

Colonization of Pathogens in Earphones and Observation of Effective Sterilization Methods and Cycles

Hyeokjin Kwon*, Myeongguk Jeong*, Shinjee Go**, Yeojin Kim**, Yein Kim**, Yeeun Kim**, Seungjun Roh**, Seonggwang Lee** and Go-Eun Choi†***

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea

The use of earphones has recently been widely used around the world. In currently, students wear earphones a lot in a daily life. The types of earphones are open-earphones, Canalphones, and headphones. Many students don't periodically to sterilization their earphones. Therefore, it can be an incubator that can induced ear infections. The objective of this study was to detect the pathogenic bacteria from the earphones used by the students. A total of 3 type earphones swabs were collected by sterile cotton swabs. The swabs were inoculated onto BHI agar and incubated aerobically 48 hour at 37°C. 16s rRNA PCR, electrophoresis and sequencing were performed to confirm the identification of all the bacterial isolates. As a result, 24 pathogens were identified in sequencing. Three types of earphones were sterilized in three ways: ultraviolet (UV), 70% ethyl alcohol, and antibacterial wet tissue. If you use earphones for a long time without disinfecting them for a long time, it causes various diseases such as external ear infections. The findings of this study the users periodically to sterilization their respective earphones.

Key Words: Externa, Earphone, PCR, Electrophoresis, Sterilization

서 론

최근 들어 혼자 시간을 보내는 문화가 대중화되면서 주변의 소음을 회피하기 위한 방안으로 이어폰 사용이 늘어나고 있다. 특히, 청소년들의 이어폰 사용 빈도가 성인의 사용 빈도보다 더 높게 나타났으며, 주로 스마트폰이나 태블릿 PC를 이용하여 인터넷 강의나 영상 등을 많이 시청하는 것으로 조사된 바 있다(Lee, 2018; Koo and Kim, 2020). 이어폰을 사용하는 사람들이 점차 증가하면서 관련 질병 또한 자주 발생하는데 그 중 대표적인 질병 중 하나가 외이도염이다(Abbinay and Bharathi, 2012).

외이도는(Externa) 귀를 구성하는 부분 중에서 귓바퀴에서 고막까지의 길을 말하며, 외이도염은 여러 가지 원인으로 인해 발생되는데 대표적으로 외이도가 세균이나 곰팡이 등에 감염되어 염증이 생긴다. 특히 외이도염은 습한 여름에 잘 생기는 질환이며, 수영장이나 목욕을 한 후 귀를 후비는 행위를 통해 피부가 약해지면서 세균이나 곰팡이에 의해 감염이 쉽게 발생할 수 있다(Nichols, 1999; Wiegand et al., 2019). 외이도염의 약 90% 이상은 세균에 의해 유발되며(Roland and Stroman, 2002), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 22~62%, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 11~34% 두 개의 균 종이 가장 흔하게 외이도염을 유발한다(Ijaz et al., 2014; Rosenfeld et al., 2014;

Received: September 19, 2022 / Revised: September 23, 2022 / Accepted: September 23, 2022

* Graduate student, ** Undergraduate student, *** Professor.

† Corresponding author: Go-Eun Choi. Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea.

Tel: +82-51-510-0563, Fax: +82-51-510-0568, e-mail: gechoi@cup.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

Table 1. Primer sequences to amplify 16s rRNA gene

Primer name	Sequence	Amplicon (bp)	References
Forward 27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1,504	(Lane et al., 1985)
Reverse 1492r	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'		

