

ORIGINAL ARTICLE

## 제주 지역에서 23S rRNA 점 돌연변이와 관련된 Clarithromycin 내성 *Helicobacter pylori*

김태윤, 송현주, 신선영<sup>1</sup>, 김조현<sup>2</sup>, 나수영, 부선진, 최은광, 조유경, 김홍업, 송병철

제주대학교 의학전문대학원 내과학교실, 제주대학교병원 인체자원은행<sup>1</sup>, 가톨릭대학교 의과대학 부천성모병원 병리학교실<sup>2</sup>

### Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* Associated with 23S rRNA Point Mutations in Jeju Island

Taeyun Kim, Hyun Joo Song, Sun Young Shin<sup>1</sup>, Jo-Heon Kim<sup>2</sup>, Soo-Young Na, Sun-Jin Boo, Eun Kwang Choi, Yoo-Kyung Cho, Heung Up Kim and Byung-Cheol Song

Department of Internal Medicine, Jeju National University School of Medicine, National Biobank of Korea, Jeju National University Hospital<sup>1</sup>, Jeju, Department of Pathology, Bucheon St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine<sup>2</sup>, Bucheon, Korea

**Background/Aims:** The point mutations in 23S rRNA gene accounts for the majority of the clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. This study aimed to investigate the association between the clarithromycin-resistance of *H. pylori* and the failure of primary *H. pylori* eradication therapy in Jeju Island.

**Methods:** Between April 2011 and October 2012, 6,937 patients underwent endoscopy, and *H. pylori* infection was evaluated in 2,287 patients (33.0%). Total of 110 patients with *H. pylori* infection were treated with proton pump inhibitor (PPI)-based triple therapy. The result of eradication was evaluated with urea breath test, histology and PCR which were conducted 4 weeks from the last dose of medicine.

**Results:** The patients who had point mutations were 33 (26.0%). A2142G and A2143G mutations were observed in 10 patients (7.9%) and 23 patients (18.1%). Among 110 patients treated with PPI-based triple therapy, the success rate of the eradication therapy was 52.7% (58/110) and 70.7% (58/82) by intention-to-treat and per-protocol analysis, respectively. Fifteen of the 24 patients who failed the eradication therapy showed point mutations; 1 patient (4.2%) showed A2142G mutation and 14 patients (58.3%) showed A2143G mutation. Patients with A2143G mutation *H. pylori* showed higher failure rate of 87.5%. Patients with A2142G mutation *H. pylori* showed similar failure rate compared to those of the patients with wild type *H. pylori*.

**Conclusions:** In Jeju Island, the frequency of 23S rRNA point mutations is similar (26.0%) with other regions of Korea (15.8-31.3%). A2143G mutation is associated with the failure of *H. pylori* eradication. (Korean J Gastroenterol 2013;61:252-258)

**Key Words:** 23S rRNA; Point mutation; Clarithromycin; Resistance; *Helicobacter pylori*

## 서론

*Helicobacter pylori*는 만성위염, 소화성 궤양, 위 변연부 B세포 림프종, 그리고 위암의 원인으로 작용하는 그람 음성

막대균이다.<sup>1,2</sup> 감염률은 전 세계 인구의 50% 이상이며,<sup>3</sup> 국가 별로는 선진국인 서유럽이나 미국에서는 25-50%, 개발도상 국가에서는 70-80%, 한국은 전 세계 평균보다 높은 60%가 감염되어 있다.<sup>4,5</sup> 동일한 인구 집단 내에서 공공위생 수준의

Received December 27, 2012. Revised March 5, 2013. Accepted March 7, 2013.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 송현주, 690-767, 제주시 아란 13길 15, 제주대학교병원 내과

Correspondence to: Hyun Joo Song, Department of Internal Medicine, Jeju National University Hospital, 15 Aran 13-gil, Jeju 690-767, Korea. Tel: +82-64-717-1266, Fax: +82-64-717-1131, E-mail: songhj@jejunu.ac.kr

Financial support: This work was supported by a research from grant from Jeju National University Hospital. Conflict of interest: None.

