

## Antibacterial Activity of Ciprofloxacin-incorporated Central Venous Catheters and its Mechanism Against Planktonic Bacterial Cells

Sung Min Jeon and Mal Nam Kim<sup>†</sup>

Department of Biology, Sangmyung University, 7, Hongji-dong, Jongno-gu, Seoul 110-743, Korea

Bloodstream infections (BSI) are caused by planktonic microorganisms, sometimes leading to serious infections such as bacteremia and sepsis. BSI occurs more frequently to the patients wearing the central venous catheter (CVC). The ciprofloxacin-incorporated CVC (CFX-CVC) has been reported previously to possess antimicrobial activity. In this study, the antibacterial activity of CFX-CVC and its mechanism against planktonic BSI cells were explored by using the shake flask test and by examining the release rate of 260 nm-absorbing substances from the bacterial cells indicative of the membrane damage of the bacterial cells. CFX-CVC reduced more than 99.9% of the viable planktonic BSI cells demonstrating its potent antibacterial activity. It provoked bacteriolysis causing leakage of a large amount of 260 nm-absorbing materials from the planktonic bacterial cells like *S. aureus* and *E. coli*. These results provide evidence that the antibacterial activity of CFX-CVC came from the inhibition of the stability of the planktonic bacterial cells.

**Key Words:** Antibacterial activity, Bloodstream infections (BSI), Central venous catheters (CVCs), Ciprofloxacin (CFX), Planktonic bacterial cells

### 서 론

혈관 내 카테터 연관 감염 (intravascular catheter-related infections)의 주 근원지는 수액, 약물, 기타 영양액 등을 투여하기 위해 조작이 빈번한 catheter hubs와 피부와 직접 맞닿는 카테터 삽입 부위이다 (Mermel et al., 2000). 카테터 연관 감염은 대개 카테터 표면에 미생물이 부착하여 일어난다. 특히, 바이오필름 (biofilm) 형성균일 경우에는 이들이 카테터 표면에 부착하여 증식하고 균락을 이루면서 biofilm 내에 파묻혀 있게 된다. 하지만, 이들 중 일부는 물리적인 충격과 같은 탈착 요인에 의해 biofilm으로부터 떨어져 나와 자유롭게 떠다니는 부유 미생물이 된다. 부유 미생물은 또 다시 새로운 카테터 표면에 부착하여 biofilm을 형성하거나 자유 유영 생활할 수 있다. 고착형 미생물 (sessile form microorganisms)도 카테터 연관 감염의 큰 문제가 되지만, 부유 미생물의 경우에도 카테터의 tip이나 lateral eye를 통해 자유롭게

카테터 내강 (lumen)과 혈관 내부를 순환할 수 있기 때문에 큰 문제가 될 수 있다. 부유 미생물이 혈류를 타고 전신으로 전파되면 균혈증 (bacteremia), 패혈증 (sepsis) 등의 심각한 합병증을 유발하기 때문이다 (Raad, 1998).

중심정맥 카테터 (central venous catheters, CVCs)의 경우에도 쇄골하 정맥 (subclavian vein), 경정맥 (jugular vein), 대퇴 정맥 (femoral vein) 등의 주요 혈관 부위에 삽입 되는 혈관 내 카테터이기 때문에 (Polderman and Girbes, 2002) 부유 미생물에 의한 혈관 내 감염 유발 가능성을 배제할 수 없다. 실제 CVCs의 사용으로 인한 카테터 연관 혈류 감염 (catheter-related bloodstream infections, CR-BSI)이 빈번히 발생하고 있으며 (Mermel, 2001; Danese, 2002; Yorganci et al., 2002), 이를 방지하기 위하여 항감염 CVCs이 지속적으로 개발되고 있다. 이미 상용화된 항감염 CVCs들은 폴리우레탄을 주 원료로 하여 chlorhexidine-silver sulfadiazine (Rupp et al., 2005), silver zeolite (Khare et al., 2007), 또는 minocycline-rifampicin (Falagas et al., 2007) 등과 같은 항균제가 처리된 것인데, 시판 후에도 지속적으로 CVCs 표면의 세균 군락화와 CR-BSI에 대한 방지 효과가 있는지를 평가 받고 있다. 최근에 발표된 몇몇 CR-BSI 관련 보고들을 살펴 보면, 항균제가 전혀 첨가되어 있지 않은 standard CVCs 대신 항감염 CVCs를 사용한 경우에는 CR-BSI 발생 빈도와 의료비 면에서 통계

\*논문 접수: 2009년 1월 14일

수정재접수: 2009년 3월 15일

<sup>†</sup>교신저자: 김말남, (우) 110-743 서울시 종로구 홍지동 7,

상명대학교 자연과학대학 생물학과

Tel: 02-2287-5150, Fax: 02-2287-0070

e-mail: mnkim@smu.ac.kr

**Table 1.** Central venous catheters (CVCs) employed in the present study

Sample	Standard CVC	CFX-CVC	
	PC	0.5CP	1.0CP
CFX content (% w/w)	0	0.5	1.0
Catheter material	Polyurethane	Polyurethane	Polyurethane

CFX; ciprofloxacin, PC; ciprofloxacin-free polyurethane catheter, CP; ciprofloxacin-incorporated polyurethane catheter

적으로 유의한 감소 효과를 나타내는 것으로 평가되었다 (Hockenull et al., 2008; Ramritu et al., 2008).