Musso and Crews, 2016). 그 외의 약 10%의 균으로는 누룩곰팡이속(*Aspergillus*) 80~90%가 있다(Boustred, 1999; Sander, 2001). 외이도염의 초기 증상은 가려움증과 함께 미미한 통증을 동반하며, 이후에는 극심한 통증이 동반된다(Wiegand et al., 2019). 이로 인해 식사에 방해를 주고 수면이나 보행에 어려움을 동반한다. 외이도염의 치료 방법은 귀를 깨끗하게 소독하고, 항생제와 진통제 등의 약물로 치료하여야 한다. 외이도에 고름 주머니가 형성된 경우에는 이를 절개해 고름을 제거해야 하며 외이도염 청소는 반드시 이비인후과 의사에 의해 조심스럽게 행해져야 한다. 외이도염 등 귀 질환을 예방하려면 손과 귀, 이어폰 등을 주기적으로 소독하여야 한다(Sander, 2001). 이어폰을 사용하는 사람은 점차 증가하는 반면, 외이도염 등 관련 질병에 대한 위험성과 소독 방법에 관해 알려진 바가 거의 없어 소독의 필요성을 인식시키기 위해 본 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 이어폰 3가지 종류를 사용하여 어떠한 병원균이 있는지 확인하고 자외선(UV), 70% Ethyl alcohol, 항균 물티슈를 이용하여 소독 전 후를 비교 분석해 소독의 필요성을 확인하고자 한다(Madigan et al., 2006; Oughton et al., 2009; Buonanno et al., 2017).

재료 및 방법

시료 수집 및 DNA 추출

본 연구에서 사용된 이어폰은 외이의 접촉면에 따라 종류를 나누어 실험하였다. 선정된 3가지 종류의 이어폰은 오픈 이어폰(Open-earphones), 커널 이어폰(Canalphones), 헤드폰(Headphones)으로 사용하였으며, 하루 평균 3시간 이상 사용하는 학생 대상의 이어폰을 수집하였다. 시료 수집은 멸균 면봉으로 이어폰 표면을 긁은 후 BHI agar에 접종하였다. 배양 조건은 37°C, 48시간 배양하였으며, 배양 후 총 24개의 단일 집락을 수집하였다. 수집한 단일 집락은 DNA 추출에 사용하였다. DNA 추출은 Kit (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit - 3032) 제조사의 지시에 따라 사용하였다.

PCR, 전기영동

16S rRNA 유전자 서열의 PCR 증폭은 Bacteria primer (Table 1)를 사용하였다. PCR 과정은(Marchesi et al., 1998)을 참고 및 변형하여 방법을 사영하였다. Initial denaturation 95°C에서 10분 denaturation 95°C 30초, annealing 54°C 30초, extension 72°C 30초, 32 Cycle 증폭 후 Final extension 72°C 5분 동안 실시하였다. 1% Agarose gel (Lonza, Basel, Swiss)에 NEOgreen (CELLGENTEK, Deajeon, Korea) 시약을 혼합 후 Mupid-2plus (Takara, Kusatsu, Japan)를 사용하여 실시하였고, ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 DNA Band를 확인하였다. 전기영동 과정은(Southern, 1975)을 참고 및 변형하여 실시하였다. 염기서열 분석은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 동정하였다.

이어폰 소독

이어폰 소독 방법은 인체에 유해하지 않고 흔히 사용되며, 기기에 손상을 가하지 않는 방법을 사용하였다. 각 실험군 별로 자외선(UV) 처리, 70% Ethyl alcohol 처리, 항균 물티슈 처리로 나누어 소독하였으며 자외선(UV) 소독은 254 nm 파장으로 10분, 20분, 30분으로 진행하였으며, 항균 물티슈(BIOMAX, Seoul), 70% Ethyl alcohol을 이용하여 이어폰 표면을 닦았다. 이 후 살균 효과를 확인하기 위해 소독 후 3시간 동안 착용하였고, 시료 채취는 멸균 면봉을 이용하여 이어폰 표면에서 채취하여 BHI agar에 접종했으며, 그 후 CFU 수를 측정하였다.

결 과

시료 수집 및 PCR

3가지 종류의 이어폰(Open-earphones, Canalphones, Headphones) 표면을 멸균 면봉으로 긁어 BHI agar에 접종하여 37°C, 48시간 배양 후 24개의 단일 집락을 수집하였으며, 수집한 시료는 16s rRNA PCR에 수행하였다.

전기영동 및 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물을 전기영동 한 후(Fig. 1), Macrogen에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 분석 결과는 NCBI BLAST (National Center for Biotechnology information Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 통해 염기

서열의 유사도를 분석하여 24개의 균 동정을 확인하였다. *Staphylococcus epidermidis* 균종이 12건, *Staphylococcus capitis* 균종 5건, *Staphylococcus caprae* 균종 2건, *Staphylococcus hominis subsp. Novobiosepticus* 균종 2건 그리고 *Kocuria marina*, *Micrococcus yunnanensis*, *Bacillus velezensis* 균종이 각 1건씩 분리되었다(Table 2).

