

## 요로감염환자에서 혈청학적 방법을 이용한 P-pili특이혈중 항체의 조사

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

이 원 응<sup>†</sup> · 김 종 배

**국문초록:** 비뇨기계 병원성 대장균의 중요한 병원성 인자 중의 하나로 인정되고 있는 p-fimbriae의 subtype의 분포를 확인하기 위하여 요로감염증으로 확진된 환자의 혈청을 이용하여 immunoblotting을 실시하였고, 이와 동시에 효소면역 측정법을 실시하여 p-fimbriae특이 항체 보유를 확인하였다.

Immunoblotting 결과 우리나라 요로감염증환자에서 높은 빈도로 확인되는 p-fimbriae subtype의 분포는 F7, 34(56.7%), F7<sub>2</sub>, 28(46.7%), F13 30(50%) 등이 높게 나타났으며, 이와 같은 결과는 효소면역 측정법에서도 동일하게 나타났다. 그러나 P-pili를 순수분리하지 않고 whole cell을 이용한 효소면역 측정법은 교차반응 때문에 비뇨기 감염증의 혈청학적인 진단에 적합하지 않는 것으로 나타났다.

또 우리나라의 요로감염 환자에서 항체 양성율이 높은 F7, F7<sub>2</sub>, F13만을 혼합하여 항원으로 이용한 효소면역 측정법의 특이도와 민감도가 각각 92.6%, 90%로 나타나, 이와 같은 방법을 임상진단에 응용할 수 있을 것으로 판단되었다.

### 서 론

대장균은 일반적으로 장관내에 서식하고 있는 정상 세균총의 일종이지만 요로감염, 창상감염, 뇌막염 및 패혈증 등의 원인균으로도 자주 분리된다. 특히 대장균은 요로감염에 있어 가장 흔한 병원성 원인균으로 알려져 있다<sup>2)</sup>.

요로의 병원성 세균감염은 전세계 모든 연령층의 남녀에서 가장 빈번하게 발생하는 질환이다. 남자는 요도의 길이가 여자에 비해 길고 전립선에서 분비되는 항세균 물질(zinc salt 등)의 작용 때문에 여자보다는 다소 요로감염의 발생률이 낮지만, 노인기에는 전립선의 비대와 더불어 가장 흔히 나타나는 합병증의 하나이다.

요로감염증은 크게 무증상 세균뇨, 방광염, 신우신염으로 구분할 수 있다. 무증상 세균뇨는 뇨에서 세균이  $1 \times 10^5$ /ml 존재하는 것을 의미한다. 취학전 아동기 남아의 0.03%, 또 여아의 0.1%가 무증상 세균뇨를 보이며, 이들 중 50% 이상이 요

로감염의 증상이 발현되며 이 중 30-40%는 신우신염으로까지 발전된다고 보고되고 있어<sup>1)</sup> 소아에게 요로감염은 심각한 후유증까지 남길 수 있음을 시사하고 있다<sup>20)</sup>. 여자의 경우는 성인여자의 50%가 요로감염의 이환병력을 가지고 있으며, 특히 무증상 세균뇨는 임신부에서 흔히 빈발하는 합병증의 하나이다. 이러한 요로의 세균감염은 대개 자신의 분변에서 유래된 세균이 상부 요로로 감염된 상행성 감염의 경우가 많으며, 신생아의 경우는 대개 혈행성으로 감염이 성립되며, 이때는 대개 패혈증도 동반된다.

요로감염은 원인균이 소변의 세척력과 요로점막의 방어기전을 극복하고 요로에 정착하여 증식하는 경우에만 성립될 수 있는 것으로 생각된다. 그런데 항생제 투여 또는 요로 폐쇄의 병력이 없는 일차 요로감염환자의 약 85%가 대장균 감염에 의한 것으로 밝혀지고 있다. 장관내의 정상서식균이 아닌 요로병원성 세균으로서의 감별을 할 수 있는 병원성 결정인자 중 점막상피세포에 부착능을 보이는 부착인자의 보유를 들 수 있으나, 요로감염의 발병기전을 설명하는 데는 이 부착능만으로는 부족하며 세포표면성분, 용혈소 생성능 같은 여러가지 특성이 함께 작용함으로

\*논문접수 1996년 3월 5일, 수정재접수 1996년 5월 1일.

<sup>†</sup>별책요청 저자

써 요로계 감염이 성립된다고 보는게 타당하다<sup>20)</sup>. 그러나 원인균이 일차적으로 요로점막에 부착해야만 질병을 유발할 수 있기 때문에 세균의 부착능이 가장 기본적인 병원성 결정인자라는 점을 부인하기는 어렵다<sup>19)</sup>.

일반적으로 세균의 흡착능력은 세균체 외부로 돌출된 fimbriae 혹은 pili라는 섬모를 매개로 하여<sup>4)</sup> 상피세포에 효과적으로 흡착되는 바, 이는 세균체의 운동성을 발휘하는 flagella와 형태학적으로는 비슷하나 보다 섬세하고 작은 점에서 구별된다. 그러나 세균체의 이러한 미세구조를 관찰하여 요로감염의 원인균의 형태적 특성을 감별하려면 전자현미경에 의한 관찰에 의존할 수밖에 없어서 많은 세균을 대상으로 조사하기엔 비현실적이다<sup>16)</sup>. 1908년 Guyot는<sup>20)</sup> 점막 부착능이 있는 대장균은 여러 종류의 적혈구를 응집시키는 특성을 관찰하고 대장균의 적혈구 응집능이 요로점막 부착능과 관계 있음을 보고하였다. 그후 Duguid등<sup>21)</sup>이 세균의 적혈구 응집능은 fimbriae의 존재와 관계가 있음을 보고하였고 이것은 다른 학자들에 의해 입증되었다.

