

소아 *Helicobacter pylori* 감염에서 Clarithromycin 내성과 연관된 23S rRNA의 돌연변이

서울대학교 의과대학 소아과학교실

고 재 성 · 양 혜 란 · 서 정 기

Detection of 23S rRNA Mutation Associated with Clarithromycin Resistance in Children with *Helicobacter pylori* Infection

Jae Sung Ko, M.D., Hye Ran Yang, M.D. and Jeong Kee Seo, M.D.

Department of Pediatrics, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The resistance of *H. pylori* to clarithromycin is one of the major causes of eradication failure. In *H. pylori*, clarithromycin resistance is due to point mutation in 23S rRNA. The aims of this study were to investigate the mutation of 23S rRNA and to examine the association of *cagA*, *vacA* genotype and clarithromycin resistant genes.

Methods: *H. pylori* DNA was extracted from antral biopsy specimens from 27 children with *H. pylori* infection. Specific polymerase chain reaction (PCR) assays were used for *cagA* and *vacA*. Mutations associated with clarithromycin resistance were detected by using PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 23S rRNA gene.

Results: A2143G mutation was detected in one case and A2144G in 4, indicating 18.5% were clarithromycin resistant. Among the total of 27, *cagA* was present in 25 (93%), *vacA* s1a/m1 in 6 (22%), s1a/m2 in 3 (11%), s1c/m1 in 16 (59%), and s1c/m2 in 1 (4%). All of the 5 clarithromycin resistant strains were *cagA* (+), among which 2 were s1a/m1 and 2 were s1c/m1. There was no relation between genotypes and clarithromycin resistant genes.

Conclusion: Detection of *H. pylori* resistance to clarithromycin using PCR RFLP from biopsy specimens might be useful for the selection of antibiotics. Clarithromycin resistant genes are not associated with genotypes of *cagA* and *vacA*. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 7: 137~142)

Key Words: *Helicobacter pylori*, Clarithromycin resistance, 23S rRNA, *cagA*, *vacA*

접수 : 2004년 4월 29일, 승인 : 2004년 9월 11일

책임저자 : 서정기, 110-744, 서울시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 02-760-3627, Fax: 02-743-3455, E-mail: jkseo@snu.ac.kr

이 논문은 서울대학교병원 일반연구비(0420000270) 지원에 의해 이루어진 것임.

서론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 만성 위염, 소화성 궤양의 주요 원인이고¹⁾, 위선암, 위림프종의 중요한 위험인자로 인식되고 있으며²⁾, *H. pylori*의 감염은 일반적으로 소아기에 이루어진다.

H. pylori 감염은 항생제에 의해 효과적으로 제균될 수 있으나, 항생제에 대한 내성균의 출현으로 제균 실패가 늘고 있다. *H. pylori*를 박멸하는데 proton pump inhibitor (PPI), amoxicillin, clarithromycin 삼제 병합요법이 성인에서는 80~90%의 제균율을 보인다³⁾. 우리 나라 소아를 대상으로 bismuth, amoxicillin, metronidazole의 2주간 삼제요법의 제균율은 89%이었다⁴⁾. 그러나 PPI, amoxicillin, clarithromycin 삼제 병합요법을 시도한 결과 63%에서만 제균 효과를 보였다⁵⁾. *H. pylori* 균주의 대부분이 amoxicillin에 민감한 것을 고려할 때, 낮은 제균 효과는 clarithromycin 내성과 관계 있을 것으로 추측되며, 우리 나라 성인에서 분리된 *H. pylori*에서 clarithromycin 내성이 증가하는 추세이다⁶⁾. clarithromycin 내성 검사는 균 배양검사 후 액체배지회석법과 디스크 확산법이 주로 사용되는데, 배양하는데 시간이 많이 소요되고 균 배양률이 낮다는 단점이 있다. Clarithromycin 내성은 50S ribosome subunit에 macrolide가 결합하는 것을 막기 때문에 발생하는데, *H. pylori* 23S rRNA 유전자의 V domain의 2143, 2144번에 A→G 돌연변이가 내성을 일으키는 원인으로 밝혀졌다⁷⁾. 이 돌연변이는 중합효소연쇄반응(PCR)과 제한효소분절의 다형성(restriction fragment length polymorphism, 이하 RFLP로 약함)을 이용하면 염기서열분석 없이 알아낼 수 있다.

