

A Comparison Analysis on the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection and the Detection of Clarithromycin Resistance according to Biopsy Sites

Ah Ra Cho, M.D. and Mi-Kyung Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : This study was performed to determine the biopsy sites that are suitable for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and to assess the sensitivity of culture, histology, and dual-priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR. Moreover, we evaluated the usefulness of PCR for the detection of 23S rRNA mutations, which are responsible for the clarithromycin resistance of *H. pylori*.

Methods : From 90 patients, we obtained biopsy specimens for culture, histology, and Seeplex® ClaR-*H. pylori* PCR (Seegene Inc., Korea). Phenotypic susceptibility to clarithromycin was evaluated using the E-test (AB Biodisk, Sweden).

Results : *H. pylori* was detected in 48 of 90 patients. The positive rates of infection in the antrum and body were higher than those in the biopsies obtained from the duodenal bulb. The positive rates in histology, PCR, and culture were 46.7%, 42.2%, and 34.4%, respectively. Using histology or PCR, we identified *H. pylori* in 46 of the 48 patients. 23S rRNA mutations were detected in 8 patients. The clarithromycin E-test showed that all the 10 wild-type patients were susceptible. However, the results of the PCR and E-test of 3 of the 8 mutation-positive patients were discrepant.

Conclusions : We observed that a combination of histology and PCR affords a high detection rate of *H. pylori* infection and that DPO-based PCR can be practically used for the diagnosis of *H. pylori* infection and the determination of clarithromycin resistance. These techniques were useful for biopsy sampling simultaneously from the antrum and body for the detection of clarithromycin resistance of multiple strain infection or heteroresistance. (*Korean J Lab Med* 2010;30:381-7)

Key Words : *Helicobacter pylori*, Multiplex PCR, Clarithromycin, Resistance, 23S rRNA, Point mutation

서 론

*Helicobacter pylori*는 사람의 위 점막에 서식하는 그람음성 만곡형 간균으로 만성위염을 유발할 뿐만 아니라 위궤양, 십이지장궤양, 점막연관림프조직 림프종(mucosa associated lymphoid tissue lymphoma) 및 위암 등과 연관되어 있다[1, 2].

이러한 *H. pylori* 감염률은 나이가 들수록 급격히 올라가며 한번 감염되면 저절로 치유되는 일은 거의 없이 감염이 지속된다. *H. pylori*는 전세계적으로 50% 이상이 감염되어 있으며 한국의 혈청학적 양성률은 약 60%로 알려져 있다[3, 4].

H. pylori 감염을 진단하기 위해서는 비침습적인 검사인 혈청학적 검사, 요소호기검사(urea breath test, UBT)와 침습적인 검사로 생검조직을 이용한 신속요소분해검사(CLO 검사), 염색, 배양, 중합효소 연쇄반응법(PCR) 등 매우 다양한 진단 방법이 시행되고 있다. 국내에서는 위 내시경 수가가 저렴하고 위암 발생률이 높아 위 내시경 검사를 통한 침습적인 방법들이 임상에서 선호된다.

내시경 생검에 가장 좋은 부위는 전정부로 알려져 있어 예전 *H. pylori* 감염 진단을 언급하는 많은 보고에서는 위생검을 전정부에서 시행하였다[5]. 그러나 동서양 위염 환자에게 위염의 활동성, 만성 정도, 위축의 차이가 있으며 특히 우리나라는 만

Received : February 12, 2010
Revision received : July 7, 2010
Accepted : July 26, 2010
Corresponding author : Mi-Kyung Lee, M.D.
Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University
College of Medicine, 65-207 Hangang-ro 3-ga, Yongsan-gu,
Seoul 140-757, Korea
Tel : +82-2-748-9837, Fax : +82-2-748-9929
E-mail : cpworld@cau.ac.kr

*This research was supported by the Chung-Ang University Research Grant in 2010.

ISSN 1598-6535 © The Korean Society for Laboratory Medicine

성 위축성 위염 환자가 많아 전정부보다는 다른 부위에서 더 높은 *H. pylori* 진단율을 보이기도 한다[5]. 대한 *H. pylori* 연구회에서는 가능하면 전정부와 체부에서 각각 1개 이상의 조직을 채취하여 검사하도록 권장하고 있지만[6] 실제 우리나라에서 *H. pylori*가 위장 내 어느 부위에 많이 분포하는지는 충분한 조사가 이루어져 있지 않다.

