

위조직에서 중합효소연쇄반응을 이용한 *Helicobacter Pylori* 감염의 진단

이화여자대학교 의과대학 임상병리과, 의과학연구소 분자생물학부
이 미 애

= Abstract =

Diagnosis of *Helicobacter Pylori* Infection using Polymerase Chain Reaction in Gastric Biopsy Specimens

Mi Ae Lee

*Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University and
Division of Molecular Biology, Ewha Medical Research Center*

Objectives : *Helicobacter pylori* infection is now recognized as a cause of chronic gastritis, peptic ulcer disease and is also a major risk factor for development of gastric carcinoma and gastric lymphoma. Several diagnostic methods of *H. pylori* infection, such as histopathology, Giemsa stain, culture, rapid urease test, urea breath test and serologic test have been used. Recently, the polymerase chain reaction (PCR) assay has provided a means of rapid and sensitive detection of *H. pylori*. This study aimed to evaluate PCR assay for the diagnosis of *H. pylori* infection.

Methods : I compared the PCR assay using the *ureC* gene specific for *H. pylori* with culture in gastric biopsy specimens from 30 chronic gastritis, 10 gastric ulcer and 41 duodenal ulcer patients and evaluated the positive rates of *H. pylori* according to the gastroduodenal diseases.

Results : Fifty-seven out of 81 (70%) patients were culture positive and 64 out of 81 (79%) patients were PCR positive. In seventy-two out of 81 patients, PCR was concordant with culture, but 8 patients had only positive-PCR and one patient had only positive-culture. Diagnostic sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and diagnostic efficiency of culture were 85%, 100%, 100%, 58% and 88%, respectively and those of PCR were 96%, 100%, 100%, 82% and 96%, respectively. The positive rates of *H. pylori* using PCR were 73%, 90% and 80% and those using culture were 63%, 90% and 71% in chronic gastritis, gastric ulcer and duodenal ulcer patients, respectively.

Conclusions : These findings suggest that the PCR assay using the *ureC* gene in gastric biopsy is more sensitive and rapid than culture and an effective test for the diagnosis of *H. pylori* infection.

KEY WORDS : *Helicobacter pylori* infection · Culture · PCR · *UreC* gene.

서 론

Helicobacter pylori (*H. pylori*)는 1983년 Warren과 Marshall¹⁾이 처음 분리한 이래 최근들어 만성위염 및 소화성궤양의 중요한 원인이며 위선암 및 위림프종 발생의 중요한 위험인자로 인식되고 있다^{2,4)}. 특히 십이지장궤양은 기존의 산분비 억제제로 치료하면 대부분 치유되나 재발이 흔하여 문제시되는데 *H. pylori*에 대한 박멸치료를 시행하면 재발을 현저히 억제할 수 있다고 한다^{2,4)}. 그러므로 이 균주를 보다 정확하고 예민하게 진단하는 방법이 요구된다. *H. pylori* 진단방법으로는 위내시경을 통한 위생검조직의 병리조직검사, Giemsa염색, 배양검사, rapid urease 검사, 요소호흡검사 및 혈청학적 검사^{2,4,6)}가 있으며 최근 분자생물학적 진단법의 개발로 chromosomal DNA, 16s RNA, urease유전자 등의 여러 가지 시발체(primer)를 이용한 PCR(polymerase chain reaction, 중합효소연쇄반응)⁷⁻¹⁰⁾이 도입되어 보다 빠르고 예민한 진단이 가능하게 되었다.

이에 저자는 위생검조직에서 *H. pylori*에 특이한 *ureC* 유전자를 시발체로 한 PCR을 시행하여 기존의 표준방법인 배양검사와 비교하여 *H. pylori* 진단에 유용성을 평가하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

1995년 12월부터 1996년 4월까지 본원 임상병리과에 *H. pylori* 배양검사가 의뢰된 81명의 환자를 대상으로 하여 위생검조직에서 *H. pylori*배양 및 PCR을 시행하였다. 대상 환자들은 위내시경과 병리조직학적 소견으로 진단된 만성위염 30명, 위궤양 10명 및 십이지장궤양 41명이었으며 남녀비는 52 : 29이었고 연령의 중앙값은 41세(범위 17~73세)이었다(Table 1).