한편 *H. pylori*의 제균율은 위염만 있는 환자보다 소화성 궤양 환자에서 높다고 보고되는데, 이 이유가 소화성 궤양 환자가 *cagA*, *vacA* s1 양성인 균에 많이 감염되어 있고 이런 균이 항생제 치료에 효과적이기 때문이라는 보고가 있다⁸⁾. 따라서 *cagA*, *vacA* 유전형이 항생제 치료결과에 영향을 주는

clarithromycin 내성 유전자와 분자유전학적으로 연관이 되어 있을 가능성이 존재한다.

본 연구에서는 우리 나라 소아에 감염된 *H. pylori*에서 PCR RFLP를 이용하여 clarithromycin 내성의 원인으로 알려진 23S rRNA의 돌연변이를 찾아내고, *cagA*, *vacA* 유전형과 clarithromycin 내성 돌연변이 사이에 연관이 있는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

서울대학교병원 소아 내시경실에서 위내시경검사를 통해 *H. pylori* 위염으로 진단받은 전국에서 의뢰받은 환아를 대상으로 하였다. 대상 환아의 연령은 3세에서 15세(정중값 10세)이었고 남자 11명, 여자 16명이었다. *H. pylori* 위염은 배양검사에서 양성이거나 CLO 검사(Delta West Pty Ltd, Australia)가 양성이고 H&E 염색과 Giemsa 염색으로 조직에서 균이 관찰되는 경우로 정의하였다.

환아의 위전정부 생검 조직을 -70°C에 냉동보관하였다. 위생검조직을 lysis buffer와 proteinase K 용액에 넣은 후 55°C의 항온기에 12시간 이상 방치하여 용액이 투명하게 보일 때까지 조직을 분해하였다. QIAamp tissue kit (QIAGEN Inc., USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다.

위 생검조직에서 *H. pylori* DNA를 검출하는데 가장 민감하고 특이하다고 보고된 phosphoglucosamine mutase gene, *glmM*⁹⁾에 대하여 PCR을 실시하였다. genomic DNA를 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200μM씩의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 25 pmole씩의 sense primer(HP-F)와 anti-sense primer (HP-R), 2.5 unit의 Taq DNA polymerase가 포함된 50μL의 buffer에서 PCR thermal cycler로 증폭시켰다. 94°C에서 5분간 denaturation한 후 94°C에서 1분간 denature, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 반복하였다. final extension은 72°C에서 5분간 시행하고 4°C에서 보관하였다. PCR 실시 후 반응산물 10μL를 취하여 X6 전기영동 완충액 2μL와 섞은 다음 2% agarose gel에서 전기영동한 후 UV transilluminator에서 폴라로이드

Table 1. PCR Primers Used in This Study

Gene amplified	Primer	Primer sequence	Size (bp)
<i>glmM</i>	HP-F	GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG	294
<i>glmM</i>	HP-R	GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC	
<i>cagA</i>	cagA-F	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG	349
<i>cagA</i>	cagA-R	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	
<i>vacA</i> s	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259
<i>vacA</i> s	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	or 286
<i>vacA</i> s1a	S1A-F	TCTYGTCTTAGTAGGAGC	212
<i>vacA</i> s1b	SS3-F	AGCGCCATACCGCAAGAG	187
<i>vacA</i> s1c	S1C-F	CTYCTTTAGTRGGGYTA	213
<i>vacA</i> m	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	570
<i>vacA</i> m	VAG-R	GCGTCTAAATAATTCCAAGG	or 645
Hp23	Hp23-F	CCACAGCGATGTGGTGTCTAG	425
Hp23	Hp23-R	CTCCATAAGAGCCAAAGCCC	

카메라로 촬영하였다. 294 bp 크기의 분절이 발견되어 *H. pylori* DNA가 양성으로 나온 환자가 27명으로 이들에 대하여 각 유전자에 대해 PCR을 시행하였다.