지금까지 알려진 바에 의하면 대장균의 fimbriae는 적혈구 응집능에 따라 non-adhesive형 pili, mannose sensitive hemagglutination(MSHA)형 pili 및 mannose resistant hemagglutination (MRHA)형 pili의 3가지로 분류할 수 있다. non-adhesive형 pili는 적혈구 응집능이 없고 요로점막이나 상피세포에 부착하지 못하나 구강 상피세포에 부착할 수 있고, 질병과는 밀접한 관련이 없는 것으로 알려진 fimbriae이다<sup>12)</sup>. 한편 적혈구 응집능이 있는 pili로는 D-mannose의 존재하에서는 적혈구 응집능이 억제되는 MSHA형 pili와 D-mannose의 존재하에서도 적혈구 응집능을 보유한 MRHA형 pili로 구분할 수 있다<sup>12)</sup>.

MSHA형 pili중 대표적이라 할 수 있는 type 1 pili는 대부분의 대장균이 보유하고 있으며 yeast cell, Tamm-Horsfall 단백질 등에도 결합하는 능력이 있으나 질병과의 직접적인 관련을 인정하기 어렵다. MRHA형 pili는 요로상피 세포에 존재하는 수용체의 특이성에 따라 다시 P, M 및 S로 나눌 수 있는데 *P. fimbriae*는  $\alpha$ -D-Gal p-(1-4)-D-Gal p 구조를 가진 disaccharide를 인식하고, *M. fimbriae*는 glycoprotein A인 glycoprotein과 결합하고, *S. fimbriae*는 neuraminyl 2-3-galactoside를 수용체로 인식한다. 여기서 신우신염을 유발하는 요로

병원성 대장균의 병원성은 주로 *P. fimbriae*에 기인하는 것으로 보고되고 있다. 어린아이에게서 발생한 급성, 비폐쇄성 신우신염에서 분리된 대장균의 약 90%에서 *P. fimbriae*가 확인되지만, 방광염, 무증상 세균뇨, 분변에서 분리된 대장균에서는 *P. fimbriae*의 분포율이 점차 낮아지는 성향을 보인다.

요로 병원성 대장균 표면에서 관찰되는 fimbriae는 병원균이 숙주세포에 흡착하는데 중요한 역할을 하는 filament성 표면 단백질로, 분자량과 혈청 특이성이 다른 peptide subunits(fimbrillin)로 구성되어 있다. 이와 같은 까닭에 1983년에 Ørskov I와 Ørskov F는<sup>18)</sup> 요로병원성 대장균에서 관찰되는 다양한 종류의 *P. fimbriae*에 대한 항혈청을 제조하여 cross immunoelectrophoresis를 실시하고 그 결과에 따라 F7-F13으로 분류할 것을 제안하였다<sup>18)</sup>.

그러나 *P. fimbriae*는 각각의 subtype간에 혈청학적인 교차반응이 있고 type 1 fimbriae의 각 subtype과도 교차반응이 있으므로 일반적인 polyclonal antibody로는 *P. fimbriae*의 subtype을 조사하기 어렵다. 최근 외국에서는 각각의 fimbriae에 대한 monoclonal antibody를 제조하여 *P. fimbriae*의 subtype을 조사하고 있으며, 이에 따라 신우신염을 유발하는 대장균에서 가장 흔한 *P. fimbriae* type은 주로 F11, F7, F8으로 밝혀져 있다. 한편 국내에서도 비뇨기계 질환 환자에서 분리된 대장균에서 MRHA 및 polyclonal antibody를 이용하여 *P. fimbriae* 보유율을 조사한 바 있으나<sup>1)</sup>, subtype 분포에 관하여는 아직까지 연구가 이루어지지 않고 있는 실정으므로, 국내에서도 이에 관한 연구의 필요성이 높다고 할 수 있다.

본 실험에서는 비뇨기계 감염 환자의 뇨에서 장내세균이 분리된 환자의 혈청 60주를 이용하여 각각의 *P. fimbriae* subtype plasmid를 보유한 유전자 재조합 대장균과 immunoblotting, 효소면역측정법을 실시하여 *P. fimbriae*에 대한 반응 특이성을 조사하였으며, 이를 토대로 하여 국내에서 주로 발견되는 *P. fimbriae* subtype을 조사하고, 원인균의 분리나 적혈구 응집능 검사를 실시하지 않고, 두 가지 혈청학적 진단에서 어느 방법이 신속하고 정확한 방법으로 이용할 수 있는지를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 비뇨기계 병원성 표준 대장균

본 실험에 사용한 표준 균주로 P-pili를 보유하고 있으나 serotype은 미확인된 균주인 NK1, ER 2, DS17U을 Dr. J. Winberg(Karolinska Institute, Sweden)로부터 분양받아 실험에 이용하였다. 또 type 1C와 P-pili의 subtype F7, F8, F9, F11, F12, F13의 유전자 재조합 plasmid를 보유한 세균주를 Dr. J. M. deRee(Animal Health Division, WEESP, Netherland)로부터 분양받아 본 실험에 이용하였다.<sup>37)</sup>

### 2. 요로병원성 표준대장균의 배양조건

본 실험에 사용한 표준균주는 P-pili의 생합성을 유도하기 위하여 Evans등<sup>19)</sup>이 개발한 colonization factor antigen agar(CFA agar; Casamino acid 10 g, yeast extract 1.5 g, magnesium sulfate 0.05 g, manganese chloride 0.005 g, agar 15 g, DW 1,000 ml)를 이용하여 37℃에서 18시간 배양하였다.

