

*Helicobacter pylori*의 항균제 내성

이 미 애

이화여자대학교 의과대학 임상병리학교실

Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori*

Mi Ae Lee, M.D.

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University Mokdong Hospital,
Seoul, Korea

서 론

*H. pylori*가 1983년 발견된 이래 만성위염 및 소화성 궤양의 중요한 원인균이며 위선암 및 위림프종 발생의 중요한 위험인자로 인식되고 있다. *H. pylori*의 치료는 단일 약제로는 불가능하고 현재 여러가지 병용요법 들이 시도되고 있으나 만족할 만한 치료 성적을 얻을 수 없는데, 이러한 치료 실패요인으로 가장 큰 원인은 항균제 내성 균주의 증가와 환자의 non-compliance를 들고 있다.

또한 *H. pylori*는 매우 까다로운 균이고 항균제 감수성 검사방법에 따라 결과가 달라질 수 있는데 이에 대한 기준이 아직 정립되어 있지 않다. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서 1999년 처음으로 *H. pylori*의 항균제 감수성 검사법으로 한천희석법(agar dilution)을 추천하였으나, 내성의 breakpoint는 정해져 있지 않았다. 2000년 들어 NCCLS [1]에서 clarithromycin의 breakpoint 기준만을 제시하고 있어 검사실간의 차이가 크고 검사법간의 차이가 크므로, 저자는 *H. pylori*의 항균제 내성현황, 감수성 검사의 필요성, 방법 및 내성기전을 중심으로 저자의 경험과 문헌을 바탕으로 기술하고자 한다.

*H. pylori*의 항균제 내성 현황

일반적으로 *H. pylori* 균주는 penicillin, cephalosporin을 제외한 대부분의 cephalosporin제제, macrolides, tetracyclines, nitroimidazoles, nitrofurans, quinolones, bismuth

salts 및 proton pump inhibitors (PPIs)에 대해 in vitro에서 감수성을 보이고 H₂-receptor blockers, polymyxin 및 trimethoprim에 대해 내인성 내성을 지닌다.

*H. pylori*의 박멸요법으로는 국내에서는 1차 처방에 bismuth제제를 포함하는 3제요법, PPI를 포함하는 3제요법, ranitidine bismuth citrate제제를 포함하는 3제요법, 이차 처방에는 bismuth, tetracycline, metronidazole, PPIs의 4제 요법 등이 권고된다[2].

Nitroimidazoles 내성률

Metronidazole내성률은 선진국 10-56%에서 개발도상국 80-90%까지 보고되고 있으며 유럽은 평균 20-40%, 미국은 1997년 내성률이 56%로 보고되었으나[3] 1999년 Osato 등[4]에 의하면 37.4%로 과거에 E test에 의해 내성률이 과도 측정되었다고 하였고, 카나다는 10% 정도이며, 일본은 12.4%인데 지역에 따라 8.1-23.8%로 다양하게 보고되었다[5]. 국내 결과는 1994년 33.3% 이고 1999년 47.7%로 증가하였다[6].

최근 metronidazole내성률이 높아서 이에 대한 대체 약제로 furazolidone 이나 nitrofurantoin이 시도되고 있는데 최근 보고[7]에 의하면 최소억제농도 >4 μ g/mL 을 기준으로 했을 때 내성률 1.5%로 보고되어서 좋은 대체 약제로 기대된다.

Macrolides내성률

세계적으로 0-15% 정도로 알려져 있으며, 유럽의 대부분 나라는 2-10%정도, 미국은 8%, 카나다는 3%로 낮고, 일본은 이에 비해 높아 12.9%이지만 1996년 9.1%에서 1999년 18.7%로 두배이상 증가 추세에 있으며[5], Peru에서는 50% 정도로 높은 내성률을 보인다고 하였다. 국내 보고로는 2.2-5.9%로 보고되었는데 1994년 4.8%에

접수번호 : CM 4-2-09

교신저자 : 이미애

(158-050) 서울시 양천구 목동 911-1
이화대학부속 이대목동병원 임상병리과
Tel : (02) 650-5222 Fax : (02) 654-7948
Email: miae@mm.ewha.ac.kr

서 1999년 7.7%로 점차 증가하는 추세이지만 아직까지는 비교적 낮은 내성률을 보이고 있으나[6], 소아에서 omeprazole, amoxicillin, clarithromycin 3제요법 실패율이 38%이고 이중 22%에서 23rRNA의 변이 균종(A to G at 2144 and A to G 2143)으로 보고되어[2] 국내에서 특히 소아에서는 clarithromycin감수성 검사가 필요하다 하겠고 추후 좀더 정확한 내성률이 연구되어야 할 것이다.

