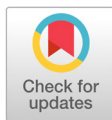


Korean Journal of Clinical Dental Hygiene

Original Article

*Acinetobacter baumannii*와 *Candida albicans*의 배양시간에 따른 자가형광발현과 pH의 변화 비교

이윤선¹, 한선영^{1,2*}¹연세대학교 치위생학과 · ²연세대학교 구강건강증진센터

Received: March 02, 2021

Revised: March 12, 2021

Accepted: March 12, 2021

Comparison of Autofluorescence and pH Changes in *Acinetobacter baumannii* and *Candida albicans* Cultures based on Incubation Time

Yun-Seon Lee¹, Sun-Young Han^{1,2*}¹Department of Dental Hygiene, Yonsei University, Wonju, 26493, Republic of Korea²Center for Oral Health Promotion, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, 26426, Republic of Korea

*Corresponding Author: 한선영, (26493) 강원도 원주시 연세대길1 연세대학교 치위생학과, Tel: (033) 760-5562, Fax: (033) 760-2919, E-mail: syhan0724@yonsei.ac.kr

ABSTRACT

Objectives: Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D) was used to investigate the relationship between the autofluorescence characteristics of *Acinetobacter baumannii* and *Candida albicans* (a major causative agent and a risk factor for nosocomial pneumonia, respectively) and pH change. **Methods:** *A. baumannii* and *C. albicans* were the experimental microorganisms, and *Streptococcus mutans* was the control. Autofluorescence expression was assessed by smearing the cells on a solid medium and imaging for QLF-D at 48 h intervals for 168 h. The R/G ratio was calculated for the three types of colonies. The pH of the cultures (in liquid media) was measured for each incubation time. For statistical analysis, the Kruskal-Wallis test and Pearson correlation analysis were performed using SPSS version 25.0. **Results:** *A. baumannii* emitted orange fluorescence; the R/G ratio and pH increased at 24 h and peaked at 168 h, and exhibited positive correlation. *C. albicans* emitted reddish fluorescence; the R/G ratio and pH increased at 24 h, peaked at 120 h, and subsequently decreased. *S. mutans* did not exhibit fluorescence. **Conclusions:** The fluorescence of the *A. baumannii* cells was clearly observed, and the pH of the medium increased. The pH of the *C. albicans* culture peaked at 120 h and then decreased gradually. The correlation between autofluorescence and pH was confirmed.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, Fluorescence, pH, Aspiration Pneumonia, Quantitative Light-Induced Fluorescence

색인: 아시네토박터 바우마니, 캔디다 알비칸스, 형광, 수소이온농도, 흡인성폐렴, 정량광형광기

1. 서론

폐렴은 요로감염에 이어 두 번째로 많이 차지하는 병원과 관련된 감염으로(1-3) 원내폐렴의 약 15%, 중환자실에서 약 27%, 관상동맥질환 집중 치료실에서 약 24%를 차지하고 있다. 기존 연구에 따르면 중환자실의 환자는 면역력이 저하되며, 각종 침습적 조작, 구강 내 많은 장치물에 의해 다제내성 병원균(multidrug resistance pathogens) 등의 위험에 노출되기 쉬우며, 이로 인해 이차적인 원내 감염에 이환될 확률이 높아진다(4). 폐렴은 특히 면역결핍 환자와 같은 특정 고위험 환자에게 더욱 취약하므로(5) 원내감염을 예방하는 것은 환자의 치료 예후에도 매우 중요하다.

원내폐렴 중 병원에 입원한 후 48시간 이후에 발생하는 폐렴(Hospital acquired pneumonia, HAP)과 기관 내 인공호흡기를 삽관한 후 48시간에서 72시간 이내에 발생하는 폐렴(Ventilator associated pneumonia, VAP)(6)은 모든 원내감염의 15%를 차지하고(7) 입원 환자의 0.5~2.0%에 영향을 미친 것으로 나타났다(8, 9). 인공호흡기를 삽관한 환자는 bite block, 삽관 튜브, 튜브 고정을 위한 밴드 등의 장치가 있어 구강위생관리를 수행하는데 어려움이 있으며 구호흡을 하는 경우가 많기 때문에 쉽게 입안이 건조해지고 치태가 형성될 가능성이 높아진다(10). 특히 인공호흡기를 삽관한 환자의 약 40~67%에서 VAP이 발생하여 환자의 사망률에 지대한 영향을 미치는 것으로 보고되면서(11) 최근 중환자에 대한 구강관리가 중요하게 다루어지고 있다(12).