H. pylori 제균은 심한 위염, 소화성 궤양, 출혈성 궤양, 저위험성 점막연관림프조직 림프종 및 조기 위암 절제 후에 권장되며 양성자 펌프 억제제(proton pump inhibitor, PPI)와 두 가지 항생제를 병용하는 삼제요법이 치료의 주를 이룬다. 주로 사용되는 항생제로서 clarithromycin (CLA), amoxicillin (AMOX), metronidazole (MET), tetracycline, quinolone 제제 등이 있다. 일반적으로 1차 제균 치료 실패 시 그 원인을 항생제 내성으로 보아 항생제 감수성 검사를 하여 2차 제균 치료 약제를 결정할 것을 권장하고 있다[7]. 또한 해당 지역에서 한 항생제의 내성률이 15%가 넘는 경우 1차 치료 약제로 권장되지 않으며 우리나라의 CLA 내성은 13.8-21.6%로 보고되고 있다[8-11].

본 연구에서는 생검 부위와 검사방법에 따른 *H. pylori* 검출률을 비교하고자 하였다. 위 내시경시 위 전정부 및 체부, 십이지장 구부를 생검하여 부위에 따른 양성률을 관찰하였으며 조직염색, 배양 및 PCR을 실시하여 방법 간의 민감도를 비교하였다. 또한 CLA 내성과 연관되어 있는 23S rRNA 돌연변이를 검출하고 E-test를 실시하여 표현형과 유전형을 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2008년 1월부터 3월까지 중앙대학교 용산병원 소화기내과 외래에서 상부위장관 내시경을 시행한 90명의 환자를 대상으로 하였다. 90명 중 75명에서는 위 전정부와 체부 및 십이지장 구부에서 점막조직 생검이 이루어졌고, 나머지 15명은 위전정부와 체부에서만 점막조직을 채취할 수 있었다. 위전정부와 체부에서는 각각 두 조각의 조직을 채취하여 한 조각은 조직검사를 시행하였고 나머지 한 조각은 배양과 PCR을 시행하였다. 십이지장 구부에서는 한 조각의 조직만을 채취하여 배양과 PCR을 시행하였다.

2. 조직검사

총 90명의 환자로부터 채취한 180개의 생검 조직을 사용하여

으며, 위 전정부와 체부에서 각각 채취한 1개의 생검조직으로 hematoxylin-eosin 염색, giemsa 염색을 시행하여 *H. pylori* 감염 여부를 판단하였다. 십이지장 검체는 시행하지 않았다.

3. 배양

총 90명의 환자로부터 채취한 255개의 생검조직을 사용하였다. 신선한 생검조직을 5% 면양 혈액천천배지에 접종 후 37°C 10% CO₂ 배양기에서 3일간 배양 후 균집락을 관찰하였고, 관찰되지 않을 때는 3일간 더 배양하여 균집락의 유무를 판정하였다.

4. Clarithromycin 내성 검사

1) DNA 추출

배지에 접종 후 남은 생검 조직에서의 DNA 분리는 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)로 제조회사의 설명서에 따라 시행하였다. 생검조직에 ATL buffer 180 µL, proteinase K 20 µL를 넣어 56°C에서 용해시킨 후 AL buffer 200 µL를 넣고 70°C에서 10분간 방치하였다. 100% ethanol 240 µL를 첨가하여 15분간 섞은 후 QIAamp spin column에 넣어 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 AW1 buffer 500 µL를 넣어 8,000 rpm, 1분 원심분리, 2차로 AW2 buffer 500 µL를 넣어 14,000 rpm, 3분 원심분리한 후 세척하였다. 이후 AE buffer 200 µL를 넣어 1분간 방치한 후 8,000 rpm, 1분간 원심분리하여 column에 붙어있는 DNA를 분리하였다.

2) 내성유전자 변이 검사: Dual-priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR

Seeplex ClaR-*H. pylori* PCR kit (Seegene Inc., Seoul, Korea)의 Seeplex home-brew primer mix를 이용하여 유전자를 증폭하였다. DNA의 증폭은 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하였으며, 94°C에서 15분 동안 변성시킨 후 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 40회 증폭하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 브롬화에티듐(ethidium bromide)으로 염색하여 Image system (ChemiDoc XRS system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 분절의 크기를 확인하였다. 621 bp PCR 산물만 보일 경우 *H. pylori* 양성 야생형(wild type)으로 해석하였고 그 외 475 bp는 A2143G 돌연변이, 194 bp는

A2142G 돌연변이로 해석하였다(Fig. 1).

