대한의진균학회지 제 4권 제 1호 1999

■ 원 저 ■

칸디다 균주에 대한 소독제들의 시험관내 항진균 효과

전남대학교 의과대학 피부과학교실

박진영 · 김수철 · 이승철 · 김영표 · 원영호

=Abstract=

In vitro Antifungal Activities of Several Disinfectants Against Candida Species

Chin Young Park, Su Chul Kim, Seung Chul Lee, Young Pyo Kim and Young Ho Won

Department of Dermatology, Chonnam University Medical School Kwangju, Korea

Background: The increased incidence of fungemia by hospital-acquired infection necessitates reevaluation of fungicidal activities of antiseptics and disinfectants.

Objective: We examined the candidacidal activity of several disinfectants including ethanol, phenol, povidone-iodine, and methanol which has been used commonly in the hospital. Candidal species tested were *Candida albicans, Candida krusei, Candida parapsilosis*, and *Candida guillermondii*.

Methods: All candidial stains were cultured in Sabouraud-dextrose agar (SDA), and the spore numbers of them were measured by a hemocytometer. After candidial suspensions were mixed with disinfectants of differant concentration for 30 second, they were washed with physiologic saline to remove disinfectants. The suspensions were adjusted into $1x10^4$ cfu/ml and were cultured in SDA at 30℃ for 72 hours. Minimal fungicidal concentration (MFC) was defined as the minimum concentration of a disinfectant to effect no growth of candidial strains. Minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the minimum concentration of a disinfectant to effect minimum growth of candidial strains.

Results: Our results showed that MFCs of candidial strains were 30～45% in Ethanol, 40～55% in methanol, 0.025～0.06% in povidon-iodine and 1～2% in phenol. All strains tested were killed by ethanol, methanol and povidone-iodine within 2 min at MIC, except phenol.

Conclusion: In conclusion, concentrations of disinfectants generally used in the hospital are sufficient to kill candidial strains. Careful procedure should be done in mycologic studies to eliminate the fungicidal effect of disinfectants. **[Kor J Med Mycol 4(1): 49-54]**

Key Words: *Candida*, disinfectants

서 론

근래 광범위 항생제나 스테로이드제의 장기 복용, 유치카테터사용, 면역억제제 및 항암제를 사용, 선천성 또는 후천성 면역기전 부전증 등 면역억제 상태의 환자가 증가함에 따라 병원내 감염(hospital-acquired infection)에 의한 국소 또는 전신

*본 논문의 요지는 97년 춘계 진균학회에서 보고되었음.

†별책 요청 저자: 이승철, 500-757 광주광역시 동구 학동 8 전남대학교 병원 피부과

성 진균증의 빈도가 증가되고 있다[1~7]. 칸디다 균은 병원성 혈류감염의 7%를 차지하며[8], 면역이 억제되었거나 말기 쇠약환자에서 심한 감염증을 일으켜 칸디다 혈증의 치사율은 25~57%를 차지하는 등 병원내 감염균으로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다[9]. 이에 저자들은 병원에서 흔히 사용되고 있는 4종의 소독제에 병원성 진균증 (hospital-acquired)의 주요 원인균인 *Candida albicans* (*C. albicans*를 비롯한 4종의 칸디다 균)을 노출시킨 후 가장 효과적인 살균농도와 노출시간 등을 비교함으로써 소독제를 이상적으로 사용하기 위한 기초자료를 마련하기 위해 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 칸디다 균주

실험에 사용된 칸디다 균주는 *C. albicans* 1주 (American Type Culture Collection 90028, 이하 ATCC), *C. krusei* 1주 (ATCC 14243), *C. parapsilosis* 1주 (ATCC 90018) 및 *C. guillermondii* 1주 (ATCC 90030)이었다.

2. 소독제

소독제로 피부와 점막 등의 소독에 사용되는 무수 에탄올 (ethanol anhydrous)과 베타딘® (povidone-iodine, 현대약품), 의료기구의 소독에 사용되는 메탄올 (methanol)과 페놀 (phenol)의 4종류이었으며, 각각 20~55%, 0.025~4%, 30~65% 및 0.0125~0.1%의 농도 범위 내에서 칸디다 균주의 성장 여부를 비교 조사하였다.

3. 칸디다 균 부유액 준비

일정 농도의 균 부유액을 얻기 위해 Sabouraud dextrose agar (SDA)에 균을 30℃에서 3일간 배양한 다음, 배양된 칸디다 균의 집락을 백금이로 채취한 후 멸균 생리식염수로 3회 균을 세척하여 균 부유액을 만들었다. 균 수를 hemocytometer로 계측하여 균 부유액의 농도를 2.5×10^7 cfu/ml이 되도록 생리식염수로 희석하여 실험에 사용하였다.

