

## Clonal and Virulence Distribution of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Children in Korea

Dong Ho Kim and Chul Hee Choi\*

Department of Microbiology and Medical Science, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon, Korea

Urinary tract infections (UTI) are one of the most frequent infectious diseases. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) are among major pathogens causing UTI. A variety of virulence genes are mainly responsible for the severity of these emerging infection. This study investigate the influences of virulence properties of UPEC isolates with reference to multi-locus sequence typing (MLST). The aim of this study was targeted that investigation of the bacterial pathogenicity associated with UTI in children. A total of 58 UPEC isolates were collected from urine samples from patients with clinical diagnosis of uncomplicated UTI. The MLST of UPEC strains were assessed by methods based on polymerase chain reaction. Motility was evaluated using soft-agar plates. Biofilm formation was analyzed in microtiter dish biofilm formation assay. Cell death assay was analyzed by Annexin V/Phosphatidylserine staining and DNA fragmentation assay. According the result, the predominant sequence type (ST) was ST95 (24.1%) and ST73 (17.2%). There were some difference in virulence gene and antibiotics resistance between ST95 and ST73. The number of 11 (18.9%) isolates were strongly adherent. Based on the detected biofilm formation, these strongly adherent are almost ST73. The ST95 was higher than ST73 in population, but ST95 was lower than ST73 in motility and cell death induction. This study indicated that the UPEC molecular strains are related to some virulence traits. Furthermore, the virulence factors carried by ST73 strains contribute to their abilities to colonize the host and cause disease.

**Key Words:** Uropathogenic *Escherichia coli*; Virulence; MLST; Sequence type; Clonal complex

### INTRODUCTION

요로감염증(urinary tract infection, UTI)은 인간에게 발생하는 흔한 세균성 감염병으로 매년 1,500~2,000만 명이 UTI를 앓는다 (1). 많은 수의 여성이 UTI를 경험하며, 그 중 20~40%의 여성에서 재발된다 (2). 그 중 요로병원성 대장균(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)은 UTI의 주요 원인균으로 UTI 원인의 90%를 차지한다 (3, 4).

대장균은 크게 공생 균주(commensal strain), 장내병원균주(intestinal pathogenic *E. coli*)와 장외병원균주(extraintestinal pathogenic *E. coli*)로 구분된다. 과거에는 대장균을 분류하는 방법으로 random amplified polymorphic DNA, ribotyping, pulsed field gel electrophoresis, multilocus enzyme electrophoresis와 같은 방법이 사용되었으나, 실험과정이 복잡하고 시간이 많이 소모된다는 단점으로 잘 쓰이지 않게 되었다 (5). 현재는 다좌위 서열 형별 분석(multi-locus sequence typing, MLST), 혈청형 분류(serotype analysis), 계통

Received: January 31, 2017/ Revised: February 12, 2017/ Accepted: February 20, 2017

\*Corresponding author: Dr. Chul Hee Choi. Department of Microbiology and Medical Science, Chungnam National University School of Medicine, 266 Munwha-ro, Jung-gu, Daejeon 35015, Korea.

Phone: +82-42-580-8246, Fax: +82-42-585-3686, e-mail: choich@cnu.ac.kr

\*\*This work was supported by Chungnam National University (2014).

©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/>).

분류(phylogenetic analysis)와 같은 방법이 사용되고 있다 (6). MLST는 항존 유전자(housekeeping gene)의 염기서열을 이용하기 때문에 전기영동을 기반으로 한 DNA 검사가 필요 없으며, 온라인으로 존재하는 데이터베이스를 통해 쉽고 빠르게 그 특징을 파악할 수 있는 장점 때문에 최근에 선호되는 방법이다 (7). MLST를 통한 UPEC의 분류에서는 sequence type 69, 73, 95, 131이 UTI에서 높은 빈도를 가진다는 보고가 있다 (8, 9).

UPEC은 요로와 같은 환경에서 생존하기 때문에 공생적 군주와는 다르게 생존과 요로감염을 일으키는데 필요한 병원성 인자(virulence factor)들을 가지고 있다. UPEC의 병원성 인자는 크게 adhesins, toxins과 iron-chelating factor (siderophore)로 나눌 수 있으며, 그 중 adhesins은 UPEC이 요로 상피세포에 부착할 때 사용되는 물질로써 A-fimbrial adhesins (*afa*), P-fimbrial adhesins (*pap*)과 S-fimbrial adhesins (*sfa*)가 있다 (10, 11). 이외에도 type 1 fimbriae (*fimH*), intimin (*eae*)과 IrgA (*ihgA*)와 같은 물질도 UPEC이 요로 상피세포에 부착하는데 관여하는 것으로 알려져 있다 (12, 13). UPEC이 분비하는 toxin은 대표적으로 cytotoxic necrotizing factor 1 (*cnf1*)과  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ -*hly*)가 존재한다. 이 물질들은 숙주 신체 조직에 손상을 일으킴으로써, 숙주의 면역반응을 억제하거나 대장균이 손상된 조직으로부터 영양소를 얻을 수 있도록 돕는 역할을 한다 (14). 생존에 필요한 철을 획득하기 위하여 UPEC은 철포획체(siderophore)를 분비한다. 철포획체를 암호화하는 유전자에는 aerobactin (*aer*)과 yersiniabactin (*irp2*)가 존재하며, 철포획체 수용체인 *iroN*과 iron transporter인 *feoB*가 존재한다 (15). 이외에도 세포 내 칼슘농도를 증가시켜 철을 배출시키는 열저항성 장독소(heat-stable enterotoxin b, *stb*), 세포 내 cAMP 농도를 증가시켜 철을 배출시키는 enterotoxin (*lt*) 같은 다양한 병원성 인자가 UPEC의 생존과 요로감염에 관여한다 (16).