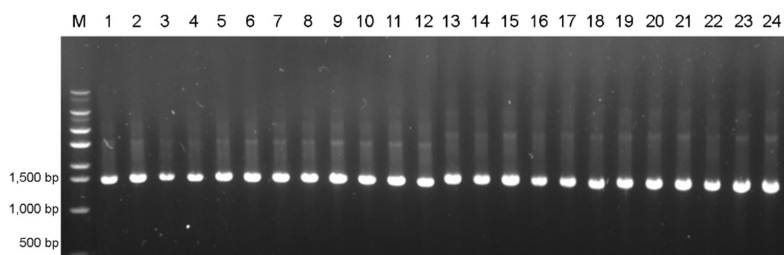


Fig. 1. PCR gel electrophoresis showing 16S rRNA gene bands (at 1,500 bp) of the isolated bacterial groups. Samples were collected bacteria from earphones and then 1% agarose gel electrophoresis analysis of 16s rRNA gene amplified. Lane M, 1 kb DNA ladder; lanes 1 to 5 are Open earphones DNA bands, and lanes 6 to 21 are Canalphones DNA bands. The last 22nd to 24th lanes are Headphones DNA bands.

Table 2. Sequencing results of identified pathogens in 3 types of earphones

Type	No.	Binominal nomenclature	16s rRNA Per. Ident
Open earphones	1	<i>Staphylococcus capitis</i>	100%
	2	<i>Staphylococcus hominis subsp. Novobiosepticus</i>	99.8%
	3	<i>Staphylococcus hominis subsp. Novobiosepticus</i>	99.6%
	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%
	5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.9%
Canalphones	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.7%
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.9%
	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.8%
	4	<i>staphylococcus caprae</i>	98%
	5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.82%
	6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.9%
	7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%
	8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.56%
	9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%
	10	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	100%
	11	<i>Staphylococcus capitis</i>	100%
	12	<i>Staphylococcus capitis</i>	100%
	13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%
	14	<i>Bacillus velezensis</i>	100%
	15	<i>Staphylococcus capitis</i>	100%
	16	<i>Staphylococcus caprae</i>	100%
Headphones	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%
	2	<i>Staphylococcus capitis subsp. urealyticus</i>	100%
	3	<i>Kocuria marina</i>	99.8%

Table 3. The results of the CFU counts after the sterilization

Type	UV								
	10 min			20 min			30 min		
	Before (CFU/mL)	After (CFU/mL)	Sterilization rates (%)	Before (CFU/mL)	After (CFU/mL)	Sterilization rates (%)	Before (CFU/mL)	After (CFU/mL)	Sterilization rates (%)
Open earphones	172	45	26.1%	1,208	9	99.25%	544	0	100%
Canalphones	TNTC	TNTC	0%	TNTC	25	99%	1,592	0	100%
Headphones	51	4	7.84%	542	8	98.5%	327	0	100%

TNTC: Too Numerous To Count

Table 3. The results of the CFU counts after the sterilization (continues)

Type	70% Ethyl alcohol			Antibacterial wet tissue		
	Before (CFU/mL)	After (CFU/mL)	Sterilization rates (%)	Before (CFU/mL)	After (CFU/mL)	Sterilization rates (%)
Open earphones	398	0	100%	326	3	99.08%
Canalphones	TNTC	3	99%	789	17	97.85%
Headphones	164	3	98.17%	141	2	98.58%

