



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015년 8월

박사학위 논문

세균성 질증 치료의  
주요 표적 세균  
(*Gardnerella vaginalis*)에 대한  
프로바이오틱스와 항생제 효과

조선대학교 대학원

보완대체 의학과

김 정 아

세균성 질증 치료의  
주요 표적 세균  
(*Gardnerella vaginalis*)에 대한  
프로바이오틱스와 항생제 효과

Effects of Probiotics and Antibiotics on Major Target  
Bacterium(*Gardnerella vaginalis*) for Treatment of  
Bacterial Vaginosis

2015년 8월 25일

조선대학교 대학원

보완대체 의학과

김 정 아

세균성 질증 치료의  
주요 표적 세균  
(*Gardnerella vaginalis*)에 대한  
프로바이오틱스와 항생제 효과

지도교수 박 상 학

이 논문을 보완대체의학 박사학위신청  
논문으로 제출함

2015년 4월

조선대학교 대학원

보완대체의학과

김 정 아

## 김정아의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 문경래 (인)

위원 조선대학교 교수 양남웅 (인)

위원 조선대학교 교수 이미자 (인)

위원 남부대학교 교수 박명숙 (인)

위원 조선대학교 교수 박상학 (인)

2015년 6월

조선대학교 대학원

# 목 차

표 목차 .....	iii
도 목차 .....	iv
ABSTRACT .....	v
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
A. 실험에 사용한 표준균주들 .....	3
B. 실험에 사용한 probiotics .....	3
C. <i>G. vaginalis</i> 배양을 위한 사람 적혈구 용해액의 제조 .....	3
D. 세균성 질증의 진단 .....	4
E. <i>G. vaginalis</i> 집락의 순수 분리 배양 .....	4
F. <i>G. vaginalis</i> 의 동정 .....	4
G. <i>G. vaginalis</i> 의 biotype 결정 .....	5
1. $\beta$ -galactosidase test (ONPG) .....	5
2. Hippurate 가수분해 검사 .....	5
3. Lipase egg-yolk plate test .....	6
4. Lipase spot test .....	6
H. Augmentin, clindamycin, metronidazole disc 감수성 검사 .....	7
I. <i>S. denitrificans</i> YH1과 <i>L. crispatus</i> YH2에 의한 <i>G. vaginalis</i> 야생주들의 성장 억제 검사 .....	9
III. 결 과 .....	11
A. <i>G. vaginalis</i> 야생주들에 대한 lipase egg-yolk plate test와 lipase spot test .....	11
B. <i>G. vaginalis</i> 야생주들의 biotype 분포 .....	13

C. <i>G. vaginalis</i> biotype과 $\beta$ -hemolysis의 상관관계 .....	13
D. <i>G. vaginalis</i> 33균주에 대한 항균제 원판 확산법 .....	14
E. Probiotics와 절대 무산소 세균들의 항균제 감수성 .....	16
F. <i>S. denitrificans</i> YH1과 <i>L. crispatus</i> YH2에 의한 <i>G. vaginalis</i> 야생주들의 성장 억제 효과 .....	16
IV. 고 찰 .....	18
V. 결 론 .....	22
참 고 문 헌 .....	24

## 표 목차

<b>Table 1.</b> Differences between lipase tests by Briselden etc. and Piot etc. ....	12
<b>Table 2.</b> Distribution of <i>G. vaginalis</i> biotype .....	13
<b>Table 3.</b> Relationship between <i>G. vaginalis</i> biotype and degree of $\beta$ -hemolysis .....	13
<b>Table 4.</b> Antibiotic disc diffusion test to 33 wild strains of <i>G. vaginalis</i> .....	15
<b>Table 5.</b> Correlation between <i>G. vaginalis</i> biotype and metronidazole resistance .....	16
<b>Table 6.</b> Growth inhibition zone diameters of probiotics and obligate anaerobic bacteria by antibiotic disc diffusion method .....	16
<b>Table 7.</b> Growth inhibition zone diameters of <i>G. vaginalis</i> wild strains by <i>S.</i> <i>denitrificans</i> YH1 and <i>L. crispatus</i> YH2 .....	17



## 도 목 차

**Figure 1.** Growth inhibition zone of *G. vaginalis* by antibiotic disc diffusion test ..... 8

**Figure 2.** Growth inhibition zones of *G. vaginalis* by *S. denitrificans* YH1(above) and *L. crispatus* YH2(below) ..... 10

## ABSTRACT

### Effects of Probiotics and Antibiotics on Major Target Bacterium(*Gardnerella vaginalis*) for Treatment of Bacterial Vaginosis

Kim Jung-A

Advisor: Prof. Park Sang-Hag, M.D., Ph.D.

Department of Complementary and  
Alternative Medicine,

Graduate School of Chosun University

**Objective:** *Gardnerella vaginalis* is a major predisposing bacterium of Bacterial vaginosis (BV). It helps to obligate anaerobic bacteria to adhere on vaginal squamous epithelia, increasing the risk of BV. This study aims to test probiotic effect of *Steroidobacter denitrificans* YH1 and *Lactobacillus crispatus* YH2 against wild strains of *G. vaginalis* and search vaginal antibiotic suppository that inhibits growth of *G. vaginalis* wild strains as pre-treatment before administrating probiotics.

**Methods:** Thirty-three *G. vaginalis* wild strains were isolated from BV patients diagnosed using Amsel's criteria then identified by several confirmative characteristics and tests, *i.e.*  $\beta$ -hemolytic tiny colony, Gram-variable pleomorphic short rods, oxidase test (-), catalase test (-), metronidazole disc (5  $\mu$ g) resistance and clue cell. Biotype was determined by the results of hippurate test,  $\beta$ -galactosidase test and lipase egg-yolk plate test. The effective vaginal antibiotic suppository was searched using antibiotic disc diffusion test on thirty-four strains of *G. vaginalis*. Probiotic effects of *S. denitrificans* YH1 and *L. crispatus* YH2 strains isolated from a healthy woman's vagina were also

measured using a similar antibiotic disc diffusion method.

**Results:** Biotypes of 33 wild strains were as following: three type 1, two type 2, two type 3, four type 4, fifteen type 5, one type 6, two type 7 and four type 8. The distinct  $\beta$ -hemolysis (+++) was caused by type 1, 2, 5, 6 and the weak  $\beta$ -hemolysis (+) by type 4, 8. The average inhibition zone diameters of augmentin and clindamycin against *G. vaginalis* wild strains were  $44.9 \pm 9.5$  mm and  $55.5 \pm 5.5$  mm each. Twenty-one strains (64%) among the 33 wild strains of *G. vaginalis* showed inhibition zones of 0 mm against metronidazole (50  $\mu$ g) disc. The average inhibition zone diameters by *S. denitrificans* YH1 and *L. crispatus* YH2 were  $27.4 \pm 9.7$  mm and  $23.9 \pm 9.0$  mm respectively against randomly selected 15 strains of *G. vaginalis*. Metronidazole resistance showed a close relation among *G. vaginalis* biotypes, but there was no relation between probiotic inhibition and biotype.

