

< Original Article >

국내 도축돈의 위병변과 *Helicobacter suis*의 검출과의 상관관계

이재하 · 이선규 · 한정희*

강원대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

Comparison of histopathological and molecular diagnostic methods in *Helicobacter suis* infection in Korea

Jae Ha Lee, Sun Gue Lee, Jeong Hee Han*

College of Veterinary Medicine and Institute of Veterinary Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

(Received 10 September 2018; revised 14 September 2018; accepted 16 September 2018)

Abstract

Helicobacter suis is a gram negative bacterium and colonizes in porcine stomach. It causes gastric diseases in the stomach and plays a significant role in daily weight gains in pigs. Recent studies about one of potential sources of human gastric diseases. Therefore, this study was conducted to compare histopathological lesions and molecular detection of *Helicobacter suis* in the pyloric mucosa of porcine stomachs transferred from slaughterhouses, based on gross and histological examinations and a PCR assay. A total 90 stomach samples were investigated to record gastric lesion scores by characteristic gastric lesions, followed by routine H & E and Warthin-Starry silver staining to detect Helicobacter-like organisms. For PCR assay, *H. suis* specific primers and conditions are used. Sixty-one samples (67.8%) showed gross gastric lesions, of which 38 samples (40.2%) presented grade 1, 12 samples (13.3%) presented grade 2, and 11 samples (12.2%) presented grade 3, respectively. In Warthin-Starry silver stain, Helicobacter-like organisms were detected from 11 samples (12.2%) with 4 samples (4.4%) for grade 0, 5 samples (5.6%) for grade 1, 1 sample (1.1%) for grade 2 and 1 sample (1.1%) for grade 3, respectively. The PCR resulted positive in 37 samples (41.1%) with 14 samples (15.6%) for grade 0, 14 samples (15.6%) for grade 1, 3 samples (3.3%) for grade 2 and 6 samples (6.7%) for grade 3, respectively. Positive samples for both examinations were 5 samples (5.6%). The result suggested that it should be considered as one of factors causing a gastric disease in pigs. Also, it could be acknowledged to research fundamental aspects of Helicobacter-induced gastritis in human as an animal model.

Key words : *Helicobacter suis*, Gastric gross lesion, Warthin-Starry silver stain, PCR

서 론

돼지 위병변은 스트레스, 사육환경 및 병원체 감염 요인들이 복합적으로 작용하여 나타난다. 최근 들어 사람에서와 같이 돼지에서도 *Helicobacter*가 돼지의 위에 병변을 일으킨다는 연구들이 진행되고 있다(De Groote 등, 1999; Zhang 등, 2016). *Helicobacter* (*H.*) *suis*는 그람 음성 균으로 돼지 위에 기생하는 인수공

통 병원체로 알려져 있으며, 전세계적으로 도축돈의 60%에서 검출되고 자돈보다 성돈에서 더 많은 감염률을 보인다(Hellemans 등, 2007). 돼지에서 *H. suis*를 실험적으로 감염시킨 연구 결과에 의하면 감염 돼지에서 일당증체율이 감소하고 위에 병변이 나타난다고 하였다(De Bruyne 등, 2012).

사람에서 *H. suis*는 non-*helicobacter pylori* helicobacter species (NHPH) 중에 가장 많이 존재한다(Van den Bulck 등, 2005). 돼지와 사람의 *H. suis*의 유전자 상동성을 비교한 결과 돼지에서 사람으로 전파되었다

*Corresponding author: Jeong Hee Han, Tel. +82-33-250-8657, Fax. +82-33-259-5625, E-mail. hanjh@kangwon.ac.kr

는 것이 확인되었고(Liang 등, 2013) 돼지와 관련된 직업을 가진 사람에서 더 높은 감염률을 보였으며 식육에서도 검출되었다(De Cooman 등, 2013; De Cooman 등, 2014). 사람의 위질환 모델에서 마우스에 인공감염시킨 경우 *H. suis*는 *H. pylori*와 비슷한 양상의 위병변을 보였으며, mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma에서 *H. pylori*보다 더 높은 위험성을 보였다(Morgner 등, 2000; Flahou 등, 2010; Flahou 등, 2012) 최근 idiopathic Parkinson (IP)'s disease에 걸린 사람들을 대상으로 한 연구 결과는 *H. suis*와의 연관되어 있을 가능성을 제시하였다(Blaecher 등, 2013).