생물막(biofilm)은 세균들의 구조화된 군집으로써 항생제로부터 세균을 보호하고 지속적인 감염을 유지하는데 도움을 주며, 생물막 형성에는 type1 fimbriae, autotransporter proteins, 운동성과 같은 여러 병원성 인자들이 관여하고 형성된 생물막은 항생제 내성과도 관련이 있다는 보고가 있다 (17, 18).

따라서 본 연구에서는 충남대학교 병원에서 분리된 UPEC을 MLST를 통하여 수집된 균주의 계통을 분석하고 대장균이 가진 병원성 인자, 항생제 내성과 같은 특징을 파악함으로써 UTI와 UPEC에 대한 병원성과 역학적 연관

성을 조사하고자 하였다.

## MATERIALS AND METHODS

### UPEC 수집, 확인

충남대학교 병원 소아청소년과에 2011년부터 2013년 사이에 내원한 요로감염으로 진단된 13세 미만 어린이의 소변검체를 MacConkey (Difco/BD, Sparks, MD, USA) 배지에서 16시간 이상 배양 후 VITEK®2 system (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)으로 대장균임을 확인하였다.

### 대장균 배양, 보관

UPEC으로 동정된 균은 Luria-Bertani (LB; Difco/BD) 배지에 접종하여 37°C 배양기에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. 배양된 균은 배양된 배지와 동일한 양의 30% glycerol을 희석하여 -70°C 초저온 냉동고에 보관하였으며, 표준 균주로 CFT 073 (*E. coli* O6:H1/ UPEC; ATCC 700928)을 사용하였다.

### T24 (ATCC® HTB-4™) 배양

본 연구에 사용된 방광암 세포주인 T24 (ATCC® HTB-4™)는 미국세포주은행(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 분양 받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Biowest, Reverside, MO, USA)가 첨가된 Roswell Park Memorial Institute 1640 배지(WelGene, Daegu, Korea)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경조건에서 배양하였다.

### DNA 추출

본 연구에 사용된 UPEC DNA는 UPEC을 LB 배지 3 ml에서 배양한 뒤 1.5 ml tube에 1 ml씩 분주하여 원심분리를 통해 배양배지를 제거한 후 Genomic DNA prep Kit (NANOHELIX, Daejeon, Korea)를 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 4°C 냉장고에 보관하였다.

### PCR

본 연구에서 사용한 PCR은 최종 용량 50 µl로 반응을 진행하였다. 혼합물에는 UPEC DNA 1 µg, 10× Tris-Cl buffer (100 mM, pH 8.3) 3 µl, 2.5 mM dNTPs 2 µl, ExTaq DNA polymerase (TakaRa, Shiga, Japan) 0.5 µl, primer (10 pmol) 0.5 µl로 혼합한 뒤 T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA)에서 실시하였다.

MLST 분석 확인을 위해 95°C에서 10분간 온도를 올린 다음 denaturation을 95°C에서 1분, annealing을 54~60°C에서 1분, extension을 72°C에서 2분 조건으로 30회 반복하였다. 마지막 extension 시간은 72°C에서 10분으로 하였다. 예상되는 유전자의 크기와 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

병원성 유전자 조사에서는 95°C에서 10분간 온도를 올린 다음 denaturation을 95°C에서 1분, annealing을 55~58°C에서 1분, extension을 72°C에서 1분 조건으로 30회 반복하였다. 마지막 extension 시간은 72°C에서 10분으로 하였다. 실험에 사용된 primer의 염기서열은 Lee JH *et al.* (19)을 참고하였다.

#### MLST

7개의 항존 유전자(*adh*, *fumC*, *purA*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *recA*)에 대하여 각각 PCR ([http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi\\_html](http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi_html), Table 1)을 수행한 뒤, Higene™ Gel & PCR purification system (Biofact, Daejeon, Korea)을 이용하여 제조사에서 제시한 방법으로 증폭된 유전자를 정제하였다. 정제된 유전자는 MACROGEN (Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였으며, MLST database (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>)에서 각각의 대장균 염기서열을 입력하여 sequence type (ST)과 clonal complex (CC)를 분석하였다.

#### 항생제 내성 분석

모든 UPEC들은 amikacin (64 µg ml<sup>-1</sup>), ampicillin (32 µg ml<sup>-1</sup>), aztreonam (32 µg ml<sup>-1</sup>), cefepime (32 µg ml<sup>-1</sup>), cefoxitin (32 µg ml<sup>-1</sup>), cefotaxime (32 µg ml<sup>-1</sup>), ceftazidime (32 µg ml<sup>-1</sup>), ciprofloxacin (4 µg ml<sup>-1</sup>), chloramphenicol (32 µg ml<sup>-1</sup>), gentamicin (16 µg ml<sup>-1</sup>), imipenem (4 µg ml<sup>-1</sup>), meropenem (4 µg ml<sup>-1</sup>), tetracycline (16 µg ml<sup>-1</sup>), tobramycin (16 µg ml<sup>-1</sup>), trimethoprim (16 µg ml<sup>-1</sup>) 등 총 15종의 항생제에 대하여 미량희석법을 이용하여 항생제에 대한 내성 여부를 분석하였다. 내성 분석은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) 기준에 의거하여 분석하였으며, 대장균 ATCC 25922는 대조군으로 사용하였다.