4. 살균력 평가방법

최소살균농도 (minimum fungicidal concentration, MFC)는 소독제의 살균작용에 의하여 집락이 관찰되지 않거나 배지표면이 마르면서 얇은 막의 형태를 보이는 소독제의 최소농도로 정의하였다. 소독제에 대한 최소살균농도를 측정하기 위하여 칸디다 균 부유액 100 μl를 각기 다른 농도의 소독제들 900 μl에 혼합하여 30초 동안 노출시킨 후 생리식염수로 세척하여 소독제를 제거하였다. 이를 더욱 희석하여 1×10^5 cfu/ml 농도의 부유액을 제조한 후 이중에서 1×10^4 개의 균을 취하여 SDA에 접종하고 30℃에서 72시간 배양한 다음 균의 집락 형성 여부를 육안으로 관찰하였는데 칸디다 균주의 집락은 배지표면으로부터 약간 융기되면서 촉촉한 형태로 관찰되었다. 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration: MIC)는 최소살균농도의 소독제를 점차 희석해가면서 노출시킨 후 배양하여, 극소수의 생존한 균주의 집락이 관찰되었을 때의 소독제 농도로 정의하였다. 최소억제농도의 소독제들에 균주를 30초, 60초, 90초 및 120초 동안 각각 노출시킨 후 생리식염수로 세척하여 1×10^5 cfu/ml 농도의 부유액을 만들고, 이 부유액에서 1×10^4 개의 균을 취하여 SDA에서 72시간 동안 배양한 후 균 집락의 감소 정도로서 노출시간에 따른 소독제의 억제능을 분석하였다.

결 과

1. 칸디다 균주에 대한 소독제의 최소살균농도

4가지 균주에 대한 최소살균농도는 에탄올은

Table 1. Minimal fungicial concentration of various antiseptics against *Cadida* species

	Ethanol	Methanol	Povidone	Phenol
C. albicans	35%*	45%	0.05%	1%
C. krusei	40%	50%	0.05%	1%
C. parapsilosis	45%	55%	0.025%	2%
C. guillermondii	30%	40%	0.05%	2%

*Mean concentration of antiseptic from 2-5 experiments

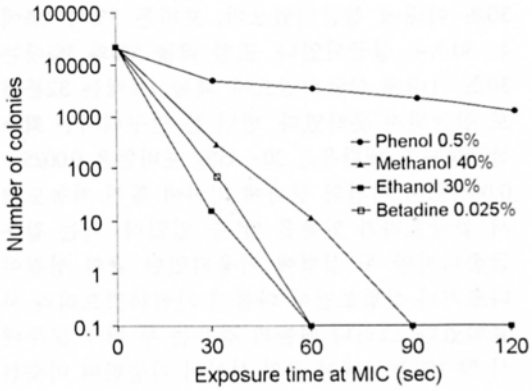

Fig. 1. Inhibitory activities of disinfectants against *C. albicans* at different exposure times at MIC.

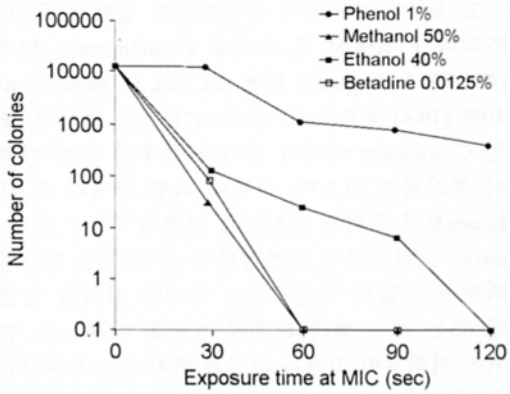

Fig. 3. Inhibitory activities of disinfectants against *C. parapsilosis* at different exposure times at MIC.

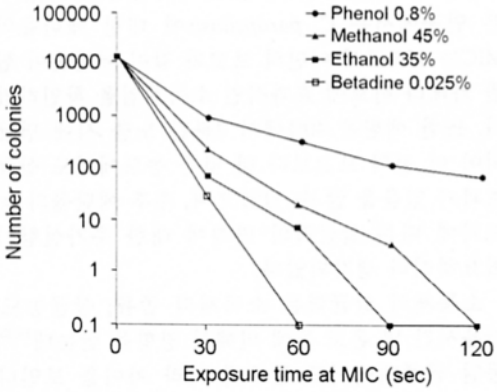

Fig. 2. Inhibitory activities of disinfectants against *C. krusei* at different exposure times at MIC.