3) 항생제 감수성 표현형 검사: E-test

DPO-based multiplex PCR에서 야생형 10균주, 돌연변이 양성 8균주에 대해서 각각 E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden)로 CLA 감수성 검사를 시행하였다. 스트립을 배지 위에 놓고 37°C 10% CO₂ 배양기에서 72시간 배양 이후 최소억제농도가 1 µg/mL 이상이면 내성으로 판정하였다[12].

5. *H. pylori*의 감염 기준

조직검사, 배양, DPO-based multiplex PCR 중 한가지 검사 이상에서 양성을 보일 경우 *H. pylori* 감염으로 판단하였다.

6. 의무기록 조사

H. pylori 양성 환자의 제균 치료력, 제균 치료 약제, 경과 관찰을 위한 요소호기검사, 위내시경 검사 등의 결과를 조사하기 위해 후향적으로 전산의무기록을 검토하였다.

7. 통계분석

통계학적 분석을 위해서 SPSS software ver. 12.5 (SPSS Inc.,

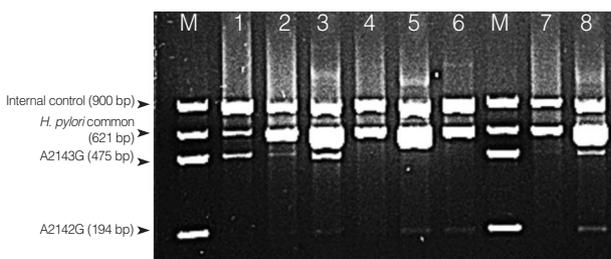


Fig. 1. Detection of the A2143G and A2142G in the 23S rRNA gene on the basis of the dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR product. Lane M, amplicon size marker (Seegene Inc., Korea); lanes 4-7, wild type; lanes 1-3, mutant type of A2143G; lane 8, coexistence of A2143G and A2142G.

Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 생검 부위별 검사 양성률 차이, 그리고 검사방법 간 양성률 차이는 카이제곱검정에 의해 평가되었으며 *P* 값이 0.05 이하이면 의미가 있다고 판단하였다.

결 과

1. 대상 환자군의 *H. pylori* 양성률

본 연구에서 *H. pylori* 감염은 53.3% (48/90)였다. 생검 부위에 따른 양성률은 위 전정부 53.3% (48/90), 체부 52.2% (47/90)였으며, 십이지장 구부는 17.3% (13/75)로 매우 낮은 양성률을 보여주었다. *H. pylori* 양성 48명 중 위 전정부의 민감도는 100% (48/48), 체부는 97.9% (47/48)로 대부분의 환자를 검출할 수 있었다. 십이지장 구부 검체는 48명의 양성환자 중 42명에서 채취되었으며 민감도는 30.9% (13/42)였다. 부위별 검사 양성률은 조직검사와 PCR에서 전정부와 체부는 동일했으며 배양에서는 전정부보다 체부가 더 높은 양성률을 보였다(24/48, 50% vs. 28/48, 58.3%, *P*<0.05). 십이지장 검체는 조직검사를 시행하지 않아 비교하지 않았다(Table 1).

90명 환자의 조직검사와 배양, PCR을 비교하였다(Table 2). 조직검사 46.7% (42/90), PCR 42.2% (38/90), 배양 34.4% (31/90)로 조직검사의 양성률이 제일 높았으며(*P*<0.05), 조직검사와 PCR을 동시에 했을 경우 46명의 환자가 양성으로 보고되어 총 48명의 양성환자 중 대부분의 환자를 검출할 수 있었다(Table 3).

Table 2. Dual-priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR, histological analysis, and culture of the biopsies obtained directly from 90 patients

<i>Helicobacter pylori</i> infection	DPO-based PCR	Histology	Culture
Positive	38	42	31
Negative	52	48	59
Total	90	90	90

The positivities of the 3 methods are significantly different (*P*<0.05).