#### 생물막 형성 조사

LB 배지에서 증식한 균 2 µl를 염화나트륨이 포함되지

않은 LB 배지 200 µl가 들어 있는 Ninety six-well microplates (Corning, Corning, NY, USA)에 1/100의 농도(v/v)로 접종하였다. 배양기에서 24시간 동안 정제 배양 후 배양액을 제거하고 멸균증류수에 3번 세척하였다. 0.1% crystal violet을 이용하여 15분간 염색한 후 멸균증류수에 3회 세척한 다음 30분간 건조하였다. 염색된 생물막의 정량적 측정을 위해 건조가 완료된 96-well plate에 30% 아세트산을 첨가하여 용출된 염색액을 96-well plate로 옮긴 뒤 UV max kinetic microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 600 nm의 흡광도(optical density, OD)로 측정하였다. 음성 대조군으로 균 배양에 사용된 배지를 사용하였다. 모든 측정치의 표준편차를 cut-off optical density (OD<sub>c</sub>)로 두고 non-adherent (OD≤OD<sub>c</sub>), weakly adherent (OD<sub>c</sub><OD≤2×OD<sub>c</sub>), moderately adherent (2×OD<sub>c</sub><OD≤4×OD<sub>c</sub>), strongly adherent (4×OD<sub>c</sub><OD)로 측정된 생물막을 구분하였다 (20).

#### 균의 이동성 조사

배양된 요로감염성 대장균 균액 10 µl를 0.3% Agar 농도의 LB 배지의 중앙 심부에 주입한 후 16시간 동안 37°C 배양기에 정치하였다. Davinch-Gel™을 이용하여 배양배지 표면영상을 수집한 다음, ImageJ ([imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij)) 소프트웨어를 이용하여 균 이동성의 정량적 범위를 측정하였다.

#### 세포사멸 측정

T24 세포를 12-well plate에 1×10<sup>5</sup> well<sup>-1</sup>으로 배양하였다. 배양된 세포에 대장균을 multiplicity of infection (MOI) 10으로 감염시킨 뒤 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 기존의 세포배양배지를 제거하고 인산완충용액으로 3회 세척한 뒤 Trypsin-EDTA 완충용액(WelGene) 처리를 통해 세포를 1.5 ml tube로 옮긴다. 떼어낸 세포는 Annexin 결합 완충액(ChemoMetec, Allerod, Denmark)을 이용하여 1회 세척하고 3분간 1,000 rpm으로 원심분리를 통해 세포를 침전시켰다. Annexin 결합 완충액 100 µl와 CF488A Annexin V (ChemoMetec) 0.5 µl, Hoechst-33342 (ChemoMetec) 0.5 µl를 넣고 침전된 세포를 풀어준 뒤 암실에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, Annexin 결합 완충액 100 µl와 propidium iodide (PI, ChemoMetec) 0.5 µl를 넣어준 다음 NC-Slide A2 (ChemoMetec)에 30 µl를 분주하여 NucleoCounter® NC-3000™ (ChemoMetec)을 이용하여 측정하였다.

## DNA 절편화 분석

T24 세포를 12-well plate에  $1 \times 10^5$  well<sup>-1</sup>으로 배양한 세포에 대장균을 MOI 10으로 감염시킨 뒤 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 세포 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 기존의 배양배지를 제거하고 멸균된 인산완충용액으로 세척한 뒤 Trypsin-EDTA 완충용액을 사용하여 세포를 분리하였다. 10,000 rpm으로 감염된 세포를 원심한 후 용해용 완충용액(1% NP-40, 50 mM pH 6.5 Tris-Cl, 25 mM EDTA)를 넣고 10분간 얼음에서 세포를 용해시켰다. 5분간 4,500 rpm 원심분리를 통해 상등액만 취한 후 1.5 ml tube에 옮긴 뒤 상등액에 RNase (10 mg ml<sup>-1</sup>, NANOHELIX) 2 µl와 10% sodium dodecylsulfate 3 µl를 첨가한 후 37°C 항온 수조에서 2시간 동안 반응시켰다. Protease K (20 mg ml<sup>-1</sup>, NANOHELIX) 3 µl를 첨가한 후 50°C 항온 수조에 2시간 동안 반응 후 100% 에탄올을 반응물의 2.5배 양만큼 첨가한 뒤 -20°C에서 16시간 동안 보관하였다. 20분간 15,000 rpm 원심분리 후 상등액을 제거한 뒤 30분간 건조시켰다. TE 완충액 (pH 8.0, NANOHELIX) 50 µl를 넣어 37°C 항온 수조에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 1.8% agarose gel에서 전기영동을

한 뒤 ethidium bromide로 염색한 뒤 자외선으로 확인하였다.

## 통계 분석

생물막 형성 조사에서 cut-off value를 구하기 위해 음성 대조군의 평균과 표준편차를 구하였다. 병원성 유전자 조사에서 그룹 간 비교를 위해 *t*-test를 이용하였고, 운동성 조사에서는 모든 개체간의 비교를 one-way ANOVA로 개체간의 유의성을 판단하였다. 모든 그래프와 통계 처리는 Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

## RESULTS

## 대장균 확인

총 58개의 UPEC은 VITEK®2 system을 통해 대장균임을 확인하였으며, 무작위로 대장균을 선택하여 성장 곡선과 집락 형성 단위(colony-forming unit, CFU)를 조사하였다. 분석을 통해 대부분 UPEC의 성장 곡선이 유사한 패턴을 가지며, OD값이 1일 때, 대장균의 군수가  $1 \times 10^8$  cfu/ml임을 확인하였다.

