

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Eficacitatea transplantului fecal în infecția cu *Clostridium* *Difficile* recurentă

Doctorand **Maricoiu Mihaela Ramona (Laszlo)**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Vasile Andreica**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

*„Nu rămâne în trecut, nu te pierde în viitor,
concentrează-te asupra prezentului.
Trăiește Clipa...”*

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Mihaela Laszlo, Lidia Ciobanu, Oliviu Pascu, Vasile Andreica. Fecal transplantation indications in ulcerative colitis. Preliminary study. Clujul Medical 2016 Vol. 89 no. 2: 224-228 (*BDI*) (*studiu cuprins in capitolul 4*).
2. Mihaela Laszlo, Oliviu Pascu, Daniel-Corneliu Leucuta, Vasile Andreica. Fecal microbiota transplantation in recurrent Clostridium difficile infection: the first prospective study of 30 patients in Romania. Revista Română de Medicină de Laborator 2018 :26(2) :201-10. DOI:10.2478/rrlm-2018-0013 (*ISI-IF 0,325*) (*studiu cuprins in capitolul 3*).
3. Mihaela Laszlo, Oliviu Pascu. Full Clinical and Endoscopic Remission Following Fecal Microbiota Transplant with Moderate-Severe Treatment-Resistant Ulcerative Colitis. Revist J Gastroint Dig Syst 2014, 4:2 (*revista neindexată*) (*studiu cuprins in capitolul 4*).

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Microbiota	17
1. 1. Definiții de bază și dezvoltarea microbiotei	17
1. 2. Funcțiile microbiotei normale	18
1. 3. Modificări ale compoziției bacteriene de-a lungul tractului gastro-intestinal	18
1.3.1. Esofag, stomac și intestin subțire	18
1.3.2. Intestinul gros	19
1. 4. Microbiota și metabolismul	19
1. 5. Microbiomul GI în contextul dezvoltării și îmbătrânirii	20
1. 6. Tulburări asociate cu alterarea microbiotei	21
1.6.1. Obezitatea și diabetul de tip 2	21
1.6.2. Sindromul colonului iritabil	21
1.6.3. Bolile inflamatorii intestinale (BII)	22
1.6.4. Cancerul colorectal CCR	23
1.6.5. Bolile alergice	23
1.6.6. Boli neuropsihiatrice	24
2. Infecția cu Clostridium Difficile	25
2. 1. Definiție, istoric, epidemiologice, etiopatogenează	25
2.1.1. Istoric	25
2.1.2. Epidemiologie	26
2.1.3. Etiopatogeneza	26
2. 2. Tablou clinic	27
2. 3. Diagnostic paraclinic	28
2. 4. Tratament	29
2.4.1. Boala recurentă	30
2.4.2. Terapii alternative	32
3. Transplantul fecal	35
3. 1. Definiție, istoric	35
3. 2. Metodologia FMT	36
3. 2. 1. Selecția donatorilor	36
3. 2. 2. Prepararea materialelor fecale	36
3. 2. 3. Mod de administrare	37

3. 2. 4. Evenimente adverse	38
3. 3. Aplicarea FMT în bolile gastrointestinale	38
3. 3. 1. Infecția cu Clostridium Difficile	38
3. 3. 2. Boala inflamatorie intestinală (IBD)	38
3. 3. 3. Obezitatea și sindromul metabolic	39
3. 3. 4. Bolile gastrointestinale funcționale (FGID)	40
3. 4. Concluzii	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiu 1. Transplantul fecal în infecțiile recidivante cu Clostridium Difficile	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	54
3.5. Discuții	61
3.6. Concluzii	63
4. Studiu 2. Transplantul fecal în colita ulcerativă	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
4.3. Material și metodă	67
4.4. Rezultate	69
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	77
5. Studiu 3. Evaluarea viabilității probioticelor cu Lactobacillus plantarum ATCC 8014 după trecerea prin sistemul gastrointestinal.	
Studiu pilot pe subiecți umani	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	80
5.3. Material și metodă	80
5.4. Rezultate	84
5.5. Discuții	86
5.6. Concluzii	87
6. Concluzii generale	89
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	91
REFERINȚE	93

ABREVIERI UTILIZATE IN TEXT

FMT	Transplant de materii fecale
CDI	Infecția cu Clostridium Difficile
IBD	Boală intestinală inflamatorie
UC	Colită ulcerativă
CCR	Cancer colorectal
GI	Gastro-intestinal
SCFAs	Acizi grași cu lanț scurt Acizi grași cu lanț scurt

INTRODUCERE

Date generale

Tractul gastrointestinal uman este un ecosistem complex care, deși steril la naștere, devine rapid colonizat de microorganisme cu o populație microbiană vastă ce cuprinde zeci de mii de miliarde de bacterii și sute de specii diferite care co-există în simbioză cu gazda^{1,2}.