국내에서도 항감염 CVCs를 개발하고자 ciprofloxacin이 함유된 폴리우레탄 카테터를 제조하고 비부유 상태의 카테터 연관 감염균을 대상으로 항균 활성을 평가한 바 있다 (Jeon and Kim, 2004; Jeon and Kim, 2007). 그러나, CR-BSI 발생의 직접적인 원인이 될 수 있는 부유 상태의 미생물에 대한 CFX-CVCs의 항균 활성을 평가하고 그 활성 기전에 대해 보고한 바는 아직 없다. 이에 본 연구에서는 카테터 연관 감염균의 부유 세포 (planktonic bacterial cells)를 대상으로 CFX-CVCs의 항균 활성을 평가하고, CFX-CVCs의 항균 활성이 세균 세포 구조의 안정성 저해에 기인한 것인지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 중심정맥 카테터 (CVCs)의 준비

Aliphatic polyether polyurethane (Noveon, USA)을 주원료로 압출성형 과정을 통해 제조된 국내 standard CVC 상용 제품을 사용하였다. 또한, 동일한 주원료 고분자에 퀴놀론계 항균제인 시프로플록사신 (ciprofloxacin hydrochloride, Sanivar, Hong Kong)을 각각 0.5% (w/w), 1.0% (w/w) 첨가하여 제조한 중심정맥 카테터 (CFX-CVCs) 시제품도 준비하여 사용하였다. Standard CVC와 CFX-CVCs 모두 7Fr. 규격의 단일 내강 (single lumen) 카테터로 (주)세운메디칼 (Sewoonmedical, Korea)에서 제조하였으며, ethylene oxide gas 처리가 완료된 카테터를 10 mm 길이로 무균적으로 절단하여 시편을 준비하였다. 본 시험에 사용된 중심정맥 카테터 시편의 특성을 Table 1에 수록하였다.

### 2. 시험 균주의 선택과 배양

카테터 연관 감염의 주 원인이자 원내 혈류 감염 (nosocomial bloodstream infections)을 일으키는 대표적인

세균으로 알려진 (Danese et al., 2002; O'Grady et al., 2002) 그람양성세균 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)와 *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) 및 그람음성세균 *Escherichia coli* (ATCC 25922)와 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15522)를 CFX-CVCs의 항균 활성 평가 시험에 사용하였다. 대사 활성이 활발한 부유 세포를 얻기 위해 모든 시험 균주는 brain-heart infusion broth (BHIB) 또는 trypticase soy broth (TSB)의 액체 배지에 각각 접종하여 37°C의 진탕 배양기 (Jeio Tech, Korea)에서 지수적 성장 시기에 도달하도록 균을 배양하여 사용하였다.

### 3. 부유 세포에 대한 CFX-CVCs의 항균 활성 평가 시험

본 시험의 주재료인 CFX-CVCs의 항균 활성을 평가하기 위해 한국산업규격인 KSM 0146 (2003)에 제시된 시험 방법을 토대로 진탕 플라스크법을 수행하였다. 그람양성 세균 2종과 그람음성세균 2종의 지수기 배양체를 TSB에 첨가하여 균 배양액의 최종 농도가  $1\sim5\times 10^5$  CFU/ml가 되도록 준비한 후, 여기에 시료를 0.09 g/ml의 비율로 첨가하였다. 시험 시료로는 CFX-CVCs (0.5CP와 1.0CP)를 대조 시료로는 standard CVC (PC)를 사용하였으며, 각각의 시료가 포함된 시험균과 대조균을  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 120 rpm으로 진탕 배양한 후 각 균의 배양 전과 후의 생균수를 측정하였다.

시험의 유효성을 판정하기 위해 세균의 증식값 (F)을 구한 후, 시험이 유효할 경우에는 CFX-CVCs에 의한 세균 감소율 (Reduction rate, %)과 세균 감소값 (R)을 다음과 같이 구하였다.

$$F (\text{growth value}) = M_b / M_a$$

$$\text{Reduction rate (\%)} = [M_b - M_c] / M_b \times 100,$$

$$R (\text{reduction value}) = \log M_b - \log M_c$$

$M_a$ ; average number of viable bacteria immediately after inoculation on the PC

$M_b$ ; average number of viable bacteria on the PC after 24 h of incubation

$M_c$ ; average number of viable bacteria on the 0.5CP (or 1.0CP) after 24 h of incubation

### 4. CFX-CVC에 의한 부유 세포의 안정성 저해 시험

CFX-CVCs가 카테터 연관 감염균의 세포 안정성 (cell stability)에 영향을 주어 항균 활성이 나타나는 지를 알아보기 위해 부유 세포를 대상으로 세포막 손상과 관련

된 변화들을 조사하였다. 일반적으로 spectrophotometer를 이용하면 항균제로 인한 세균 세포의 표면 손상으로 야기될 수 있는 세포의 용균 현상이나 세포 내 구성성분의 유출 여부를 간접적으로 확인할 수 있다 (Leduc et al., 1982; Chen et al., 2002; Song and Kim, 2003). 이에 본 연구에서는 카테터 연관 감염균 중 세포벽 구조가 서로 다른 그람양성세균 *S. aureus*와 그람음성세균 *E. coli*를 대상으로 이들 부유 세포의 용균 현상과 세포 내 구성성분의 유출 여부를 spectrophotometer를 이용하여 조사하였다.

