

阴道保健潜力的乳酸菌的分离、鉴定与筛选

江佳琳¹, 吕廷宇¹, 蔡侑珊¹, 林诗伟¹, 吴文歆², 陈炎炼¹, 陈劲初^{3*}

¹葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

²上海葡萄王企业有限公司, 上海

³台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

收稿日期: 2022年2月11日; 录用日期: 2022年3月4日; 发布日期: 2022年3月14日

摘要

本研究旨在分离和筛选具有潜在女性私密护理作用的乳酸菌(LAB)。收集女性一次性卫生用品上的残留物作为标本, 通过革兰氏染色确认阴道菌群正常。用LAB选择性培养基MRS培养从标本中分离出单个LAB菌落, 并通过16s DNA鉴定物种。进一步对这些分离物进行了多项功能筛选试验, 包括抗菌能力、H₂O₂产生试验和宫颈细胞粘附试验。结果表明*L. gasseri* GKA2对致病菌大肠杆菌(*E. coli*)和肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)具有抑制作用。*L. gasseri* GKA2和*L. crispatus* GKJ6都具有产生H₂O₂的能力。在宫颈细胞粘附试验中, 菌株GKA2和GKJ6的粘附能力分别为92.21%和92.46%。综上所述, 乳酸杆菌GKA2和GKJ6具有阴道保健的潜力。未来可对这两种菌株进行体内试验验证, 作为贴身保健品的应用进一步验证定量生产的可行性。

关键词

细菌性阴道炎, 卷曲乳杆菌, 加氏乳杆菌, 抗菌物质, 阴道护理, 健康女性

Isolation, Identification and Screening of Lactic Acid Bacteria with Potential Vaginal Health Care

Jia-Lin Jiang¹, Ting-Yu Lyu¹, You-Shan Tsai¹, Shih-Wei Lin¹, Wen-Shin Wu², Yan-Lian Chen¹, Chin-Chu Chen^{3*}

¹Grape King Biotechnology Co., Ltd., Taoyuan Taiwan

²Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai

³Taiwan University Institute of Food Technology, Taipei Taiwan

*通讯作者。

文章引用: 江佳琳, 吕廷宇, 蔡侑珊, 林诗伟, 吴文歆, 陈炎炼, 陈劲初. 阴道保健潜力的乳酸菌的分离、鉴定与筛选[J]. 微生物前沿, 2022, 11(1): 31-41. DOI: 10.12677/amb.2022.111004

Abstract

This study was to isolate and screen the lactic acid bacteria (LAB) with potential female intimate care. The residues on the women's disposal sanitary were collected as specimens and confirmed the normal vaginal bacteria flora by Gram staining. Single LAB colonies were isolated from the specimens by culturing with LAB selective medium MRS and identified the species by 16s DNA. Several functional screening tests for these isolations were further carried out, including antibacterial ability, H₂O₂ production test, and cervical cell adhesion test. Results showed that *L. gasseri* GKA2 could inhibit pathogenic bacteria *E. coli* and *K. pneumonia*. Both *L. gasseri* GKA2 and *L. crispatus* GKJ6 had abilities to produce H₂O₂. In the cervical cell adhesion test, strains GKA2 and GKJ6 had 92.21% and 92.46% adhesion ability, respectively. To summarize, *Lactobacillus* GKA2 and GKJ6 have the potential for vaginal health care. In the future, these two strains can be tested in vivo for verification, and the feasibility of quantitative production can be further tested as the application of intimate health care products.

Keywords

Bacterial Vaginosis, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, Antibacterial Substance, Vaginal Care, Healthy Woman

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

阴道炎(vaginitis)是常见的妇科病症, 约有 50%的女性在一生中会感染阴道炎, 其中以细菌性阴道炎(bacterial vaginosis, BV)尤为常见, 占有阴道炎的 40%~50% [1]。其他阴道炎, 例如念珠菌阴道炎(vulvovaginal candidiasis)占 20%~25%、滴虫感染阴道炎(trichomonas vaginitis)占 15%~20% [2]。细菌性阴道炎是由于女性阴道内菌相改变, 使阴道内酸碱值提升, 导致嗜碱性病菌滋长, BV 主要由阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)导致, 此为一种革兰氏阳性杆菌, 若 *G. vaginalis* 含量高出于正常一千倍则会引起非特异性阴道炎(nonspecific vaginosis), 以怀孕期妇女最易感染, 感染机率为 10%~30% [3]。临床上指出若阴道分泌物量多、颜色呈牛乳状、且发出鱼腥味, 阴部可能伴有搔痒症状则为感染病征, 如合并发痒可能还并发白色念珠菌[4]。在阴道中 *G. vaginalis*、*Mycoplasma hominis* 及乳酸菌等皆为正常菌丛[5]。但若体内 H₂O₂ 缺乏, 使得 *G. vaginalis* 等厌氧菌过度繁殖, 若多于乳酸菌 100~1000 倍, 便会产生阴道发炎的症状[6]。目前阴道炎的治疗大多为口服锭剂、阴道塞剂或药膏, 临床上有许多患者看到症状改善就会自行停药, 反而造成症状未根治而一再发作[7]。

