

Multiplex PCR 분석을 통한 건강한 20대 여성의 질 내에 서식하는 *Lactobacillus* 속 유산균의 신속한 검출

오초롱 · 조홍범*

서경대학교 화학생명공학과

Rapid Detection of *Lactobacillus* Genus Inhabiting in Vagina of 20's Healthy Women Using Multiplex PCR

Cho-Rong Oh and Hong-Bum Cho*

Department of Chemical and Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Republic of Korea

(Received September 26, 2012 / Accepted October 12, 2012)

The purpose of this study is to simultaneously detect and identify specific genus of *Lactobacillus* distributed in vagina of healthy women in their twenties by using multiplex primer. Vaginal fluid samples were taken from 166 women who were healthy and did not have vaginosis symptoms caused by bacterial infection. Six species of lactic acid bacteria belong to *Lactobacillus* genus that are known to inhabit in healthy vagina were selected to make a species-specific multiplex primer. Multiplex primer I was specified to selectively detect *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* and multiplex primer II was specified to selectively detect *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. fermentum*. *L. crispatus* (77%) was most frequently detected, and *L. acidophilus* (57%) and *L. jensenii* (57%) were relatively higher than others. Although the proportion of *L. iners* (59%) was a little higher than those of *L. acidophilus* and *L. jensenii*, this should be further validated in healthy women's vagina to be sure since they often appear in women having bacterial vaginosis and/or during the antibiotic therapy. Conclusively, the multiplex PCR technique using the species-specific primer could a useful tool to predict variation of vaginal health condition and process of recovery from vaginal disease.

Keywords: *Lactobacillus* sp., bacterial vaginosis, multiplex PCR

유산균은 자연계에서 영양 요구성이 가장 큰 종속영양 그룹에 속하기 때문에 생화학적 물질순환 기능을 수행하는 미생물들과 공생이나 공영양이 불가능하지만, 다양한 영양물질을 생산하거나 대사하는 동·식물의 특정한 조직이나 기관에서 서식하기에 적합하다(Collins *et al.*, 1991). 또한 숙주가 생산하거나 대사하는 당을 발효하여 젖산, 아세트산, 알코올 등 숙주의 세포에 생리적인 영향을 주지 않는 대사산물을 생산하기 때문에 숙주의 면역학적 반응을 유발하지 않고 유기산에 의한 pH를 저하하는 기능이 있어 기타 오염균이나 동식물의 조직에서 고도 생장이 가능한 병원성 미생물의 생장을 억제할 수 있는 환경을 조성한다(Redondo-Lopez *et al.*, 1990). 따라서 건강한 사람의 구강, 장내부, 질 내부 등에는 유산균이 정상적으로 성장할 수 있는 환경적인 요인이 조성되어 있고 다양한 종의 유산균이 서식하고 있어 유산균의 종과 밀도를 측정하는 것만으로도 특정 조직과 기

관의 건강 상태를 판단할 수 있다.

최근의 연구, 임상적 사례분석, *in vitro* test, *in vivo* test 등을 통하여 새롭게 밝혀지거나 공인된 결과에 따르면 유산균은 동물의 특정 조직 기관의 상피세포에 부착하여 공생하면서 스스로 군집의 다양성을 유지하여 균총을 안정화하고, 유해미생물의 정착 억제에 따른 부패산물 생성을 감소하거나 질환을 예방한다(Barbés and Boris, 1999; Park *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2011). 또한 숙주의 방어기능을 갖는 세포를 생화학적으로 자극하여 면역 기능을 활성화하고 항암 및 콜레스테롤의 저하기능 등 숙주 동물에게 직, 간접적으로 유익한 세포 및 생화학 수준의 반응을 유지하는 것으로 보고되고 있다(Dahiya and Speck, 1968; Daeschel, 1989).

여성의 질은 자궁의 입구에 위치하고 있어 월경주기에 따른 영향을 직접적으로 받으며 요도와 항문과 가까운 곳에 위치하여 대장 미생물과 요도계 질환 미생물에 의한 오염 가능성이 매우 높으나(Cho, 2006; Ahn *et al.*, 2011) 다양한 종류의 유산균들이 우점 종으로 서식하여 생리적, 구조적 위험성으로부터 질의 건강을 지켜내고 있다.

