Pejouhesh dar Pezeshki *(i.e., Research in Medicine)* **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2024; Vol. 48; No. 2

Study of the Role of *Blastocystis* sp. on Firmicutes and Bacteroidetes in IBS Patients

Alireza Olyaiee[1], Abbas Yadegar[2], Elnaz Sadat Mirsamadi[3], Amir Sadeghi[4], Hamed Mirjalali[2*]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: February 20, 2024; Accepted: June 11, 2024

Abstract

Background and Aim: Irritable bowel syndrome (IBS) is a prevalent gastrointestinal (GI) tract disorder. Although the main reason for IBS is unclear, the interaction between intestinal microorganisms and the gut barrier seems to play an important role in the pathogenesis of IBS. The current study aimed to investigate the effect of *Blastocystis* on the Firmicutes/ Bacteroidetes ratio of IBS patients compared to healthy subjects.

Methods: This is a case- control study. Stool samples were collected from 80 participants, including 40 samples from each IBS and healthy group. Upon DNA extraction from stool samples, barcoding region and quantitative real- time polymerase chain reaction (PCR) were analyzed to investigate *Blastocystis* and the Firmicutes/ Bacteroidetes ratio, respectively. Student T-test, Shapiro- Wilk, Mann- Whitney, and Wilcoxon were employed to analyze data.

Results: The value of Firmicutes was increased in IBS patients (14.52 ± 3.04) compared to healthy controls (12.83 ± 2.19). Regarding *Blastocystis*, Firmicutes were higher than other groups (14.238 ± 3.836). The value of Bacteroidetes in IBS patients (8.11 ± 1.69) was higher than healthy controls (7.62 ± 1.62). Regarding *Blastocystis*, the changes in IBS patients with *Blastocystis* were higher than other groups (8.27 ± 1.79). The changes in the Firmicutes/ Bacteroidetes ratio were not significant in different groups.

Conclusion: The present study revealed that the changes in bacteria were not significant between IBS and healthy controls. In addition, *Blastocystis* does not change the abundance of bacteria in IBS and healthy subjects. More studies are needed to clear the effect of *Blastocystis* on gut microbiota.

Keywords: IBS; *Blastocystis*; Fecal microbiota; Firmicutes; Bacteroidetes

Please cite this article as: Olyaiee A, Yadegar A, Mirsamadi E, Sadeghi A, Mirjalali H. Study of the Role of *Blastocystis* sp. on Firmicutes and Bacteroidetes in IBS Patients. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(2):37-49.

[*]**Corresponding Author:** Hamed Mirjalali; **Email:** hamedmirjalali@sbmu.ac.ir

Foodborne and Waterborne Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۸، شماره ۲، سال ۱۴۰۳ شمسی، صفحات ۳۷ تا ۴۹

بررسی نقش انگل *بلاستوسیستیس* بر باکتری‌های Firmicutes و Bacteroidetes در افراد مبتلا به IBS

علیرضا اولیائی[۱]، عباس یادگار[۲]، النازسادات میرصمدی[۳]، امیر صادقی[۴]، حامد میرجلالی[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۴- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۲

چکیده

سابقه و هدف: سندرم روده تحریک پذیر (IBS) یک اختلال عملکردی شایع دستگاه گوارش (GI) است. اگرچه دلیل اصلی بیماری IBS هنوز به طور کامل مشخص نیست، ولی به نظر می‌رسد تعامل بین میکروارگانیسم‌های روده، دستگاه گوارش و سد روده نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر *بلاستوسیستیس* روی فراوانی Firmicutes و Bacteroidetes در بیماران IBS در مقایسه با افراد سالم انجام شد.

روش کار: این مطالعه یک بررسی مورد شاهدی بود. برای این منظور، نمونه مدفوع از ۸۰ شرکت کننده شامل ۴۰ نمونه از هر گروه IBS و سالم بود، جمع‌آوری شد. هر یک از گروه‌های مذکور شامل دو زیر گروه ۲۰ نفره (افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* و افراد فاقد انگل *بلاستوسیستیس*) بودند. پس از استخراج DNA از نمونه‌های مدفوع، بررسی barcoding region و real- time PCR کمی به ترتیب برای بررسی حضور *بلاستوسیستیس* و فراوانی میکروبیوتا انجام شد. در نهایت تمامی داده‌های به دست آمده از این مطالعه توسط تست‌های Shapiro- Wilk ، آزمون Student t-test، من ویتنی و ویلکاکسون بررسی شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه در بیماران مبتلا به IBS فراوانی باکتری Firmicutes (۱۴/۵۲ ± ۳/۰۴) بیشتر از گروه کنترل بود (۱۲/۸۳ ± ۲/۱۹). فراوانی باکتری در بیماران مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* نسبت به گروه افراد سالم (گروه کنترل) افزایش یافته بود (۱۴/۲۳۸ ± ۳/۸۳۶). در مورد باکتری Bacteroidetes میزان این باکتری در افراد مبتلا به IBS (۸/۱۱ ± ۱/۶۹) بیشتر از افراد سالم (۷/۶۲ ± ۱/۶۲) بود. با در نظر گرفتن *بلاستوسیستیس* میزان این باکتری در افراد با IBS و مبتلا به *بلاستوسیستیس* بیشتر از سایر گروه ها بود (۸/۲۷ ± ۱/۷۹). تغییرنسبت Firmicutes/ Bacteroidetes در گروه‌های مختلف معنادار نبود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه با وجود تغییر بین بیماران مبتلا به IBS و افراد سالم، تفاوت معنادار نبود. همچنین حضور بلاستوسیستیس تغییر معناداری روی نسبت Firmicutes/ Bacteroidetes در افراد تحت مطالعه نداشت. با این حال به نقش این تک یاخته روی باکتری‌های دستگاه گوارش باید بیشتر توجه شود.

واژگان کلیدی: میکروبیوتا، سندروم روده تحریک پذیر، *بلاستوسیستیس*؛ Firmicutes؛ Bacteroidetes

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Olyaiee A, Yadegar A, Mirsamadi E, Sadeghi A, Mirjalali H. Study of the Role of *Blastocystis* sp. on Firmicutes and Bacteroidetes in IBS Patients. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(2):37-49.

***نویسنده مسئول مکاتبات:** حامد میرجلالی؛ **آدرس پست الکترونیکی:** hamedmirjalali@sbmu.ac.ir
مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از غذا و آب، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

CC BY NC

مقدمه

سندروم روده تحریک‌پذیر (IBS) یک بیماری شایع در بین مردم سراسر جهان است. این بیماری یک نوع اختلال عملکردی است و عوامل مختلفی مانند اختلال عصبی، عوامل ژنتیکی و عوامل اپی‌ژنتیکی می‌توانند در بروز این بیماری تأثیرگذار باشند (۱). امروزه محققان این بر این باور هستند که ممکن است به هم ریختن چیدمان میکروبی روده (Disbyosis) در ابتلا به بیماری IBS تأثیرگذار باشد. تغییر در چیدمان و عملکرد میکروبیوتای روده ممکن است روی دستگاه ایمنی روده تأثیر گذاشته و سبب ایجاد یک حالت پیش التهابی شده و این احتمال وجود دارد که روی بیماری IBS نقش داشته باشد. با این حال هنوز دلیل اصلی این بیماری به طور کامل شناخته شده نیست (۲).