正常阴道内存在正常乳酸菌丛, 它借着分解阴道内的肝糖及乳糖转变成乳酸, 使 pH 值维持在 3.8 至 4.2 的弱酸性环境, 再结合阴道本身的分泌物形成弱酸性保护环境[8]。乳酸菌代谢同时也会产生与双氧水成分相同的 H₂O₂ 及其他的抗菌物质, 抑制致病菌的生长, 形成天然防护屏障可以预防致病菌的感染, 维持阴道菌相(vaginal flora)平衡, 防止阴道发炎、老化、干燥等问题发生[9] [10]。

根据妇产科医师指出, 减少阴道感染方法有维持通风、不过度清洁私密处、生活习惯维持正常并

维持阴道菌相平衡等[7]。然而以现代人工作压力大、作息容易日夜颠倒，若能补充具私密处保健的乳酸菌以维持女性健康是一不错的方法。目前市面上有相关的益生菌保健产品，像是 Now Foods 女性专用益生菌素食胶囊(*Lactobacillus acidophilus* La-14)、U-Relax 优芮珂丝益生菌胶囊(*L. rhamnosus* GR-1、*L. reuteri* RC-14)、和 Jarrow Formulas Probiotic Women's Yeast Support (*L. crispatus* LbV88)等[11] [12] [13]。然而，这些保健品的菌种皆来自欧美国家，菌种的差异亦会影响其功效，故开发出对于亚洲女性的益生菌私密处保健品有其必要性。因此，本实验自台湾女性卫生棉分离乳酸菌，并进行具阴道保健潜力之乳酸菌菌种特性的筛选试验。

2. 材料与方法

2.1. 菌株来源

由台湾女性使用过之卫生棉取得检体。将检体抹于玻片上各别进行革兰氏染色，染色方法如下：

- 1) 阴道检体涂抹于干净无菌玻片上，以酒精灯将检体抹片大致烤干，经结晶紫(crystal violet)染色 1 分钟后，纯水洗涤。
- 2) 碘液固定 1 分钟后，纯水洗涤。
- 3) 脱色剂脱 30 秒后，纯水洗涤。
- 4) 最后以番红(safranin)染 30 秒后，纯水洗涤。
- 5) 样品盖上盖玻片后滴上油镜油，以 1000×视野下，确认其菌相组成。

镜检下，革兰氏阴性菌(G-)为粉色，革兰氏阳性菌(G+)为蓝紫色。根据 Nugent 等人(1991)研究，计算 Nugent score (表 1)，分数低于 3 者判定为正常阴道菌相，后续进行分菌作业[14]。

Table 1. Nugent's criteria

表 1. Nugent's criteria

Description	Bacteria count	score
<i>Lactobacillus</i> morphotypes, G(+)	>30	0
	5~30	1
	1~4	2
	<1	3
	0	4
Gardnerella/Bacteroides morphotypes, G(-) or G(+/-)	0	0
	<1	1
	1~4	2
	5~30	3
	>30	4
Curved Gram variable rods, G(+/-)	0	0
	1~4	1
	>5	2

2.2. 菌株分离

挑选之检体进行序列稀释后涂抹于 MRSA 平板上(BD Difco, NJ, US), 以 37℃ 厌氧培养 2 天后, 挑选单一菌落, 活化至 MRS broth 内, 37℃ 厌氧量化 1 天。培养完成后以接菌环沾取菌液, 四区划线于 MRSA 平板, 再以 37℃ 厌氧培养 2 天, 供后续鉴定使用。剩余菌液以 20% 甘油保存于 -80℃, 以利后续实验备用。

2.3. 菌株鉴定

自四区划线的平板挑选单一菌落 95℃ 破菌 5 分钟后, 加入 16s RNA 共享引子 BSF (表 2) 作为鉴定区间以及其他反应溶剂进行 PCR (表 3)。取 PCR 产物进行电泳(electrophoresis)确认亮带(band)后, 委托基龙米克斯生物科技有限公司(Genomics, Taiwan)进行定序(sequencing), 并以 NCBI 网站的 BLAST 数据库做序列比对, 确认该菌种。

