

Helicobacter pylori 감염의 치료와 Clarithromycin 내성간의 연관성

손승규 · 이종화¹ · 이정훈 · 이상희*

명지대학교 자연과학대학 생명과학정보학부, ¹단국대학교 의과대학 소화기연구소

본 연구를 수행하기 전에 *H. pylori*에 대한 어떠한 치료도 받지 않은 114명의 소화기 궤양 환자들을 내시경 검사를 하는 동안, 114개의 *H. pylori* 균주를 위 전정부로부터 분리하였다. *H. pylori*를 검출하기 위하여 rapid urease test, SSA와 *cagA* 유전자의 PCR증폭을 수행하였고, CagA 발현 검출을 위하여 Western blot 을 수행하였다. *H. pylori*에 감염된 환자들은 omeprazole, clarithromycin (a macrolide), amoxicillin을 모두 사용하는 3제 요법(triple therapy)으로 치료하였다. 치료가 중단되고 6주 후에 내시경 검사에서 세균 박멸률을 측정하였다. 내성률은 각각 clarithromycin이 20.2%, amoxicillin이 0.0%였다. Clarithromycin 내성은 *H. pylori*의 23S rRNA 유전자에 있는 A2142G 돌연변이에 의한 것이 87%이었다. A2142G 돌연변이의 clarithromycin의 MIC값(32~>256 µg/ml)은 A2143G 돌연변이의 MIC값(4~128 µg/ml)보다 더 높았다. Clarithromycin에 감수성을 가진 *H. pylori*는 박멸되었으나 clarithromycin 내성을 가진 *H. pylori*는 박멸되지 않았다($P = 0.0001$). 이러한 결과들은 CagA 발현에는 어떠한 영향도 받지 않았으며 *H. pylori*의 clarithromycin 내성은 치료 실패의 가장 중요한 이유임을 제시하였다. 우선적으로 실시되는 생검 배양에 대한 *H. pylori*의 항생제 감수성 시험은 감염된 환자들에 대한 3제 요법을 선택하기 이전에 필히 실시되어야 하며 국내에서 clarithromycin에 대한 1차 내성의 높은 빈도는 *H. pylori*의 감염증 치료에 심각한 문제점을 야기시켰다.

Key words □ clarithromycin resistance, eradication rate, *H. pylori*, peptic ulcer, triple therapy

세계인구의 50%가 감염되어 있는 *Helicobacter pylori*는 위염, 위궤양, 십이지장 궤양, 그리고 위암 발병에 매우 중요한 요인이다(9, 10, 21). 한국 성인의 약 60~70%가 *H. pylori*에 감염되어 있다(6). *H. pylori* 감염에 대한 최근의 보고에 의하면(3), 기질성 질환의 소화기 징후를 갖는 환자의 임상적 검사 시에 선호되는 방법은 생체조직 검사를 포함한 위장의 내시경 검사이다. 위궤양 또는 십이지장 궤양의 환자 및 *H. pylori*에 감염된 모든 환자들에게 항생제를 투여하여 *H. pylori*를 박멸(eradication)시켜서 소화기 궤양을 치유하는 것이 재발을 방지하기 위한 효과적인 방법으로 널리 인정 되었다(3). *H. pylori*에 감염된 성인 환자에게는 proton pump inhibitor (PPI, omeprazole)와 amoxicillin(β -lactam antibiotic)과 clarithromycin (macrolide antibiotic) 또는 metronidazole(5-nitroimidazole antibiotic)을 혼합한 3제 요법(triple therapy)이 추천되고 있다(5). Metronidazole 내성(resistance)은 유럽에서 50%이상으로 높고, 박멸률(eradication rate)은 metronidazole에 감수성인 *H. pylori* 보다 metronidazole에 내성인 *H. pylori*에 감염된 성인 환자에서 더 낮다(1). 그리고 CagA (cytotoxin-associated gene)를 생성하는 *H. pylori*의 존재는 *H. pylori*의 박멸을 어렵게 한다(12). 첫 번째 치료 후에도 박멸되지 않고 여전히 감염되어 잔존하는 *H. pylori*에 대한 적합한 치료는 배양 및 항생제 감수성 시험을 병행하는 내시경 검사가 추천되

고 있다(3). 새로운 clarithromycin에 대한 내성을 가진 *H. pylori*가 어느 정도로 만연되어 있고 소화기 궤양 환자의 치료를 어느 정도로 어렵게 하는지는 불명확하지만 clarithromycin에 대한 내성을 가진 *H. pylori*의 만연도가 1.7% (17)에서 23.4% (16)로 증가하고 있다.

