

점안약의 실온과 냉장보관에서의 2주 간격 연속 균 배양 결과

Serial Culture of Eyedrops: Room Temperature vs. under Refrigeration

강동현 · 황현지 · 최성찬 · 김응수

Dong Hyun Kang, MD, Hyun Ji Hwang, MD, Seong Chan Choi, MD, Ungsoo Samuel Kim, MD, PhD

김안과병원

Kim's Eye Hospital, Seoul, Korea

Purpose: We investigated the serial culture of multiuse eye drops applied by medical personnel by intentionally touching the tip of the bottle.

Methods: Ten different unpreserved and preserved eye drops including eye drops for allergies, artificial tears, antibiotics, and corticosteroids were included. One bottle was stored at room temperature and the other bottle stored under refrigeration. The experimenter intentionally touched the tip of the bottle with a finger twice daily. The first culture test was performed 2 weeks after contamination and the culture were performed six times; 2 weeks apart.

Results: Contamination was noted in three types of eye drops (artificial tears without preservatives, corticosteroids, and anti-allergic eye drops) under refrigerated conditions and four types of eye drops (artificial tears without preservatives, artificial tears with preservatives, corticosteroids, and anti-allergic eye drops) under room temperature conditions. The contamination in 13 eye drops was attributable to five microbial species: *Staphylococcus epidermidis* (m/c), *Staphylococcus hominis*, *Rhodotorula* sp., *Corynebacterium* sp., and *Bacillus* sp. Under refrigerated conditions, three eyedrop bottles were contaminated, with five positive cultures in 12 weeks. However, at room temperature, four eye drop bottles were contaminated with eight positive cultures. The culture results changed according to culture time. In some cases, the same result was obtained 2 weeks after the first positive culture but in other cases the result was negative or one of two strains disappeared.

Conclusions: Eye drops can be contaminated under both room temperature and refrigerated conditions. We should consider serial culture for eye drops because the culture results could be variable according to time.

J Korean Ophthalmol Soc 2020;61(5):466-471

Keywords: Culture, Drug contamination, Ophthalmic solutions

안과에서 진단 및 치료 목적으로 사용되는 점안제는 세균성 병원균에 의해 오염될 수 있고, 이는 눈의 감염으로 이어질 수 있다.¹ 점안제는 재사용 과정에서 미생물에 오염

될 수가 있으며 이전의 연구에서 보고된 오염률은 0.07%에서 70%로 다양하다.^{2,3}

점안제 안에서 자란 미생물은 피부 정상 상재균이 많으나 *staphylococcus aureus*나 그람 음성균도 낮은 비율로 발견된다.² 오염된 안약의 사용이 염증의 원인이 되는 것이 흔하지 않고 점안제에 들어있는 보존제가 고여 있는 안약에서 미생물의 활성을 막아주는 역할을 하지만, 안약에서 배양된 세균이 각막염, 결막염, 그리고 안내염의 원인으로 보고된 적이 있다.⁴

대부분 이전의 연구에서 발표된 오염률과 균 배양검사 결과는 사용된 안약에 국한되었다.¹⁻³ 이번 연구에서는 다양

■ Received: 2019. 8. 9. ■ Revised: 2019. 10. 12.

■ Accepted: 2020. 4. 17.

■ Address reprint requests to Ungsoo Samuel Kim, MD, PhD
Kim's Eye Hospital, #136 Yeongsin-ro, Yeongdeungpo-gu,
Seoul 07301, Korea
Tel: 82-1577-2639, Fax: 82-2-2677-9214
E-mail: ungsookim@kimeye.com

* Conflicts of Interest: The authors have no conflicts to disclose.

© 2020 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

한 안약을 사용자의 접촉에 의해 의도적으로 오염시킨 후 연속 배양 결과를 보고자 하였다.