Table 1. Primers used for MLST

Housekeeping gene	Primer	Primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Annealing (Tm)
<i>Adk</i> (adenylate kinase)	adk-F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	54
	adk-R	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>FumC</i> (fumarate hydratase)	fumC-F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	54
	fumC-R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>GyrB</i> (DNA gyrase)	gyrB-F	TCGCGCACACGGATGACGGC	911	60
	gyrB-R	ATCAGGCCTTCACGCGATC		
<i>Icd</i> (isocitrate dehydrogenase)	Icd-F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	54
	Icd-R	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>Mdh</i> (malate dehydrogenase)	Mdh-F	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	932	60
	Mdh-R	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
<i>PurA</i> (adenylosuccinate synthetase)	purA-F	CGCGCTGAGAAAGAGATGA	816	54
	purA-R	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>RecA</i> (adenosine triphosphate/guanosine triphosphate binding motif)	recA-F	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780	58
	recA-R	TCGTCGAAATCTACGGACCGGA		

**Table 2.** Prevalence of sequence type and clonal complex in UPEC isolated from UTI

Clonal Complex (CC)	Sequence type	MLST allelic profile							No. (%) of isolates
		<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
ST 95 Cplx	ST 95	37	38	19	37	17	11	26	14 (24.1)
	ST 979	37	38	19	13	17	11	26	1 (1.7)
	ST 3201	37	38	4	37	17	11	26	1 (1.7)
ST 73 Cplx	ST 73	36	24	9	13	17	11	25	10 (17.2)
	ST 638	76	24	9	13	17	11	25	5 (8.6)
ST 131 Cplx	ST 3443	13	40	47	13	36	11	29	3 (5.2)
UA									24 (41.4)

UA, Unassigned to any clonal complex

**Table 3.** Prevalence of virulence gene in clonal complex

Virulence gene	ST95 Cplx		ST73 Cplx		ST95 Cplx vs ST73 Cplx	Total	
	n=16	(%)	n=24	(%)	<i>p</i> value	58	(%)
<i>FimH</i>	16	(100)	24	(100)	1	58	(100)
<i>Sfa</i>	16	(100)	24	(100)	1	58	(100)
<i>PapA</i>	11	(68.8)	5	(20.8)	<b>0.003</b>	23	(39.7)
<i>HylA</i>	7	(43.8)	21	(87.5)	<b>0.003</b>	36	(62.1)
<i>Cnf I</i>	8	(50)	21	(87.5)	<b>0.01</b>	38	(65.5)
<i>LucC</i>	15	(93.8)	17	(70.8)	0.08	47	(81)
<i>AfaC</i>	–	–	2	(8.3)	0.242	5	(8.6)
<i>FeoB</i>	16	(100)	23	(95.8)	0.414	57	(98.3)
<i>Irp-2</i>	15	(93.8)	22	(91.7)	0.809	55	(94.8)
<i>IroN</i>	4	(25)	17	(70.8)	<b>0.005</b>	23	(39.7)
<i>Iha</i>	1	(6.3)	18	(75)	<b>0.000025</b>	30	(51.7)
<i>Eae</i>	–	–	0	–	1	6	(10.3)
<i>Stb</i>	5	(31.3)	10	(41.7)	0.51	25	(43.1)
<i>LT-1</i>	–	–	–	–	1	–	–

## MLST

UPEC에 존재하는 7개의 항존 유전자에 대해 각각 유전자증폭방법과 유전자 염기서열 분석을 바탕으로 MLST를 조사하였다(Table 1). 그 결과, ST95가 24.1% (n=14)로 가장 높게 나타났고, ST73이 17.2% (n=10)로 두 번째로 높은 빈도를 보였다. 그 다음으로는 ST638, ST842가 8.6% (n=5)로 높은 빈도를 보였다. 이외에도 ST992와 ST3443

이 5.2% (n=3), ST782 (n=2)와 ST2270, ST2204, ST3283, ST3201, ST3440, ST4556, ST4586, ST5150, ST4847, ST636, ST537, ST648, ST69, ST964, ST979, ST996이 각각 1주로 조사되었다. 유전적 유연관계를 분석했을 때, ST95 Cplx (sequence type complex)가 16주로 가장 많은 수를 나타내었으며, ST 73 Cplx가 15주로 두 번째로 높은 빈도를 나타내었다(Table 2).

## 병원성 유전자 빈도(prevalence of virulence gene)

임상 분리 균주의 병원성 인자 분포를 확인하기 위해 전체 균주를 대상으로 병원성 인자를 PCR로 조사하였다. 모든 대장균에서 *FimH* (100%), *Sfa* (100%), *FeoB* (98.3%), *LucC* (81%), *Irp-2* (94.8%)은 높은 빈도를 보이지만 *LT-1* (0%), *AfaC* (8.6%), *Eae* (10.3%)은 대체로 낮은 빈도를 나타냈다. 가장 빈도가 높은 2개의 CC (ST95 Cplx, ST73 Cplx)와 병원성 유전자의 연관성을 비교하면 *FimH*, *Sfa*, *FeoB*, *Irp-2* 유전자들은 두 그룹에서 모두 높은 빈도로 존재하지만, 반대로 *AfaC*, *Eae*, *LT-1* 유전자들은 두 그룹에서 모두 낮은 빈도로 존재하는 공통점을 보였다. 하지만 ST95 Cplx에서는 부착에 관련된 *PapA* 유전자가 ST73 Cplx에 비해 높은 빈도를 나타내지만, ST73 Cplx에서는 toxin과 관련된 *HylA*, *CnfI*와 부착, 생존에 관련된 *AfaC*, *IroN*, *Iha*의 유전자가 ST95 Cplx에 비해 상대적으로 높은 빈도를 나타내었다(Table 3).