*H. suis*가 돼지와 사람에 미칠 수 있는 영향에 대해 많은 연구가 진행되고 있지만 아직 확실한 병인론은 밝혀지지 않았다. 일부 연구에서는 *H. suis*와 위의 병변에 대한 연관성이 없다는 결론을 내리기도 하였다(Sapierzyński 등, 2011). 하지만 여러 감염 실험을 통한 연구로 점차 병인론이 밝혀지고 있으며 최근 연구에서 *H. suis*는 *H. pylori*보다 위의 벽세포에 친화성을 가져 위의 정상 pH의 항상성에 영향을 주어 주로 식도부점막에 병변을 일으킨다고 하였다(Zhang 등, 2016).

이러한 특성과 더불어 *H. suis*는 또한 인공 배양이 매우 까다롭기 때문에 진단을 위해 배양 대신 위의 점막 상피세포에서 조직학적 방법과 PCR을 이용하여 검출하기도 한다. 따라서 본 연구의 목적은 국내 도축장 도축돈의 위에 대한 병변의 병리학적 검사와 *H. suis*의 검출 빈도를 조사하고, 관찰된 위병변과 *H. suis*의 검출빈도와의 상관관계를 알아보는 것이며 더불어 사람의 *H. pylori*에 의한 위병변에 대한 동물모델로의 기초자료로 활용하기 위함이다.

재료 및 방법

공시동물

전라북도과 강원도에 위치한 도축장에서 도축돈의

Table 1. Gastric lesion score according to characteristic lesion (Kopinski et al, 2007)

Gastric lesion score	Gastric lesion
0	Normal
1	Parakeratosis
2	Erosion
3	Ulceration

위 총 90예를 대상으로 하였다. 위는 대만부를 따라 절개하였으며 내용물은 제거하였고, 조직학적 검사와 PCR 검사를 위해 위의 위저부 조직을 채취하였다. 조직학적 검사를 위해 채취한 위조직은 10% 중성 포르말린에 고정하였고, PCR 검사를 위한 위조직은 검사 전까지 -70°C 에서 보관하였다.

육안 검사

육안병변 검사는 Kopinski 등(2007)의 방법에 의해 돼지 위의 식도부 점막을 중심으로 관찰하였으며 위의 특징적인 육안 병변에 따라 0에서 3으로 등급을 정하였다(Table 1).

조직학적 검사

조직병리학적 검사를 위하여 고정된 위조직은 탈수한 뒤 파라핀 포매 과정을 거쳐 $4\ \mu\text{m}$ 로 박절하였다. 조직 절편은 hematoxylin and eosin (HE)염색과 Warthin-Starry 은염색을 시행하여 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)과 image analysis software (IMTi-Solution Inc, Burlington, Canada)로 검사하였다.

DNA 추출과 PCR 분석

채취한 위의 위저부 점막상피에서 DNA를 추출하였으며 교차 위험을 방지하기 위해 일회용 cell scraper를 사용하였다. 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 이용하였고 제조사에서 제시한 절차에 따라 진행하였다. PCR은 De Groot 등(2000)의 방법에 따라 *H. suis*에 특이적인 primers와 조건을 통해 T100 thermal cycler (Bio-Rad, USA)하에서 실시하였다(Table 2). Maxime PCR Premix (iNtRON, Korea)를 이용하여 총 20 ul 반응으로 2 ul의 DNA 추출물과 각각 2 pmol의 primer가 첨가되었다. PCR 산물은 ethi-

Table 2. *H. suis* specific primers and conditions (De Groot et al, 2000)

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Target gene	Size of amplified products
V832f	TIG GGA GGC TTT GTC TTT CCA	16S	433 bp
V1261r	GAT TAG CTC TGC CTC GCG GCT	rRNA	

dium bromide에 염색된 1.5% agar gel에 전기 영동한 후 UV light를 통해 확인하였다.