بیش از ۹۰درصد میکروبیوتای دستگاه گوارش معادل حدود ۹۳درصد جمعیت این میکرواورگانیسم‌ها را باکتری‌های ساکن روده تشکیل می‌دهند. در حدود ۵/۸درصد از این میکرو اورگانیسم‌ها را ویروس‌ها ، حدود ۰/۵درصد را یوکاریوت‌ها تشکیل و حدود ۰/۸درصد را مخمرها تشکیل می‌دهند (۳). میکروبیوتای روده از چهار فیلوم اصلی باکتری (Firmicutes، Bacteroidetes، Proteobacteria و Actinobacteria) تشکیل شده است، امّا بیشتر آنها Firmicutes یا Bacteroidetes هستند (۴). میکروبیوتای اکثر افراد شامل دو دومین اصلی به نام Firmicutes و Bacteroidetes است که در اکثر افراد بیشترین سرشاخه باکتریایی را تشکیل می‌دهند (۵). مطالعه‌های اولیه نمایان‌گر این موضوع است که میکروبیوتای روده افراد مبتلا به بیماری IBS با افراد سالم متفاوت است. برای مثال در مطالعه‌ای نشان داده شده است که در بیماران مبتلا به IBS باکتری‌هایی چون *Lactobacilli* و *Bifidobacteria* کاهش و *Escherichia coli* و *Enterobacter* افزایش یافته‌اند (۶). برخی محققان بر این باور هستند که تنوع میکروبی میکروبیوتای روده در افراد مبتلا به IBS کاهش یافته و یا در فیلوم باکتریایی افراد مبتلا به IBS در مقایسه با افراد سالم تغییرهایی به وجود می‌آید. به عنوان مثال نشان داده شده است که میزان Firmicutes و Bacteoridetes در افراد با IBS افزایش می‌یابد، اما این اطلاعات هنوز به طور کلی به اثبات نرسیده است (۷). به طور کلّی چیدمان میکروبیوتای روده در افراد مبتلا به IBS دستخوش تغییر می‌شود به این صورت که diversity برخی از باکتری‌ها کاهش یافته و برخی از فیلوم باکتری‌ها دستخوش تغییر شده و نسبت Firmicutes به Bacteroidetes افزایش می‌یابد (۸).

اگرچه یوکاریوت‌ها کمتر از۱درصد میکروبیوتای روده را تشکیل می‌دهند، امّا آنالیزهای مولکولی نشان می‌دهند که حدود ۳۷ گونه از یوکاریوت‌ها که شامل *بلاستوسیستیس* ، ۱۸ گونه گیاهی و ۱۸ گونه قارچی هستند، در افراد سالم یافت می‌شود (۹). بر اساس مطالعه‌های انجام شده توسط محققان، *بلاستوسیستیس* ۲/۳ برابر بیشتر از انگل‌های دیگر در مدفوع افراد مبتلا به IBS یافت شده است (۱۰). همچنین این تک‌یاخته بیشتر از سه برابر در افراد مبتلا به IBS دارای نوع مدفوع اسهال در مقایسه با افراد سالم در گروه کنترل گزارش شده است (۱۱). محققان بر این باور هستند که *بلاستوسیستیس* می‌تواند از طریق تغییر در میکروبیوتای دستگاه گوارش در بیماری IBS تأثیرگذار باشد (۱۲). بر همین اساس، این مطالعه در سال ۱۴۰۰-۱۴۰۱ برای بررسی تأثیر انگل *بلاستوسیستیس* بر تغییر باکتری‌های Firmicutes و Bacteroidetes در افراد مبتلا IBS مراجعه‌کننده به کلینیک گوارش در تهران انجام شده است.

روش کار

الزامات اخلاقی

تمامی پروتکل‌های آزمایشی به کار گرفته شده در این مطالعه، مطابق با اصول اخلاقی و هنجارها و استانداردهای ملّی برای انجام تحقیق‌های پزشکی در ایران انجام شده است. این مطالعه با استانداردهای اخلاقی (IR.IAU.SRB.REC.1400.241) منتشر شده که توسط کمیته بازبینی اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران تایید شده است. همچنین رضایت آگاهانه از همه شرکت‌کنندگان و یا قیم‌های قانونی(برای بیماران کمتر از ۱۶ سال) آنها اخذ شد.

نمونه‌برداری و استخراج DNA

در این مطالعه مورد شاهدی که در سال ۱۴۰۰الی ۱۴۰۱ انجام شده است، جامعه آماری مورد مطالعه به این شرح تعریف شده است که نمونه مدفوع از ۸۰ شرکت‌کننده شامل ۴۰ نمونه از هر گروه IBS و سالم در کلینیک فوق تخصصی گوارش بهبود تهران پس از تأیید پزشکان متخصص جمع‌آوری شد. برای تجزیه و تحلیل اثر *بلاستوسیستیس* روی Firmicutes و Bacteroidetes (از اجزای میکروبیوتای روده) چهار گروه برای مطالعه شامل ۲۰ نمونه برای هر بیمار IBS *بلاستوسیستیس* مثبت، بیماران IBS *بلاستوسیستیس* منفی، افراد سالم *بلاستوسیستیس* مثبت و افراد سالم *بلاستوسیستیس* منفی در نظر گرفته شدند (۱۰, ۱۳-۱۶). تمام نمونه‌های مدفوع از نظر وجود انگل *بلاستوسیستیس* با استفاده از روش مستقیم توسط میکروسکوپ بررسی شدند. وجود *بلاستوسیستیس* در نمونه‌های مدفوع با استفاده از تقویت ناحیه بارکدینگ از طریق ژن زیر واحد کوچک ریبوزومی RNA (SSU rRNA) تأیید شد (۱۷). وجود سایر کیست‌ها/اووسیست‌ها/تخم‌ها در نمونه‌های مدفوع به عنوان معیارهای خروج در نظر گرفته شده است. کنترل سالم از آن دسته از افرادی که یا قصد شرکت در مطالعه ما و یا مراجعه به آزمایشگاه برای چکاپ دوره‌ای را داشتند، جمع آوری شد. افراد سالم از هیچ‌گونه اختلال گوارشی شکایت نداشتند و کسانی که از هر گونه مشکل گوارشی رنج می‌بردند از مطالعه حذف شدند. اطلاعات دموگرافیک، مصرف دارو، ظاهر مدفوع در زمان نمونه‌گیری و علایم حین نمونه‌گیری ثبت شد. وجود IBS توسط متخصصان گوارش و مصرف هر کدام تأیید شد. وجود بیماری IBS در افراد توسط متخصصان گوارش تأیید شد و مصرف هر گونه آنتی‌بیوتیک، داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، الکل، پیروی از رژیم غذایی خاص و وجود هر گونه نقص ایمنی به عنوان معیار خروج از این مطالعه در نظر گرفته شد (افرادی که از رژیم غذایی خاصی پیروی می‌کردند، افرادی که از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می کردند، افرادی که از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی استفاده می‌کردند، افرادی که الکل مصرف می‌کردند، افرادی که دارای هر نقص ایمنی بودند، افرادی که داروی خاصی مصرف می‌کردند، افراد دارای بیماری‌های خاص، افراد دارای نقص سیستم ایمنی، افرادی که از پروبیوتیک‌ها استفاده می‌کردند و افراد سیگاری از مطالعه خارج شدند. علاوه بر این، در گروه افراد سالم، وجود هرگونه علایم گوارشی به عنوان معیار خروج از مطالعه در نظر گرفته شد.