**Conclusion:** The results of this study showed that *S. denitrificans* YH1 and *L. crispatus* YH2 have probiotic effects to most *G. vaginalis* wild strains without any relation to biotype. All wild strains showed high susceptibility to clindamycin and augmentin, while many were resistant to metronidazole. This means that clindamycin vaginal suppository needs to be used as a pre-treatment means of BV therapy prior to administration of probiotics *S. denitrificans* YH1 or *L. crispatus* YH2 strain.

**Key words:** Bacterial vaginosis, *Gardnerella vaginalis*, Probiotics, Clindamycin, Augmentin, Metronidazole

## I. 서 론

세균성 질증(bacterial vaginosis)은 가임기 여성들에게 가장 흔한 질염으로 생선 비린내가 나는 회백색 질 분비물의 증가가 주 증상이며(1, 2), 조기 진통, 조기 양막파수, 태아막 감염, 조산, 저체중아, 산후 자궁내막염, 불임, 산부인과적 수술 후 감염 등의 합병증과 관련이 있다(3-10).

여성의 질 내에는 정상 세균군인 유산간균(*lactobacillus*) 및 비 병원성 사슬알균 같은 유산 생성 세균들(lactic acid bacteria)이 있어 질 내 산도를 4.5 이하로 유지하여 병원성 세균의 성장을 억제하고 건강한 질 환경을 유지하는 역할을 한다.

세균성 질증은 이러한 유산 생성 세균들이 *Gardnerella vaginalis*, 절대 무산소 세균(*Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp. etc.*) 및 *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* 등으로 교체되면서 발생하는 비 특이적 질염이다(2, 3, 11, 12). 특히 조건 무산소 세균인 *G. vaginalis*는 세균성 질증에서 그 수가 크게 증가하며 질 내 pH를 상승시키고, 절대 무산소 세균들의 질 상피세포 부착을 도와 질 내 생태계에서 우위를 점하는데 결정적 기여를 한다(13, 14).

현재 세균성 질증의 치료는 항생제인 metronidazole 정제를 복용하거나, metronidazole 혹은 clindamycin 질좌제를 질 내에 삽입하여 절대 무산소 세균들을 억제하는 치료가 주를 이루고 있으나 재발이 잦다. 이는 질 내 유산 생성 세균들의 감소로 인한 질 생태계의 파괴가 중요한 원인으로 알려져 있다. Hillier 등(15)은 항생제 치료 직후 질 내에 83%의 유산간균이 있었으나 1개월 후에는 65%로 감소했다고 하였으며, Eschenbach 등(16)은 건강한 질 내 유산간균의 96%가 과산화수소를 생성하나 세균성 질증 치료 후에는 6%만이 과산화수소를 생성한다고 보고 하였다.

이처럼 세균성 질증의 만성적 감염이나 잦은 재발로 인해 보완대체요법으로 치료하는 여성들이 많으며, 대표적으로 썩을 이용한 훈증, 유산용액을 이용한 좌욕, 요구르트 요법, 티트리오일 요법 등이 있으나 어느 것도 확실한 치료법이 되지 못하고 있다.

세균성 질증 치료의 새로운 대안으로 lactic acid 생성 세균들을 probiotics로 사

용하고자 하는 연구들이 시도되고 있다(17-20). 그러나 probiotics를 단독으로 질 내에 투여했을 때 세균성 질증의 치료 효과가 뚜렷하지 않았다(21).

이에 본 연구는 세균성 질증의 주요 표적 세균인 *G. vaginalis*와 한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 동정된 probiotics인 *Steroidobacter denitrificans* YH1과 *Lactobacillus crispatus* YH2 균주를 이용하여 *G. vaginalis* 표준균주 및 야생균주들의 biotype을 결정하고 *G. vaginalis* biotype과 용혈능력, 항생제 감수성 및 probiotics 효과와의 관계를 규명함으로써, 세균성 질증의 치료와 정상적인 질 생태계의 회복을 위해 antibiotics와 probiotics의 병용에 대한 실험적 근거를 찾고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### A. 실험에 사용한 표준균주들

본 실험에 사용된 표준균주들은 다음과 같다.

*Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285),  
*Mobiluncus mulieris* (ATCC 35239), *Peptococcus spp.* (NCCP 22454),  
*Peptostreptococcus asaccharolyticus* (KCTC 3321).

### B. 실험에 사용한 probiotics

한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 동정된 *Steroidobacter denitrificans* YH1과  
*Lactobacillus crispatus* YH2를 조선대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양받아  
실험에 사용하였다.

### C. *G. vaginalis* 배양을 위한 사람 적혈구 용해액의 제조

농축 적혈구 혈액에 생리식염수를 첨가하여 냉장 원심 분리기(Vision Scientific Co., VS-21SR, Seoul, Korea)에서 3,500 rpm으로 3번 원심 세척한 후, 상청액을 제거하고 남은 적혈구에서 fibrin 성분을 wooden applicator로 휘저어 제거하고 증류수를 부가하여 사람의 전혈 용량으로 환원하였다. 이 적혈구 용액을 플라스틱 용기에 넣어 -80°C 냉동고에서 30분간 동결 후 즉시 해동하는 과정을 3회 반복하고, 용혈된 적혈구액에 같은 양의 증류수를 넣어 희석한 다음 상기 냉장 원심 분리기에서 12,000 rpm으로 30분간 원심한 후, 상청액을 수합해서 0.45  $\mu$ m Millipore syringe filter기로 여과 멸균하여 냉장 보관하면서 필요시 Columbia 배지에 10%되게 첨가하여 사용하였다. 장기간 보관할 경우에는 -80°C 냉동고에 보관하였다가 필요시 해동하여 사용하였다(22).

## D. 세균성 질증의 진단

특별한 통증이 없이 악취가 나는 질 분비물을 주소로 산부인과를 내원한 환자들에서 면봉으로 취한 질 분비물을 생리식염수 1 ml에 부유시켜 균질성을 확인하였다. 자동 피펫으로 20  $\mu$ l를 취하여 슬라이드 글라스에 놓고 커버 글라스를 덮어 400x 현미경하에 효모나 질트리코모나스 원충이 없는 것을 확인한 샘플들에서 20  $\mu$ l씩을 취하여 슬라이드 글라스에 도말한 다음 헤어드라이기로 건조하였다. 건조된 슬라이드들을 슬라이드 거치대에 삽입하여 95% 에틸알코올 용액에서 20분간 고정 한 후 그람 염색을 시행하였다. 1,000x로 검경하여 그람 다양성 짧은 간균들이 가장자리가 구분되지 않을 정도로 붙어있는 질 상피세포를 clue cell로 확인하고 최종적으로 세균성 질증 환자의 샘플로 진단하였다(23).

## E. *G. vaginalis* 집락의 순수 분리 배양

세균성 질증 환자의 것으로 진단된 샘플의 생리식염수 부유액 20  $\mu$ l를 자동 피펫으로 취하여 사람 농축 적혈구액을 10%되게 첨가한 Columbia agar (MERCK)에 접종하고 선상 도말한 후, 5~10% 이산화탄소와 더불어 무산소 상태를 조성하는 일회용 무산소 배양 세트(Quick anaero-system, Sindo Co., Gwangju, Korea)(24)에 안치한 다음 일반 배양기에 넣어서 48~72시간 배양하였다. 배양된 집락들 중에서  $\beta$ -용혈을 보이고, 크기가 0.5~0.7 mm정도인 열은 흰색 집락을 취하여 새로운 Columbia blood agar에 순수 배양하였다.