흡인성 폐렴은 미생물이나 이물질 등이 구강 내에 존재하다가 폐로 흡인되면서 발생할 수 있다(2,13). 의식이 저하되어 있거나 질병 또는 손상으로 인해 신체활동이 자유롭지 않은 경우, 구강위생관리를 하지 않는 입원환자에게는 일반인과는 다른 형태로 이물질이 구강 내에 부착하게 되는데 주로 타액 분비 감소와 혀의 운동이 감소하면서 입천장, 혀점막, 혀 표면 등에서 치면세균막이 관찰된다. 그러나 우리나라 중환자실에서 구강위생관리 프로토콜을 갖추고 있는 비율은 13.5%, 일반 병동에서는 8.8%에 불과하고, 주로 사용하고 있는 도구는 구강양치액(28.0%)과 거즈(26.7%)로 치면세균막을 효율적으로 관리하기 어려운 것으로 파악되었고(14), 환자들도 입원 중에는 칫솔질의 시간과 횟수가 감소하는 등 자가구강위생관리 행동의 변화가 나타난다(15). 따라서 입원환자의 구강 내에 존재하는 흡인성 폐렴 원인 미생물을 조기에 발견할 수 있다면 원내감염을 낮추는데 기여할 수 있을 것이다.

최근 다양한 광학탐지장비들이 출시되고 있는데, QLF-D (Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital, QLF-D Biluminator 2, Inspektor Research systems BV, Amsterdam, The Netherlands)는 세균을 분비하는 대사산물인 포피린을 405nm의 가시광선을 조사했을 때 붉은색 형광으로 탐지하는 장비로 정확성, 진단 효용성, 유효성 등이 입증되었으며 구강 미생물과 치면세균막을 대상으로 다양한 연구가 이루어지고 있다(16-18). 흡인성 폐렴을 유발하는 미생물의 자가형광을 QLF-D로 관찰한 연구에 따르면 *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)에서 오렌지색과 붉은계열의 형광을 발현하는 것을 보고한 바 있었으나 시간에 따른 형광의 변화의 원인을 규명하지는 못하였다(19).

우리나라 중환자실에서 발생하는 원내폐렴 원인균은 그람음성막대균이 가장 많으며, 미생물의 종류로는 *A. baumannii*, *S. aureus* 순으로 많았다(20). *Candida albicans* (*C. albicans*)는 중환자실에서 환자의 호흡기 내에 존재하면 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)와 *S.aureus*에 의한 인공 호흡기 관련 폐렴을 촉진시킬 수 있는 것으로 알려졌으나(21) 아직까지 QLF-D로 관찰하여 형광의 특성을 보고한 연구가 없는 실정이다. 배양 시간에 따른 형광의 변화의 원인으로 pH, 배양 성분의 변화, 광역학에 의한 형광 소실 등을 고려할 수 있는데 배양 시간에 따른 원내폐렴 원인균의 자가형광의 변화에 대한 영향을 최소화 하기 위해서는 실험 중 빛 간섭을 최소화하는 것이 필요할 것이다. 또한 구강 내 세균의 pH가 형광 발현에 미치는 효과를 평가한 연구에서는 *Prevotella nigrescens*와 *Prevotella intermedia*와 같은 혐기성세균의 pH 변화와 자가형광 발현에 영향을 미칠 수 있다고 보고하였다(22). 이 결과는 Qray를 사용하여 세균의 자가형광발현 정도를 보고 pH를 추론하여 임상 진단에 더욱 효과적으로 사용할 수 있음의 근거로 볼 수 있었다(22). 그러나 구강 내 원내폐렴을 유발하는 세균은 주로 호

기성이거나 통성혐기성균으로 구성되어 있고, 아직까지 자가형광발현과 pH의 연관성이 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 원내폐렴의 주요 원인균인 *A. baumannii*와 원내폐렴의 위험성을 촉진시키는 *C. albicans*의 자가형광발현 특징과 pH의 연관성을 알아보려고 하였다.

2. 연구대상 및 방법

2.1 실험균주 선정 및 배양

본 실험에서 실험균으로 사용한 미생물은 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC)에서 분양 받은 그람음성균 *A. baumannii* (KCTC 2508)와 진균 *C. albicans* (KCTC 7695)이고, 대조균은 연구 결과의 신뢰성을 확보하기 위해 QLF-D로 자가형광이 나타나지 않는 것으로 알려진 그람양성균 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, KCTC 3065)로 총 3종이다(Table 1).