### 3. Mannose Resistant Hemagglutination 및 Mannose Sensitive Hemagglutination

대장균의 MRHA와 MSHA여부는 Svenson의 방법<sup>38)</sup>으로 아래와 같이 조사하였다. MRHA의 경우에는 사람 A형 혈액을, 또 MSHA의 경우에는 guinea pig 혈액을 무균적으로 채취한 후 Al-sever씨 용액과 1 : 1로 혼합하여 4℃에 보관하면

서 7일내에 사용하였다. MRHA에는 Evans 등의 방법<sup>17)</sup>에 따라 상기에서 채취한 혈액을 원심분리하고 적혈구를 생리식염수로 3번 세척한 후, 이들 혈구를 생리식염수로 2% 부유액이 되도록 조정하였다. 이 적혈구 부유액에 0.5% D-mannose를 첨가하여 MRHA를 실시하였으며, MSHA의 경우에는 적혈구 부유액에 D-mannose를 첨가하지 않고 혈구응집 반응을 실시하였다.

혈구응집반응은 CFA agar를 이용하여 37℃에서 하룻밤 배양한 시험균주 한 백금이와 적혈구 부유액 한 방울을 슬라이드 글라스에 점적하고 상온에서 1분간 혼합한 후 적혈구의 응집여부를 육안으로 관찰하였다.

### 4. 표준대장균 보유 p-fimbriae의 분리

본 실험에 사용한 표준균주로부터 p-fimbriae를 분리하기 위하여 Korhonen 등<sup>39)</sup>의 방법에 따라 실시하였다. 즉, CFA agar을 이용하여 E.coli 표준균주를 37℃에서 48시간 배양한 다음 집균하여 3000 rpm으로 30분 원침한 후, 원래 배양액 1/20-1/50 부피의 Tris 완충액 (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride)에 부유시켰다. 이것을 3-4회 반복하여 급속동결 및 해동과정을 실시함으로써 얻은 완전히 파쇄된 추출액을 20,000 rpm, 1 시간 동안 원침하여 상층액을 모아 p-fimbriae를 분리하였다.

### 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

표준대장균 보유 P-pili의 단백질을 분석하고 immunoblotting을 실시하기 위하여 Laemmli의 discontinuous buffer system(Laemmli, 1970)을 이용한 SDS-PAGE를 실시하였다. 본 실험에 사용한 gel은 15%의 농도의 polyacrylamide gel을 사용하였다. 전기영동을 위한 sample은 단백질 정량을 한 E.coli P-pili항원과 sample 완충액(0.1M Tris-HCl, 2% SDS, 20% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue, pH 6.8)을 동량 혼합하여 최종 단백질 농도가 3-4 mg/ml가 되도록 희석하여 100℃ 항온수조에서 5분간 처리하였다. 각각의 시료를 20 mA에서 bromophenol blue의 색소가 gel의 바닥에 이를 때까지 전기영동한 후 단백질 분석을 위하여 Coomassie염색을 하거나 immunoblotting을 실시하였다.

### 6. Immunoblotting (Western blotting)

Table 1. p-fimbriae subtypes of uropathogenic E. coli strains

Strains with recombinant plasmid	Fimbriae	MW of monomer of fimbriae
Plasmid		
pPIL 110-70	F7 <sub>1</sub>	22,000
pPIL 110-37	F7 <sub>2</sub>	19,160
pPIL 288-10	F9	21,000
pPIL 291-15	F11	18,000
pANN 921	F8	20,000
pRHU 845	F13	17,000
pPILL 110-51	1C	15,800
Bacterial strains		
AM1727	parent strain	
C1979	F12	18,000

비노기계감염 환자에서 장내 세균이 분리된 환자의 혈청 및 정상인의 혈청을 이용하여 유전자 재조합 대장균이 보유한 P-pili와의 반응 양상을 분석하기 위하여 immunoblotting을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel을 transfer 완충액(20mM Tris-HCl, 144mM glycine, 25% methanol, 0.01% SDS, pH 8.0)에 넣어 4℃에서 30분간 처리한 후, transfer 완충액내에서 anode grid로부터 cathode grid 방향으로 sponge-3MM Whatman 여과지-nitrocellulose(NC)paper-gel-3MM Whatman 여과지-sponge순으로 조립하였다. 조립이 끝난 후 140mA로 1시간 동안 transfer한 후, NC paper를 1% BSA-TBST 완충액(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 37℃에서 30분간 교반처리하여 항원이 부착되지 않은 부위를 차단하고, 10분 간격으로 3번 세척하였다. 여기에 환자혈청 및 정상 혈청을 TBST완충액으로 희석하여 37℃에서 30분간 처리하여 항원-항체반응을 유도하였다. 이것을 다시 TBST완충액으로 3번 세척 후 alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG (H+L) (PROMEGA, Lot No.S3721, S3731)를 alkaline phosphatase(AP)완충액(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl, pH 9.5)로 1:7,500 비율로 희석하여 37℃에서 30분간 처리하였다. TBST완충액으로 3회 세척 후, 기질용액을 넣어 실온에서 빛을 차단하고 10분간 효소 반응을 진행시켰다. 이때 기질용액은 10ml의 AP 완충액에 nitro blue tetrazolium(NBT, 50mg/ml in di-

methylfluoride) 33μl와 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate(BCIP, 50mg/ml in 70% dimethylfluoride) 44μl를 첨가하여 제조하였다. 효소반응을 반응중지용 완충액(20mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8.0)으로 중지시킨 후, NC paper를 여과지에 놓아 건조시켰다.