Table 2. BSF primers
表 2. 共享引子 BSF

引子名称	引子序列
BSF-forward	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
BSF-reverse	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

Table 3. PCR solvent and reaction condition
表 3. PCR 反应溶剂与条件

PCR 反应溶剂	使用量(μL)	反应条件
PCR 产物(DNA)	3	
10× PCR buffer	2.5	
dNTP	1.5	1) 95℃, 5 min 2) 95℃, 40 sec 3) 54℃, 45 sec
BSF-forward	0.5	4) 72℃, 60 sec (40 cycles)
BSF-reverse	0.5	Final extension: 72℃, 7 min
DNA polymerase	0.25	
ddH ₂ O	16.75	

2.4. 抗菌实验

将实验用菌株活化至 MRS broth 37℃ 厌氧培养 1 天, 将活化好之菌液取 2 μL 滴至 MRSA 平板表面上, 待菌液自然风干, 放置 37℃ 厌氧培养 2 天。将病原菌以 TSA broth (BD Difco, NJ, US) 或 MRS broth 活化, 以序列稀释方式取得 10×、100×、1000× 菌液。将各稀释倍数菌液吸取 1 mL 至 9 mL 适用之培养 agar 内, 混合均匀后倒至先前备好的乳酸菌平板上, 凝固后放 37℃ 培养 1 天, 培养完观察抑菌圈大小(mm)。

2.5. 产 H₂O₂ 实验

将活化好之菌液取 2 μL 滴至 MRSA 平板表面上, 待菌液自然风干, 准备 100 mL MRS 培养基含 0.025

g 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB, Sigma-Aldrich, MA, US)、1 μ L 辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP, Sigma-Aldrich, MA, US)、以及 1.5%琼脂, 倒成平板备用。乳酸菌于 MRS 液态培养基活化一天后, 接菌环沾取菌液, 以四区划线法将菌液画于上述平板上, 培养于 37℃厌氧环境下 48 小时。观察培养基菌落呈蓝色之变色情形, 越蓝表示产二氧化氢能力越强。

2.6. 产酸实验

取活化之乳酸菌菌液 100 μ L 至 20 mL MRS broth 中, 37℃厌氧环境下培养 48 小时后, 记录其 pH 值。以 0.1 N 的 NaOH 滴定至 pH 值 7.0, 并纪录所使用的 NaOH 量。酸度公式计算如下:

$$\text{酸度} = \left[\frac{(0.1 \text{ NaOH 用量} \times \text{力价} \times 0.009)}{20 \text{ ml}} \right] \times 100\%$$

2.7. 子宫颈细胞贴附能力试验

将乳酸菌于 MRS Broth 活化 1 天后, 以 12,000 rpm 离心 5 分钟收取乳酸菌菌体, 并使用 PBS 清洗一次后回溶, 将乳酸菌液进行序列稀释 100 倍后以平板计数法计数菌数作为起始菌数后备用。将子宫颈细胞(He La cell, BCRC, Taiwan)接种于 24 孔盘中以 EGM-2 液态培养基(Sigma-Aldrich, MA, US)培养于 37℃下, 并供给 5%二氧化碳培养 1 天, 使细胞贴附于孔洞平面。每一孔盘计数, 含有一单层约 1×10^6 的子宫颈细胞贴附上。使用 PBS 润洗培养子宫颈细胞, 加入前述制备好的 100 倍 PBS 稀释的乳杆菌菌液, 静置于 37℃、5% CO₂ 下培养两小时, 再使用 PBS 清洗, 并加入 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, MA, US) 使子宫颈细胞分解。收集分解完之所剩液体进行乳杆菌的 MRSA 平板计数法, 并计算乳杆菌于子宫颈细胞的贴附能力。计算公式如下:

$$\begin{aligned} & \text{乳杆菌对子宫颈细胞的贴附能力}(\%) \\ &= \left[\frac{\log(\text{起始接种乳杆菌菌数})}{\log(\text{接种后之乳杆菌菌数})} \right] \times 100\% \end{aligned}$$