2. 연구방법

1) 배양검사

위내시경 생검조직을 잘게 갈아서 blood agar plate 와 chocolate agar에 접종하고 Campy pouch(BBL, Becton Dickinson, USA)를 이용하여 미호기성 상태(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)로 37℃ 항온기에서 7일

Table 1. Clinical data of patients in this study

Median Age(years)	41(range 17 - 73)
Sex(M : F)	52 : 29
Diagnosis*	No.(%)
Chronic gastritis, only	30(37)
Gastric ulcer	10(12)
Duodenal ulcer	41(51)
Total	81(100)

*diagnosed by endoscopy or pathology

까지 배양한후 매일 육안 관찰하였다. 무색투명한 작은 물방울 모양의 특징적인 집락이 그람염색에서 그람음성의 만곡된 간균, oxidase, catalase 및 urease검사에 양성이면 *H. pylori*로 동정하였다.

2) PCR

(1) DNA 분리

PCR을 시행하기 위해 배양을 하고 남은 위생검 조직을 -70℃에 냉동 보관하였다. 위생검조직을 잘게 갈아서 50mM Tris pH 8.3 with 200µg/ml proteinase K용액 100µl에 부유시킨후 37℃ 수조에서 가볍게 흔들면서 하루밤 반응시켰다. 이를 5분간 끓인후 5분간 얼음에 넣은다음 12,000rpm, 5분간 원침시켜 상청액 10µl를 취하여 PCR에 사용하였다.

(2) PCR조건

Labigne 등¹¹⁾에 의해 클로닝된 *H. pylori*에 특이한 *ureC* 유전자를 시발체(5'-AAGCTTTTAGGGGTGT-TAGGGGTTT-3', 5'-AAGCCTTACTTTCTAAC AC-TAACGC-3')로 하였다. 반응액은 주형DNA 10µl, 증류수, 10x PCR buffer, 0.2mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.6µM 각 시발체, Taq polymerase 2.5U의 총 50µl로 하였다. PCR은 DNA Thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, CA, USA)를 사용하였으며 반응 온도 및 시간은 94℃에서 5분간 열처리후 denaturation은 94℃ 2분, annealing은 55℃ 2분, extension은 72℃ 2분간의 총 35회를 시행하였고, 마지막 extension은 72℃에서 7분간으로 연장하였다. 시료 DNA대신에 *H. pylori* DNA와 1xTE완충액을 각기 넣어 양성고 음성대조로 사용하였다.

(3) 전기영동

PCR을 실시한 후 반응산물 10µl를 취하여 전기영동 완충액 1µl과 섞은 다음 ethidium bromide가 함유된

2% NuSieve 3:1 agarose gel(FMC BioProducts, USA)에 10 μ l씩 가하여 100V의 직류로 30분간 전기영동시킨후 UV transilluminator(Spectroline TVC-312A, Spectronics Cor., NY, USA)와 폴라로이드 카메라로 사진촬영하였다. 이때 증폭된 DNA는 DNA molecular marker VI(Boehringer-Mannheim, Germany)와 비교하여 294bp band가 확인되면 PCR양성으로 하였다(Fig. 1).

3) 결과 분석

H. pylori 배양 및 PCR의 진단적 예민도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도 및 진단적 효율성을 구하고 이에 따른 임상적 유용성을 평가하였고 질환에 따른 *H. pylori* 양성율을 조사하였다.