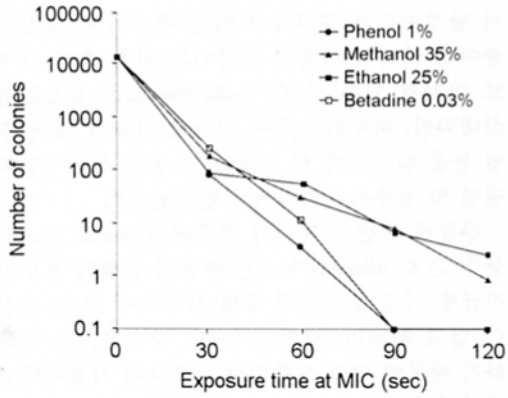

Fig. 4. Inhibitory activities of disinfectants against *C. guilliermondii* at different exposure time at MIC.

30~45%, 메탄올은 40~55%, 베타딘®은 0.0025~0.06%, 페놀 1~2%로 나타났다 (Table 1).

2. 칸디다 균주에 대한 소독제의 최소억제농도

최소살균농도 보다 한 단계 낮은 농도인 최소억제농도로서 각 소독제의 노출시간에 따른 균주의 성장을 관찰하였으며, 이를 2~5회 반복하여 평균치를 도표로 표시하였다. *C. albicans*의 경우는 최소억제농도에서 에탄올과 베타딘®에 60초, 메탄올에 90초의 노출시 성장이 억제되었으나, 페놀에는 120초간 노출시에도 균이 성장하였다 (Fig. 1). *C. krusei*는 최소억제농도에서 에탄올과 베타딘®에 60초, 메탄올에 120초 노출시 균주가 성장하지 않았고, 페놀에는 120초 동안 노출하여도 균이 성장하였다 (Fig. 2). *C. parapsilosis*의 경우는 메탄올과 베타딘®에 60초, 에탄올에 120초 노출시 성장이 억제되었고, 페놀에는 120초 동안 노출하여도 균이 성장하였다 (Fig. 3). *C. guillermondii*는 베타딘®과 페놀에 90초, 에탄올과 메탄올에 120초 노출시 균의 성장이 억제되었다 (Fig. 4).

고 찰

현대의학의 발전에 따라 감염성 질환들은 감소하고 있지만, 장기이식, 항암제 및 면역억제제의 사용, 각종 침습적 시술의 증가 등 의학의 진보에 수반되는 병원내 감염은 갈수록 중요성을 더해가고 있다. 칸디다균에 의한 감염은 현재 병원감염으로 인한 균혈증의 빈도중 4번째로 많으며, 국내에 보고된 진균 혈증의 원인균의 대부분(88%)을 차지한다[2,10].

고 등[10]의 연구에서 입원환자의 혈액배양에서 칸디다가 검출된 총 61예중 *C. albicans*는 30예 (49.2%), *C. tropicalis* 13예 (21.3%), *C. parapsilosis* 10예 (16.4) 등으로 *C. albicans*가 가장 많았다. 또한 *C. albicans* 이외의 칸디다 균주에 의한 감염이 증가하고 있으며, 이들에 의한 감염이 *C. albicans*보다 우위를 점한다고 하였다[4,10,11]. *C. albicans*는 소화기관과 피부점막에 상주하며, 인간의 피부에서 많이 발견되지는 않지만 상처를 입었을 때는 매우 빨리 피부에 집락을 이루는데, 면역이 저하되어 있거나 쇠약한 환자에서 기회감염을 일으키거나, 심한 진균감염질환을 일으킨다[12]. *C. parapsilosis*는 요로감염, 신우염, 심내막염, 피부칸디다증, 조갑 주위염, 중이염, 진균성 각막염, 진균 패혈증 및 질염 등에서 분리되는 균주로서 발생빈도가 증가되고 있는 추세이며, 심장수술이나 카테타 사용시 감염되는 가장 흔한 균주로 알려져 있다[13,14]. *C. guilliermondii*는 요로감염 심내막염, 피부칸디다증, 진균성 각막염 및 골수염 등을 일으키며, *C. krusei*는 드물게 심내막염과 질염 및 골수이식환자에서 발견된다[13].