대상과 방법

이번 연구에서 보존제가 포함된 안약과 포함되지 않은 안약을 포함하여 항알레르기제 3종류, 인공눈물 3종류, 항생제 2종류, 스테로이드제가 2종류로 총 10종 20개의 점안제가 포함되었다(Table 1). 각각 한 병은 상온에, 한 병은 2-5°C로 냉장보관하였다.

먼저 안약병의 뚜껑을 열고 실험자가 의도적으로 병의 입구를 손가락으로 오전 8시와 오후 8시 두 차례 오염시켰다. 배양 과정에서 점안기의 끝이 병의 뚜껑에 닿지 않도록 주의하며 안약 1방울을 점적하여 배양하였고, 안약이 서로 중복되지 않도록 하였다. 첫 번째 균 배양검사는 오염으로부터 2주 뒤에 시행하였다. 각각의 안약병에서 채취한 1방울은 5 mL의 blood agar plates, Chocolate, MacConkey's 배

지에서 배양하였고, 배양은 실온과 낮은 기온에서 모두 이루어졌다. 세균 배양은 표준화된 실험실 기술을 이용하여 이루어졌다. 배양은 2주 간격으로 6번 시행되었다. 이후의 배양도 동일한 방법으로 진행하였다. 이 연구는 실험 논문으로 임상연구윤리위원회의 심의 대상이 아니므로 승인을 얻지 않았다.

결 과

냉장보관군에서는 3개의 안약군에서 오염이 확인되었고(보존제가 없는 인공눈물, 스테로이드제, 항알레르기제), 상온보관군에서는 4개의 안약군에서 오염이 확인되었다(보존제가 없는 인공눈물, 보존제를 포함한 인공눈물, 스테로이드제, 항알레르기제) (Fig. 1, 2). 총 10종의 안약을 실온과 냉장보관에서 6회씩 배양을 실시하던 중 13개의 안약이 오염되었으며 5종류의 미생물이 검출되었다(*S. epidermidis*, *S. hominis*, *Rhodotorula spp.*, *Corynebacterium spp.* and

Table 1. Ten eye drops used in the study

	Commercial name	Generic name	Preservatives	<i>S. Epidermidis</i>	<i>S. Homonis</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Gram (+) bacilli</i>	<i>Rhodotorula</i>
Artificial tears	Kynex®	Sodium Hyaluronate 0.8 mg	-	●○	●	●	●	○
	Hyalein	Sodium Hyaluronate 1 mg	Benzalkonium Chloride 0.015 mg/mL	●				
	Protagent®	Povidone 20 mg/mL	Povidone 20 mg/mL					
Corticosteroid eye drops	Ocumetholone® 0.1%	Fluorometholone 1 mg/mL	Benzalkonium Chloride 0.5 mg/mL	○		●	●	○
	Flumetholon 0.02%®	Fluorometholone 0.2 mg/mL	Benzalkonium Chloride 0.05 mg/mL					
Anti-allergic eye drops	Azelastin®	Azelastine HCl 0.5 mg	Benzalkonium Chloride 0.2 mg/mL			●		
	Patanol Eye drops 0.1%®	Olopatadine HCl 1.11 mg/mL	Benzalkonium Chloride 0.1 mg/mL					
	Pataday 0.2% eye drops®	Olopatadine HCl 2.22 mg/mL	Benzalkonium Chloride 0.1 mg/mL					
Antibiotics eye drops	Cravit®	Levofloxacin 5 mg/mL	-					
	Tobrex 0.3%®	Tobramycin 3 mg/mL	Benzalkonium Chloride 0.1 mg/mL					

Three artificial tears, two corticosteroids eye drops, three anti-allergic eye drops and two antibiotics were cultivated in every two weeks for 6 times (●: room temperature, ○: low temperature).

Gram (+) bacilli). 가장 흔한 원인균은 *S.epidermidis*로 6개의 병에서 검출되었다(Table 1). 다른 미생물은 7병에서 비슷하게 검출되었다. 냉장보관하에서 3개의 안약 오염, 12주간 5번의 균 배양검사 양성을 보였으나, 상온보관에서는 4개의 안약 오염 및 8번의 배양검사 양성이 나타났다.