3. 结果

3.1. 菌株分离与鉴定结果

本试验共取得 12 份女性使用过之卫生棉。以革兰氏染色做为简易判别该检体源之有无细菌性感染。图 1(a)和图 1(b)检体皆可清楚观察到杆状蓝色菌体, 推断为乳酸菌; 且无观察到革兰氏阴性菌或球状菌体, 故给予 Nugent score 小于 3。图 1(c)检体虽有部分革兰氏阳性菌, 但多数为革兰氏阴性菌, 故初步判断 Nugent 分数大于 3, 不采用此检体分菌。所有样品中, 共有 8 个样品其 Nugent 分数小于 3 分, 故进一步取这 8 组样品做乳酸菌菌株分离。采用的检体于 MRS 平板培养基培养后, 共自平板培养基分离出 19 株菌落, 经 16s RNA 鉴定后, 有 11 株为乳酸菌, 菌株分别给予编号, 如表 4。共分离出 *Lactobacillus gasseri*、*Limosilactobacillus fermentum*、*Weissella confusa*、*L. delbrueckii*、*L. jensenii*、*L. vaginalis* 以及 *Lacticaseibacillus rhamnosus* 各一株, 和 4 株不同检体来源的 *L. crispatus*。

3.2. 菌株抗菌能力表现

抗菌试验能评估乳酸菌对阴道常见病原菌抑制效果强弱。使用病原菌有 *C. candida* BCRC 20519、*E. coli* BCRC 11634、*S. aureus* BCRC 12154、*K. pneumonia*。结果如表 5 所示, 分离出的 11 株乳酸菌对 *C. candida* 均没有抑菌效果。除了 GKJ6 外, 剩余分离之 10 株菌皆对 *E. coli* 有抑制的作用, 其中又以 GKA2、GKW3、GKB1、GKC2、GKJ3、GKJ4、和 GKR9 抑制效果强。在抑制 *S. aureus* 方面上, 以 GKR9、GKC2 和 GKF4 效果最强。分离出的 11 株菌中, 仅 GKA2、GKF3、和 GKW3 具有抑制 *K. pneumonia* 的能力。

Table 4. Identification of the isolated lactic acid bacteria strain
表 4. 检体分离之菌株鉴定结果

命名代号 Strain No.	菌名 Identified Species
GKA2	<i>Lactobacillus gasseri</i>
GKF4	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
GKW3	<i>Weissella confusa</i>
GKB1	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>
GKC2	<i>Lactobacillus crispatus</i>
GKJ3	<i>Lactobacillus jensenii</i>
GKV9	<i>Limosilactobacillus vaginalis</i>
GKJ4	<i>Lactobacillus crispatus</i>
GKJ5	<i>Lactobacillus crispatus</i>
GKR9	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>
GKJ6	<i>Lactobacillus crispatus</i>

Table 5. Anti-pathogen effects of the isolated lactic acid bacteria
表 5. 乳酸菌对病原菌抑菌效果

菌株编号 Strain No.	100× <i>C. candida</i>	100× <i>E. coli</i>	100× <i>S. aureus</i>	100× <i>K. pneumoniae</i>
GKA2	—	+++	+	+
GKF4	—	++	+++	+++
GKW3	—	+++	+	+++
GKB1	—	+++	++	—
GKC2	—	+++	+++	—
GKJ3	—	+++	+	—
GKV9	—	++	+	—
GKJ4	—	+++	++	—
GKJ5	—	+	—	—
GKR9	—	+++	+++	—
GKJ6	—	—	—	—