결 과

육안 소견

육안 소견상 정상인 위는 29예(32.2%)였으며 육안 병변이 관찰된 위는 61예(67.8%)였다. 육안병변 지수에 따른 육안병변 결과는 부전각화증(1)은 38예(42.2%), 미란(2)은 12예(13.3%), 3인 궤양(3)은 11예(12.2%)를 보였다(Table 3).

Table 3. Results of gastric lesion examination according to lesion score

Gastric lesion score	Number of pigs with gastric lesion(%)	
0	29 (32.2%)	29 (32.2%)
1	38 (42.2%)	61 (67.8%)
2	12 (13.3%)	
3	11 (12.2%)	

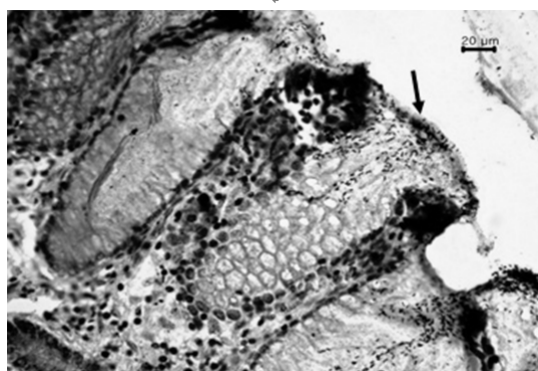


Fig. 1. Colonies of *Helicobacter*-like organisms (arrow) were showed in the surface of gastric mucosa of pigs. Warthin-Starry silver stain, Bar=20 μm.

Table 4. Results of positive reaction of *Helicobacter*-like organisms by Warthin-Starry stain

Gastric lesion score	Positive	Negative	Total
0	4 (4.4%)	25 (27.8%)	29
1	5 (5.6%)	33 (36.7%)	38
2	1 (1.1%)	11 (12.2%)	12
3	1 (1.1%)	10 (11.1%)	11
Total	11 (12.2%)	79 (87.8%)	90

조직학적 검사

Warthin-Starry 은염색(Fig. 1) 결과는 *Helicobacter*-like organisms은 11예(12.2%)에서 검출되었다. 육안병변 지수에서 정상 소견을 보인 위에서 4예(4.4%), 병변이 있는 위에서는 7예(7.8%)가 양성을 보였다. 육안병변 등급에 따른 결과는 부전각화증(1)은 5예(5.6%), 미란(2)은 1예(1.1%), 궤양(3)은 1예(1.1%)를 보였다(Table 4).

PCR 검출

*H. suis*는 37예(41.1%)에서 검출되었으며, 정상 위는 14예(15.6%), 육안병변을 보인 위는 23예(26.6%)에서 검출되었다(Table 5). 육안병변 등급에 따른 검출은 부전각화증(1)은 14예(15.6%), 미란(2)은 3예(3.3%), 궤양(3)은 6예(6.7%)를 보였다(Table 5 & Fig. 2).

또한 Warthin-Starry은 염색과 PCR 검사에 모두 반응을 보인 위는 5예(5.6%)이었다(Table 6).

Table 5. Results of detection of *H. suis* by PCR assay

Gastric lesion score	Positive	Negative	Total
0	14 (15.6%)	15 (16.7%)	29
1	14 (15.6%)	24 (26.7%)	38
2	3 (3.3%)	9 (10%)	12
3	6 (6.7%)	5 (5.6%)	11
Total	37 (41.1%)	53 (58.9%)	90

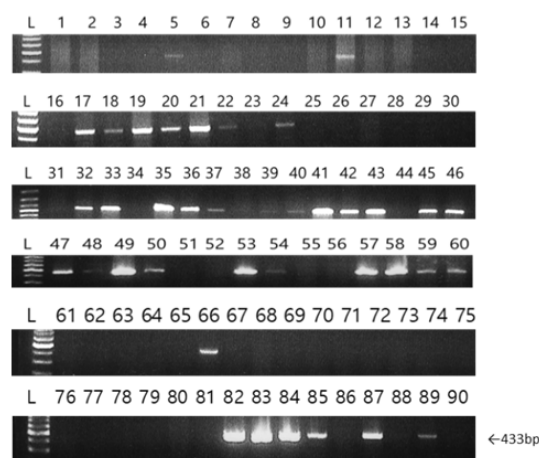


Fig. 2. Results of agarose gel electrophoresis analysis of *H. suis* for 90 samples with PCR products of 433 bp. L: 100 bp plus DNA ladder.