향상으로 인하여 젊은 세대의 감염률은 지속적으로 낮아지고 있지만, 고령층에서는 한 번 감염되면 재균 치료를 하지 않는 한 대부분의 경우 평생 감염이 지속되는 이유로 감염률이 높다.<sup>1</sup> 이처럼 높은 감염률과 만성위염, 소화성 궤양, 위 변연부 B세포 림프종, 그리고 위암의 원인으로 작용하기 때문에 *H. pylori*의 재균 치료는 중요하며 우리나라에서는 1998년 이후에 프로톤 펌프 억제제(proton-pump inhibitor)와 amoxicillin, clarithromycin을 1-2주간 경구 투여하는 3제 요법을 일차 재균 치료로 사용하고 있다. 이 중 clarithromycin에 대한 *H. pylori*의 내성률은 2001년 한국에서 10% 이하로 보고된 바 있으나<sup>6</sup> 2008년 23S rRNA 점 돌연변이를 이용한 clarithromycin 내성에 대한 연구에서는 21.6%였고, 총 변이 빈도는 15.8-31.3%로 연구 병원에 따라 다양하였다.<sup>7</sup> 이는 국내에서 macrolide와 같은 항생제를 10년 이상 광범위하게 사용하면서 clarithromycin 항생제 내성을 보이는 *H. pylori*가 점차 증가하고 있으며, 이로 인해 재균율이 감소하여 심각한 문제가 되고 있음을 시사한다.<sup>8</sup> *H. pylori* 균주에 대한 3제 요법의 재균 성공률은 clarithromycin 감수성 균주는 81-95%, clarithromycin 내성 균주는 0-48%로 보고되어 있어 clarithromycin 내성이 치료 실패에 중요한 원인이 되므로 이를 확인하는 것이 중요하다.<sup>8</sup>

현재까지 한국에서 지역에 따른 *H. pylori* 균주 내성에 대한 연구는 서울, 경기, 강원, 부산 지역에 국한되어 있으며<sup>9</sup> 제주 지역에서 clarithromycin 내성에 대한 연구는 없었다. 따라서 이번 연구의 목적은 제주 지역에서 *H. pylori* 재균 치료 실패와 clarithromycin 내성과 연관된 것으로 알려진 23S rRNA 점 돌연변이의 빈도와 재균 치료와의 관련성을 확인하고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2011년 4월부터 2012년 10월까지 제주대학교병원 소화기 내과에 내원한 환자 중 내시경을 시행받은 환자는 6,937명이며, 헬리코박터 감염 여부를 확인하였던 환자는 2,287명(33.0%)이었다. 소화성 궤양, 점막절제 후 궤양 등 *H. pylori* 감염시 치료의 적응증이 되는 환자를 대상으로 이번 연구에 동의한 환자 213명 중에 상부위장관 내시경 중 시행한 신속요소분해효소검사, Giemsa stain 검사를 통해 *H. pylori* 감염이 확인되어 1차 3제 요법(lansoprazole 60 mg, amoxicillin 2.0 g, clarithromycin 1,000 mg)으로 재균 치료의 대상이 되는 환자 127명을 대상으로 하였다. 연구대상에는 해당 기간 내에 *H. pylori* 재균 치료를 처방받은 모든 환자 중 본인(보호자)이 연구에 대한 설명을 듣고 정보활용동의서를 작성한 환자를 포

함하였으며, 연구에 동의하지 않는 환자와 위암 및 *H. pylori* 재균 치료에 사용하는 약제에 대한 금기증을 가진 환자는 제외하였다. 연구대상에 포함된 127명에 대해 연령과 성별, 체질량지수, *H. pylori* 재균 치료 적응증, 당뇨, 고혈압, 고지혈증 등의 기저질환, 흡연력, 음주력, 약제 복용 정도에 따른 순응도 등의 변수들을 전향적으로 분석하였다. 그리고 일차 3제 *H. pylori* 재균 치료 4주 뒤 요소호기검사 또는 신속요소분해효소검사 및 조직의 Giemsa stain을 시행하여, 이 중 하나라도 양성인 경우 *H. pylori* 재균 치료 실패군으로 정의하였고, 시행한 검사에서 음성인 경우 성공군으로 정의하였다. 1차 치료 성공 여부에 따라서 성공군과 실패군 두 그룹으로 나누고, 각 환자에서의 23S rRNA 점 돌연변이 중 내성 여부와 관련성이 많이 알려진 A2142G, A2143G 돌연변이 여부를 clarithromycin PCR 결과에 따라 분석하였다.

이번 연구는 제주대학교병원의 임상시험심사위원회로부터 연구 프로토콜(IRB No. 2011-32) 승인을 받았고 모든 환자의 정보는 임상시험 전 서면 동의를 받았으며, 제주대학교병원 인체자원단위는행에서 제공한 인체자원을 이용하였고 소속 연구원에 의해 실험이 수행되었다.

