



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 박사학위논문

한국인 코호트를 대상으로 한 장내
원충류 블라스토시스티스 분포,
유전형 및 그에 따른 장내 미생물
분포와의 관련성 분석

전남대학교 대학원

의과학과

김문주

2023년 2월

한국인 코호트를 대상으로 한 장내 원충류 블라스토시스티스 분포, 유전형 및 그에 따른 장내 미생물 분포와의 관련성 분석

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

전남대학교 대학원
의 과 학 과
김 문 주
지도교수 원 은 정

김문주의 이학 박사 학위논문을 인준함

심사위원장

신 종 희 (인)

심 사 위 원

김 수 현 (인)

심 사 위 원

기 승 정 (인)

심 사 위 원

김 태 종 (인)

심 사 위 원

원 은 정 (인)

2023년 2월

목 차

국문 초록	1
서론	4
연구대상 및 방법	6
연구 결과	10
고찰	18
참고 문헌	22
영문 초록	26
표 및 그림	28

한국인 코호트를 대상으로 한 장내 원충류 블라스토시스 티스 분포, 유전형 및 그에 따른 장내 미생물 분포와의 관 련성 분석

김 문 주

전남대학교 대학원 의과학과

(지도교수 원 은 정)

(국문초록)

배경: 블라스토시스티스(*Blastocystis*)는 최근 장내에서 발견된 원충류로 그 생물학적, 병태생리학적 의의에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 본 연구는 한국인 코호트를 대상으로 분리한 *Blastocystis*의 형태학적인 특성을 규명하고, 대변 성상에 따른 *Blastocystis* 분포 및 유전형에 대해 조사하고, *Blastocystis* 분포에 따른 장내 미생물군 분포와의 관련성을 분석하였다.

대상 및 방법: 한국인 코호트를 대상으로 하여 총 440 건의 잔여 대변 검체를 수집하였다. 액체 배양법을 이용하여 배양 조건을 분석하고, *Blastocystis* SSU rRNA 유전자를 표적으로 한 중합효소연쇄반응 및 염기서열분석을 수행하여 유전형을 분석하였다. 이들 중 *Blastocystis* 음성(n=25) 및 양성(n=25) 검체 총 50 건을 대상으로 하여 대변 양상 및 *Blastocystis* 분포에 따른 장내 미생물군 분석을 수행하였다. 장내 미생물군 분석을 위해 박테리아 16S 리보솜 유전자의 V3-V4 영역을 표적으로 하여 차세대 염기서열분석을 수행하고, alpha diversity, beta

diversity, 및 선형판별분석 효과 크기(Linear discriminant (LDA) effect size, LEfSe) 방식으로 분석하였다.

결과: *Blastocystis* 는 전체 440 건 중 9 개(4.0%)의 설사변과 33 개(15.3%)의 비설사군을 포함한 42 개(9.5%)에서 양성이었다. *Blastocystis* 양성인 설사변 9 건 중 ST1, ST2 및 ST3 아형은 각각 4 건(44.5%), 0 건(0.0%), 5 건(55.5%)이었다. *Blastocystis* 양성인 비설사변 33 건 중 ST1, ST2 및 ST3 아형은 각각 6 건(18.2%), 2 건(6%), 25 건(75.8%) 관찰되었다. 유전학적 분석 결과, ST3 아형의 경우, 멕시코, 이란, 폴란드, 및 태국에서 분리된 것과 상대적으로 더 가까웠으며, ST1 아형의 경우, 멕시코, 태국 및 라오스와 유전학적으로 가까웠다. 먼저, 검체 성상에 따른 장내 미생물군 분석 결과, 비설사변에서 설사변에 비해 유의하게 높은 alpha diversity 를 보였고, 확연히 다른 beta diversity 분포를 보임을 알 수 있었다. *Blastocystis* 양성인 경우, 음성인 경우에 비해 유의하게 높은 alpha diversity 를 보였고, 확연히 다른 beta diversity 분포를 보임을 알 수 있었다. 특히, 종 수준에서 보았을 때 *Blastocystis* 양성인 경우 *Akkermansia* 나 *Prevotella* 9, *Faecalibacterium* 가 더 풍부한 반면, 음성군에서는 *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis* 가 풍부함을 알 수 있었다. 전반적인 LEfSe 분석 결과, *Clostridiales*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* 9, *Ruminococcaceae* UGG_002, *Rikenellaceae* 이 *Blastocystis* 양성군에서 특이적으로 풍부하였으며, *Bacilli*, *Lactobacillales*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* 는 *Blastocystis* 음성군에서 특이적이었다.

결론: 본 연구 결과, 한국인 코호트 내에서 *Blastocystis* 는 설사변보다는 비설사변에서 더 흔히 발견되며, ST3 가 가장 흔한 아형임을 알 수 있었다. 특히, *Blastocystis* 가 존재하는 경우 장내 세균총의 다양성이 높고, 병원성 세균과 역상관

관계가 있어 향후 건강한 장내 환경을 대변하는 바이오마커로 활용할 수 있으리라
사료된다.

서론

블라스토시스티스(*Blastocystis*)는 사람의 장에서 가장 흔히 발견되는 원생동물 기생충으로, 전 세계적으로 건강한 사람 및 증상이 있는 환자와 기타 동물들에게서도 발견된다[1]. *Blastocystis*는 일반적으로 대변-구강 경로를 통해 낭포(cyst) 형태로 전염되는 것으로 생각된다[2]. *Blastocystis* 감염 진단을 위해 대변을 이용한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기반 접근법이 널리 사용되고 있고[3], 아형의 구분은 small subunit ribosomal DNA (SSU rRNA) 유전자 분석을 기반으로 최소 17 개의 아형으로 구성 되어있다고 알려져 있다[4]. 인간의 경우 ST1-ST4 가 90% 이상을 차지하고 있으며 다른 아형은 ST5-ST9 이다[5]. 이전의 연구에 따르면 선진국(10~15%)에 비해 개발도상국(55~70%)에서 *Blastocystis*의 유병률이 더 높았으며[6], *Blastocystis* 감염시 과민성대장증후군 유사 증상, 메스꺼움, 발열, 구토, 거식증, 설사 그리고 복통 등이 동반될 수 있다고 보고된 바 있다[7]. *Blastocystis*의 병원성과 비병원성은 장내 미생물과의 상호작용, 아형의 감염, 숙주의 면역반응과 같은 여러 요인에 의해 결정된다. 일부의 연구는 *Blastocystis*가 인간과 동물의 정상적인 장내 미생물의 일부이며, 질병을 유발하지 않고 장기간동안 장에 정착하고 있다고 보고한 바 있다[8-10]. *Blastocystis*는 과학적으로 큰 관심을 받고 있지만, *Blastocystis*의 생물학이나 병태생리학에 대해서는 더 연구가 필요하다. 지금까지 국내에서 이뤄진 *Blastocystis*에 대한 연구는 주로 동물에서의 감염률과 유전형 분포에 대한 내용이 다수이며[11-15], 한국인 코호트를 대상으로 한 *Blastocystis*에 대한 연구는 많지 않은 실정이다[16-18]. 본 연구에서는 설사 및 무증상의 한국인 그룹에서

Blastocystis 와 그 아형의 유병률을 확인하고, 일부 검체를 대상으로 하여 *Blastocystis* 집락 여부가 장내 세균총에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2015년 11월부터 2021년 3월까지 전남대병원과 화순전남대병원에서 설사 원인 규명을 위해 위장관 배양 검사가 의뢰된 환자의 잔여 대변 검체와 건강 검진을 위해 대변 잠혈 검사가 의뢰된 환자의 잔여 대변 검체를 대상으로 하였다. 전남대학교병원 생명윤리위원회의 지침 및 승인(IRB CNUH-2015-052)을 받아 진행하였으며, 잔여 검체량이 2 mL 이상 충분한 경우에 한하여 수집하였다.

2. *Blastocystis* 배양

Blastocystis 배양에 적절한 배지 선택을 위하여 신선한 대변 검체를 다양한 배양액과 배양액 보충제를 사용하여 배양하였다. 액체배지는 Locker's egg solution 과 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였고 각 배지에는 10, 20, 30%의 horse serum, calf serum 을 각각 첨가하여 사용하였다. 약 200mg 의 대변을 각각의 배지 혼합물 10mL 에 접종한 후 혐기 컨테이너에 넣어 혐기성 상태로 만든 후 37 °C 에서 배양하였다. 배양 48 시간 후에 광학현미경을 이용하여 검경하여 *Blastocystis* 를 확인하였다[19]. 배양용기의 배양액과 대변을 모아 conical tube 에 넣어 Phosphate buffer Saline (PBS)를 넣어 준 후 1,000rpm, 5분 원심분리 하였다. 상층액을 버린 후 새 배지 혼합물 10mL 을 넣고 침전물을 잘 풀어준 후 새로운 배양 용기에 넣고 배양하였다. 이 과정을 2~3 일에 한 번씩 반복하였으며, 현미경으로 관찰하며 다양한 환경 조건에 따른 *Blastocystis* 배양의 특성을 분석하였다. 배양 2~3 일 후부터 광학현미경을 사용하여 저배율(100x)와 고배율(400x)로 관찰하였다.

3. *Blastocystis* 분포 및 유전형 검사

채취한 대변 검체는 -80°C 에서 보관 후 검사를 시행하였다. Genomic DNA 는 Ci-ca Geneus® DNA Prep Kit (Kanto Chemical, Tokyo, Japan)를 사용하여 제조사의 지시대로 수행되었고, *Blastocystis* 감염 여부는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 확인하였다. *Blastocystis* small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) 유전자는 Blast-505-532 (5'-GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC-3') 및 Blast-998-1017 (5'-TGC TTT CGC ACT TGT TCA TC-3') 시발체(primer)를 사용하여 증폭되었다[20]. 각 튜브는 8.5 μL PCR primer 용액(25 pmol 의 Blast-505-532 및 Blast-998-1017 각각 1 μL 포함), 36.5 μL 증류수 및 5 μL 주형 DNA 를 포함했다. 모든 PCR 증폭은 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (TaKaRa, Tokyo, Japan)를 사용하여 수행되었다. 94°C 에서 3 분간 초기 변성 후 59°C 에서 30 초, 72°C 에서 60 초를 30 회 반복하고 72°C 에서 5 분간 최종 신장하였다. PCR 산물을 1.5%(w/v) 아가로스 겔 전기영동으로 분석한 후 DNA 유전형은 SSU rRNA 의 염기서열을 분석하여 측정하였다. 계통발생분석은 *Blastocystis* SSU rRNA 유전자 데이터베이스를 참고하여 수행하였으며 Geneious Prime (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand)을 이용하여 계통수를 구성하였다. 계통발생학적 추론은 1,000 개의 부트스트랩 복제와 산술 평균 클러스터링을 특징으로 하는 pair-group 방법을 사용하여 도출되었고, 그룹간 비교를 위해 Student's t-test 를 사용하였다.

4. 검체 양상과 *Blastocystis* 존재 여부에 따른 장내 미생물 분석

검체 양상과 *Blastocystis* 존재 여부에 따른 장내 미생물 분석을 위해 전체 50 개 대변 검체를 대상으로 핵산을 추출하였다. 검체 양상은 Bristol stool from scale 에서

분류한 대변 형태 중 Type 7 에 준하는 설사변 25 개 검체와 Type 2-3 에 준하는 비설사변 25 개 검체로 구분되었다[21]. Genomic DNA 는 Cica Geneus® DNA Prep Kit (Kanto Chemical, Tokyo, Japan)를 사용하여 제조사 지침에 따라 추출하였다. PCR 증폭은 박테리아 16S 리보솜 유전자의 V3-V4 영역을 대상으로 16S universal primers 를 사용하여 수행되었다. 이 염기서열 조각들은 Macrogen (Seoul, Korea)의 MiSeq 기술을 사용하여 검출되었다. Sequence 를 다듬고 CLC Genomics Workbench v.10.1.1 및 CLC Microbial Genomics Module v.2.5 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 operational taxonomic units (OTUs)로 병합하였다. OTU 테이블을 생성하기 위해 먼저 SILVA v.132 데이터베이스에서 미리 정렬된 16S 데이터를 사용하여 MUSCLE v.3.8.31 로 다중 시퀀스 정렬을 수행하였다. 키메라 서열을 확인 후 제거하고 UPARSE 프로토콜을 사용하여 클러스터링을 수행하였다. NCBI 분류학 데이터베이스를 기반으로 하되, OTU 컷오프는 3%로 설정하였다. OTU 파일 분석은 먼저 검체 양상에 따라 설사변 과 비설사변 간 장내 미생물 분포에 차이가 있는지 살펴보고, 다음으로는 *Blastocystis* 감염 여부에 따라 그룹을 나눠 분석했다. 대변 검체 내 장내 미생물 분포의 다양성은 Chao-1 bias, Total number, Shannon, 그리고 Simpson's index 를 포함한 4 가지의 지수를 이용하여 알파 다양성(alpha diversity)로 표현하였다. 각 결과에 대해 Mann-Whitney Utest 를 사용하여 군간 통계를 측정하였다. 베타(표본 간) 다양성(beta diversity)은 Bray-Curtis 법을 이용하여 분석하였고, Principle coordinates Analysis (PCoA)를 기반으로 시각화 하였다. 또한 각 군 간 미생물 군집 구조 간 통계학적 차이를 위해 Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) test 를 수행하였다. 각 그룹 간에 서로 다른 풍부함을 보이는 박테리아 분류군을 도출하기 위해, 선형판별분석 효과 크기(Linear discriminant

(LDA) effect size, LEfSe) 방식을 이용하여 분석하였다. LDA 값이 3.0 을 초과하면서 p 값이 0.05 미만인 경우를 유효하게 판정하였다. 각 군에서 나타나는 미생물 분포가 log2 배 차이가 나는 경우를 Volcano plot 을 이용하여 시각화 하였다.

연구 결과

1. *Blastocystis* 배양

Blastocystis 배양을 위해 사용한 방법의 수율은 Table 1에 정리하였다. Sample 1로 Locker's medium을 이용하였을 때 Day 1에 2개, Day 3에 3개, Day 7에 4개, Day 10에 3개, Day 14에 2개, Day 17, 21, 24, 27에 각각 1개가 관찰되었다. DMEM 배지에 10% horse serum을 넣어 배양하였을 때에는 Day 1에 4개, Day 3에 2개, Day 7에 1개, Day 10, 14, 17, 21, 24에 각 2개, Day 27에 1개 관찰되었고, 20% horse serum을 넣어 배양하였을 때에는 Day 1에 5개, Day 3에 4개, Day 7에 0개, Day 10에 2개, Day 14에 1개, Day 17, 21, 24에 각 2개, Day 27에는 0개가 관찰되었다. 30% horse serum을 넣어 배양하였을 때에는 Day 1에 4개, Day 3에 2개, Day 7, 14, 17, 21, 24에 각 2개씩, Day 27에는 1개가 관찰되었다. 10, 20, 30% calf serum을 넣어 배양하였을 때에는 관찰되지 않았다. Sample 2로 Locker's medium과 DMEM에 10% horse serum을 넣은 배양액을 이용하였을 때에는 Day 1~21까지는 각 1개씩을 관찰할 수 있었는데 그 이후로는 관찰할 수 없었다. DMEM에 20%, 30% horse serum을 이용하였을 때에는 Day 1부터도 관찰할 수 없었다.