*抑制效果强(+++)、中(++)、弱(+)、无(-)。

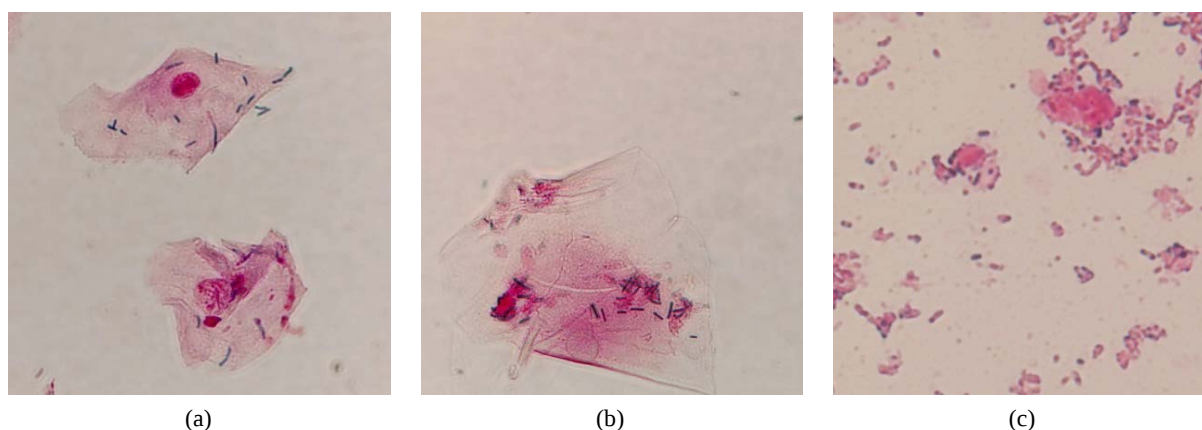


Figure 1. Specimens were Gram stained and examined under 1000× oil microscope. Gram-positive bacteria are blue, Gram-negative bacteria are pink, Gram-denatured bacteria are purple-blue, and exfoliated epi-dermal cells are pink. The Nugent score of (a) is 2; the Nugent score of (b) is 1; the Nugent score of (c) is 4

图 1. 检体以革兰氏染色并于 1000×油镜镜检查结果。革兰氏阳性菌为蓝色，革兰氏阴性菌为粉色，革兰氏变性菌为紫蓝色，脱落的表皮细胞为粉色。(a) 之 Nugent score 为 2；(b) 之 Nugent score 为 1；(c) 之 Nugent score 为 4

3.3. 产 H_2O_2 能力比较

图 2(a)可观察到 GKJ6 菌落呈现明显深蓝色，判断产 H_2O_2 能力为强(+++)。图 2(b)的 GKV9 有部分菌落并没有蓝色形成，判断产 H_2O_2 能力为中(++)。图 2(c)的 GKW3 大部分菌落没有蓝色形成，少部分菌落有蓝色反应但颜色并不深，判断产 H_2O_2 能力为弱(+)。图 2(d)的 GKA2 完全没有产生蓝色反应，判断为不具产 H_2O_2 能力(-)。分离之 11 株乳酸菌，其产 H_2O_2 能力整理如表 6。菌株以 GKJ6 和 GKJ3 产 H_2O_2 能力最强，次之为 GKB1、GKV9、以及 GKJ5。

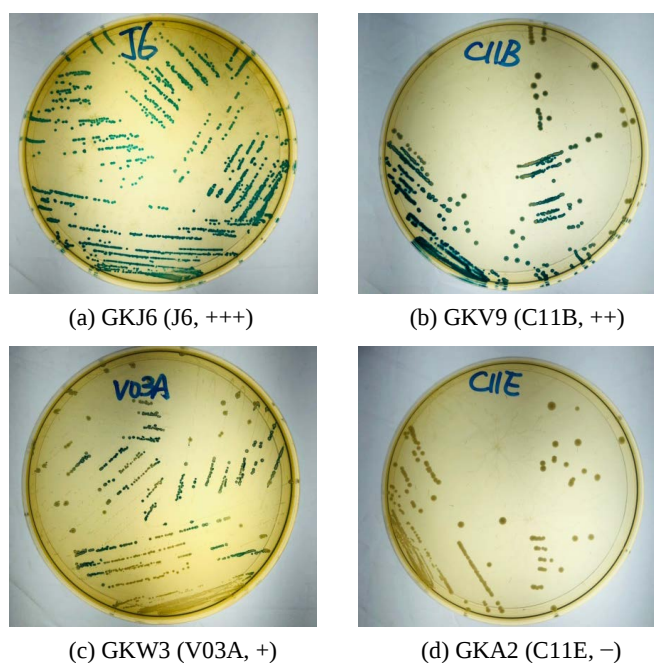


Figure 2. H_2O_2 production capacity identification. (a) Strong ability to produce H_2O_2 (+++); (b) Medium (++) in H_2O_2 production capacity; (c) Weak ability to produce H_2O_2 (+); (d) Not capable of producing H_2O_2 (-)

图 2. 产 H_2O_2 能力辨识。(a) 产 H_2O_2 能力强(+++); (b) 产 H_2O_2 能力中(++); (c) 产 H_2O_2 能力弱(+); (d) 不具产 H_2O_2 能力(-)

Table 6. Ability of H₂O₂ production from isolated strains
表 6. 检体分离之菌株产 H₂O₂ 能力总表