Tetracycline 내성률

미국에서는 거의 보고가 없으며 세계적으로 내성률이 비교적 낮은 것으로 알려져 있으나, 최근 몇몇 나라에서 내성률이 점차 증가하고 있는데 국내에는 비교적 높아 5.3%, 일본 6.7% 및 영국에서 6%까지 보고되고 있다[6,8].

Amoxicillin 내성률

Amoxicillin은 *H. pylori* 치료제로 사용되는 유일한 beta-lactam제제이며 이 균주의 최소억제농도가 0.03 µg/mL미만으로 매우 낮고, 내성 균주는 거의 없는 것으로 알려져 있으며, 내성률도 국내 보고는 0%이지만, 최근 Italy, 미국 및 Brazil에서 내성 균주들이 보고되고 있다.

항균제 heteroresistance

H. pylori 감염된 환자에서 위조직 생검 부위에 따라 내성유무가 달라지는 heteroresistance가 보고되고 있는데 metronidazole이 가장 흔히 보고되어 9.4-15.8%로 높고 그외에 clarithromycin 1.7-4.1%, tetracycline 0-4.6%, amoxicillin 0-0.5% 및 furazolidone 과 nitrofurantoin 2%로 다양한 항균제에서 나타날 수 있고, 위 체부와 위 전정부 조직 중 어느 부분이 이를 대표할 수 있는지는 알려져 있지 않으므로 다생검조직에서 배양 및 항균제 감수성 검사를 시행해야 할 것으로 생각된다[9-10].

항균제 감수성 검사법

필요성

*H. pylori*의 항균제 감수성검사는 매우 까다롭기 때문에 치료전 항균제 감수성 검사를 시행하는데 비용효과면에서 고려되어야 할 점으로는

- 1) 일차 선택제에 내성인 *H. pylori*의 비율
- 2) *H. pylori* 항균제 감수성 균주에서 박멸률
- 3) *H. pylori* 항균제 내성 균주에서 박멸률
- 4) 진단과 치료에 사용되는 비용 등을 들 수 있다.

현재 metronidazole에 대한 항균제 감수성검사 결과

와 치료 효과에 관해서는 많은 이견이 있으나, 일반적으로 nitroimidazole 감수성 균주에서 박멸률이 90%인데 비해 내성 균주는 75%이하라고 하였고 다른 보고도 bismuth 및 PPI 삼제요법에서 metronidazole 내성 균주인 경우 효과를 50%정도 감소시킨다고 하였으며, 또한 clarithromycin은 내성인 균주에서는 치료효과가 거의 없기 때문에 항균제 감수성 검사를 미리 시행하는 것이 좋을 것으로 생각된다[11,12]. 또한 국내의 clarithromycin내성률은 2.2-7.7% 정도로 비교적 낮으나 소아에서는 항균제 내성률이 높은 것으로 알려져 있고 clarithromycin, PPI, amoxicillin의 삼제요법이 많이 사용되는데 소아에서는 박멸률이 62% 정도밖에 되지 않는다는 보고도 있어 일차 치료전에 항균제 감수성 검사를 시행하여 항균제 선택을 하면 좋을 것으로 생각된다. 그러나 실제적으로 모든 검사실에서 이를 시행하기 어렵기 때문에 성인에서는 clarithromycin포함 3제 요법을 일차 치료로 경험적으로 사용할 수 있으나 일차 약제 실패후에는 원칙적으로 항균제 감수성 검사를 시행하여 그 결과에 따라 치료제를 선택하여야 한다.