### 2. 방법

#### 1) DNA 추출

우선 clarithromycin 내성유전자 검사는 위 생검 조직에서 QIAamp DNA mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 키트설명서에 따라 DNA를 분리한 후 시행하였다.<sup>10</sup> 위 생검 조직을 microcentrifuge tube에 담고, 단백질을 제거하기 위해 막대사발에 위 생검 조직을 넣고 액체질소를 조금씩 부어 넣으면서 잘게 부숴준 후 ATL buffer 180 µL를 넣고 다시 한번 갈았다. 그 다음 막대사발에 녹아져 있는 ATL buffer와 조직을 1.5 mL tube에 넣고, proteinase K 20 µL를 넣어준 후 잘 섞이도록 섞었다. 이후 56°C (dry heating block)에서 완전히 용해될 때까지 방치한 후 AL buffer 200 µL를 넣은 후 70°C (dry heating block)에서 10분간 반응시켰다. 조직이 녹아있는 1.5 mL tube에 100% 에탄올 200 µL를 첨가하여 섞어준 후 QIAamp spin column에 넣어 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 이후 세척을 위하여 column에 AW1 buffer 500 µL를 넣고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, 2차로 AW2 buffer 500 µL를 넣어 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. Column에 붙어 있는 DNA를 분리하기 위해 AE buffer (elution buffer) 50 µL를 넣어 1분간 실온에 방치한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하였다. 분리된 DNA는 자외선 분광광도계(Beckman, Brea, CA, USA)를 이용하여 정량하고 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

## 2) 내성유전자변이검사

Dual priming oligonucleotide system 기법을 도입하여 개발된 Seeplex ClaR-*H. pylori* PCR kit (Seegene Inc., Seoul, Korea)의 Seeplex Home-brew primer mix를 이용하여 유전자를 증폭하였다. DNA의 증폭은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, Branchburg, NJ, USA)을 이용하였고, kit 안의 용액을 빠른 시간에 실온에서 완전히 녹였다. Kit에 포함된 시약은 5× ClaR-HP PM, 8-MOP solution, 2× Multiplex Master였다. 완전히 녹인 kit 시약과 0.2 mL tube, 1.5 mL tube를 준비하여, 0.2 mL tube는 실제 실험에 이용될 조직의 갯수와 negative control (NC), clarithromycin의 A2142G 내성(PC1), clarithromycin의 A2143G 내성(PC2)을 포함하여 준비하였다. 1.5 mL tube는 원활한 실험을 위해 시약을 섞기 위해 사용되었다. 준비된 1.5 mL tube에 5× ClaR-HP PM (4 µL×전체 표본수), 8-MOP solution (3 µL×전체 표본수), 2× Multiplex Master (10 µL×전체 표본수)만큼 섞었다. 준비된 0.2 mL tube에 각각의 조직에 추출된 각각의 DNA 3 µL를 넣었다. DNA를 넣은 tube에 섞은 용액을 17 µL씩 넣고, 방울이 생기지 않도록 천천히 섞어주었다. 3개의 0.2 mL tube (NC, PC1, PC2)를 준비하여 NC에는 8-MOP 3 µL를 넣고, PC1, PC2에는 PC1, PC2 시약을 각각 3 µL씩 넣었다. 모든 준비가 끝나면 중합효소 연쇄반응에 실험 온도 및 시간을 맞추었다. 94°C에서 15분 동안 변성시킨 후 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 40회 증폭하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다.

## 3) 실험결과와 판정

증폭된 DNA 산물 5 µL를 2% 아가로스겔을 이용하여 100 volt에서 30분간 전기 영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 투과조명기에서 밴드를 확인하였다. 621 bp 산물이 관찰되면 *H. pylori* 양성으로 해석하였다. *H. pylori* 양성 검체에서 194 bp와 475 bp의 변이형 밴드가 관찰되지 않으면 야생형(wild type)으로, 194 bp 산물이 확인되면 A2142G 변이형으로, 475 bp 산물이 보이면 A2143G 변이형으로 해석하였다(Fig. 1).