## F. *G. vaginalis*의 동정

순수 배양된 집락들을 그람 염색하여 그람 다양성 및 다형태를 보이는 짧은 간균을 확인하고 catalase test 음성, oxidase test 음성 및 metronidazole disc (5  $\mu$ g)에 내성을 보이는 균주들을 최종적으로 *G. vaginalis*로 동정하였다. 최종 동정된 야

생주들에 대하여 14-1부터 14-37까지 균주 번호를 부여하였다.

## *G. G. vaginalis*의 biotype 결정

### 1. $\beta$ -galactosidase test (ONPG)

Benito 등(25)의 방법을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 1M sodium phosphate monobasic monohydrate (SIGMA-ALDRICH) 39 ml와 1M sodium phosphate dibasic anhydrous (SIGMA-ALDRICH) 61 ml를 혼합하여 1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 만들고, 여기에서 25 ml를 취하여 D.W 75 ml와 혼합해 최종 농도 0.25M 용액을 만들었다. 0.25M sodium phosphate buffer 50 ml에 2-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (SIGMA) 200 mg을 용해하여 0.4% 용액을 만든 다음 멸균된 작은 시험관에 0.5 ml씩 분주하고, 여기에 직경 2 mm 루프로 평판에 배양된 33개의 *G. vaginalis* 균주들을 각각 1 루프씩 취하여 부유 혼합하였다. 부유된 시험관들을 37°C 수조에서 4시간 혹은 18시간까지 두었다가 노란색으로 변하면 양성으로 판독하였다.

### 2. Hippurate 가수분해 검사

황 등(26)의 방법을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. Sodium hippurate (SIGMA) 1% 수용액을 만들어(-20°C에 냉동 보관하였다가 필요시 해동하여 사용) 여과 멸균한 후 멸균된 작은 시험관들에 0.4 ml씩 분주하였다. *G. vaginalis* 33개 균주들을 크게 한 루프씩 취하여 시험관들에 부유하고 이를 37°C 일반배양기에서 2시간 방치한 다음, Acetone (Junsei, Japan)과 1-butanol (Junsei, Japan) 1:1 혼합액 100 ml에 ninhydrin (SIGMA) 3.5 g을 용해한 3.5% ninhydrin용액 200  $\mu$ l씩을 추가하였다. 다시 37°C 배양기에 시험관들을 10분간 방치하였다가 짙은 보라색으로 변하면 양성으로 판독하였다.



### 3. Lipase egg-yolk plate test

Piot 등(27)의 방법을 사용하였으며, Lipase test 배지의 조성은 다음과 같다. Proteose peptone N0. 3 (DIFCO) 40 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (SIGMA-ALDRICH) 5 g, NaCl 2 g, Dextrose 2 g, 5% MgSO<sub>4</sub> 0.2 ml, Bacto-agar (DIFCO) 25 g을 D.W 850 ml 에 혼합 용해하여 121°C, 15 Lb에서 15분간 멸균하고 50°C로 식힌 후, 무균 상태의 egg-yolk emulsion (MERCK) 100 ml와 여과 멸균된 마혈청 (GIBCO, heat-inactivated) 50 ml를 첨가 혼합하여 90 mm 평판에 분주하였다. *G. vaginalis* 33균주들을 각 1개의 lipase test 평판에 선상 도말하여 일회용 무산소 배양 세트에 10개씩 안치한 다음 일반 배양기에 넣어 7일간 배양한 후, 평판을 비스듬히 빛에 비추어 집락 주위에 진주 빛의 반투명대가 관찰되면 양성으로 판독하였다. 이때 *Staphylococcus aureus*를 양성 대조로 함께 사용하였다.

### 4. Lipase spot test

Briselden 등(28)의 방법을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 먼저 Whatman™ No. 2 filter paper (GE healthcare Co. UK) strip (60 x 6mm)의 한 쪽 끝에 연필로 균주 번호를 적어 플라스틱 평판에 5개씩 놓고, D.W에 용해한 110 µmol/ml의 4-methyl-umbelliferyl oleate (SIGMA) 40 µl를 strip 중앙에 투하하였다. 상기 1.의 1M sodium phosphate buffer를 8배 희석한 10 ml (125 mmol)에 CaCl<sub>2</sub> (SIGMA) 11 mg (12 mmol)과 N-octyl-β-D-glucopyranoside (SIGMA) 58.4 mg (22 mmol)을 용해한 용액 40 µl를 strip 중앙에 증첩 투하하였다. 이어서 평판에서 성장한 *G. vaginalis* 야생주들을 2 mm loop로 충분히 취하여 strip 중앙에 혼합하고 strip이 들어있는 평판들을 37°C에서 15분간 방치하였다. 그 후 평판들을 암실로 옮겨 365 nm UV lamp (VL-4.L, France)로 자외선을 쬐어 균을 접종한 부위가 푸른색 형광을 나타내면 lipase 양성으로 판독하였다. 이때 *Staphylococcus aureus*를 양성 대조로 함께 사용하였다.

## H. Augmentin, clindamycin, metronidazole disc 감수성 검사

세균성 질증 치료에 빈번하게 사용되어 온 3가지 항균제들에 대한 감수성 검사를 시행 하였다. 멸균한 Columbia broth (MERCK, Germany)에 사람 적혈구 용해액을 10%되게 첨가한 액체 배지에 *G. vaginalis* 33균주를 각각 접종하고 37°C에서 48시간 무산소 배양을 한 후, 배양액을 희석하지 않고 사람 적혈구 용해액을 10% 되게 첨가한 Columbia agar에 면봉으로 도포 접종하였다. 이어서 각 균주 당 Augmentin (amoxicillin/clavulanic acid, 30  $\mu$ g, OXOID, UK), clindamycin (10  $\mu$ g, OXOID), metronidazole (50  $\mu$ g, OXOID) disc 1개씩을 평판의 중앙에 놓고 핀셋으로 가볍게 눌러 일회용 무산소 배양 세트에 10개씩 안치한 다음 일반 배양기에서 48시간 배양한 후 표준자로 억제대의 직경을 측정하였다.

건강한 여성에서 분리한 probiotics인 *Steroidobacter denitrificans* YH1과 *Lactobacillus crispatus* YH2 균주에 대해서도 disc 감수성 검사를 시행 하였다. Man-Rogosa-Sharpe (MERCK) (MRS) broth에서 48시간 배양한 두 가지 균액을 생리식염수로 1,000x 희석한 후, 면봉으로 MRS agar에 도포 접종하여 각 평판의 중앙에 상기 disc 한 개씩을 놓고 마찬가지로 48시간 무산소 배양을 한 다음 억제대의 크기를 측정하였다.

세균성 질증 환자들에서 흔히 분리되는 절대 무산소 세균들인 *Bacteroides fragilis*, *Mobiluncus mulieris*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* 표준균주들에 대해서도 disc 감수성 검사를 시행 하였다. metronidazole disc는 50  $\mu$ g disc 대신 5  $\mu$ g disc (OXOID, UK)를 사용하였다. Wilkins-Chalgren anaerobe broth (OXOID, UK)에서 48시간 무산소 배양한 균액들을 생리식염수로 1,000x 희석하여 Wilkins-Chalgren agar (DIFCO, USA)에 면봉으로 도포하고 중앙에 disc 한 개씩을 놓아 동일하게 48시간 무산소 배양을 한 후 억제대의 크기를 측정하였다.