#### 1) 부유 세균의 용균 현상

*S. aureus*와 *E. coli* 균체를 BHIB와 TSB에 각각 접종한 후, 120 rpm, 37°C에서 지수기까지 배양하였다. 각 균의 지수기 배양체 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml)를 삼각 플라스크에 분주한 후, 여기에 0.5CP 또는 1.0CP를 0.09 g/ml의 비율로 첨가한 것을 시험균으로 하였다. 또한, PC를 첨가한 것을 대조균으로 하였다. 시험균과 대조균 모두 동일 조건에서 4시간 더 배양 (37°C, 120 rpm)하되, CFX-CVCs에 의한 용균 현상을 관찰하기 위해 1시간 간격으로 균액을 회수하여 spectrophotometer (UV-1700, Shimadzu, Japan)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 용균 여부를 확인하였다.

#### 2) 세포 내 구성성분의 유출

CFX-CVCs에 의해 부유 세포로부터 260 nm-absorbing materials이 유출되는 지를 단기간 동안 관찰하기 위해 Song 등 (2003)의 방법을 적용하여 시험하였다. 세균의 액체배양 배지가 260 nm-absorbing materials 탐지에 영향을 줄 가능성이 있기 때문에 이를 배제하기 위해 시험 용액은 10 mM PBS (pH 7.2)를 사용하였다. *S. aureus* (ATCC 25923)와 *E. coli* (ATCC 25922) 지수기 배양체를 각각 원심분리 (12,000 rpm, 3 min)한 후, 세척된 균액을 10 mM PBS (pH 7.2)에 희석하여 최종 농도가  $1 \times 10^7$  CFU/ml이 되도록 하였다. 균액을 각각 삼각 플라스크에 분주한 후, 여기에 카테터 시편 (PC, 0.5CP, 1.0CP)을 0.012 g/ml의 비율로 첨가하고, 37°C에서 0, 20, 40, 60, 90, 120분간 120 rpm으로 진탕하였다. 각 시간대별로 회수한 균액은 즉시 원심분리 (120 rpm, 3 min)하여 상층액을 수거한 후, spectrophotometer로 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

CFX-CVCs 내 CFX의 함량 및 CFX-CVCs와 부유 세포와의 접촉 시간에 따른 260 nm-absorbing materials의 유출 양상을 보다 용이하게 관찰하기 위해 다음과 같이 흡광비 (absorbance ratio)를 구하여 시간에 따른 변화를 그래프로 나타내었다.

$$\text{Absorbance ratio} = A_2 / A_1$$

$A_1$ ; O.D<sub>260</sub> of the supernatant from PC-treated planktonic bacterial cells

$A_2$ ; O.D<sub>260</sub> of the supernatant from 0.5CP (or 1.0CP)-treated planktonic bacterial cells

#### 5. 통계 분석

본 실험 결과에 대한 통계 처리는 student's *t*-test에 준하였고, *P*값이 0.05 미만 (*P*<0.05)인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 부유 세포에 대한 CFX-CVCs의 항균성 평가

진탕 플라스크법 (shake flask test)은 항균성 고분자를 비롯해 항균제가 함유된 기능성 제품의 항균 활성을 평가하는 데에 널리 사용되고 있다 (Moon et al., 2003; Park et al., 2004; KSM, 2003). CFX-CVCs와 같이 항균제를 함유하고 있는 시제품의 경우, 생체 내 안전성 및 생체 적합성과 함께 항균 활성에 대한 평가 역시 제품의 품질을 결정짓는 데에 매우 중요한 요인이 된다. 이에 본 연구에서는 CFX-CVCs의 항균 활성을 보다 공인된 방법으로 평가하기 위해 국내 표준규격 (KSM, 2003)인 진탕 플라스크법에 의거하여 시료의 항균 활성을 평가하였다.

Table 2는 진탕 플라스크법에 따라 4가지 균종의 부유 세포에 대한 CFX-CVCs의 항균 활성을 시험한 것이다. 항균 활성은 세균 감소율 (R)로 산출되며, 그 값이 인정되기 위해서는 세균의 증식값이 (F)  $\geq 31.6$ 이어야 한다. 시험 결과를 보면, 4개의 시험 균주 모두  $F \geq 31.6$ 로 항균 시험이 인정되는 범위 내에 속하기 때문에 본 시험의 결과가 유효하다고 판정하여 CFX-CVCs에 대한 세균 감소율 (reduction rate, %)과 세균 감소값 (R)을 구하였다. 비록 24시간 동안 CFX-CVCs에 노출되었던 *S. epidermidis* ( $M_c = 3.3$  CFU/ml from 0.5CP, 10 CFU/ml from 1.0CP)와 *P. aeruginosa* ( $M_c = 13$  CFU/ml from 0.5CP)에서 약간의 균이 검출되기는 했지만, 세균 감소율에 있어서는 CFX-CVCs에 의해 모든 시험 균주의 99.9% 이상이 제어되는 것으로 나타났다. 99.9%의 동일한 세균 감소율을 나타내는 경우라 하더라도 세균 감소값 (R)으로 환산하면 항균 활성의 미묘한 차이를 좀 더 확연히 알 수 있는데, *S. epidermidis*의 경우에는 예측했던 결과와는 조금 다르긴 하지만 0.5CP가 1.0CP보다 높은 R값을 가져 항균 활성