본 연구는 첫 번째로, 치료 전과 후에, *H. pylori*에 감염된 소화기 궤양 환자들로부터 분리한 *H. pylori* 균주에서 clarithromycin 내성의 기전과 이환율(prevalence)을 분석하였다. 두 번째로, 환자들에 감염되어 있는 *H. pylori*의 박멸에 미치는 clarithromycin 내성의 영향과 *H. pylori*에 감염된 소화기 궤양 환자들에게 적당한 치료법을 선택하기 전에 실시하는 위생검배양(gastric biopsy culture)을 이용한 항생제 감수성 시험의 유용성을 재평가 하였다. 모든 환자들의 CagA 발현 양상은 clarithromycin 내성만의 효과를 고찰하기 위해서 조사하였다.

재료 및 방법

환자의 선별

2000년 1월부터 2002년 3월까지 단국대학교 병원에서 위장 내시경 검사를 통해 소화불량 증상을 겪고 있는 114명의 환자들을 연구대상으로 하였다. 모든 환자들로부터 동의를 받았고, 환자들에 대한 세부적인 사항은 Table 1과 같다. 조직학적 검사(histology), rapid urease test(RUT), *H. pylori*의 26-kDa 세포 표면 항원(SSA) 유전자의 탐색, 그리고 분리된 *H. pylori*의 배양

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: (031) 330-6195, Fax: (031) 335-8249
E-mail: sangheele@mjju.ac.kr

Table 1. Details of 114 patients referred for endoscopy

Characteristic ^a	No. of patients	Percentage of patients
Age, years		
≤30	27	23.7
31-40	29	25.4
41-50	30	26.3
>50	28	24.6
Gender		
Male	63	55.3
Female	51	44.7
Indications for endoscopy		
Duodenal ulcer	64	56.1
Gastric ulcer	50	43.9
RUT	114 (positive)	100
PCR		
SSA	114 (positive)	100
	59 (positive)	51.8
<i>cagA</i>	55 (negative)	48.2

^aAbbreviations: RUT, rapid urease test for *Helicobacter pylori* detection; SSA, 26-kDa cell surface antigen gene of *H. pylori*; *cagA*, cytotoxin-associated gene encoding the virulence factor of *H. pylori*.

을 통해 위 또는 십이지장에 *H. pylori*의 감염 여부를 판단하였다.

모든 환자는 내시경 검사를 받았고 생검(biopsy)을 시료로 이용하여 RUT (CLO test, Delta West Pty Ltd., Bentley, Western Australia, Australia), 조직학적 검사 및 배양을 실시하였다. 조직학적 검사를 위해, 생검 조직을 중성의 포르말린(fomalin)에서 고정시키고 파라핀(paraffin)에 담가놓았다. Giemsa (Giemsa concentration, Difco Laboratories, Detroit, Mi., USA)와 hematoxylin-eosin으로 염색 하여 *H. pylori*를 검출 하였다.

환자의 선별 시 제외기준은 다음과 같다. 18세 이하와 90세 이상의 연령인 환자; 본 연구가 시작된 시기보다 8주 전에 PPIs (omeprazole, lansoprazole, pantoprazole), H₂-blockers (cimetidine, ranitidine, nizatidine, famotidine, roxatidine) 그리고 항생제 (clarithromycin, metronidazole, amoxicillin)로 치료받은 환자; 위장의 악성종양인 환자; 심각한 다른 질병을 동반하는 환자; 알러

지(allergy)의 병력이 있는 환자; 위의 외과수술을 받은 환자; 임신 중 이거나 수유기(lactation)인 환자; 알코올 중독 및 약물중독인 환자; corticosteroid 또는 비스테로이드(non-steroid) 계열의 항염증제를 상습적으로 사용하는 환자는 실험 대상에서 제외하였다.