냉장보관 및 상온보관에서 항알레르기제는 6%에서, 스테로이드제는 17%의 양성 배양률을 보였다. 냉장보관하에서 인공눈물의 배양검사 양성률은 11%였으며, 상온에서는 28%였다(Fig. 3). 첫 번째 균 배양검사서 양성일 때 2주 후 시행한 검사에서 같은 결과를 보이는 경우도 있었으나, 첫 번째 검사와 두 번째 배양검사 결과가 상이한 경우도 있었다.

고 찰

점안제는 상온보관과 냉장보관 모두에서 오염이 될 수

있다. 인공눈물, 스테로이드제, 항알레르기제 모두 두 가지 상황에서 오염이 될 수 있다. 항생제 안약에서는 세균 배양이 관찰되지 않았으며 기존 연구와 동일한 결과를 보여 항생제는 세균오염으로부터 비교적 안전한 것으로 생각된다.⁵ 그러나 Kim et al⁶의 연구에서 항생제 안약에서 진균 감염이 보고되기도 하였다. 보존제가 없는 인공눈물은 상온 및 냉장보관하에서 균 배양검사 양성률이 보였다. 이 결과는 스테로이드제(11%), 항생제(5%), 베타차단제(17%)에 비해 인공눈물의 오염 비율(29%)이 높다는 이전의 결과와 상응한다.^{1,3} 그러나 최고 오염률은 베타차단제, 스테로이드제, 윤활제에서 나타났다는 보고도 있다.⁷ 보존제가 없는 안약에서 내인적으로 항 미생물 활동이 나타난다는 연구도 있다.¹

상온에서는 총 60번의 배양 중 8개, 냉장보관에서는 60번 중 5개의 안약에서(각각 13.3%와 8.3%) 균 배양검사 양성을 보였다. 냉장보관하에서 상온보관에 비해 더 낮은 양성률을 보였고, 이는 냉장보관하에서 미생물의 복제율이 더