검사법

검사방법으로는 다른 균주와 같이 디스크 확산법, E test, 액체미량희석법, 한천희석법 및 PCR법 등이 알려져 있으며, clarithromycin, amoxicillin 및 tetracycline에 대한 각 검사법 간에는 허용할 만한 오차 내에 있는데 metronidazole에 대한 E test는 한천희석법과 일치하지 않아 추천되지 않는다. 그러나 이들의 최소억제농도의 breakpoint가 생체내 치료효과를 판정하는데 정확하지 않으며, 이중 clarithromycin만이 치료 효과를 판정하는데 의의가 있어 2000년 NCCLS[1]에서 clarithromycin에 대한 breakpoint 기준치가 제시되었다.

특히 metronidazole 항균제 감수성 검사법은 실제로 in vitro에서는 어려운데 이는 metronidazole이 작용하려면 prodrug으로 환원되는데 필요한 redox potential이 -415mV이므로 이는 혐기성 상태에서만 이루어 지는데 *H. pylori*는 혐기성 상태에서는 잘 자라지 않고 미호기성 상태에서만 자라기 때문에 실제 검사와 임상 효과를 판정하기에는 어려움이 크고 검사방법 간에도 오차가 크다.

각 방법 간의 장단점 비교는 다음과 같다(Table 1).

표준방법

2000년 NCCLS M7-A5 기준인 한천희석법은 Muller-Hinton agar with 5% aged sheep blood를 사용하여 혈액한천배지에서 72시간 배양하여 준비한 McFarland No 2로 균수를 맞춘 식염수 균부유액(10^{7-8} CFU/mL)으로 1-3 µL로 배지에 접종하여 35°C에서 3일간 미호기성상태에서

Table 1. Comparison of methods tested in antimicrobial susceptibility of *H. pylori*

	Advantages	Disadvantages
Disk diffusion	Easy to perform Requires no special equipment Single isolates can be tested Inexpensive Widely available	No standard disk concentration No standard effective diameter of inhibition Only one test isolate per plate No breakpoints Only qualitative susceptibility
Broth dilution	Multiple isolates can be tested/plate Endpoints easy to determinate MBC determination possible Quantitative endpoint (MIC)	Not widely available Not all antibiotics and/or concentration available Custom plates are expensive No breakpoints for metronidazole, amoxicillin or tetracycline
E test	Easy to perform Single isolate can be tested Quantitative endpoint (MIC)	Not all E test strips FDA approved Testing of multiple isolates requires multiple plates Over-estimates metronidazole susceptibility High Internal variability No breakpoints for metronidazole, amoxicillin or tetracycline
Agar dilution	NCCLS standard methodology Multiple concentration can be tested Quantitative endpoints	Technically difficult to perform Expensive Each antibiotic requires multiple plates No breakpoints for metronidazole, amoxicillin or tetracycline
PCR-RFLP	Multiple isolates can be tested at a time Rapid turnaround time	Technically difficult Expensive Qualitative endpoints ~10% of resistant isolates cannot be identified Research tool Cannot be used for other antibiotics (clarithromycin only)

Table 2. Acceptable quality control limits of minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) for *H. pylori* (ATCC 43504)

항균제	기준치($\mu\text{g/mL}$)
Amoxicillin	0.016-0.12
Clarithromycin	0.016-0.12
Metronidazole	64-256
Tetracycline	0.12-1

배양한다. 정도관리균주로는 *H. pylori* ATCC 43504를 이용하여 다음과 같은 허용범위로 사용한다. clarithromycin에 대한 최소억제농도의 breakpoint는 $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ 이면 감수성, $0.5 \mu\text{g/mL}$ 이면 중간내성, $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ 이면 내성으로 판정한다.

Table 3. Breakpoint minimum inhibitory concentration used to designate resistant criteria in *H. pylori*

	내성($\mu\text{g/mL}$)
Metronidazole	>8
Amoxicillin	>8 or ≥ 0.25
Tetracycline	>2

사용되는 항균제로는 NCCLS에서는 clarithromycin만을 정하였으나, 일반적으로는 amoxicillin, clarithromycin, metronidazole, tetracycline 정도의 항균제에 대한 검사를 시행하면 될 것으로 생각되며 여기에 대한 일반적으로 통용되는 내성 기준은 (Table 3)과 같다.