*For correspondence. E-mail: hbcho@skuniv.ac.kr; Tel.: +82-2-940-7614; Fax: +82-2-940-7616

Table 1. List of bacterial strains used in this study.

Reference strains	Accession No.
<i>Escherichia coli</i> K-12 16S rRNA gene	JN628304.1
<i>Lactobacillus iners</i>	GU428492, AY283272, AY283264, EF120361
<i>Lactobacillus crispatus</i>	FR683088.1, NR041800.1, AF257097
<i>Lactobacillus fermentum</i>	GU372721.1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	NBRC 3863
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NBRC 13951
<i>Lactobacillus jensenii</i>	AF243153.1, AF243159.1, AF243143.1
<i>Lactobacillus gasseri</i>	GU454858.1, AY959098, JQ805637.1
<i>Lactobacillus casei</i>	NBRC 101979
<i>Lactobacillus salivarius</i>	HQ828143.1

여성의 질은 분비물에 함유된 또는 유산균이 생산하는 유기산에 의해 약한 산성조건이 유지되며 다당류인 글리코젠을 포함하는 분비물에 의해 서식 미생물을 위한 영양 조건을 충족하고 있다(Barb ers and Boris, 1999). 이러한 인체 생리조건에 의해 형성된 온도, 수분, 영양, 공간 등은 유산균의 성장을 위해 요구되는 최적의 서식환경을 조성하기 때문에 인체의 생리적인 건강상태가 양호할 때는 다양한 종의 유산균의 밀도가 증가하여 정상적인 유산균이 우점하는 질 내 환경을 형성한다. 젖산균이 글리코젠을 발효하여 생산하는 젖산은 질 내의 산도를 비 유산균이 생육하기 부적합한 4.5 이하로 낮아지게 하기 때문에 외부의 환경과 접촉에 의해 유입되는 세균에 의한 오염이나 감염의 기회가 낮아진다. 이렇게 낮아진 질의 산도는 다른 종류의 미생물들의 성장을 억제하여 건강한 질 내 환경을 유지할 수 있도록 한다. 그리고 이와 함께, 유산균은 organic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins, reuterin, diacetyl, acetaldehyde 등의 항균 물질을 생산함으로써 (Redondo-Lopez *et al.*, 1990) 면역학적 방어기전 이외에 생화학적으로 방어 작용을 강화함으로써 숙주의 건강상태를 유지하는 데 직접적인 도움을 준다. 이러한 유산균의 특징으로 인하여 인체의 구강, 대장 그리고 질 등에서 서식하는 유산균의 종 다양성과 양을 확인함으로써 해당 기관의 미생물학적 안정성을 확인하는 지표로 활용될 수 있을 것으로 보인다.

본 연구는 간편하고 새로운 multiplex PCR 방법을 적용하여 건강한 20대 여성들의 질 내부에 서식하는 유산균의 다양성과 분포를 분석하는 것이 목적이다. 이를 위하여 2004년 한국여성을 대상으로 진행된 임상실험 결과 한국여성의 질에서 주로 발견되었던 유산균 중 *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*가 우점균임을 참고하여(Park *et al.*, 2004) *Lactobacillus* 속에 속하는 6종의 유산균 종을 선정하고(Dickson *et al.*, 2005; Sul *et al.*, 2007; Zozaya *et al.*, 2010), 이를 다시 *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* 그룹과 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus fermentum* 그룹으로 구분하여 각 균종의 특이적인 염기서열을 기준으로 multiplex PCR system을 이용한 검출도구를 제작하였다. 본 연구에서 활용한 multiplex PCR system은 여러 종의 유산균을 동시에 검출할 수 있는 기술로서 기존의 단일 PCR 방법이나 PCR RFLP 방법과 비교하여 빠르고 효율적인 방법이며(Sung *et al.*, 2007) 여성 질 건강 및 질염의 진행 여부를 확인하는데 유용한 방법으로 판단된다.