미생물학적 연구방법

내시경 검사를 하는 동안 생검 조직으로부터 114개의 *H. pylori*를 분리 및 배양하였다. 위 전정부(antrum)의 생검 시료는 선택배지(*Helicobacter* selective agar plus 7% defibrinated horse blood, Becton Dickinson, Cockeysville, Md., USA)에서 배양되었다. 배양 plate는 100% 상대습도와 microaerobic 상태(Campy Pak Plus, BBL, Becton Dickinson)에서 37°C 5~7일 동안 배양되었다. 분리된 균주는 Brucella broth(Difco Laboratories, Detroit, Mi., USA)에 배양하여 -70°C에 보관하였다. Amoxicillin(Sigma, St. Louis, Mo., USA)과 clarithromycin(Abbott Laboratories, Queensborough, UK)의 최소저해농도 (MIC) 측정은 E-test (AB Biodisk, Uppsala, Sweden)에 의해서 이루어졌다. 현탁액은 McFarland no. 2의 혼탁도(turbidity)가 되게 조정하였다. MIC 측정용 plate는 37°C에서 미호기성(microaerobic) 상태로 72시간 동안 배양되었다. 분리된 균주는 MIC값이 amoxicillin인 경우는 0.5 µg/ml, clarithromycin인 경우는 1.0 µg/ml 이상이던 두 항생제에 대해서 내성을 가지는 것으로 판단하였다(8). *H. pylori* ATCC 43504는 MIC 측정을 위한 대조구로 사용되었다. *H. pylori* 감염 여부의 진단은, Mikula (7) 등의 방법으로써, 분리된 균주의 게놈(genome) DNA를 주형(template)으로 사용하여 *H. pylori*의 SSA 유전자를 증폭하는 PCR (polymerase chain reaction) 증폭법을 사용하였고, 사용된 primer는 Table 2와 같다. 분리된 *H. pylori*로부터 *cagA* gene와 CagA protein의 검출은 새롭게 고안된 primer (Table 2)를 이용하는 PCR 증폭법(23)과 Western blot kit인 Helicoblot 2.0 (Genelabs, Singapore, Republic of Singapore)에 의해 수행되었다.

Clarithromycin 내성 기전 분석

*H. pylori*의 23S rRNA 유전자에 형성되는 A2142G와 A2143G 돌연변이가 clarithromycin 내성의 기전으로 보고 되었다(20).

Table 2. Nucleotide sequences of the oligonucleotides used for PCR amplifications and DNA sequencing

Primer (orientation) ^a	Sequence (5' → 3')	Position	Amplicon size (bp)
SSA-F ^b (F)	TGGCGTGTCTATTGACAGCGAG	220	303
SSA-R ^b (R)	CCTGCTGGGCATACTTCACCAT	522	(SSA-F/-R) ^c
CagA-F ^c (F)	AGTAAGGAGAAACAATG	14824	1320
CagA-R ^c (R)	AATAAGCCTTAGAGTCTTTTTGGAAAT	16143	(CagA-F/-R)
Cla-F ^d (F)	AGTATTCTAAGGCGCGTGAAAG	1743	1204
Cla-R ^d (R)	GACCTGCATGAATGGCGTAAC	2946	(Cla-F/-R)

^aOrientation of each primer: F, forward; R, reverse.

^bDesigned according to the sequence of 26-kDa cell surface antigen gene (SSA; GenBank accession no. M55507) from *H. pylori*.

^cDesigned according to the sequence of cytotoxin-associated gene A (*cagA*; GenBank accession no. AF282853) from *H. pylori*.

^dDesigned according to the sequences of *H. pylori* 23S rRNA gene (GenBank accession no. U27270) associated with clarithromycin (Cla) resistance.

^ePrimer pair for PCR amplification.

23S rRNA 유전자의 점 돌연변이(point mutation)는 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)에 의해 분석했다. *H. pylori*로부터 Wizard genomic DNA purification kit에 의해 분리된 게놈 DNA를 주형(template) DNA로 사용하였으며, 고안된 primer (Table 2)로 PCR증폭 하였다. 1024 bp의 증폭된 DNA조각은 *Mbo*II 와 *Bsa*I 제한효소를 이용하여 A2142G와 A2143G 돌연변이를 각각 검출하였다. PCR 증폭 산물은 자동 DNA 서열 분석기(automated DNA sequencer, ABI PRISM3100, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)를 사용하여 양쪽 가닥의 DNA 서열을 직접 분석 하였다.