각 유전자의 시발체와 산물의 크기는 Table 1과 같다. *cagA* 유전자의 middle conservative region을 증폭하였는데, 1분간 94°C에서 denature하고 1분간 55°C에서 annealing한 후 1분간 72°C에서 확장하는 35 cycle을 시행하였다. *vacA* s region은 VA1-F와 VA1-R을 시발체로 하여 94°C에서 denature하고 1분간 57°C에서 annealing한 후 1분간 72°C에서 extension하는 35 cycle을 시행하였다. 259 bp가 나오면 s1, 286 bp가 나오면 s2로 분류하고 s1은 s1a, s1b, s1c에 특이한 시발체인 S1A-F, SS3-F, S1C-F와 VA1-R을 이용하여 PCR하여 세분하였다. *vacA* m region은 VAG-F, VAG-R을 시발체로 하여 94°C에서 denature하고 1분간 58°C에서 annealing한 후 1분간 72°C에서 extension하는 35 cycle을 시행하였다. 570 bp가 나오면 m1, 645 bp가 나오면 m2로 분류하였다.

Clarithromycin 내성과 연관된 돌연변이를 찾기 위해 23S rRNA의 V domain은 Hp23을 시발체로 하여 증폭하였다. PCR cycle은 1분 동안 94°C에서 denature하고 1분 동안 55°C에서 annealing한 후 1분간

72°C에서 확장하는데, 39 cycle을 시행하였다. 2% agarose gel에서 전기영동하여 425 bp의 산물을 확인하였다. PCR 산물은 PCR RFLP를 이용하여 *BsaI*과 *MboII* 제한효소로 처리하여 37°C에서 3시간 배양 후 밴드를 확인하여 돌연변이 여부를 판정하였다.

결 과

A2143G 돌연변이는 *MboII*에 의해 두 개의 밴드가 나타나는데, 1명에서 관찰되었다. *BsaI*에 의해 두 개의 밴드가 나타나 A2144G 돌연변이로 밝혀진 경우는 4명이었다(Fig. 1). 27명 중 5명에서 A2143G 또는 A2144G 돌연변이가 발견되어 18.5%가 clarithromycin 내성으로 관찰되었다.

전체 27명 중 *cagA* 양성이 25명(93%)이었고, *vacA* s1a/m1이 6명(22%), s1a/m2가 3명(11%), s1c/m1이 16명(59%), s1c/m2가 1명(4%)이었다. Clarithromycin 내성 돌연변이를 보이는 경우는 모두 *cagA* 양성이었고 s1a/m1이 2명, s1c/m1이 2명으로 특정 유전형이 clarithromycin 내성 돌연변이와 연관성을 보이지 않았다.