재료 및 방법

시료 구성 및 DNA 추출

본 연구의 분석 대상 시료는 2011년 9월부터 12월까지 서경대학교에 재학중인 여학생들 중 통증, 화끈거림, 가려움증이나 질 분비물 등과 같은 질염 증상 없이 건강한 20대 여성들을 대상으로 하였다. Vaginal swab은 전용 brush와 sample transfer container를 사용하여 채취되고 운송되었다. Sample transfer container에는 세포를 파괴하고 핵산을 고정하는 cell lysis buffer를 포함하며 주요성분은 guanidine hydrochloride이다. 핵산의 추출은 진올사(Korea)에서 제조한 핵산 추출 시약을 사용하였으며 추출 방법은 제조사의 방법을 따랐고 추출된 핵산을 PCR template로 사용하였다.

Primer design

본 연구에서 활용된 multiplex PCR법은 여러 target sequence를 동시에 증폭하여, 분석 대상 sequence의 존재 여부를 확인하는 기법이다. 여러 종류의 primer들이 동시에 반응하는 multiplex PCR 반응의 특성상 각 primer들 사이에 교차 혹은 저해 반응이 없어야 한다. 본 연구의 대상 균종은 질 내 서식 유산균들 가운데 검출 빈도가 높은 종으로 알려진 *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. fermentum* 등을 분석 대상 균종으로 선택하였다. Primer의 design에 사용된 16S rRNA 유전자의 서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)으로부터 얻었으며(Table 1), 본 실험에서 사용된 primer의 sequence는 Table 2에 나타내었다.

Multiplex PCR

반응에 사용된 모든 물은 RNase-DNase free water (Sigma, USA)를 사용하였다. PCR 증폭은 Thermal Cycler XP (Bioer, China)를 이용하여 증폭하였으며 조건은 아래와 같다.

Template DNA 3 μ l, free water 9.7 μ l, deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Genenmed, Korea) 1 μ l (0.2 mM 각각 dATP, dCTP, dGTP과 0.6 mM dUTP), multiplex primer 1 μ l, uracil-DNA glycosylase (UDG) 0.2 U (Solgent, Korea), dye (60% sucrose, cresol red) 4 μ l, PCR buffer (Genenmed) 2 μ l, taq 중합효소(Genenmed) 1.5 U의 조성으로 수행되었다. PCR 증폭 반응은 초기 45°C에서 10분, 94°C 5분 후, 94°C 30초, 62°C 30

Table 2. PCR Primers

Target	Name	Sequence(5'→3')	Size (bp)
<i>L. iners</i>	Iners F	agtctgccttgaagatcggag	105
	Iners R	ttatcccgatctctgggca	
<i>L. crispatus</i>	Cris F	ggaactaacagatttacttcgtaatg	137
	Cris R	gcgatctgctttctatccg	
<i>L. gasseri</i>	Gasseri F	cttgcttagatgaattgggtcctt	190
	Gasseri R	ccatccaagagtgatagcagaacc	
<i>L. acidophilus</i>	Acido F	tgaaccaacagattcacttcgg	137
	Cris R	gcgatctgctttctatccg	
<i>L. jensenii</i>	Jensenii F	gagcgagcttgctatagaatt	190
	Jensenii R	cgtaaagctgctaaaggatgg	
<i>L. fermentum</i>	Fermen F	cgcattacaactttgtcgcgatg	337
	Fermen R	actttctggttaataaccgcaactg	

초, 72°C 30초로 구성된 40 cycles의 반응 후, 72°C에서 5분으로 구성되었다. PCR 증폭산물은 0.05 µg/ml의 EtBr을 포함한 2.5% agarose gel (FMC Bioproduct, USA)을 1X TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA)에서 100 mA, 200 V로 25분간 전기 영동하여 확인하였다.

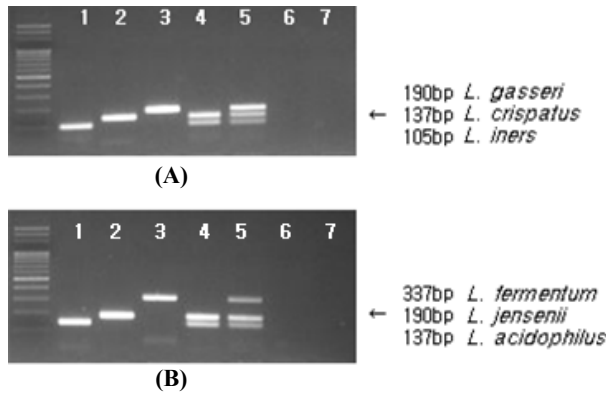


Fig. 1. Multiplex PCR product for *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. jensenii* and *L. fermentum*. (A) 1, *L. iners*; 2, *L. crispatus*; 3, *L. gasseri*; 4, mixture of *L. iners* and *L. crispatus*; 5, mixture of *L. iners*, *L. crispatus*, and *L. gasseri*; 6-7, negative control. (B) 1, *L. acidophilus*; 2, *L. jensenii*; 3, *L. fermentum*; 4, mixture of *L. acidophilus* and *L. jensenii*; 5, mixture of *L. acidophilus*, *L. jensenii*, and *L. fermentum*; 6-7, negative control.