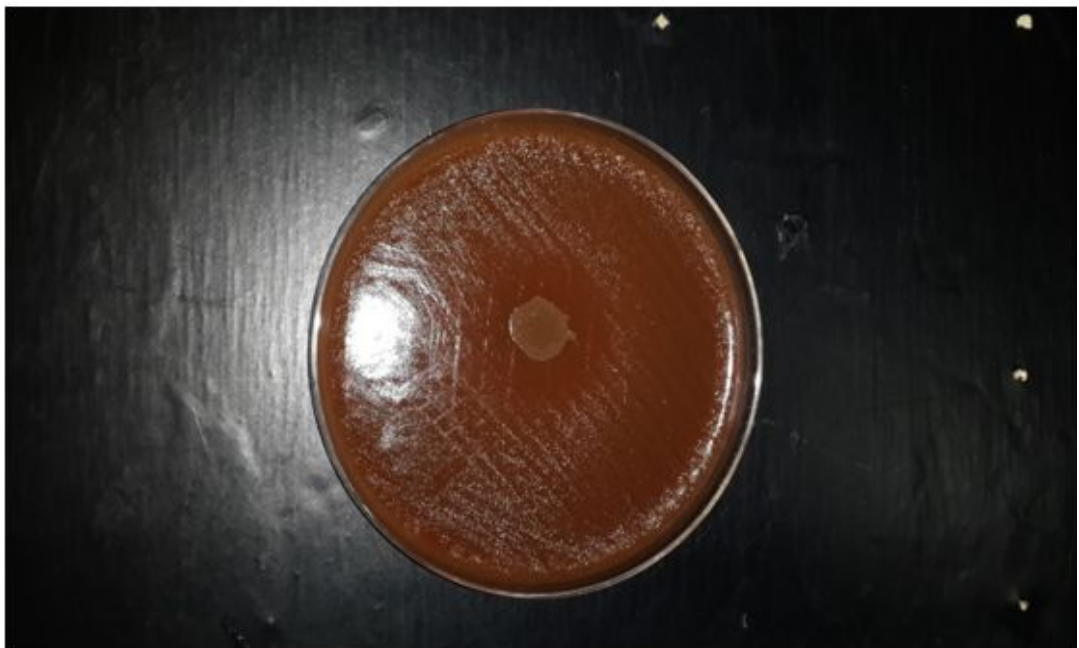
Figure 1. Growth inhibition zone of *G. vaginalis* by antibiotic disc diffusion test



## I. *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2에 의한 *G. vaginalis* 야생주들의 성장 억제 검사

세균성 질증 환자에서 분리한 *G. vaginalis* 33개 야생균주들에 대하여 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 성장 억제 검사를 시행하였다. Columbia agar와 MRS agar를 동량으로 혼합하고 여기에 사람 적혈구 용해액을 10%되게 첨가한 배지를 CMB agar (pH 6.3)로 약칭하였다. 사람 적혈구 용해액 10%를 첨가한 Columbia broth에서 5~10% 이산화탄소와 함께 48시간 무산소 배양한 *G. vaginalis* 야생균주들을 생리식염수로 10x 희석하고, 동시에 MRS broth에서 24시간 배양한 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2를 생리식염수로 10x 희석하여 균액을 만들었다. 희석한 *G. vaginalis* 야생주들의 균액을 면봉으로 취하여 균주 당 2개의 CMB agar에 도포 접종하고, 각 평판의 중앙에 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2 균액 5  $\mu$ l씩을 투하 접종하여 5~10% 이산화탄소와 함께 72시간 무산소 배양한 후 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2 주변 억제대의 직경 (mm)을 측정하고 평균값을 산출하였다.

Figure 2. Growth inhibition zones of *G. vaginalis* by *S. denitrificans* YH1(above) and *L. crispatus* YH2(below)



### III. 결 과

#### A. *G. vaginalis* 야생주들에 대한 lipase egg-yolk plate test와 lipase spot test

Briselden 등(28)의 4-methyl-umbelliferyl oleate을 사용한 lipase spot test와 Piot 등(27)의 egg-yolk을 사용한 lipase plate test의 결과는 표 1과 같이 *G. vaginalis* 33개 야생균주 중 20개 균주에서 서로 상반된 결과를 보였다. 전통적으로 사용된 Piot 등(27)의 egg-yolk법 biotype 분류에 따르면 biotype 1, 2, 3, 4는 lipase 양성, 5, 6, 7, 8은 lipase 음성이었다. 이에 본 연구에서는 *G. vaginalis* biotype을 분류하는 한 가지 항목인 lipase 검사법으로 Briselden 등(28)의 lipase spot test와 Piot 등(27)의 lipase egg-yolk plate test를 동시에 시행하여 그 결과를 비교한 후, 논란이 많은 Briselden법의 결과를 버리고 Piot 등의 방법으로 biotype을 결정하였다(Table 1).

Table 1. Differences between lipase tests by Briselden etc. and Piot etc.

<i>GV</i> strain No.	lipase spot test by	lipase egg-yolk plate test	<b><i>GV</i> Biotype No.</b>
	Briselden etc.	by Piot etc.	
14-1	+	+	<b>1</b>
14-2	-	-	<b>5</b>
14-3	+	+	<b>4</b>
14-4	+	-	<b>6</b>
14-5	+	+	<b>4</b>
14-6	-	+	<b>1</b>
14-7	+	-	<b>5</b>
14-8	+	+	<b>3</b>
14-9	+	+	<b>2</b>
14-10	-	+	<b>3</b>
14-11	+	+	<b>2</b>
14-12	+	-	<b>5</b>
14-13	+	-	<b>5</b>
14-14	-	+	<b>4</b>
14-15	+	-	<b>5</b>
14-16	+	-	<b>8</b>
14-17	+	-	<b>5</b>
14-19	+	-	<b>5</b>
14-20	-	-	<b>7</b>
14-21	-	-	<b>8</b>
14-23	-	-	<b>8</b>
14-24	-	-	<b>8</b>
14-25	+	-	<b>5</b>
14-26	+	-	<b>5</b>
14-27	+	+	<b>4</b>
14-28	+	-	<b>5</b>
14-29	+	-	<b>5</b>
14-30	+	-	<b>5</b>
14-32	+	-	<b>5</b>
14-33	+	-	<b>7</b>
14-34	+	-	<b>5</b>
14-36	+	-	<b>5</b>
14-37	+	+	<b>1</b>
14018*	+	+	<b>4</b>

\*ATCC 14018

## B. *G. vaginalis* 야생주들의 biotype 분포

*G. vaginalis* 표준균주 (ATCC 14018)를 포함한 34균주의 biotype 결과는 다음과 같다(Table 2).

Table 2. Distribution of *G. vaginalis* biotype

Biotype No.	GV Biotype No. and features							
	1	2	3	4	5	6	7	8
β-galactosidase	+	-	-	+	-	+	-	+
Lipase activity	+	+	+	+	-	-	-	-
Hippurate hydrolysis	+	+	-	-	+	+	-	-
Biotype distribution (total 34 strains)	3	2	2	5(1)*	15	1	2	4

\*No. of parenthesis is the standard strain(ATCC 14018)

## C. *G. vaginalis* biotype과 β-hemolysis의 상관관계

사람 적혈구에 대한 *G. vaginalis*의 완전용혈 정도와 biotype과는 밀접한 관계가 있었다. 3+의 완전용혈을 보인 biotype은 1, 2, 5, 6이었으며(biotype 5는 15균주 중에서 1균주만 1+ 용혈을 보임), biotype 4, 8은 모두 1+의 용혈을 보였다. biotype 3, 7은 3+와 1+를 반반씩 나타냈다(Table 3).