Printre sutele de specii diferite de bacterii, care populează lumenul gastrointestinal uman, se găsește o bacterie baciliformă, Gram-pozitivă, mobilă, strict anaerobă, sporogenă, pe care la om o întâlnim la nivelul colonului și se numește *Clostridium difficile*³.

Infecția cu *Clostridium difficile* se manifestă clinic de la o boală diareică acută până la colită pseudomembranoasă și megacolon toxic reprezentând cea mai frecventă cauză a diareei infecțioase asociată asistenței medicale, conducând la o rată mare de morbiditate și mortalitate în rândul pacienților spitalizați.

Clostridium difficile a fost descoperită inițial, în 1935, ca o componentă a florei intestinale la nou născuți, rolul patogen fiind observat mult mai târziu în 1970, când toxinele eliberate de *Clostridium difficile* au fost observate în fecalele pacienților expuși la antibiotice fiind în prezent recunoscut ca fiind cauza colitei pseudomembranoase și a altor forme de diaree și colită la pacienții care urmează tratamente cu antibiotice⁴.

Compoziția microbiotei este semnificativ afectată de utilizarea pe scară largă a antibioticelor, ceea ce conduce la o îndepărtare selectivă a unui grup de specii de bacterii care servesc drept barieră pentru colonizarea și persistența agenților patogeni la nivelul tractului gastrointestinal uman, rezultând astfel recidiva infecției cu *Clostridium difficile* care apare la 10-25% dintre pacienții tratați cu metronidazol sau vancomicină.

Atunci când asistăm la dezechilibre homeostatice prin alterarea funcțiilor barierei intestinale predispunând gazda umană la infecții enterice și se constată o creștere a ratei de recidivă a infecțiilor cu *Clostridium difficile* necesitând cure prelungite de antibiotice cu multiple efecte adverse asupra florei intestinale umane se poate proceda și trece la metode de tratament alternativ.

Experiența cumulată din serii de cazuri și studii clinice controlate relevă faptul că transplantul de materii fecale (FMT) de la persoane sănătoase la pacienții

cu recidivă este eficient atunci când este utilizat pentru a trata recidiva infecției cu *Clostridium difficile*.

Motivația alegerii subiectului.

Infecția cu *Clostridium difficile* este o boală frecvent nozocomială. Bacteria a fost identificată ca agent patogen în 10-20% din cazurile tratate cu antibiotice asociate diareei și la fel de frecvent cca. 50% în focare epidemice.

Ratele de infectare în creștere, cu o mortalitate de până la 20 000 cazuri pe an, tratamentele cu antibiotice, puține la număr, foarte costisitoare, cum sunt Vancomicina și Fidaxomicina, recidiva bolii care apare la 20% din pacienții care au urmat terapia inițială m-au făcut să mă aplec asupra acestei metode de tratament.

Transplantul de materii fecale (FMT) în tratarea infecțiilor recidivante cu *Clostridium difficile*, chiar dacă nu este o terapie reglementată, ar putea să se constituie într-o bună zi într-o terapie recunoscută ca eficientă, ținând cont de faptul că este o opțiune viabilă și din ce în ce mai adecvată pentru pacienții care nu răspund la terapia tradițională.

Dacă luăm în calcul și punem în balanță, pe de o parte, creșterea incidenței și severității infecției cu *Clostridium difficile*, recidiva infecției la un număr semnificativ de pacienți și, de cealaltă parte a balanței, costurile reduse, disponibilitatea universală, extrem de eficientă, cu indicații și metode optime de administrare, face ca transplantul de materii fecale (FMT) să poată fi considerat o terapie utilă și potențială pe viitor.