Table 1. Detection of *Helicobacter pylori* by histological analysis, culture, and dual-priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR of each biopsy site from *H. pylori*-positive patients (48 of 90)

Biopsy site	DPO-based multiplex PCR		Histology		Culture	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Antrum (N=48)	36	12	42	6	24	24
Body (N=48)	36	12	42	6	28*	20
Duodenal bulb (N=42)	10	32	Not tested	Not tested	6	36

**P*<0.05 compared to culture positivity of antrum.

Table 3. Comparison of the *Helicobacter pylori* positivity of dual-priming oligonucleotide (DPO)-based PCR, histological analysis, and culture status

DPO-based multiplex PCR	Histological analysis		Culture	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	34	4	25	13
Negative	8	44	6	46
Total	42	48	31	59

The positivities of the 3 methods are significantly different ($P < 0.05$).

2. Clarithromycin 내성 유전형 결과

CLA 내성 유전형 분석을 위한 DPO-based multiplex PCR에서 *H. pylori* 양성 48명 중 8명에서 내성과 관련된 점돌연변이가 확인되어 16.7%의 빈도를 보였다. A2143G 점돌연변이는 4명, A2142G 점돌연변이는 1명에서 전체 또는 일부 생검부위에서 검출되었으며, 그 외 3명의 환자에서 야생형과 돌연변이가 동일 환자의 각기 다른 생검부위에서 동시 검출되었다(Table 4).

3. Clarithromycin 내성 유전형과 표현형의 비교

DPO-based multiplex PCR에서 야생형으로 확인된 10명의 각 생검부위에서 분리된 23균주는 E-test에서 모두 CLA 감수성을 보였다. 돌연변이가 검출된 8명의 결과는 Table 3과 같다. A2143G 돌연변이가 검출된 4명 중 1명은 배양에서 *H. pylori*가 자라지 않았고(patient 1), 나머지 3명(patient 2-4)은 배양이 된 부위에서는 표현형과 일치하는 결과를 보였다. 위 전정부에서 야생형, 체부에서 A2143G 돌연변이가 발견된 1인(patient 6)은 전정부에서는 배양 음성이었으나 체부에서는 E-test에서 CLA 내성을 보였다. 배양에서 *H. pylori*가 증식된 7명 중 4명에서 표현형과 유전형이 일치하는 소견을 보였다.

유전형과 표현형이 일치하지 않은 경우는 A2142G 돌연변이가 검출되었으나 E-test에서 CLA 감수성으로 확인된 1명(patient 5)과 야생형과 돌연변이가 중복 검출된 2명(patient 7, 8)으로서 각 부위별 균주의 유전형과 표현형의 불일치 소견을 보였다(Table 4).

4. H. pylori 제균요법 결과

H. pylori 양성 48명 중 31명이 제균 치료를 받았다. PPI, CLA, AMOX, MET 4제 요법이 24명, PPI, AMOX, CLA 3제 요법으로 치료받은 환자는 6명이었다. 그 외 1차 치료에 실패하

Table 4. Comparison between dual-priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR and E-test for detection of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* in 8 mutation-positive patients

Patient No.	Biopsy site	23S rRNA genotype	Phenotype
1	Antrum	A2143G	No growth
	Body	A2143G	No growth
	Duodenal Bulb	Negative	No growth
2	Antrum	A2143G	Resistant
	Body	A2143G	No growth
	Duodenal Bulb	A2143G	No growth
3	Antrum	A2143G	Resistant
	Body	A2143G	No growth
	Duodenal Bulb	Negative	No growth
4	Antrum	A2143G	Resistant
	Body	A2143G	No growth
	Duodenal Bulb	Negative	No growth
5	Antrum	Negative	Susceptible
	Body	A2142G	Susceptible
	Duodenal Bulb	Negative	No growth
6	Antrum	Wild type	No growth
	Body	A2143G	Resistant
	Duodenal Bulb	Not tested	Not tested
7	Antrum	Wild type	Susceptible
	Body	A2142G, A2143G	Susceptible
	Duodenal Bulb	Wild type	Susceptible
8	Antrum	Wild type	Susceptible
	Body	A2142G	No growth
	Duodenal Bulb	A2142G	Susceptible

고 2차 치료를 받는 1명이 PPI, MET, tetracycline, bismuth 요법으로 치료받았다. 제균 치료를 받은 31명 중 18명에서 추적 검사로 UBT를 시행하였으며 이중 CLA 내성 돌연변이가 발견되지 않은 야생형 *H. pylori* 분리 환자 14명은 전부 음성 결과를 보였다. 나머지 4명은 전부 A2143G 돌연변이 양성 환자로서 이 중 PPI, CLA, AMOX, MET로 치료받은 3명은 추적 UBT에서 2명은 음성, 다른 1명은 양성을 보였다. 마지막 환자 1명은 PPI, MET, tetracycline, bismuth 요법으로 재치료받은 환자이며 추적 UBT에서 음성을 보였다.