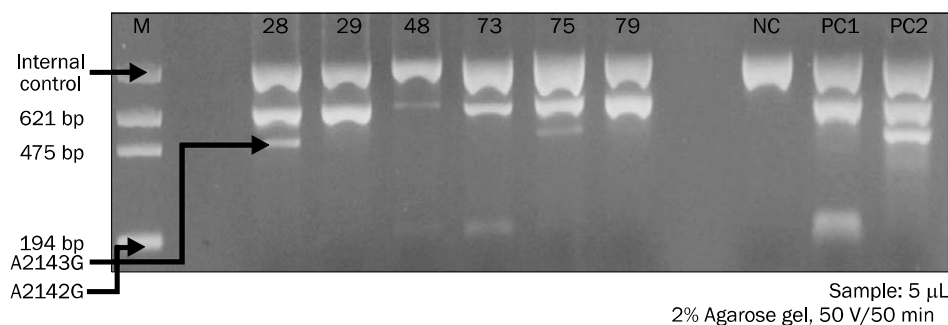
## 3. 통계 및 분석

통계 분석은 PASW Statistics 18.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하여 분석하였고 결과는 평균과 비율로 표시하였으며, 연속 변수는 평균과 표준 편차로 기술하였다. 두 그룹 간의 연속 변수에 대한 비교는 Student's t-test를 사용하였고, 비연속 변수는 chi-square test를 사용하여 분석하였다. 경향 분석은 선형 대 선형 결합(linear by linear association)을 사용하였다. 세 그룹의 비교는 one-way ANOVA test를 사용하였고, 사후 검정은 Scheffe test로 분석하였다. p값이 0.05 미만을 통계적으로 유의한 것으로 정의하였다.

**Table 1.** Demographic Characteristics of Patients

Characteristic	Patient (n=127)
Age (yr)	52±14 (15-82)
Sex (male:female)	79 (62.2):48 (37.8)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.8±3.0
Indication of <i>Helicobacter pylori</i> eradication	
Active or healing gastric ulcer	11 (8.7)
Gastric ulcer scar	6 (4.7)
Active or healing duodenal ulcers	6 (4.7)
Duodenal ulcer scar	74 (58.3)
Endoscopic therapy of gastric adenoma	18 (14.2)
Endoscopic therapy of early gastric cancer	4 (3.1)
Endoscopic therapy of gastric hyperplastic polyp	6 (4.7)
Peptic ulcer bleeding	1 (0.8)
Functional dyspepsia	1 (0.8)
Underlying disease	
Diabetes mellitus	12 (9.4)
Hypertension	26 (20.5)
Hyperlipidemia	19 (15.0)
Social history	
Smoking	54 (42.5)
Alcohol	71 (55.9)

Values are presented as mean±SD (range) or n (%).



**Fig. 1.** Detection of point mutation at A2143G and A2142G in 23S rRNA gene by polymerase chain reaction products.

M, marker; NC, negative control; PC1, PC2, clarithromycin resistance (PC1: A2143G, PC2: A2142G). Lane 28, A2143G mutation; lane 29, wild type; lane 73, A2142G mutation.

## 결 과

### 1. 대상 환자의 일반적 특성

전체 연구 대상에 포함된 127명의 환자의 기본 정보는 다음과 같다(Table 1). 환자의 평균연령은  $52 \pm 14$ 세였고, 평균 체질량지수는  $23.8 \pm 3.0 \text{ kg/m}^2$ 이었다. *H. pylori* 제균 치료의 적응질환으로 십이지장 궤양흔적 74명(58.3%), 위선종의 점막절제술 18명(14.2%), 활동성 또는 치유기 위궤양 11명(8.7%), 위 궤양흔적 6명(4.7%), 활동성 또는 치유기 십이지장 궤양 6명(4.7%) 등이 있었다.

### 2. 일차 제균 치료의 결과

연구에 포함된 127명의 환자 중 소화기내과 외래에서 일차 *H. pylori* 제균 치료를 받지 않거나 거절한 17명의 환자를 제외하고 이차 제균 치료를 시행받은 110명의 환자 중 외래에서 추적 관찰된 환자는 82명(74.5%)이었다. 82명의 환자 중 58명이 일차 제균 치료에 성공하였고, 24명의 환자는 제균 치료에 실패하였다. 성공한 58명의 환자를 intention-to-treat로 분석하면 52.7% (58/110명)의 제균 성공률을 보였으며, per-protocol로 분석하면 70.7% (58/82명)의 제균 성공률을 보였다(Fig. 2).

### 3. *H. pylori* 점 돌연변이와 일차 제균 치료 결과

*H. pylori* 감염 양성을 보인 127명의 환자 중 33명(26%)의 검체에서 23S rRNA 유전자의 변이를 보였다. 이 중 A2143G

변이는 23명(18.1%)이었고, A2142G 변이는 10명(7.9%)이었다. 23S rRNA 유전자 변이에 따른 임상적 특징을 비교 분석하였을 때(Table 2), 환자의 연령은 A2143G 변이군에서  $59 \pm 11$ 세, wild type군에서  $50 \pm 14$ 세, A2142G 변이군에서  $53 \pm 19$ 세로 A2143G 변이군의 평균 연령이 통계적으로 유의하게 높았다( $p=0.028$ ). 성별에서는 A2143G 변이군에서 여성의 비율이 통계적으로 의미 있게 다른 군에 비해 높았다( $p<0.005$ ). 체질량지수 및 기저질환에 따른 23S rRNA 유전자 변이의 통계학적인 차이는 보이지 않았다.