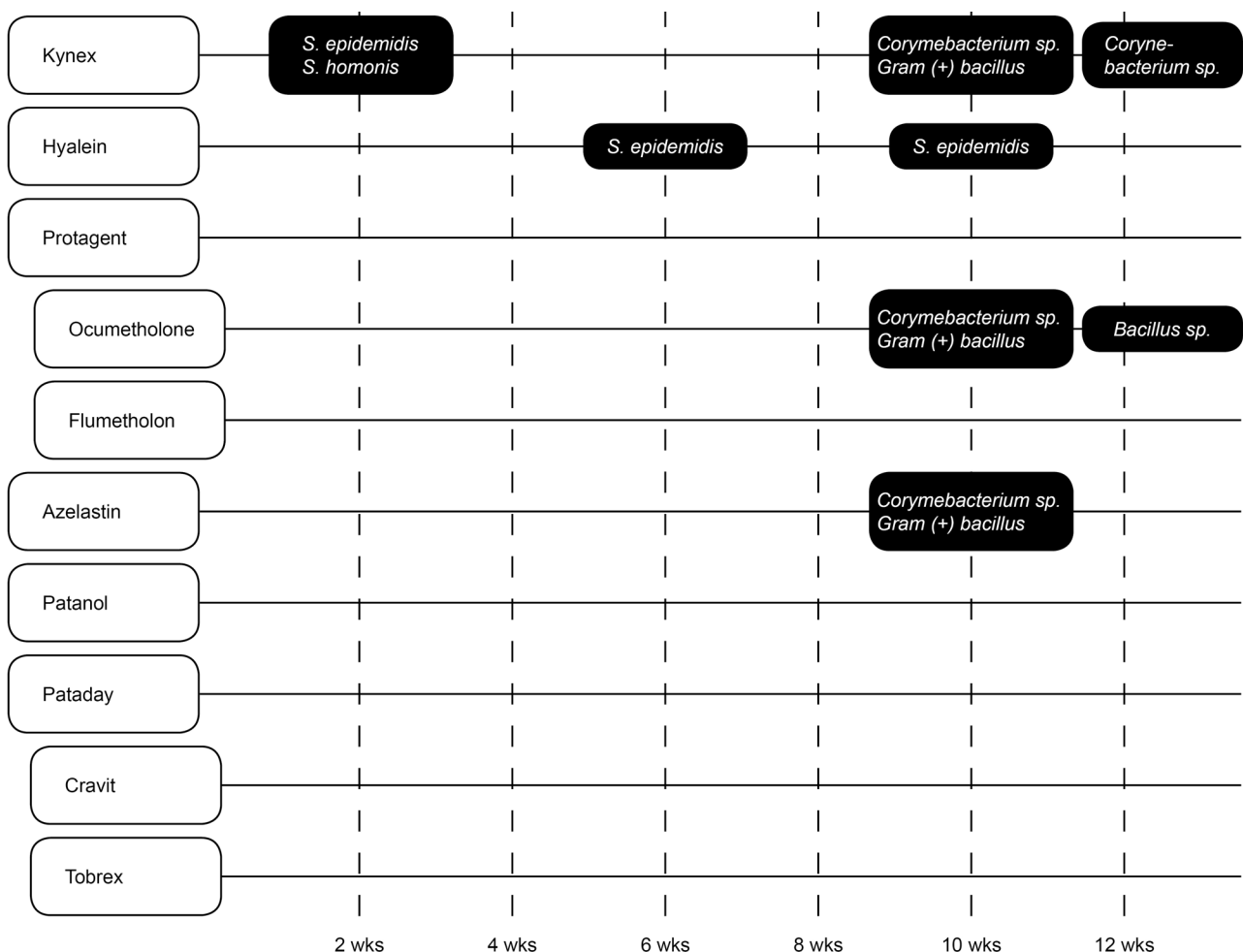


Figure 1. Results of culture test under room temperature. Several microbacilli are found in the artificial tears, corticosteroids eye drops and anti-allergic eye drops over time. *Corynebacterium* species are most common agents. wks = weeks.

낮다는 기존의 다른 연구와 같은 결과이다.³ 이번 연구에서는 오염된 안약 중에 1회용 인공누액만 실온과 냉장보관에서 차이를 보였으나 항알레르기제와 스테로이드제에서는 차이를 보이지 않았다. 이러한 차이에 대해서는 향후 병의 용기, 뚜껑의 밀봉 여부 등에 대한 연구가 필요하겠다.

Staphylococcus spp., *Bacillus spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*은 국소 점안제에서 흔히 발견된다.^{1,2,7,8} 이번 연구에서 배양된 미생물 중 *S. epidermidis*, *S. hominis*, *Rhodotorula spp.*, *Corynebacterium spp.*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *Rhodotorula spp.*은 기회감염으로 생각되고, *Corynebacterium spp.*이 안 표면에서 가장 흔하게 발견된 균이었으며 안과적으로는 병원성이 없다고 간주된다. 앞에서 언급된 균들이 기회감염균이긴 하지만 정상안에서 종종 집락화를 일으키기도 한다.⁹ 세균의 포자가 보존제에서도 살아남는 것을 고려할 때, 이론적으로 *Bacillus spp.*가 남은 용액에서 가장 우세하다.² 흥미로운 것은 *Rhodotorula spp.*