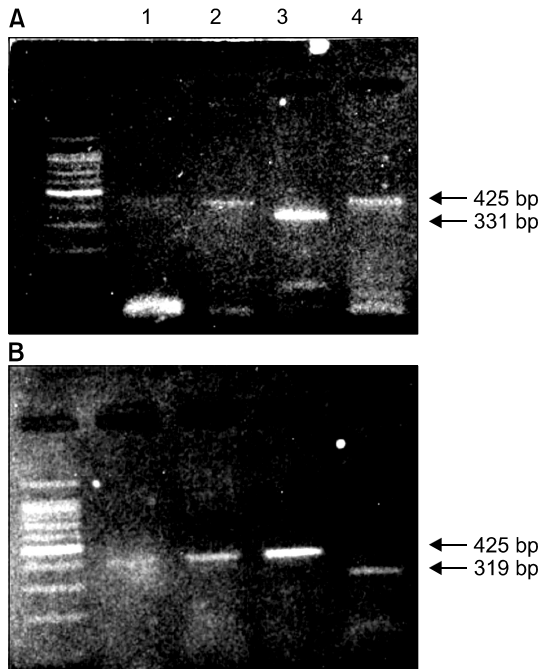


Fig. 1. PCR RFLP of 23S rRNA gene of *H. pylori*. A. Detection of A2143G mutation by MbolI-mediated restriction digestion. Lanes 1~2, 4, wild type; 3, A2143G. B. Detection of A2144G mutation by BsaI-mediated restriction digestion. Lanes 1~3, wild type; 4, A2143G.

고 찰

최근에는 *H. pylori* 치료에 PPI와 함께 항생제를 병합해서 사용하는 것이 권장된다. 항생제는 amoxicillin, clarithromycin, metronidazole 중에 두 개를 복용하며, 1주일간의 삼제 병합요법으로 성인 *H. pylori* 감염에서 제균율은 80~90%이다. Metronidazole 내성률이 50% 내외로 보고되는 우리나라 성인에서는 PPI, amoxicillin, clarithromycin의 삼제요법이 추천되는데¹⁰⁾, 제균율은 57~92%로 보고되며 1주간의 치료에 비해서 2주간의 치료로 제균율이 향상된다^{11,12)}.

소아의 *H. pylori* 위염에서 PPI, amoxicillin, clarithromycin 삼제요법의 제균율은 프랑스의 보고에서

80%에 이르렀다¹³⁾. 우리 나라 소아에서 PPI, amoxicillin, clarithromycin 삼제 병합요법을 시도한 결과 63%에서만 제균효과를 보였으나, PPI, amoxicillin, metronidazole, bismuth 사제 병합요법의 제균율은 88%로 큰 차이를 보이고 있다³⁾. Metronidazole의 내성은 다제요법으로 극복할 수 있지만, clarithromycin 내성은 다제요법에서도 치료 실패의 원인이 된다¹⁴⁾. Clarithromycin에 감수성이 있는 *H. pylori*의 제균율은 83%이지만, 내성이 있는 군에서의 제균율은 30%에 불과하다. 미국의 경우 clarithromycin 내성균이 1993~94년에 4%에서 1995~96년에는 12.6%로 증가하였고, 우리 나라에서도 단일 기관의 연구 결과 1994년 5%에서 1998년 8%로 증가하는 추세이다⁶⁾. Clarithromycin을 상기도 감염의 치료에 많이 사용하는 지역에서는 이에 대한 내성이 많은 것으로 알려졌다¹⁵⁾. 우리 나라에서는 소아의 상기도 감염 치료에 clarithromycin이 많이 사용되기 때문에 소아에서 clarithromycin 내성 균주가 성인에 비해 더 많이 발견될 가능성이 있다.

*H. pylori*의 clarithromycin에 대한 내성은 *H. pylori*의 23S rRNA 유전자의 V domain의 염기서열 2143번 혹은 2144번인 adenine이 guanine으로 변이되어 macrolide가 결합하는 것을 막기 때문에 발생한다⁶⁾. Clarithromycin 내성과 연관된 돌연변이는 PCR-RFLP로 찾아낼 수 있어 낮은 배양률을 극복할 수 있고, 배양 후 항생제 감수성 검사를 하는데 걸리는 시간을 줄일 수 있다. A2143C, A2143T 돌연변이는 저자들이 사용한 PCR-RFLP로는 찾아낼 수 없지만¹⁶⁾ 이러한 돌연변이를 가진 *H. pylori*는 ribosome 구조에 약간의 변화를 일으키고, 정상 *H. pylori*나 A2143G, A2144G를 가진 *H. pylori*에 비해서 훨씬 느린 성장 유형을 보여서 임상적으로 의미가 없는 것으로 보고되고 있다¹⁷⁾. 본 연구의 결과 27명 중 5명에서 A2143G 또는 A2144G 돌연변이가 발견되어 18.5%에서 clarithromycin 내성이 관찰되었다. 아직까지 국내에서 amoxicillin 내성균은 거의 없으므로¹⁸⁾ 우리 나라 소아에서 PPI 삼제병합요법의 낮은 제균율이 clarithromycin 내성 때문일 가능성이 많다. 우리나라 성인에서 PCR-RFLP로 조사한 clarithro-