Table 1. Microbial strains and culture requirement

	Strains	Straining properties	Culture requirement
Nosocomial neumococcus	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram(-)	Aerobic
	<i>Candida albicans</i>	Fungus	Aerobic
Control	<i>Streptococcus mutans</i>	Gram(+)	Facultative anaerobes

한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 추천하는 배지로 *A. baumannii*는 Tryptic soy broth Soybean-Casein Digest Medium (Bacto™ Tryptic Soy Broth, BD, New Jersey, USA), *C. albicans*는 YPD Broth (difco™ YPD, BD, Sparks, USA), *S. mutans*는 Brain Heart Infusion (Bacto™ BHI, BD, New Jersey, USA)를 사용하여 활성화 시켰다. 분양 받은 미생물은 동결 건조 되어 있었으며 멸균된 생리 식염수(0.3~0.5 ml)에 현탁 하여 20% Glycerol 1 mL에 넣어 초저온 냉동고(-72°C)에 동결 보존하였다. 실험에서는 동결 보존되어 있는 미생물을 초저온 냉동고에서 꺼낸 후 실온에서 활성을 위해 액체 상태로 녹인 후 준비된 액체배지에 접종한 후 새로운 액체배지에 24시간 동안 배양하였다. 최적의 활성상태를 위해 성장기까지 배양시킨 후 흡광도가 0.600이 되도록 희석하여 사용하였다.

pH 측정에 사용한 배지는 한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 3종의 미생물에 추천하는 액체배지를 사용하였으며 15 mL Conical tube에 1 mL 미생물을 9 mL 액체배지(*A. baumannii*는 Tryptic Soy Broth, *C. albicans*는 YPD Broth, *S. mutans*는 BHI Broth)에 분주하여 사용하였고 각 미생물마다 총 3개씩 제작하였다. 자가형광발현 평가는 선행연구를 참고하여 Tryptic soy agar (TSA, Difco™ TSA, BD, Sparks, USA)배지를 사용하였으며(21) Petri dish는 60×15 mm 규격의 제품을 사용하였다. 1개의 petri dish 당 30 µL의 미생물을 분주한 후 유리 도말봉으로 도말하였으며, 3개씩 제작하여 37°C에서 호기 환경으로 총 7일간 배양하였다.

2.2 pH 측정

실험균주의 pH 측정을 위해 pH meter(ORION™ VERSA STAR PRO™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)을 이용했으며, pH 전극을 buffer 용액에 담가서 pH를 보정한 후 사용하였다(Figure 1). *A. baumannii*는 Tryptic Soy Broth, *C. albicans*는 YPD Broth, *S. mutans*는 BHI Broth 액체배지에 배양하여 48시간 간격으로 168시간 동안 pH를 측정하였다. 각 배지는 적정 pH인 7.3±0.2, 6.5±0.2, 7.4±0.2로 맞추어 실험에 사용하였다.

2.3 자가형광발현 평가

선택배지에서 성장한 미생물의 자가형광발현 특성을 확인하기 위해 48시간 간격으로 총 168시간 동안 암실에서 QLF-D로 이미지를 촬영하였다(Figure 1). QLF-D의 촬영조건은 Shutter speed = 1/30 sec, Aperture value = 5.6 sec, ISO speed = 1600으로 기본설정 하였다. 이미지를 촬영 후 저장 및 분석하는 분석프로그램(C3 version 1.16, Inspektor Research Systems BV, Amsterdam, The Netherlands)을 이용하였으며 1개 petri dish에서 3개의 colony를 무작위 추출하여 Image J 소프트웨어(Image J, version 1.50i, National Institutes of Health, USA)에서 RGB값을 추출하였고, 이를 바탕으로 R/G ratio의 변화량을 산출하였다. 모든 실험은 3번 반복해서 확인하였다.