치료(treatment)와 치료 후 처리(follow-up)

본 연구의 대상인 모든 성인은 조직학 검사, 배양, RUT, *SSA* 유전자의 PCR 검출 방법을 이용하여 *H. pylori* 에 양성 반응을 나타내는지를 검사하였다. 대상 성인 환자들은 10일 동안 PPI인 omeprazole (20 mg twice a day [BID]), amoxicillin(1 g BID) 및 clarithromycin (500 mg BID)을 투여하였다. 치료가 끝나고 6주 후에, 임상적 증상을 검사하였고 내시경 검사를 수행하면서 얻은 생체조직을 이용하여 조직학적 검사, 세균학적 검사, 생화학적 검사 그리고 분자생물학적 검사를 수행하였다. 상기 4가지 검사에 음성이면 *H. pylori*가 박멸되었음을 의미한다.

통계학적 분석

통계학적 분석을 위해서 SPSS software(version 11.5 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 세균 박멸률의 그룹간 차이는 chi-square test(χ^2 test)에 의해 평가되었으며 *P* 값이 0.05이하이면 그룹간의 관련성이 의미 있다고 판단하였다.

결 과

소화기 궤양 환자에 감염된 *H. pylori*의 특성

연구 대상 기준에 적합한 총 114명의 환자들을 선택하였다. 총 114명 중 위궤양, 십이지장 궤양 환자는 각각 64명(56.1%)과 50명(43.9%)이었다(Table 1 및 Fig. 1B). Rapid urease test (RUT)와 *SSA* 유전자의 PCR증폭에 관한 실험 결과에 의하면 모든 환자들은 *H. pylori*에 감염된 것으로 나타났다(Table 1 및 Fig. 1A). *cagA* 유전자의 PCR증폭 실험 결과에 의하면 114명의 환자들 중 59명의 환자들(51.8%)이 *cagA*-양성 (table 1)이고 *cagA*-양성인 모든 *H. pylori*는 CagA 단백질(128 kDa, Fig. 1C)을 발현시켰다. CagA-양성 환자 59명중 42명(71.2%)의 환자와 CagA-음성 환자들 55명중 41명(74.5%)의 환자에서 *H. pylori*가 박멸(eradication)되었다(*P* = 0.1).

Clarithromycin 내성 현황

치료 전과 후에 분리된 clarithromycin 내성(MIC > 1.0 µg/ml)인 *H. pylori*는 114명의 환자중 23명(20.2%)에서 검출되었고, 분리된 모든 *H. pylori*는 amoxicillin (MIC<0.5 µg/ml)에 감수성

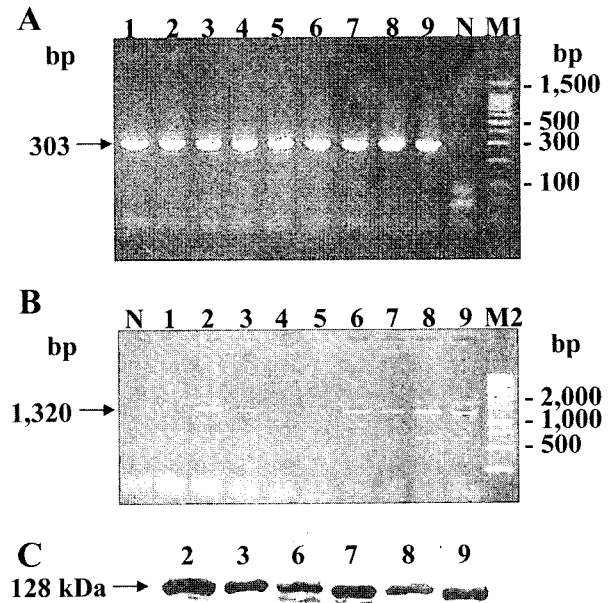


Fig. 1. Representative electrophoresis of *SSA* (A) and *cagA* (B) gene PCR products and Western blot analysis (C) of CagA protein expression. Lane M1 and M2, molecular weight marker 100-bp and 1-kb DNA ladder, respectively; lane N: negative control (distilled water); lanes 1-3: three isolates of *H. pylori* A2143G mutants; lanes 4-6: three representative isolates among *H. pylori* wild-type; lanes 7-9: three representative isolates among *H. pylori* A2142G mutants. CagA protein was expressed in all *cagA* gene-positive isolates (lanes 2, 3, and 6-9 of Fig. 1B).