#### 7. 효소 면역 측정법

환자혈청의 항체 생성 여부 및 대장균의 항원과의 반응 특성을 보기 위하여 효소면역측정법을 실시하였다. 대장균으로부터 분리 정제한 수용성항원을 96-well polystyrene microplate(Costar Serocluster 96 well EIA plate flat bottom, Cat, No. 3590)에 0.05M carbonate 완충액(pH 9.6)으로 20μg/ml의 농도로 희석한 항원을 well당 100μl씩 첨가하고 4℃에서 하룻밤 부착시켰다. 부착 후 세척용액(150mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 5분간 3번 세척하고, 3% bovine serum albumin (BSA)-phosphate buffered saline(PBS, pH 7.3)-0.05% Tween 20용액 150μl/well씩 첨가하여 37℃에서 3시간 처리하여 항원이 부착되지 않은 부위를 차단시켰다. 그 다음 PBS-Tween 20 용액으로 microplate를 세척한 후, 적절한 농도로 희석한 혈청을 100μl/well씩 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 항원-항체반응을 진행 시켰다. 이것을 PBS-Tween 20으로 5분간 세척하는 것을 3회 반복한 후, 1:2,500으로 희석한 peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG (H+L) (PROMEGA, Lot No.

Table 2. Mannose resistant hemagglutination and agglutination with antisera against the p-fimbriae

Strains	F. serotype of fimbriae	MRHA	Agglutination with antisera to		
			NK1	ER2	DS17U
<i>E. coli</i> NK1	?*	++++*	++++	++	+
<i>E. coli</i> ER2	?	++++	+	++++	++
<i>E. coli</i> DS17U	?	++++	+	+	++++
<i>E. coli</i> C1979	F12	++++	+	—	—
<i>E. coli</i> AM1729 with					
pPIL 110-70	F <sub>7</sub> <sub>1</sub>	+++	++	++	++
pPIL 110-37	F <sub>7</sub> <sub>2</sub>	+++	++	+	+
pPIL 288-10	F9	++++	++++	++++	++++
pPIL 291-15	F11	++++	++++	++++	++++
pANN 921	F8	+	++	—	—
pRHU 845	F13	+	+++	+	++
pPIL 110-51	1C	—	+	—	—
<i>E. coli</i> AM1727	—	—	—	—	—

\*: Unknown F. serotype, \*\*: —: no agglutination, +: slight agglutination, ++: moderate agglutination, +++: strong agglutination, ++++: very strong agglutination.

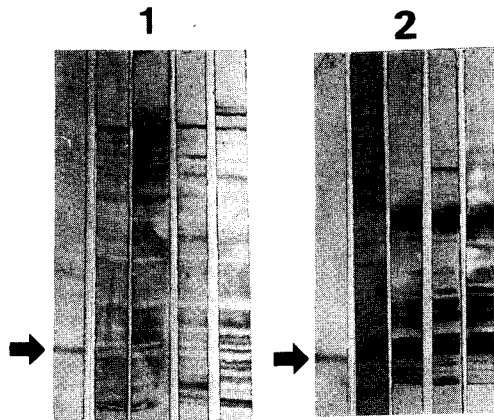


Fig. 1. Immunoblot analysis of the *E. coli* AM 1727 bearing recombinant plasmid of p-fimbriae against sera which were reacted with F7<sub>1</sub> or F7<sub>2</sub>. plate 1: *E. coli* AM1727 with pPIL 110-70(F7<sub>1</sub> fimbriae group), plate 2: *E. coli* AM1727 with pPIL 110-37(F7<sub>2</sub> fimbriae group).

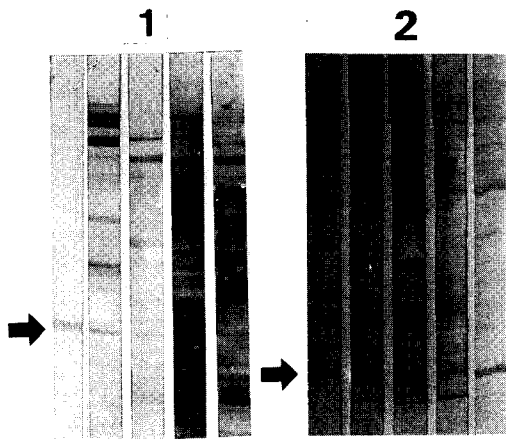


Fig. 2. Immunoblot analysis of the *E. coli* AM 1727 bearing recombinant plasmid of p-fimbriae against sera which were reacted with F9 or F11. plate 1: *E. coli* AM1727 with pPIL 288-10(F9 fimbriae group), plate 2: *E. coli* AM1727 with pPIL 291-15(F11 fimbriae group).