2. *Blastocystis* 아형 및 분포

연구 기간동안 총 440개의 검체가 수집되었고, 그 중 설사변 9개와 비설사변 33개를 포함한 42개 (9.5%) 검체에서 *Blastocystis* PCR 양성을 보였다. 설사변 그룹에서 4명(44.5%), 0명(0.0%), 5명(55.5%) 환자에서 ST1, ST2 및 ST3 아형이

발견되었으며 정상대변 그룹에서 6 명(18.2%), 2 명(6%), 25 명(75.8%) 환자에서 ST1, ST2 및 ST3 아형이 발견되었다. *Blastocystis* 시퀀스의 유전학적 근접성을 살펴보기 위해 phylogenetic tree 로 살펴보았을 때, 모든 ST3 시퀀스는 한국(MT093452), 멕시코(MK874780, KU147402), 이란(MH049544, LC414153), 폴란드(MN918265) 및 태국(JX305884)의 시퀀스와 그룹으로 묶이는 것을 알 수 있었다. 하지만 독일(MK801366, MK801409), 중국(KY823341, MK898939), 싱가포르(KX618192) 및 필리핀(KY610166, KT374023)의 시퀀스와는 다소 멀리 떨어져 있는 것을 확인할 수 있었다. ST1 의 시퀀스는 한국(MT093451), 멕시코(KT591850), 태국(KF285443) 및 라오스(KX358439)의 시퀀스와 함께 클러스터링 되었고, 중국(MK801400, MK801402) 와 일본(AB107962)의 시퀀스와는 멀리 떨어져 있는 것을 확인하였다. ST2 의 시퀀스는 멕시코(KT591847, KU147357, KU147361), 이란(LC414147, LC413928) 및 라오스(KX358434)의 시퀀스와 함께 클러스터링 되었다. 그리고 모든 시퀀스는 각각 ST4(KP284173, KX351997), ST5(KM438216, MT094303), ST6(KP284174, MG011651) 및 ST7(JN003686)의 시퀀스와는 멀리 떨어져 있었다(Figure 1).

3. 검체 양상에 따른 장내 미생물의 다양성

Alpha diversity 로 설사변 대 비설사변 내 장내 미생물군의 다양성을 비교하였을 때, 비설사변에서 설사변보다 장내 미생물의 다양성이 높은 것을 확인할 수 있었다(diarrheal vs. non-diarrheal; Chao-1 bias, 225 vs. 443.3; Total number, 164.1 vs. 326.9; Shannon, 3.762 vs 5.267; Simpson's index, 0.8084 vs. 0.9292, $p < 0.001$, in all) (Figure 2). Bray-Curtis 법을 이용한 beta diversity 결과, 설사변과

비설사변 사이의 미생물 군집 구조에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.0001$) (Figure 3).

4. 검체 양상에 따른 장내 미생물 분포 차이

설사변 대 비설사변으로 나누어 장내미생물 분포를 각 분류 체계에 따라 분석한 결과를 Figure 4-8 에 나타내었다. 문 수준에서는 Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria 가 설사변에서 더 풍부했으며, 비설사변에서는 Bacteroidetes 가 더 풍부함을 알 수 있었다. Firmicutes 는 두 그룹 모두에서 가장 높은 비율을 나타내는데 두 군 간에는 큰 차이가 없었다(Figure 4). 강 수준에서는 *Bacilli*, *Gammaproteobacteria*, *Negativicutes*, *Verrucomicrobiae*, *Actinobacteria*, *Coriobacteria*, *Synergistia* 가 설사변에서 더 풍부했으며, 비설사변에서는 *Bacteroidia*, *Clostridia* 가 더 풍부하였다(Figure 5). 두 군간 비중에 큰 차이가 없었던 *Firmicutes* 목에서 설사변에서는 *Bacilli* 와 *Negativicutes* 가, 비설사변에서는 *Clostridia* 가 더 풍부한 것을 확인할 수 있었다. 과 수준에서는 *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Akkermansiaceae*, *Veillonellellaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Lactobacillaceae* 가 설사변에서 더 풍부하였고, 비설사변에서는 *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Muribaculaceae* 가 더 풍부하였다(Figure 6). 속 수준에서는 *Enterococcus*, *Akkermansia*, *Klebsiella*, *Veillonella*, *Escherichia-Shigella*, *Bifidobacterium*, *Phascolarctobacterium* 이 설사변에서 더 풍부하였고, 비설사변에서는 *Prevotella* 9, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* UCG-002, *Alistipes*, *Subdoligranulum*, *Lachnospira* 가 더 풍부하였다(Figure 7). 종 수준에서는 *Akkermansia* unidentified,

Enterococcus durans, *Bifidobacterium* Ambiguous_taxa, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus hirae* 가 설사변에서 더 풍부하고, 비설사변에서는 *Prevotella* 9 uncultured bacterium, *Faecalibacterium* gut metagenome, *Bacteroides* uncultured bacterium 이 더 풍부하였다(Figure 8).

5. *Blastocystis*의 유무에 따른 장내 미생물의 다양성

Blastocystis 유무에 따른 샘플 내의 다양성은 *Blastocystis* 양성군에서 *Blastocystis* 음성군보다 장내 미생물의 다양성이 높은 것을 확인할 수 있었다(*Blastocystis*-negative vs. positive; Chao-1 bias, 307.8 vs. 459.7; Total number, 216.9 vs. 352.5; Shannon, 4.402 vs 5.35; Simpson's index, 0.8737 vs. 0.922, $p < 0.001$, in all)(Figure 9). 또한 *Blastocystis* 유무와 증상에 따른 다양성을 함께 분석하였을 때 *Blastocystis* 음성군에서는 비설사변이 설사변보다 장내 미생물의 다양성이 Chao-1 bias 와 Total number 에서 유의하게 더 높았고, Shannon 과 Simpson's index 는 다양성의 차이를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Chao-1 bias, $p = 0.01$; Total number, $p = 0.02$; Shannon, $p = 0.07$; Simpson's index, $p = 0.06$). *Blastocystis* 양성군에서는 4 가지 지수 모두 비설사변이 설사변보다 장내 미생물의 다양성이 유의하게 높았다(Chao-1 bias, $p = 0.04$; Total number, $p = 0.03$; Shannon, $p = 0.01$; Simpson's index, $p = 0.02$). 설사변 중 *Blastocystis* 유무에 따른 다양성은 차이가 없었으나, (Chao-1 bias, $p = 0.6$; Total number, $p = 0.9$; Shannon, $p = 0.7$; Simpson's index, $p = 0.4$) 비설사변에서 *Blastocystis* 유무에 따른 다양성은 *Blastocystis* 양성군이 *Blastocystis* 음성군보다 장내 미생물의 다양성이 유의하게 높은 것을 확인할 수 있었다(Chao-1 bias, $p = 0.002$; Total number, $p = 0.001$; Shannon, $p = 0.005$;

Simpson's index, $p = 0.04$). Beta diversity 분석에서 PCoA 를 기반으로 시각화한 결과는 대변의 상태에 따라 군집이 달라지는 결과를 보여주었고(Figure 10), PERMANOVA 분석은 *Blastocystis* 음성군 중 설사변, *Blastocystis* 음성군 중 비설사변 그리고 *Blastocystis* 양성군 중 설사변 각각과 비교한 *Blastocystis* 양성군 중 비설사변 사이의 미생물 군집 구조에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(각 $p = 0.00001$, $p = 0.00046$, $p = 0.00043$)(Table 2).

6. *Blastocystis* 유무에 따른 장내 미생물 분포 차이

Blastocystis 유무에 따른 장내미생물 분포를 각 분류 체계에 따라 분석한 결과는 Figure 11-15 에 나타내었다. 문 수준에서는 Proteobacteria, Verrucomicrobia 가 *Blastocystis* 음성군에서 풍부하였으며, Bacteroidetes 가 *Blastocystis* 양성군에서 더 풍부하였다. *Blastocystis* 음성군 중 설사변에서는 Verrucomicrobia 가, *Blastocystis* 양성군 중 설사변에서는 Actinobacteria 가 다른 군들에 비하여 더 풍부하였다(Figure 11). 강 수준에서는 Bacilli, Gammaproteobacteria, Verrucomicrobiae, Coriobacteria 가 *Blastocystis* 음성군에서 풍부하였으며, Bacteroidia, Clostridia, Negativicutes, Actinobacteria 가 *Blastocystis* 양성군에서 더 풍부하였다. *Blastocystis* 음성군 중 설사변에서는 Bacilli 와 Verrucomicrobiae 가, *Blastocystis* 양성군 중 설사변에서는 Negativicutes 와 Actinobacteria 가 다른 군들에 비하여 더 풍부하였다. 또한 강 수준에서는 *Blastocystis* 양성군 중 비설사변에서는 다른 군들에 비하여 Clostridia 가 더 풍부하였고 Bacilli 는 거의 없음을 확인할 수 있었다(Figure 12). 과 수준에서는 Enterococcaceae, Enterobacteriaceae, Lachnospiraceae, Akkermansiaceae, Veillonellellaceae 가 *Blastocystis* 음성군에서 풍부하였으며, *Blastocystis*

양성군에서는 *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Muribaculaceae* 가 더 풍부하였다. *Blastocystis* 음성군 중 설사변에서는 *Enterococcaceae* 와 *Akkermansiaceae* 가, 비설사변에서는 *Bacteroidaceae* 와 *Tannerellaceae* 가 풍부하였고, *Blastocystis* 양성군 중 설사변에서는 *Bifidobacteriaceae*, *Acidaminococcaceae* 와 *Lactobacilaceae* 가, 비설사변에서는 *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae* 와 *Muribaculaceae* 가 더 풍부하였다(Figure 13). 속 수준에서는 *Enterococcus*, *Akkermansia*, *Klebsiella*, *Veillonella*, *Escherichia-Shigella* 가 *Blastocystis* 음성군에서 풍부하였고, *Blastocystis* 양성군에서는 *Prevotella* 9, *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae* UCG-002, *Alistipes* 가 더 풍부하였다. *Blastocystis* 음성군 중 설사변에서는 *Enterococcus*, *Akkermansia*, *Veillonella*, *Escherichia-Shigella* 가, *Blastocystis* 음성군 중 비설사변에서는 *Bacteroides*, *Subdoligranulum*, *Lachnospira* 가 풍부하였고, *Blastocystis* 양성군 중 설사변에서는 *Bifidobacterium*, *Klebsiella*, *Phascolarctobacterium* 이, 비설사변에서는 *Prevotella* 9, *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae* UCG-002 가 더 풍부하였다(Figure 14). 종 수준에서는 *Akkermansia* unidentified, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus hirae* 가 *Blastocystis* 음성군에서 풍부하였고, *Blastocystis* 양성군에서는 *Prevotella* 9 uncultured bacterium, *Faecalibacterium gut metagenome*, *Bifidobacterium Ambiguous_taxa* 가 더 풍부하였다. *Blastocystis* 음성군 중 설사변에서는 *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* 와 *Akkermansia* unidentified 가, 비설사변에서는 *Enterococcus faecalis* 가 풍부하였고, *Blastocystis* 양성군 중 설사변에서는 *Bifidobacterium*

Ambiguous_taxa, *Klebsiella pneumonia* 가, 비설사변에서는 *Prevotella* 9 uncultured bacterium, *Faecalibacterium* gut metagenome 가 더 풍부하였다 (Figure 15).

각 군에서 특이성이 높다고 판단되는 박테리아를 LEfSe 분석을 통해 선별한 결과는 Figure 16-17 에 나타내었다. *Bacteroidia*, *Clostridia*, *Prevotella* 9, *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae* UGG_002 등이 비설사변에서 특이적이었고, *Lactobacillales*, *Bacilli*, *Enterococcaceae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Coriobacteriia* 등이 설사변에서 특이적으로 나타났다(Figure 16). *Clostridiales*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* 9, *Ruminococcaceae* UGG_002, *Rikenellaceae* 등이 *Blastocystis* 양성군에 특이적이었으며, *Bacilli*, *Lactobacillales*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* 등이 *Blastocystis* 음성군에 특이적으로 나타났다(Figure 17). Volcano plot 에서는 *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Paraprevotella clara*, *Megasphera micronuciformis*, uncultured *Firmicutes bacterium* 과 같은 박테리아종이 *Blastocystis* 음성군과 관련성이 높고 (Figure 18), *Enterococcus faecalis*, uncultured *Firmicutes bacterium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella bivia*, bacterium NLAZ-zl-P280 이 설사변과 관련이 있음을 보여주었다. 반면, *Blautia* sp. Marseille -P3087, *Leclercia adecarboxylata*, *Bacteroides vulgatus* PC510, *Lactobacillus* sp. KC38, uncultured *Streptococcus* sp., *Eubacterium* sp. oral clone DO016, *Coprobacter fastidiosus* NSB1, *Intestinimonas gabonensis*, *Bacteroides acidifaciens* JCM 10556, *Bacteroides* sp. 3_2_5, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides stercoris* CC31F, uncultured *compost bacterium*, *Bacteroides eggerthii* DSM 20697,

Rothia dentocariosa ATCC 17931, *Bacteroides uniformis* CL03T12C37 는
비설사변과 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 19).

고찰

*Blastocystis*의 실험실적 진단을 위해 다양한 방법이 이용되고 있지만, 기본적으로는 대변 검체에서 액포, 과립 또는 아메바 형태를 광학현미경으로 관찰할 수 있다. Wheatley trichrome 염색을 통한 *Blastocystis*의 진단은 널리 사용되어 왔는데 이 진단법은 쉽게 접근이 가능하고 시간을 단축시킬 수 있다는 점에서 자주 채택되어왔다[22]. Wheatley trichrome 염색은 유병율이 다소 낮았음에도 불구하고 높은 민감도와 특이도를 보였다. 하지만 체외배양법은 Wheatley trichrome 염색보다 높은 유병율을 보였다[23]. 본 연구에서 비교한 체외 배양법 중 Locker's egg solution 과 DMEM을 이용한 배양법이 비슷하게 효율이 좋았는데, 이는 다른 연구 결과와 유사하였다[19]. 포몰-에테르 기법(FECT), Wheatley trichrome 염색, 제닉 체외 배양(XIVC), 분변 도말 현미경 검사 및 배반포균 검출을 위한 중합효소 연쇄 반응(PCR) 방법의 민감도와 특이성을 비교한 기존 연구에 따르면, 체외 배양법이 가장 민감도가 높은 것을 알 수 있었다[19]. *Blastocystis*의 병원성에 대해서는 아직 논란이 많은 실정인데, 과민성 대장 증후군이나 위장관 증상과 관련이 있다고 보고된 바 있다[24, 25]. 최근 보고된 스페인 연구에 따르면, 설사 외의 다른 위장관 증상(복통, 식욕부진, 오심 등)이 *Blastocystis* 감염과 관련이 있었는데[25], 이는 대상 인구 집단에 따라 다소 차이가 있을 수 있으리라 사료된다. 네팔의 선행 연구에 따르면, 설사 환자 189명 중 56명(30%)에서 검출된 반면 무증상 대조군 112명 중 40명(36%)에서 검출된 바 있다[26]. 네팔의 여행자와 국외 추방자들 사이에서 이 유기체의 높은 유병률에도 불구하고, *Blastocystis*가 네팔 인구에서는 설사를 일으키지 않음을 시사한다고 하였다. 한국인 코호트를 대상으로 한 *Blastocystis* 역학에 대해서는 연구가 많지 않으나, 본 연구에서는 9.5%의 양성률을 제시할 수 있었다. 특히, 총 440개의 검체 중 설사변 9개와 비설사변 33개에서 PCR

양성을 보였으며, 이는 *Blastocystis* 존재 여부가 설사를 일으키는 원인으로만 볼 수 없다는 것을 시사하는 결과였다.