을 나타내었다(Table 3). 이태리, 미국 및 캐나다 예에서도 amoxicillin에 대한 내성이 매우 드물게 나타났다(16). 1차 내성률(primary resistance rate)은 20.2%이고, 2차 내성률(3제 요법이 실패한 환자에서 분리한 *H. pylori*의 내성률)은 100%였다. 나이, 성별, 위궤양 또는 십이지장 궤양의 존재와 clarithromycin 내성 사이의 상호관계는 나타나지 않았다.

Clarithromycin 내성 기전

모든 *H. pylori*의 23S rRNA 유전자 돌연변이의 분석은 PCR-RFLP 방법에 의해서 수행되었다(Fig. 2). *Mbo*II에 의해 완전히 절단된 A2142G 돌연변이는 clarithromycin에 내성인 23개의 *H. pylori* 중 20개(87.0%)에서 검출되었다. *Bsa*I에 의해 완전히 절단된 A2143G 돌연변이는 clarithromycin에 내성인 23개의 *H. pylori* 중 3개(13.0%)에서 검출되었다(Table 3). 이러한 결과들은 모든 PCR 산물(amplicons)의 DNA 서열 분석에 의하여 확증되었다. A2142G 돌연변이인 *H. pylori*의 clarithromycin에 대한 MIC값(256 µg/ml)은 A2143G 돌연변이인 *H. pylori*의 MIC값(16 µg/ml)보다 더 높았다(*P* = 0.001).

Clarithromycin 내성과 *H. pylori* 박멸간의 연관성

Clarithromycin에 내성인 *H. pylori*에 감염된 환자에서는 *H. pylori*가 박멸(eradication)되지 않았으나 clarithromycin에 감수성

Table 3. The relationship between A-to-G mutations of clarithromycin-resistant *H. pylori* isolates and the failed eradication after clarithromycin-based therapy against 114 patients suffering gastric or duodenal ulcer

Isolate ^a (No.)	No. of patients ^b (%)	No. of eradication failure (%)	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^b	
			Amoxicillin	Clarithromycin
Wild-type (91)	91 (79.83)	0 (0.00)	0.016-0.063 (S)	0.031-0.125 (S)
A2142G (20)	20 (17.54)	20 ^c (17.54)	0.031-0.125 (S)	32->256 (R)
A2143G (3)	3 (2.63)	3 ^c (2.63)	0.016-0.125 (S)	4-128 (R)

^aSequence and PCR-RFLP analyses of the 23S rRNA gene from each *H. pylori* isolated from each patient revealed mutations (A → G) at residues 2142 and 2143.

^bResults presented for each isolate before treatment are same as those after treatment.

^c $P = 0.0001$ compared to wild-type group.

Abbreviations: S, susceptible; R, resistant.

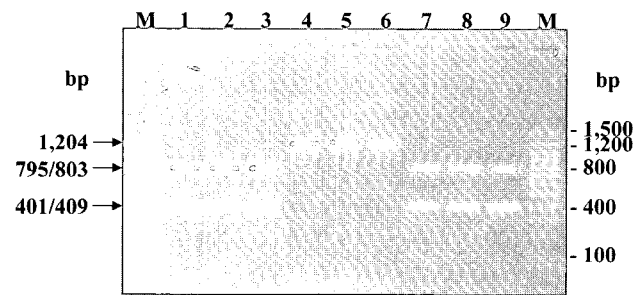


Fig. 2. *MbolI* and *BsaI* restriction analysis of 1,204-bp amplicons from 23S rRNA gene. Lane M, molecular weight marker 100-bp DNA ladder; lanes 1-3: the *BsaI*-digestion products of three *H. pylori* A2143G mutants with two clearly distinguishable bands of 401 and 803 bp; lanes 4-6: the *MbolI/BsaI*-digestion products of three representative isolates among *H. pylori* wild-type showing one band of 1,204 bp with no cleavage; lanes 7-9: the *MbolI*-digestion products of three representative isolates among *H. pylori* A2142G mutants showing two fragments, respectively of 409 and 795 bp.