نمونه‌های مدفوع تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای تأیید حضور بلاستوسیستیس و میکروبیوتای منتخب (Firmicutes و Bacteroidetes)، DNA کل از نمونه‌های مدفوع با استفاده از کیت استخراج DNA مدفوع (یکتا تجهیز، تهران، ایران) استخراج شد. به این منظور ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های مدفوع سه بار با سالین بافر فسفات استریل (PBS؛ pH=۷/۵) شسته شد و پس از دور ریختن مایع رویی، DNA از رسوب باقی‌مانده استخراج شد. DNA جدا شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

پروفایل میکروبیوتا

Real-Time PCR برای بررسی میکروبیوتاهای انتخابی بر اساس بررسی مقاله‌ها، برای بررسی دو راسته مهم از باکتری‌های میکروبیوتای روده: Firmicutes و Bacteroidetes استفاده شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی راسته و پرایمرهای universal انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در مطالعه

میکروارگانیسم ها	توالی الیگونوکلئوتیدی (5`-3`)	اندازه محصول (bp)	منابع
Eubacteria	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT ATTACCGCGGCTGCTGGC	۲۰۰	(۱۸)
Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	۱۲۹	(۱۹)
Bacteroidetes	GTTTAATTCGATGATACGCG TTAAGCCGACACCTCACG	۱۳۷	(۱۹)

Real-Time PCR در حجم کل ۱۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه Rotor-Gene Q (QIAGEN، آلمان) بر اساس شرایط ذیل انجام شد: ۷/۵ میکرولیتر 2X Real-time PCR Master Mix (BioFACT™، کره)، ۵ پیکومول از هر پرایمر، ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر و ۳ میکرولیتر DNA الگو. سیکل‌های انجام شده توسط دستگاه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و افزایش از ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد در یک درجه سانتی‌گراد - ۱. کنترل مثبت و آب مقطر استریل همراه با هر نمونه، به عنوان کنترل مثبت و منفی اجرا شدند. برای حذف احتمال تقویت کاذب و پرایمر-دایمرها، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب انجام شد. در موارد سیکل آستانه (Ct) بیش از ۳۵، نمودار تقویت و پروفیل ذوب برای حذف نمونه‌های منفی در نظر گرفته شد. فراوانی نسبی گروه تاکسونومیک باکتری طبق روشی که در مطالعه‌های دیگر (۲۰، ۲۱) بر اساس فرمول زیر شرح داده شد محاسبه شد:

$$X = (Eff.Univ)^{Ct\ univ} / (Eff.Spec)^{Ct\ spec} \times 100.$$

(Eff.Univ نشان دهنده کارایی محاسبه شده پرایمرهای جهانی برای (Eubacteria ۲=۱۰۰درصد و ۱=۰درصد) و Eff.Spec نشان‌دهنده کارایی پرایمرهای اختصاصی تاکسون است. علاوه بر این، Ct univ و Ct spec به Ct آزاد شده توسط ترموسایکلر اشاره دارد و "X" درصد (درصد) تعداد کپی ژن ۱۶S rRNA تاکسون خاص در نمونه مدفوع هر فرد است.)

تحلیل آماری

آمار توصیفی به صورت فراوانی و شیوع ارائه شد، مقدار باکتری به صورت میانگین و انحراف معیار (SD) ارائه شد. نرمال بودن توزیع با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و آزمون Student t-test (نمونه مستقل و زوجی) برای تجزیه و تحلیل داده‌های پارامتریک استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های ناپارامتریک از آزمون‌های من ویتنی و ویلکاکسون استفاده شد. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از همان برنامه بر اساس روش عدم تشابه Bray-Curtis محاسبه شد. مقدار P < ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد. REST، SPSS v.24، GraphPad Prism نسخه ۸/۳/۰/۵۳۸ و نرم افزار آماری منبع باز R نسخه ۳/۶/۱ (R Core Team، وین، اتریش) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. برای تجسم داده‌ها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸/۳/۰/۵۳۸ استفاده شد.

یافته‌ها

در این مطالعه در کل ۸۰ نفر بررسی شده‌اند (۳۹ زن در بازه سن ۲۱ تا ۶۹ ساله و ۴۱ مرد در بازه سنی ۱۵ تا ۷۶ ساله) که شامل: ۲۰ فرد مبتلا به بیماری IBS، ۲۰ فرد مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس*، ۲۰ فرد دارای انگل *بلاستوسیستیس* فاقد بیماری IBS و ۲۰ فرد سالم (گروه کنترل) بوده‌اند(جدول۱). در این مطالعه در گروه بیماران مبتلا به بیماری IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* از نظر فرم مدفوع بررسی شده‌اند و مشاهده شده است که: ۱۸ نفر مبتلا به IBS-U (۸ مرد و ۱۰ زن که در این افراد ۹ زن و یک مرد دارای زیرگونه۱ و شش مرد و دو زن دارای زیرگونه۳ از انگل *بلاستوسیستیس*) و دو نفر مبتلا به IBS-D (یک مرد و یک زن که در این افراد یک زن دارای زیرگونه۱ و یک مرد دارای زیرگونه۲ از انگل *بلاستوسیستیس*) بوده‌اند. در گروه افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* فاقد بیماری IBS که از نظر فرم مدفوع بررسی شده‌اند مشخص شده است که: ۱۸ نفر دارای حالت فرم و نرم (۹ زن و ۹ مرد که در این افراد دو مرد و یک زن دارای زیرگونه۲ و هفت زن و شش مرد دارای زیرگونه۱ و یک زن و یک مرد دارای زیرگونه۳ از انگل *بلاستوسیستیس*) و دو نفر دارای حالت شل (یک زن با زیرگونه۲ از انگل *بلاستوسیستیس*) و یک مرد دارای زیرگونه۳ از انگل *بلاستوسیستیس*) بودند. در افراد مبتلا به بیماری IBS فاقد انگل *بلاستوسیستیس* که از نظر فرم مدفوع بررسی شده‌اند، مشخص شده است که: ۲۰ نفر مبتلا به IBS-U (۱۰ مرد و ۱۰ زن) بوده‌اند. در گروه کنترل نیز از لحاظ فرم مدفوع ۱۷ نفر شامل هفت زن و ۱۰ مرد فرم و ۲ نفر شامل یک مرد و ۱ زن شل و یک زن نرم بوده‌اند (جدول ۲).