하지만, *Blastocystis*라고 하더라도 비설사변 그룹에서는 ST3 아형이 거의 대부분을 차지한 반면 설사변 그룹에서는 ST1과 ST3 아형이 비슷하게 관찰되었다. 이는 ST1이 ST3보다 설사 증상과 잠재적인 상관관계가 있을 가능성을 시사하였는데, 다른 연구들에서도 *Blastocystis*의 병원성이 특정 유전형과 관련성이 높을 수 있다고 하였다[27]. 병원성은 극도의 탈수 및 장 염증과 관련된 인터루킨-8 (IL-8)을 방출하도록 점막 세포를 자극하는 시스테인 프로테아제 형성으로 인한 것으로 추측된다[28]. 또한 본 연구에서는 ST4를 검출하지 못하였는데, 이는 아시아와 중동지역에서는 드물었다는 이전의 연구와 일치하였다. 한국인 코호트를 대상으로 관찰된 ST3 아형의 경우, 멕시코, 이란, 폴란드 및 태국에서 분리된 것과 상대적으로 더 가까웠으며, ST1 아형의 경우, 멕시코, 태국 및 라오스와 상대적으로 가까움을 확인할 수 있었다. 이는 본 연구에서 사용한 *Blastocystis* 유전형 검사법이 유전형 아형을 구별하는데 있어 충분한 구별능을 갖는 것을 알 수 있었다.

이와 같이 *Blastocystis*가 비설사변 그룹에서 상대적으로 높은 비율로 나타나는 사실에 기인하여, *Blastocystis*와 장내 미생물군 분포 간 연관성에 대해 살펴보고자 하였다. 먼저 비설사변의 미생물군에 대해 설사변과 비교하여 살펴보았을 때, 장내 미생물군의 다양성이 높고, 설사변과는 확연히 다른 미생물 군집 분포를 보이는 것을 알 수 있었다. 이미 많은 연구에서 건강한 장내 미생물군의 다양성과 박테리아 종 구성은 대사성 질환이나 감염성 질환이 있는 환자의 장내 미생물군과 다르다고 보고되어 있으며[29], 한국인 코호트에서도 동일하게 나타남을 알 수 있었다. 이어 *Blastocystis*에 따른 장내 미생물군 분포를 살펴보았을 때, *Blastocystis*의 존재 자체가 장내 미생물군의 풍부함 및 다양성과 관련이 있음을 확인할 수 있었고, 이는

*Blastocystis*가 건강한 장 또는 장내 미생물군 유전체 공생의 촉진자의 잠재적인 바이오마커가 될 수 있음을 시사하는 바였다[30, 31]. Audebert 등의 연구와 동일하게 *Blastocystis* 양성 환자에서 *Clostridia* 클래스와 *Ruminococcaceae* 및 *Prevotellaceae* 계통, 그리고 *Blastocystis* 음성 환자에서 *Enterobacteriaceae* 계통이 더 풍부함을 보였다[32]. 특히, *Prevotella*의 경우 기존 연구에서 식물성이 풍부한 식단을 섭취하는 비서구화 인구에서 장내에 풍부하다고 알려져 있는 균종이었다. 특히, *Blastocystis*가 존재하였을 때 부티레이트를 생성하는 박테리아 중 *Faecalibacterium*의 상대적 풍부도가 높았고, 이는 다른 연구들과는 차이를 보이는 바였다. 다양한 연구들 간의 차이는 각 샘플을 분석하는 데 사용되는 기술적 요인이나, 지리적, 인종 / 민족 또는 식이 요인의 차이에서 기인할 수 있으므로, 다양한 인자들의 영향을 고려하여 판단할 필요가 있다고 생각한다.

본 연구에서는 설사 여부와 상관없이 *Blastocystis* 음성 그룹에서 장내 세균 풍부도의 차이가 크지 않았는데, 장내 세균총의 다양성만으로는 건강한 장을 온전히 대변할 수 없을 가능성을 시사하였다. 특히, *Blastocystis* 음성 그룹에서 여러 *Enterococcus* 종, *Enterococcaceae* 및 *Bacilli*가 상대적으로 우세하였는데, *Enterobacteriaceae* 또는 *Enterococcaceae*의 상대적 존재비의 경우, 위장관 또는 전신 염증과 연관성이 높다고 알려져 있다[33]. *Blastocystis* 양성 대변에서 대사체 분석을 진행한 최근 연구에 따르면, 담즙산, 아미노산 및 스펅고리피드를 포함한 흡수 장애와 관련된 대사 산물과 단쇄 지방산(SCFA)이 감소되어 있음을 확인할 수 있었다[34]. *Blastocystis*가 존재할 경우 일반적인 염증 관련 대사 산물이 감소되는 것은, *Blastocystis*가 장내에서 항염증 작용을 가질 가능성을 시사하며 추후 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

본 연구는 한국인 코호트를 대상으로 하여 장내 *Blastocystis* 여부를 살펴보고, 다양한 방법으로 실험실적 배양을 시도하였다. 또한, 서로 다른 장내세균총 분포를 보이는 검체 성상에 따라 장내 *Blastocystis* 분포 역시 다르게 나타남을 알 수 있었다. 더불어 장내 *Blastocystis* 가 존재하는 경우에 상대적으로 장내 세균총의 다양성이 높고, 병원성 세균들과 역상관 관계를 보임을 알 수 있어, *Blastocystis* 존재 여부를 통해 건강한 대변 여부를 판단할 수 있으리라 기대할 수 있었다.

참고문헌

1. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*. 2013;1(5):167-78; doi: 10.1177/2049936113504754.
2. Lepczynska M, Bialkowska J, Dzika E, Piskorz-Ogorek K, Korycinska J. Blastocystis: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(9):1531-40; doi: 10.1007/s10096-017-2965-0.
3. Stensvold CR. Blastocystis: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol*. 2013;3(1):26-34; doi: 10.4103/2229-5070.113896.
4. Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic diversity of blastocystis in livestock and zoo animals. *Protist*. 2013;164(4):497-509; doi: 10.1016/j.protis.2013.05.003.
5. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications. *Acta Trop*. 2013;126(1):11-8; doi: 10.1016/j.actatropica.2012.12.011.
6. Palasuwan A, Palasuwan D, Mahittikorn A, Chiabchalard R, Combes V, Popruk S. Subtype Distribution of Blastocystis in Communities along the Chao Phraya River, Thailand. *Korean J Parasitol*. 2016;54(4):455-60; doi: 10.3347/kjp.2016.54.4.455.
7. Andersen LO, Stensvold CR. Blastocystis in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):524-8; doi: 10.1128/JCM.02520-15.
8. Parfrey LW, Walters WA, Knight R. Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions. *Front Microbiol*. 2011;2:153; doi: 10.3389/fmicb.2011.00153.
9. Scanlan PD, Stensvold CR, Rajilic-Stojanovic M, Heilig HG, De Vos WM, O'Toole PW, et al. The microbial eukaryote Blastocystis is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;90(1):326-30; doi: 10.1111/1574-6941.12396.
10. Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of Blastocystis in healthy Indian individuals. *Infect Genet Evol*. 2015;31:296-9; doi: 10.1016/j.meegid.2015.02.012.
11. Lee H, Seo MG, Oem JK, Kim YS, Lee SY, Kim J, et al. Molecular Detection and

- Subtyping of Blastocystis Detected in Wild Boars (*Sus scrofa*) in South Korea. *J Wildl Dis.* 2020;56(3):662-6; doi: 10.7589/2019-04-092.
12. Paik S, Jung BY, Lee H, Hwang MH, Han JE, Rhee MH, et al. Molecular Detection and Subtyping of Blastocystis in Korean Pigs. *Korean J Parasitol.* 2019;57(5):525-9; doi: 10.3347/kjp.2019.57.5.525.
 13. Lee H, Lee SH, Seo MG, Kim HY, Kim JW, Lee YR, et al. Occurrence and genetic diversity of Blastocystis in Korean cattle. *Vet Parasitol.* 2018;258:70-3; doi: 10.1016/j.vetpar.2018.06.010.
 14. Kim KT, Noh G, Lee H, Kim SH, Jeong H, Kim Y, et al. Genetic Diversity and Zoonotic Potential of Blastocystis in Korean Water Deer, *Hydropotes inermis argyropus*. *Pathogens.* 2020;9(11); doi: 10.3390/pathogens9110955.
 15. Suh S, Lee H, Seo MG, Kim KT, Eo KY, Kwon YS, et al. Molecular Detection and Genetic Diversity of Blastocystis in Korean Dogs. *Korean J Parasitol.* 2022;60(4):289-93; doi: 10.3347/kjp.2022.60.4.289.
 16. Chang T, Jung BK, Shin H, Hong S, Ryoo S, Lee J, et al. Genotypes of Blastocystis sp. among elderly health checkup people in South Korea with a questionnaire on risk factors. *Parasitol Res.* 2021;120(9):3297-306; doi: 10.1007/s00436-021-07274-w.
 17. Kim MJ, Lee YJ, Kim TJ, Won EJ. Gut Microbiome Profiles in Colonizations with the Enteric Protozoa Blastocystis in Korean Populations. *Microorganisms.* 2021;10(1); doi: 10.3390/microorganisms10010034.
 18. Kim MJ, Won EJ, Kim SH, Shin JH, Chai JY. Molecular Detection and Subtyping of Human Blastocystis and the Clinical Implications: Comparisons between Diarrheal and Non-diarrheal Groups in Korean Populations. *Korean J Parasitol.* 2020;58(3):321-6; doi: 10.3347/kjp.2020.58.3.321.
 19. Zhang X, Qiao J, Wu X, Da R, Zhao L, Wei Z. In vitro culture of blastocystis hominis in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *Int J Infect Dis.* 2012;16(1):e23-8; doi: 10.1016/j.ijid.2011.09.012.
 20. Ramirez JD, Sanchez LV, Bautista DC, Corredor AF, Florez AC, Stensvold CR. Blastocystis subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect Genet Evol.* 2014;22:223-8; doi: 10.1016/j.meegid.2013.07.020.
 21. Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;44(7):693-703; doi: 10.1111/apt.13746.
 22. Anuar TS, Al-Mekhlafi HM, Abdul Ghani MK, Abu Bakar E, Azreen SN, Salleh FM, et al. Evaluation of formalin-ether sedimentation and trichrome staining techniques:

- its effectiveness in detecting *Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii* in stool samples. *J Microbiol Methods*. 2013;92(3):344-8; doi: 10.1016/j.mimet.2013.01.010.
23. Mohammad NA, Mastuki MF, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, Anuar TS. Comparative Study of Wheatley's Trichrome Stain and In-vitro Culture against PCR Assay for the Diagnosis of *Blastocystis* sp. in Stool Samples. *Iran J Parasitol*. 2018;13(1):127-36.
 24. Dogruman-Al F, Simsek Z, Boorum K, Ekici E, Sahin M, Tuncer C, et al. Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One*. 2010;5(11):e15484; doi: 10.1371/journal.pone.0015484.
 25. Matovelle C, Tejedor MT, Monteagudo LV, Beltran A, Quilez J. Prevalence and Associated Factors of *Blastocystis* sp. Infection in Patients with Gastrointestinal Symptoms in Spain: A Case-Control Study. *Trop Med Infect Dis*. 2022;7(9); doi: 10.3390/tropicalmed7090226.
 26. Shlim DR, Hoge CW, Rajah R, Rabold JG, Echeverria P. Is *Blastocystis hominis* a cause of diarrhea in travelers? A prospective controlled study in Nepal. *Clin Infect Dis*. 1995;21(1):97-101; doi: 10.1093/clinids/21.1.97.
 27. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog*. 2014;6:17; doi: 10.1186/1757-4749-6-17.
 28. Kumarasamy V, Anbazhagan D, Subramaniyan V, Vellasamy S. *Blastocystis* sp., Parasite Associated with Gastrointestinal Disorders: An Overview of its Pathogenesis, Immune Modulation and Therapeutic Strategies. *Curr Pharm Des*. 2018;24(27):3172-5; doi: 10.2174/1381612824666180807101536.
 29. Frost F, Kacprowski T, Ruhlemann M, Pietzner M, Bang C, Franke A, et al. Long-term instability of the intestinal microbiome is associated with metabolic liver disease, low microbiota diversity, diabetes mellitus and impaired exocrine pancreatic function. *Gut*. 2021;70(3):522-30; doi: 10.1136/gutjnl-2020-322753.
 30. Audebert C, Even G, Cian A, *Blastocystis* Investigation G, Loywick A, Merlin S, et al. Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep*. 2016;6:25255; doi: 10.1038/srep25255.
 31. Andersen LO, Bonde I, Nielsen HB, Stensvold CR. A retrospective metagenomics approach to studying *Blastocystis*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015;91(7); doi: 10.1093/femsec/fiv072.
 32. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al.

- Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691-6; doi: 10.1073/pnas.1005963107.
33. Liu J, Wang M, Chen W, Ma J, Peng Y, Zhang M, et al. Altered Gut Microbiota Taxonomic Compositions of Patients With Sepsis in a Pediatric Intensive Care Unit. *Front Pediatr*. 2021;9:645060; doi: 10.3389/fped.2021.645060.
 34. Betts EL, Newton JM, Thompson GS, Sarzhanov F, Jinatham V, Kim MJ, et al. Metabolic Fluctuations in the Human Stool Obtained from Blastocystis Carriers and Non-Carriers. *Metabolites*. 2021;11(12); doi: 10.3390/metabo11120883.

Distribution and Genotype of Enteric Protozoa *Blastocystis* and their Relationship with Gut Microbiome Profiles in Korean Populations

Moon-Ju Kim

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Chonnam National University

(Supervised by Professor Eun Jeong Won)

(ABSTRACT)

Background: *Blastocystis* is a protozoa recently discovered in the intestine, and there is controversy about its biological and pathophysiological significance. This study aims to investigate the morphological characteristics of separated *Blastocystis* in Korean cohorts, examine the distribution and genotype of *Blastocystis* according to stool properties, and examine the difference in the distribution of gut microbiome according to *Blastocystis*.