23S rRNA 유전자 변이에 따른 일차 제균 치료의 성공 및 실패율을 비교 분석하였다(Table 3). 제균 치료 성공군에서 연령이  $52 \pm 12$ 세, 실패군이  $59 \pm 15$ 세로 제균 치료 실패군에서 통계적으로 유의하게 연령이 높았다( $p=0.027$ ). 전체 환자

**Table 2.** Comparison of Clinical Characteristics of Patients according to *Helicobacter pylori* Point Mutation

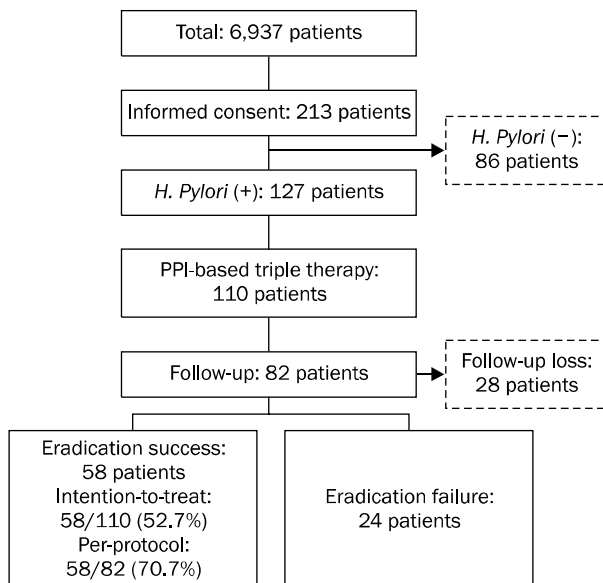
Variable	Wild type (n=94)	A2142G (n=10)	A2143G (n=23)	p-value
Age (yr)	$50 \pm 14$	$53 \pm 19$	$59 \pm 11$	0.028
Sex				< 0.005
Male (n=79)	64 (81.0)	9 (11.4)	6 (7.6)	
Female (n=48)	30 (62.5)	1 (2.1)	17 (35.4)	
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	$23.7 \pm 2.8$	$24.5 \pm 2.6$	$23.8 \pm 3.6$	0.752
Diabetes mellitus (n=12)	8 (66.7)	1 (8.3)	3 (25.0)	0.799
Hypertension (n=26)	16 (61.5)	3 (11.5)	7 (26.9)	0.266
Hyperlipidemia (n=19)	13 (68.4)	1 (5.3)	5 (26.3)	0.572

Values are presented as mean $\pm$ SD or n (%).

**Table 3.** Comparison of First *Helicobacter pylori* Eradication Results (n=82)

Variable	Success group (n=58)	Failure group (n=24)	p-value
Age (yr)	$52 \pm 12$	$59 \pm 15$	0.027
Sex			0.443
Male (n=53)	39 (73.6)	14 (26.4)	
Female (n=29)	19 (65.5)	10 (34.5)	
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	$24.2 \pm 2.7$	$22.5 \pm 3.5$	0.020
Social history			
Smoking (n=35)	23 (65.7)	12 (34.3)	0.389
Alcohol (n=47)	35 (74.5)	12 (25.5)	0.389
Compliance			0.743
100% (n=78)	55 (70.5)	23 (29.5)	
80-100% (n=2)	2 (100)	0 (0.0)	
50-80% (n=0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
< 50% (n=2)	1 (50.0)	1 (50.0)	
Point mutation			< 0.001
Wild type (n=59)	50 (84.7)	9 (15.3)	
A2142G (n=7)	6 (85.7)	1 (14.3)	
A2143G (n=16)	2 (12.5)	14 (87.5)	

Values are presented as mean $\pm$ SD or n (%).



**Fig. 2.** Results of *Helicobacter pylori* eradication with primary triple therapy.

PPI, proton pump inhibitor.

중 여자에서 돌연변이 발생이 통계적으로 높게 나왔지만, 그 밖에 치료 결과에 따른 분류에서는 성별, 흡연력, 음주력 및 약물 순응도에서는 성공군과 실패군의 통계학적인 차이는 없었고, 두 군에서 약물 순응도는 94.8-95.8%로 높았다.

23S rRNA의 점돌연변이 여부에 따른 제균 성공률은 wild type과 A2142G mutant는 각각 84.7%와 85.7%였다. 그러나 A2143G mutation이 있는 경우 제균 성공률은 12.5%로 유의하게 낮은 수준이었다.