菌株名称 Strain name	产 H ₂ O ₂ 能力 Ability of H ₂ O ₂ production
<i>Lactobacillus gasseri</i> GKA2	—
<i>Lactobacillus fermentum</i> GKF4	—
<i>Weissellaconfusa</i> GKW3	+
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i> GKB1	++
<i>Lactobacillus crispatus</i> GKC2	—
<i>Lactobacillus jensenii</i> GKJ3	+++
<i>Lactobacillus vaginalis</i> GKV9	++
<i>Lactobacillus crispatus</i> GKJ4	+
<i>Lactobacillus crispatus</i> GKJ5	++
<i>Lacticaseibacillusrhamnosus</i> GKR9	—
<i>Lactobacillus crispatus</i> GKJ6	+++

3.4. 菌株产酸之酸度分析

乳酸菌具产乳酸能力，可抑制杂菌生长。由图 3 可观察到 GKJ5 产酸能力为 1.61%，是 11 株乳酸菌中最强的。其次为 GKA2、GKR9、GKB1 分别产酸能力为 1.39%、1.31%、以及 1.28%。GKC2 则为 0.53%，产酸能力最低。

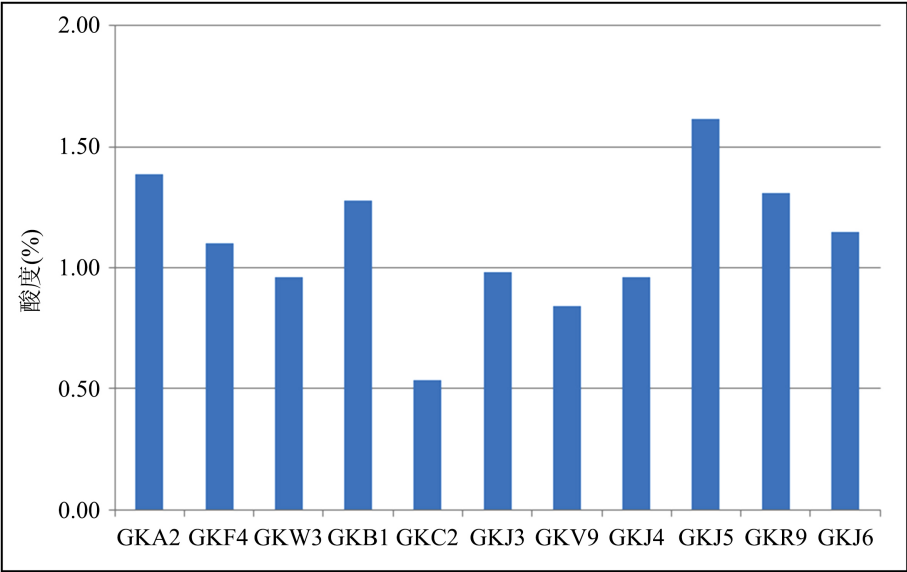


Figure 3. Ability of the lactic acid production from 11 isolated strains
图 3. 筛选出 11 株乳酸菌酸度分析

3.5. 菌株于子宫细胞的贴附能力

分析乳酸菌于子宫颈细胞贴附能力可推估该乳酸菌是否能够长期定植于女性私密处。若贴附能力愈强,表示能够长期定植的机率愈大。由图 4 可看出 11 株乳酸菌对于子宫颈细胞贴附效果均佳,皆可高达 60%以上。其中以 GKJ4 对于子宫颈细胞贴附力达 97.34%最高。GKJ6、GKA2 亦分别有 92.46%与 92.21%的贴附能力。