고 찰

서양에서는 위 전정부가 *H. pylori* 감염 진단을 위한 가장 좋은 위치로 알려져 있으나 우리나라는 만성위염과 내시경 소견상 위축형 점막을 가진 환자가 많아 *H. pylori*가 위 점막에 균일하게 분포하지 않을 확률이 높으므로 생검의 위치나 수에 따라 민감도가 달라질 수 있다. 본 연구에서 위장내 부위에 따른 양성률은 위 전정부 53.3% (48/90), 체부 52.2% (47/90)는 거의 비슷하나 그에 비해 십이지장 구부는 17.3% (13/75)로 매

우 낮은 양성률을 보여 진단부위로 적절치 않음을 알 수 있었다. 배양률은 체부가 가장 높았으나 조직검사, PCR의 경우는 전정부와 체부의 양성률이 동일하였다. 대한 *H. pylori* 연구학회에서는 전정부와 체부에서 각각 검체를 채취하도록 권장하였으나 *H. pylori* 진단을 위해서는 위 전정부나 체부 중 어느 한 부위만 생검하더라도 비슷한 양성률을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 하지만 CLA 내성 검출을 위한 DPO-based multiplex PCR에서는 23S rRNA A2142G 돌연변이 1명(patient 5)은 체부에서만 발견되었으며 야생형과 돌연변이형이 동시에 검출된 3명은 전정부와 체부에서 각각 다른 형이 관찰되었다(Table 4). 그러므로 전정부와 체부에서 동시에 조직을 채취하는 것은, 23S rRNA 유전자 돌연변이의 검출률을 높일 수 있을 뿐만 아니라 중복감염이나 hetero-resistance 균주의 검출률을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

조직검사와 DPO-based multiplex PCR의 양성률을 비교하였을 때, 조직검사 46.7% (42/90), DPO-based multiplex PCR 42.2% (38/90)로 조직검사의 양성률이 더 높았다(Table 2). Woo 등[13]도 조직검사의 민감도가 더 높다고 보고하였는데, 이는 *H. pylori*가 위 점막 내 균등하게 분포하지 않으며 조직검사는 두 개의 검체로 시행하였으나 PCR의 경우 한 개의 검체로 시행하였기 때문에 결과의 편견(bias)을 가져왔을 것으로 추측하였다. 본 연구에서는 조직검사와 PCR에 이용된 생검조직의 개수는 동일하였으나 배양접종 이후 남은 검체를 DNA 추출에 이용하였기 때문에 조직검사에 비해 PCR의 민감도가 떨어진 원인으로 생각된다. 하지만 조직검사서 음성이고 PCR에서 양성인 환자가 전체 양성환자의 8.3% (4/48)에서 발견되어, PCR 검사를 위한 단독검체 채취시 PCR 검사의 민감도는 상당히 높아질 것으로 생각하였다(Table 3). 서양에서는 위 내시경 검사 비용이 높고 위암 발생률이 낮아 비침습적 진단방법으로 *H. pylori* 존재 유무를 확인할 것을 권장하지만 우리나라는 위 내시경 수가가 상대적으로 저렴하고 위암 발생률이 높아 위 내시경 검사를 우선 시행하므로 침습적 진단방법이 *H. pylori* 감염 진단에 많이 이용된다. 이를 고려하여 위 내시경시 생검한 검체로 조직검사와 PCR을 동시에 시행하였을 경우 거의 모든 환자 (95.8%, 46/48)에서 *H. pylori*를 검출할 수 있었다. 특히 CLA 내성이 의심될 때 DPO-based multiplex PCR 검사는 *H. pylori* 검출뿐만 아니라 내성을 동시에 발견할 수 있어 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

우리나라에서는 1차 제균요법에 AMOX, CLA이 주로 사용되는 항생제이며 이 두 항생제의 병합요법 제균율은 80-90%이지만 최근 *H. pylori* 제균율은 전반적으로 감소하고 있다. 이는

항생제의 사용으로 인한 내성률 증가가 그 원인으로 생각되며 CLA의 경우 내성과 치료효과에 관한 연구는 아직 부족하나 내성균주의 제균율은 25-50%로 낮게 보고되고 있다[14].