W4021)을 100 $\mu$ l/well씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS-Tween 20으로 3회 세척하고 발색제가 첨가된 기질용액을 100 $\mu$ l/well씩 넣어 효소반응을 유도하였다. 기질용액은 0.1M phosphate-citrate 완충액 (pH 5.0) 50ml에 30%의 과산화수소 10 $\mu$ l, ortho-phenyldiamine 25mg을 넣어 만들었다. 2.5M 황산용액을 25 $\mu$ l/well씩 첨가하여 효소반응을 중단시킨 후 발색반

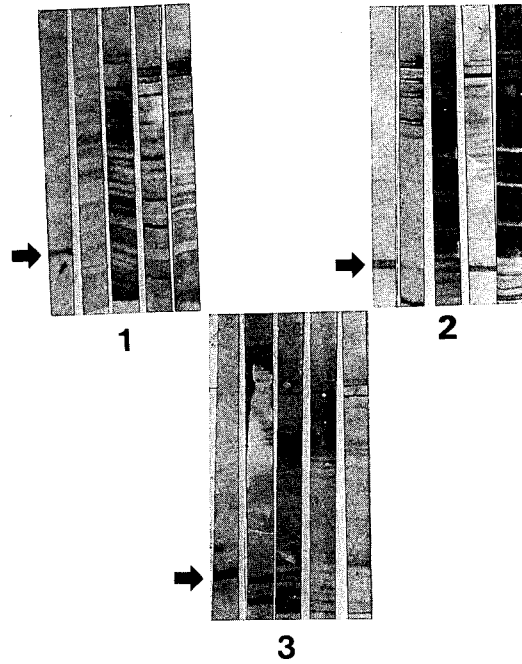


Fig. 3. Immunoblot analysis of the *E. coli* AM 1727 bearing recombinant plasmid of p-fimbriae against sera which were reacted with F8 or F12 or F13.

plate 1: *E. coli* AM1727 with pANN 921(F8 fimbriae group), plate 2: *E. coli* AM1727 with pRHU 845(F13 fimbriae group), plate 1: *E. coli* AM1727 with C1979(F12 fimbriae group).

응의 정도를 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 성적 및 결과

### 1. 요로병원성 표준 균주의 MRHA 및 항혈청에 대한 반응

본 실험에 사용한 3종의 P-pili 표준균주 NK1, ER2, DS17U는 P-pili의 F serotype을 알 수 없었기 때문에 deRee로부터 분양받은 8종의 F serotype P-pili를 표현하는 유전자 재조합 plasmid를 보유한 균주를 이용하여 P-pili의 보유상태를 확인하였다. 사람의 A형 적혈구를 이용하여 이들 균주의 MRHA 양상을 조사하였으며, 또 3종의 표준균주를 각각 토끼에 면역하여 얻은 특이 항혈청과 평판 응집반응을 실시하였다.

그 결과 Table2에서와 같이 3종의 표준균주와 각각의 F serotype의 plasmid를 보유한 대장균은 모두 MRHA양성이었다. 이들 3종의 표준균주로 제조한 항혈청을 각각 F serotype균주와 반응시

킨 결과 NK1균주로 제조한 항혈청은 본 실험에 사용한 모든 균주의 P-pili와 반응하였으나, ER 2와 DS17U로 제조한 항혈청은 F8, F12 serotype 균주를 제외한 다른 균주의 P-pili와 모두 반응하였다.

또한 type 1C를 보유한 pPIL110-51은 P-pili의 표준 균주중 NK1 균주를 이용하여 제조한 항혈청에 교차반응하였다. 이는 P-pili와 type 1 pili가 서로 교차하는 항원결정기를 갖고 있다는 deRee의 보고와 일치하는 결과였다. 상기의 결과로 본 실험에서 사용한 3종의 표준균주는 지금까지 알려진 8종의 F serotype P-pili를 갖고 있는 것으로 확인할 수 있었고, 이들을 이용하여 제조한 특이 항혈청은 대장균이 갖고 있는 P-pili의 serotype 모두를 검색할 수 있는 것으로 인정되었다.

### 2. 유전자 재조합 P-pili에 대한 비노기계 감염증 환자혈청의 Immunoblotting 분석

유전자 재조합 대장균에서 발현된 각각의 p-fimbriae subunit를 이용하여 요로감염으로 확진

**Table 3.** Immunoblotting analysis of the *E. coli* AM1727 bearing recombinant plasmid of p-fimbriae against patient serum of p-fimbriated *E. coli*

Strain	F. serotype of P-pili	No. (%) of positive sera
<i>E. coli</i> AM 1727 with		
pPIL 110-70	F7 <sub>1</sub>	34/60 (56.7%)
pPIL 110-37	F7 <sub>2</sub>	28/60 (46.7%)
pPIL 288-10	F9	15/60 (25%)
pPIL 291-15	F11	13/60 (21.7%)
pANN 921	F8	11/60 (18.3%)
pRHU 845	F13	30/60 (50%)
<i>E. coli</i> C1979	F12	20/60 (33.3%)

**Table 4.** Enzyme-linked immunosorbent assay analysis of the *E. coli* AM1727 bearing recombinant plasmid of p-fimbriae against patient serum of p-fimbriated *E. coli*

Strain	F. serotype of P-pili	No. (%) of positive to	
		Whole cell	P-pili
<i>E. coli</i> AM 1727 with			
pPIL 110-70	F7 <sub>1</sub>	38/60 (63.3%)	30/60 (58.3%)
pPIL 110-37	F7 <sub>2</sub>	23/60 (38.8%)	30/60 (50%)
pPIL 288-10	F9	7/60 (11.7%)	17/60 (28.3%)
pPIL 291-15	F11	9/60 (15%)	11/60 (18.3%)
pANN 921	F8	5/60 (8.3%)	10/60 (16.7%)
pRHU 845	F13	35/60 (58.3%)	32/60 (53.3%)
<i>E. coli</i> C1979	F12	14/60 (23.3%)	23/60 (38.3%)