## 고 찰

이번 연구에서는 *H. pylori*의 clarithromycin 내성과 연관된 23S rRNA 점 돌연변이 발생률은 26.0%로 국내 타 지역의 clarithromycin 23S rRNA 점 돌연변이 발생률과 비슷한 수치(15.8-31.3%)를 보였다.<sup>7</sup> 국내에서 일차 *H. pylori* 제균 치료제 중 clarithromycin은 한양대학교서울병원과 서울대학교병원에서 1987년 분리한 균주에서는 내성률이 0% (0/34), 1994년에는 2.8% (1/36), 2003년에는 13.8% (9/65)로 급격히 증가하였다.<sup>11</sup> 분당서울대병원의 2003년부터 2005년까지 분리 균주의 내성률은 16.7% (11/66), 2007년부터 2009년까지 내성률은 38.5% (60/156)로 급격한 상승세를 보이고 있다.<sup>12</sup> 특히, amoxicillin과 clarithromycin에 모두 내성이 없는 경우의 표준 3제 요법의 제균률은 95% 내외인데 반해, clarithromycin에 내성이 있는 경우 제균률은 43-65% 정도로 보고하고 있어, clarithromycin의 내성률 증가가 제균 치료에 미치는 영향은 심각한 수준이다.<sup>12,13</sup>

Clarithromycin에 대한 내성 균주의 증가뿐만 아니라 고농도의 세균 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC) 값을 갖는 균주의 비율이 높아졌다. 2003년도 이후의 MIC 분포를 보면, 감수성 균은 주로 저농도의 MIC값을, 내성균은 고농도의 MIC값을 나타내는 쌍봉분포(bimodal distribution)를 나타내고 있는데, 이는 내성을 의미하는 전형적인 형태라고 할 수 있다. 대부분의 clarithromycin 내성 헬리코박터균은 macrolide의 상호작용에 중요한 부위인 23S rRNA에 있는 특정 염기서열이 점 돌연변이에 의해 치환되기 때문에 내성이 발생한다.<sup>14</sup> 이들 점 돌연변이는 주로 2143, 2144, 2142 위치의 adenosine이 guanine, cytosine, 또는 thymidine으로 치환되기 때문이고 지역에 따른 차이가 있지만 A2142G, A2143G, A2144G 변이가 가장 흔하며, 일부에서 A2116G, G2141A, A2144T, T2182C 등이 보고되었다.<sup>14</sup> 최근 연구들에서 A2142G, T2182C 변이는 높은 내성(MIC > 64 µg/mL)을 나타내었고, A2143G 변이는 보다 낮다(MIC 2-64 µg/mL).<sup>14-17</sup> Clarithromycin 내성 헬리코박터균으로 알려진 A2143G, A2142G, A2142C의 3개의 돌연변이 중에서

A2143G 점 돌연변이가 A2142G 또는 A2142C에 비해 매우 낮은 제균율과 관련있는 것으로 보고되어 있다(48% vs. 93%,  $p=0.004$ ).<sup>18</sup> 이는 이번 연구의 결과에서 보인 것처럼 A2143G 점 돌연변이에서 12.5%의 낮은 제균율을 보인 반면, A2142G 점 돌연변이에서 85.7%의 야생형과 비슷한(86.2%) 제균율을 보여준 결과와 유사하여, A2142G 점 돌연변이에 비해 A2143G 점 돌연변이가 제균율 실패에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 한편, 국내의 114명의 소화불량증 환자를 대상으로 한 연구에서는 A2142G 점 돌연변이가 A2143G 점 돌연변이보다 주로 clarithromycin 내성 돌연변이로서의 역할을 한 연구가 있어 환자 대상군의 따라 다른 결과 보고도 있다.<sup>19</sup>

제균 치료에 있어 해당 지역에서 또는 특정 환자군에서 한 항생제에 대한 내성률이 15%가 넘으면 경험적인 일차치료제로 권장되지 않는다.<sup>20,21</sup> 일반적으로 1차 제균 치료 실패 시 항생제 감수성 검사를 하여 이차 제균 치료 약제를 결정할 것을 권장하고 있다. 이번 연구와 국내 이전 연구를 종합하여 볼 때 국내 clarithromycin의 내성률이 15%가 넘는다고 판단되며, 따라서 clarithromycin의 일차 표준 *H. pylori* 제균 치료 약제로써 투여 여부를 고민해 볼 필요가 있다. 따라서, 일차 제균 치료 전에 clarithromycin 항생제 감수성 검사를 시행하여 clarithromycin A2143G 점 돌연변이가 있는 경우 일차 제균 치료보다는 바로 이차 제균 치료 약제 투여를 고려해 볼 수 있다.