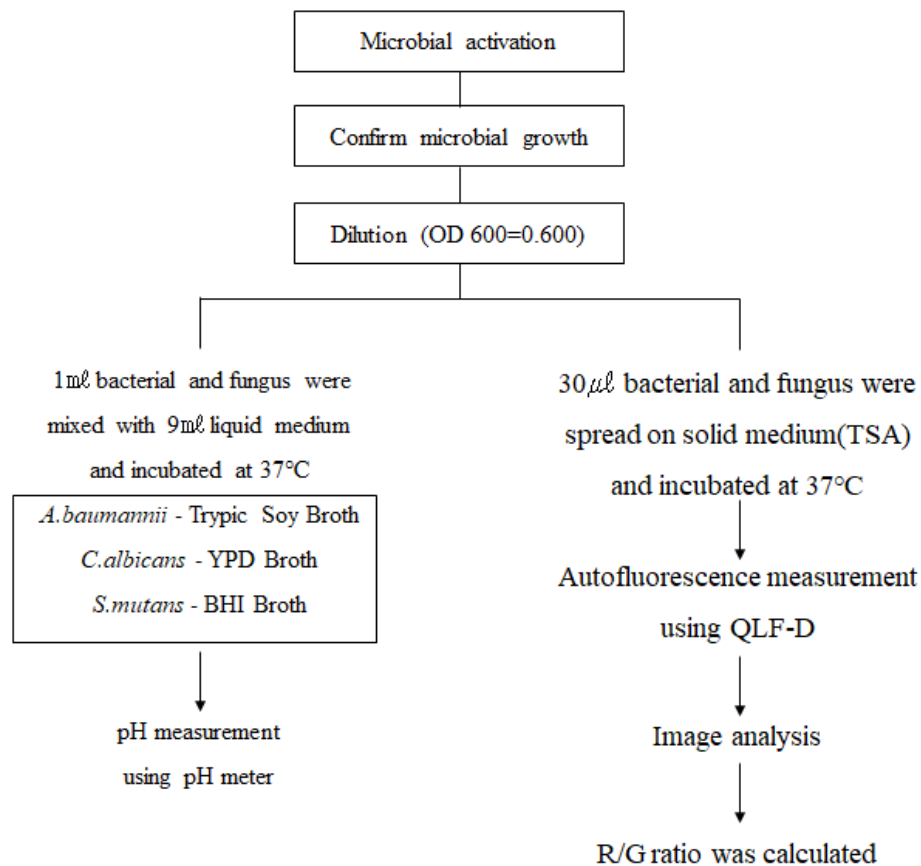


Figure 1. Experimental process of this study.

2.4 통계분석

통계분석 전 데이터의 정규성 검정을 위해 Kolmogorov-Smirnov test를 실시한 결과, 정규분포하지 않아 비모수 검정방법을 이용하였다($p=0.05$). 배양시간에 따른 R/G ratio, pH 변화의 차이와 연관성을 확인하기 위하여 기술통계, Kruskal-Wallis H test, Pearson correlation을 실시하였다. 통계 분석은 IBM SPSS 25.0 프로그램(SPSS Inc., IL, Chicago, USA)을 이용해 분석하였고, 유의수준은 0.05를 기준으로 판단하였다.

3. 연구결과

3.1. *A. baumannii*, *C. albicans*, *S. mutans*의 자가형광발현

QLF-D로 관찰한 결과, 실험군이었던 흡인성 폐렴과 관련된 두 종류의 미생물 모두 오렌지 혹은 붉은계열의 형광을 발현하였다. *A. baumannii*는 오렌지계열의 형광발현을 보였고, *C. albicans*는 붉은계열의 형광을 나타냈다. 대조군 *S. mutans*은 최종 배양시간까지 자가형광발현을 하지 않았다(Figure 2).