된 환자 60명의 혈청을 immunoblotting한 결과는 Fig. 1 - Fig. 3에서와 같다. 각각의 p-fimbriae 혈청형에 따른 여러 종류의 다양한 반응 양상이 보이는 것으로 확인되었다. 특히 유전자 재조합 plasmid가 있는 대장균을 순수 분리한 각각의 p-fimbriae와 immunoblotting한 결과는 17KD-22KD 범위에서 모두 강하게 반응하였다. 그러므로 이와 같은 결과로부터 유전자 재조합 대장균을 이용하여 요로감염 환자의 혈청내 p-fimbriae subtype을 확인할 수 있는 것으로 판단되었다. 특히 요로감염이 의심되는 환자혈청과의 immunoblotting시 p-fimbriae subtype 분포는 Table 3와 같이 F7<sub>1</sub>, F7<sub>2</sub>, F13에 양성을 보인 환자혈청이 각각 34/60(56.7%), 28/60(46.7%), 30/60(50%)로 나타나, 우리나라의 요로감염환자에서 가장 높은 빈도로 요로감염에 관계하고 있는 것으로 나타났다.

### 3. 효소 면역 측정법을 이용한 P-pili에 대한 면역학적 분석

비노기계감염 환자의 혈청을 이용하여 p-fimbriae subtype에 대한 항체의 보유 양상을 효소 면역 측정법을 이용하여 유전자 재조합 대장균이 보유하고 있는 P-pili에 대한 항체 보유 여부를 확인하였다. 각각의 P-pili에 대한 정상인의 평균흡광도  $\pm 3$  표준편차 값을 cutoff value로 정하여 그 이상의 흡광도를 나타낸 환자혈청을 양성으로 인정하였을 때의 결과는 Table 4와 같다.

유전자 재조합 대장균으로부터 순수분리한 p-fimbriae와 환자혈청을 이용한 효소면역 측정법의 결과를 비교해보면 immunoblotting에서와 마찬가지로, 역시 F7<sub>1</sub>, F7<sub>2</sub>, F13이 비슷한 수치를 보이고 있으나, 순수정제하지 않는 대장균 (whole cell)을 항원으로 사용하여 효소면역 측정

**Table 5.** Sensitivity and specificity of ELASA with mixed purified F7<sub>1</sub>, F7<sub>2</sub>, F13 pili as an antigen against patient's sera of urinary tract infections

	p-pili specific Ab	Non specific p-pili Ab	Total
Test positive	38	4	42
Test negative	3	37	38
Total	41	41	82

sensitivity= 38/41=92.6%, specificity= 37/41=90.2%

법을 실시한 결과 p-fimbriae subtype에 양성으로 판독할 수 있는 것이 다소 낮게 나타났다.

또 이와 같은 결과로부터 우리나라에서 높은 빈도로 확인되고 있는 F7<sub>1</sub>, F7<sub>2</sub>, F13만을 항원으로 혼합하여 요로감염 환자의 혈청과 효소면역측정법을 이용하여 P-pili에 대한 항체보유 여부를 조사하면 Table 5에서와 같이 특이도는 92.6%, 민감도는 90%로 나타났다.

## 고 찰

대장균은 모든 연령층의 요로감염에서 가장 흔히 분리되고 있다. 흔히 대장균에 의한 요로감염은 장관에서 유래된 세균에 의한 상행성 감염으로 생각되며, 이러한 상재균으로 존재하는 대장균이 장관외부에서 감염을 일으키는 데는 숙주의 방어 기전의 변화나 균의 특별한 형질 획득 등 많은 요인이 관계되리라 보며 이들 대장균은 혈구응집, 용혈소의 산생, 상피세포에 대한 흡착성 등의 몇가지 특성을 지닌다고 한다. 그중에서도 세포표면에 부착하고 감염을 유발하는 기전에 대해서는 아직 많은 것이 밝혀져 있지 않으나 대체로 대장균이 요로계 점막에 대한 수용체를 통하여 점막에 부착한 후 점막을 투과하고 요로상피세포에 대한 독특한 수용체를 이용하여 요로상피세포에 부착함으로써 성립될 것으로 추정되고 있다<sup>13</sup>. 세균이 인체에 침입하였을 때 가장 먼저 접하게 되는 상피세포에 대한 반응기작과 이들 세포에서 유래되는 각종 염증매개물질, 숙주세포와 부착인자의 상호반응에 의한 세포막의 분자생물학적 구조와 활성의 변화, 그리고 이들 반응이 세포질내로 전달되는 signal transduction의 과정 및 기전에 대한 심도 높은 규명이 미생물 특히 세균에 의한 감염증의 근원적인 해결이라는 관점에서 관심이 집중되고 있는 추세이다<sup>4</sup>.

요로감염은 전 세계의 모든 연령층에서 성별에 관계없이 빈발하는 질병중의 하나로서 이러한 요로감염은 임상증세에 따라 무증상 세균뇨, 방광염, 신우신염 등으로 나눌 수 있다. 요로 감염의 원인으로 *E. coli*, *Proteus spp.*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *S. fecalis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* 등을 들 수 있으나, 85% 이상에서 그 원인이 대장균에 의한 감염으로 밝혀져 있다<sup>4</sup>). 요로감염과 p-fimbriae와의 병인학적 원인-인과 관계에 관하여는 많은 연구가 진행된 바 있으며<sup>12</sup>), 임상적인 진단결과와 원인균의 p-fimbriae의 보유 여부와의 관계도 상당히 연구되고 있다.