TNTC: Too Numerous To Count

이어폰 소독

자외선(UV), 70% Ethyl alcohol, 항균 물티슈 3가지 방법으로 소독한 결과 자외선(UV) 10분과 20분에서 소독 효과를 볼 수 없었으며, 30분부터 소독의 효과를 볼 수 있었다(Table 3). 항균 물티슈, 70% Ethyl alcohol 소독 방법은 자외선 10분, 20분 보다 효과를 볼 수 있었다(Table 3). 소독의 효과는 자외선(UV) 소독 30분이 가장 좋았으며 다음 70% Ethyl alcohol, 항균 물티슈 순으로 소독에 효과가 있었다. 자외선을 10분간 노출시켰을 시 오픈형 이어폰은 172 CFU/mL에서 45 CFU/mL로 26.1% 살균되었고, 커널형 이어폰 TNTC (Too Numerous To Count)에서 TNTC로 0%, 헤드폰 51 CFU/mL에서 4 CFU/mL로 7.84% 살균되었다. 20분 노출시켰을 때에는 오픈형 이어폰 1,208 CFU/mL에서 9 CFU/mL로 99.25%, 커널형 이어폰 TNTC에서 25 CFU/mL로 99%, 헤드폰 542 CFU/mL에서 8 CFU/mL로 98.5% 살균되었다. 30분 노출시켰을 때에는 3종류 이어폰 모두 100% 살균 효과를 볼 수 있었다. 70% Ethyl alcohol로 이어폰 표면을 닦았을 때에 오픈형 이어폰은 398 CFU/mL에서 0 CFU/mL로 100%, 커널형 이어폰 TNTC에서 3 CFU/mL로 99%, 헤드폰 164 CFU/mL에서 3 CFU/mL로 98.17% 살균이 되었으며, 항균물 티슈를 이용해서 이어폰 표면을 닦았을 때에는 오픈형 이어폰 326 CFU/mL에서 3 CFU/mL로 99.08%, 커널형 이어폰 789 CFU/mL에

서 17 CFU/mL로 97.85%, 헤드폰 141 CFU/mL에서 2 CFU/mL로 98.58% 살균되었다.

결론 및 고찰

이어폰 소독은 외이도염이나 염증을 예방하고 병원감염을 관리하는데 있어 간단하면서도 가장 중요한 방법이다. 효과적인 소독을 하기 위해서는 소독 방법, 시간이 중요하며, 이어폰 기기 손상이 없어야 한다. 외이도염은 여러 가지 원인으로 외이도에 세균이나 곰팡이 등에 감염되어 염증이 생기는 것을 말한다. 외이도의 약 90% 이상은 세균에 의해 생기는 것이며 심할 경우 악성 외이도염이 발생할 수 있다. 본 연구는 이어폰을 통한 외이도염 및 염증을 심각성과 안전성 확보를 위해 이어폰에 있는 병원균을 찾고 예방과 이어폰 소독의 중요성을 알리고자 하였다.

흔히 사용하는 이어폰 3종류(Open earphones, Canalphones, Headphones)를 대상으로 염기서열 분석 결과 *Staphylococcus epidermidis* 균종이 12건 *Staphylococcus capitis* 균종 5건, *Staphylococcus caprae* 균종 2건, *Staphylococcus hominis* subsp. *Novobiosepticus* 균종 2건 그리고 *Kocuria marina*, *Micrococcus yunnanensis*, *Bacillus velezensis* 균종이 각 1건씩 분리되었다. *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. hominis* 균종은 Coagulase Negative Species (CoNS)이며, 피

부 및 점막에 서식하는 상재균이다. 건강한 사람에게는 질병을 야기하지 않지만, 면역력이 저하된 사람에게 복막염, 인공 판막 심내막염, 수막염, 골수염 등 여러 질병을 야기할 수 있다. *K. marina*은 피부와 구강에 서식하는 균종이며, 비병원성으로 간주되지만 요로감염, 담낭염, 각막염 등 일부 질병을 유발할 수 있다.

수집된 미생물을 대상으로 살균 효과를 확인하기 위해 자외선(UV), 70% Ethyl alcohol, 항균 물티슈 3가지 방법으로 소독하였다. 실험 전과 후의 미생물 분포도를 비교 분석하기 위해, 3종류 이어폰을 소독 전과 소독 후 3시간 동안 착용한 이어폰으로 그룹화 하여 비교 분석하였다. 시료 채취는 멸균 면봉을 이용하여 이어폰 표면에서 채취하여 BHI agar에 접종했으며, 그 후 CFU 수를 측정하였다. 그 결과 자외선을 10분간 노출시켰을 시 오픈형 이어폰은 26.1% 살균되었고, 커널형 이어폰은 0%, 헤드폰은 7.84% 살균되었다. 20분 노출시켰을 때에는 오픈형 이어폰 99.25%, 커널형 이어폰 99%, 헤드폰은 98.5% 살균되었다. 30분 노출시켰을 때에는 3종류 이어폰 모두 100% 살균 효과를 볼 수 있었다. 70% Ethyl alcohol로 이어폰 표면을 닦았을 때 오픈형 이어폰 100%, 커널형 이어폰 99%, 헤드폰 98.17% 살균이 되었으며, 항균 물티슈를 이용해서 이어폰 표면을 닦았을 때에는 오픈형 이어폰 99.08%, 커널형 이어폰 97.85%, 헤드폰 98.58% 살균되었다.