인 *H. pylori*에 감염된 환자에서만 박멸(eradication)되었다. Clarithromycin에 감수성인 *H. pylori* 감염 환자에서의 박멸률은 100%이고 clarithromycin 비감수성과 감수성을 모두 합한 경우의 박멸률은 79.8%이었다.

박멸률은 79.8%였다(Table 3). A2142G 돌연변이 그룹과 A2143G 돌연변이 그룹에서의 *H. pylori*의 박멸 실패율(eradication failure rate)은 각각 100%였다($P = 0.001$).

고 찰

본 연구는 한국에서 clarithromycin에 내성인 경우는 *H. pylori*를 박멸하기 위한 치료제로는 clarithromycin가 부적합하다는 것과 *H. pylori*에 감염되어 소화기 궤양의 증상이 있는 환자를 치료하기 전에, 우선적으로 실시하는, 생검에서 배양된 *H. pylori*의 항생제 감수성시험의 필요성을 재확인하였다. 본 연구에서 밝혀진 clarithromycin에 대한 내성의 빈도(incidence)는 북동 이탈리아(1.8%)(11), 네덜란드(1.7%)(17) 그리고 독일(3.3%)(22)보다는 높았지만 중부 이탈리아(23.4%)(16)에서 보고된 것과 비슷하였다. Clarithromycin을 사용하는 3제 요법(triple therapy)을 수행하기

전의 clarithromycin에 대한 내성 빈도와 3제 요법을 수행한 후의 clarithromycin에 대한 내성 빈도는 동일하였다. 이는 3제 요법의 실시로 인하여 내성이 획득되지 않았음을 의미하며 이탈리아에서의 보고와 유사하였다(5).

Clarithromycin에 대한 *H. pylori*의 내성은 23S rRNA 유전자에서 A2142G와 A2143G의 염기전위 돌연변이(transition mutation)가 발생하여 리보솜(ribosome)에 clarithromycin이 결합하는 정도의 감소에 기인한다. 몇 연구자들은 가장 중요한 clarithromycin에 대한 1차 내성(primary resistance) 기전이 A2143G 돌연변이임을 최근 보고하였다(18). 그러나 본 연구에서는 A2142G 돌연변이가 1차 내성의 중요한 기전이었다. *H. pylori* 게놈(genome)은 높은 유전적 다양성(genetic variability)을 나타내기 때문에(14) 한국에서의 clarithromycin에 대한 1차 내성 기전은 서양의 경우와는 다른 양상을 나타내었다. A2142G 돌연변이인 *H. pylori*의 clarithromycin에 대한 MIC 값은 A2143G 돌연변이인 *H. pylori*의 경우보다 더 높으며 이런 결과는 Versalovic 등(19)에 의해 보고된 내용과 일치하였다.

Clarithromycin에 대해 내성인 경우는 치료의 실패율이 100%였다(*H. pylori*의 박멸률은 0%). 본 연구 결과와는 대조적으로, 다른 보고(2)에서는 평균 55%였다(*H. pylori*의 박멸률은 45%). Clarithromycin에 대한 높은 수준의 내성인 경우는, Graham 등(4)이 이미 보고 한 바와 같이, clarithromycin 투여의 양을 늘리거나 또는 치료기간을 연장하는 것으로는 해결 될 수 없다. 따라서, 치료약에 대한 내성문제가 없이, *H. pylori* 감염을 치료하고 억제 또는 예방하는 넓은 의미의 새로운 치료법을 찾아내는 것이 중요하다. 우리는 이 전에 *H. pylori* 감염에 대한 항생제 치료(antibiotic treatment)를 대신할 수 있는 제란의 난황을 이용한 *H. pylori* 항체(IgY-HP)에 대해서 보고하였다(13). *H. pylori*가 인간의 위암 세포주(cell line)인 AGS에 부착하는 정도가 IgY-HP에 의해 분명하게 감소하였다. Mongolian gerbil 모델에서 *H. pylori*에 감염된 위염 발생균은 IgY-HP를 경구 투입할 시에 성공적으로 치료되었다(13). 항생제 치료의 실패 시에는 즉각적인 내시경 검사, *H. pylori* 배양 그리고 항생제 감수성 시험을 수행하여야 한다. 재치료(retreatment) 시에는 내성이 획득된 항생제는 사용할 수 없다. 많은 연구자들은 재치료의 어려움과 제일 효과적인 1차 치료법의 중요함을 보고하였다(5). *H. pylori* 박멸률은 항생제 감수성시험의 결과를 토대로 항생제 치료법을 수행하였을 때 주목