**STADIUL
ACTUAL
AL
CUNOAȘTERII**

1. Microbiota

1. 1. Definiții de bază și dezvoltarea microbiotei

Termenul de microbiom se referă la numărul total de microorganisme împreună cu materialul lor genetic și este diferit de termenul microbiotă, care este populația microbiană prezentă în diferite ecosisteme din organism. În medie, microbiota intestinală are 100 de miliarde de microbi, care este de 10 ori mai mare decât numărul celulelor din corpul uman; prin urmare, bacteriile comensale și ciupercile care populează corpurile noastre sunt mai numeroase decât celulele noastre umane^{1,2}.

La naștere, întregul tract intestinal este steril; intestinul sugarilor este primul colonizat de bacteriile materne și de mediu, în timpul nașterii și continuă să fie populat prin hrănire și alte contacte. Factorii cunoscuți care influențează colonizarea includ vârsta gestațională, tipul nașterii (naștere vaginală vs cezariană), dieta (lapte matern vs formula generală), nivelul de salubritate, precum și expunerea la antibiotice. Microbiota intestinală a nou-născuților se caracterizează printr-o diversitate scăzută și dominarea relativă de Proteobacterie și Actinobacterie; după aceea, microbiota devine mai diversă odată cu apariția dominației Firmicutes și Bacteroidetes, care caracterizează microbiota adultă³.

Microbiota intestinală este în mod obișnuit dominată de bacterii și în mod specific de către membrii diviziilor Bacteroidetes și Firmicutes. Deși există un imens interval de variație alături de variabilitatea interindividuală în compoziția microbiană, s-a sugerat că microbiota umană poate fi împărțită într-una din cele trei variante sau "enterotypes", bazată pe genul dominant: Bacteroides, Prevotella și Ruminococcus^{3,4}.

Microbiota intestinală poate fi diferită la diverse intervale de timp, în același loc anatomic, în aceeași persoană, datorită unor modificări de mediu. Dieta joacă un rol important în definirea compoziției microbiotei intestinale. Microbiota produce metaboliți care pot avea un efect pozitiv asupra gazdei, inclusiv activitate anti-inflamatoare și antioxidantă, reglarea funcției barierei intestinului și producția de vitamine și surse de energie.

Mai degrabă, microbiota noastră este esențială pentru mai multe aspecte ale dezvoltării normale prin interacțiuni cu sistemul imun al mucoaselor. Interacțiunea florei noastre cu sistemul imunitar în mai multe procese, cum ar fi

secreția de IgA secretor și eliberarea de peptide antimicrobiene endogene, printre altele, ajută la menținerea homeostaziei microbiomului⁵.

Aceste interacțiuni sunt, de asemenea, vitale pentru maturarea și întreținerea sistemului imun.

1. 2. Funcțiile microbiotei normale

Bacteriile enterice conferă numeroase beneficii pentru fiziologia intestinului, inclusiv efecte protectoare, structurale și metabolice.

De-a lungul epitelului, bacteriile enterice formează o barieră naturală de apărare împotriva microbilor exogeni. Colonizarea implică mai multe mecanisme, inclusiv deplasarea, competiția pentru nutrienți și producerea de factori antimicrobieni, cum ar fi acizii lactici și bacteriocine^{3,5}.

Bacteriile comensale ajută, de asemenea, la fortificarea barierei epiteliale prin diverse mecanisme sau ca și factor de creștere pentru funcția de barieră. Activitatea metabolică a microbiotei este echivalentă cu cea a unui "organ în cadrul unui organ". Prin producerea de acizi grași cu lanț scurt, microorganismele rezidente influențează pozitiv diferențierea și proliferarea enterocitelor intestinale. Bacteriile rezidente pot descompune cancerigenii dietetici; sintetizează biotina, acidul folic și vitamina K; fermentează reziduurile dietetice non digestibile, în special glucide, și ajută la absorbția de calciu, magneziu și fier⁴.

Împreună, această activitate metabolică complexă recuperează energia de valoare și substraturile resorbabile pentru gazdă și furnizează energie și nutrienți pentru dezvoltarea bacteriilor.

1. 3. Modificări ale compoziției bacteriene de-a lungul tractului gastro-intestinal

1.3.1. Esofag, stomac și intestin subțire

Cu toate că au existat puține studii despre microbiota esofagului proximal, o varietate de specii de bacterii trec prin acest tub, care fac legătura între cavitatea bucală și stomac. Date insuficiente au fost colectate cu privire la populațiile microbiene din esofagul proximal. Microbiota esofagului distal este dominată de specii de *Streptococcus*. Spre deosebire de alte zone ale corpului uman, unde o mai mare diversitate microbială este asociată cu sănătatea umană, creșterea diversității microbiene în esofagul distal a fost asociată cu inflamația cronică și displazia. Alte genuri, cum ar fi *Prevotella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* și *Staphylococcus* au fost detectate în esofagul distal; aceste genuri bacteriene ar putea oferi funcții complementare asociate sănătății și rezistenței ecologice⁶.