제주 지역에서 2005년도 1월부터 2007년도 8월까지 총 523명의 환자를 대상으로 한 연구에서 프로톤 펌프 억제제를 근간으로 한 3제 용법의 제균율은 1주 치료에서 68.6%였고, 2주 치료에서 86.2%로 보고하였다.<sup>22</sup> 내성 발생 시 약제 용량을 증가하여도 제균율이 현저히 떨어지는 'all or nothing phenomenon'을 고려해 볼 때<sup>14</sup> 제주 지역의 clarithromycin 내성률은 13.8%로 예측해 볼 수는 있으나, 2005-2007년도 자료로서 현재의 내성률은 상승했으리라고 추정된다. 이번 연구에서는 일차 *H. pylori* 제균 치료 약제를 복용 후 성공 및 실패를 추적 관찰한 82명의 환자에서 실패한 24명 중 15명(62.5%)에서 A2142G 1명, A2143G 14명의 점 돌연변이가 발견되었다.

Clarithromycin에 의한 내성률의 증가와 이로 인한 *H. pylori* 제균 실패의 문제가 대두되고 있는 현실에서 clarithromycin에 대한 내성을 치료 전에 확인할 수 있는 방법을 찾는 것은 매우 유용하다. 그러나 현재까지 *H. pylori*에 대한 내성 검사를 위한 배양은 조건이 까다롭고 배양기간이 길어서 최근까지 항생제 감수성 검사방법으로는 표준화된 방법이 없었고, 내성을 판정하는 기준 농도도 연구자마다 달라서 내성률 비교에도 문제가 있었다. 이번 연구에서는 Seeplex ClaR-*H. pylori* PCR kit을 통한 돌연변이 여부를 판단하였는데, 이를

이용한 방법은 배양검사보다 시간이 적게 걸려 치료 시작까지의 시간을 줄일 수 있다는 장점이 있어 임상적 유용성이 있다.<sup>7</sup>

이번 연구에서 A2143G 점 돌연변이의 존재여부가 일차 *H. pylori*의 제균 치료 성공여부에 중요한 인자로 생각되며, 이를 PCR assay (Seeplex ClarR-*H. pylori* ACE detection)을 통해 확인하였다. 하지만 2명의 A2143G 점 돌연변이 환자에서(13.3%) 일차 제균 치료로 치료 성공하였는데 이는 야생형과 변이형이 같이 있는 hetero-resistance 균주 감염이거나 한 환자에서 감수성을 나타내는 균과 저항성을 나타내는 균이 중복 감염되어 있는 것으로 추정할 수 있겠다.<sup>23</sup>

이번 연구는 제주도라는 국내의 고립된 지역에서 clarithromycin에 대한 *H. pylori* 점 돌연변이의 유병률을 측정하고 이에 따른 제균 치료의 성공여부를 분석하였다. 이전 국내 연구들과 비교하여(15.8-31.3%),<sup>7</sup> 제주 지역에서도 clarithromycin의 23S rRNA 점 돌연변이가 26.0%로 비슷한 결과를 보였다. 이 중 A2143G는 제균 치료 실패의 중요한 원인인자로 볼 수 있으며 나이가 고령일수록(50대 후반) 1차 3제 *H. pylori* 제균 치료의 실패율도 높아진다고 할 수 있겠다. 이번 연구의 제한점은, 전향적 연구이나 처음에 대상환자에서 clarithromycin을 포함한 이전 항생제 사용력을 미리 파악하지 못하였고, 환자들이 과거 사용한 항생제의 이름을 기억하지 못하는 경우가 많기 때문에 현실적으로 파악하는 데 제한점이 있었다는 것이다. 그리고 여성에서 내성변이종의 빈도가 높은 것에 대해서는 기존의 연구에서 성별에 따른 분석을 한 데이터가 없어 비교하기는 어려우나, 여성에서 병원 내원력이 더 많아 항생제 내성이 더 많이 생겼을 가능성도 있을 것이다. 좀더 큰 규모의 연구에서 재검증이 필요하다.

Clarithromycin의 내성률이 점점 증가하는 국내 현실을 고려하였을 때 이번 연구결과를 바탕으로 치료 실패의 중요한 원인인자로 알려진 A2143G 점 돌연변이의 유무를 미리 판별할 수 있는 선별검사를 통해 *H. pylori* 제균 치료제를 보다 효과적으로 선택할 수 있을 것이다.

## 요 약

**목적:** 대부분의 clarithromycin 내성 *Helicobacter pylori*는 23S rRNA에 있는 특정 염기서열이 점 돌연변이에 의해 내성이 발생한다. 이번 연구의 목적은 제주 지역에서 clarithromycin 내성 헬리코박터와 일차 제균 치료의 실패와의 관련성을 보고자 하였다.