mycin에 대한 내성률은 4~20%로 보고자에 따라 차이를 보이지만, PCR-RFLP 결과는 균 배양 후 Epsilonometer test를 이용한 clarithromycin 내성률과 밀접한 관계를 보였다^{18,19}. 염기서열 분석 결과에서도 clarithromycin 내성 균주의 대부분에서 A2143G, A2144G 돌연변이가 발견되었다. 일본의 소아에서 분리된 *H. pylori* 균주에서도 clarithromycin 내성률이 24%에 이르렀고, 내성 균주의 90%가 A2143G 돌연변이로 밝혀졌다²⁰. 따라서 clarithromycin 내성률이 높은 지역에서는 위점막 조직의 PCR-RFLP 검사가 제균 실패를 예방하는데 도움이 될 것이다.

cagA+/*vacA* s1인 균주가 *cagA*+/*vacA* s2 균주에 비해 항생제 치료효과가 좋아 *H. pylori*의 유전형에 따라 치료 성적이 다르다는 보고가 있다⁷. 그러나 *cagA*+/*vacA* s1 균주가 대부분인 우리나라에서는 적용되기 어렵다고 생각하며, 치료성적에 영향을 주는 clarithromycin 내성 돌연변이와 *cagA*, *vacA* 유전형 사이에 특별한 연관성을 찾을 수 없었다.

위점막 조직에서 PCR-RFLP를 이용한 *H. pylori*의 clarithromycin 내성 검사는 균배양 후 항생제 감수성 검사 없이도 항생제를 선택하는데 유용할 것이라고 생각된다.

요 약

목 적: 우리 나라 소아에 감염된 *H. pylori*에서 PCR RFLP를 이용하여 clarithromycin 내성의 원인으로 알려진 23S rRNA의 돌연변이를 찾아내고, *cagA*, *vacA* 유전형과 clarithromycin 내성 돌연변이 사이에 연관이 있는지 알아보고자 하였다.

방 법: 서울대학교병원 소아과에서 위내시경검사를 통해 *H. pylori* 위염으로 진단 받은 환자 27명의 내시경 생검 조직에서 *H. pylori* *cagA*, *vacA* 유전자를 증폭하여 유전형을 조사하였다. *H. pylori*의 23 rRNA V domain을 조사하기 위해 증폭한 후, PCR 산물은 BsaI과 MboII 제한효소로 처리하여 PCR RFLP를 이용하여 돌연변이 여부를 판정하였다.

결 과: A2143G 돌연변이가 1명에서, A2144G 돌연변이가 4명에서 발견되어 18.5%가 clarithromycin 내

성으로 관찰되었다. *cagA* 양성인 25명(93%)이었고, *vacA* s1a/m1이 6명(22%), s1a/m2가 3명(11%), s1c/m1이 16명(59%), s1c/m2가 1명(4%)이었다. clarithromycin 내성 돌연변이를 보이는 경우는 모두 *cagA* 양성 이었고 s1a/m1이 2명, s1c/m1이 2명으로 특정 유전형이 clarithromycin 내성 돌연변이와 연관성을 보이지 않았다.

결 론: 위점막 조직에서 PCR-RFLP를 이용한 *H. pylori*의 clarithromycin 내성 검사는 항생제를 선택하는데 유용하다고 생각된다. Clarithromycin 내성 돌연변이는 *cagA*, *vacA* 유전형과 연관성이 없었다.