Diversitatea microbiomului stomacului uman, similar cu cel al esofagului, este limitată. Ph-ul scăzut al lumenului gastric limitează tipurile de microbi care

pot trăi acolo, selectând populații de bacterii rezistente la acid. Prezența agentului patogen *Helicobacter pylori* afectează puternic compoziția microbiomului gastric.

H pylori poate fi o specie comensală sau un agent patogen. Blaser a fost primul care a propus că eradicarea H pylori prin terapie antimicrobiană a crescut sensibilitatea indivizilor la esofagită și neoplazie. Genurile cele mai predominante din stomacul uman includ *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella* și *Rothia*. *Streptococcus* este genul cel mai dominant în esofag distal și stomac în absența infecției cu H pylori^{7,8}.

Intestinul subțire uman rămâne o frontieră de explorare a microbiologiei umane sănătoase. În general, este acceptat faptul că, comunitățile bacteriene cresc în raport cu diversitatea și complexitatea, de la proximal către distal, de la duoden spre jejun și ileon. Genul *Streptococcus* pare a fi genul dominant în duoden și jejun.

1.3.2. Intestinul gros

În ceea ce privește compoziția bacteriană, microbiomul gastro-intestinal (GI) este dominat de tipul Firmicutes și Bacteroidetes, urmat apoi de Actinobacteria și Verrucomicrobia. Încrengătura Proteobacteria reprezintă doar o mică proporție de bacterii gastro-intestinale la persoanele sănătoase, dar de multe ori Proteobacteria se regăsește în proporții mai mari la pacienții cu boli gastro-intestinale. Firmicutes și Bacteroidetes sunt tipuri predominante în intestinul gros. Cu toate că unele dovezi sugerează că raportul dintre Firmicutes:Bacteroidetes poate fi utilizat pentru a determina predispoziția la obezitate și sindroame metabolice, acesta variază semnificativ între indivizi sănătoși. Ca atare, semnificația raportului dintre Firmicutes: Bacteroidetes rămâne controversat și implicațiile sale asupra sănătății umane sunt neclare⁷.

Trei enterotipuri de bază au fost descrise la adulți sănătoși. Enterotipul 1 conține o proporție ridicată de Bacteroides, enterotipul 2 conține o proporție ridicată de *Prevotella* și enterotipul 3 conține o proporție mare de *Ruminococcus*. Aceste enterotipuri au fost caracterizate pe baza proporțiilor de module metabolice specifice. De exemplu, genele care aparțin căilor de biosinteză pentru biotină și riboflavină au fost detectate cu o frecvență mai mare în enterotipul 1, în timp ce genele implicate în căile de biosinteză pentru tiamina și acid folic au fost detectate cu frecvența mai mare în enterotipul 2⁸.

1. 4. Microbiota și metabolismul

Deși este de mult timp studiată, doar recent a început să fie înțeleasă amploarea potențialului metabolic al microbiotei. Unele dintre aceste funcții metabolice au fost bine cunoscute, cum ar fi capacitatea dizaharidazelor bacteriene pentru a salva zaharuri neabsorbante dietetice, cum ar fi lactoza și alcoolii și să le transforme în acizi grași cu lanț scurt (SCFAs), care sunt apoi utilizate ca sursă de

energie de către mucoasa colonică. SCFAs promovează creșterea celulelor epiteliale intestinale și controlează proliferarea și diferențierea lor.

Este cunoscut de ceva timp că bacteriile enterice pot produce substanțe nutritive și vitamine, cum ar fi acidul folic și vitamina K, deconjugând sărurile biliare și metabolizează unele medicamente (cum ar fi sulfasalazină) în lumenul intestinal, eliberând în acest fel fragmentele active ale acestora.

În prezent, este, de asemenea, cunoscut faptul că anumite organisme comensale produc și alte substanțe chimice, inclusiv neurotransmițători și neuromodulatori, care pot modifica funcțiile intestinului, precum motilitatea sau senzația. Cel mai recent, și poate cel mai surprinzător, s-a propus că microbiota poate influența dezvoltarea și funcționarea sistemului nervos central, conducând astfel la conceptul de axa microbiota-gut-creier.