**대상 및 방법:** 2011년 4월부터 2012년 10월까지 제주대학교 병원에서 상부위장관 내시경을 받은 환자는 6,937명이며, 헬리코박터 감염 여부를 확인하였던 환자는 2,287명(33.0%)이

었다. 이 중 127명에서 연구 동의를 얻어 23S rRNA 검사를 하였고, 프로톤 펌프 억제제를 근간으로 하는 3제 요법으로 치료받은 환자 110명에 대해 한 달 뒤 일차 치료 성공 여부에 따라서 clarithromycin PCR 결과를 분석하였다.

**결과:** A2142G 점 돌연변이는 10명(7.9%), A2143G 점 돌연변이는 23명(18.1%)으로 전체 127명 중에 33명(26.0%)이었다. 일차 제균 치료를 받은 환자 110명 중 제균 치료 성공률은 intention-to-treat 분석에 따르면 52.7% (58/110명), per-protocol 분석에 따르면 70.7% (58/82명)였다. 일차 제균 치료에 실패한 24명 중에 15명이 점 돌연변이가 있었는데, A4142G 점 돌연변이 1명(4.2%), A2143G 점 돌연변이가 14명(58.3%)이었으며, 특히 A2143G 점 돌연변이가 있는 군에서 제균 치료의 실패는 87.5%였고, A2142G 점 돌연변이의 경우는 야생형과 비슷한 제균율을 보여 주었다.

**결론:** 제주도에서 23S rRNA 점 돌연변이와 관련된 clarithromycin 내성은 26.0%로 국내 다른 지역과 비슷하며 (15.8-31.3%), 특히 A2143G 점 돌연변이가 일차 *H. pylori* 제균 치료의 실패와 관련과 매우 관련이 있었다.

**색인단어:** 23S rRNA; 점 돌연변이; Clarithromycin; 내성; *Helicobacter pylori*

## REFERENCES

1. NIH consensus conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA 1994;272:65-69.
2. Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. J Infect Dis 1999;179:1523-1530.
3. Boyanova L, Mentis A, Gubina M, et al. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. Clin Microbiol Infect 2002;8:388-396.
4. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther 1995;9 (Suppl 2):33-39.
5. Yim JY, Kim N, Choi SH, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in South Korea. Helicobacter 2007;12:333-340.
6. Kim JJ, Reddy R, Lee M, et al. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. J Antimicrob Chemother 2001;47:459-461.
7. Lee HK, Chae HS, Kang JO, et al. Multicenter study for the frequency of 23S rRNA Point mutations associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* in Korea. Korean J Clin Microbiol 2008;11:84-89.
8. Houben MH, van de Beek D, Hensen EF, de Craen AJ, Rauws EA, Tytgat GN. A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy-the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. Aliment Pharmacol Ther 1999;13:1047-1055.
9. Kim JY, Kim NY, Kim SJ, et al. Regional difference of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Korea. Korean J

- Gastroenterol 2011;57:221-229.
10. Woo HY, Park DI, Park H, et al. Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with gastric biopsy specimens. *Helicobacter* 2009;14:22-28.
11. Kim JM, Kim JS, Jung HC, Kim N, Kim YJ, Song IS. Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4843-4847.
12. Hwang TJ, Kim N, Kim HB, et al. Change in antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:536-543.
13. Kim N, Kim JM, Kim CH, et al. Institutional difference of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Korea. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:683-687.
14. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 2006;6:699-709.
15. Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* 2002;17:599-603.
16. García-Arata MI, Baquero F, de Rafael L, et al. Mutations in 23S rRNA in *Helicobacter pylori* conferring resistance to erythromycin do not always confer resistance to clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:374-376.
17. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:477-480.
18. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med* 2006;144:94-100.
19. Lee JH, Shin JH, Roe IH, et al. Impact of clarithromycin resistance on eradication of *Helicobacter pylori* in infected adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1600-1603.
20. Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim SG, Jung HC, Song IS. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:6-13.
21. Sung H, Chung HJ, Kim MN, Lee GH. Clinical usefulness of antimicrobial susceptibility test for *Helicobacter pylori*. *Korean J Lab Med* 2006;26:179-184.
22. Kim HU, Song HJ, Choi EK, Cho YK, Song BC. The eradication rate of *Helicobacter pylori* using PPI-based triple therapy in Jeju Island. *Korean J Helicobacter Up Gastrointest Res* 2009;9:26-30.
23. Cho AR, Lee MK. A comparison analysis on the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the detection of clarithromycin resistance according to biopsy sites. *Korean J Lab Med* 2010;30:381-387.