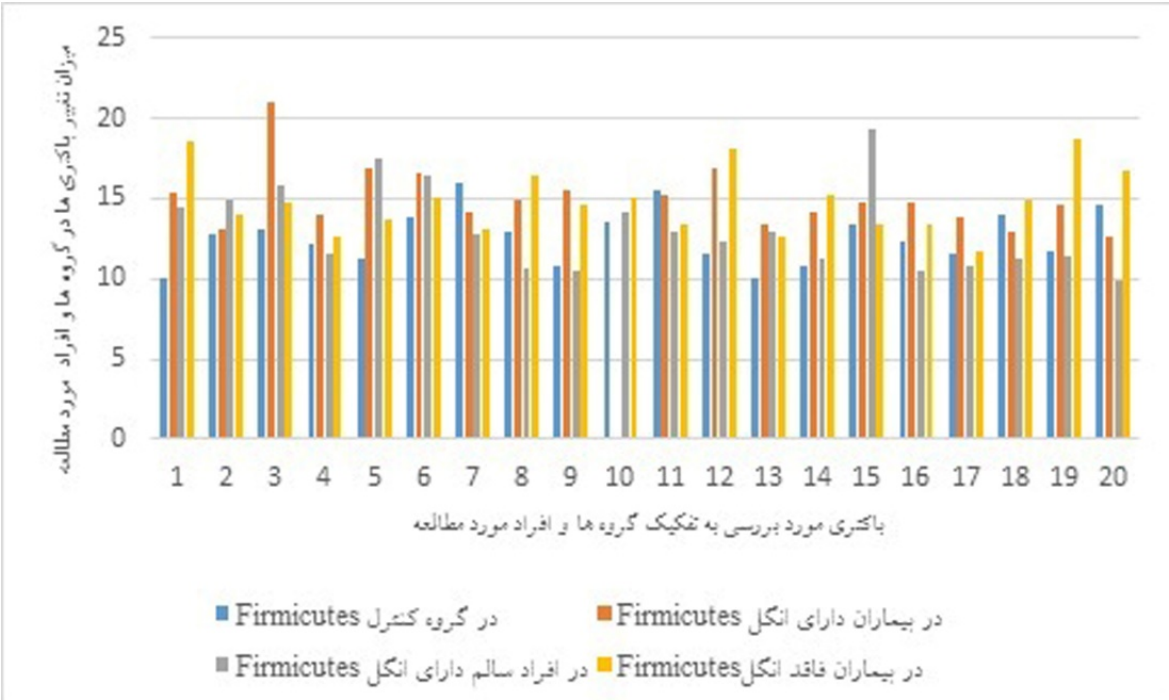
جدول ۲- الگوی دفع مدفوع در گروه‌های مختلف مطالعه شده

ردیف های مورد مطالعه	مدفوع / گروه‌های مورد مطالعه	فرم	شل	نرم	آبکی	جمع
۱	بیماران مبتلا به IBS	۱۳(۶۵٪)	۰	۷(۳۵٪)	۰	۲۰
۲	بیماران مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس*	۱۴(۷۰٪)	۱(۵٪)	۴(۲۰٪)	۱(۵٪)	۲۰
۳	افراد سالم دارای انگل *بلاستوسیستیس*	۱۷(۸۵٪)	۱(۵٪)	۱(۵٪)	۱(۵٪)	۲۰
۴	افراد سالم فاقد انگل *بلاستوسیستیس*	۱۷(۸۵٪)	۲(۱۰٪)	۱(۵٪)	۰	۲۰

Firmicutes

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به بیماری IBS میزان باکتری Firmicutes نسبت به گروه افراد سالم(گروه کنترل) افزایش می‌یابد، همچنین حضور انگل *بلاستوسیستیس* نیز سبب افزایش میزان باکتری Firmicutes نسبت به افراد سالم می‌شود. لازم به ذکر است که حضور انگل *بلاستوسیستیس* در بیماران مبتلا به IBS میزان این باکتری را نسبت به افراد مبتلا به IBS و فاقد انگل *بلاستوسیستیس* کاهش می‌دهد. همچنین میزان این باکتری در افراد مبتلا به بیماری IBS بیشتر از گروه‌های دیگر گزارش شده است.

در این مطالعه مشخص شده است که در بیماران مبتلا به IBS فراوانی میکروبی روده افراد به این صورت تغییر کرده است که باکتری Firmicutes در این افراد نسبت به گروه کنترل (افراد سالم) افزایش داشته است، در افراد مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* نیز میزان باکتری Firmicutes در این افراد نسبت به گروه کنترل (افراد سالم) افزایش داشته است. در افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* فاقد بیماری IBS میزان باکتری Firmicutes در مقایسه با گروه کنترل (افراد سالم) به میزان کمی افزایش داشته است. لازم به ذکر است که به طور کل در این مطالعه مشاهده شد که وجود بیماری IBS می‌تواند میزان باکتری Firmicutes را چه در افراد مبتلا به IBS و چه در افراد مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* افزایش دهد. قابل توجه این که میزان این باکتری در بیماران مبتلا به بیماری IBS در مقایسه با افراد دارای بیماری IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* و همچنین افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* نیز بیشتر بوده است. (نمودار ۱).