**Table 2.** Antimicrobial activity of CFX-CVCs (0.5CP and 1.0CP) measured by using the shake flask test

Microorganism	Catheter	M <sub>a</sub> (CFU/ml)	M <sub>b</sub> (CFU/ml)	M <sub>c</sub> (CFU/ml)	F	Reduction rate (%)	R
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5CP	2.93×10 <sup>5</sup>	5.53×10 <sup>9</sup>	0	18,900	100	9.74
	1.0CP	2.93×10 <sup>6</sup>	5.53×10 <sup>9</sup>	0	18,900	100	9.74
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0.5CP	3.14×10 <sup>5</sup>	5.03×10 <sup>9</sup>	3.3	16,000	99.9	9.18
	1.0CP	3.14×10 <sup>5</sup>	5.03×10 <sup>9</sup>	10	16,000	99.9	8.70
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5CP	1.56×10 <sup>5</sup>	8.57×10 <sup>9</sup>	0	54,900	100	9.93
	1.0CP	1.56×10 <sup>5</sup>	8.57×10 <sup>9</sup>	0	54,900	100	9.93
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15522	0.5CP	3.79×10 <sup>5</sup>	3.10×10 <sup>9</sup>	13	8,180	99.9	8.38
	1.0CP	3.79×10 <sup>5</sup>	3.10×10 <sup>9</sup>	0	8,180	100	9.49

M<sub>a</sub>: average number of viable bacteria immediately after inoculation on the PC

M<sub>b</sub>: average number of viable bacteria on the PC after 24 h of incubation

M<sub>c</sub>: average number of viable bacteria on the 0.5CP (or 1.0CP) after 24 h of incubation,

F (growth value), M<sub>b</sub> / M<sub>a</sub>, Reduction rate (%); [M<sub>b</sub> - M<sub>c</sub>] / M<sub>b</sub> × 100, R (reduction value); log M<sub>b</sub> - log M<sub>c</sub>

에 차이를 나타내었다. *S. epidermidis*와 같이 *P. aeruginosa*의 경우에도 0.5CP가 100%의 세균 감소율을 나타내지는 않았지만, 표준규격 (KSM, 2003)에 제시된 시험 조건 (시료의 양과 시험 용액의 비율: 0.2 g/ml)보다 약 2배 더 강화된 시험 조건 (0.09 g/ml)에서 항균성을 평가한 것을 감안하면, CFX-CVCs를 임상에 적용했을 때에 효과적으로 이들 부유 세포를 제어할 수 있을 것으로 기대된다.

## 2. CFX-CVC에 의한 부유 세포의 안정성 저해

세포막 손상과 관련된 변화들을 관찰하면 세균 세포의 안정성에 영향을 끼치는 항균제의 작용 기전을 비교적 쉽게 알아낼 수 있다. 항균제에 의해 미생물의 세포막이 손상되면 세포 내 구성성분의 유출, 용균 현상, proton motive force (PMF)의 소실, 막 구성 효소 활성의 저해 등과 같은 여러 가지 현상들이 일어나는 것으로 알려져 있다 (Russell and Chopra, 1996). 본 연구에서는 CFX-CVCs의 항균 기전을 알아보기 위해 부유 세균을 대상으로 세포 내 구성성분의 유출과 용균 현상을 관찰하였다.

### 1) 부유 세균의 용균 현상

일반적으로 세균의 지수기 세포는 약제와 같은 화학요법제에 대한 감수성이 높은 것으로 알려져 있다 (Kim et al., 2007). 또한, 세포벽 합성을 억제하는 항생제나 세포막에 손상을 주는 화학 물질을 지수기 배양체에 첨가하면 세포가 용해되어 죽게 되는데, 이러한 용균 현상은 세포의 수나 균액의 탁도가 감소되는 것으로부터 쉽게 알 수 있다 (Madigan MT et al., 2003).

CFX-CVCs에는 퀴놀론계 항균제인 ciprofloxacin (CFX)이 소량 포함되어 있는데, 몇몇 연구자들에 의하면 이러한 퀴놀론계 항균제들이 세포막 투과성의 변화를 유

도하여 세포의 형태를 잃게 하고, 세포 내 구성성분을 유출시키며, 결국 세포를 죽게 한다고 보고한 바 있다 (Dougherty and Saukkonen, 1985; Elliott et al., 1987; Mason et al., 1995). 앞서 진탕 플라스크법에서 볼 수 있었던 CFX-CVCs의 항균성도 카테터에서 방출된 CFX가 세균 세포막의 투과력을 변화시킴으로써 유발된 일련의 결과로 추정된다. 그 이유는 CFX와 같은 퀴놀론계 항균제들의 주목표 대상인 DNA gyrase는 세포 내부에 존재하기 때문에 반드시 세포막을 통과해야 하며 (Russell and Chopra, 1996), 그러기 위해서는 세포질 내로 침투하는 과정에서 세포막 또는 그람음성 세균에 있어서는 inner membrane의 보존성이 유지되기 어려워 세포막의 투과력도 변화될 가능성이 높기 때문이다. 세균 세포막 보존성의 상실은 세포막 손상을 의미하며, 이는 세포 안정성의 저해로 볼 수 있다. 항균제에 의해 세포막이 손상된 경우에는 여러 가지 현상들이 나타나는 데, 그 중 용균 현상은 spectrophotometer를 이용하면 쉽게 탐지할 수 있는 장점이 있다 (Song and Kim, 2003).