Table 6. Positive results of *H. suis* by Warthin-Starry silver stain and PCR examination

	WS silver stain	PCR	Both
Positive	11/90 (12.2%)	37/90 (41.1%)	5/90 (5.6%)
Negative	69/90 (76.7%)	53/90 (58.9%)	46/90 (51.1%)

고 찰

사람과 돼지의 위 병변을 일으키는 요인은 다양하며, 많은 공통점과 차이점이 있다. 사람에서 위 질병에 가장 중요한 병원체인 *H. pylori*는 많은 연구가 진행되고 있으며 최근에는 다양한 숙주 범위를 가진 NHPH도 주목받고 있다(Roosendaal 등, 2000; Vermoote 등, 2011). 발병 기전이 많이 밝혀진 *H. pylori*와는 달리 NHPH가 숙주나 사람에게 영향을 줄 수 있는지는 아직 논쟁의 여지가 있다. 돼지에서는 사육 환경과 사료가 위 병변을 일으키는 주요한 원인이지만 최근 연구에서와 같이 *H. suis*도 위 병변을 유발하는 원인(Zhang 등, 2016)이라는 것은 한국에서도 돼지 위병변의 원인으로 *H. suis*가 고려되어야 한다는 것을 시사한다.

본 연구에서 *H. suis*에 의한 위 병변을 진단하는데 조직학적 특수염색과 PCR이 사용되었다. 조직학적 방법은 시간이 오래 걸리고 염색 방법도 상대적으로 복잡하여 많은 시료를 대상으로 검사하기 적합하지 않았다. 가장 큰 단점으로 Warthin-Starry 은염색은 *Helicobacter. species*와 함께 돼지의 위에 기생하는 다른 나선균이 같이 염색되어 정확한 진단과 감별진단을 하는데 어려웠다. 이번 결과에서 특수 은염색과 PCR에 양성인 개체를 비교하였을 때, 은염색에서 양성인 6예의 시료에서 PCR 검사 결과는 음성이었다(Table 6). 이들 결과를 통해 *H. suis*의 진단은 원인균 배양이 까다롭기 때문에 진단적인 가치는 PCR이 보다 높다고 여겨진다.

돼지의 위병변은 도축돈의 77%에서 관찰된다고 보고되었다(Queiroz 등, 1996). 본 연구 결과에서 67.8%의 도축돈의 위에서 관찰되어 기존의 연구결과 보다는 낮았으나 이는 검사두수, 사육환경, 사양관리, 사료 성분 등의 요인과의 밀접한 관련이 있다고 추정된다. PCR의 검출률은 미국의 조사 예(Baele 등, 2008)는 88%, 유럽의 조사(Foss 등, 2013)에서는 90%, 이전 한국의 조사 결과(Park 등, 2004)인 95%보다 낮은 41.1%의 양성률을 보였다. 이처럼 상대적으로 낮은 검출률

은 *H. suis*에 감염된 돼지의 수가 적다기 보다는 적은 시료 수, 도축 연령, 사육환경과 사양관리, 시료 채취 방법 등의 차이가 우선적으로 고려되어야 한다고 하였다(Sapierzyński 등, 2006; Foss 등, 2013).

위 병변과 PCR 검출과의 상관관계에서 본 연구의 결과는 이전의 미국의 연구(Roosendaal 등, 2000; Choi 등, 2001)와 다르게 위 병변이 높아질수록 *H. suis*의 검출이 높아지는 상관관계를 보이지 않았고, 또한 국내 연구(Park 등, 2004)와도 다른 결과를 보였다. 이는 미국과 국내의 사양 환경, 도축 일령, 시료 채취 부위 등의 차이를 고려하여야 하고, 선행 연구들은 위 유문부에 대한 조직병리학적 소견으로 병변 등급을 정하였으나, 본 연구에서는 위 식도부점막에 대한 육안병변을 바탕으로 하여 비교하였기에 선행 연구의 상관관계와 다를 수가 있으리라 사료된다. 추후 연구에서 위의 식도부점막이외의 부위에 대한 육안병변과 조직학적 특수염색, 원인균 배양과 PCR의 검출 결과와의 상관 비교가 반드시 필요하다.