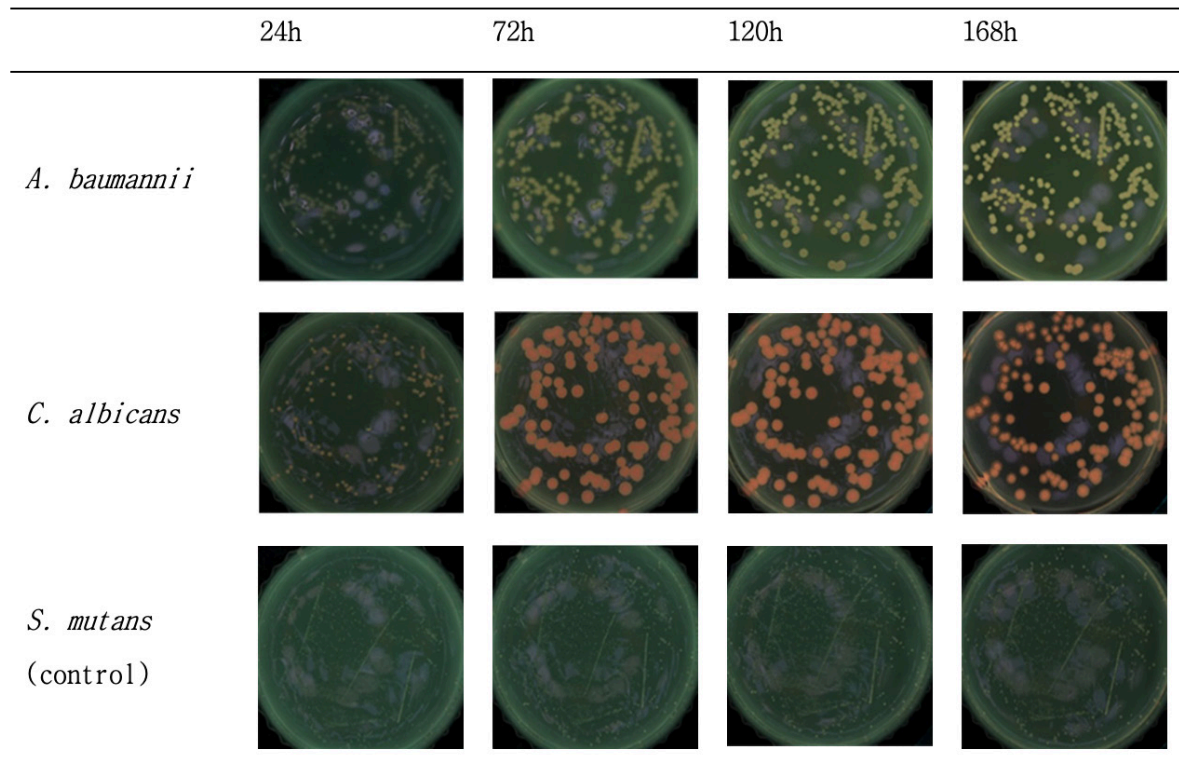


Figure 2. Red fluorescence at 24, 72, 120, and 168 h.

3.2. 배양시간에 따른 pH와 자가형광발현의 연관성

*A. baumannii*의 배양시간에 따른 pH는 24 h (7.118)에 가장 낮았고 최종 168 h (7.728)에 가장 높았다(Table 2, Figure 3). R/G ratio는 24 h (0.749)에 가장 낮았고 168 h (1.140)에 가장 높았으며 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). *C. albicans*의 배양시간에 따른 pH는 24 h (5.224)에 가장 낮았고 120 h (5.604)에 가장 높았다(Table 2, Figure 3). R/G ratio는 24 h (1.053)에 가장 낮았고 120 h (1.972)에 가장 높았으며 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 대조군이었던 *S. mutans*는 최종 배양시간까지 형광발현을 보이지 않았고 배양시간에 따른 pH의 변화는 오차 범위 내에 있었으며($p>0.05$), 실험군 *A. baumannii*, *C. albicans*의 배양시간에 따른 R/G ratio와 pH는 양의 상관관계를 보였다(Table 3).

Table 2. Comparison of the pH and R/G ratio

pH	24 h	72 h	120 h	168 h	<i>p</i>
<i>A. baumannii</i>	7.118±0.000	7.216±0.002	7.384±0.002	7.728±0.001	0.392
<i>C. albicans</i>	5.224±0.056	5.373±0.003	5.604±0.000	5.428±0.001	0.392
<i>S. mutans</i> (control)	5.105±0.004	5.066±0.002	5.077±0.002	5.063±0.009	0.392
<i>p</i>	0.317	0.317	0.317	0.317	
R/G	24 h	72 h	120 h	168 h	<i>p</i>
<i>A. baumannii</i>	0.749±0.001	1.014±0.001	1.095±0.001	1.140±0.001	0.392
<i>C. albicans</i>	1.053±0.001	1.760±0.001	1.972±0.001	1.696±0.001	0.392
<i>S. mutans</i> (control)	0.755±0.014	0.759±0.025	0.828±0.019	0.853±0.009	0.392
<i>p</i>	0.317	0.317	0.317	0.317	

All values are expressed as mean ± standard deviations.
by Kruskal-Wallis test

Table 3. Correlation (*r* values) between the R/G ratio and pH value of *Acinetobacter baumannii* and *Candida albicans* cultures

R/G ratio	pH	
	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>
<i>r</i>	0.973*	0.950
<i>p</i>	0.027	0.050

r indicates the Pearson correlation coefficient.