Methods: A total of 440 residual stool samples were collected from the Korean cohort. *Blastocystis* was cultured under anaerobic conditions using a liquid culture method. The genotype was analyzed by performing polymerase chain reaction and sequencing targeting the *Blastocystis* Small subunit ribosomal ribonucleic acid (SSU rRNA) gene. Among them, a total of 50 *Blastocystis*-negative (n=25) and positive (n=25) samples were subjected to gut microbiome analysis according to stool pattern and *Blastocystis* colonization. For gut

microbiome analysis, next-generation sequencing (NGS) was performed targeting the V3-V4 region of the bacterial 16S ribosomal gene, and alpha diversity, beta diversity, and linear discriminant analysis effect size (LEfSe) were analyzed.

Results: Of the 440 samples, 42 (9.5%) including 9 (4.0%) diarrheal and 33 (15.3%) non-diarrheal samples were positive for *Blastocystis*. Of the 9 *Blastocystis*-positive diarrheal, ST1, ST2, and ST3 subtypes were 4 (44.5%), 0 (0.0%), and 5 (55.5%), respectively. Of the 33 *Blastocystis*-positive non-diarrheal, ST1, ST2, and ST3 subtypes were observed in 6 cases (18.2%), 2 cases (6%), and 25 cases (75.8%), respectively. As a result of genetic analysis, the ST3 sequences clustered with Mexico, Iran, Poland, and Thailand, ST1 sequences clustered to Mexico, Thailand, and Laos. As a result of analyzing the gut microbiome according to the sample properties, it was found that non-diarrheal showed significantly higher alpha diversity compared to diarrheal, and showed a significantly different beta diversity distribution. The *Blastocystis*-positive showed significantly higher alpha diversity compared to the *Blastocystis*-negative, and it was found that the distribution of beta diversity was significantly different. In particular, at the species level, *Akkermansia*, *Prevotella 9*, and *Faecalibacterium* were more abundant in the *Blastocystis*-positive, whereas *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, and *Enterococcus faecalis* were abundant in the *Blastocystis*-negative. As a result of the LefSe analysis, *Clostridiales*, *Faecalibacterium*, *Prevotella 9*, *Ruminococcaceae* UGG_002, *Rikenellaceae* were particularly abundant in *Blastocystis*-positive, and *Bacilli*, *Lactobacillales*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae* were specific in the *Blastocystis*-negative.

Conclusion: As a result of this study, in the Korean cohort, *Blastocystis* was found more frequently in non-diarrheal stool than in diarrheal stool, and ST3 was found to be the most common subtype. In particular, in the presence of *Blastocystis*, the diversity of intestinal microorganisms is high and has an inverse correlation with pathogenic bacteria, so it can be used as a biomarker representing a healthy intestinal environment in the future.

Table 1. Comparison of *Blastocystis* detection by different medium

samples*	Culture medium	positive result (n)								
		0 day	3 days	7 days	10 days	14 days	17 days	21 days	24 days	27 days
sample 1	Locker's egg solution	2	3	4	3	2	1	1	1	1
	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)									
	10% horse serum	4	2	1	2	2	2	2	2	1
	20% horse serum	5	4	0	2	1	2	2	2	0
	30% horse serum	3	3	2	2	2	2	2	2	1
	10% calf serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20% calf serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30% calf serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sample 2	Locker's egg solution	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)									
	10% horse serum	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	20% horse serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30% horse serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10% calf serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20% calf serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30% calf serum	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Sample 1 contains the higher number of *Blastocystis* per specimen, and sample 2 contains the lower number of *Blastocystis* per specimen, respectively.

Table 2. Result of PERMANOVA test comparing statistical significance between each group

	<i>p</i> -value			
	diarrhea vs. non-diarrhea	<i>Blastocystis</i> negative vs. positive	<i>Blastocystis</i> negative diarrhea vs. non-diarrhea	<i>Blastocystis</i> positive diarrhea vs. non-diarrhea
Bray-Curtis	0.00001	0.00007	0.09142	0.00043
Jaccard	0.00001	0.00005	0.16329	0.00043
Euclidean	0.00219	0.00255	0.18148	0.00087

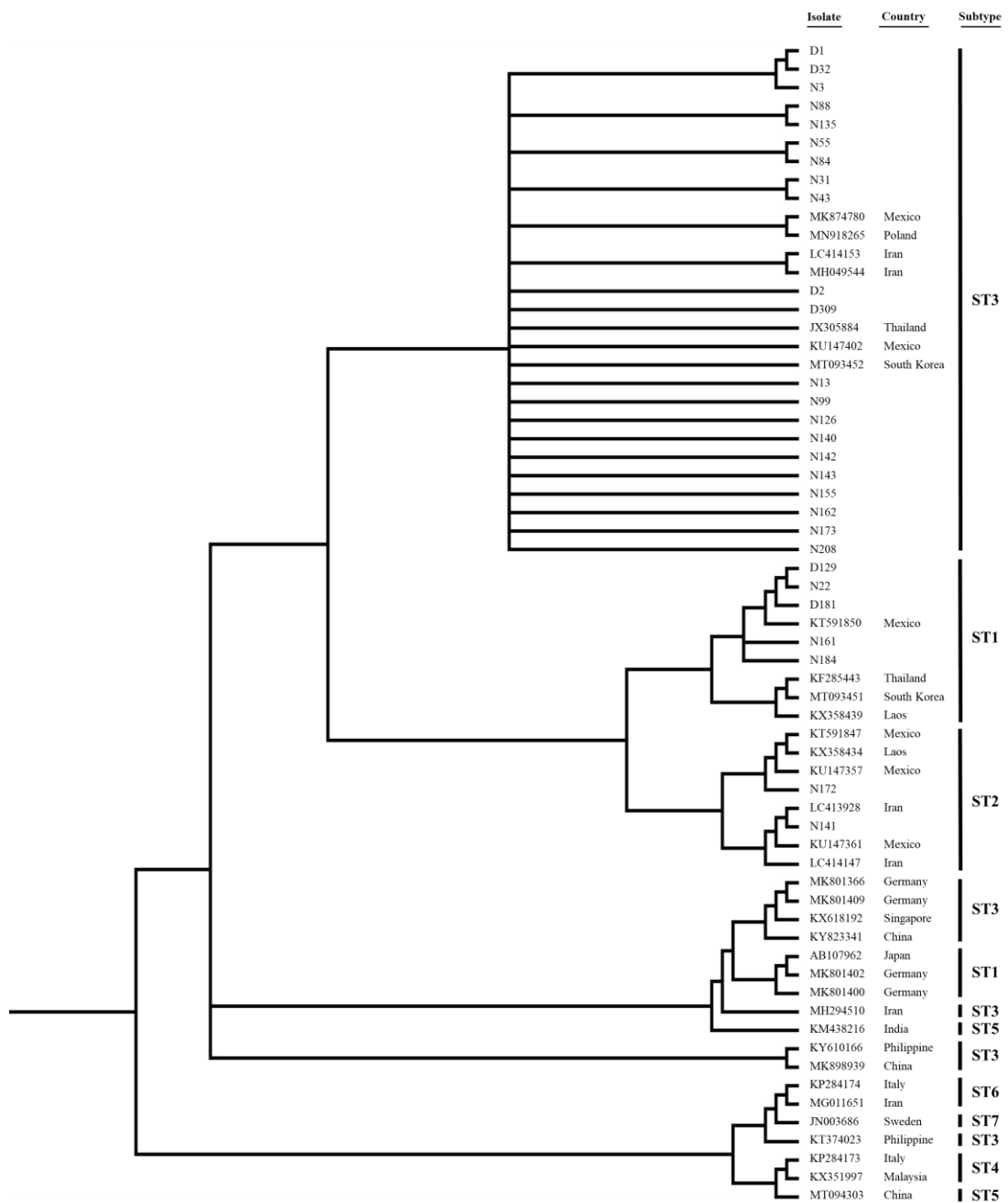


Figure 1. Phylogenetic tree of 28 sequences of *Blastocystis* SSU rRNA gene compared to database *Blastocystis* SSU rRNA genes.

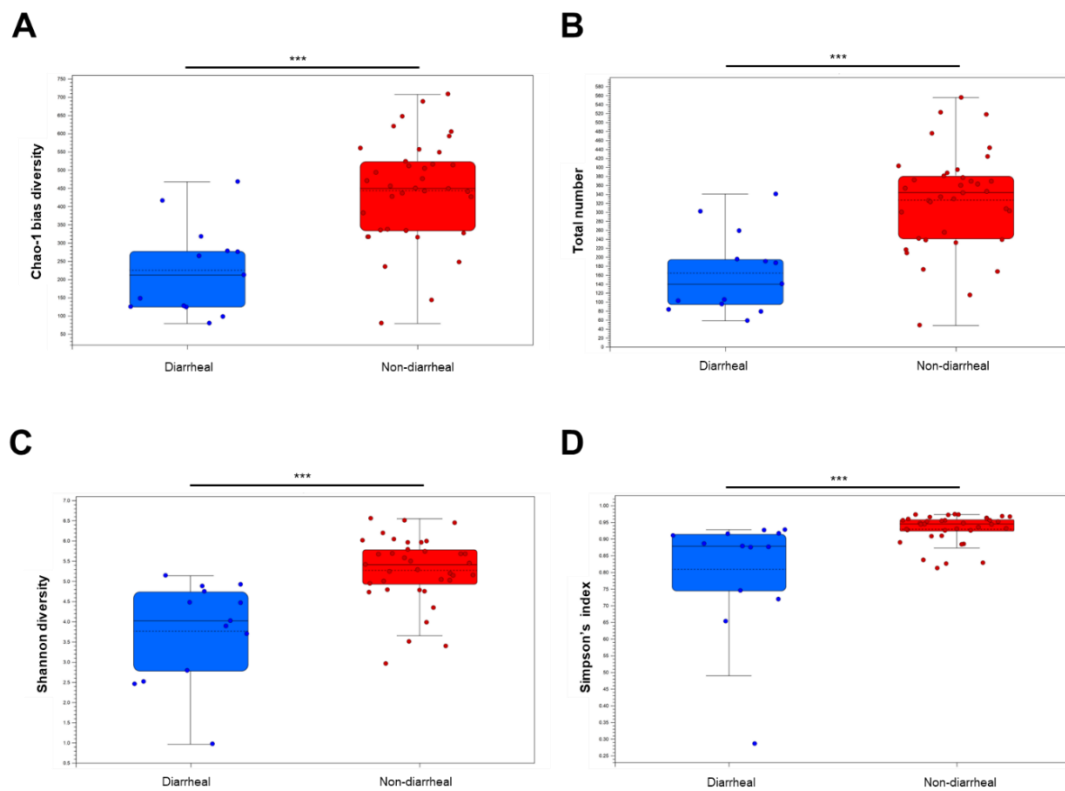


Figure 2. Alpha diversity indices boxplot at the diarrheal and non-diarrheal. (A) Boxplots of the Chao-1 bias index. (B) Boxplots of the Total number index. (C) Boxplots of the Shannon index. (D) Boxplots of the Simpson's index. Statistical analyzes were performed using the Mann-Whitney-Wilcoxon; ***, $p < 0.001$

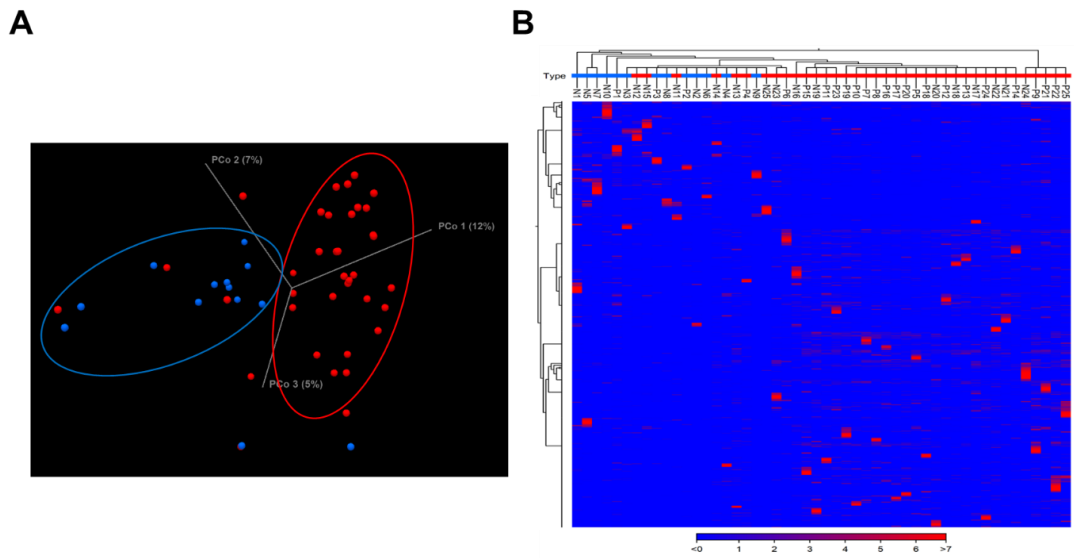


Figure 3. Distinct bacterial community structure in the diarrheal and non-diarrheal. (A) Beta diversity on Principal coordinates analysis (PCoA) of Bray-Curtis distance of the microbial communities in diarrheal (blue) and non-diarrheal (red). Statistical values obtained by the PERMANOVA test. (B) Heatmap of relative abundance in diarrheal (blue) and non-diarrheal (red).

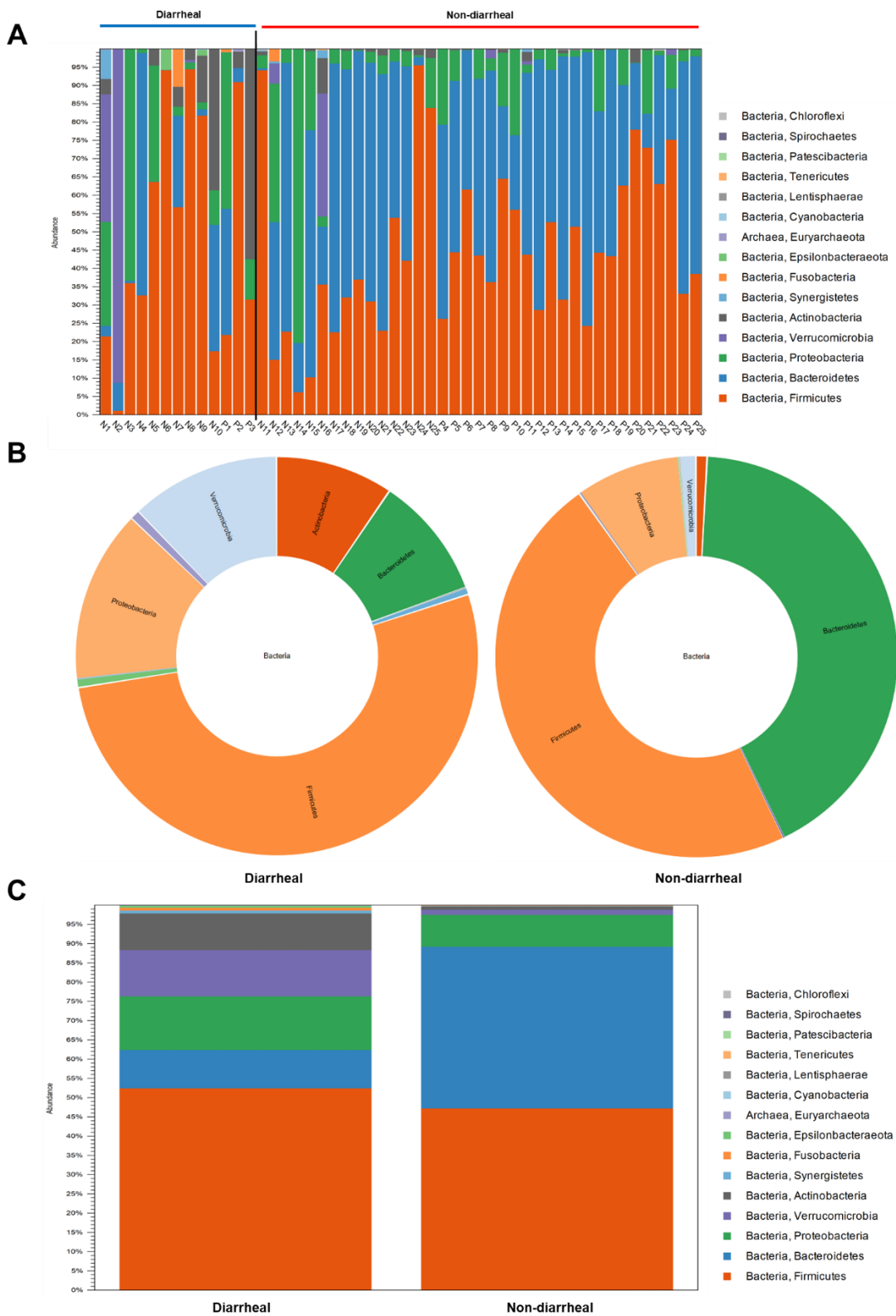


Figure 4. Comparison of the microbial composition according to diarrheal and non-diarrheal at the Phylum level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in diarrheal and non-diarrheal.