할 만하게 향상 되었다(다른 보고(15)에서는 17%의 향상 그리고 우리의 예비 결과에서는 18%의 향상을 보임).

본 연구에서는 clarithromycin-감수성인 *H. pylori*에 감염된 환자와 clarithromycin-내성인 *H. pylori*에 감염된 환자들 간의 *H. pylori* 박멸률은 현저하게 차이가 확인되었다. 이런 결과는, 양쪽 그룹에서 CagA의 발현 양상이 유사한 이유로, 병원성(pathogenicity)의 차이에 기인하지는 않는 것으로 판단된다. 우리는 또한 *H. pylori*에 감염된 환자를 치료 시 clarithromycin이 포함된 3제 요법을 선택하기 전에 실시하는 생검 배양(biopsy culture)의 항생제 감수성시험의 필요성을 재확인하였으며 항생제 감수성시험 결과로부터 clarithromycin의 1차 내성(primary resistance)이 높은 빈도로 나타남을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Debets-Ossenknopp, Y.J., A.J. Herscheid, R.G. Pot, E.J. Kuipers, J.G. Kusters, and C.M. Vandenbroucke-Grauls. 1999. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and trovafloxacin in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 511-515.
2. Dore, M.P., G. Leandro, G. Realdi, A.R. Sepulveda, and D.Y. Graham. 2000. Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy. *Dig. Dis. Sci.* 45, 68-76.
3. Drumm, B.S., S. Koletzko, and G. Oderda, on behalf of the European Pediatric Task Force on *Helicobacter pylori*. 2001. *Helicobacter pylori* infection in children: a consensus statement. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30, 207-213.
4. Graham, D.Y. and W.A. Qureshi. 2000. Antibiotic-resistant *H. pylori* infection and its treatment. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1537-1544.
5. Kalach, N., P.H. Benhamou, F. Campeotto, M. Bergeret, C. Dupont, and J. Raymond. 2001. Clarithromycin resistance and eradication of *Helicobacter pylori* in children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2134-2135.
6. Kim, J.H., H.Y. Kim, N.Y. Kim, S.W. Kim, J.G. Kim, J.J. Kim, J.K. Seo, J.G. Sim, I.H. Roe, H.S. Ahn, B.C. Yoon, S.W. Lee, Y.C. Lee, I.S. Chung, H.Y. Jung, W.S. Hong, and K.W. Choi. 2000. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic people in Korea. *Kor. J. Med.* 59, 388-397.
7. Mikula, M., A. Dzwonek, K. Jagusztyn-Krynicka, and J. Ostrowski. 2003. Quantitative detection for low levels of *Helicobacter pylori* infection in experimentally infected mice by real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 55, 351-359.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Ninth informational supplement M100-S9. Villanova, PA.
9. NIH Consensus Conference. 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *J. Am. Med. Assoc.* 272, 65-69.
10. Parsonnet, J., G.D. Friedman, D.P. Vandersteen, Y. Chang, J.H. Vogelman, N. Orentreich, and R.K. Sibley. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325, 1127-1131.
11. Pilotto, A., M. Rasso, G. Leandro, M. Franceschi, and F. Di Mario. 2000. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Northeast Italy: a multicentre study. *Dig. Liver Dis.* 32, 763-768.
12. Raymond, J., N. Kalach, M. Bergeret, P.H. Benhamou, J.P. Barbet, Gendrel, and C. Dupont. 1998. Effect of metronidazole resistance on bacterial eradication of *Helicobacter pylori* in infected children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1334-1335.
13. Shin, J.-H., M. Yang, S.W. Nam, J.T. Kim, N.H. Myung, W.-G. Bang, and I.H. Roe. 2002. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1061-1066.
14. Taylor, D.E., M. Eaton, N. Chang, and S.M. Salama. 1992. Construction of *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J. Bacteriol.* 174, 6800-6806.
15. Toracchio, S., L. Cellini, D.I. Campi, G. Cappello, M.G. Malatesta, A. Ferri, A.F. Ciccaglione, L. Grossi, and L. Marzio. 2000. Role of antimicrobial susceptibility testing on efficacy of triple therapy in *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14, 1639-1643.
16. Toracchio, S. and L. Marzio. 2003. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in central Italy during the years 1998-2002. *Dig. Liver Dis.* 35, 541-545.
17. Tucci, A., O. Varoli, R. Corinaldesi, V. Stanghellini, S. Gasperoni, G.F. Paparo, M. Ricci-Maccarini, M. La Placa, and L. Barbara. 1993. Evaluation of *Helicobacter pylori* sensitivity to amoxicillin and metronidazole in dyspeptic patients. *Ital. J. Gastroenterol.* 25, 65-67.
18. van Doorn, L.-J., Y. Glupczynski, J.G. Kusters, F. Mégraud, P. Midolo, N. Maggi-Solcà, D.M.M. Queiroz, N. Nouhan, E. Stet, and W.G.V. Quint. 2001. 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.* 45, 1500-1504.
19. Versalovic, J., M.S. Osato, K. Spakovsky, M.P. Dore, R. Reddy, G.G. Stone, D. Shortridge, R.K. Flamm, S.K. Tanaka, and D.Y. Graham. 1997. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 283-286.
20. Wang, G.E., M.S. Rahman, M.Z. Humayun, and D.E. Raylor. Multiplex sequence analysis demonstrates the competitive growth advantage of the A-to-G mutants of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 683-685.
21. Warren, J.R. and B.J. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1, 1273-1275.
22. Wolle, K., M. Nilius, A. Leodolter, W.A. Muller, P. Malfertheiner, and W. Koning. 1998. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to several antimicrobial agents in a region of Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 519-521.
23. Xiang, Z., S. Censini, P.F. Bsyeli, Y. Chang, J.H. Vogelman, N. Orentreich, and R.K. Sibley. 1995. Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* 63, 94-98.