결 과

1. *H. pylori* 감염 진단에 있어서 배양검사와 PCR 비교

총 81명의 환자중 57명(70%)에서 배양 양성이었으며 PCR양성은 64명으로 79%를 차지하였다. 72명에서 PCR과 배양결과가 일치하여 89%의 일치율을 보였으며 8명에서는 PCR만 양성이었으며 1명은 배양에서만 양성으로 나타났다(Table 2). 총 81명 환자는 조직학적, 혈청학적(anti-Helicobacter Ab), rapid urease 검사, 배양검사결과에 의해 *H. pylori* 감염양성 67명이었고 14명은 음성이었는 데 이에 따른 진단적 예민도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도 및 진단적 효율성을 보면 배양은 각각 85%, 100%, 100%, 58% 및 88%이었고 PCR은 각각 96%, 100%, 100%, 82% 및 96%이었다(Table 3).

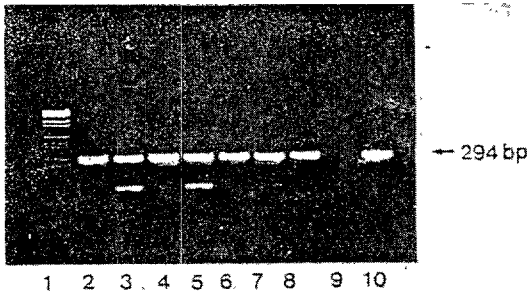


Fig. 1. The PCR results by amplification of the *ureC* gene specific for *H. pylori* in gastric biopsy specimens. Lanes : 1, DNA Molecular-Weight Marker VI ; 2-8, positive results ; 9, negative control(D/W) ; 10, positive control(*H. pylori* DNA).

2. 질환에 따른 *H. pylori* 양성율

질환에 따른 *H. pylori* 양성율을 보면 PCR은 만성위염 73%(22/30), 위궤양 90%(9/10) 및 십이지장궤양 환자의 80%(33/41)이었으며 배양은 만성위염 63%(19/30), 위궤양 90%(9/10) 및 십이지장궤양 환자의 71%(29/41)이었다(Table 4).

고 찰

만성 위염, 위 및 십이지장궤양의 가장 중요한 원인균인 *H. pylori*의 진단방법에는 크게 위내시경을 이용한 침습적 방법과 비침습적 방법이 있는데 침습적 방법으로는 위생검조직의 병리조직학적 검사, Giemsa 염색, 배양

Table 2. Comparison of PCR with culture for the diagnosis of *H. pylori* infection

Culture	PCR	No.(%) of Cases	
+	+	56	(69)
-	-	16*	(20)
+	-	1**	(1)
-	+	8***	(10)
Total		81	(100)

* : 2 cases of false negative PCR & culture

** : 1 case of false negative PCR

*** : 8 cases of false negative culture

Table 3. Comparison of sensitivity and specificity between culture and PCR for the diagnosis of *H. pylori*

	Culture	PCR
Sensitivity(%)	57/67* (85)	64/67* (96)
Specificity(%)	14/14** (100)	14/14** (100)
Positive predictive value(%)	57/57 (100)	64/64 (100)
Negative predictive value(%)	14/24 (58)	14/17 (82)
Diagnostic efficiency(%)	71/81 (88)	78/81 (96)

*Total 67 positive cases of *H. pylori* infection by pathology, rapid urease test(CLO test), anti-Helicobacter antibody, culture and PCR

**Total 14 negative cases of *H. pylori* infection by pathology, rapid urease test(CLO test), anti-Helicobacter antibody, culture and PCR

Table 4. Positive rates of *H. pylori* using culture and PCR according to the gastroduodenal diseases

Gastroduodenal disease	Total No.	Positive No.(%) of	
		Culture	PCR
Chronic gastriti	30	19(63)	22(73)
Gastric ulcer	10	9(90)	9(90)
Duodenal ulcer	41	29(71)	33(80)
Total	81	57(70)	64(79)