특정 지역에서 CLA에 대한 내성이 15-20%가 넘으면 경험적인 일차치료제로 CLA를 사용하기 전에 감수성 검사를 요구하고 있다. 이는 일차 치료제를 감수성 결과에 따라 선택하는 것이 제균율을 높이고, 항균제 내성의 발생을 방지하기 위해 필요하기 때문이다. 국내 CLA 내성률은 검사방법, 균집중액 농도, 배양기간, 내성 판정을 위한 기준 등이 달라 비교가 어렵지만 2005년도 이후 17.2-21.6%로 증가하는 추세를 보이고 있으며 [8, 11] 본 연구에서는 DPO-based multiplex PCR에서 48개 중 8개로 16.7%의 빈도를 보였다. 이를 미루어 볼 때 국내도 일차치료제로 CLA를 사용하기 전에 감수성 검사가 필요한 시점으로 생각된다. CLA 내성 측정방법 중 액체배지희석법, 디스크 확산법, E-test 등 세균배양을 이용한 방법은 배양 자체가 까다롭고 또한 시간이 오래 걸려 실제 임상에서 이러한 배양 검사를 제균치료 전에 시행하기 어렵기 때문에 PCR, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), real-time PCR hybridization, FISH 등 신속한 결과를 낼 수 있는 분자유전학적인 방법이 각광을 받고 있다[11, 13, 15-19].

CLA 내성은 23S rRNA 유전자 돌연변이와 관련되며 23s rRNA V domain 염기서열 2,142번 혹은 2,143번 adenine이 guanine으로 치환되고 소수 cytosine이나 thymine으로 변이된다. 다른 부위에서도 돌연변이가 일어나지만, 이 두 부위가 CLA의 *H. pylori* 결합에 영향을 주는 부위이다[20]. 본 연구 중 DPO-based multiplex PCR에서 돌연변이형을 보이는 환자는 8명으로 A2143G 점돌연변이 4명, A2142G 점돌연변이 1명, 그 외 3명의 환자에게 각각 다른 부위에서 야생형과 A2143G 혹은 A2142G가 동시에 검출되었다(Table 4). 이와 같은 동시 검출의 경우 야생형과 변이형이 같이 있는 hetero-resistance 균주 감염이거나 한 환자에게 감수성을 나타내는 균과 저항성을 나타내는 균이 중복 감염되어 있는 걸로 추정할 수 있다. 국내는 선진국에 비해 *H. pylori* 감염률이 높으며 또한 일상 생활에서 감염의 기회가 높아 서로 다른 균주에 의한 중복 감염의 기회가 높다고 생각된다. 실제 한국 *H. pylori* 감염환자는 대부분 *H. pylori* 균주 분포가 혼합된 양상을 보여준 보고도 있다[21]. 이렇게 균주가 혼합된 경우는 항생제 내성균이 포함될 확률이 높아 지므로 제균율에 영향을 줄 수 있다. 또한 낮은 농도의 저항균주는 디스크확산법이나 E-test 등 내성 표현형 검사에서 발현이 안될 수 있으며 DNA sequencing 역시 돌연변이형이 전체의 25% 이하인 경우 놓칠 가능성이 높다. 그러나 DPO-based

multiplex PCR인 경우 돌연변이형이 2%만 차지하더라도 검출이 가능한 것으로 보고되고 있다[13]. 또한 본 연구에서도 돌연변이를 보이는 8명 중 3명은 표현형에서 감수성을 보여 DPO-based multiplex PCR의 경우 더 높은 민감도를 보이는 것을 알 수 있었다.