참 고 문 헌

- 1) 최연호, 고재성, 김순영, 유영미, 서정기. 소아 십이지장궤양에서의 *H. pylori* 박멸과 궤양재발에 대한 연구. 대한소아소화기영양학회지 1998;1:30-6.
- 2) Graham DY. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. Gastroenterology 1997;113:1983-91.
- 3) Peitz U, Menegatti M, Vaira D, Malfertheiner P. The European meeting on *Helicobacter pylori*: therapeutic news from Lisbon. Gut 1998;43(suppl 1):S666-S9.
- 4) 배선환, 고재성, 서정기. 소아 *H. pylori* 감염에 대한 두약제와 세약제 치료 효과의 비교. 소아과 1998;41:323-30.
- 5) 류 일, 장주영, 고재성, 서정기. 소아 *Helicobacter pylori* 감염증의 치료에서 proton pump inhibitor 삼제요법과 사제요법의 비교. 제 7차 대한 *H. pylori* 연구회 학술대회 초록집 2000;p 19.
- 6) 정정환, 김재준, 김영호, 이풍렬, 이종철. 한국에서의 *Helicobacter pylori* 균주의 metronidazole, clarithromycin, tetracycline 내성에 대한 분석. 대한*Helicobacter*연구학회지 2002;2:57-60.
- 7) Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:477-80.
- 8) van Doorn LJ, Schneeberger PM, Nouhan N, Plaisier AP, Quint WGV, de Boer WA. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. Gut 2000;46:321-6.

- 9) Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SKF, et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissue. J Clin Microbiol 1999;37:772-4.
- 10) 대한 *Helicobacter pylori* 연구회. 한국인에서의 *Helicobacter pylori* 감염의 진단과 치료. 대한소화기학회지 1998;32:275-89.
- 11) 심상균, 김재준, 김영호, 성인경, 손희정, 이규택 등. 일주일 3제 병합 *Helicobacter pylori* 항균요법의 제균 효과에 대한 전향적 무작위 연구. 대한소화기학회지 2000;35:16-22.
- 12) 김용식, 전훈재, 정록선, 김경오, 김영선, 박철희 등. PPI 포함 삼제 병합요법의 투여기간에 따른 *Helicobacter pylori* 제균율 비교. 대한*Helicobacter*연구학회지 2002;2:50-6.
- 13) Gottrand F, Kalach N, Spyckerelle C, Guimber D, Mougenot JF, Tounian P et al. Omeprazole combined with amoxicillin and clarithromycin in the eradication of *Helicobacter pylori* in children with gastritis: a prospective randomized double-blind trial. J Pediatr 2001;139:664-8.
- 14) Graham DY. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. Gastroenterology 1998;115:1272-7.
- 15) Vakil N, Hahn B, McSorley D. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in the United States. Am J Gastroenterol 1998; 93:1432-5.
- 16) Pina M, Occhialini A, Monteiro L, Doermann HP, Megraud F. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by hybridization in liquid phase. J Clin Microbiol 1998;36:3285-90.
- 17) Debets-Ossenkopp YJ, Brinkman AB, Kuipers EJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Kusters JG. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2749-51.
- 18) 송호진, 정인식, 김상우, 이강문, 김병욱, 이동수 등. *Helicobacter pylori*의 항생제 내성률 및 clarithromycin 내성에 연관된 23S rRNA 돌연변이의 검출. 대한소화기학회지 2000;36:597-606.
- 19) 남승우, 노임환, 김석배, 이병석, 황영준, 박영석 등. clarithromycin에 내성을 지닌 *Helicobacter pylori* 균주 확인을 위한 중합효소연쇄반응법의 이용. 대한소화기학회지 2000;36:450-6.
- 20) Kato S, Fujimura S, Udagawa H, Shimizu T, Maisawa S, Ozawa K, et al. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children. J Clin Microbiol 2002;40:649-53.