검사, rapid urease 검사가 있고 비침습적 방법으로는 요소호흡검사 및 혈청학적 검사가 있다²⁴⁻⁶⁾. 이중 특이도가 높은 검사로는 배양과 조직학적 염색검사이지만 염색은 *H. pylori*와 비슷한 균주에 의해 위양성을 보일수 있으며¹²⁾ 배양은 시간이 오래 걸리고 예민도가 다소 떨어지는 것으로 알려졌다⁷⁾. 생검조직을 urea포함된 배지에 넣어 urease생성 균주에 의해 urea가 분해되어 pH변화에 의해 검출하는 CLO test 등과 같은 rapid urease 검사가 신속한 검사법으로 개발되었으나 예민도 및 특이도가 배양에 비해 낮은 것이 문제점이다⁴⁷⁾¹⁰⁾.

이에 신속하고 예민한 검사법의 개발이 요구되고 있는데 최근 분자생물학적 진단법의 개발로 *H. pylori*감염 진단에도 신속하고 예민한 방법인 PCR이 응용되고 있다. *H. pylori* 위한 PCR의 시발체로는 chromosomal DNA, 16s RNA 및 urease유전자 등이 이용되고있는데 Valentine 등¹³⁾은 chromosomal DNA를 이용한 PCR을 기술하였고 1994년 Fabre 등⁷⁾에 의하면 위생검조직에서 이를 이용한 진단방법이 rapid urease 검사인 CLO test, 배양 및 조직학적검사가 43~50%양성율을 보인데 비해 53%의 양성율을 보여 가장 예민하고 특이도가 높은 방법이라고 하였다. 그후 16s rRNA를 이용한 PCR은 Ho 등⁹⁾ 및 Peek 등¹⁴⁾에 의해 시행되어 예민한 방법으로 기술하였다. 또한 *H. pylori*의 중요한 병인으로 생각되는 urease는 *H. pylori*균주가 위내의 강산성에서 생존할 수 있도록 작용하여 전지근거가 가능하도록 하고 H⁺을 역확산하거나 gastrin생성을 자극하여 위점막의 산성을 증진시킨다고 하였고 urease에 의해 가수분해되어 생성되는 암모니아가 위상피세포에 세포독소로 작용할 수 있다고 하는데 Labigne 등¹¹⁾에 의해 이유전자가 클로닝되어 *H. pylori* 진단에 이용되고 있다. Lage 등¹⁰⁾이 ureC유전자를 이용한 PCR을 시행한 결과에 의하면 예민도는 *H. pylori* 두균주에 해당된다고 하였으며 *H. pylori*이외의 *Helicobacter* species, *Campylobacter* species 및 다른 urease양성 세균들에서는 모두 음성으로 나타나서 특이도가 매우 높다고 하였으며 배양음성이고 PCR양성인 예가 총 62예 중 2예에서 나타났는데 이들은 다른 방법에 의해서 *H. pylori*감염으로 진단되어 배양 위음성이었다고 했다. 이에 저자는 이시발체를 이용하여 조직생검에서 직접 PCR 시행하여 배양과 비교하였는데 배양과 PCR결과의 불일치를 보였던 경우중 8예에서 PCR양성이고 배양음성으로 다른 연구자들보다 배양의

위음성이 많았던 것은 본 환자들이 항균제를 투여받고 있어서 배양에서 위음성으로 나타났거나 PCR에서 소수의 균주도 검출가능할 정도로 예민하였기 때문으로 생각된다. 1예는 PCR음성이고 배양양성으로 PCR의 위음성을 보였는데 이는 아마도 PCR에 대한 저해제에 의해 위음성을 보였던 것으로 생각된다. 전체적인 PCR 예민도가 96%로 배양 85%에 비해 보다 높았고 진단적 효율성도 배양 88%에 비해 PCR 96%로 높게 나타나서 PCR이 *H. pylori* 감염의 효과적인 진단방법으로 이용될 수 있다고 생각된다. 최근 *H. pylori*의 병인과 관련된 유전자들이 알려지고 있는데 이중 *cagA* 유전자¹⁵⁾(cytotoxin-associated antigen)는 96~138kDa의 단백질을 생성하는 유전자로 공포형성 독소 생성과 관련되어 있으며 *vacA*유전자¹⁶⁾(vacuolating cytotoxin) 등은 일부 균주에서만 표현되어 이들이 세포독성과 관련있다고 보고되고 있어 추후 진단뿐만아니라 독력표지자로서 이들 유전자를 이용한 PCR에 대한 연구가 필요하다 하겠다.