**p*<0.05

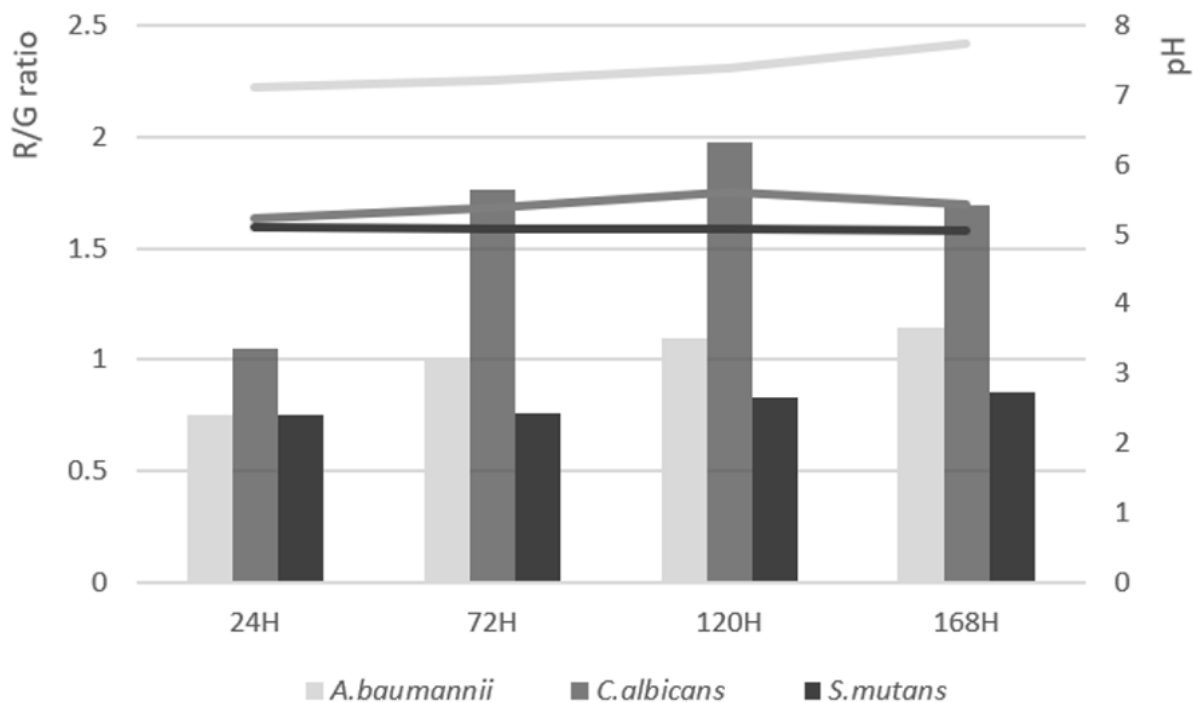


Figure 3. Change in the pH and R/G ratio based on maturation time.

4. 고안

본 연구에서는 흡인성 폐렴의 원인균과 인공호흡기 관련 폐렴을 촉진시키는데 관여하는 2종의 미생물에 대하여 정량형광 광기인 QLF-D로 형광발현의 특성을 확인하고 시간에 따른 형광의 변화와 pH의 연관성을 확인하고자 하였다. 인공호흡기 관련 폐렴(VAP)은 중환자실의 원내 감염에서 가장 큰 비중을 차지한다(23). 병원 내 사망의 주요 원인으로 33-71%의 사망률을 보이며 특히 면역결핍 환자와 같은 고위험 환자에게 흡인성 폐렴은 더욱 위험하다(5).

연구 결과, *A. baumannii*, *C. albicans*에 대해 QLF-D를 조사하였을 때 오렌지계열, 붉은계열의 자가형광이 관찰되었다. 이 결과는 선행연구에서 TSA배지에서 성장한 *A. baumannii*의 자가형광의 결과와 동일하였으며(19), *C. albicans*에 대한 선행연구가 없어 반복 실험을 통해 얻은 결과가 동일하여 본 연구의 결과의 신뢰성을 확보하였다.