1. 5. Microbiomul GI în contextul dezvoltării și îmbătrânirii

Comunităților microbiene care populează tractul gastro-intestinal uman sunt modelate de multiple influențe de mediu, inclusiv stilul de viață, evenimente de viață, și, mai important, procesul de îmbătrânire. Acest corp tot mai mare de cercetare, indică faptul că microbiomul intestinal se schimbă odată cu dezvoltarea și maturarea gazdei sale⁹.

Există dovezi suplimentare că modul de naștere (naștere vaginală vs cezariană) poate afecta compoziția microbiomului. Sugarii care sunt născuți pe cale naturală au microbiomurile inițiale din tractul vaginal care conțin un număr mare de lactobacili, în timp ce sugarii născuți prin cezariană au microbiomurile inițiale formate din *Stafilococ*, *Corynebacterium*, și *Propionibacterium*, asemănătoare în mare parte cu microbiomul pielii de la mama lor. Până când un copil ajunge la aproximativ 3 ani, microbiomul său GI este de 40%-60%, similar cu cel a unui adult sănătos^{8,9}. Microbiomul GI pentru adulți rămâne stabil de la al treilea până la al șaptelea deceniu de viață; compoziția microbiomului GI de la adulții tineri (25-40 ani) are un grad ridicat de similitudine cu cel al adulților în vârstă (63-76 ani).

Pe măsură ce îmbătrânim, proporțiile de bifidobacterii, *Faecalibacterium prausnitzii*, și mai mulți membri ai tipului *Firmicutes* în mod tipic încep să scadă, în timp ce proporția de *Esterichia coli*, alți membri de proteobacterii, și *Staphylococcus* adesea cresc.

Îmbătrânirea și inflamația sunt procese combinate, iar semnele distinctive cheie ale îmbătrânirii includ scăderi ale funcției gastro-intestinale și de răspuns imun al gazdei, precum și dezvoltarea unei inflamații cronice de grad scăzut. Vârsta înaintată (65-100 ani) aduce tranziții suplimentare importante în compoziția, funcția și stabilitatea microbiomului GI¹⁰.

1. 6. Tulburări asociate cu alterarea microbiotei

Deși studiul microbiomului uman și rolul său în stările de sănătate și boală este relativ nou, multe asociații interesante au fost descoperite, care încep să dezvăluie cât de importantă este microbiota comensală pentru sănătatea noastră și bunăstare^{9,10}.

1.6.1. Obezitatea și diabetul de tip 2

Obezitatea și tulburările asociate, cum ar fi diabetul zaharat tip 2 și sindromul metabolic, au devenit din ce în ce mai frecvente în ultimele decenii. Obezitatea este un sindrom complex, care se dezvoltă dintr-un dezechilibru prelungit dintre aportul de energie și consumul de energie.

Identitatea populațiilor cheie care pot fi asociate cu creșterea în greutate a fost, de asemenea, subiectul multor dezbateri. Cu toate că o serie de studii despre microbiota șoarecilor slabi și obezi au indicat faptul că populația șoarecilor obezi genetic și induși de dietă conțin proporții mai mari de Firmicutes și niveluri mai scăzute de Bacteroidetes decât omologii lor slabi, situația la om este mai puțin clară în ciuda faptului că au existat o serie de studii care s-au concentrat asupra microbiotei intestinale a indivizilor slabi și obezi^{11,12,13}. Într-adevăr, Ley și colegii săi, au constatat o scădere a raportului Firmicutes/Bacteroidetes ca urmare a pierderii în greutate la subiecți umani^{14,15}. Eforturile suplimentare ale lui Turnbaugh și colegii săi, au indicat o proporție mai mică de Bacteroidetes la persoanele obeze, o creștere de Actinobacteria, în timp ce nivelurile de Firmicutes au rămas neschimbate¹⁶.

DZ tip 2 este în principal legat de ciclul obezitate – rezistență la insulină. Cu toate acestea, o serie de factori genetici și de mediu influențează această stare. Din nou, modificările în compoziția microbiotei intestinale a adulților cu DZ tip 2, comparativ cu cea de la martorii sănătoși, a fost observată.