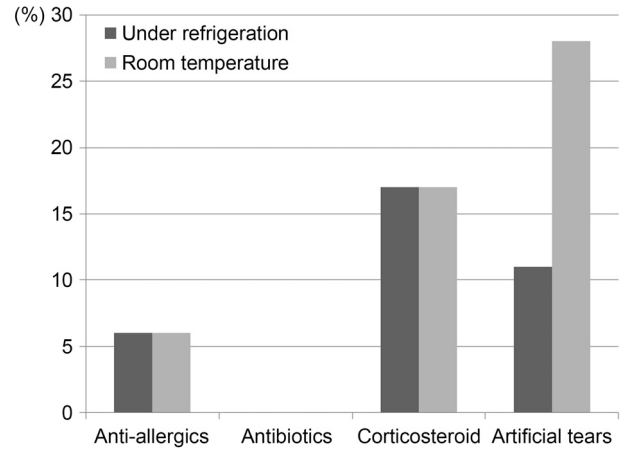


Figure 3. Culture positivity rate of different kinds of eye drops. Any bacteria are not cultured in the antibiotics. Among eye drops, artificial tears under room temperature is the most vulnerable to the contamination. As for anti-allergic eye drops and corticosteroids eye drops, there is no difference of contamination between room temperature and under refrigeration.