최근 연구 결과를 바탕으로 외국에서 *H. suis*는 동물복지, 공중보건 및 식품위생의 측면에서 많은 관심의 대상이 되고 있다(Foss 등, 2013; Zhang 등, 2016). 앞으로 한국에서도 양돈산업의 측면에 대한 *H. suis*에 의한 돼지 위 병변에 대한 이해와 더불어 인수공통 질병의 원인체로 관심과 사람의 *Helicobacter*균에 의한 위 병변의 동물모델로 심도 있게 연구되어야 할 것이라고 사료된다.

결 론

돼지의 위 질병은 다양한 요인들이 복합적으로 작용하여 나타난다. *H. suis*는 돼지 위에 기생하는 인수공통질병의 병원체이다. 국내 도축돈 90예의 위를 대상으로 식도구 부위의 육안병변을 0~3까지 등급화하였다. *H. suis*의 감염과 육안병변과의 상관 관계를 위해 위저부 점막조직을 조직학적인 특수염색과 PCR을 이용하여 검출하였다. 조직학적 특수염색은 Warthin-Starry 은염색을, PCR은 위 점막에서 DNA를 추출하여 *H. suis*에 대한 특이 primers를 사용하여 검출하였다. 육안병변에 따른 결과는 정상 위는 29예를, 위병변을 보인 것은 61예로, 부전각화증은 38예, 미란은 12예, 궤양은 11예였다. 조직학적 특수염색은 11예에서 양성을 보였으며, 육안병변과의 상관 관계는 정상 위는 4예, 부전각화증은 5예, 미란은 1예, 궤양은 1예

로 관찰되었다. PCR 검출은 모두 37예로, 정상인 위는 14예, 부전각화증은 14예, 미란은 3예, 궤양은 3예였다. 조직학적 특수염색과 PCR의 결과에서 모두 양성 반응을 보인 예는 5예였다. 본 연구는 조직학적 특수염색은 *H. suis* 외에 다른 나선균도 양성을 보일 수 있기 때문에 *H. suis*의 검출은 조직학적 특수염색보다 PCR이 진단적인 가치가 높다는 것을 확인하였고 한국 양돈산업에 있어서 *H. suis*는 돼지 위 질병과 더불어 인수공통질환의 병인체 및 사람의 *Helicobacter* 균에 의한 위 병변의 동물모델로 중요하게 다루어져야 한다.

감사의 글

2017년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비로 연구하였음(과제번호-D 1001419-01-01).