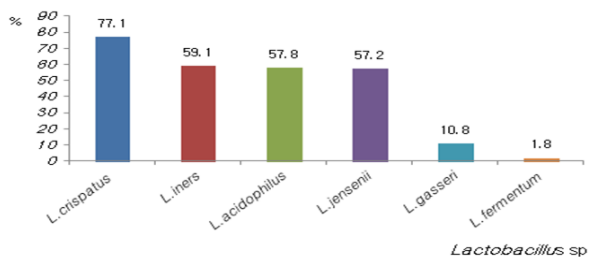


Fig. 2. Distribution of *Lactobacillus* spp. isolated from vagina of 20's Women.

결과

PCR을 통한 *Lactobacillus* sp.의 검출

166명의 건강한 20대 여성으로부터 채취한 시료를 *Lactobacillus* multiplex PCR을 이용하여 분석한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

시험대상 여성의 질 내 유산균 분포

채취한 166개의 시료로부터 multiplex PCR 기술을 적용하여 최종적으로 얻어진 목적하는 특정 유산균 종의 특이적인 16S rRNA의 단편을 이용하여 Fig. 2에서 보는 바와 같이 건강한 20대 여성의 질 내에 서식하는 보편적인 유산균 종의 종류와 분포를 확인할 수 있었다. 전체적으로 *L. crispatus*가 가장 높은 77%의 빈도로 확인되었고 *L. iners*, *L. acidophilus*, *L. jensenii*의 분포는 약 57-59% 빈도로 검출되었다. 반면, *L. gasseri*는 약 10%, *L. fermentum*은 약 2%의 매우 낮은 빈도로 분포하는 것으로 나타났다.

Fig. 3과 Fig. 4는 각각 *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*와 *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. fermentum*의 실험 결과 패턴을 나타낸 것이며, 이와 같은 결과로 볼 때 20대 여성의 질 환경에서는 *L. crispatus*가 우점종으로 서식하고 있는 것으로 판단되며 이는 20대 여성들의 생리적 특성과 유산균들의 서식 적합성에 의하여 이루어진 결과로 추정된다.

아울러 Fig. 3과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 실험 대상 166명 가운데 50% 이상의 시료에서 *L. iners*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*와 *L. jensenii*는 공통적으로 검출되는 유산균 종으로 나타났다.

Fig. 5(A)는 *L. crispatus*와 *L. acidophilus* 양성을 비교한 것으로 *L. crispatus*와 *L. acidophilus* 동시에 양성인 여성이 56%, *L. crispatus* 양성인 여성이 21%, *L. acidophilus* 양성인 여성이 1%로 *L. acidophilus*의 경우 *L. crispatus*와 매우 유사한 결과를 나타냈다. Fig. 5(B)는 *L. crispatus*와 *L. jensenii*를 비교한 것으로, *L. crispatus*와 *L. acidophilus* 동시에 양성인 여성이 50%, *L. crispatus* 양성인 여성이 27%, *L. jensenii* 양성인 여성이 7%로

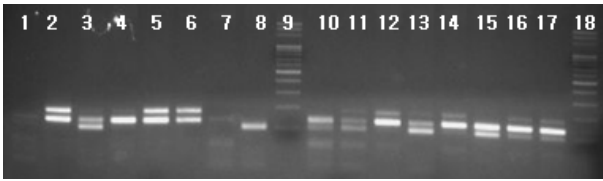


Fig. 3. Experiment pattern of *L. iners* and *L. crispatus* and *L. gasseri* in *Lactobacillus* sp. that were isolated from vagina of 20's women. 1-8 and 10-17, experiment pattern; 9 and 18, 100 bp size marker.