Larsen și colegii au dezvăluit faptul că proporțiile Firmicutes, și în special clasa Clostridia, s-au redus, în timp ce Bacteroidetes și clasa Betaproteobacteria s-au îmbogățit într-un grup cu DZ tip 2, comparativ cu lotul control al adulților sănătoși¹⁷.

1.6.2. Sindromul colonului iritabil

O varietate de dovezi sugerează un rol pentru microbiota intestinală la pacienții cu sindrom de intestin iritabil (Tabelul 1)¹⁸. În primul rând, printre acestea este observația clinică, în care sindromul de intestin iritabil se poate dezvolta la indivizii de novo, ca urmare a expunerii la infecții și infestări enterice¹⁹. Schimbări în fermentația bacteriană ar putea duce la modificări ale volumului de gaz și/sau compoziție.

Tabel 1. Dovezi pentru rolul microbiotei în sindromul colonului iritabil

1. Dovada directă a unui microbiote intestinale modificate <ul style="list-style-type: none"> • Sindromul de colon iritabil postinfecțios • Suprainfecția bacteriană intestinală • Alterarea microbiotei colonice 2. Dovezi ale efectelor fiziologice ale unei microbiote modificate <ul style="list-style-type: none"> • Alterările microbiotei care conduc la o creștere sau scăderea deconjugării sărurilor biliare - Modificări în scaun volum / consistență • Alterările microbiotei care conduc la o creștere sau scădere în fermentație bacteriană - Alterări în volum de gaz / compoziție 3. Mediator al unui status proinflamatoriu 4. Impactul terapeutic al alterării microbiotei <ul style="list-style-type: none"> • Antibiotice • Probioticele • Prebioticele

Dovezi suplimentare vin de la impactul clinic al intervențiilor terapeutice, cum ar fi antibioticele, prebioticele sau probioticele, care pot altera sau modifica microfilmul. Astfel, rifaximina atenuează simptomele de sindrom de intestin iritabil predominant cu diaree²⁰ și unele probiotice (*Bifidobacterium infantis* 35624), s-au dovedit a exercita răspunsuri clinice substanțiale²¹.

Zeng și colegii săi au inversat parțial modificările permeabilității intestinale mici, cu un cocktail de probiotice^{22,23}. Un alt organism, *Lactobacillus acidophilus*, s-a dovedit a produce efecte analgezice viscerale prin inducerea de micro-opioizi și receptorii canabinoizi²⁴, iar *Lactobacillus paracasei* s-a dovedit a atenua hipercontractilitatea musculară a intestinului^{24,25}. *Lactobacillus reuteri*, de asemenea, s-a dovedit a inhiba durerea viscerală indusă de distensia colorectală la șobolani²⁵.

În plus, membrii genului *Bacteroides* s-au dovedit a fi prezenți la un nivel mai scăzut la pacienții copii și adolescenți cu sindrom de intestin iritabil decât la martorii sănătoși și creșterea *Alistipes* a fost legată de o frecvență mai mare a durerii²⁶. Jeffery și colegii săi au descoperit subgrupuri în rândul pacienților cu sindrom de intestin iritabil, cu diferite semnaturi microbiene, cu toate acestea, în general, o creștere a raportului Firmicutes/Bacteroidetes a fost evidentă la pacienții cu intestin iritabil, care erau diferite de populații normale²⁷.

Aceste studii sugerează că ar putea exista o legătură între microbiota intestinală și intestinul iritabil, care ar putea, în timp, duce la proiectarea de opțiuni terapeutice.

1.6.3. Bolile inflamatorii intestinale (BII)

Bolile inflamatorii intestinale, cuprinzând atât colita ulcerativă, cât și boala Crohn, se caracterizează printr-o inflamație cronică și recidivantă a tractului gastro-intestinal. Există un volum considerabil de dovezi pentru a susține ipoteza că microflora intestinală endogenă joacă un rol crucial în patogeniza bolilor

inflamatorii intestinale^{28,29}. Unele dintre aceste dovezi sunt onorate de timp, cum ar fi predilecția BII pentru zonele bogate în bacterii, precum și rolul contactului fluxului de fecale în susținerea inflamației.

Inflamația intestinală este în general asociată cu o diversitate bacteriană redusă și, în special, o abundență inferioară, și o complexitate redusă, a tipurilor Bacteroidetes și Firmicutes cu o reducere specifică a abundenței în *Clostridium leptum* și grupările *Clostridium coccoides*^{30,31}.

A fost demonstrat că Firmicutes prausnitzii, este mai puțin abundent la pacienții cu BII decât la persoanele sănătoase.