결론적으로 이어폰 소독 전과 후 차이를 보여주며, 소독 전 이어폰에서 여러 미생물이 채취된 것을 확인할 수 있었다. 이어폰을 장시간 착용할 경우 귓속 환기를 어렵게 하여, 귓속 습도를 높이고 미생물 증식의 원인이 된다. 특히, 오픈형 이어폰과 달리 커널형 이어폰의 경우 착용 시 외이도와 직접 접촉하기 때문에, 주기적으로 소독하기를 권장한다.

시료 채취 방법에서 연구자 한 명이 동일한 부위에서 반복하여 검체를 채취하더라도 문지르는 강도나 채집 부위가 일치하지 않을 가능성이 있었다. 하지만 본 연구 결과에서 사용한 3가지 소독 방법은 환경관리를 대체하기 위함이 아니라 이어폰 사용자들에게 좋은 제안이 될 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENT

None.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Abbinay S, Bharathi P. Mobile phones in hospital settings: A serious threat to infection control practices. *Occup Health Saf.* 2012. 74: 115-118.
- Boustred N. Practical guide to otitis externa. *Australian Family Physician.* 1999. 28: 217-221.
- Buonanno M, Ponnaiya B, Welch D, Stanislauskas M, Randers-Pehrson G, Smilenov L, Lowy FD, Owens DM, Brenner DJ. Germicidal efficacy and mammalian skin safety of 222-nm uv light. *Radiation Research.* 2017. 187: 493-501.
- Ijaz T, Anjum AA, Aslam S, Raja SA, Khawaja AR, Ijaz S. Microbial profiling and risk factors assessment for otitis media and otitis externa. *Advancements in Life Sciences.* 2014. 1: 191-196.
- Ku ES, Kim SJ. A study on user experience through the analysis of generation Z's earphone use behavior. *Digital Convergence Research.* 2020: 18: 317-323.
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16s ribosomal rna sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1985. 82: 6955-6959.
- Lee SJ. Mental health analysis of smartphone addicted adolescents. *Youth Welfare Research.* 2018. 20: 47-67.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biology of microorganisms. 2006. 11. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. Design and evaluation of useful bacterium-specific pcr primers that amplify genes coding for bacterial 16s rna. *Applied and Environmental Microbiology.* 1998. 64: 795-799.
- Musso MF, Crews JD. Infections of the external ear. In: *Infectious Diseases in Pediatric Otolaryngology.* Springer, Cham, 2016. p. 15-28.
- Nichols AW. Nonorthopaedic problems in the aquatic athlete. *Clinics in Sports Medicine.* 1999. 18: 395-411.
- Oughton MT, Loo VG, Dendukuri N, Fenn S, Libman MD. Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of clostridium difficile. *Infection Control & Hospital Epidemiology.* 2009. 30: 939-944.

Roland PS, Stroman DW. Microbiology of acute otitis externa. *The Laryngoscope*. 2002. 112: 1166-1177.

Rosenfeld RM, Schwartz SR, Cannon CR, Roland PS, Simon GR, Kumar KA, Huang WW, Haskell HW, Robertson PJ. Clinical practice guideline: Acute otitis externa. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. 2014. 150: S1-S24.

Sander RW. Otitis externa: A practical guide to treatment and prevention. *American Family Physician*. 2001. 63: 927.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 1975. 98: 503-517.

Wiegand S, Berner R, Schneider A, Lundershausen E, Dietz A.

Otitis externa: Investigation and evidence-based treatment. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2019. 116: 224.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2022.28.3.186>

Cite this article as: Kwon H, Jeong M, Go S, Kim Y, Kim Y, Kim Y, Roh S, Lee S, Choi GE. Colonization of Pathogens in Earphones and Observation of Effective Sterilization Methods and Cycles. *Biomedical Science Letters*. 2022. 28: 186-191.