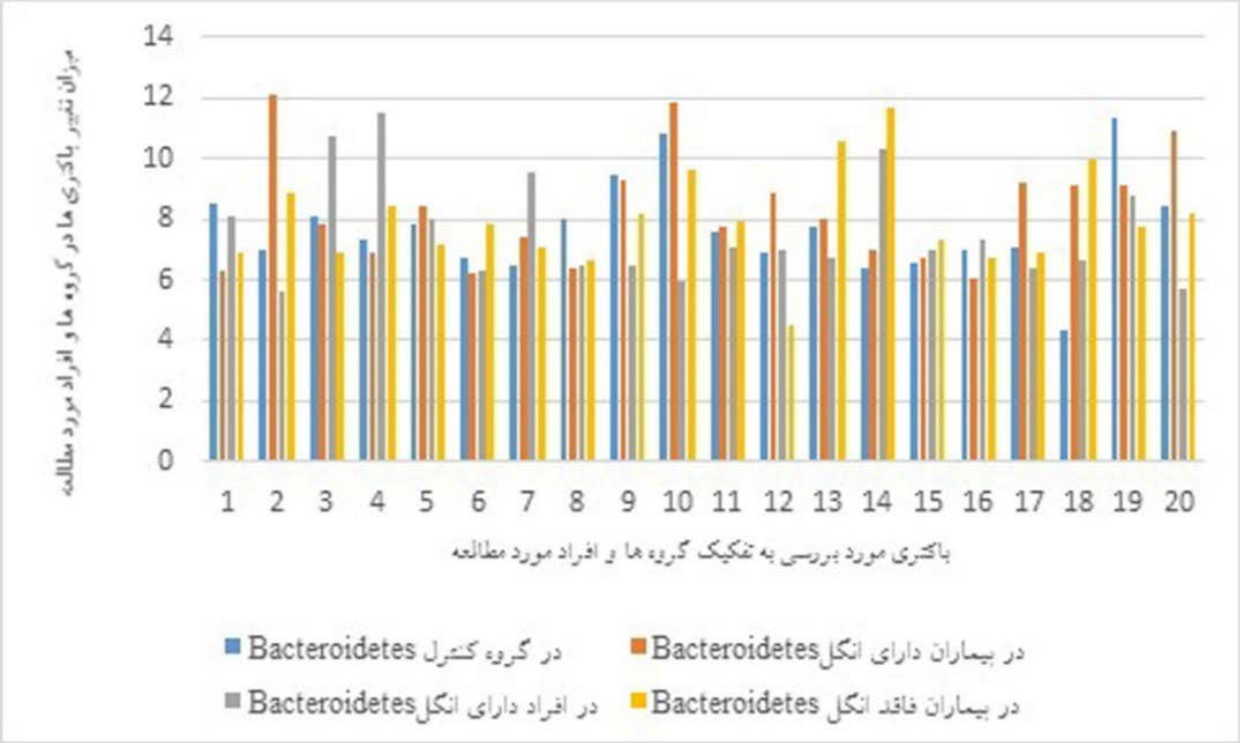
نمودار ۱- مقایسه تغییر Firmicutes در تمام گروه‌ها

Bacteroidetes

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به بیماری IBS میزان باکتری Bacteroidetes نسبت به گروه افراد سالم(گروه کنترل) افزایش می‌یابد، وجود انگل *بلاستوسیستیس* تأثیر بسیار ناچیزی در کاهش میزان این باکتری نسبت به افراد سالم می‌گذارد، ولی در بیماران مبتلا به بیماری IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* میزان باکتری Bacteroidetes افزایش می‌یابد. در واقع میزان این باکتری در این گروه از افراد نسبت به افراد گروه مبتلا به IBS و گروه افراد سالم نیز بیشتر گزارش شده است. لازم به ذکر است که میزان این باکتری در افراد مبتلا به بیماری IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* بیشتر از گروه‌های دیگر گزارش شده است.

همچنین نسبت Bacteroidetes نیز در افراد مبتلا به IBS نسبت به افراد سالم (گروه کنترل) نیز افزایش داشته است، میزان باکتری Bacteroidetes در افراد مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* نسبت به گروه کنترل (افراد سالم) نیز افزایش داشته است.

میزان باکتری Bacteroidetes در افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* فاقد بیماری IBS نسبت به گروه کنترل (افراد سالم) کاهش یافته است (این میزان کاهش زیاد نبوده است). فراوانی باکتری Bacteroidetes در این مطالعه این چنین مشاهده شده است که میزان این باکتری در افراد مبتلا به بیماری IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* نسبت به افراد سالم و افراد مبتلا به بیماری IBS فاقد انگل *بلاستوسیستیس* و همچنین افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* افزایش چشمگیری یافته است. به طور کل در این مطالعه مشاهده شده است که میزان باکتری Bacteroidetes در بیماران مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* بیشتر از گروه افراد مبتلا به IBS و افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* بوده است.(ولی در کل این تغییرها معنادار نبوده است.) (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه تغییر Bacteroidetes در تمام گروه‌ها

مقایسه فراوانی باکتری‌های Firmicutes و Bacteroidetes

در این مطالعه تمام افرادی که دارای انگل *بلاستوسیستیس* بودند با تمام افراد فاقد انگل *بلاستوسیستیس* در مورد فراوانی باکتری‌های Firmicutes و Bacteroidetes بررسی شده‌اند و نتایج به این صورت به دست آمده است که باکتری Bacteroidetes در افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* در مقایسه با افراد فاقد *بلاستوسیستیس* کاهش یافته است، ولی باکتری Firmicutes در این افراد افزایش یافته است.

همچنین در این مطالعه تمام افرادی که دارای بیماری IBS در مقایسه با افراد فاقد بیماری IBS نیز از لحاظ فراوانی باکتری‌های Firmicutes **و** Bacteroidetes بررسی شده‌اند و نتیجه به این صورت مشاهده شده است که میزان این دو میکروبیوتای روده در تمام افراد دارای بیماری IBS بیشتر از افرادی بود که فاقد این بیماری بودند.

به طور کلی می‌توان به این نتیجه رسید که حضور انگل *بلاستوسیستیس* سبب کاهش نسبی میزان باکتری Firmicutes در بیماران مبتلا به IBS می‌شود، ولی میزان این باکتری را در افراد سالم افزایش می‌دهد، همچنین حضور انگل *بلاستوسیستیس* در افرادی که مبتلا به بیماری IBS نیز هستند، سبب افزایش میزان باکتری Bacteroidetes در این افراد می‌شود. (ولی در کل این تغییرها معنادار نبوده است.)(نمودار ۳ الف و ...) (جدول ۳ الی ۵).