Lucrări recente legate de analiza biopsiilor intestinale și probele de scaun de la pacienți cu BII și subiecți sănătoși, au documentat o asociere a statutului bolii BII cu modificări ale enterobacterilor, Ruminococcaceae și Leuconostoc Aceae, în timp ce la nivel de gen, nivelurile de *Clostridium* au crescut în timp ce *Roseburia butirat* -producător și *Phascolarctobacterium* producător - succinat au fost reduse semnificativ, atât în colita ulcerativă, cât și Boala Crohn³². Indiferent de populația microbiană sau patogenul în cauză și, deși cauzalitatea specifică nu a fost încă clarificată, acestea și alte studii au subliniat cu siguranță o legătură între microbiota intestinală și BII.

1.6.4. Cancerul colorectal CCR

Un rol pentru microbiomul intestinal în patogeniza cancerului colorectal a fost sugerat în mai multe publicații^{33,34}. Cu toate că nici un organism cauzal nu a fost identificat, o serie de studii au implicat o asociere pentru membrii *Fusobacterium* cu CCR^{35,36}.

Această observație a fost susținută de analiza secvențiată ADNr 16S a microbiomului colorectal, care a relevat membri ai genului *Fusobacterium*, inclusiv *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum* și *Fusobacterium necrophorum*, în proporție ridicată în țesutul tumoral. Aceste dovezi s-au dovedit a fi însoțite de o reducere semnificativă a Firmicutes și Bacteroidetes. Acest lucru poate sugera că *Fusobacterium* species contribuie la tumorigeneza printr-un mecanism inflamator^{33,37}.

1.6.5. Bolile alergice

În ultimele decenii a existat o creștere extraordinară a prevalenței bolilor alergice, cum ar fi astmul, eczema și alergii alimentare.

Ipoteza igienei a sugerat că expunerile microbiene în timpul copilăriei sunt esențiale pentru dezvoltarea sistemului imunitar, precum și modificările în dezvoltarea sistemului imunitar predispune la pierderea auto-toleranței¹⁵.

Dovezi recente au sugerat că schimbările microbiotei intestinale joacă un rol important în influențarea evenimentelor imunologice care ar putea duce la dezvoltarea bolilor alergice. Alterarea colonizării microbiene și expunerile în timpul perioadei perinatale și copilăria timpurie, în special expunerea la

antibiotice, poate promova perturbări în răspunsurile imune, ceea ce duce la tulburări alergice și atopice¹⁵. Cu toate acestea, în ciuda dovezilor puternice, justificând rolul alterării microbiotei intestinale în bolile atopice, tratarea acestor tulburări, folosind probioticele a fost o nereușită.

1.6.6. Boli neuropsihiatrice

Disfuncția dintre creier și sistemul imunitar intestinal poate fi un factor important care contribuie la patogeniza mai multor afecțiuni, incluzând schizofrenia, tulburările de dispoziție, tulburarea obsesiv-compulsivă, autism, deficit de atenție/tulburare de hiperactivitate, anorexia nervoasă, narcolepsia și oboseala cronică¹⁶. La indivizii susceptibili genetic, modificarea microbiotei intestinale poate duce la o perturbare dintre bariera hematoencefalică și generarea cerebrală reactivă de autoanticorpi, iar în condiții inflamatorii poate exista o perturbare a barierei hemato-encefalice, care poate facilita transportul și apoi legarea anticorpilor, rezultând dezvoltarea acestor tulburări de comportament¹⁶.

Cu toate acestea, până în prezent nu se știe dacă există dovezi pentru modificarea microbiotei intestinale pentru a trata în mod eficient aceste tulburări¹⁶.

2. Infecția cu *Clostridium Difficile*

2. 1. Definiție, istoric, epidemiologice, etiopatogeneză

Clostridium difficile este o bacterie baciliformă Gram-pozitivă, mobilă, strict anaerobă, sporogenă, care la om colonizează intestinul gros și poate duce la apariția infecției cu *Clostridium difficile* care din punct de vedere clinic se poate manifesta de la forme ușoare până la megacolon toxic, de cele mai multe ori după un tratament antibiotic³⁸⁻⁴⁰.