*A. baumannii*의 배양시간에 따른 R/G ratio는 24 h에 0.749로 서서히 증가하여 168 h에 1.140으로 가장 높았다. pH는 24 h에 7.118, 최종 168 h에서 7.728으로 점차 높아졌다. *A. baumannii*는 배양시간에 따라 형광이 뚜렷해지며 pH가 높아져 양의 상관관계를 보였다. *C. albicans*의 배양시간에 따른 R/G ratio는 24 h에 1.053에서 서서히 증가해 120 h에 1.972로 가장 높았으며 이후에 서서히 감소하였다. pH는 24 h에 5.224으로 서서히 증가하면서 120 h에 5.604로 가장 높았다가 이후에 서서히 감소하여 R/G ratio의 변화양상이 같았다(Table 1, Figure 2). *A. baumannii*와 *C. albicans*의 배양시간에 따른 R/G ratio와 pH의 변화는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 대조군이었던 *S. mutans*는 최종 배양시간까지 형광발현을 보이지 않았으며, 이 결과는 기존 선행연구의 결과와 동일하였다(24). 선행연구에서 혐기성균인 *Prevotella intermedia*와 *Prevotella nigrescens*의 pH와 형광 발현이 선행관계임을 입증하였으며(22), 이번 연구에서는 실험군 *A. baumannii*와 *C. albicans* 모두 R/G ratio가 증가하면 pH도 증가하는 양의 상관관계를 보였으나 통계적으로 유의한 변화는 없다는 결과를 확인하였다($p > 0.05$, Table 2). 선행연구와 마찬가지로 pH가 구강 내 세균의 형광 발현에 영향을 미치는 것을 짐작해 볼 수 있었다. 배지 자체의 완충력에 의해 pH의 변화가 의미있게 변하지 않았을 것으로 여겨지며(22), 추후 미생물의 성장조건이 자가형광 발현에 미치는 영향에 대한 후속연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구는 원내폐렴 원인균인 *A. baumannii*와 인공호흡기 관련 폐렴을 촉진시키는데 관여하는 *C. albicans*를 대상으로 QLF-D에 의해 발현되는 자가형광의 특성을 확인하고, 성장 시간에 따른 변화와 미생물의 성장조건 중 하나인 pH의 연관성을 확인해보기 위한 파일럿 연구로 수행되었다. 단 2종의 미생물을 대상으로 하였기 때문에 모든 원내폐렴균에 대하여 일반화하는데에는 한계가 있으나 본 연구를 통해 해당 미생물의 자가형광과 pH가 연관성이 있다는 결과를 확인하였고 QLF-D를 통해 pH 수치를 예측할 수 있는 가능성을 발견했다는 데 의미가 있다고 생각한다. 그러나 구강 내에는 단일 균종이 존재하지 않으며 바이오필름의 형태로 집락하고, 성장조건에 대한 다양한 요인들이 관여한다. 따라서 추후 원내폐렴관련 미생물에 대하여 QLF-D로 관찰되는 자가형광물질에 대한 탐구와 형광발현에 영향을 미치는 요인에 대한 다각적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

5. 결론

QLF-D를 이용해 우리나라 중환자실에서 원내폐렴을 일으키는 중요한 원인균인 *A. baumannii*와 인공호흡기 관련 폐렴을 촉진시킬 수 있는 진균인 *C. albicans*의 배양시간에 따른 자가형광발현 특성과 pH에 대한 연관성을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. *A. baumannii*와 *C. albicans*는 각각 오렌지, 붉은계열의 형광을 나타냈다.
2. *A. baumannii*는 배양시간에 따라 완만하게 R/G ratio와 pH가 높아지는 특성을 보였다.
3. *C. albicans*는 배양시간에 따라 급격하게 붉은 형광이 발현되어 120 h에 R/G ratio와 pH가 가장 높았고 이후 서서히 감소하였다.
4. *A. baumannii*와 *C. albicans*의 배양시간에 따른 R/G ratio와 pH는 양의 상관관계를 보였다.

Acknowledgement

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. 2017R1C1B5018016).