*H. pylori*의 내성 기전

Nitroimidazole의 내성 기전

Metronidazole의 작용 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 nitro group이 NADPH와 같은 물질로부터 전자를 받아서 화학적으로 활성이 높은 hydroxyamine과 같은 중간대사물로 바뀌어 DNA, 단백질, 세포막과 반응하는 것으로 알려져 있다[13]. 최근 Goodwin 등[14]의 연구에 의하면 oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase가 nitro group환원에 관여하는데 여기에 해당되는 유전자인 *rdxA*의 변이에 의해 효소 활성이 저하되어 내성균주가 발생한다고 알려져 있다. 그러나 이것만으로 설명 안되는 균주들도 있어 Kwon 등[15,16]은 NAD (P)H flavin oxidoreductase 유전자인 *frxA*와 ferredoxin-like protein의 유전자인 *fdxB*의 비활성화가 또 다른 내성 기전으로 작용한다고 보고하였으며, 32µg/mL이상의 중간 또는 고도의 metronidazole내성균에서는 *rdxA*와 *frxA* 유전자가 모두 관여되며 저도내성 (8µg/mL)인 경우는 *frxA*의 missense mutations에 의한다고 하였다.

최근 metronidazole내성률이 높아져 이에 대한 대체 약제로 furazolidone 이나 nitrofurantoin이 시도되고 있는데 MIC >4 µg/mL을 기준으로 했을 때 내성률 1.5%로 보고 되어서 좋은 대체 약제로 기대된다고 하였는데 이에 대한 내성기전은 metronidazole과는 달리 *rdxA*, *frxA* 및 *fdxB* 등의 유전자가 관여하지 않는다고 하였으며 아마도 pyruvate:flavodoxin oxidoreductase (porCDAB) and/or 2-oxoglutarate oxidoreductase (OorDABC)와 같은 nitroreductase의 부분적 비활성에 의한 것이 아닌가 추정되고 있다[7].

Macrolides의 내성 기전

Macrolide계 항균제의 작용기전은 감수성이 있는 세균의 50S 리보솜 - 23S rRNA V domain의 peptidyl transferase loop 과 비가역적으로 결합하여 단백질 생성을 억제한다.

일반세균에서 macrolide 내성기전은 이와 같은 리보솜에 대한 결합 장애에 의한 것으로 생각되며 *S. aureus*에서는 MLS (macrolide, lincosamide, streptogramin B) resistance에 관여하는 23S ribosomal RNA 유전자의 adenine residue의 methylation에 의한 것이 잘 알려져 있으며 그와 다른 변형으로는 *E. coli* 등에서 알려진 23S rRNA의 peptidyl transferase domain의 변이가 내성을 유발한다고 알려져 있다[17]. *H. pylori*에서 clarithromycin 내성 기전은 1996년 Versalovic 등[18]이 23S rRNA 염기 서열의 점 돌연변이와 관련있으며 V domain의 2143이나 2142에서 adenine이 guanine으로 변이 되는 것으로

최초로 보고하였으며 그후 드물게 A2116G 이나 A2142C 등의 변이도 보고되고 있으나 *H. pylori*에서 macrolide내성기전은 erythromycin-modifying enzymes이나 rRNA methylase 등은 관여 하지 않는다고 알려져 있다. 이를 확인하는 방법으로는 염기분석법이 이용되나 쉽게 검출하는 방법으로는 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)법이 사용되고 그 외 oligonucleotide ligase assay, DNA enzyme immunoassay, Reverse hybridization line probe assay, Fluorescent in situ hybridization법 등이 개발되어 있고 상품화되어 진단에 이용되고 있다. 최근 reverse hybridization line probe assay를 이용한 다기관연구에 의하면 clarithromycin내성 130 균주중 127균주(98%)가 23S rRNA 변이를 보였고, A2143G가 45.2%, A2142G 33.3%, A2142C 2.9%이었고 다부위 변이를 나타낸 균주는 19.8%에 이른다고 하였다[19].

Tetracycline의 내성 기전

이 약제는 세균의 30S 리보솜에 결합하여 단백질 생성을 억제하는 기전을 통하여 많은 그람 음성균에 작용한다. *H. pylori*에서 tetracycline내성기전은 아직까지 밝혀져 있지 않는데 흥미있는 것은 metronidazole에 대해 cross-resistance를 보인다는 점이고 이것이 metronidazole 내성기전 또는 외막 투과성 변화, active reflux 및 ribosome protection 등과 같은 다른 균주에서 tetracycline 내성기전 혹은 다른 그람음성균에서 처럼 다약제내성 기전의 일부분 등을 생각해 볼 수 있다고 하였다[8].