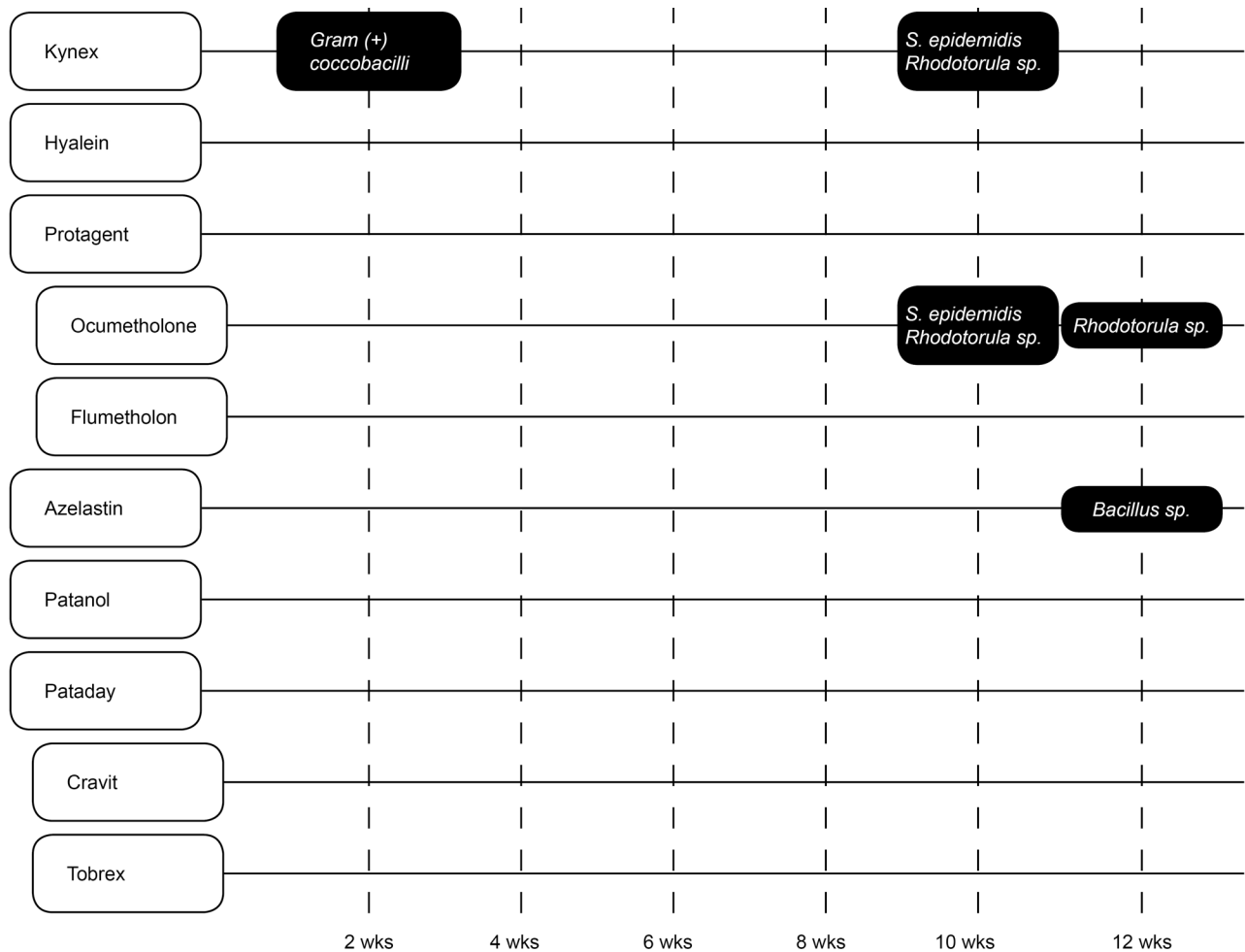


Figure 2. Results of culture test under low temperature. *Gram (+) coccobacilli*, *S. epidermidis*, *Rhodotorula sp.* and *Bacillus sp.* are detected in the artificial tears, corticosteroid eye drops and anti-histamine eye drops. wks = weeks.

는 냉장보관하에서만 검출되었다. *Rhodotorula spp.*는 Basidiomycota의 한 종류로 단세포 효모이다. 자연에 흔히 존재하는 유기체이며, 면역이 억제된 환자에서는 감염을 일으킬 수 있다.¹⁰ *Rhodotorula spp.*의 적정 성장 온도는 20-30°C이나, 4°C의 낮은 온도에서도 생존이 가능하다.¹¹ 반면 *Corynebacterium spp.*는 5°C에서 생존할 수 없어 냉장보관된 안약에서의 검출 가능성은 낮다.¹²

배양된 미생물은 반복된 배양검사에서 다시 자라지 않았다. 2주 뒤에 시행된 재 배양검사에서 균이 검출되지 않거나 부분적으로 검출되는 데는 몇 가지 이유가 있을 수 있다. 첫 번째로 환자가 사용하는 동안 오염을 막기 위해 용기에 첨가된 보존제의 효과 때문일 수 있다. 두 번째로 영양분의 결핍이 미생물의 성장을 막아줄 수 있다. 마지막으로 전체 용기의 오염이 아닌 병의 끝 부분만 오염된 경우에는 안약을 점안하는 동안 미생물이 씻겨 나가거나 제거될 수 있다. 이번 연구의 제한점으로는 각 안약제제의 오염이 동일하게 이루어졌는지에 대한 한계가 있다. 이를 최대한 줄이고자 한 실험자가 동일한 시간, 동일한 방법으로 실험을 진행하였으나 상황에 따른 손의 오염도를 고려하면 차후 실험적 방법으로 균의 배양 상태를 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

안약의 오염은 안구 감염을 일으킬 수 있기 때문에 환자들에게 안약병을 적절하게 다루는 것을 교육해야 한다. 이전의 연구에서 손가락이 안약 병에 닿는 것이 미생물의 오염의 중요한 위험인자로 밝혀졌다.¹³ 항생제가 포함된 안약은 다른 안약에 비해 낮은 오염을 보이는 것으로 나타났다.

항생제를 제외한 안약은 상온 보관 및 냉장보관하에서 오염될 수 있다. 특히 보존제가 없는 인공눈물의 경우 안약병을 위생적으로 다루는 것이 중요하다. 균 배양검사는 검사를 하는 시기에 따라 결과가 달라질 수 있기 때문에 연속 배양검사를 시행하는 것이 필요하다.

