและทำนายผลลบร้อยละ 78.7, 68.0, 75.4 และ 71.8 ตามลำดับ อาจมีการพัฒนาวิธีการตรวจในอนาคตเพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะของวิธี เช่นการใช้เทคนิค real-time quantitative

PCR ซึ่งจะช่วยให้แยกคนปกติที่สามารถเจอเชื้อ *Gardnerella vaginalis* ปริมาณน้อยๆ ออกจากคนเป็นโรคได้ สำหรับวิธี PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Atopobium vaginae* รายงานนี้ถือเป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่ทำการตรวจหาเชื้อชนิดนี้เพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดโรค BV ซึ่งพบความซุกของ BV ร้อยละ 29.0 วิธีนี้มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและทำนายผลลบร้อยละ 49.0, 97.0, 95.3 และ 60.5 ตามลำดับ โดยจะพบว่ามีความจำเพาะของวิธีและค่าการทำนายผลบวกที่สูงมาก เนื่องจากไม่ค่อยพบเชื้อนี้ในคนปกติและมีความสำคัญกับการรักษามากกว่า BV เนื่องจากเชื้อส่วนใหญ่จะดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา คือ metronidazole ด้วย ในอนาคตน่าจะมีการพัฒนาการตรวจ PCR แบบชนิด multiplex-PCR ด้วยเพื่อประเมินสาเหตุของโรค BV ว่าเกิดจากเชื้อ *Gardnerella vaginalis* หรือชนิด *Atopobium vaginae* จะได้ปรับเปลี่ยนชนิดของยารักษาให้ถูกต้องกับชนิดของเชื้อสาเหตุเพื่อป้องกันการกลับเป็นซ้ำใหม่ของโรค BV

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนโครงการพัฒนานักวิจัยใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2553 และสราวุธ หงษ์สิทธิ์ ได้รับทุนการศึกษาระดับปริญญาโทจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 455-9.
2. Sobel JD. Bacterial vaginosis. Annu Rev Med 2000; 51: 349-56.
3. Livengood CH. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. Rev Obstet Gynecol 2009; 2: 28-37.
4. Nelson DB, Macones G. Bacterial vaginosis in pregnancy: current findings and future directions. Epidemiol Rev 2002; 24: 102-8.
5. Paige DM, Augustyn M, Adih WK, Witter F, Chang J. Bacterial vaginosis and preterm birth: a comprehensive review of the literature. J Nurse Midwifery 1998; 43: 83-9.

6. Helmig R, Uldbjerg N. Bacterial genesis of pre-term delivery. *Ugeskr Laeger* 1991; 153: 1268-71.
7. Reynolds HD. Bacterial vaginosis and its implication in preterm labor and premature rupture of membranes. A review of the literature. *J Nurse Midwifery* 1991; 36: 289-96.
8. Del Bene VE, Moore E, Rogers M, Kreutner AK. Bacterial flora of patients with prematurely ruptured membranes. *South Med J* 1977; 70: 948-50.
9. Soper DE. Bacterial vaginosis and postoperative infections. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 467-9.
10. Cohen CR, Duerr A, Pruithithada N, Rugsao S, Hillier S, Garcia P, et al. Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers in Chiang Mai, Thailand. *Aids* 1995; 9: 1093-7.
11. Royce RA, Thorp J, Granados JL, Savitz DA. Bacterial vaginosis associated with HIV infection in pregnant women from North Carolina. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20: 382-6.
12. McGregor JA, French JI. Bacterial vaginosis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55: S1-19.
13. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999; 180: 1863-8.
14. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74: 14-22.
15. 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.
16. Ryan-Wenger NA, Neal JL, Jones AS, Lowe NK. Accuracy of vaginal symptom self-diagnosis algorithms for deployed military women. *Nurs Res* 2010; 59: 2-10.
17. Raz R, Stamm WE. A controlled trial of intra-vaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med* 1993; 329: 753-6.
18. Stamm WE, Raz R. Factors contributing to susceptibility of postmenopausal women to recurrent urinary tract infections. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 723-5.
19. Menard JP, Mazouni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F. Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 1547-52.
20. Raz R, Gennesin Y, Wasser J, Stoler Z, Rosenfeld S, Rottensterich E, et al. Recurrent urinary tract infections in postmenopausal women. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 152-6.
21. Myziuk L, Romanowski B, Johnson SC. BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1925-8.
22. West B, Morison L, Schim van der Loeff M, Gooding E, Awasana AA, Demba E, et al. Evaluation of a new rapid diagnostic kit (FemExam) for bacterial vaginosis in patients with vaginal discharge syndrome in The Gambia. *Sex Transm Dis* 2003; 30: 483-9.
23. Yen S, Shafer MA, Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 927-33.
24. Forsum U, Hallen A, Larsson PG. Bacterial vaginosis: a laboratory and clinical diagnostics

- enigma. *Apmis* 2005; 113: 153-61.
25. Ferris MJ, Masztal A, Martin DH. Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of *Atopobium vaginae* in patients with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5892-4.
 26. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3270-6.
 27. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect* 2002; 78: 413-5.
 28. Larsson PG, Carlsson B, Fahraeus L, Jakobsson T, Forsum U. Diagnosis of bacterial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. *Sex Transm Infect* 2004; 80: 63-7.
 29. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis* 2006; 194: 828-36.
 30. Ison CA, Dawson SG, Hilton J, Csonka GW, Easmon CS. Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of *Gardnerella vaginalis* infection. *J Clin Pathol* 1982; 35: 550-4.
 31. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 170-7.
 32. Thanavuth A, Chalermchokcharoenkit A, Boriboonhirunsarn D, Sirisomboon R, Pimol K. Prevalence of bacterial vaginosis in Thai pregnant women with preterm labor in Siriraj hospital. *J Med Assoc Thai* 2007; 90: 437-41.
 33. 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.
 34. Eriksson K, Adolfsson A, Forsum U, Larsson PG. The prevalence of BV in the population on the Aland Islands during a 15-year period. *Apmis* 2011; 118: 903-8.
 35. Mohanty S, Sood S, Kapil A, Mittal S. Interobserver variation in the interpretation of Nugent scoring method for diagnosis of bacterial vaginosis. *Indian J Med Res* 2010; 131: 88-91.
 36. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dorffle Y, Scholze J, et al. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198: 97 e1-6.
 37. Pereira L, Culhane J, McCollum K, Agnew K, Nyirjesy P. Variation in microbiologic profiles among pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 746-51.
 38. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 33-43.
 39. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 1130-2.
 40. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol* 2004; 4: 16.

41. Burton JP, Devillard E, Cadieux PA, Hammond JA, Reid G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. J Clin Microbiol 2004; 42: 1829-31.
42. Trama JP, Pascal KE, Zimmerman J, Self MJ, Mordechai E, Adelson ME. Rapid detection of *Atopobium vaginae* and association with organisms implicated in bacterial vaginosis. Mol Cell Probes 2008; 22: 96-102.
43. Romanik M, Friedek D, Wojciechowska-Wieja A, Martirosian G. *Atopobium vaginae*: characterization and association with pathogenesis of bacterial vaginosis. Ginekol Pol 2006; 77: 398-403.
44. Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjoden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999; 49 Pt 4: 1573-6.
45. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M, et al. Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*. BMC Infect Dis 2006; 6: 51.
46. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. J Infect Dis 2006; 194: 828-36.
47. Hay P. Recurrent bacterial vaginosis. Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 82-6.
48. Ferris MJ, Masztal A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL, Jr., Martin DH. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. BMC Infect Dis 2004; 13: 5.