جدول ۳- فراوانی نسبی میکروبیوتای روده در چهار گروه مطالعه شده

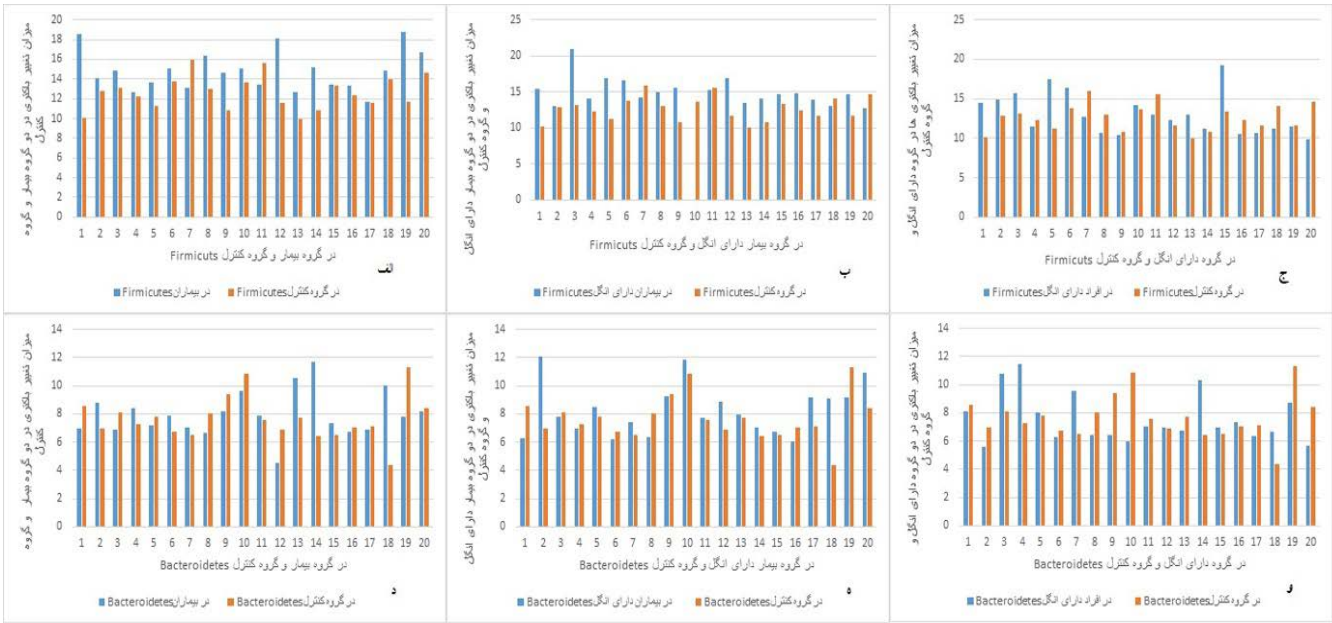
باکتری‌ها	IBS		سالم		P-value
	بلاستوسیستیس- مثبت	بلاستوسیستیس- منفی	بلاستوسیستیس- مثبت	بلاستوسیستیس- منفی	
Firmicutes	۱۴/۲۳۸± ۳/۸۳۶	۲/۰۱ ±۱۴/۷۹۹	۱۳/۰۵۳±۲/۶۲	۱۲/۶۰۸ ± ۱/۶۸	۰/۰۱
Bacteroidetes	۸/۲۶۸ ± ۱/۷۹	۱/۵۹ ± ۷/۹۵۸	۷/۵۷۱± ۱/۷۲	۷/۶۷۴±۱/۵۶	۰/۴۲۱

جدول ۴- فراوانی Firmicutes در گروه‌های مطالعه شده

IBS / بلاستوسیستی	دارد	ندارد
دارد	۱۴/۲۳۸± ۳/۸۳۶	۱۴/۷۹۹ ±۲/۰۱
ندارد	۱۳/۰۵۳±۲/۶۲	۱۲/۶۰۸ ± ۱/۶۸

جدول ۵- فراوانی Bacteroidetes در گروه‌های مطالعه شده

IBS / بلاستوسیستیس	دارد	ندارد
دارد	۸/۲۶۸ ± ۱/۷۹	۷/۹۵۸ ± ۱/۵۹
ندارد	۷/۵۷۱± ۱/۷۲	۷/۶۷۴±۱/۵۶



نمودار۳- (الف): مقایسه تغییر Firmicuts در افراد مبتلا به بیماری IBS و گروه سالم، (ب): مقایسه تغییر Firmicuts در افراد مبتلا به بیماری IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* و گروه سالم، (ج): مقایسه تغییر Firmicuts در افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* و گروه سالم، (د): مقایسه تغییر Bacteroidetes در افراد مبتلا به بیماری IBS و گروه سالم، (ه): مقایسه تغییر Bacteroidetes در افراد مبتلا به بیماری IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* و گروه سالم، (و): مقایسه تغییر Bacteroidetes در افراد دارای انگل *بلاستوسیستیس* و گروه سالم.

بحث

در این مطالعه در بیماران مبتلا به IBS فراوانی باکتری Firmicutes بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین فراوانی باکتری در بیماران مبتلا به IBS دارای انگل *بلاستوسیستیس* نسبت به گروه افراد سالم (گروه کنترل) افزایش یافته بود. میزان Bacteroidetes در افراد مبتلا به IBS بیشتر از افراد سالم بود. با در نظر گرفتن *بلاستوسیستیس* میزان این باکتری در افراد با IBS و مبتلا به *بلاستوسیستیس* بیشتر از سایر گروه‌ها بود. به هر حال تغییر نسبت Firmicutes/Bacteroidetes در گروه‌های مختلف معنادار نبود.

در مطالعه Camilleri و همکارانش که بررسی روی ۱۶۱ بیمار انجام شده است، مشخص شده که در بیماران مبتلا به بیماری IBS نسبت باکتری Firmicutes به Bacteroidetes افزایش یافته است (۲۲)، امّا این تفاوت در مطالعه ما معنادار نبود که این نتیجه با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر هم‌راستا و منطبق است. در مطالعه Rajilic-Stojanovic و همکارانش که روی ۶۲ بیمار مبتلا به بیماری IBS و ۴۶ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انجام شد، مشخص شده است که بیماران مبتلا به IBS فراوانی بیشتری از باکتری Firmicutes نسبت به افراد سالم دارند در حالی که فراوانی باکتری Bacteroidetes در این افراد کمتر از افراد سالم (گروه کنترل) گزارش شده است (۲۳). این نتایج در مورد باکتری Firmicutes با مطالعه انجام شده منطبق است، ولی در مورد باکتری Bacteroidetes بر خلاف نتایج به دست آمده با مطالعه انجام شده است. در مطالعه Durban و همکارانش که روی ۱۶ فرد بیمار مبتلا به بیماری IBS و ۹ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انجام شده، مشخص شده است که باکتری Bacteroidetes در بیماران مبتلا به بیماری IBS نسبت به افراد سالم (گروه کنترل) افزایش یافته است (۲۴) که با نتایج به دست آمده از این مطالعه منطبق است. در مطالعه Parkes و همکارانش که روی ۴۷ بیمار مبتلا به بیماری IBS و ۲۶ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انجام شده است، مشخص شده که میزان باکتری Bacteroidetes سطح بالاتری نسبت به افراد سالم (گروه کنترل) داشته است (۲۵) که در مورد باکتری Bacteroidetes با این مطالعه منطبق است. در کنار افزایش مطالعه‌ها روی پراکنش *بلاستوسیستیس*، گزارش‌های زیادی از شیوع بالای این انگل در بیماران IBS حکایت دارد. با این حال، ارتباط بین IBS و حامل *بلاستوسیستیس* همچنان در حال بررسی است، IBS یک بیماری چند عاملی دستگاه گوارش (GI) است که با اختلال میکروبیوتای روده همراه است (۲۶، ۲۷). همچنین ارتباط بین *بلاستوسیستیس* و تنوع و فراوانی میکروبیوتای روده در مطالعه‌های متعدد ارزیابی شده است (۳۰-۲۸). به عنوان یافته، صرف‌نظر از حضور *بلاستوسیستیس*، فراوانی نسبی Firmicutes در بیماران IBS به طور معناداری بیشتر از افراد سالم بود، غنای Firmicutes در بیماران IBS در مقایسه با افراد سالم بحث‌برانگیز است. اگرچه شواهد موجود از نتایج ما مانند برخی مطالعه‌ها از فراوانی بالاتر Firmicutes در بیماران مبتلا به بیماری IBS را پشتیبانی می‌کند (۲۳)، ولی بسیاری از مطالعه‌ها نیز غنای کمتر Firmicutes را در بیماران IBS در مقایسه با افراد کنترل نشان می‌دهند (۳۱-۳۳) که این نتایج بحث‌برانگیز به احتمال زیاد با روش‌های مختلف بررسی و انواع IBS مرتبط است. به عنوان مثال Zhuang و همکاران نشان داده‌اند که فراوانی Firmicutes در بیماران IBS-D کاهش یافته است، در حالی که فراوانی Bacteroidetes افزایش یافته است (۲۷). در مطالعه حاضر، اسهال در اکثر موارد در افراد مبتلا به بیماری IBS مشاهده نشد، بنابراین فراوانی بالای Firmicutes در بیماران مبتلا به بیماری IBS می‌تواند منطقی باشد (۳۴، ۳۵).