이와 같이 요로 감염과 p-fimbriae의 병인학적 관계를 인정하는 결과가 계속 알려지고 있지만 아직 우리나라에서는 요로감염에 있어 대장균의 병원성 결정 인자로서의 p-fimbriae에 관한 연구가 부족한 상황이라고 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 요로감염환자로부터 분리한 혈청과 정상혈청을 이용하여 p-fimbriae보유 혈청에 대한 p-fimbriae subtype의 규명을 위해 immunoblotting, 효소면역측정법을 실시하여 그 결과를 서로 비교 검토함으로써 요로감염증 환자의 혈청학적인 진단 방법을 수립하는 데 이용하기 위한 기초적인 실험을 실시하였다<sup>20</sup>. Table 2와 같이 P-pili 표준균주와 deRee로부터 분양받은 유전자 재조합 plasmid를 보유한 대장균을 가지고 사람의 A형 적혈구를 이용하여 이 대장균들의 MRHA양상을 관찰하였으며, 또 3종의 P-pili 표준균주를 이용하여 p-fimbriae에 대한 가토 특이 항혈청을 제조하였으며, 각각의 p-fimbriae의 subtype을 표현하는 plasmid를 보유하고 있는 유전자 재조합 균주를 가토 특이 항혈청과 평판 응집반응을 시켜 본 결과 모든 대장균의 subtype pili가 반응을 하여 이 항혈청은 대장균이 가지고 있는 p-fimbriae의 subtype과 관계없이 모든 p-fimbriae를 감지할 수 있는 것으로 생각되었다<sup>14</sup>). 이와 같은 결과를 보다 확실히 확인하기 위하여 유전자 재조합 plasmid를 보유한 세균을 SDS-PAGE를 실시한 후 3종의 P-pili 표준균주를 가토에 면역하고 흡수하여 제조한 특이 항혈청을 이용하여 immunoblotting을 한 결과는 각각의 fimbriae가 모두 17KD-22KD범위에서 모두 강하게 반응하여 유전자 재조합 plasmid보유 대장균은 p-fimbriae가 왕성하게 생합성되고 있음을 김<sup>3</sup>의 결과와 일치하였다.

요로감염증 환자의 혈청내에 존재하는 p-fimbriae subtype을 규명하기 위해 요로감염 환자혈청과 유전자 재조합 plasmid보유 대장균을 immunoblotting한 결과는 17KD-22KD에서 p-fimbriae subtype을 확인 할 수 있었고, 66KD-97KD에서 여러 가지 반응양상이 보였다. 이것은 요로감염환자가 병원성 대장균에 감염이 된 것 이외에도 장내에 서식하고 있는 대장균과 기타 장내세균에 의해 감염되었던 흔적으로 생각된다. p-fimbriae subtype의 분포는 유전자 재조합 plasmid보유 대장균 7주중에 F7<sub>1</sub> 34(56.7%), F7<sub>2</sub> 28(46.7%), F13 30(50%) 등이 높은 수치를 보이고 있다.

이러한 결과를 뒷받침하기 위하여 효소면역측정법을 실시하였다. Table 3을 참고하면 유전자 재조합 대장균과 gel filtration으로 순수히 정제한 p-fimbriae와의 효소면역 측정법을 비교하면 immunoblotting에서와 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 유전자 재조합 대장균(whole cell)으로 실시한 효소면역측정법은 독자적인 반응보다는 세균체의 다른 항원과의 교차반응 때문에 약간의 오차가 유발되었고, 순수 분리한 p-fimbriae를 항원으로 이용한 효소면역측정법이 훨씬 양호한 결과를 나타낸 것으로 판단되었다.

이러한 실험결과를 토대로 우리나라의 요로감염 환자에서 항체 양성율이 높은 F7<sub>1</sub>, F7<sub>2</sub>, F13만을 혼합하여 항원으로 이용한 효소면역측정법의 특이도와 민감도를 조사한 결과는 Table 4와 같이 특이도는 92.6%, 민감도는 90%로 요로감염환자의 혈청학적인 진단에 이용할 수 있는 유용한 방법이라고 생각된다. 위의 실험결과들을 종합해 보았을 때 비뇨기 감염증 환자의 혈청학적인 진단에는 원인균의 분리를 시도하지 않은 경우에 immunoblotting과 효소면역 측정법 두 가지 모두 사용할 수 있지만, immunoblotting으로 진단에는 몇가지 난점이 있다. 즉 1) 결과를 얻는데 오랜 시간이 필요하고 2) 실시가 번잡하고 3) 특별한 시설이 필요하고 4) 검사비용이 비싸다는 것이다. 그러므로 이와 같은 관점에서 효소면역 측정법이 신속한 진단에는 이용될 수 있다. 그리고 비뇨기계감염을 유발시키는 것이 부착능만으로는 질병을 유발할 수 없으므로, 세포표면성분에 관한 연구와 독성물질 생성, hemolysin 생성능 등 질병유발에 관여한다고 알려진 여러 인자<sup>20)</sup>들의 복합적인 연구가 체계적으로 수행되어야만 요로감염의 병인학적 규명에 기여할 수 있을 것으로