## 항생제 내성(antibiotics resistance)

전체 UPEC을 15종류의 항생제에 대한 감수성을 미

량회식법을 이용하여 조사하였다. 49주의 균주(84.4%)가 ampicillin에 내성을 보였으며, 이외에도 trimethoprim, tetracycline에 대해서는 각각 22 (37.9%), 21 (36.2%)주의 균주가 내성을 가진 것으로 조사되었다. Amikacin과 imipenem, meropenem에서는 내성이 존재하지 않고 나머지 항생제에서는 낮은 내성을 나타냈다. CC에서 많은 수를 차지하는 ST95 Cplx와 ST73 Cplx 두 그룹 모두 amikacin, imipenem, meropenem, ceftazidime, cefepim, cefoxitin에서는 높은 감수성을 나타내지만, 특이적으로 ST95 Cplx에서는 chloramphenicol, ST73 Cplx에선 cefoxitin에 내성이 존재하지 않는 결과를 보였다(Table 4).

## 생물막 형성 조사(biofilm formation assay)

Novais *et al.* (20)이 조사한 방법에 따라 UPEC을 '생물막을 형성하지 않음(non-adherent)', '약하게 형성(weakly adherent)', '중간 정도로 형성(moderately adherent)'과 '강하게 형성(strongly adherent)'으로 구분하였다. 총 11주(#10, 11, 15, 16, 21, 23, 24, 27, 42, 43, 49, CFT073)의 균주가 생물막을 형성하지 않았고(OD≤0.1), 22주(#1, 2, 3, 5, 6, 12, 13, 14, 15-1, 18, 19, 29, 32-1, 33, 36, 39, 45, 46, 50, 51, 52, 62)의 균

Table 4. Prevalence of antibiotics resistance in clonal complex

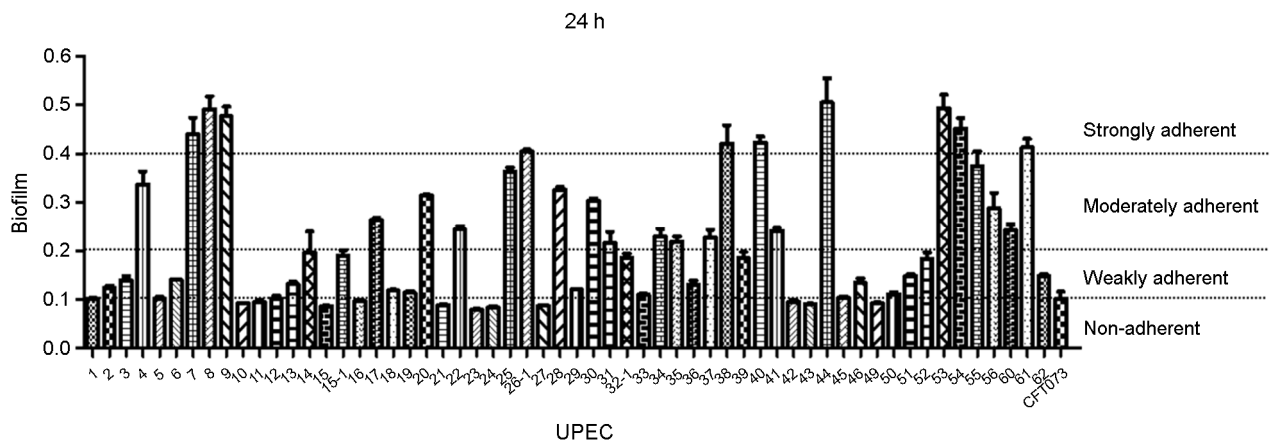
Antibiotics	ST95 Cplx		ST73 Cplx		Total	
	n=16	%	n=24	%	n=58	%
Gentamycin	2	(12.5)	5	(20.8)	11	(18.9)
Tobramycin	2	(12.5)	6	(25)	9	(15.5)
Amikacin	–	–	–	–	–	–
Ampicillin	11	(68.8)	23	(95.8)	49	(84.4)
Imipenem	–	–	–	–	–	–
Meropenem	–	–	–	–	–	–
Cefotaxime	2	(12.5)	5	(20.8)	8	(13.7)
Ceftazidime	1	(6.3)	2	(8.3)	4	(6.8)
Cefepim	1	(6.3)	1	(4.2)	4	(6.8)
Cefoxitin	1	(6.3)	–	–	3	(5.1)
Aztreonam	2	(12.5)	2	(8.3)	5	(8.6)
Chloramphenicol	–	–	2	(8.3)	2	(3.4)
Trimethoprim	5	(31.3)	5	(20.8)	22	(37.9)
Ciprofloxacin	3	(18.8)	6	(25)	18	(31)
Tetracycline	3	(18.8)	7	(29.2)	21	(36.2)

주가 약하게 형성( $0.1 < OD \leq 0.2$ )하였다. 14주(#4, 17, 20, 22, 25, 28, 30, 31, 34, 35, 37, 41, 55, 56, 60)의 군주가 중간 정도로 형성( $0.2 < OD \leq 0.4$ )하였고, 11주(#7, 8, 9, 26-1, 38, 40, 44, 53, 54, 61)의 군주가 생물막을 강하게 형성하는 것( $0.4 < OD$ )으로 조사되었다(Fig. 1). 앞서 실시한 MLST와 생물막 형성의 연관성 분석을 통해 생물막을 강하게 형성하는 군주들은 대부분 ST73 Cplx에 속하는 것을 확인하였다. 생물막을 강하게 형성하는 군주들의 병원성 유전자의 특징을 확인하였을 때 *HylA*, *CnfI*를 모든 군주가 가지고 있었으며 *IroN*, *Iha* 유전자를 70%, 90%의 군주가 각각 가지고