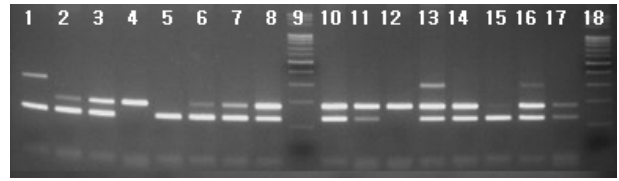


Fig. 4. Experiment pattern of *L. acidophilus* and *L. jensenii* and *L. fermentum* in *Lactobacillus* sp. that were isolated from vagina of 20's women. 1-8 and 10-17, experiment pattern; 9 and 18, 100 bp size marker.

L. jensenii 또한 *L. crispatus*와 매우 유사한 결과를 보였다. Fig. 5(C)는 *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. jensenii* 세 가지 균종이 모두 동시에 검출된 경우를 나타낸 것으로 전체 166명의 여성 중 41%에 해당되는 여성이 세 가지 균종 모두가 동시에 검출되었다.

이와 같은 결과로 볼 때 질 내부에 서식하는 유산균 종의 분포와 우점종의 종류를 확인하는 것만으로 생식기관의 건강상태 및 질염의 발병 여부를 예측할 수 있을 것으로 판단된다.

고찰

유산균은 그람 양성 그룹에 속하는 전형적인 중속영양세균으로 자연계에 서식하는 다른 미생물들과 공영양, 공생, 경쟁 등의 생태적인 기능이 매우 약하거나 없다. 질 내부에 서식하는 유산균은 자궁이나 질 내부의 상피세포에서 분비되는 영양물질을 이용하여 생장에 필요한 물질대사를 유지하며 핵산이나 아미노산 등의 생합성 능력이 제한적으로 존재하기 때문에 영양조건이 일정하게 유지되지 않으면 쉽게 생리적인 기능을 상실할 수 있다. 따라서 질 내부의 생리적인 변화가 발생하거나 생리적인 요인에 의해 면역반응에 의한 서식환경의 변화가 발생하면 유산균의 분포와 생물량은 감소하게 된다(Cho, 2006). 즉, 다른 세균의 생장을 억제할 수 있는 환경 요인이 감소하거나 사라지게 되면 질 내부에는 요도, 항문주위, 질 입구의 피부 점막 등에 서식하는 생태적 경쟁력이 상대적으로 큰 그람 음성 그룹에 속하는 장내균, 피부 상재균, 접촉성 오염균 등이 질 내부의 유산균을 대체하게 되고 면역학적 증진반응이 발생하고 분비물질이 증가하게 되어 질염 상태를 초래할 수 있다(Ahn et al., 2011). 따라서 생식에 문제가 있거나 질병이 의심되는 여성의 질 내부에 서식하는 유산균의 생물량, 분포와 종 등을 확인하면 건강의 정도나 질병의 가

능성을 예측할 수 있는 자료로서 이용이 가능하다고 보여진다.

건강한 여성의 질 내에는 수많은 유산균들이 존재하고 있으며, 이들의 구성과 분포는 인종과 연령 그리고 환경에 따라 변하는 것으로 알려져 있다(Redondo-Lopez et al., 1990; Pavlova et al., 2002).

미국의 한 연구에 의하면 질 내 우점균주는 *L. crispatus*와 *L. jensenii*라고 보고하였으며, 증상이 없는 건강한 여성의 질 내에서 *L. acidophilus*는 발견되지 않았다고 보고하였다(Antonio et al., 1999). 또한 일본의 한 연구에서는 질 내 우점균주는 *L. crispatus*와 *L. gasseri*라고 보고하고 있다(Song et al., 1999). 그러나 2004년 한국에서 발표된 한 연구에 의하면(Park et al., 2004) 한국 여성의 질 내 우점균주는 *L. crispatus*와 *L. acidophilus*로 다른 나라의 연구결과와 차이가 있다고 발표되었으며, 본 연구의 결과와 일치하는 점으로 보아서 한국 여성의 경우 질 내 우점균주가 다르다는 것을 확인할 수 있었고, 20대 여성의 질 내 우점균주는 *L. crispatus*와 *L. acidophilus* 뿐만 아니라 비슷한 분포로 검출된 *L. jensenii*라고 판단된다. 이들 유산균과 함께 발견되었던 *L. iners*의 경우 질염 증상이 없는 건강한 여성에게서도 발견되지만 주로 질염의 치료를 위한 항생제 치료 후에 제일 먼저 발견되는 유산균으로 건강한 여성의 질 내에서만 서식하는 우점종이라고 할 수 없을 것으로 보인다(Falsen et al., 1999; Vasquez et al., 2002; Burton et al., 2003; Zhou et al., 2004; Antonio et al., 2005).