생각되고, 세균성 부착인자, 특히 *Escherichia coli*의 부착인자인 fimbriae를 초점으로 한 본 연구 논문에서 제시된 실험결과들이 비뇨기 감염증 진단을 규명하는데 기여를 하리라고 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. 강경희 외 8인 (1989): P-pili 보유 대장균의 분포. 대한미생물학회지, **24**: 323.
2. 권영식 외 2인 (1988): 요로병원성 대장균의 병원성과 항균제내성 Plasmid와의 관계. 대한 미생물학회지, **23**: 439-447.
3. 김종배 (1991): 비뇨기계 감염환자의 요에서 분리한 대장균의 P-pili 보유와 항생물질 저항성. 보건과학논집, **1**: 78.
4. 오양효 외 4인 (1992) *Escherichia coli*의 부착인자 발현을 조절하는 유전물질과 부착인자의 동정 및 특성. 대한미생물학회지, **27**: 391-405.
5. Brauner A et al (1995): P-fimbriation and hemolysin production are the most important virulence factors in diabetic patients with *Escherichia coli* bacteremia: A multivariate statistical analysis of seven bacterial virulence factors. *J Infect*, **31**: 27-31.
6. DeRee JM, et al (1985): Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F7<sub>1</sub>, F7<sub>2</sub>, F9 and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **50**: 900.
7. Dozois CM et al (1995): Expression of P and type 1 fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol*, **45**: 297-309.
8. Duguid JP (1968): The function of bacterial fimbriae. *Arch Immunol Ther Exp*, **16**: 173-188.
9. Evans DG et al (1973): Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **7**: 873-880.
10. Evans DG et al (1977): Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect Immun*, **18**: 330-337.
11. Guyot G (1908): Ueber die bakterielle hae-



- maggglutination (bacteri-haemo-Agglutination). Zentralblatt fur bakteriologie, parasitenkunde, infektionskrankheiten and hygiene. *Abteilung, 1: originale 47*: 640-653.
12. Hoschutzky H et al (1989): isolation and characterization of the galactosyl-1,4- $\beta$ -galactosyl-specific adhesin (P adhesin) from fimbriated *Escherichia coli*. *Infect Immun, 57*: 76.
  13. Korhonen TK et al (1980): New Method for isolation of immunologically pure pili from *Escherichia coli*. *Infect Immun, 27*: 569-575.
  14. Lory S et al (1994): A plasmid-encoded prepilin peptidase gene from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol, 176*: 6885-6891.
  15. Mostafavi M et al (1995): Production of soluble virulence factor by *Escherichia coli*. *J Urol, 153*: 1441-1443.
  16. Nataro JP et al (1992): Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun, 60*: 2297-2304.
  17. Otto G et al (1993): Virulence factors and pap genotype in *Escherichia coli* isolate from women with acute pyelonephritis, with or without bacteremia. *Clin Infect Dis, 17*: 448-456.
  18. Ørskov I and Ørskov F, 1983. The serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog Allergy, 33*: 80.
  19. Schrotten H et al (1993): Inhibition of adhesion of S-fimbriated *E.coli* to buccal epithelial cells by human skim milk is predominantly mediated by mucins and depends on the period of lactation. *Acta Paediatr Int J Paediatr, 82*: 6-11.
  20. Schrotten H et al (1992): S-fimbriae mediated adhesion of *Escherichia coli* to human buccal epithelial cells si age independent. *Infection, 20*: 273-275.
  21. Sittonen A (1992): *Escherichia coli* in fecal flora of healthy adults: serotypes, P and type 1C fimbriae, non-P mannose-resistant adhesins, and hemolytic activity. *J Infect Dis, 166*: 1058-1065.
  22. Svanborg-Eden et al (1976): Variable adherence to normal urinary tract epithelial cells of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary tract infection. *Lancet ii*: 490-492.
  23. Svnnsen SB et al (1984): Infection of clinical pyelonephritis the role of p-fimbriae mediated bacterial adhesion. *Contr Nephrol, 39*: 252-272.

=Abstract=

**Serological Studies on the Specific Antibodies Against P-pili of Uropathogenic  
*Escherichia coli***

**Won-Yong Lee<sup>†</sup> and Jong-Bae Kim**

*Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University,  
Wonju City, Kangwon-Do 222-701, Korea*

*Escherichia coli* is one of the most common etiological agents in urinary tract infection. An important virulence factor is the adhesive capacity of *E.coli* to uroepithelial cell, mediated by bacterial fimbriae. The Adhesion property has been regarded as an important virulence determinant in urinary tract infections. A total of 60 patients, who were diagnosed microbiologically as urinary tract infections, were examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Uropathogenic *E. coli* with recombinant plasmid were positive for mannose resistant hemagglutination (MRHA). For identification of p-fimbriae subtype in uropathogenic *E. coli*, In the immunoblot analysis, specific bands in the range of p-fimbriae molecular weight of 17KD-22KD were identified. For the distribution of p-fimbriae subtype in the patient sera, 34/60(56.7%) were positive for F7<sub>1</sub>, 28/60(46.7%) were positive for F7<sub>2</sub> and 30/60(50%) were positive for F13 with immunoblotting method. similar trends were observed in the enzyme-linked immunosorbent assay. Relatively good specificity(92.6%) and sensitivity(90%) were found in the ELISA test system using mixed antigens of purified F7<sub>1</sub>, F7<sub>2</sub> and F13 p-fimbriae, and 60 sera from patients with urinary tract infections. In conclusion The serological tests were convenient method in diagnosis of urinary tract infections. among those ELISA could be recommended in diagnosis of urinary tract infections.

**Key Words:** *Escherichia coli*, MRHA pili, urinary tract infection, Enzyme-linked immunosorbent assay, p-fimbriae subtype.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(1): 31-40, June 1996]

---

<sup>†</sup>Corresponding author