Table 3. Relationship between *G. vaginalis* biotype and degree of β-hemolysis

Degree of β-hemolysis	GV Biotype(Counts of strain)							
	1(3)	2(2)	3(2)	4(4)	5(15)	6(1)	7(2)	8(4)
+	0	0	1	4	1	0	1	4
+++	3	2	1	0	14	1	1	0



## D. *G. vaginalis* 33균주에 대한 항균제 원판 확산법

*G. vaginalis* 야생균주에 대한 항균제 감수성 결과는 다음과 같다.

Metronidazole (50  $\mu$ g/disc)은 *G. vaginalis* 21개 야생균주 (64%)에 대하여 전혀 억제 효과를 나타내지 않았으며, 나머지 12균주들에서 20~40mm의 억제대를 보였다 (Table 4). Biotype 5는 15균주 중 14균주(93%)가 완전 내성을 보였고 biotype 2, 3, 7도 모두 완전 내성을 보인 반면, biotype 1, 4, 6, 8은 12균주 중 1균주를 제외한 11균주에서 20~40mm의 억제대를 보임으로써 metronidazole 내성과 biotype이 밀접한 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Table 5).

한편 clindamycin은 평균 55.5 $\pm$ 5.5 mm의 억제대를 나타냈고 augmentin 역시 44.9 $\pm$ 9.5 mm의 비교적 넓은 억제대를 보였으며, clindamycin, augmentin 모두 내성을 보이는 균주는 한 균주도 없었다(Table 4).

Table 4. Antibiotic disc diffusion test to 33 wild strains of *G. vaginalis*

<i>GV</i> strain	Antibiotics Inhibition zone diameter (mm)			<i>GV</i>
	No.	Augmentin	Metronidazole	
14-1	60	27	50	<b>1</b>
14-2	33	0	60	<b>5</b>
14-3	40	40	55	<b>4</b>
14-4	45	35	50	<b>6</b>
14-5	40	35	45	<b>4</b>
14-6	60	32	45	<b>1</b>
14-7	40	0	60	<b>5</b>
14-8	50	0	50	<b>3</b>
14-9	35	0	50	<b>2</b>
14-10	35	0	55	<b>3</b>
14-11	60	0	60	<b>2</b>
14-12	35	0	50	<b>5</b>
14-13	30	0	55	<b>5</b>
14-14	40	35	50	<b>4</b>
14-15	45	0	60	<b>5</b>
14-16	45	25	60	<b>8</b>
14-17	35	0	55	<b>5</b>
14-19	40	0	55	<b>5</b>
14-20	60	0	50	<b>7</b>
14-21	50	30	50	<b>8</b>
14-23	35	33	55	<b>8</b>
14-24	50	20	50	<b>8</b>
14-25	60	25	55	<b>5</b>
14-26	50	0	65	<b>5</b>
14-27	50	0	55	<b>4</b>
14-28	30	0	60	<b>5</b>
14-29	40	0	65	<b>5</b>
14-30	55	0	65	<b>5</b>
14-32	50	0	60	<b>5</b>
14-33	45	0	55	<b>7</b>
14-34	40	0	60	<b>5</b>
14-36	40	0	60	<b>5</b>
14-37	60	20	60	<b>1</b>
14018*	60	0	55	<b>4</b>
Average	44.9±9.5		55.5±5.5	

\*ATCC 14018

Table 5. Correlation between *G. vaginalis* biotype and metronidazole resistance

<b>GV Biotype</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Counts of strain	3	2	2	4	15	1	2	4
Strain counts of IZS* of 0 mm	0	2	2	1	14	0	2	0

\*Inhibition zone size

## E. Probiotics와 절대 무산소 세균들의 항균제 감수성

*S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2 및 세균성 질증에서 흔히 분리되는 절대 무산소성 세균들에 대한 항균제 감수성 결과는 다음과 같다(Table 6).

Table 6. Growth inhibition zone diameters of probiotics and obligate anaerobic bacteria by antibiotic disc diffusion method

<b>Bacteria</b>	<b>Augmentin (mm)*</b>	<b>Metronidazole** (mm)</b>	<b>Clindamycin (mm)</b>
<i>S. denitrificans</i> YH1	40	0	35
<i>L. crispatus</i> YH2	40	0	45
<i>B. fragilis</i>	86	86	86
<i>M. mulieris</i>	86	0	79
<i>Peptococcus spp.</i>	67	58	41
<i>P. asaccharolyticus</i>	68	68	74

\*Abbreviation of inhibition zone diameter (mm)

\*\*5 µg disc

## F. *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2에 의한 *G. vaginalis* 야생주들의 성장 억제 효과

CMB agar에서 충분히 성장한 *G. vaginalis* 야생주 각 15균주씩을 무작위로 선

택하여 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 성장 억제 효과를 측정 한 결과 억제대의 평균 직경이 전자는 27.4±9.7 mm, 후자는 23.9±9.0 mm였으며, 동일한 biotype에 대하여 다양한 억제대를 보임으로써 biotype과 probiotics의 성장 억제 효과는 서로 상관관계가 없었다(Table 7).

Table 7. Growth inhibition zone diameters of *G. vaginalis* wild strains by *S. denitrificans* YH1 and *L. crispatus* YH2

<i>GV</i> strain No.	<i>GV</i> biotype	Inhibition zone by <i>SD</i> YH1 (mm)	<i>GV</i> strain No.	<i>GV</i> biotype	Inhibition zone by <i>LC</i> YH2 (mm)
14-2	5	40	14-12	5	18
14-7	5	46	14-13	5	13
14-9	2	27	14-15	5	22
14-12	5	20	14-17	5	12
14-13	5	13	14-19	5	27
14-14	4	23	14-20	7	26
14-15	5	25	14-25	5	42
14-17	5	16	14-26	5	25
14-19	5	31	14-28	5	14
14-20	7	34	14-29	5	12
14-25	5	36	14-30	5	32
14-28	5	20	14-32	5	31
14-29	5	18	14-33	7	21
14-36	5	38	14-36	5	30
14-37	1	24	14-37	1	33
Average		27.4±9.7			23.9±9.0

## IV. 고 찰

여성의 질 내에는 정상 세균군인 유산 생성 세균들(lactic acid bacteria)이 있어 질 내 산도를 4.5 이하로 유지하여 병원성 세균의 성장을 억제하고 건강한 질 환경을 유지하는 역할을 하고 있다.

세균성 질증은 유산 생성 세균들이 *Gardnerella vaginalis*, 절대 무산소 세균 (*Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp.* etc.) 및 *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* 등으로 교체되면서 발생하며(2, 3, 11, 12), 그 중 *Gardnerella vaginalis*는 세균성 질증 환자의 질 내 생태계에서 가장 우위를 점하는 세균이다(29).