CLA 내성 유전형과 표현형과의 일치율을 살펴보았을 때 10명의 환자로부터 분리된 야생형 23균주는 모두 감수성을 보였다. 그러나 돌연변이가 균주가 관찰되는 배양 가능한 환자 7명 중 4명의 균주만이 유전형과 일치하는 양상을 보였다. 나머지 3명은 A2142G 돌연변이가 1명과 중복감염인 2명(patient 5, 7, 8)으로서 돌연변이가 발현된 부위와 야생형이 분리된 부위에서 모두 감수성을 보였다. 국내에서 시행한 CLA 내성유전형과 표현형 검사들을 살펴보면 표현형에서 감수성을 보인 균주에서 일부는 변이형을 보이는 등 유전형과 표현형이 일치하지 않는 경우를 보여주고 있다[8, 22]. 이는 부위에 따른 저항성 균주의 농도 차이가 표현형검사에서의 감수성으로 발현, 유전자 변이와 함께 다른 단계의 내성 획득 기전 존재의 가능성, 혹은 23S rRNA 돌연변이가 실제 모든 환자에게 저항성을 나타내는지도 고려해야 할 것이다.

제균치료 이후 추적검사를 살펴보면 UBT를 시행한 야생형 14명은 모두 음성을 보였으나 돌연변이 환자 중 3명은 추적 UBT에서 2명은 음성, 다른 1명은 양성을 보여 유전형과 맞지 않은 결과를 보였다. PPI, CLA, AMOX, MET 4제요법으로 치료하였기 때문에 CLA 내성 유전자 돌연변이를 가졌으나 AMOX, MET에 대한 감수성이 있었을 것으로 추정할 수도 있다. 그러나 실제 CLA 내성이 있다 하더라도 CLA를 포함한 제균 요법에 약 50%는 효과적으로 제균된 보고[23]도 있으며 또한 앞에서 언급한 표현형과 유전형의 불일치율 등을 고려할 때 23S rRNA 돌연변이가 절대적으로 저항성을 유발하는지에 대한 임상적 연구가 더 필요할 것으로 사료되었다.

결론적으로 내시경시 위 전정부와 체부를 같이 생검하여 *H. pylori* 검출을 위한 조직검사와 DPO-based multiplex PCR을 동시에 시행함으로써 *H. pylori* 검출 민감도를 증가시킬 뿐만 아니라 중복감염 및 hetero-resistance 균주의 발견을 높일 수 있을 것으로 기대되었다. 또한 *H. pylori*의 CLA에 대한 내성률은 점차 증가하고 있으므로 DPO-based multiplex PCR은 신속하게 CLA 내성균주를 검출할 수 있는 유용한 방법으로 생각된다.

요 약

배경 : 본 연구에서는 위 생검부위에 따른 *H. pylori* 검출률

을 관찰하였으며 배양, 조직검사 및 dual priming oligonucleotide (DPO)-based multiplex PCR을 실시하여 방법간의 민감도를 비교하였다. 또한 clarithromycin 내성과 연관된 23S rRNA 돌연변이를 검출하기 위한 multiplex PCR의 유용성을 평가하였다.

방법 : 90명의 환자에게 위 전정부, 체부 및 십이지장 구부에서 생검한 조직을 배양, 조직검사 및 Seeplex ClaR-*H. pylori* PCR (Seegene Inc., Korea)을 시행하였다. Clarithromycin 내성 표현형 검사는 E-test (AB Biodisk, Sweden)로 시행하였다.

결과 : 90명 환자 중 48명(53%)이 *H. pylori* 양성이었다. 위 전정부와 체부에 비해 십이지장 구부는 낮은 검출률을 보였다. 조직검사 46.7% (42/90), PCR 42.2% (38/90), 배양 34.4% (31/90)로 조직검사의 양성률이 제일 높았으며 조직검사와 PCR을 동시에 했을 95.8% (46/48)로 거의 모든 환자를 검출할 수 있었다. DPO-based multiplex PCR에서는 8명의 돌연변이 환자가 검출되었다. Clarithromycin 내성 E-test에서는 유전형에서 wild type로 나온 10명의 23균주는 모두 감수성을 보였으나 돌연변이 3명은 표현형과 유전형이 불일치하였다.

결론 : *H. pylori*는 조직검사와 PCR을 같이 시행하였을 경우 높은 검출률을 보이며 DPO-based multiplex PCR를 시행할 경우 PCR과 내성 검사를 동시에 시행할 수 있어 임상에 유용한 정보를 제공할 수 있다. 또한 위전정부와 체부를 동시에 검사함으로써 혼합감염 및 hetero-resistance 균주로 인한 clarithromycin 내성을 검출할 수 있겠다.