در افراد مبتلا به بیماری IBS فراوانی باکتری Firmicutes نسبت به افراد سالم (گروه کنترل) افزایش یافته است، در حالی که فراوانی باکتری Bacteroidetes در افراد مبتلا به بیماری IBS در مقایسه با افراد سالم (گروه کنترل) کاهش داشته است. همچنین در این مطالعه فراوانی نسبت Firmicutes به Bacteroidetes با یک افزایش ۳ برابری نسبت Firmicutes به Bacteroidetes همراه بوده است (۱۲) که نتایج این مطالعه از نظر افزایش میزان فراوانی باکتری Firmicutes در بیماران مبتلا به IBS، با مطالعه حاضر هم‌راستا بوده، ولی در مورد فراوانی

باکتری Bacteroidetes در بیماران مبتلا به بیماری IBS، با مطالعه حاضر متناقض است. همچنین در مطالعه حاضر، تغییر در فراوانی نسبت Firmicutes به Bacteroidetes معنادار نبود.

سندرم روده تحریک‌پذیر (IBS) یک اختلال شایع در تعاملات محور مغز و روده است که بین ۵ تا ۱۰ درصد از بیماران گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهد. امروزه این احتمال وجود دارد که عوامل مختلفی مانند تغییر در عملکرد محور مغز-روده بتواند روی ایجاد و درمان این بیماری تأثیرگذار باشد (۳۶). اصطلاح میکروبیوم روده به قریب به ۱۰۰ تریلیون موجودات میکروسکوپی (باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و یوکاریوت‌ها) و میلیون‌ها ژن آنها اشاره دارد که در سراسر دستگاه گوارش، از حفره دهان تا رکتوم که با بیشترین غلظت و تنوع در روده بزرگ زندگی می‌کنند (۳۷). اگرچه میکروبیوتای روده متشکل از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها است، ولی بیشتر مطالعه‌ها که روی نقش میکروبیوتا در محور روده- مغز در سندرم روده تحریک‌پذیر (IBS) می‌پردازند، تنها بر روی باکتری‌ها تمرکز دارند، این در حالی است که تغییر در نوع و فراوانی قارچ‌ها و ویروس‌ها نیز می‌تواند به عنوان عامل ایجادکننده بیماری IBS مطرح باشد (۳۸). به عنوان مثال در یک مطالعه بیان شده است که در بیماران مبتلا به IBS مخمرهایی نظیر *Candida albicans* و *Saccharomyces cerevisiae* افزایش یافته‌اند (۳۹). میکروبیوتای روده از چندین گونه میکروبی با ترکیب‌های متنوع و متغیر در افراد سالم و بیمار تشکیل شده است. میکروبیوتای روده تا زمانی که دست نخورده باقی بماند، می‌تواند تمام عملکردهای فیزیولوژیکی، متابولیکی و ایمنی را به طور عادی انجام دهد و از توسعه بیماری‌ها جلوگیری کند. اختلال در میکروبیوتای روده می‌تواند به دلایل زیادی مانند عفونت میکروبی در دستگاه گوارش، مسمومیت غذایی، اسهال، شیمی درمانی، سوء تغذیه، اختلال در محور مغز روده، سبک زندگی و افزایش سن و ... باشد که اگر این اختلال به حالت عادی بازگردانده نشود، ممکن است سبب به هم ریختگی میکروبیوتای روده شود و ممکن است سبب ایجاد چندین مشکل مانند: التهاب دستگاه گوارش، القای سرطان، ایجاد و پیشرفت انواع بیماری‌ها مانند سندرم روده تحریک‌پذیر و بیماری التهابی روده شود (۴۰).

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که وجود *بلاستوسیستیس* در نسبت Firmicutes/ Bacteroidetes تغییر معناداری را ایجاد نکرده است. در این مطالعه با وجود تغییر بین بیماران مبتلا به IBS و افراد سالم، تفاوت باکتری‌های بررسی شده معنادار نبود. با این حال باید به نقش این تک یاخته روی باکتری‌های دستگاه گوارش بیشتر توجه شود.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بررسی و با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1400.241 ثبت شده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای علیرضا اولیایی برای دریافت درجه دکتری در رشته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود.

از مشارکت‌کنندگان محترم و همه کارکنان مرکز تحقیقات بیماری‌های منتقله از آب و غذا پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را یاری کردند، سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

References

1. Pittayanon R, Lau JT, Yuan Y, Leontiadis GI, Tse F, Surette M, et al. Gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome—a systematic review. Gastroenterology. 2019;157(1):97-108.

2. Menees S, Chey W. The gut microbiome and irritable bowel syndrome. F1000Research. 2018;7.

3. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Erratum: Enterotypes of the human gut microbiome (Nature (2011) 473 (174-180)). Nature. 2011;474(7353):666.

4. Fagoonee S, Pellicano R. Does the Microbiota Play a Pivotal Role in the Pathogenesis of Irritable Bowel Syndrome? Journal of clinical medicine. 2019;8(11).

5. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012;489(7415):220-30.