본 연구에서는 세균성 질증 치료의 주요 표적 세균인 *G. vaginalis*의 생물형을 분류하는 한 가지 항목인 lipase 검사법으로 Briselden 등(28)의 lipase spot test와 Piot 등(27)의 lipase egg-yolk plate test를 함께 사용하였으며, 그 결과 생물형이 매우 상이하게 분류되었다. Moncla 등(30)은 Briselden 등(28)의 lipase spot test가 부정확한 검사이며, 재현성이 크게 떨어짐을 지적한 바 있다.

본 연구결과에서도 *G. vaginalis* 생물형 1~4는 lipase 양성이어야 함에도 11균주 중 3균주가 음성으로 판독되었고, 전체적으로 20균주가 상반된 결과를 보였다 (Table 1). 따라서 8개의 생물형으로 분류할 경우에는 Piot 등(27)의 lipase egg-yolk plate test를 사용해야 정확성을 기할 수 있다. 이러한 견해는 생물형 5인 15균주 중 14균주가 3+의  $\beta$ -용혈을 보이고(Table 3), 생물형 5인 15균주 중 14균주와 생물형 2, 3, 7의 6균주 모두가 metronidazole에 완전 내성을 보이며, 생물형 1, 6, 8의 8균주 모두가 감수성을 보인 결과(Table 5)들이 뒷받침하고 있다.

현재 세균성 질증은 항생제 치료가 주를 이루고 있으며, 민간에서 사용하는 각종 보완대체요법이 있으나 어느 것도 확실한 치료법이 되지 못하고 있다(31). 그 대안으로 probiotics를 이용하여 세균성 질증을 치료하려는 연구들이 이루어져 왔다.

Skarin 등(32)은 in vitro에서 9종의 유산균들이 *Mobiluncus*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides*에 대해 성장 억제 효과가 있음을 확인하였고, Sethi 등(33)은 과산화수소를 생산하는 유산균들이 *G. vaginalis*의 성장억제에 더 효과가 있다고 보고하였다.

Atassi 등(12)은 건강한 여성에서 분리한 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus*의 배양 상청액을 *G. vaginalis*와 *Prevotella bivia*의 배양액에 첨가할 경우 각각 정도는 다르지만 두 균의 생존율을 크게 떨어뜨릴 수 있음을 확인 하였으며, 그 기작은 낮은 pH, lactic acid에 기인하는 것이 아니라 상청액 내의 과산화수소와 단백분해효소에 내성을 갖는 미지의 화합물에 기인하는 것이라고 하여 Skarin 등(32) 및 Sethi 등(33)과 다른 견해를 제시하였다.

Anukam 등(34)은 5일간 각 20명의 환자군에서 *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 과 *Lactobacillus reuteri* RC-14 건조분말을 담은 캡슐을 질 내 삽입한 군과 metronidazole gel을 투여한 군을 비교하여 전자는 18명, 후자는 11명이 치료되어 상기 두 균이 probiotics로서 우수한 균주라고 보고하였다.

Saunders 등(35)은 in vitro 실험에서 과산화수소를 생산하지 않는 *Lactobacillus reuteri* RC-14와 적게 생산하는 *Lactobacillus rhamnosus* GR-1이 과산화수소를 많이 생산하는 *Lactobacillus crispatus* 보다 *G. vaginalis* biofilm 감소 효과가 더 크며, 이는 과산화수소나 pH가 질 내의 *G. vaginalis*를 *Lactobacillus*로 대체하는데 있어 일차적 요인이 아닌 다른 더 중요한 요인들에 의한다고 보고하여 Atassi 등(12)의 견해를 지지하였다.

Antonio 등(17)도 과산화수소를 생산하는 *L. crispatus*, *L. jensenii*와 *L. gasseri* 중에서 세균성 질증을 치료할 수 있는 균은 *L. crispatus*이며, 과산화수소 생산 능력과는 무관한 다른 요인들에 의한 것이라고 보고하였다.

Ling 등(36)은 세균성 질증 환자들에서 사람의 장에서 분리한 *L. delbrueckii subsp. lactis* DM8909 (*L. crispatus* DM8909)을 10일 동안 질 내에 투여한 군과 metronidazole 질좌제를 7일간 삽입한 군 중 30일 후 치료율이 전자가 96%(재발률 0%), 후자가 70%(재발률 20%)였다고 보고하였다.

신 등(31)은 건강한 여성에서 분리한 *S. denitrificans* YH1 균주와 *L. crispatus* YH2 균주가 *G. vaginalis*, *B. fragilis*, *M. mulieris*, *P. asaccharolyticus* 등과 같은 세균성 질증 유발 균들에 대하여 상당한 성장 억제 능력이 있음을 보고하였다.

상기의 여러 문헌들(12, 17, 31-36)은 유산균 계열의 생균들 혹은 그 배양 상청액이 *G. vaginalis*의 성장을 억제하고 세균성 질증을 치료하며 질 내 정상 세균군을

회복시킬 수 있는 probiotics 효과가 있음을 입증하고 있다. 그러나 probiotics 단독으로 *G. vaginalis*를 질 내에서 근절시킨 연구 결과는 아직 보고되지 않았다.

*G. vaginalis*는 세균성 질증에서 그 수가 크게 증가하며 질 내 pH를 상승시키고, 절대 무산소 세균들의 질 상피세포 부착을 도와 질 내 생태계에서 우위를 점하는데 결정적 기여를 한다(13, 14). 따라서 *G. vaginalis*와 절대 무산소성 세균들을 억제하기 위해 항생제를 사용한 후 probiotics를 투여하는 보존적 요법을 병행한다면 세균성 질증의 치료 효과를 높일 수 있을 것이다(31).

본 연구에서는 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 probiotics 효과에 대한 신 등(31)의 결과가 *G. vaginalis* 표준균주 1주에 대한 결과일 뿐이어서, 다른 *G. vaginalis* 야생주들에 대해서도 동일한 probiotics 효과가 있는지를 확인하기 위해 세균성 질증으로 진단된 환자에서 분리한 33균주들 중 무작위로 15균주씩을 선택하여 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 probiotics 효과를 실험하였다. 그 결과 전자는 평균  $27.4 \pm 9.7$  mm, 후자는  $23.9 \pm 9.0$  mm의 성장 억제대를 보임으로써 (Table 7), 세균성 질증의 치료에서 항생제와 병용할 수 있는 보다 확실한 실험적 근거를 갖게 되었다.

지금까지는 세균성 질증 항생제 치료의 일환으로 *G. vaginalis*를 제거하기 위해 augmentin(amoxycillin/clavulanic acid), metronidazole, clindamycin 등 무산소성 세균에 사용하는 항생제들에 의존하여 왔다(22, 37-40).

Symond 등(37)은 augmentin이 *G. vaginalis*와 무산소 세균들을 효과적으로 억제하지만, 유산균을 덜 억제하는 metronidazole을 사용하는 것이 좋다는 견해를 피력하였다.

Kharsany 등(38)은 *G. vaginalis*에 대한 metronidazole의 MIC90이  $16 \mu\text{g/ml}$ 인데, metronidazole의 hydroxymetabolites는  $4 \mu\text{g/ml}$ 이므로 더 효과적이라고 사용을 권유하였다.