CFX-CVCs의 항균 기전에 대해 아직 정확히 규명된 바는 없으나 퀴놀론계 항균제의 항균 기전을 따를 것으로 예측되며, 실제 CFX-CVCs에 의해 세포막 손상이 유도되는 지를 확인하기 위해 항균제에 감수성이 높은 지수기 부유 세포를 대상으로 용균 현상을 관찰하였다.

Fig. 1은 *S. aureus* 부유 세포가 지수기에 이르는 시점에 각 카테터 시편을 첨가한 후 시간 경과에 따라 세포 밀도를 측정한 것으로, 세포 밀도가 감소할수록 용균 현상이 증가한 것으로 해석할 수 있다. 카테터를 첨가한 지 2시간이 경과한 시점 (6 hr)에서 1.0CP는 PC (대조군)와 세포 밀도에 있어 유의한 차이 ( $P < 0.05$ )를 보여 1.0CP에

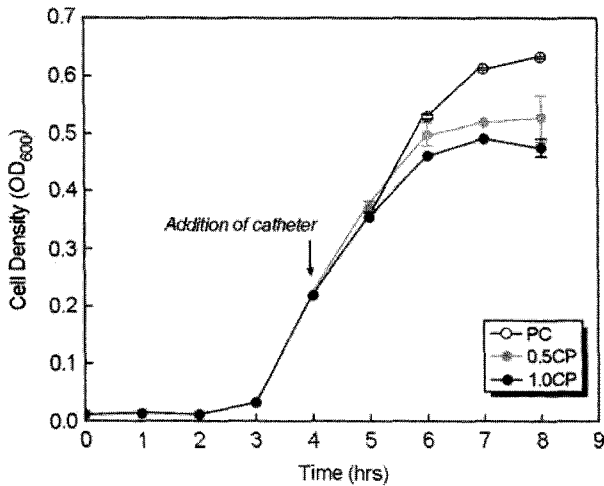


Fig. 1. Growth inhibition of planktonic *S. aureus* cells by CFX-CVCs-induced bacteriolysis. The arrow indicates the point when the catheter is added to the exponential-phase cultures of *S. aureus*.

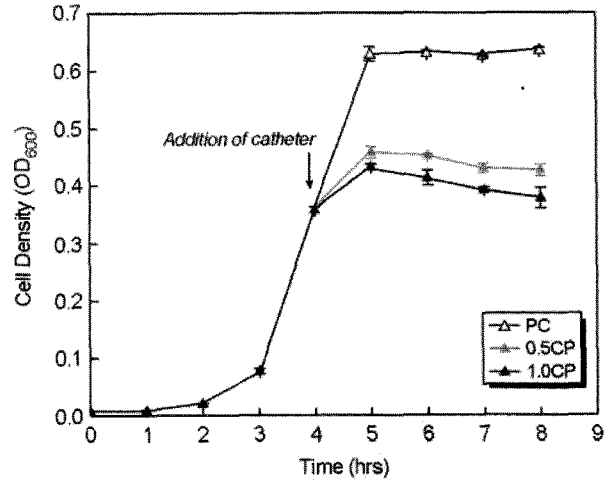


Fig. 2. Growth inhibition of planktonic *E. coli* cells by CFX-CVCs-induced bacteriolysis. The arrow indicates the point when the catheter is added to the exponential-phase cultures of *E. coli*.

의해 용균 현상이 유도됨을 알 수 있었다. 0.5CP 또한 카테터를 첨가한 지 3시간이 경과한 시점 (7 hr)에서 PC (대조군)와 세포 밀도 면에 있어 유의한 차이를 보였다. 카테터 내 CFX의 함량이 용균 현상에 영향을 주는 지를 알아보기 위해 0.5CP와 1.0CP를 첨가한 후 세포 밀도를 비교한 결과, 전반적으로 확연한 차이는 볼 수 없었다.

Fig. 2에 의하면 *E. coli*의 경우에는 *S. aureus*보다 CFX-CVCs에 대해 상당히 민감한 반응을 보였는데, 카테터를 첨가한지 1시간이 경과한 시점 (5 hr)에서 0.5CP와 1.0CP 모두 PC (대조군)와 세포 밀도에 있어 유의한 차이 ( $P < 0.05$ )를 보였다. 0.5CP와 1.0CP 간의 세포 밀도를 비교한 경우에도 1.0CP는 0.5CP에 비해 세포 밀도가 유의하게 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다. *E. coli*와 *S. aureus*의 지수기 부유 세포가 CFX-CVCs에 의해 서로 다른 용균 양상을 보이는 정확한 이유는 알 수 없으나, 카테터에 포함된 CFX이 그람음성 세균의 외막 (outer membrane)을 잘 통과하는 특성 때문인 것으로 보인다. 대부분의 퀴놀론계 항균제들은 분자량이 400 이하로 낮은 친수성 분자들로 이들은 porin channel을 통해 세균의 외막을 통과하는 것으로 알려져 있다 (Russell and Chopra, 1996). 특히, *E. coli*의 경우에는 OmpF와 OmpC porins을 통해 퀴놀론계 항균제가 외막을 통과하는 것이 입증되었다 (Chapman and Georgopadakou, 1998). CFX-CVCs 제조 시 사용된 CFX (ciprofloxacin HCl USP24) 역시 분자량이 385.82인 낮은 친수성 퀴놀론계 항균제로 대부분의 퀴놀론계 항균제와 마찬가지로 *E. coli*의 외막을 통과하여 세포막을 손상시키고 결국에는 세포 용해로 인한 세포 치

사를 유도할 것으로 사료된다.