Amoxicillin의 내성 기전

이 약제의 작용기전은 다른 페니실린계와 비슷하게 세포벽의 생성을 억제하는 것인데 내성기전은 아직 확실히 않으나 일반적으로 β-lactamase는 관여되어 있지 않다고 알려져 있으며, Dore 등[20]에 의하면 고농도의 최소억제농도를 보이는 균주는 감수성 균주에 비해 4개의 protein-binding protein (PBP) 중 하나인 30-32 kD해당되는 PBP D가 없어지는데 이것이 내성기전에 관여한다고 하였다.

참 고 문 헌

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. fifth ed., Approved standard M7-A5(M100-S10)*. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, Pa., 2000.
2. 대한 *H. pylori*연구회. *Helicobacter pylori* -기초와 임

- 상의 실제. 1판. 서울:군자출판사, 2001:182, 212.
3. Weissfeld A, Haber M, Rose P, Kids S, Siejman N. *Geographical distribution in the United States of primary resistance to clarithromycin and metronidazole in patients infected with Helicobacter pylori(abstr)*. *Gastroenterology* 1997;112:A328.
 4. Osato MS, Reddy R, Graham DY. *Metronidazole and clarithromycin resistance amongst Helicobacter pylori isolates from a large metropolitan hospital in the United States*. *Int J Antimicrob Agents* 1999;12:341-7.
 5. Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ, Reddy R, Asaka M, Kashima K, et al. *Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among Helicobacter pylori isolates from Japan*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2214-6.
 6. Kim JJ, Reddy R, Lee MA, Kim JG, El-Zaatari FA, Osato MS, et al. *Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of Helicobacter pylori isolates from Korea*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:459-61.
 7. Kwon DH, Lee MA, Kim JJ, Kim JG, El-Zaatari FA, Osato MS, Graham DY. *Furazolidone- and nitrofurantoin-resistant Helicobacter pylori: prevalence and role of genes involved in metronidazole resistance*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:306-8.
 8. Kwon DH, Kim JJ, Lee MA, Yamaoka Y, Kato M, Osato MS, et al. *Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3203-5.
 9. 이미애, Kwon DH, Osato MS, Graham DY. 항균제에 대한 heteroresistance를 보이는 *H. pylori* 균주에서 RAPD fingerprinting 분석. *대한임상미생물학회지* 2001;4(부록1):S65.
 10. Weel JFL, van der Hulst RW, Gerrits Y, Tytgat GN, van der Ende A, Dankert J. *Heterogeneity in susceptibility to metronidazole among Helicobacter pylori isolates from patients with gastritis or peptic ulcer disease*. *J Clin Microbiol* 1996;34:2158-62.
 11. van der Wouden EJ, Thijs JC, van Zwet AA, Sluiter WJ, Kleibeuker JH. *The influence of in vitro nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-Helicobacter pylori regimens: a meta-analysis*. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1751-9.
 12. Houben MH, Van Der Beek D, Hensen EF, 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;13:1047-55.
 13. Edwards DI. *Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms*. *J Antimicrob Chemother* 1993;31:9-20.
 14. Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. *Metronidazole resistance in Helicobacter pylori is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase*. *Mol Microbiol* 1998;28(2):383-93.
 15. Kwon DH, El-Zaatari FA, Kato M, Osato MS, Reddy R, Yamaoka Y, et al. *Analysis of rdxA and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin-oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(8): 2133-42.
 16. Kwon DH, Hulten K, Kato M, Kim JJ, Lee M, El-Zaatari FA, et al. *DNA Sequence Analysis of rdxA and frxA from 12 pairs of metronidazole-sensitive and-resistant clinical Helicobacter pylori isolates*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2609-15.
 17. Weisblum B. *Erythromycin resistance by ribosome modification*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39: 577-85.
 18. 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*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1996;40:477-80.
 19. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, et al. *Accurate prediction of macrolide resistance in Helicobacter pylori by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(5):1500-4.
 20. Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR. *Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1999;4(3): 154-61.