과거에 비특이성 질염 또는 *Gardnella* 질염으로 불리던 세균성 질염(Bacterial vaginosis)은 건강한 상태의 질 환경에서 서식하는 유산균이 감소하거나 사라지면서 발생하는 감염증이다(Zozaya et al., 2010). 세균성 질염을 일으키는 혐기성 세균들은 건강한 여성의 질 내에 존재하는 전체 세균의 약 1% 미만을 차지하고 있지만, 유산균이 사라지면 세균성 질염의 원인이 되는 세균의 개체 수는 약 100-1000배 정도 증가하게 된다. 질염은

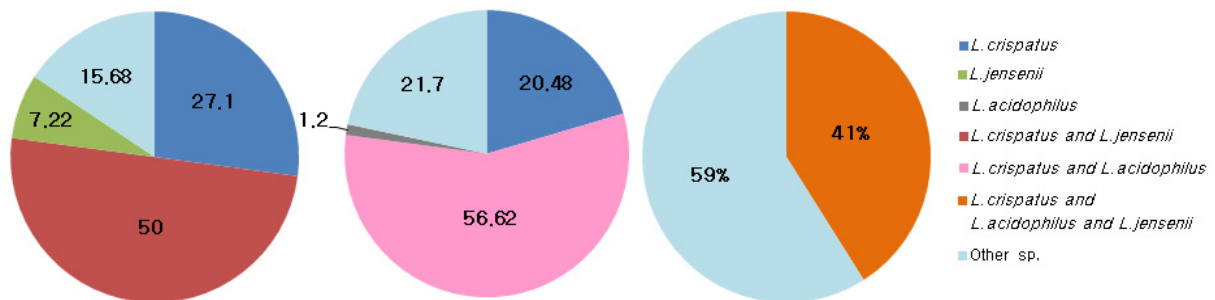


Fig. 5. Ratio of *L. crispatus*, *L. acidophilus*, and *L. jensenii* in *Lactobacillus* that were isolated from vagina of 20's women (A) *L. crispatus* and *L. acidophilus* (B) *L. crispatus* and *L. jensenii* (C) *L. crispatus*, *L. acidophilus*, and *L. jensenii*.

일반적인 감염성 질환과 달리 염증을 일으키는 지표가 되는 혐기성 세균들을 제거한다고 하여도 회복이 쉽게 이루어지지 않아 재발이 잦은 질환이다. 따라서 염증 지표군의 제거보다 유산균이 우점하는 질 환경 개선이 더욱 중요하다(Park *et al.*, 2004).

현재 산부인과에서 질염의 정도와 예후를 판정하는 기준으로 질염의 원인균인 *Gardnella vaginalis*를 PCR을 이용하여 검출하는 방법을 사용하고 있는데, 이는 유산균의 안정한 생태적 기능이 유지되는 조건에서도 검출될 가능성이 있기 때문에, 최근 연구에서 *G. vaginalis*의 감염여부는 질염의 여부를 판정하는 지표로 사용하기 어렵다는 보고가 있었다(Zozaya *et al.*, 2010). 이와 같은 이유로 지금까지 *G. vaginalis*의 감염여부를 기준으로 치료와 예후를 판단하여 처치할 경우 불필요한 항생제의 사용으로 문제가 없는 질 내부에 서식하는 유산균까지 감소시키는 원인이 될 수 있을 것으로 추정된다(Ahn *et al.*, 2011).