참고문헌

1. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. JAMA 1994;272:65-9.
2. Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. J Infect Dis 1999;179:1523-30.
3. Pounder RE and Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther 1995;9(S2):33-9.
4. Yim JY, Kim N, Choi SH, Kim YS, Cho KR, Kim SS, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in South Korea. Helicobacter 2007;12:333-40.
5. Lee MS, Roe IH, Lee MY, Lee JH, Nam SW, Lee MI, et al. The best endoscopic biopsy site for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Korean J Gastroenterol 2001;37:406-11. (이문숙, 노임환, 이만

- 용, 이재현, 남승우, 이명인 등. *Helicobacter pylori* 감염을 진단하기 위한 내시경 생검의 최적 위치. 대한소화기학회지 2001;37:406-11.)
6. Kim N, Kim JJ, Choe YH, Kim HS, Kim JI, Chung IS. Diagnosis and treatment guidelines for *Helicobacter pylori* infection in Korea. Korean J Gastroenterol 2009;54:269-78. (김나영, 김재준, 최연호, 김현수, 김진일, 정인식. 헬리코박터 파일로리 감염의 진단 및 치료 가이드 라인. Korean J Gastroenterol 2009;54:269-78.)
 7. Malfertheiner P, Meégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:167-80.
 8. Lee HK, Chae HS, Kang JO, Lee MK, Sung H, Kim MN, 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;11:84-9. (이혜경, 채현석, 강정옥, 이미경, 성홍섭, 김미나 등. 한국에서 *Helicobacter pylori* 균주의 Clarithromycin 내성 23S rRNA 유전자 점돌연변이의 빈도에 대한 다기관 연구. Korean J Clin Microbiol 2008;11:84-9.)
 9. Kim JM. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. Korean J Gastroenterol 2006;47:337-49. (김정목. 한국인 환자에서 분리한 *Helicobacter pylori* 균주의 항생제 내성률. Korean J Gastroenterol 2006;47:337-49.)
 10. 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.
 11. Sung H, Chung HJ, Kim MN, Lee GH. Clinical usefulness of antimicrobial susceptibility test for *Helicobacter pylori*. Korean J Lab Med 2006;26:179-84. (성홍섭, 정희정, 김미나, 이진혁. *Helicobacter pylori* 항균제 감수성 검사의 임상적 유용성. 대한진단검사의학회지 2006; 26:179-84.)
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement, M100-S18. Wayne, PA: CLSI, 2008.
 13. Woo HY, Park DI, Park H, Kim MK, Kim DH, Kim IS, 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;14:22-8.
 14. Byun YH, Jo YJ, Kim SC, Lee JS, Shin WY, Park YS, et al. Clinical factors that predicts successful eradication of *Helicobacter pylori*. Korean J Gastroenterol 2006;48:172-9. (변영혜, 조윤주, 김성철, 이준석, 신원용, 박영숙 등. *Helicobacter pylori* 감염 환자에서 재균을 예측할 수 있는 임상 인자. Korean J Gastroenterol 2006;48:172-9.)
 15. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG, et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. J Antimicrob Chemother 1997;40:283-6.
 16. Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. J Clin Microbiol 2003;41:3636-40.
 17. Gibson JR, Saunders NA, Burke B, Owen RJ. Novel method for rapid determination of clarithromycin sensitivity in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1999;37:3746-8.
 18. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthélémy P, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2003;41:397-402.
 19. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. Gut 2000; 46:608-14.
 20. Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:2621-8.
 21. Kim JW, Kim JG, Chae SL, Cha YJ, Park SM. High prevalence of multiple strain colonization of *Helicobacter pylori* in Korean patients: DNA diversity among clinical isolates from the gastric corpus, antrum and duodenum. Korean J Intern Med 2004;19:1-9.
 22. Nam SW, Roe IH, Kim SB, Lee BS, Hwang YJ, Park HJ, et al. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction. Korean J Gastroenterol 2000;36:450-6. (남승우, 노임환, 김석배, 이병석, 황영준, 박현종 등. Clarithromycin 내성을 지닌 *Helicobacter pylori* 균주 확인을 위한 중합효소연쇄반응법의 이용. 대한소화기학회지 2000;36:450-6.)
 23. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Troiani L, Burattini O, et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. Ann Intern Med 2006;144:94-100.