6. Liu H-N, Wu H, Chen Y-Z, Chen Y-J, Shen X-Z, Liu T-T. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: A systematic review and meta-analysis. Digestive and Liver Disease. 2017;49(4):331-7.

7. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human Blastocystis hominis Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitology research. 2008;102(5):853-60.

8. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BM, Spiller RC, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. Gut. 2013;62(1):159-76.

9. Gouba N, Raoult D, Drancourt M. Plant and fungal diversity in gut microbiota as revealed by molecular and culture investigations. PloS one. 2013;8(3):e59474.

10. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, Cian A, et al. Blastocystis is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. PloS one. 2014;9(11):e111868.

11. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2000;118(2):S68-S82.

12. Nagel R, Traub RJ, Allcock RJ, Kwan MM, Bielefeldt-Ohmann H. Comparison of faecal microbiota in Blastocystis-positive and Blastocystis-negative irritable bowel syndrome patients. Microbiome. 2016;4(1):47.

13. Rashnaei N, Sepahi AA, Siadat SD, Shahsavand-Ananloo E, Bahramali G. Characterization of gut microbiota profile in Iranian patients with bipolar disorder compared to healthy controls. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2023;13.

14. Naseri K, Dabiri H, Olfatifar M, Shahrbaf MA, Yadegar A, Soheilian-Khorzoghi M, et al. Evaluation of gut microbiota of iranian patients with celiac disease, non-celiac wheat sensitivity, and irritable bowel syndrome: are there any similarities? BMC gastroenterology. 2023;23(1):15.

15. Nourrisson C, Scanzi J, Brunet J, Delbac F, Dapoigny M, Poirier P. Prokaryotic and eukaryotic fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy individuals colonized with blastocystis. Frontiers in Microbiology. 2021;12:713347.

16. Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, Mättö J, Kassinen A, Krogius L, et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG. 2005;100(2):373-82.

17. Norouzi M, Pirestani M, Arefian E, Dalimi A, Sadraei J, Mirjalali H. Exosomes secreted by Blastocystis subtypes affect the expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (TNFα, IL-6, IL-10, IL-4). Frontiers in Medicine. 2022;9.

18. Moszak M, Szulińska M, Bogdański P. You are what you eat—the relationship between diet, microbiota, and metabolic disorders—a review. Nutrients. 2020;12(4):1096.

19. Thursby E, Juge N. Introduction fo the human gut flora. Biochem J. 2017;474(11):1823-36.

20. Gholam-Mostafaei FS, Azimirad M, Naseri K, Nabavi-Rad A, Asadzadeh Aghdaei H, Shahrokh S, et al. Intestinal microbiota changes pre-and post-fecal microbiota transplantation for treatment of recurrent Clostridioides difficile infection among Iranian patients with concurrent inflammatory bowel disease. Frontiers in Microbiology. 2023;14:1147945.

21. De Gregoris TB, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. Improvement of phylum-and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. Journal of microbiological methods. 2011;86(3):351-6.

22. Camilleri M, Carlson P, BouSaba J, McKinzie S, Vijayvargiya P, Magnus Y, et al. Comparison of

biochemical, microbial and mucosal mRNA expression in bile acid diarrhoea and irritable bowel syndrome with diarrhoea. Gut. 2023;72(1):54-65.

23. Rajilić-Stojanović M, Biagi E ,Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology. 2011;141(5):1792-801.

24. Durbán A, Abellán JJ, Jiménez-Hernández N, Salgado P, Ponce M, Ponce J, et al. Structural alterations of faecal and mucosa-associated bacterial communities in irritable bowel syndrome. Environmental Microbiology Reports. 2012;4(2):242-7.

25. Parkes G, Rayment N, Hudspith B, Petrovska L, Lomer M, Brostoff J, et al. Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of sub-groups of irritable bowel syndrome. Neurogastroenterology & Motility. 2012;24(1):31-9.

26. Tap J, Derrien M, Törnblom H, Brazeilles R, Cools-Portier S ,Doré J, et al. Identification of an intestinal microbiota signature associated with severity of irritable bowel syndrome. Gastroenterology. 2017;152(1):111-23. e8.

27. Zhuang X, Tian Z, Li L, Zeng Z, Chen M, Xiong L. Fecal microbiota alterations associated with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. Frontiers in microbiology. 2018;9:1600.

28. Stensvold CR, Sørland BA, Berg RP, Andersen LOB, van der Giezen M, Bowtell JL, et al. Stool microbiota diversity analysis of Blastocystis-positive and Blastocystis-negative individuals. Microorganisms. 2022;10(2):326.

29. Kim M-J, Lee YJ, Kim T-J, Won EJ. Gut microbiome profiles in colonizations with the enteric protozoa Blastocystis in Korean populations. Microorganisms. 2021;10(1):34.

30. Deng L, Wojciech L, Gascoigne NR, Peng G, Tan KS. New insights into the interactions between Blastocystis, the gut microbiota, and host immunity. PLoS pathogens. 2021;17(2):e1009253.

31. Mei L, Zhou J, Su Y, Mao K, Wu J, Zhu C, et al. Gut microbiota composition and functional prediction in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. BMC gastroenterology. 2021;21(1):1-12.

32. Lee SM, Kim N, Yoon H, Kim YS, Choi SI, Park JH, et al. Compositional and functional changes in the gut microbiota in irritable bowel syndrome patients. Gut and Liver. 2021;15(2):253.

33. Chen H, Ou R, Tang N, Su W, Yang R, Yu X, et al. Alternation of the gut microbiota in irritable bowel syndrome: an integrated analysis based on multicenter amplicon sequencing data. Journal of Translational Medicine. 2023;21(1):117.

34. O'Riordan KJ, Collins MK, Moloney GM, Knox EG, Aburto MR, Fülling C, et al. Short chain fatty acids: Microbial metabolites for gut-brain axis signalling. Molecular and Cellular Endocrinology. 2022;546:111572.

35. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2019;16(8):461-78.

36. Mayer EA, Ryu HJ, Bhatt RR. The neurobiology of irritable bowel syndrome. Molecular Psychiatry. 2023:1-15.

37. Cao Z, Sugimura N, Burgermeister E, Ebert MP, Zuo T, Lan P. The gut virome: A new microbiome component in health and disease. EBioMedicine. 2022;81.

38. van Thiel I, de Jonge W, van den Wijngaard R. Fungal feelings in the irritable bowel syndrome: the intestinal mycobiome and abdominal pain. Gut microbes. 2023;15(1):2168992.

39. Whelan K, Staudacher H. Low FODMAP diet in irritable bowel syndrome: a review of recent clinical trials and meta-analyses. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2022;25(5):341-7.

40. Dahiya D, Nigam PS. Biotherapy Using Probiotics as Therapeutic Agents to Restore the Gut Microbiota to Relieve Gastrointestinal Tract Inflammation, IBD, IBS and Prevent Induction of Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(6):5748.