진균에 대한 소독제의 연구에서 *van de Voorde* 등[15,16]은 *C. albicans*가 모든 종류의 진균과 효모양 진균중 가장 소독제에 대해 저항력이 크고, 성장이 쉽고 빠르며, 실험자에게도 상대적으로 무해하기 때문에 단일 실험대상 균주로서 적절하다고 제안하였다.

실험대상 소독제의 살균작용의 기전으로 알코올은 세균, 진균 및 결핵균에서 유기용제로서 지질막에 작용하며, 주로 탄화수소와 반응하여 지방성 구조를 파괴한다. 이외에도 알코올과 여러 유기용제는 세포막에 대한 효과뿐만 아니라 세포단백을 변성시킴으로써 살균작용을 나타낸다[17]. 포비돈은 수용성으로 polyvinylpyrolidone과 요오드의 화합물로서 10% 용액 내에 1%의 유리요오드를 함유하고 있다. 이중 요오드는 세균의 세포벽을 매우 빨리 투과하여 단백질과 핵산구조를 파괴하며, 합성을 억제함으로써 살균작용을 나타낸다[16]. 페놀은 효소체계를 불활성화시키고, 단백질을 응고시키며, 세포막과 세포벽을 분열시킴으로써 세균, 결핵균, 바이러스 및 진균 등에 살균작용을 한다[17].

칸디다균에 대한 소독제의 연구는 그리 많이 보고되어 있지 않은데, 조 등[18]의 연구에서는 *C. albicans*는 에탄올 75%와 포비돈 10%에 대하여 30초 이내에 살균되었으며, 포비돈 5%와 1%에는 30초에 살균되었다. 또한 페놀 5%와 3%에는 30초 이내에 살균되었으나 페놀 1%에는 32분에도 살균되지 못하였다. 반면 본 연구에서는 최소살균농도가 에탄올은 30~45%, 포비돈은 0.0025~0.06%로서 이전의 결과에 비하여 훨씬 저농도에서 살균효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 같은 균종이지만 두 실험에 이용되었던 균의 성질이 다르거나 실험조건이 다름에 기인하였으리라 사료되었다. 그러나 페놀의 경우는 두 연구 모두에서 약 1% 농도에서 균의 성장이 가능하여 비슷한 실험결과를 보였다. Salzman 등[14]은 *C. parapsilosis*에 대한 에탄올의 살균력에 있어서 70%와 97% 농도가 큰 차이가 없으나 카테타 허브 (hub) 소독에는 70% 에탄올이 가장 효과적이라고 하였다. 본 연구에서는 *C. parapsilosis*에 대한 에탄올의 MIC는 45%로서 이전의 보고와 같이 에탄올이 혈관 카테타 허브에 효과적인 소독제임을 확인하였다. 또한 에탄올 40%에서 2분간 노출 시에 멸균되어 이 전의 보고보다 더 낮은 농도에서도 살균효과가 있음을 알 수 있었으며, 추후 에탄올의 농도차에 따른 살균력의 변화에 대한 추가실험이 필요하리라 생각되었다.

소독제의 살균력은 소독제의 종류, 살균농도, 작용시간 및 온도 등에 의해서 영향을 받는데[19,20], 동일 균종내에서도 균주에 따라 차이를 보인다고 하였다[20]. 본 연구에서도 소독제의 종류, 농도 및 작용시간에 따른 소독제들의 살균력의 차이를 관찰할 수 있었으며, 같은 조건에서도 실험오차가 어느 정도 존재함을 알 수 있었다. Bloomfield 등[21]의 소독제에 대한 살균력 실험에서도 반복성 및 재현성에 있어서 실험기간들 뿐만 아니라 실험실들 사이에서도 차이를 나타내었고, 시험 균주의 저항성이 날짜와 기간 사이에 변이를 나타낸다고 하였다. 그러므로 표준 현탁액 검사에서 숙련된 실험자가 신선한 현탁으로 다른 날에 최소한 두 번 이상 시행해야 하며, 재검사시에도 신선한 현탁액을 준비해야 한다고 주장하였다. 본 연구에서는 서로 다른 날 2~5번에 걸쳐서 시험하였으며, 이들의 평균치를 도표로 표시하였다. 또한, *van de Voorde* 등[16]에 의하면 배지에 따라 *C. abicans*의 성장형태가 달라지며, 소독제에 대한 저항성이 균사체보다는 효모형태가 크다는 점으로 보아 이러한 점도 실험결과의 차이를 유도하였으리라 생각된다. 본 연구에서는 모

두 효모형태의 칸디다 균을 사용하였으며, 균사형태와 비교하지는 아니하였다.