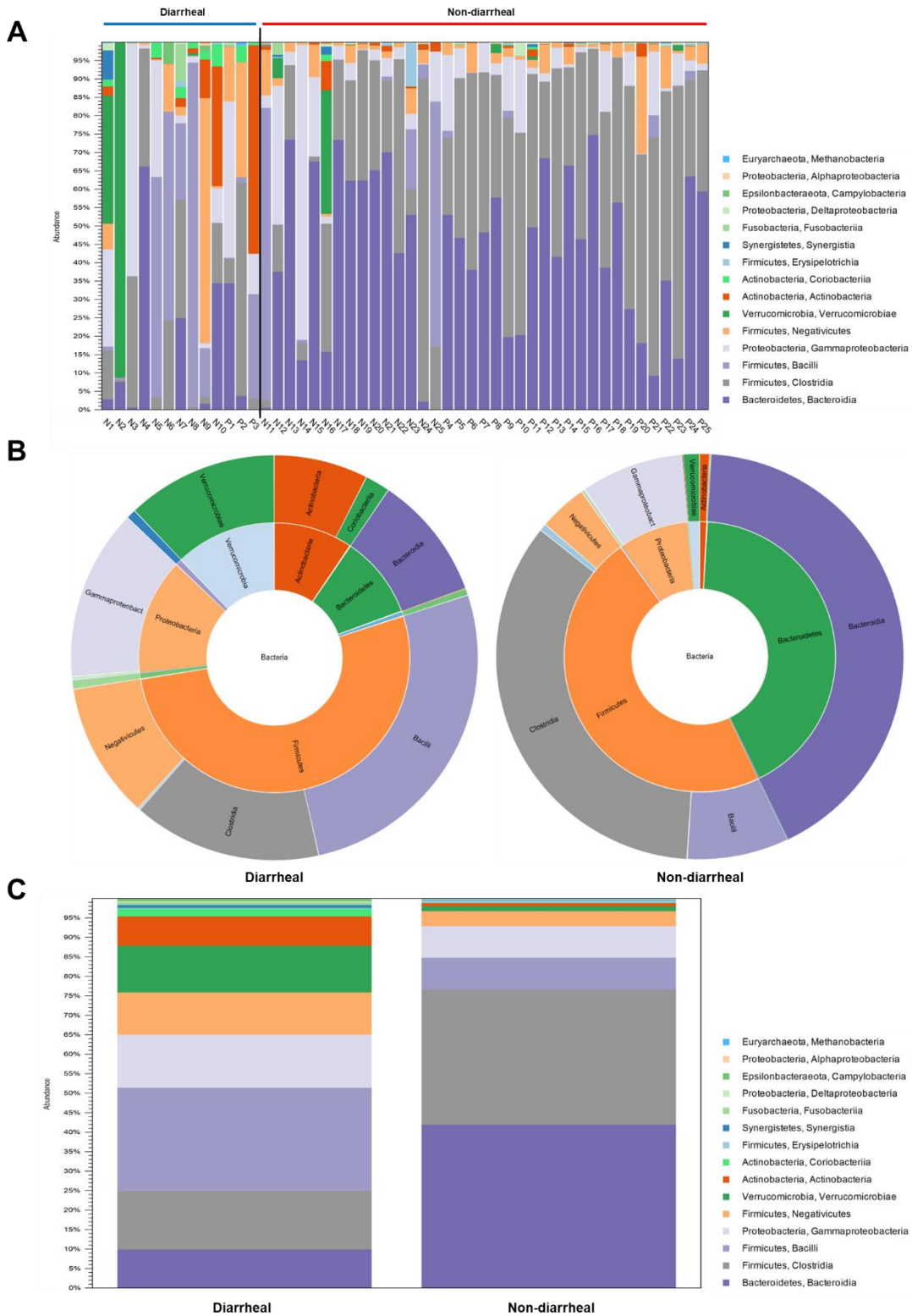


Figure 5. Comparison of the microbial composition according to diarrheal and non-diarrheal at the Class level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in diarrheal and non-diarrheal.

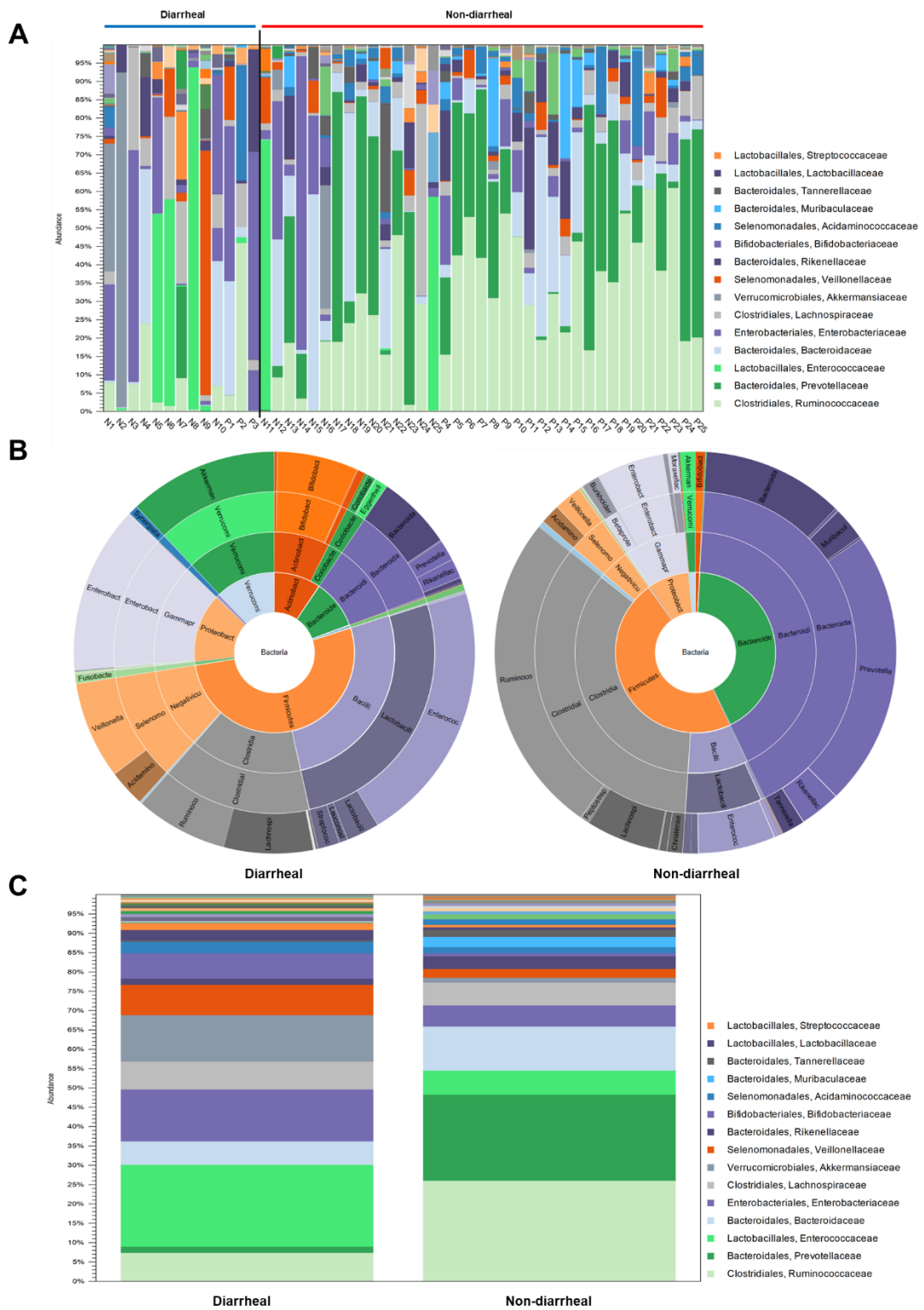


Figure 6. Comparison of the microbial composition according to diarrheal and non-diarrheal at the Family level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in diarrheal and non-diarrheal.

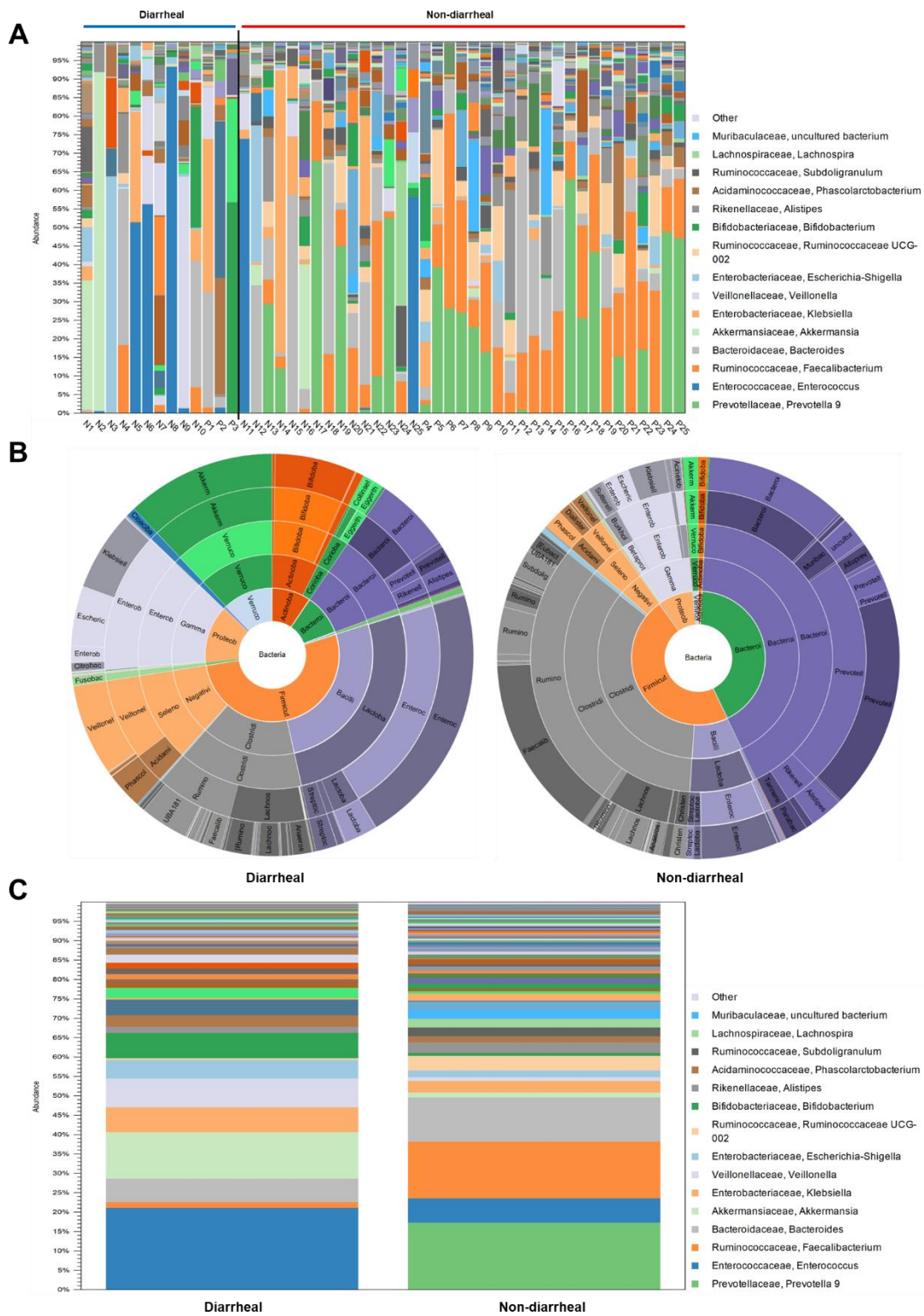
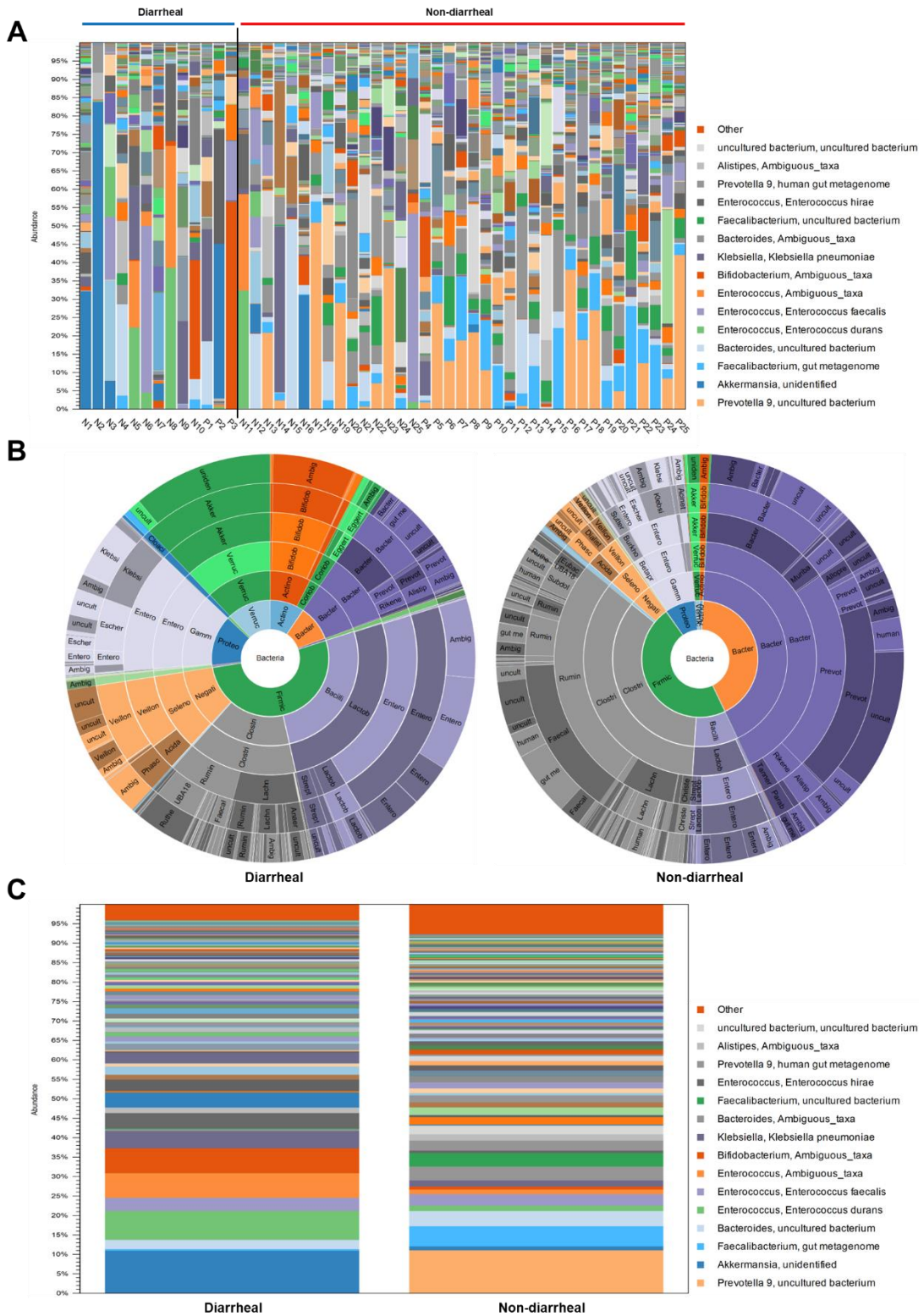