## 2) 세포 내 구성성분의 유출

항균제 침투로 인한 세균 세포 내 구성성분의 유출은 세포막 보존 여부를 알 수 있는 지표이다. 이는 투과 장벽으로서의 일반적인 세포막 기능을 소실했음을 알려주는 가장 좋은 척도로 여겨질 뿐만 아니라 세포 내 구성성분의 유출 정도를 측정함으로써 세균 세포막의 강도를 추정할 수도 있다 (Russell and Chopra, 1996; Chen and Cooper, 2002). 세포막 손상을 알 수 있는 첫 번째 지수는 칼륨 (K<sup>+</sup>) 유출이고, 그 다음으로는 무기 인산 (P), 아미노산, 그리고 260 nm-absorbing materials의 유출이다 (Russell and Chopra, 1996). 이 중 260 nm의 빛을 흡수하는 DNA, RNA, 그리고 phenylalanine과 같은 260 nm-absorbing materials는 spectrophotometer로 쉽게 탐지할 수 있는데, 세균 세포막의 보존성을 확인하는 데에 널리 사용되는 방법이기도 하다 (Kang et al., 1997; Chen and Cooper, 2002). 이에 본 연구에서는 260 nm-absorbing materials의 유출 여부를 관찰함으로써 CFX-CVCs가 부유 세포의 세포막을 손상시키는 지의 여부를 재확인하고자 하였다.

Fig. 3과 4는 카테터 시편 (PC, 0.5CP, 1.0CP)을 *S. aureus*와 *E. coli*의 부유 세포에 각각 첨가한 후 시간 경과에 따라 세포로부터 유출되는 260 nm-absorbing materials의 흡광도를 측정하여 standard CVC (PC)에 대한 CFX-CVCs (0.5CP 또는 1.0CP)의 흡광도를 흡광비 (absorbance ratio)로 나타낸 것이다. *S. aureus*의 경우, 0.5CP와 1.0CP 모두 시간이 경과함에 따라 흡광비가 증가하는 것을 볼 수 있

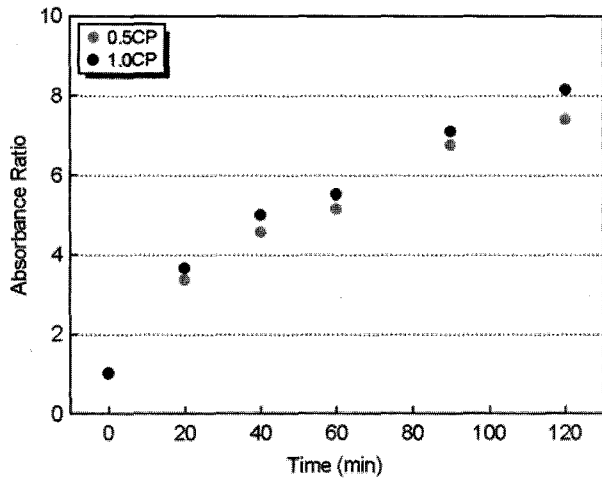


Fig. 3. Leakage of 260 nm-absorbing materials from *S. aureus* treated with CFX-CVCs. Each point represents the average of triplicate tests. Absorbance ratio was defined as  $A_2 / A_1$ , where  $A_1$  is  $O.D_{260}$  of the supernatant from PC-treated planktonic cells, and  $A_2$  is  $O.D_{260}$  of the supernatant from 0.5CP (or 1.0CP)-treated planktonic bacterial cells

다. 특히, *S. aureus*가 CFX-CVCs에 노출된 지 20분 만에 흡광비는 약 3.5배로 확연히 증가하였다. 0.5CP와 1.0 CP 간의 흡광비는 유의한 차이를 나타내지 않았으나 ( $P > 0.05$ ), 모두 1.0 이상의 흡광비를 나타내어 CFX-CVCs에 의해 *S. aureus*로부터 260 nm-absorbing materials이 유출됨을 알 수 있었다 (Fig. 3). *E. coli*의 경우, 0.5CP와 1.0CP 모두 시간이 경과함에 따라 흡광비가 증가하였으나, 전반적으로 *S. aureus*보다는 흡광비가 낮게 나타났다 (Fig. 4). CFX-CVCs에 노출된 지 20분 만에 흡광비는 약 2배로 증가하여 *S. aureus*보다 260 nm-absorbing materials의 초기 유출량이 적게 나타났으며, 0.5CP와 1.0 CP 간의 흡광비는 *S. aureus*에서와 마찬가지로 유의한 차이를 나타내지 않았다 ( $P > 0.05$ ). 비록, *S. aureus*와 *E. coli* 모두 CFX-CVCs 내 CFX의 함량에 따른 260 nm-absorbing materials 유출량의 차이는 볼 수 없었으나, 260 nm-absorbing materials의 존재를 확인할 수 있었기 때문에 CFX-CVCs로 인해 부유 세포의 세포막이 손상된다는 것은 알 수 있었다.