향후 다양한 살균제에 대하여 반복 실험을 실시하여 이들 소독제에 대한 살균력 검사의 재현성을 높이는 표준 검사법을 개발하고, 이를 토대로 가장 이상적인 소독제를 임상에 응용할 수 있도록 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다. 또한 진균검사시 시료를 채취하기 위한 전처치로서 시행하는 피부소독이 칸디다 균 배양에 영향을 미칠 가능성이 있으므로 이에 대하여도 세심한 주의가 필요하리라 생각된다.

결 론

저자들은 병원에서 자주 쓰이는 소독제인 에탄올, 메탄올, 베타딘® 및 페놀 등으로 4종류의 칸디다 균주에 대하여 감수성을 검사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 4종류 칸디다 균주의 최소살균농도는 에탄올 30~45%, 메탄올 40~55%, 베타딘® 0.025~0.06% 및 페놀 1~2%이었다.

2. 각 소독제의 최소억제농도에 각종 칸디다 균주를 노출시킬 때 에탄올, 메탄올 및 베타딘®에서 2분 이내의 노출시간으로 모든 균주의 성장이 억제되었으나, 페놀의 경우 *C. guillermondii*를 제외한 균주에서 2분 이내의 노출시간으로는 균주의 성장이 억제되지 않았다.

이러한 결과를 토대로 현재 병원에서 사용하는 소독제의 농도는 여러 칸디다 종에 대한 성장억제를 위해서는 충분한 농도임을 알 수 있었으며, 피부과의 진균검사시 전처치로서 시행하는 피부소독이 칸디다 균의 배양에 영향을 주리라 생각되었다.

참 고 문 헌

1. 김병일, 김준명, 김응, 등. 진균혈증에 대한 임상적 고찰. 대한내과학회잡지 1989; 36: 689
2. 신형식, 백경란, 배현주, 정문현, 등. 칸디다 혈증의 임상적 고찰. 감염 1991; 25: 257-263
3. 홍석일, 김대원, 석종성, 등. 최근 2년간 임상검체에서 분리된 진균 (1981-1982). 대한임상병리학회지 1983; 3: 45
4. Komshian SV, Uwaydah AK, Sovel JD, et al. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: Frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. Rev Infect Dis 1989; 11: 379
5. Klein JJ, Watanakunakorn C. Hospital-acquired fungemia: Its natural course and clinical significance. Am J Med 1979; 67: 51
6. Harvey RL, Myers JP. Nosocomial fungemia in a large community teaching hospital. Arch Intern Med 1987; 147: 2117
7. Gold JWM. Opportunistic fungal infections in patients with neoplastic disease. Am J Med 1984; 76: 458
8. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 428-442
9. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, et al. Hospital-acquired candidemia; attributable mortality and excess length of stay. Arch Intern Med 1988; 148: 2642-2647
10. 고경식, 서환조. 병원성 진균혈증의 임상적 고찰. 대한내과학회잡지 1993; 44: 620-626
11. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. Am J Med 1991; 91: 86S-89S
12. Schaber DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. Am J Med 1991; 91: 72S-75S
13. Fisher FW. Fundamentals of diagnostic mycology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998: 202-212
14. Salzman MB, Isenberg HD, Rubin LG. Use of disinfectants to reduce microbial contamination of hubs of vascular catheters. J Clin Microbiol 1993; Mar: 475-479
15. *van de Voorde H, Reybrouck G, Van Dijck P, et al.* The choice of fungi as test organisms in disinfectant testing. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig 1984; B179: 125-129
16. *van de Voorde H, Van Dijck P, Reybrouck G.* Influence of the growth characteristics of *Candida albicans* on disinfectant testing. Zbl. Bakt. Hyg 1987; B184: 160-166

17. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995: 27-245
18. 조한익, 김진규, 김의종, 등. 병원에서 사용하는 각종 소독제의 살균효과에 관한 조사연구. 대한의학협회지 1986; 29: 1115-1123
19. Maki DG. Nosocomial bacteremia; An Epidemiologic overview. Am J Med 70; 1981: 719-732
20. Schaberg DR, Weinstein RA, Stamm WE. Epidemics of nosocomial urinary tract infection caused by multiply resistant Gram-negative bacilli; Epidemiology and Control. J Infect Dis 1976; 133: 363
21. Bloomfield SF, Looney E. Evaluation of the repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. J (Appl) Bacteriol 1992; 73: 87-93