References

1. Horan TC, White JW, Jarvis WR et al. Nosocomial infection surveillance, 1984. *MMWR Surveill Summ* 1986;35(1):17SS-29SS.
2. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. *Crit Care Med* 1999;27(5):887-892. 10.1097/00003246-199905000-00020.
3. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in coronary care units in the United States. *Am J Cardio* 1998;82(6):789-793. 10.1016/s0002-9149(98)00450-0.
4. Garrouste-Orgeas M, Chevret S, Arlet G et al. Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients: A prospective study based on genomic DNA analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(5):1647-1655. 10.1164/ajrccm.156.5.96-04076.
5. Apostolopoulou E, Bakakos P, Katostaras T, Gregorakos L. Incidence and risk factors for ventilator-associated pneumonia in 4 multidisciplinary intensive care units in athens, greece. *Respir Care* 2003;48(7):681-688.
6. American Thoracic Society Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(4):388-416. 10.1164/rccm.200405-644ST.
7. Lawton RM, Fridkin SK, Steward CD et al. Intensive care antimicrobial resistance epidemiology (ICARE) surveillance report, data summary from January 1996 through December 1997: a report from the national nosocomial infections surveillance (NNIS) system. *Am J Infect Control* 1999;27(3):279-284. 10.1053/ic.1999.v27.a98878.
8. Mayhall CG. Nosocomial pneumonia: diagnosis and prevention. *Infect Dis Clin North Am* 1997;11(2):427-457. 10.1016/S0891-5520(05)70364-0.
9. American Thoracic Society. Hospital acquired pneumonia in adult: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies: a consensus statement. *Am J Respir Cri Care Med* 1996;153:1711-1725. 10.1164/ajrccm.153.5.8630626.
10. Munro CL, Grap MJ. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. *Am J Crit Care* 2004;13(1):25-34. 10.4037/ajcc2004.13.1.25.
11. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(7):867-903. 10.1164/rccm.2105078.
12. Kwak YG, Choi YH, Choi JY et al. Korean national healthcare-associated infections surveillance system, intensive care unit module report: summary of data from July 2015 through June 2016. *Korean J Healthc Assoc Infect Control Prev* 2017;22(1):9-20. 10.14192/kjhaicp.2017.22.1.9.
13. Jeon MH, Park WB, Kim SR et al. Korean nosocomial infections surveillance system, intensive care unit module report: data summary from July 2010 through June 2011. *Korean J healthc Assoc Infect Control Prev* 2012;17(1):28-39. 10.14192/kjicp.2012.17.1.28.
14. Lee YJ, Noh HJ, Han SY, Jeon HS, Chung WG, Mun SJ. Oral health care provided by nurses for hospitalized patient in Korea. *Int J Dent Hyg* 2019;17(4):336-342. 10.1111/idh.12417.
15. Kim SM. Comparison of oral care status during adult daily life and hospitalization[Unpublished master's thesis]. Wonju: Yonsei University Graduate School;2020.

16. Han SY, Kim BR, Go HY, Kwon HK, Kim BI. Validity and reliability of autofluorescence-based quantification method of dental plaque. *Photodiagnosis Phtodyn Ther* 2015;12(4):587-591. 10.1016/j.pdpdt.2015.10.003.
17. Han SY, Kim BR, Ko HY, Kwon HK, Kim BI. Assessing the use of quantitative light-induced fluorescence-digital as a clinical plaque assessment. *Photodiagnosis Phtodyn Ther* 2016;13:34-39. 10.1016/j.pdpdt.2015.12.002.
18. Kim YS, Lee ES, Kwon HK, Kim BI. Monitoring the maturation process of a dental microcosm biofilm using the quantitative light-induced fluorescence-digital (QLF-D). *J Dent* 2014;42(6):691-696. 10.1016/j.jdent.2014.03.006.
19. 2018 IADR/PER General session & exhibition online scientific program. Schedule. Session. Poster presentation. 304-Disease models, viruses. Assessment of nosocomial pneumonia pathogens using quantitative light-induced fluorescence-digital. [online] <https://iadr2018.zerista.com/event/member/492916>. 2021.2.24.
20. Kwak YG, Choi YH, Choi JY et al. Korean national healthcare-associated infections surveillance system, intensive care unit module report: summary of data from July 2016 through June 2017. *Korean J healthc assoc Infect Contro Prev* 2018;23(2):25-38. 10.14192/kjhaicp.2018.23.2.25.
21. Hamet M, Pavon A, Dalle F et al. *Candida* spp. airway colonization could pronote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2012;38(8):1272-1279. 10.1007/s00134-012-2584-2.
22. Hope CK, Higham SM. Evaluating the effect of local pH on fluorescence emissions from oral bacteria of the genus *Prevotella*. *J Biomed Opt* 2016;21(8):084003. 10.1117/1.JBO.21.8.084003.
23. Kwak YG, Choi JY, Yoo HM et al. Validation of the korean national healthcare-associated infections surveillance system (KONIS): an intensive care unit module report. *J Hosp Infect* 2017;96(4):377-384. 10.1016/j.jhin.2017.04.003.
24. Coulthwaite L, Pretty IA, Smith PW, Higham SM, Verran J. The microbiological origin of fluorescence observed in plaque on dentures during QLF analysis. *Caries Res* 2006;40(2):112-116. 10.1159/000091056.