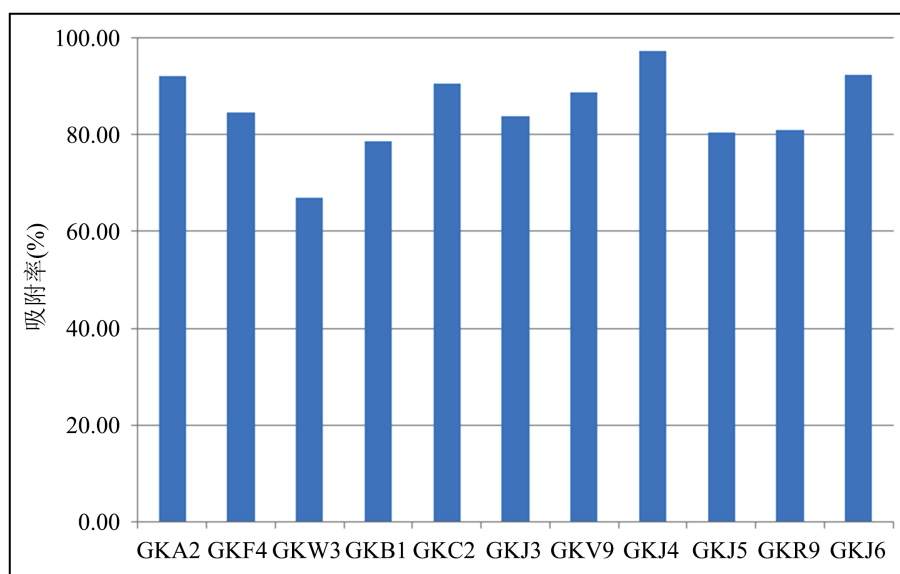


Figure 4. Ability of cervical cell adhesion test for 11 strains probiotics

图 4. 11 株乳酸菌于子宫颈细胞贴附能力试验

4. 讨论

一般女性阴道菌相多为乳杆菌属的细菌,以 *L. crispatus*、*L. inners*、*L. gasseri*、以及 *L. jensenii* 为常见[15]。根据 Ravel 等人研究,其将女性阴道菌群做基本分类后发现,西班牙裔和黑人女性之阴道菌相主要以 *L. inners* 为主,其他不特定菌相为其次;而白人和亚洲女性阴道菌相则以 *L. crispatus* 和 *L. inners* 为主[16]。因本次分离方法所使用的培养基 MRS 较不适合 *L. inners* 生长,故无分离出 *L. inners* [17]。除外,上述菌种皆可生长于 MRS 而被分离出来,本次分离以 *L. crispatus* 菌种次数最多,可初步推测台湾女性阴道内主要菌种与文献指出相近(表 4)。

多数乳酸菌具有抑制病原菌的效果,其抑菌机制可能为乳酸菌本身产生的酸性物质、 H_2O_2 或抑菌物质达到抑菌效果等[18]。以菌株 GKF4 和 GKW3 的抑制病原菌现象为例,其两者皆具有抑制阴道常见病原菌 *E. coli*、*S. aureus*、以及 *K. pneumonia* (表 5); 然而进一步比较,发现菌株 GKW3 有产生 H_2O_2 的能力,而菌株 GKF4 并没有(表 6)。此说明 GKF4 的抑菌效果并非来自 H_2O_2 的产生,而有其他机制作用,像是乳酸的产生等(图 3)。

另一个阴道乳酸菌的特性为良好的子宫细胞贴附能力[19]。乳酸菌贴附力高者,能竞争掉子宫表面面积,阻挡其他病原菌的贴附或定植生长,也能使乳酸菌本身在阴道内壁存留更久,让乳酸菌能成为优势菌[20]。本试验分离的 11 株菌株中,可发现不同株但同菌种 *L. crispatus* 的贴附能力皆为 80%以上,可推论此类菌种可能多以竞争空间的方式防止病原菌入侵,且成为阴道菌群中常见的种类之一(图 4)。

本研究分离出 11 株乳酸菌,其中以菌株 GKA2 具有抗病原菌 *E. coli* 和 *K. pneumoniae* 的能力,且具

有高吸附率及高产酸能力。而菌株 GKJ6 具有高吸附率、高产酸能力及高 H_2O_2 产生的能力。综观上述特性分析实验, 此两株菌株具有相当阴道保健的潜力, 后续可针对 *L. gasseri* GKA2 和 *L. crispatus* GKJ6 这两株菌株进行安全性评估、量化生产、以及动物的功效性确认, 以利发展有阴道保健应用的生物制剂。

5. 结论

分离株 *L. gasseri* GKA2 可抑制病原菌 *S. aureus*、*E. coli* 及 *K. pneumonia*。分离株 *L. crispatus* GKJ6 则具强的 H_2O_2 产生能力。在子宫细胞贴附力上, 菌株 GKA2 与 GKJ6 分别具 92.21% 和 92.46% 的贴附能力。因此, 本试验初步筛选出乳酸菌菌株 GKA2 和 GKJ6, 可作为后续开发私密处保健的益生菌。