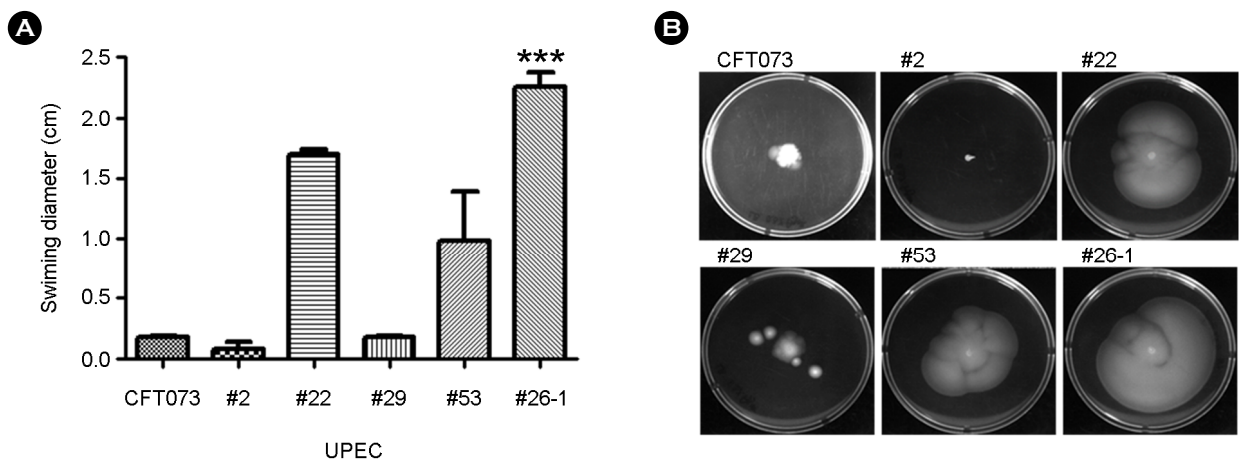
있었지만, *PapA* 유전자는 모든 군주가 가지고 있지 않은 것으로 조사되었다.

#### 이동성 조사(motility test)

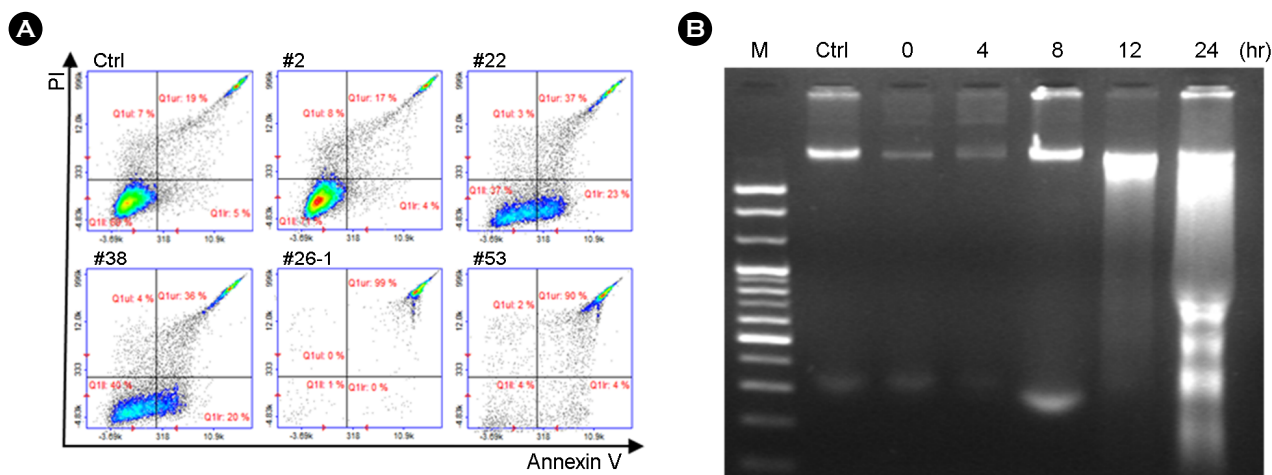
생물막 형성 결과를 바탕으로 나눈 그룹에서 대표 군주를 선발하여 이동성 조사 실험을 진행하였다. 생물막을 강하게 형성하는 그룹인 53번 군주와 26-1번 군주, 중간 정도로 형성하는 그룹인 22번 군주와 약하게 형성하는 그룹인 2번 군주와 29번 군주, CFT073을 선택하여 균의 이동성을 조사하였다. 실험대상 군주 중 26-1번 군주가 가장



**Figure 1.** Biofilm formation of UPEC isolates. UPEC isolates incubate for 24 h at 37°C in LB broth without NaCl. Biofilm was stained by 0.1% crystal violet. Error bars represent the standard deviations of the results from three independent experiments.



**Figure 2.** Motility of UPEC. (A and B) Motility on 0.3% LB Agar of CFT073, isolated UPEC No.2, 22, 26-1, 53 and 29 after 16 h of incubation at 37°C. The errors bars in panel A represent the standard deviations from four independent experiments. Significant difference in motility was determined using one-way ANOVA; \*,  $p < 0.005$ .



**Figure 3.** UPEC-induced cell death. (A) Apoptosis of T24 infected with UPEC No. 2, 22, 38, 26-1 or 53 (MOI 10) for 3 h was measured by flow cytometry using Annexin V/PI staining. (B) DNA fragmentation analysis of T24 cells infected with UPEC isolate No. 26-1. T24 cells were infected with UPEC isolate No. 26-1 at an MOI of 10 for different time point at 37°C. M, 100 bp DNA marker; Ctrl, no infection.