(Received July 1, 2005/Accepted August 19, 2005)

ABSTRACT: Relationship between Eradication of *Helicobacter pylori* Infection and Clarithromycin Resistance

Seung Ghyu Sohn, Jong Hwa Lee¹, Jung Hun Lee, and Sang Hee Lee* (Department of Biological Sciences, Myongji University, San 38-2 Namdong, Yongin, Kyunggido, 449-728, Korea, ¹Research Center of Gastroenterology, College of Medicine, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea)

H. pylori strains were isolated from antral biopsies taken during upper endoscopy in 114 dyspeptic patients with no previous therapy against *H. pylori*. Rapid urease test, PCR amplification of *SSA* and *cagA* gene for *H. pylori* detection, and Western blot for CagA expression detection were performed. *H. pylori* infected patients were treated with omeprazole, clarithromycin (a macrolide), and amoxicillin. At 6 weeks after the discontinuation of therapy, the bacterial eradication rate was determined by endoscopy. The resistance rate to clarithromycin and amoxicillin was 20.2% and 0.0%, respectively. The clarithromycin resistance was mainly caused by the A2142G mutation in the 23S rRNA gene of *H. pylori*. MICs of clarithromycin for the A2142G mutant isolates were significantly higher than MICs for the A2143G mutant isolates. *H. pylori* eradication was obtained in all patients with clarithromycin-susceptible isolates but not in patients with clarithromycin-resistant isolates ($P = 0.0001$). These results did not appear to be biased by any differences in CagA expression. The resistance of *H. pylori* to clarithromycin included in the therapeutic regimens is the most important reason for treatment failure. *H. pylori* antimicrobial susceptibility testing of the gastric biopsy culture should be performed before choosing the first triple therapy in infected patients and the increase in prevalence of clarithromycin resistance in Korea was problematic.