REFERENCES

- Baele M, Decostere A, Vandamme P, Ceelen L, Hellemans A, Mast J. 2008. Isolation and characterization of *Helicobacter suis* sp. nov. from pig stomachs. *International J Syst Evol Microb*, 58: 1350-1358.
- Blaecher C, Smet A, Flahou B, Pasmans F, Ducatelle R, Taylor D. 2013. Significantly higher frequency of *Helicobacter suis* in patients with idiopathic parkinsonism than in control patients. *Alim Pharm Therap* 38(11-12): 1347-1353.
- Choi YK, Han JH, Joo HS. 2001. Identification of novel *Helicobacter* species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. *J Clin Microb* 39(9): 3311-3315.
- De Bruyne E, Flahou B, Chiers K, Meyns T, Kumar S, Vermoote M. 2012. An experimental *Helicobacter suis* infection causes gastritis and reduced daily weight gain in pigs. *Vet Microb* 160(3-4): 449-454.
- De Cooman L, Flahou B, Houf K, Smet A, Ducatelle R, Pasmans F. 2013. Survival of *Helicobacter suis* bacteria in retail pig meat. *International J Food Microb* 166(1): 164-167.
- De Cooman L, Houf K, Smet A, Flahou B, Ducatelle R, De Bruyne E. 2014. Presence of *Helicobacter suis* on pork carcasses. *International J Food Microb* 187: 73-76.
- De Groote D, Ducatelle R, van Doorn LJ, Tilmant K, Verschuuren A, Haesebrouck F. 2000. Detection of "*Candidatus helicobacter suis*" in gastric samples of pigs by PCR: Comparison with other invasive diagnostic techniques. *J Clin Microb* 38(3): 1131-1135.
- De Groote D, van Doorn LJ, Ducatelle R, Verschuuren A, Haesebrouck F, Quint WG. 1999. '*Candidatus helicobacter suis*', a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. *International J Syst Bacter* 49: 1769-1777.
- Flahou B, Deun KV, Pasmans F, Smet A, Volf J, Rychlik I. 2012. The local immune response of mice after *Helicobacter suis* infection: Strain differences and distinction with *Helicobacter pylori*. *Vet Res* 43(1)75 doi: 10.1186/1297-9716-43-75.
- Flahou B, Haesebrouck F, Pasmans F, D'Herde K, Driessen A, Van Deun K. 2010. *Helicobacter suis* causes severe gastric pathology in mouse and mongolian gerbil models of human gastric disease. *PLoS One* 5(11): e14083.
- Foss DL, Kopta LA, Paquette JA, Bowersock TL, Choromanski LJ, Galvin JE. 2013. Identification of *Helicobacter suis* in pig-producing regions of the United States. *J Swine Health Prod* 21(5): 242-247.
- Hellemans A, Chiers K, De Bock M, Decostere A, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2007. Prevalence of '*Candidatus helicobacter suis*' in pigs of different ages. *Vet Rec* 161(6): 189-192.
- Kopinski JS, Fogarty R, McVeigh J. 2007. Effect of s-methylmethionine sulphonium chloride on oesophagogastric ulcers in pigs. *Australian Vet J* 85(9): 362-367.
- Liang J, Ducatelle R, Pasmans F, Smet A, Haesebrouck F, Flahou B. 2013. Multilocus sequence typing of the porcine and human gastric pathogen *Helicobacter suis*. *J Clin Microb* 51(3): 920-926.
- Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K. 2000. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: Complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 118(5): 821-828.
- Park JH, Seok SH, Cho SA, Baek MW, Lee HY, Kim DJ. 2004. The high prevalence of *Helicobacter* sp. in porcine pyloric mucosa and its histopathological and molecular characteristics. *Vet Microb* 104(3-4): 219-225.
- Queiroz DM, Rocha GA, Mendes EN, De Moura SB, De Oliveira AM, Miranda D. 1996. Association between helicobacter and gastric ulcer disease of the pars esophagea in swine. *Gastroenterology* 111(1): 19-27.
- Roosendaal R, Vos JH, Roumen T, van Vugt R, Cattoli G, Bart A. 2000. Slaughter pigs are commonly infected by closely related but distinct gastric ulcerative lesion-inducing gastrospirilla. *J Clin Microb* 38(7): 2661-2664.
- Sapierzyński R, Fabisiak M, Kizerwetter-Świda M. 2006. Preliminary data on *Helicobacter* sp. and *Candidatus helicobacter suis* infection rate in porcine gastric mucosa. *Bulletin Vet Inst Pulawy* (50): 445-449.
- Sapierzyński R, Fabisiak M, Kluciński W, Dolka I. 2011. *Helicobacter* sp. microorganisms do not alter proliferative activity of gastric epithelial cells in naturally infected swine. *Bulletin Vet Inst Pulawy*, (55): 9-14.
- Van den Bulck K, Decostere A, Baele M, Driessen A, Debonne JC, Burette A. 2005. Identification of non-*Helicobacter*

- pylori* spiral organisms in gastric samples from humans, dogs, and cats. J Clin Microb 43(5): 2256-2260.
- Vermoote M, Pasmans F, Flahou B, Van Deun K, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2011. Antimicrobial susceptibility pattern of *Helicobacter suis* strains. Vet Microb 153(3-4): 339-342.
- Zhang G, Ducatelle R, Mihi B, Smet A, Flahou B, Haesebrouck F. 2016. *Helicobacter suis* affects the health and function of porcine gastric parietal cells. Vet Res 47(1): 101 doi: 10.1186/s13567-016-0386-1.