넓은 면적을 형성하였고, 22번 균주와 53번 균주가 다음으로 넓은 면적을 형성하였지만 29번, CFT073 균주들은 비교적 적은 면적을 형성하였다. 그리고 2번 균주는 이동성이 없는 형태를 나타냈다(Fig. 2).

#### 세포사멸 (cell death)

병원성 유전자 빈도 조사를 통해 세포사를 유도하는 독소 유전자(*cnfI*, *hlyA*)를 가진 UPEC이 있음을 확인하였다 (21, 22). 이 두 유전자와 세포사의 관계를 조사하기 위해 *cnfI*, *hlyA* 유전자를 모두 가진 UPEC (#2, 22, 26-1, 53)을 각각 T24 세포에 MOI 10으로 감염시켜 Annexin V/PI 염색을 통해 세포사가 일어나는지 여부를 조사하였다. 감염시키지 않은 T24 세포와 임상 균주 2번을 감염시킨 T24 세포는 음성 대조군으로 사용하였다. 균주 22번과 38번을 감염시킨 T24 세포는 Annexin V 양성 쪽으로 각각 23%, 20%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 26-1번 균주와 53번 균주를 감염시킨 T24 세포는 Annexin V와 PI 모두 양성인 쪽으로 각각 99%, 90%로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3A). Annexin V/PI 염색을 통해 38번 균주와 22번 균주가 세포자멸사의 경로로 세포사를 일으킨다는 사실은 확인하였지만, 26-1번 균주와 53번 균주는 어느 형태의 세포사를 유도하는지는 확인하지 못하였다. 따라서 세포자멸사의 특징 중 하나인 DNA 절편화 분석을 통해 UPEC에 의한 세포사가 세포자멸사임을 확인하고자 하였

다 (23). 감염시키지 않은 T24와 감염 후 8시간이 되기 전까지는 DNA가 손상 없이 응축되어 있는 모습을 확인하였다. 감염 후 12시간부터는 DNA가 손상되어 gel상에서 DNA 절편화 현상을 확인할 수 있었으며, 24시간에서는 DNA가 절편화가 완전히 진행된 형태로 나타났다(Fig. 3B).

## DISCUSSION

UTI는 UPEC에 의해 빈번하게 발생하는 흔한 질환으로써 UTI의 발병 기전을 이해하고 치료와 예방을 위해서 감염 초기 숙주와의 상호작용과 세균의 병원성 인자 및 감염성과의 관계에 대한 연구가 무엇보다 중요하다고 사료된다. UPEC은 다양한 병원성 인자들을 가지고 있으며, 이 병원성 인자들은 특정 분류그룹과 연관성이 높은 것으로 연구되어 있다 (24, 25). UPEC을 동정하는 것은 역학 조사에 도움이 될 뿐만 아니라 UPEC의 생물학적 특징을 쉽게 파악할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구는 임상에서 분리된 UPEC을 MLST로 동정한 뒤, 항생제 내성과 병원성 인자 분석 등을 포함한 분자생물학적인 특징을 조사하고자 하였다.

충남대학교병원에 내원한 UTI로 진단된 어린이들에서 분리된 UPEC을 MLST를 통하여 UPEC을 분류하고 계통적 유연관계를 파악하고자 하였다. 그 결과, ST95가 24.1%, ST73이 17.2%로 존재하며, 이외에도 다른 ST이 25종류가

존재하였다. 또한, 유전적으로 유연관계를 나타내는 CC를 확인하였을 때, ST95 Cplx가 가장 높은 비율을 나타내지만, 이외에도 ST73 Cplx, ST131 Cplx 등 다양한 CC가 존재하였다. ST95 Cplx와 ST73 Cplx가 높은 빈도를 보이는 것은 지역사회에 두 가지 형태의 CC에 속한 균주들에서 파생된 균주들이 주를 이루고 있음을 알 수 있다.

각각의 균주들을 대상으로 병원성 인자 여부 분석을 통해 전체 균주가 보유하고 있는 병원성 인자가 *FimH* (100%), *Sfa* (100%), *PapA* (39.7%), *HylA* (62.1%), *CnfI* (65.5%), *lucC* (81%), *AfaC* (8.6%), *FeoB* (98.3%), *Irp-2* (94.8%), *IroN* (39.7%), *Iha* (51.7%), *Eae* (10.3%), *Stb* (43.1%)과 *LT-1* (0%)으로 조사되었다. 이를 통해 UPEC이 UTI를 일으키기 위해서는 부착에 관여하는 유전자인 *FimH*, *Sfa*와 생존에 관련된 유전자인 *lucC*, *FeoB*, *Irp-2*가 필요한 것으로 사료된다. 반면에 *AfaC*, *Eae*, *LT-1*와 같은 유전자는 UPEC이 UTI를 일으키는데 미치는 영향이 미비한 것으로 보인다.

항생제 내성 검사를 통해 ampicillin, trimethoprim, tetracycline, ciprofloxacin에 내성을 가지는 UPEC의 비율이 다른 항생제에 비해 많이 존재하였다. 위 4가지 항생제들은 UTI 치료에 사용된 적이 있는 항생제들이기 때문에 다른 항생제보다 내성을 가지는 대장균수가 많은 것으로 추측된다. 반대로 내성을 나타내지 않았던 imipenem, meropenem과 amikacin은 UTI 치료에 응용할 수 있다고 생각된다.