Figure 7. Comparison of the microbial composition according to diarrheal and non-diarrheal at the Genus level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in diarrheal and non-diarrheal.



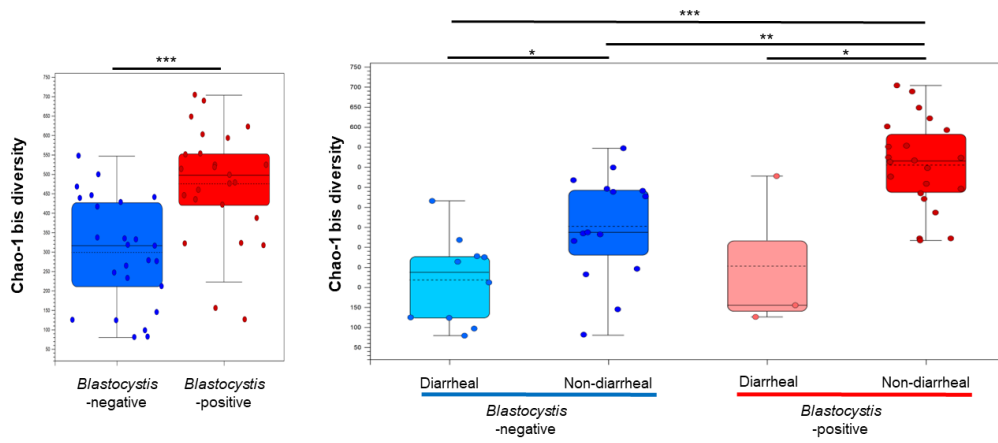
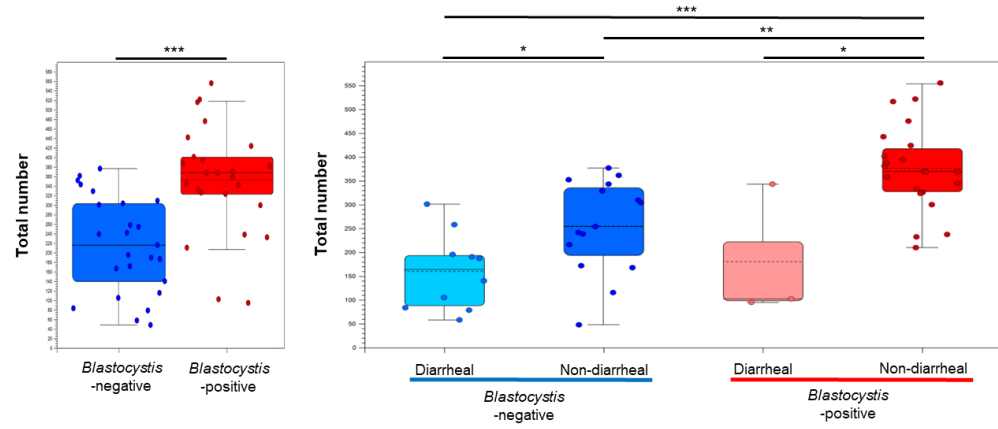
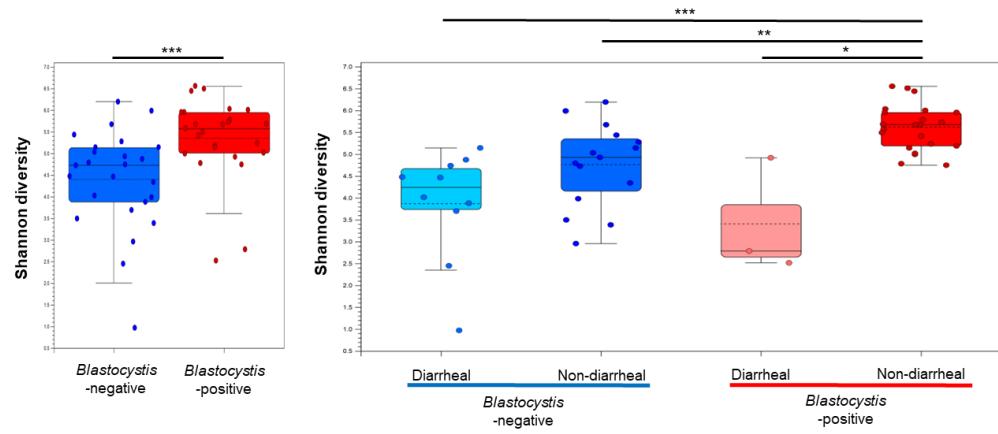
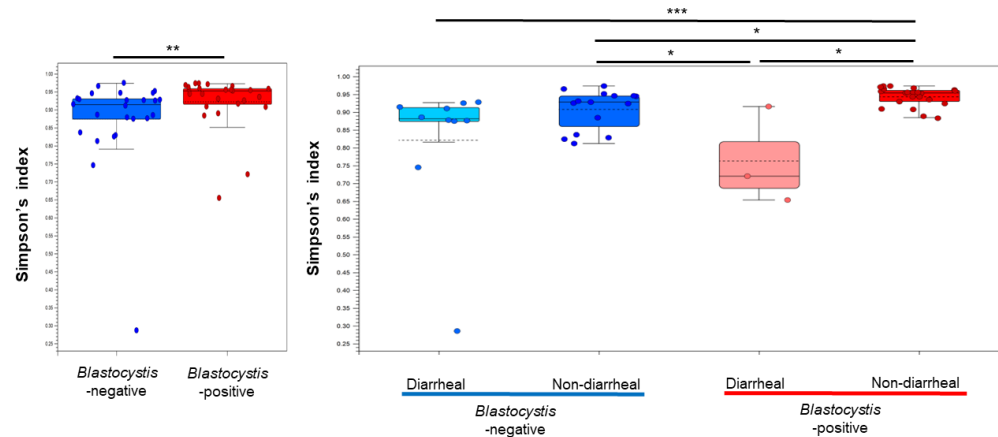
A**B****C****D**

Figure 9. Alpha diversity indices boxplot at the *Blastocystis* colonization and diarrheal type. (A) Boxplots of the Chao-1 bias index. (B) Boxplots of the Total number index. (C) Boxplots of the Shannon index. (D) Boxplots of the Simpson's index. *Blastocystis*-negative diarrheal (sky-blue dots) and non-diarrheal (blue dots) samples; *Blastocystis*-positive diarrheal (pink dots) and non-diarrheal (red dots) samples. Statistical analyzes were performed using the Mann-Whitney-Wilcoxon; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$

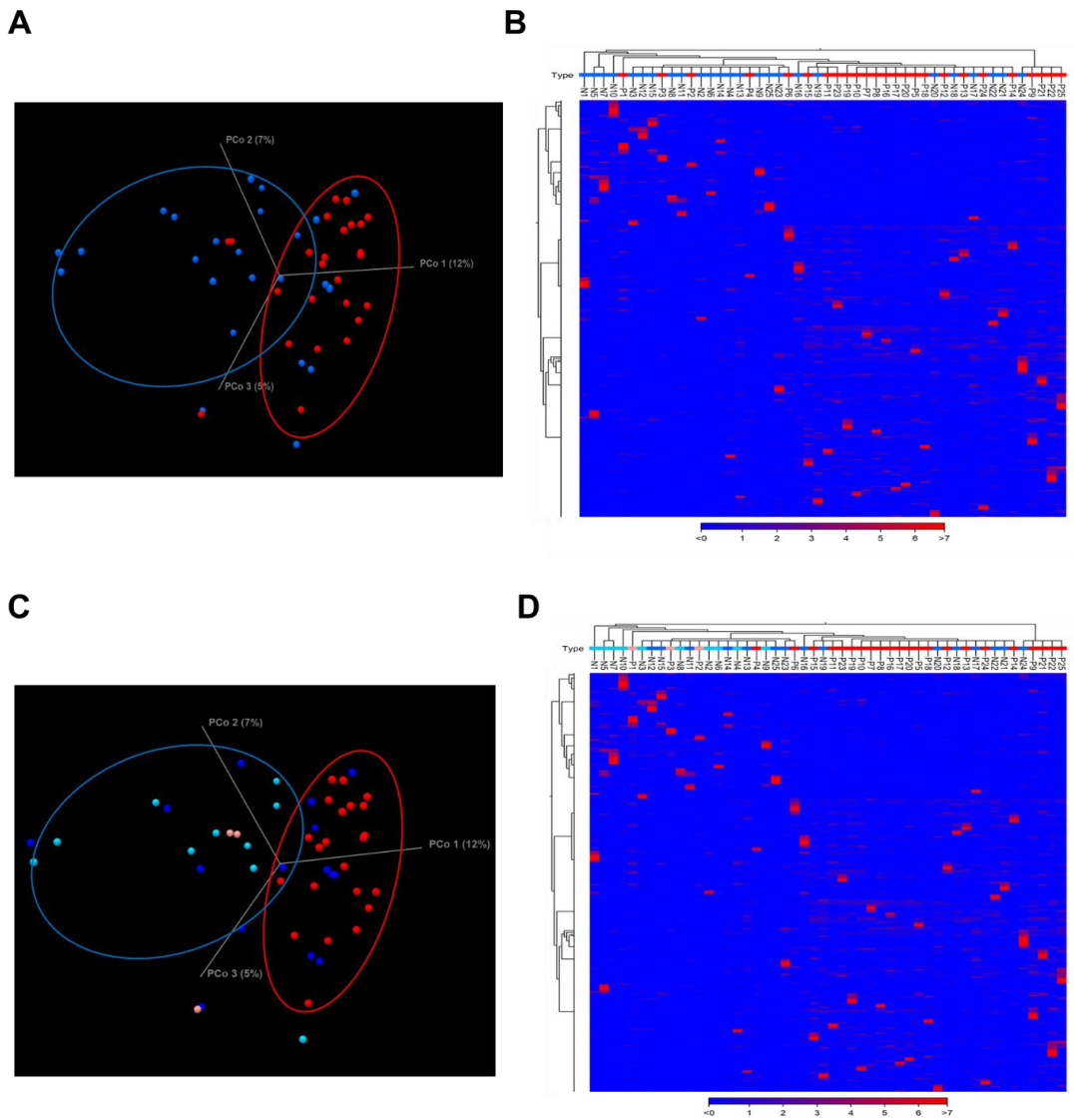


Figure 10. Distinct bacterial community structure at the *Blastocystis* colonization and diarrheal type. (A) Beta diversity on Principal coordinates analysis (PCoA) of Bray-Curtis distance of the microbial communities in *Blastocystis* colonization and diarrheal type. Statistical values obtained by the PERMANOVA test. (B) Heatmap of relative abundance in *Blastocystis* colonization and diarrheal type. *Blastocystis*-negative diarrheal (sky-blue dots) and non-diarrheal (blue dots) samples; *Blastocystis*-positive diarrheal (pink dots) and non-diarrheal (red dots) samples.

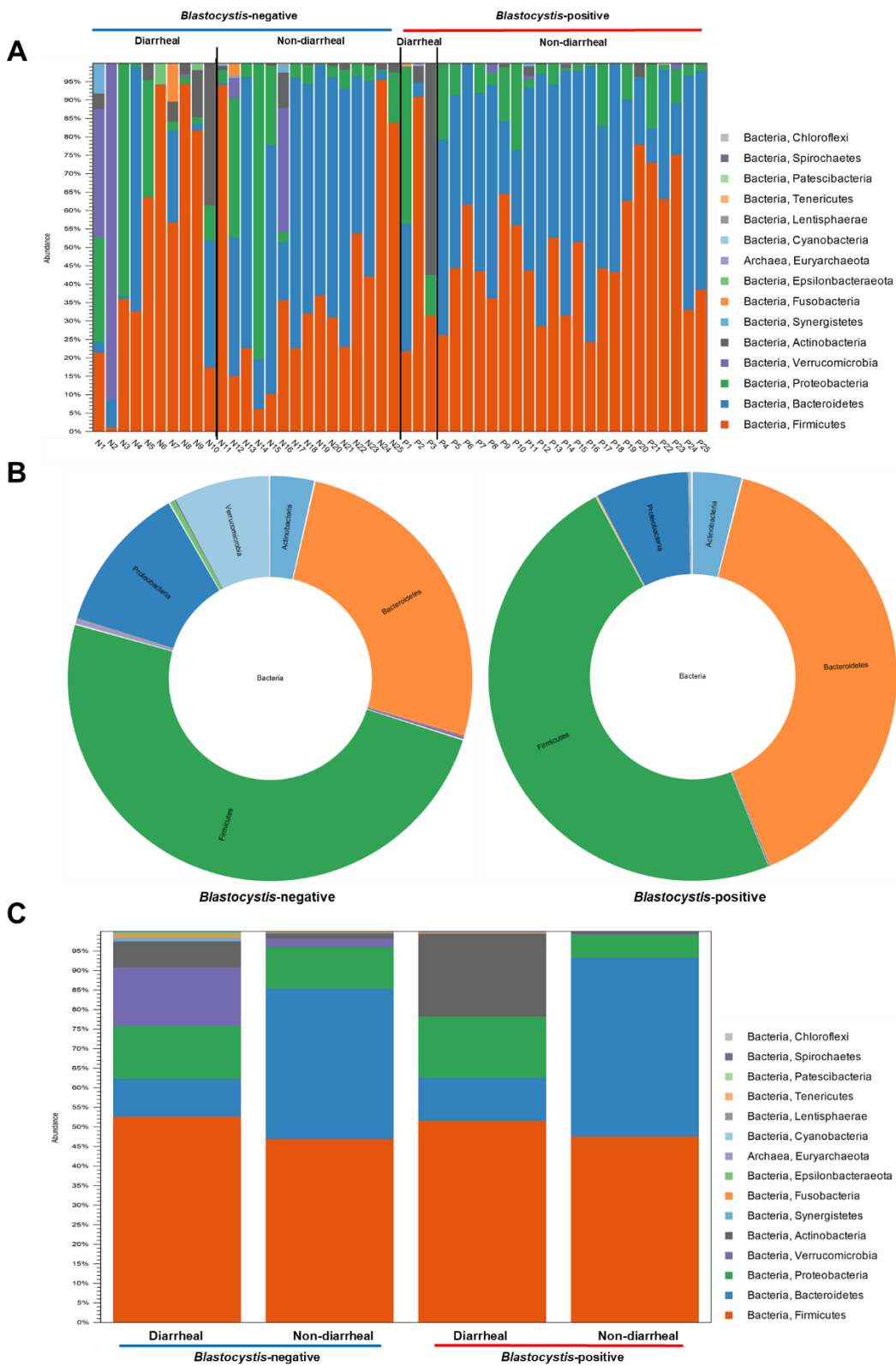


Figure 11. Comparison of the microbial composition according to *Blastocystis* colonization and diarrheal type at the Phylum level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in *Blastocystis*-negative and positive.