REFERENCES

- 1) Jokl DH, Wormser GP, Nichols NS, et al. Bacterial contamination of ophthalmic solutions used in an extended care facility. Br J Ophthalmol 2007;91:1308-10.
- 2) Teuchner B, Wagner J, Bechrakis NE, et al. Microbial contamination of glaucoma eyedrops used by patients compared with ocular medications used in the hospital. Medicine (Baltimore) 2015;94:e583.
- 3) Oldham GB, Andrews V. Control of microbial contamination in unpreserved eyedrops. Br J Ophthalmol 1996;80:588-91.
- 4) Lalitha P, Das M, Purva PS, et al. Postoperative endophthalmitis due to Burkholderia cepacia complex from contaminated anaesthetic eye drops. Br J Ophthalmol 2014;98:1498-502.
- 5) Mason BL, Alfonso EC, Miller D. In-use study of potential bacterial contamination of ophthalmic moxifloxacin. J Cataract Refract Surg 2005;31:1773-6.
- 6) Kim MS, Kim HK, Kim JM, Choi CY. Comparison of contamination rates between preserved and preservative-free fluoroquinolone eyedrops. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2013; 251:817-24.
- 7) Schein OD, Hibberd PL, Starck T, et al. Microbial contamination of in-use ocular medications. Arch Ophthalmol 1992;110:82-5.
- 8) Pinna A, Usai D, Zanetti S. Pseudomonas aeruginosa growth in Refresh Plus(R). J Ocul Pharmacol Ther 2011;27:561-4.
- 9) Locatcher-Khorazo D, Seegal BC. Microbiology of the Eye, 1st ed. St. Louis: Mosby, 1972;14-7.
- 10) Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of rhodotorula: an emerging pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis 2012;2012:465717.
- 11) Sanjay S, Khan AM, Butt M, et al. Rhodotorula mucilaginosa BPT1 can form arthrospore in response to cold-temperature. J Coast Life Med 2014;2:141-5.
- 12) Stanley SO, Rose AH. On the clumping of Corynebacterium xerosis as affected by temperature. J Gen Microbiol 1967;48:9-23.
- 13) Kim MS, Choi CY, Kim JM, et al. Microbial contamination of multiply used preservative-free artificial tears packed in reclosable containers. Br J Ophthalmol 2008;92:1518-21.

= 국문초록 =

점안약의 실온과 냉장보관에서의 2주 간격 연속 균 배양 결과

목적: 점안약을 인위적으로 오염시킨 후 연속 배양을 통해 미생물의 검출을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 보존제가 첨가된 안약과 첨가되지 않은 안약을 포함하여 총 10가지의 안약을 대상으로 하였다. 점안제에는 항알레르기제, 인공눈물, 항생제, 스테로이드제가 포함되었다. 동일한 안약 두 가지를 준비하여 한 그룹은 상온 보관하였고, 다른 한 그룹은 냉장 보관(2-5℃)하였다. 한 명의 실험 연구자에 의해 하루 두 번 병의 입구를 손으로 오염시킨 후 첫 번째 균배양은 2주 뒤에 시행하였고, 두 번째 균배양은 그로부터 2주 간격으로 총 6번 균 배양을 시행하였다.

결과: 냉장보관하에서는 보존제가 없는 인공눈물과 스테로이드제제, 항알레르기제 총 3개의 안약에서 오염이 발견되었다. 상온에서는 보존제가 없는 인공눈물, 보존제가 있는 인공눈물, 스테로이드제, 항알레르기제 4개에서 오염이 발견되었다. 13개의 오염된 안약에서 검출된 균은 5종류였다: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *Rhodotorula spp*, *Corynebacterium spp*, *Bacillus spp*. 12주간 6번 시행한 균 배양에서 냉장보관하 오염된 3개의 안약에서는 양성이 5번 나타났으며, 상온에서 오염된 4개의 안약에서는 8번의 양성이 보였으나 시행한 시간에 따라 변화가 있었다.

결론: 점안약은 상온보관과 냉장보관 모두에서 오염될 수 있다. 균 배양은 검사를 시행한 시간에 따라 달라질 수 있기 때문에 연속적으로 이루어져야 하며 면역체계가 취약한 환자에서는 유의하여 사용하는 것이 중요하다.

〈대한안과학회지 2020;61(5):466-471〉

강동현 / Dong Hyun Kang

김안과병원
Kim's Eye Hospital