용균 현상과 세포 구성성분인 260 nm-absorbing materials의 유출을 조사함으로써 CFX-CVCs로 인해 부유 세포의 세포막이 손상됨을 확인할 수 있었는데, 시험에 사용한 두 균종 (그람양성세균 *S. aureus*와 그람음성세균 *E. coli*)은 용균 현상과 세포 구성성분의 유출 여부 확인 시험에서 서로 상반된 결과를 나타내었다. 항균제에 의해 세균의 세포막이 손상을 받게 되면, 세포 내 구성성분의

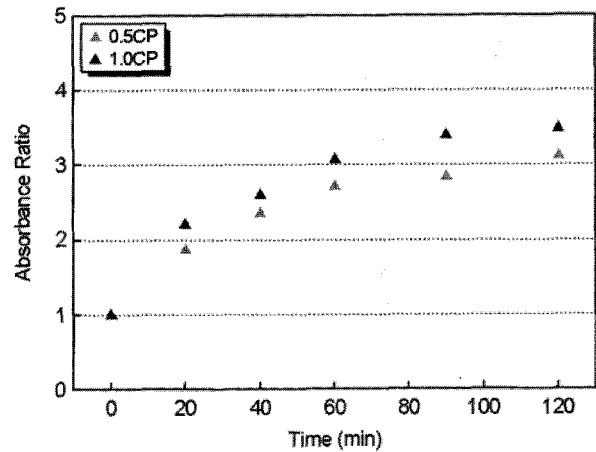


Fig. 4. Leakage of 260 nm-absorbing materials from *E. coli* treated with CFX-CVCs. Each point represents the average of triplicate tests

유출과 용균 현상은 강한 상관 관계를 가진다고 할 수 있으나, 두 세포 간의 구조적 차이와 그 구조에 따른 기능적 특성에 따라 서로 다른 결과를 나타낼 수도 있다. 전술한 바와 같이 CFX와 같은 퀴놀론계 항균제가 *E. coli*의 세포질 내로 유입될 수 있는 것은 외막의 porin channel을 쉽게 통과할 수 있기 때문이다. 외막은 세포막 (inner membrane)에 비해 물질의 투과가 더 용이하기 때문에 600~700 Da 이하의 물질들은 porin channel을 쉽게 통과하는 것으로 알려져 있다 (Lim et al., 2003). 따라서, CFX는 외막을 완전히 손상시킨 것은 아니며, 주로 세포막 손상에 의해 세포의 안정성이 위협 받은 것으로 추정된다.

*E. coli*의 외막은 각종 유해물질이 자신의 세포 내로 유입되는 것을 차단하거나 지연시키는 기능을 가짐과 동시에 주변질 (periplasm) 내에 있는 각종 단백질이나 세포 내 구성성분들이 세포 밖으로 유실되지 못하도록 방지하는 기능도 가지고 있다 (Lim et al., 2003). 또한, *E. coli*는 CFX와 같은 퀴놀론계 항균제에 노출되어도 최소 2시간 동안은 SOS 회복을 지속적으로 유도하는 것으로 알려져 있다 (Mason DJ et al., 1995). 용균 현상이 일어나기 위해서는 세포막 침투 후 어느 정도의 시간이 필요할 것으로 생각되는데, 260 nm-absorbing materials의 유출을 관찰하기 위해 CFX-CVCs와 세균이 접촉한 시간은 총 2시간으로 용균 시험을 관찰한 시간보다 짧았다. 따라서, *E. coli*가 CFX에 노출되었다 하더라도 단시간 동안은 외막의 기능이 유지되어 세포 내 구성성분들이 유실되는 것을 차단하고, SOS 회복 기작 또한 지속적으로 유도될 가능성이 있기 때문에 *S. aureus*에 비해 260 nm-absorbing

materials이 적은 양과 느린 속도로 유출된 것으로 보인다.