Yang 등(22)은 metronidazole의 MIC90이  $80 \mu\text{g/ml}$ 로 내성이 높기 때문에 MIC90이  $0.15 \mu\text{g/ml}$ 인 clindamycin이나  $0.6 \mu\text{g/ml}$ 인 ciprofloxacin의 병합사용을 검토할 필요가 있다고 하였다.

Nagaraja 등(39)은 재발성 세균성 질증 환자에서 분리한 50균주의 *G. vaginalis*의 68%가 metronidazole에 내성을 보이고, 76%는 clindamycin에 감수성이 있다고

보고하였다.

한편 Tomusiak 등(40)이 67균주 중 46주 (68.7%)가 metronidazole에 내성을 보인 반면, 모든 균주가 augmentin과 clindamycin에 감수성을 보였다고 보고한 결과는 *G. vaginalis*의 64%가 metronidazole에 0 mm의 억제대를 보였고, augmentin과 clindamycin에 각각 평균 44.9±9.5 mm, 55.5±5.5 mm의 억제대를 보인 본 연구의 결과(table 4)와 아주 흡사하였다.

현재 세균성 질증의 주요 원인균인 *G. vaginalis*에 대해 probiotics를 이용하여 억제할 수 있다는 보고들(12, 17, 32-35, 41)과 새로운 항균물질을 이용하여 억제할 수 있다는 보고들은 있으나(42-45), 세균성 질증 환자에게 항생물질을 전 처치로 투여한 후 probiotics를 투여하여 질 내 생태계에서 *G. vaginalis*를 근절하려는 보고는 없다. Turovskiy 등(43)이 유일하게 *Lactobacillus rhamnosus*에서 분리한 lactocin 160, 항균물질인 zinc lactate와 sapindin (soapnut extract)을 투여하여 질 내 유익 세균에 영향을 주지 않고 *G. vaginalis* 및 *Prevotella bivia*를 상승적으로 억제할 수 있다고 보고하였다.

현재 임상에서 세균성 질증 치료제로 사용되고 있는 metronidazole의 단독 사용은 높은 빈도의 내성으로 인해(Table 4) *G. vaginalis*를 근절할 수 있는 수단이 아니므로 세균성 질증의 근본적인 치료제로는 충분하지 않다고 생각된다. 이는 metronidazole 사용 후 세균성 질증의 높은 재발률을 보고한 Sobel 등(46)과 Bradshaw 등(47)의 보고와도 일치한다. *G. vaginalis* 야생주들에 효과가 있는 clindamycin을 metronidazole 대신 단독으로 사용하는 것 역시 probiotics들에 대한 항균 효과가 크기 때문에(Table 6) 고려해야 한다.

따라서 본 연구에서와 같이 항생제인 Augmentin 투약 혹은 clindamycin 질정으로 세균성질증 환자들을 전 처치하여 *G. vaginalis*와 무산소성 세균들의 수를 감소시킨 후에 probiotics인 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2의 동결건조 생균 제제를 사용 직전 수화하여 환자의 질 내에 투여하는 보존적 요법을 병행한다면, probiotics의 질 내 생태계 정착이 가능하고 궁극적으로 세균성 질증의 치료효과도 높일 수 있을 것으로 사료된다.



## V. 결 론

세균성 질증의 주요 표적 세균인 *G. vaginalis*의 biotype과 용혈능력, 항생제 감수성 및 *Steroidobacter denitrificans* YH1과 *Lactobacillus crispatus* YH2 균주의 probiotics 효과에 대한 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *G. vaginalis* 생물형 분류 방법 중 Briselden 등(28)의 lipase spot test는 옳은 방법이 아닌 것으로 확인되었다. Piot 등(27)의 lipase egg-yolk plate test를 사용하여 *G. vaginalis* 33 야생균주에 대한 생물형을 결정하였으며, 주로 분리된 생물형은 biotype 5는 15 (45%), biotype 4는 4 (12%), biotype 8은 4 (12%)로, Piot 등의 기존 8종 생물형이 모두 분리되었다.

2. *G. vaginalis* biotype과  $\beta$ -hemolysis 정도 및 metronidazole 내성 정도는 상호 밀접한 관계를 나타낸 반면, *G. vaginalis* biotype과 probiotics의 억제효과는 서로 상관관계가 없었다.

3. *G. vaginalis* 33 야생균주 전체가 augmentin과 clindamycin에 감수성을 보였으나, metronidazole (50  $\mu$ g/disc)은 21균주 (64%)에서 완전 내성을 보였다.

4. *G. vaginalis* 야생주들에 대하여 *Steroidobacter denitrificans* YH1과 *Lactobacillus crispatus* YH2는 각각 평균 27.4 $\pm$ 9.7 mm, 23.9 $\pm$ 9.0 mm의 억제대를 보임으로써, *G. vaginalis*에 대한 probiotics로서 사용 가능한 균주들이므로 밝혀졌다.

5. Clindamycin은 *G. vaginalis* 야생주들에 대하여 평균 55.5 $\pm$ 5.5 mm의 억제대를 보였고, 무산소성 세균들인 *Bacteroides fragilis*, *Mobiluncus mulieris*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* 등의 표준균주에 대해서도 항균 효과가 크기 때문에 질 내 probiotics 투여 전 처치로서 가장 적합한 항생제로 생각된다.

6. 세균성 질증의 치료를 위해 Augmentin 투약 혹은 clindamycin 질정으로 전 처치를 시행하여 *G. vaginalis*와 무산소성 세균들의 수를 감소시킨 후에 probiotics인 *S. denitrificans* YH1과 *L. crispatus* YH2를 질 내에 투여하는 보존적 요법을 병행한다면, probiotics의 질 내 생태계 정착이 가능하고 궁극적으로 세균성 질증의 치료효과도 높일 수 있을 것이다.

7. 세균성 질증의 치료를 위해 항생제와 병용할 수 있는 여러 보완대체요법적 연구와 이의 임상 적용 가능성에 대한 추가적 연구가 필요하다.

## 참 고 문 헌

(1) Dawson, S. G., Harris, J. R. *Gardnerella vaginalis* and nonspecific vaginitis. Br J Hosp Med 1983;29:28-37.

(2) Joesoef, M. R., Schmid, G. Bacterial vaginosis. Clin Evid 2005;13:1968-1978.

(3) Sobel, J. D. Bacterial vaginosis: An ecological mystery. Annals of Internal medicine 1989;111:551-553.

(4) Hillier, S. L., Nugent, R. P., Eschenbach, D. A., Krohn, M. A., Gibbs, R. S. et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The vaginal infections and prematurity study group. N Engl J Med 1995;333:1737 - 1742.

(5) Watts, D. H., Eschenbach, D. A., Kenny, G. E. Early postpartum endometritis: the role of bacteria, genital *mycoplasmas* and *Chlamydia trachomatis*. Obstet Gynecol 1989;73:52 - 60.

(6) Mania-Pramanik. J., Kerkar, S. C., Salvi, V. S. Bacterial vaginosis: a cause of infertility? Int J STD AIDS 2009;20:778 - 781.

(7) Gravett, M. G., Hummel, D., Eschenbach, D. A., Holmes, K. K. Preterm labor associated with subclinical amniotic fluid infection and with bacterial vaginosis. Obstet Gynecol 1986;67:229-237.

(8) Kurki, T., Sivonen, A., Renkonen, O. V., Savia, E., Ylikorkala, O. Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome. Obstet Gynecol

1992;80:173-177.