질환에 따른 *H. pylori*에 대한 감염률을 보면 십이지장궤양 및 위염의 거의 100% 및 위궤양의 80%에서⁴⁾¹⁷⁻¹⁸⁾ 관련된다고 알려져 있으며 국내에서는 서구보다 다소 낮아 십이지장궤양의 73~82%¹⁹⁻²¹⁾, 위궤양의 56%와 만성활동성위염 91% 및 위염의 38%¹⁹⁾로 보고되었다. 본 연구에서는 배양에 의한 *H. pylori*양성율이 십이지장궤양의 71% 및 만성위염의 63%보다 PCR에 의한 양성율이 위 및 십이지장궤양의 80~90%, 만성위염의 73%로 높았으며 다른 국내 연구보다 다소 높게 나타났다. 이는 국내연구가 주로 CLO test, 배양, 혈청학적 진단방법에 의한 *H. pylori* 감염율이 주로 연구되었기 때문으로 생각된다. Lage 등¹⁰⁾이 PCR에 의해 십이지장궤양의 100% 및 위염의 96%에서 *H. pylori*양성이었다고 한 것보다는 본 연구에서 낮게 나타났는데 이는 다른 국내 연구들과 같이 인종간의 차이로 생각된다.

이상으로 위조직에서 *H. pylori*감염 진단에는 PCR이 기존의 배양보다 신속하고 예민하며 효율성이 높은 진단 방법이라 사료된다.

요 약

목 적:

현재 *Helicobacter pylori*감염은 만성위염과 소화성궤양의 원인이며 또한 위선암과 위림프종 발생의 중요한

위험인자로 인식되고 있다. *H. pylori* 감염의 진단방법으로는 위생검조직의 병리조직검사, Giemsa 염색, 배양 검사, rapid urease test, 요소호흡검사 및 혈청학적검사가 이용되고 있다. 최근 PCR법이 개발되어 신속하고 예민한 *H. pylori* 감염 진단이 가능하게 되었다. 이에 저자는 위조직에서 *H. pylori* 감염 진단을 위한 PCR법의 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

방 법:

1995년 12월부터 1996년 4월까지 본원 임상병리과에 *H. pylori* 배양검사가 의뢰된 81명의 환자(위염 30명, 위궤양 10명 및 십이지장궤양 환자 41명)의 위생검조직에서 *H. pylori* 균주에 특이한 *ureC* 유전자를 시발체로 한 PCR을 시행하여 기존의 배양검사와 비교하였으며 질환에 따른 *H. pylori* 양성율을 조사하였다.

결 과:

총 81명의 환자중 57명(70%)에서 배양양성이었으며 PCR양성은 64명(79%)을 차지하였다. 72명에서 PCR과 배양결과가 일치하였으며 8명에서는 PCR만 양성이었으며 1명은 배양만 양성으로 나타났다. 이들 방법의 진단적 예민도, 특이도, 양성예측도, 음성예측도 및 진단적 효율성을 보면 배양은 각각 85%, 100%, 100%, 58% 및 88%이었고 PCR은 각각 96%, 100%, 100%, 82% 및 96%이었다. 질환별로 *H. pylori* 양성율을 보면 PCR은 만성위염 73%, 위궤양 90% 및 십이지장궤양 환자의 80%이었으며 배양은 만성위염 63%, 위궤양 90% 및 십이지장궤양 환자의 71%이었다.