이상의 연구 결과를 종합해 보면, CFX-CVCs는 부유 세균을 99.9% 이상 제어하는 우수한 성능을 보여 카테터 연관 혈류 감염 (CR-BSI)을 방지하는 데에도 유용할 것으로 생각된다. 또한, 예상했던 바와 같이 CFX-CVCs가 세포벽 구조가 서로 다른 부유 세포 (*S. aureus*와 *E. coli*)의 용균 현상과 260 nm-absorbing materials의 유출을 유도한 것으로 보아 CFX-CVCs가 세균 세포의 세포막을 손상시키는 것을 알 수 있다. 세포의 용균 현상이나 세포 내 구성성분의 유출이 반드시 세포 치사와 직결되는 것은 아니지만, 세포막 손상에 의해 세포의 안정성이 저해되면 세포의 성장을 억제하거나 사멸시킬 가능성이 높아진다. 이러한 측면에서 CFX-CVCs의 항균성은 일차적으로 부유 세균의 세포막을 손상시켜 세포 안정성을 저해함으로써 유발된다고 볼 수 있다. 차후 다양한 접근 방법을 통해 CFX-CVCs의 항균 기전을 보다 상세히 규명할 필요가 있으며, 실제 임상에서의 활용 가능성을 고려하여 *in vitro* CR-BSI 모델이나 동물 실험을 통해 CFX-CVCs의 성능을 평가해 보는 것도 바람직할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Chapman JS, Georgopapadakou NH. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988. 32: 438-442.
- Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* 2002. 3359-3368.
- Danese PN. Antibiofilm approaches: Prevention of catheter colonization. *Chem Biol*. 2002. 9: 873-880.
- Dougherty TJ, Saukkonen JJ. Membrane permeability changes associated with DNA gyrase inhibitors in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985. 28: 200-206.
- Elliott TSJ, Shelton A, Greenwood D. The response of *Escherichia coli* to ciprofloxacin and norfloxacin. *J Med Microbiol*. 1987. 23: 83-88.
- Falagas ME, Fragoulis K, Bliziotis IA, Chatziniolaou I. Rifampicin-impregnated central venous catheters: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Antimicrob Chemother*. 2007. 59: 359-369.
- Hockenhull JC, Dwan K, Boland A, Smith G, Bagust A, Dündar Y, Gamble C, McLeod C, Walley T, Dickson R. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of central venous catheters treated with anti-infective agents in preventing bloodstream infections: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2008. 12: 1-154.
- Jeon SM, Kim MN. Prevention of catheter-related infections (CRIs) using ciprofloxacin. *J Exp Biomed Sci*. 2004. 10: 245-251.
- Jeon SM, Kim MN. *In vitro* retention of antimicrobial activity of ciprofloxacin-incorporated central venous catheters. *J Exp Biomed Sci*. 2007. 13: 175-182.
- Khare MD, Bukhari SS, Swann A, Spiers P, McLaren I, Myers J. Reduction of catheter-related colonisation by the use of a silver zeolite-impregnated central vascular catheter in adult critical care. 2007. *J Infect*. 54: 146-150.
- Kim TW, Kim YK, Kwon HC, Park KH, Park SW, Baek TH, Lee YA, Yoon ES. *Medical Microorganisms and Infectious Diseases*. 2007. pp 45-46. SooMoonSa Publishing. Seoul, Korea.
- KSM. Testing methods for antibacterial activity of antibacterial functional products. Part 1: Shake flask method. KSM. 2003. KSM 0146.
- Leduc M, Kasra R, Heijenoort JV. Induction and control of the autolytic system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1982. 152: 26-34.
- Lim KM, Seo YH, Shin JO, Lee HY, Jeong IS, Jo EH, Ha YM. *Microbiology* (5<sup>th</sup> ed.). 2003. pp 54-56. Life Science Publication, Co. Seoul, Korea.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganisms* (10<sup>th</sup> ed.). 2003. pp 704-705. Pearson Education, Inc. NJ, USA.
- Mason DJ, Power EGM, Talsania H, Philips I, Gant VA. Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995. 39: 2752-2758.
- Mermel LA, DO, ScM, AM(Hon). Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med*. 2000. 132: 391-402.
- Mermel LA. New technologies to prevent intravascular catheter-related bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*. 2001. 7: 197-198.
- Moon WS, Chung KH, Seol DJ, Park ES, Shim JH, Kim MN, Yoon JS. *J Appl Polym Sci*. 2003. 90: 2933-2937.
- Park ES, Kim HS, Kim MN, Yoon JS. Antibacterial activities of polystyrene-block-poly(4-vinyl pyridine) and poly(styrene-random-4-vinyl pyridine). *Eur Polym J*. 2004. 40: 2819-2822.
- Ramritu P, Halton K, Collignon P, Cook D, Fraenkel D, Battistutta

- D, Whitby M, Graves N. A systematic review comparing the relative effectiveness of antimicrobial-coated catheters in intensive care units. *Am J Infect Control*. 2008. 36: p104-117
- Rupp ME, Lisco SJ, Lipsett PA, Perl TM, Keating K, Civetta JM, Mermel LA, Lee D, Dellinger EP, Donahoe M, Giles D, Pfaller MA, Maki DG, Sherertz R. Effect of a second-generation venous catheter impregnated with chlorhexidine and silvers sulfadiazine on central catheter-related infections: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2005. 143: 570-580.
- Song MJ, Kim MN. Antimicrobial action of *p*-hydroxyphenyl acrylate. *Int Biodeterior Biodegradation* 2003. 52: 107-113.
- Polderman KH, Girbes ARJ. Central venous catheter use. Part1: Mechanical complications. *Intensive Care Med*. 2002. 28: 1-7.
- Raad I. Pathogenesis of intravascular-catheter-related infections. *The Lancet* 1998. 351: 893-898.
- Russell AD, Chopra I. *Understanding Antimicrobial Action and Resistance* (2<sup>nd</sup> ed). 1996. pp 85-110. Ellis Horwood, Ltd. Maylands, England.
- Yorganci K, Krepel C, Weigelt JA, Edmiston CE. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of three different central venous catheters against gram-positive bacteria. *Eur J Clin Microbial Infect Dis*. 2002. 21: 379-384.
-