각각의 MLST 그룹마다 병원성 유전자의 빈도가 조금씩 다르며 특정 유전자가 특정 그룹에서는 높은 빈도를 보이는 결과를 확인하였다. 모든 균주가 *fimH*를 가지고 있었으며, Type 1 fimbriae는 생물막 형성에 영향을 미치는 주요 형질이기 때문에 생물막 형성 조사를 통해 개체 수준에서 병원성 인자와 UPEC의 병원성 인자들간의 연관성을 추측하고자 하였다 (26). 생물막 형성 정도에 따라 4가지 등급으로 나누고 생물막을 강하게 형성하는 그룹을 모아 그들의 ST를 확인하였다. 생물막을 강하게 형성하는 대부분 UPEC이 ST73에 속하며, 이들 대부분은 toxin 유전자인 *HylA*과 *CnfI*를 가지고 있었다. Hemolysin이 생물막 형성에 중요한 영향을 미친다는 보고가 있는데, 이를 통해 이번 실험에서 발생한 균주들 간의 생물막 형성 차이는 *HylA* 유무에 의한 영향으로 발생한 차이로 생각된다 (27).

앞서 생물막 형성 실험을 통해 생물막 형성을 잘하는 균주에는 *HylA*, *CnfI* 유전자가 존재하는 경향을 보였다. 이

유전자들은 UPEC의 대표적인 toxin 유전자이며, UPEC은 이 유전자들을 이용하여 요로 상피세포의 세포사를 유도한다고 알려져 있다 (21, 22). 본 연구에서도 생물막 형성을 잘하는 균주가 세포사를 유도하며, 이 세포사의 종류가 세포자멸사임을 확인하였다. 이를 통해 *HylA*, *CnfI*가 UTI 발병에 중요한 인자들은 아니지만, UPEC의 병원성을 높이는데 기여한다고 사료된다. 생물막 형성을 잘하는 균주는 운동성과 세포사 유도하는 능력이 생물막 형성이 낮은 균주에 비해 높은 경향을 보이지만, 이에 관한 정확한 작용 기전 및 대장균 계통간의 관련성에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구의 대상이 된 균주 수가 많지 않은 후향적 연구라는 점의 한계가 있지만 향후 많은 균주확보를 통한 전향적 연구 및 UPEC에 의한 질병발생 기전규명의 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCE

- 1) Asadi S, Kargar M, Solhjoo K, Najafi A, Ghorbani-Dalini S. The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli* With Antibiotic Resistance. Jundishapur J Microbiol 2014;7:e9936.
- 2) Tabasi M, Asadi Karam MR, Habibi M, Yekaninejad MS, Bouzari S. Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. Osong Public Health Res Perspect 2015;6:261-8.
- 3) Blango MG, Mulvey MA. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:1855-63.
- 4) Lee S, Yu JK, Park K, Oh EJ, Kim SY, Park YJ. Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with blaCTX-M. Ann Clin Lab Sci 2010;40:361-7.
- 5) Bashir S, Sarwar Y, Ali A, Mohsin M, Saeed MA, Tariq A, et al. Multiple drug resistance patterns in various phylogenetic groups of uropathogenic *E. coli* isolated from Faisalabad region of Pakistan. Braz J Microbiol 2011;42:1278-83.
- 6) Obata-Yasuoka M, Ba-Thein W, Tsukamoto T, Yoshikawa H, Hayashi H. Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other

- extraintestinal *E. coli*. Microbiology 2002;148:2745-52.
- 7) Tartof SY, Solberg OD, Manges AR, Riley LW. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multi-locus sequence typing. J Clin Microbiol 2005;43:5860-4.
  - 8) Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Chattopadhyay S, Tchesnokova V, Sokurenko EV, *et al.* The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* isolates vary according to patient characteristics. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:5912-7.
  - 9) Yun KW, Kim DS, Kim W, Lim IS. Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. Korean J Pediatr 2015; 58:20-7.
  - 10) Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev 1991;4:80-128.
  - 11) Le Bouguenec C, Garcia MI, Ouin V, Desperrier JM, Gounon P, Labigne A. Characterization of plasmid-borne *afa-3* gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. Infect Immun 1993;61:5106-14.
  - 12) Lacher DW, Steinsland H, Whittam TS. Allelic subtyping of the intimin locus (*eae*) of pathogenic *Escherichia coli* by fluorescent RFLP. FEMS Microbiol Lett 2006;261:80-7.
  - 13) Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, *et al.* Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. Science 1998;282:1494-7.
  - 14) Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol 2008;85:11-9.
  - 15) Kammler M, Schön C, Hantke K. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1993;175:6212-9.
  - 16) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004;2:123-40.
  - 17) Uhlich GA, Cooke PH, Solomon EB. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. Appl Environ Microbiol 2006;72:2564-72.
  - 18) Nolan LM, Cavaliere R, Turnbull L, Whitchurch CB. Extracellular ATP inhibits twitching motility-mediated biofilm expansion by *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol 2015;15:55.
  - 19) Lee JH, Subhadra B, Son YJ, Kim DH, Park HS, Kim JM, *et al.* Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. Lett Appl Microbiol 2016; 62:84-90.
  - 20) Novais Â, Vuotto C, Pires J, Montenegro C, Donelli G, Coque TM, *et al.* Diversity and biofilm-production ability among isolates of *Escherichia coli* phylogroup D belonging to ST69, ST393 and ST405 clonal groups. BMC Microbiol 2013;13:144.
  - 21) Mills M, Meysick KC, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. Infect Immun 2000;68:5869-80.
  - 22) Dhakal BK, Mulvey MA. The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. Cell Host Microbe 2012;11:58-69.
  - 23) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 1998;391: 43-50.
  - 24) Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. J Infect Dis 2000;181:261-72.
  - 25) Gordon DM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. Environ Microbiol 2008;10:2484-96.
  - 26) Emody L, Kerényi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22 Suppl 2:29-33.
  - 27) Soto SM, Smithson A, Martinez JA, Horcajada JP, Mensa J, Vila J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. J Urol 2007;177:365-8.