参考文献

- [1] Hainer, B.L. and Gibson, M.V. (2011) Vaginitis. *American Family Physician*, **83**, 807-815.
- [2] Sobel, J.D. and Chaim, W. (1996) Vaginal Microbiology of Women with Acute Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**, 2497-2499.
- [3] Coudray, M.S. and Madhivanan, P. (2020) Bacterial Vaginosis—A Brief Synopsis of the Literature. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **245**, 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.12.035>
- [4] Reed, B.D., Huck, W. and Zazove, P. (1989) Differentiation of *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, and *Trichomonas vaginalis* Infections of the Vagina. *Journal of Family Practice*, **28**, 673-680.
- [5] Verhelst, R., Verstraelen, H., Claeys, G., Verschraegen, G., Van Simaey, L., De Ganck, C., De Backer, E., Temmerman, M. and Vanechoutte, M. (2005) Comparison between Gram Stain and Culture for the Characterization of Vaginal Microflora: Definition of a Distinct Grade that Resembles Grade I Microflora and Revised Categorization of Grade I Microflora. *BMC Microbiology*, **5**, Article No. 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-61>
- [6] Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K., Critchlow, C.M. and Holmes, K.K. (1989) Prevalence of Hydrogen Peroxide-Producing *Lactobacillus* Species in Normal Women and Women with Bacterial Vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 251-256.
- [7] 台湾大学医学院附属医院. 阴道炎的治疗[EB/OL]. https://epaper.ntuh.gov.tw/health/201205/project_3.html, 2021-10-26.
- [8] Godha, K., Tucker, K.M., Biehl, C., Archer, D.F. and Mirkin, S. (2018) Human Vaginal pH and Microbiota: An Update. *Gynecological Endocrinology*, **34**, 451-455. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1407753>
- [9] Athanasiou, S., Pitsouni, E., Antonopoulou, S., Zacharakis, D., Salvatore, S., Falagas, M.E. and Grigoriadis, T. (2016) The Effect of Microablative Fractional CO₂ Laser on Vaginal Flora of Postmenopausal Women. *Climacteric*, **19**, 512-518. <https://doi.org/10.1080/13697137.2016.1212006>
- [10] Tester, R. and Al-Ghazzewi, F.H. (2018) Intrinsic and Extrinsic Carbohydrates in the Vagina: A Short Review on Vaginal Glycogen. *International Journal of Biological Macromolecules*, **112**, 203-206. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.166>
- [11] Jang, S.E., Jeong, J.J., Choi, S.Y., Kim, H., Han, M.J. and Kim, D.H. (2017) *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* La-14 Attenuate *Gardnerella vaginalis*-Infected Bacterial Vaginosis in Mice. *Nutrients*, **9**, Article No. 531. <https://doi.org/10.3390/nu9060531>
- [12] Yefet, E., Colodner, R., Strauss, M., Gam ZeLetova, Y. and Nachum, Z. (2020) A Randomized Controlled Open Label Crossover Trial to Study Vaginal Colonization of Orally Administered *Lactobacillus reuteri* RC-14 and Rhamnosus GR-1 in Pregnant Women at High Risk for Preterm Labor. *Nutrients*, **12**, Article No. 1141. <https://doi.org/10.3390/nu12041141>
- [13] Laue, C., Papazova, E., Liesegang, A., Pannenbeckers, A., Arendarski, P., Linnerth, B., Domig, K.J., Kneifel, W., Petricevic, L. and Schrezenmeier, J. (2018) Effect of a Yoghurt Drink Containing *Lactobacillus* Strains on Bacterial Vaginosis in Women—A Double-Blind, Randomised, Controlled Clinical Pilot Trial. *Beneficial Microbes*, **9**, 35-50. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0018>
- [14] Nugent, R.P., Krohn, M.A. and Hillier, S.L. (1991) Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 297-301.
- [15] Tidbury, F.D., Langhart, A., Weidlinger, S. and Stute, P. (2021) Non-Antibiotic Treatment of Bacterial Vaginosis—A Systematic Review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **303**, 37-45. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05821-x>
- [16] Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S., McCulle, S.L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C.O., Brotman, R.M., Davis, C.C., Ault, K., Peralta, L. and Forney, L.J. (2011) Vaginal Microbiome of Re-

-
- productive-Age Women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 4680-4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- [17] Falsen, E., Pascual, C., Sjöden, B., Ohlén, M. and Collins, M.D. (1999) Phenotypic and Phylogenetic Characterization of a Novel *Lactobacillus* Species from Human Sources: Description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**, 217-221. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-217>
- [18] Borges, S., Silva, J. and Teixeira, P. (2014) The Role of Lactobacilli and Probiotics in Maintaining Vaginal Health. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **289**, 479-489. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3064-9>
- [19] Zárate, G. and Nader-Macias, M.E. (2006) Influence of Probiotic Vaginal Lactobacilli on *in Vitro* Adhesion of Urogenital Pathogens to Vaginal Epithelial Cells. *Letters in Applied Microbiology*, **43**, 174-180. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01934.x>
- [20] Witkin, S.S. (2015) The Vaginal Microbiome, Vaginal Anti-Microbial Defence Mechanisms and the Clinical Challenge of Reducing Infection-Related Preterm Birth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, **122**, 213-218. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13115>