적요

본 연구는 multiplex PCR 방법을 적용하여 질 내부에 서식하는 유산균을 동시에 그리고 신속하게 검출하는 방법을 개발하는 것을 목적으로 수행되었다. 세균의 감염에 의한 질염 증상이 없는 건강한 20대 여성 166명으로부터 질 분비물을 채취하였다. 건강한 여성의 질 내부에 서식하는 것으로 확인된 *Lactobacillus* 속에 속하는 6종의 유산균을 종 특이 multiplex PCR primer를 제작하기 위해 선정하였다. Multiplex primer I은 *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*를 선택적으로 검출하기 위해 특성화하였고 multiplex primer II는 *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. fermentum*를 선택적으로 검출하기 위해 특성화하였다. Multiplex PCR 기술을 이용하여 분석한 결과 *L. crispatus* (77%)가 가장 높은 빈도로 검출되었고 *L. acidophilus* (57%)과 *L. jensenii* (57%)는 상대적으로 높은 빈도로 검출되었다. *L. iners* (59%)는 *L. acidophilus* (57%)와 *L. jensenii* (57%) 보다 높은 빈도로 검출되었지만 항생제 치료 과정 후 또는 세균성 질염의 경우에도 발견되는 균종으로 건강한 여성에게서 주로 서식하는 종이라고 결론 내리기는 어렵다. 결론적으로, 특정 유산균의 특이적인 primer를 이용한 multiplex PCR 기술은 질의 건강상태의 변화 또는 질의 질병으로부터 회복 과정을 예측할 수 있는 도구로서 유용할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Ahn, H.R., So, J.S., and Oh, K.H. 2011. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from vaginas of women of childbearing age. *Kor. J. Microbiol.* **47**, 308–315.
- Antonio, M.A., Hawes, S.E., and Hillier, S.L. 1999. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* **180**, 1950–1956.
- Antonio, M.A., Rabe, L.K., and Hillier, S.L. 2005. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* **192**, 394–398.
- Barb ers, C. and Boris, S. 1999. Potential role of *Lactobacilli* as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care STDs* **13**, 747–751.
- Burton, J.P., Cadieux, P.A., and Reid, G. 2003. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 97–101.
- Cho, Y.H. 2006. Introduction to urinary tract infection. *Kor. J. Urol.* **47**, 559–567.
- Collins, M.D., Rodrigues, U., Aguirre, A.M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Mart nez-Murcia, A., Phillips, B.A., and Williams, A.M. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 5–12.
- Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as preservatives. *J. Food Technol.* **43**, 164–167.
- Dahiya, R.S. and Speck, M.L. 1968. Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* **51**, 1568–1572.
- Dickson, E.M., Riggio, M.P., and Macpherson, L. 2005. A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *J. Med. Microbiol.* **54**, 299–303.
- Falsen, E., Pascual, C., Sjoden, B., Ohlen, M., and Collins, M.D. 1999. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 217–221.
- Park, M.Y., Park, H.M., So, J.S., and Kim, S.C. 2004. Microbiologic and molecular genetic analysis of *Lactobacillus* spp. isolated from vagina of Korean women and a pilot clinical study on the treatment of vaginitis using the best *Lactobacillus* strain KLB 46. *Kor. J. Obstet. Gynecol.* **47**, 1154–1164.
- Pavlova, S.I., Kilic, A.O., Kilic, S.S., So, J.S., Nader-Macias, M.E., and Simoes, J.A. 2002. Genetic diversity of vaginal *Lactobacilli* from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 451–459.
- Redondo-Lopez, V., Cool, R.L., and Sobel, J.D. 1990. Emerging role of *Lactobacilli* in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Infect. Dis. Rev.* **12**, 856–872.
- Song, Y.L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C.X., Kato, H., and Watanabe, K. 1999. Identification of and hydrogenperoxide production by fecal and vaginal *Lactobacilli* isolated from Japanese women and new born infants. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3062–3064.
- Sul, S.Y., Kim, H.J., Kim, T.W., and Kim, H.Y. 2007. Rapid identification of *Lactobacillus* and bifidobacterium in probiotic products using multiplex PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 490–495.
- Sung, H.R., Joo, J.Y., Lee, C.K., Chung, Y.B., and Song, S.G. 2007. Simultaneous detection of cytomegalovirus, epstein-barr virus, hepatitis B virus, and parvovirus by a multiplex PCR. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 1–6.
- Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U., and Molin, G. 2002. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2746–2749.
- Zhou, X., Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C., Islam, M.R., and Fomey, L.J. 2004. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* **150**, 2565–2573.
- Zozaya-Hinchliffe, M., Lillis, R., Martin, D.H., and Ferris, M.J. 2010. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1812–1819.