(9) Soper, D. E. Gynecologic sequelae of bacterial vaginosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 1999;67 Suppl 1:S25-28.

(10) Hillier, S. L. Clindamycin treatment of bacterial vaginosis. *Rev Contemp Pharmacother.* 1992;3:263-268.

(11) Spiegel, C. A. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:85-502.

(12) Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F., Servin, A. L. *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in co-culture and cell culture. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 2006;48:424-432.

(13) Borchardt, K. A., Adly, B. S., Smith, R. F., Eapen, J., Beal, C. B. Importance of *Gardnerella vaginalis* as an aetiological agent in bacterial vaginosis. *Genitourin Med* 1989;65:285.

(14) Machado, A., Jefferson, K. K., Cerca, N. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *Int J Mol Sci* 2013;14:12004-12.

(15) Hillier, S. L., Lipinski, C., Briselden, A. M., Eschenbach, D. A., Efficacy of intravaginal 0.75% metronidazole gel for the treatment of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 1993;81(6):963-967.

(16) Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M., Holmes, K. K. Prevalence of hydrogen

peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 1989;27(2):251-256.

(17) Antonio, M., Petrina, M., Meyn, L., Hillier, S. *Lactobacillus crispatus* colonisation reduces risk of bacterial vaginosis (BV) acquisition. Sex Transm Infect 2011;87:A304-5.

(18) McLean, N. W., Rosenstein, I. J. Characterization and selection of a *Lactobacillus* species to recolonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. J Med Microbiol. 2000;49(6):543-552.

(19) Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U., Matteuzzi, D. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. J Appl Microbiol. 2002;93(5):884-893.

(20) Reid, G., Burton, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect. 2002;4(3):319-324.

(21) Zongxin, L., Xia, L., Weiguang, C. et al. Restoration of the Vaginal Microbiota after Treatment for Bacterial Vaginosis with Metronidazole or Probiotics. Microb Ecol 2013;65:773-780.

(22) Yang, N. W., Lim, Y., Sin, S. H. Drug-resistant profiles of clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* on Columbia agar base supplemented with human erythrocyte lysate and horse serum. Infect chemother 2003;35:86-90.

(23) Yang, N. W., Sin, S. H., Chang, J. S. Diagnosis of bacterial vaginosis with relation to isolation of *Gardnerella vaginalis*. J Bacteriol Virol

2002;32:109-114.

(24) Yang, N. W., Kim, J. M., Choi, G. J., Jang, S. J. Development and evaluation of the quick anaero-system: A new disposable anaerobic culture system. Korean J Lab Med 2010;30:133-137.

(25) Benito, R., Vazquez, J. A., Berron, S., Fenoll, A., Saez-Neito, J. A. A modified scheme for biotyping *Gardnerella vaginalis*. Journal of Medical Microbiology 1986;21:357-359.

(26) Hwang, M. N., Ederer, G. M. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B *streptococci*. J Clin Microbiol 1975;1:114-5.

(27) Piot, P., Van Dyck, E., Peeters, M., Hale, J., Totten, P. A. et al. Biotypes of *Gardnerella vaginalis* 1984;20:677-679.

(28) Briselden, A. M., Hillier, S. L. Longitudinal study of the biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol 1990;28:2761-2764.

(29) Menard, J. P., Mazouni, C., Salem-Cherif, I., Fenollar, F., Raoult, D. et al. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing pre-term labor. Obstet Gynecol 2010;115:134 - 140.

(30) Moncla, B. J., Pryke, K. M. Oleate lipase activity in *Gardnerella vaginalis* and reconsideration of existing biotype schemes. BMC Microbiology 2009;9:1-5.

(31) Sihm, W. J., Yang, N. W. The growth inhibition effect on the causative bacteria of bacterial vaginosis by bacterial strains isolated from the vagina of a

healthy woman. J Bacteriol Virol 2014;44:244-251.

(32) Skarin, A., Sylwan, J. Vaginal *lactobacilli* inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology 1986;94:399-403.

(33) Sethi, S., Das, A., Sharma, M. Inhibition of *Gardnerella vaginalis* by *lactobacilli*. International Journal of Gynecology & Obstetrics 2006;93:158-159.

(34) Anukam, K. C., Osazuwa, E., Osemene, G. I., Ehigiagbe, F., Bruce, A. W., Reid, G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. Microbes Infect 2006;8:2772-2776.

(35) Saunders, S., Bocking, A., Challis, J., Reid, G. Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 2007;55:138-142.

(36) Ling, Z., Liu, X., Chen, W., Luo, Y., Yuan, L. et al. The restoration of the vaginal microbiota after treatment for bacterial vaginosis with metronidazole or probiotics. Microb Ecol 2013;65:773-780.

(37) Symonds, J., Biswas, A. K. Amoxicillin, augmentin and metronidazole in bacterial vaginosis associated with *Gardnerella vaginalis*. Genitourinary medicine 1986;62:136.

(38) Kharsany, A. B., Hoosen, A. A., Van den Ende, J. Antimicrobial

susceptibilities of *Gardnerella vaginalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1993;37:2733–2735.

(39) Nagaraja, P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* in recurrent bacterial vaginosis. Indian Journal of Medical Microbiology 2008;26:155–157.

(40) Tomusiak, A., Magdalena, S., Bogumil, H. P. Antibiotic resistance of *Gardnerella vaginalis* isolated from cases of bacterial vaginosis. Ginekologia Polska 2011;82:900–904.

(41) Joo, H. M., Hyun, Y. J., Myoung, K. S., Ahn, Y. T., Lee, J. H. et al. *Lactobacillus johnsonii* HY7042 ameliorates *Gardnerella vaginalis*-induced vaginosis by killing *Gardnerella vaginalis* and inhibiting NF- $\kappa$ B activation. International Immunopharmacology 2011;11:1758–1765.

(42) Strandberg, K. L., Peterson, M. L., Lin, Y. C., Pack, M. C., Chase, D. J. et al. Glycerol mono-laurate inhibits *Candida* and *Gardnerella vaginalis* in vitro and in vivo but not *Lactobacillus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2010;54:597–601.

(43) Turovskiy, Y., Chikindas, M. L. Zinc lactate and sapindin act synergistically with lactocin 160 against *Gardnerella vaginalis*. Probiotics and antimicrobial proteins 2011;3:144–149.

(44) Lopes dos Santos Santiago, G., Grob, P., Verstraelen, H., Waser, F., Vanechoutte, M. Susceptibility testing of *Atopobium vaginae* for dequalinium chloride. BMC Res Notes 2012;5:151.

(45) Ha, Y. M., Choi, J. S., Lee, B. B., Moon, H. E., Cho, K. K. et al.



Inhibitory effects of seaweed extracts on the growth of the vaginal bacterium *Gardnerella vaginalis*. Journal of Environmental Biology 2014;35:537-542.

(46) Sobel, J. D., Ferris, D., Schwebke, J., Nyirjesy, P., Wiesenfeld, H. C. et al. Suppressive antibacterial therapy with 0.75% metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 2006;195:1283-1289.

(47) Bradshaw, C. S., Morton, A. N., Hocking, J., Garland, S. M., Morris, M. B. et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. J Infect Dis 2006;193:1478-1486.