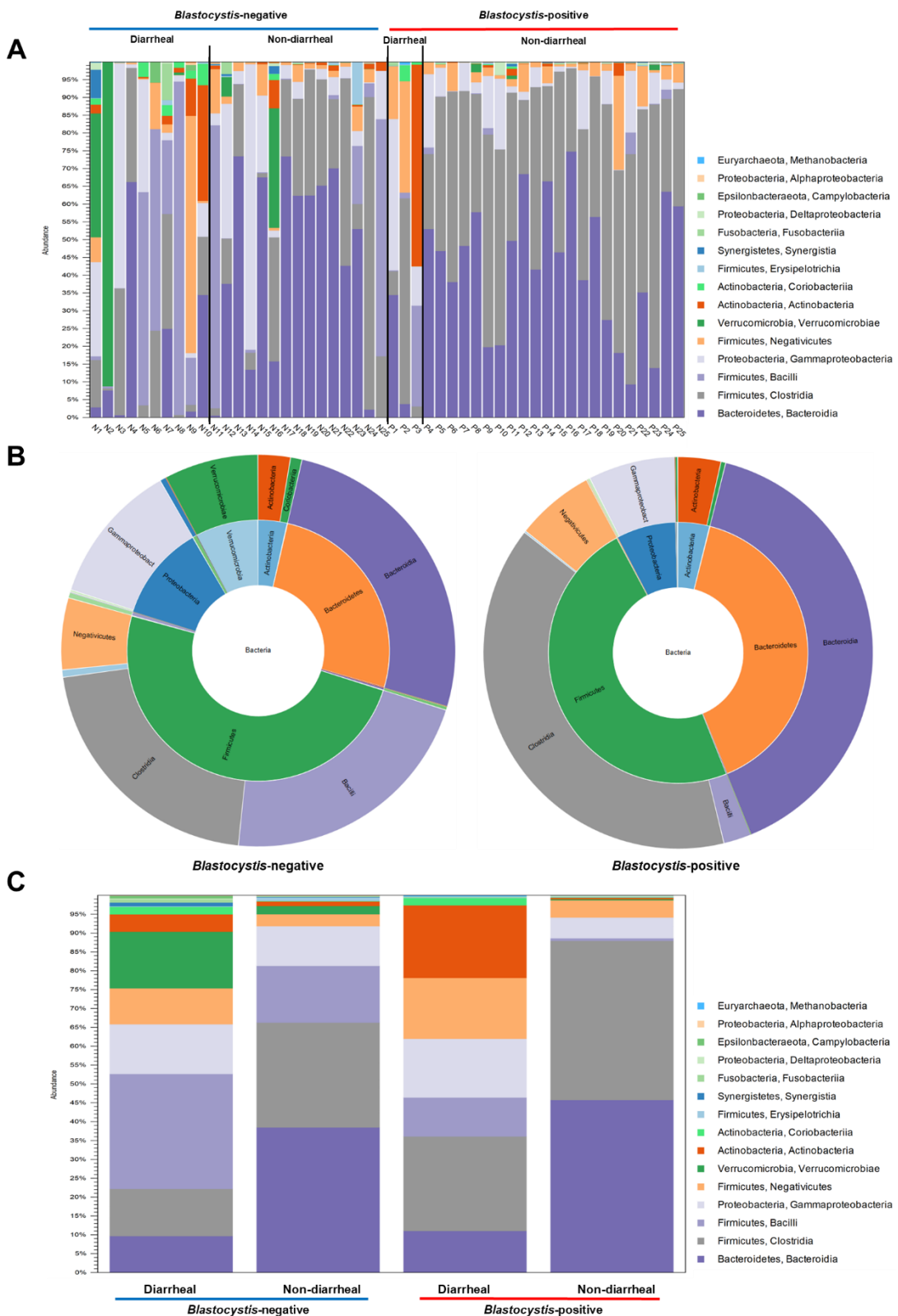


Figure 12. Comparison of the microbial composition according to *Blastocystis* colonization and diarrheal type at the Class level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in *Blastocystis*-negative and positive.

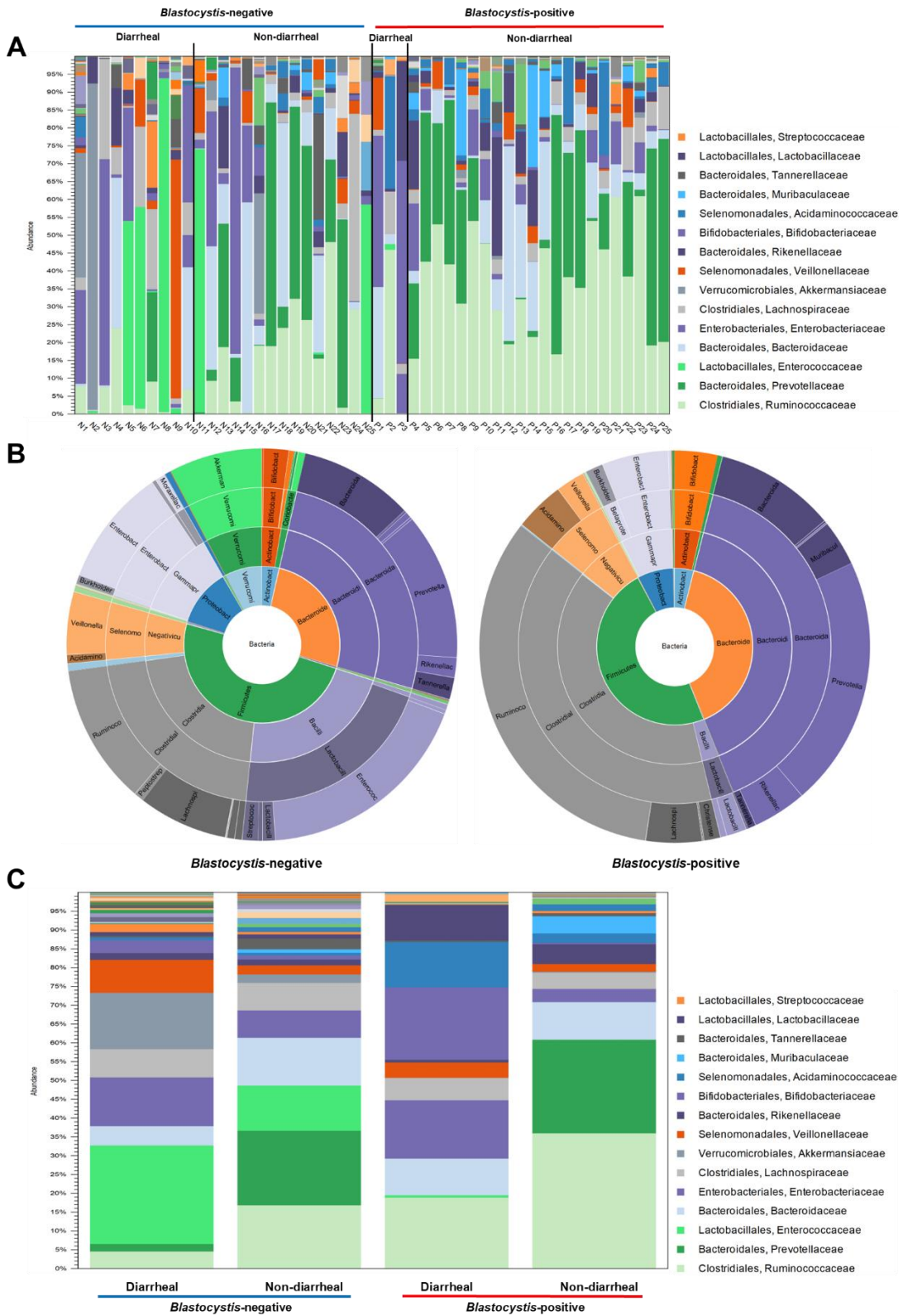


Figure 13. Comparison of the microbial composition according to *Blastocystis* colonization and diarrheal type at the Family level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in *Blastocystis*-negative and positive.

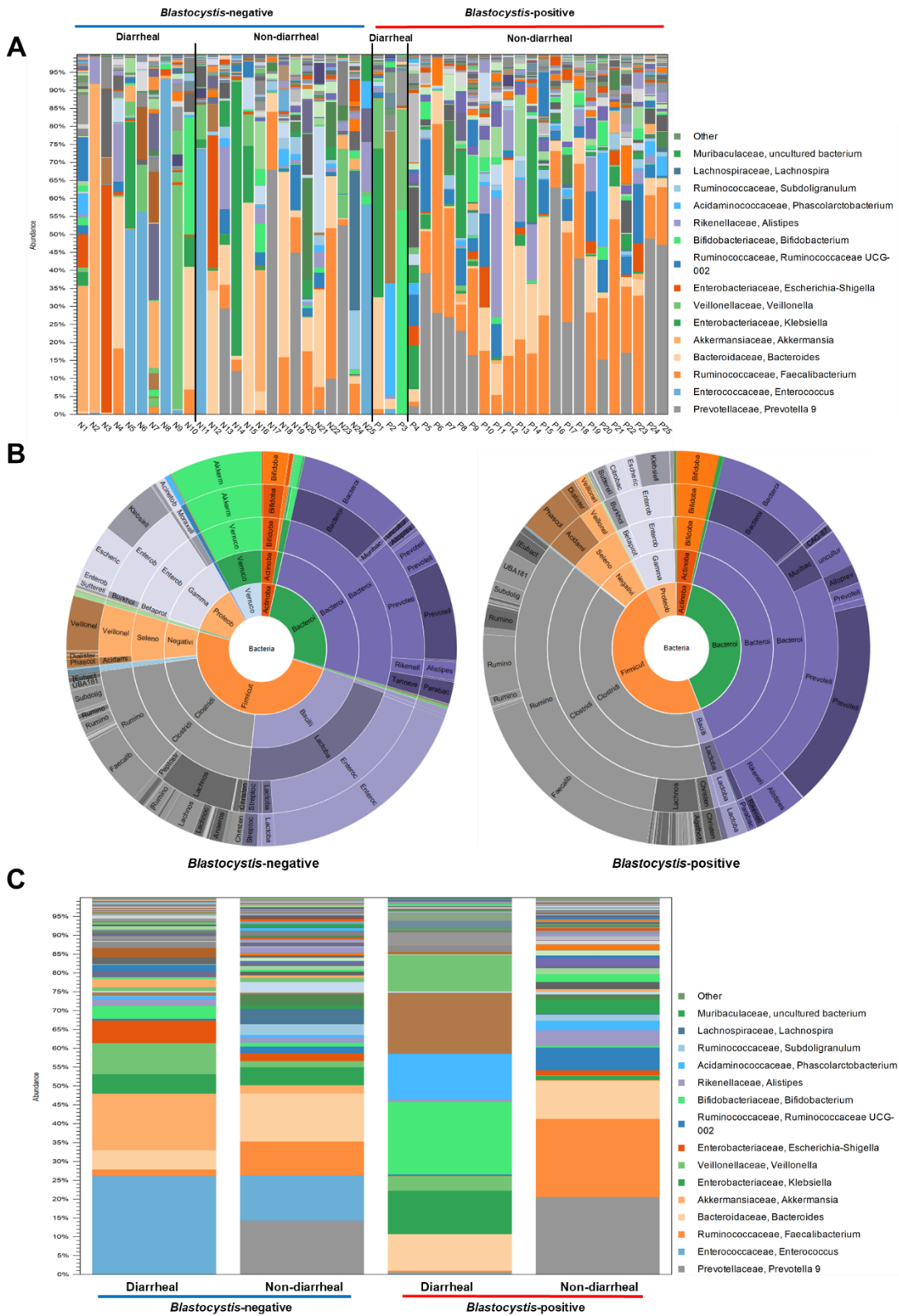


Figure 14. Comparison of the microbial composition according to *Blastocystis* colonization and diarrheal type at the Genus level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in *Blastocystis*-negative and positive.