결 론:

이상으로 위조직에서 *H. pylori* 감염 진단에는 PCR법이 기존의 배양보다 신속하고 예민하고 효율성이 높은 방법으로 생각된다.

■ 감사의 글

본 연구를 함에 있어 검체수집에 도움을 주신 임상병리과 신진수선생님, 전공의김소영선생님, 박사신선생님과 최문희선생님께 감사드립니다.

References

1) Warren JR, Marshall B : *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet* 1983 ; i ; 1273-1275

2) Blaser MJ : *Helicobacter pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. J Infect Dis* 1990 ; 161 : 626-633

3) Crabtree JE, Wyatt JL, Sobala GM, Miller G, Tompkins DS, Primrose JN, Morgan AG : *Systemic and mucosal humoral response to Helicobacter pylori in gastric cancer. Gut* 1993 ; 34 : 1339-1343

4) Peterson WL : *Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. N Engl J Med* 1991 ; 324 : 1043-1048

5) Gray SF, Wyatt JL, Rathbone BJ : *Simplified techniques for identifying Campylobacter pyloridis. J Clin Microbiol* 1986 ; 39 : 1279

6) Graham DY, Evans DJ Jr, Alpert LC, Klein PD, Evans DG, Opekun AR, Boutton TW : *Campylobacter pylori detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. Lancet* 1987 ; 1 : 1174-1177

7) Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, et al : *Polymerase chain reaction assay for the detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens : comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. Gut* 1994 ; 35 : 905-908

8) Hammer M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Toole PW : *Rapid detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 54-58

9) Ho S, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, et al : *Direct polymerase chain reaction test for detection of Helicobacter pylori in humans and animals. J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 2543-2549

10) Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, Glupczynski Y : *Diagnosis of Helicobacter pylori infection by PCR : Comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2752-2756

11) Labigne A, Cussac V, Courcoux P : *Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity. J Bacteriol* 1991 ; 173 : 1920-1931

12) Dye KR, Marshall BJ, Frierson HF, Guerrant RL, McCallum RW : *Ultrastructure of another spiral organism associated with human gastritis. Dig Dis Sci* 1989 ; 34 : 1787-1791

13) Valentine JL, Athur RR, Mobley HLT, Dick JD :

- Detection of Helicobacter pylori by using the PCR. J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 689-695
- 14) Peek RM, Miller GG, Tham K, Perez-perz GI, Cover TL, Atherton JC, et al : *Detection of Helicobacter pylori gene expression in human gastric mucosa. J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 28-32
- 15) Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ : *Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori : evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun* 1993 ; 61 : 1799-1809
- 16) Phadnis SH, Bver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU : *Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of Helicobacter pylori. Infect Immun* 1994 ; 62 : 1557-1565
- 17) Marshall BJ : *Helicobacter pylori. Am J Gastroenterol* 1989 ; 89 : 116
- 18) Dooley CP, Fitzgibbons PL, Cohen H, Appleman MD, Perez-Perez GI, Blaser MJ : *revalence of Campylobacter pylori infection and histologic gastritis in asymptomatic persons-correlation with gastric and duodenal inflammation. N Engl J Med* 1989 ; 321 : 1562-1566
- 19) 홍기숙 · 김옥경 : 각종 위질환에서 위점막의 *Campylobacter pylori* 검출에 관한 연구. *한국생활과학연구원 논총* 1989 ; 43 : 149-162
- 20) Lee HR, Han KS, Yoo BC, Park SM : *Prevalence of Helicobacter pylori infection in patients with peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia. Korean J Intern Med* 1993 ; 8 : 73-77
- 21) 김도영 · 김성숙 : 십이지장궤양 환자에서 시행한 *Rapid urease test (CLO test)*의 임상적의의. *이화의대지* 1995 ; 18 : 375-381