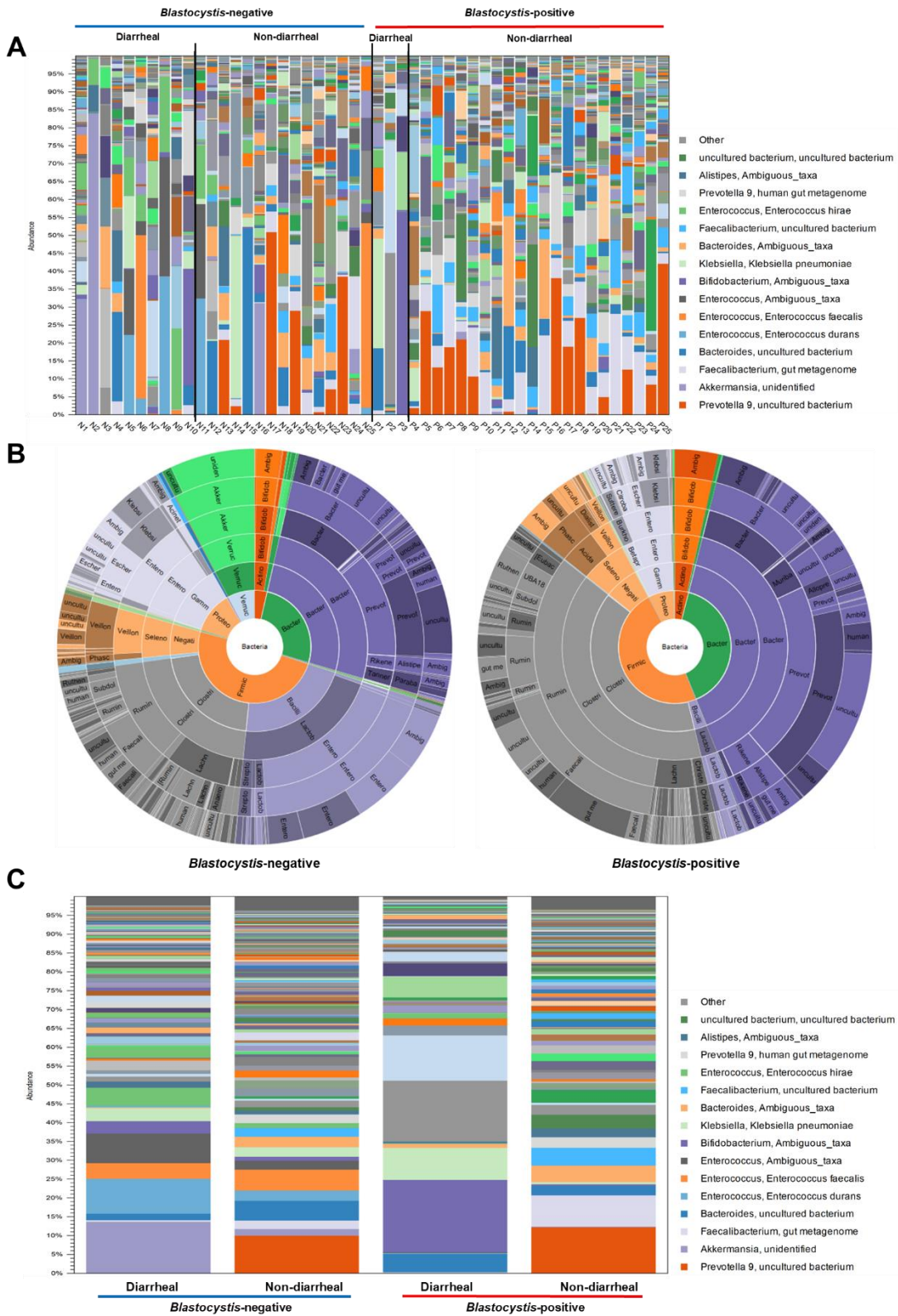


Figure 15. Comparison of the microbial composition according to *Blastocystis* colonization and diarrheal type at the Species level. (A) Bar chart of relative abundance in sample. (B) Round chart and (C) Bar chart of relative abundance in *Blastocystis*-negative and positive.

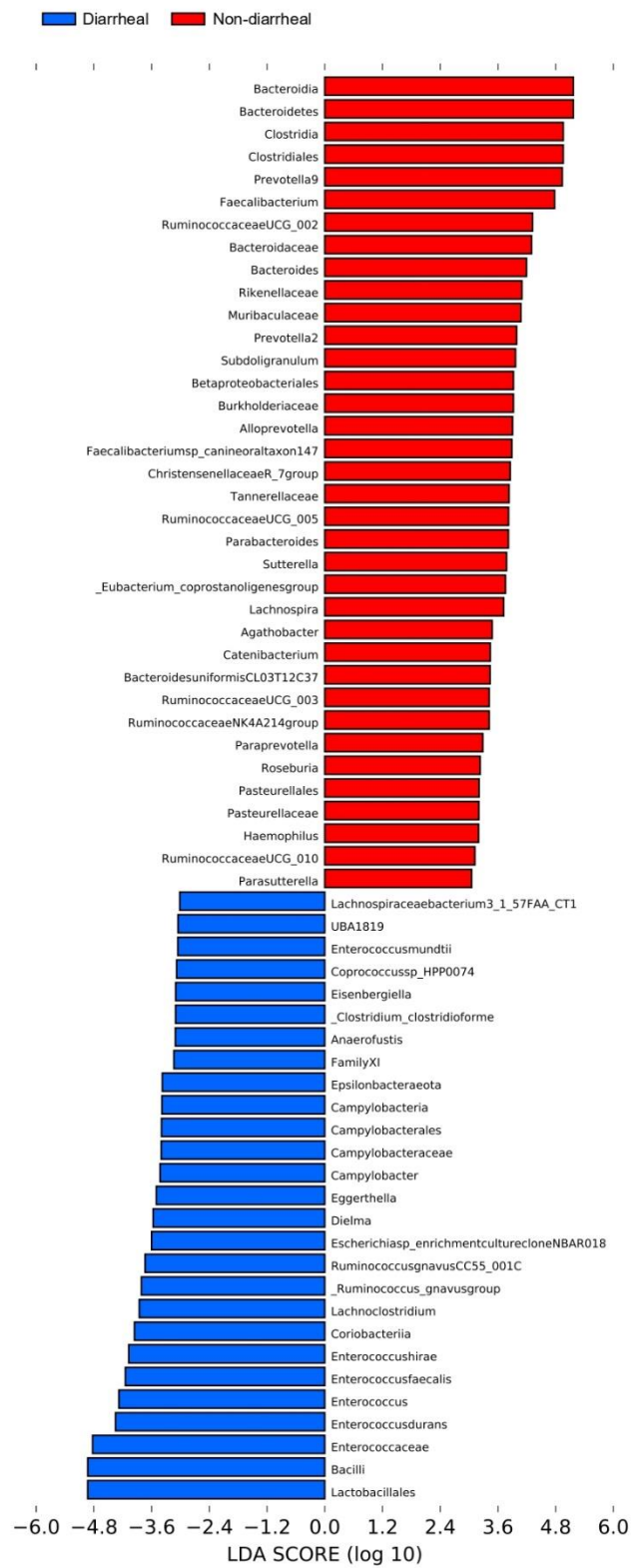


Figure 16. Histogram of the distribution of LDA values at the diarrheal (blue) and non-diarrheal (red). Length denotes effect size. $p = 0.05$, Kruskal–Wallis test; LDA score > 3.0 .

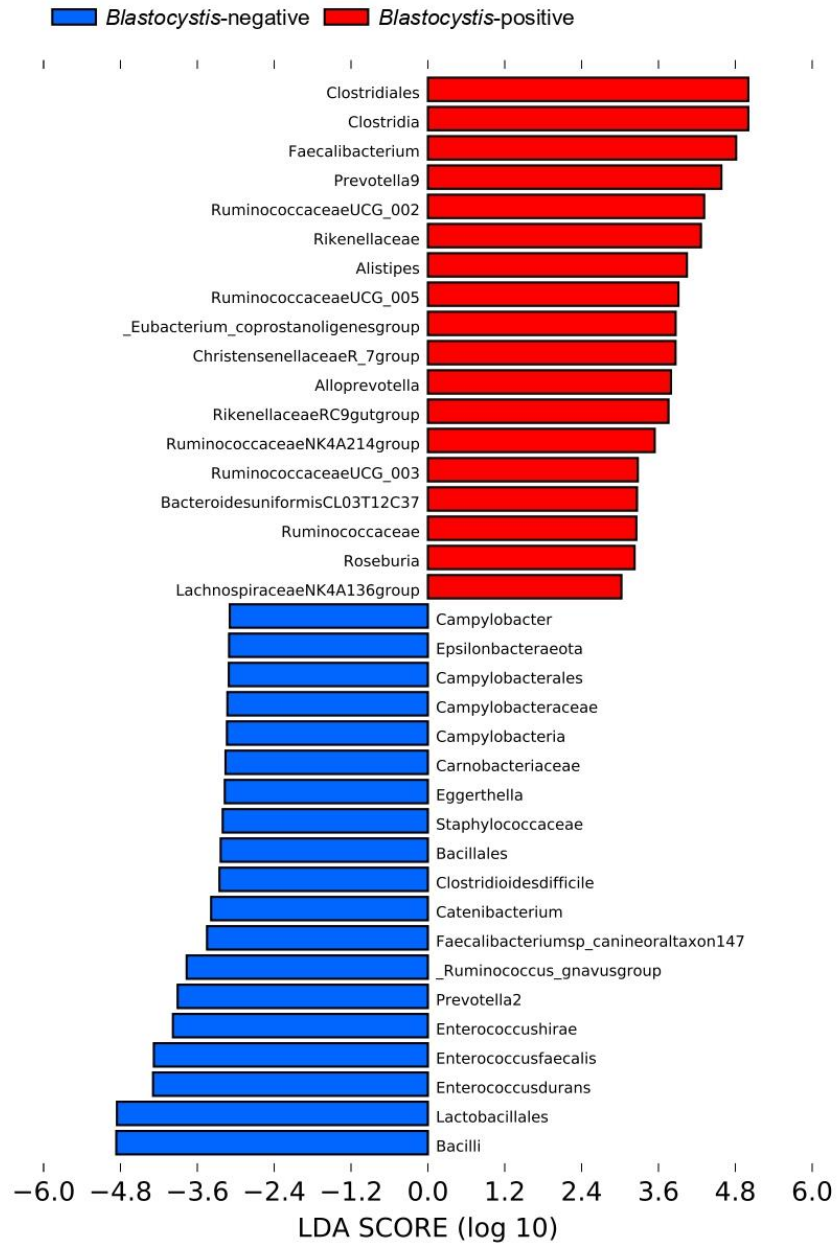


Figure 17. Histogram of the distribution of LDA values at the *Blastocystis*-negative (blue) and *Blastocystis*-positive (red). Length denotes effect size. $p = 0.05$, Kruskal–Wallis test; LDA score > 3.0.

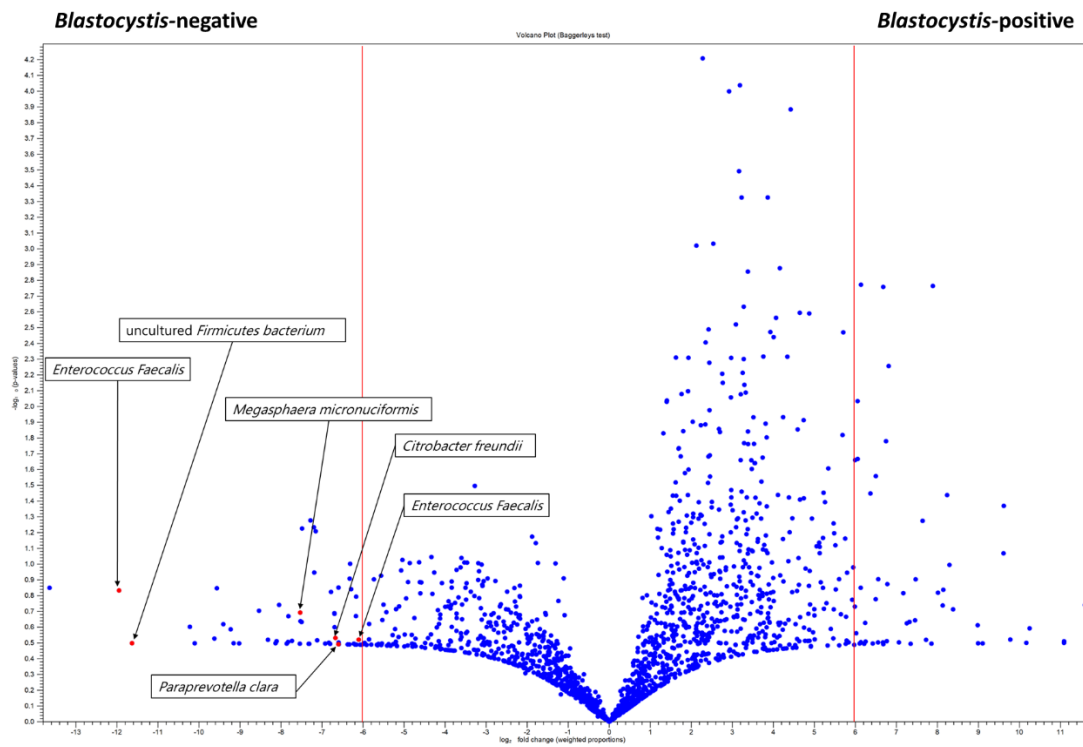


Figure 18. Volcano plot showing bacterial taxa related to *Blastocystis*-negative and *Blastocystis*-positive. Volcano plots were created to show estimated \log_2 -fold differences in OUT abundance between *Blastocystis*-negative and *Blastocystis*-positive.

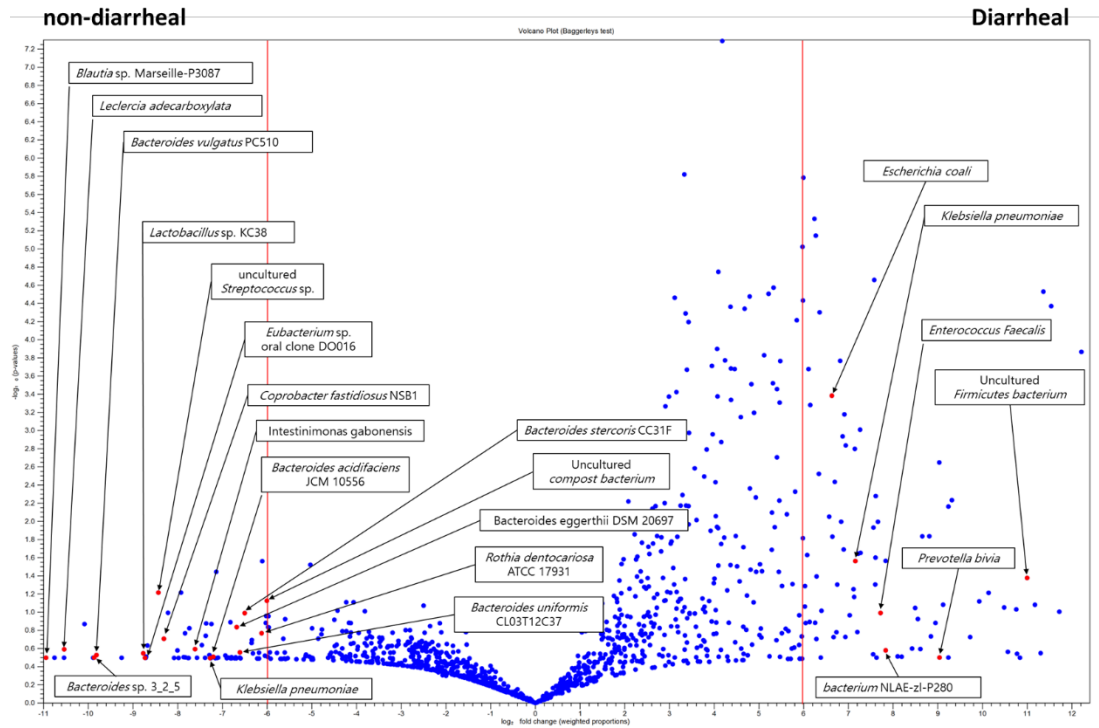


Figure 19. Volcano plot showing bacterial taxa related to diarrheal and non-diarrheal. Volcano plots were created to show estimated log₂-fold differences in OUT abundance between at the diarrheal and non-diarrheal.