Forma vegetativă a acestui bacil moare repede în contact cu oxigenul din aerul atmosferic, dar, pentru a supraviețui în contact cu aerul atmosferic, clostridiile sporulează și se transformă în spori. Sporii acestui bacil nu reprezintă forma reproductivă a bacteriei, ei sunt forma și strategia de supraviețuire a bacteriei în medii ostile. Sporii sunt forma prin care se transmite infecția cu *Clostridium difficile*. Sporii *Clostridium difficile*, supraviețuiesc în mediul spitalicesc (peste 6 luni), rezistă la majoritatea dezinfectantelor uzuale, rezistă la antibiotice, deoarece sporul este inactiv metabolic. Pot fi distruși de căldură și de dezinfectantele care generează oxigen (clor, peroxizi)^{38,41,42}.

2.1.1. Istoric

Din anul 1935, ne parvin primele informații cu referire directă la *Clostridium difficile*, când în Denver, statul Colorado, Hall și O'Toole, descriau pe atunci, un bacil descoperit în scaunul noilor născuți, pe care l-au numit ***Bacillus difficile***, datorită dificultăților legate de izolarea experimentală și creșterea lentă din mediul de cultură⁴³⁻⁴⁶.

În cel de-al doilea război mondial, pe respectivul bacil a fost testată penicilina și s-au inventat metode de cultură în anaerobioză.

Datorită faptului că a existat și există o proporție însemnată de purtători sănătoși, cu o pondere de aproximativ 3-5% din cadrul populației adulte și 50-60% la copii cu vârsta de maxim 2 ani, mult timp acest bacil a fost văzut și considerat ca fiind o componentă normală a florei microbiene care populează partea inferioară a sistemul gastrointestinal uman – ileonul terminal și colonul – nefiind capabil să dezvolte situații patologice la om, deși, încă de la primele cercetări s-a făcut remarcată capacitatea acestuia de a elabora o toxină puternică^{40,47}.

Rolul jucat de *Clostridium difficile* în etiopatogeneza unor enterite la pacienții umani, exprimate în special prin colite pseudomembranoase, a fost afirmat începând cu anul 1970. A început din ce în ce mai bine să fie studiat din anul 1974, când un grup de medici americani, au descris prima epidemie de spital cu *Clostridium difficile* numită și “colita după clindamicină” care a afectat 21% din pacienții tratați cu clindamicină, fiind vorba de un număr de 200 de cazuri care manifestau clinic diaree severă și colită pseudomembranoasă^{48,49}.

După anul 2000, în Canada și SUA apar cazuri de I.C.D. determinate de ribotopul 027 cu o contagiozitate ridicată, cu rată înaltă de transmitere interumană, evoluție comunitară și rezistență la fluorochinolone^{50,51}.

În România, în ianuarie 2011 au fost diagnosticate primele cazuri de infecții cu *Clostridium difficile*, o dată cu apariția testelor de determinare a toxinelor A și B, ajungând ca în 2013 să existe 60-70 de cazuri pe lună și la peste 100 de cazuri pe lună în 2014⁴⁰.

Tulpinile din ribotopul 027 sunt mai sporogene, iar eliminarea sporilor durează mai mult timp de unde și tendința la recidive mai frecvente.

În România, în anul 2014 a fost introdusă supravegherea infecțiilor cu *Clostridium difficile* în spitale.

În anul 2015, în România au fost înregistrate 4.958 de cazuri de infecții cu *Clostridium difficile*, majoritatea apărute după tratamente cu antibiotice, în special cefalosporine de generația a treia sau fluorochinolone⁴⁰.

2.1.2. Epidemiologie

Sursele de infecție cu CD sunt variate de la contaminarea directă până la surse posibile din regnul animal sau contaminarea cu spori de CD – extrem de rezistenți în timp.

Calea de transmitere dominantă a CD este fecal-orală prin mână murdară contaminată cu spori.

Clostridium difficile poate exista în intestinalele pacienților ca germene comensual, situație definită ca și colonizare bacteriană.

Apariția unui dezechilibru în flora normală din tubul digestiv, datorită unor factori supraadaugați, poate determina eliminarea concurenței microbiene a altor germeni saprofiți și dezvoltarea în exces a populațiilor de *Clostridium difficile*.

2.1.3. Etiopatogeneza

Infecția cu *Clostridium difficile* poate prezenta diferite aspecte clinice, în funcție de starea de imunitate a gazdei, care pot varia de la stare asimptomatică până la megacolon toxic și, uneori, deces.

Cele mai frecvente cazuri de infecție cu *Clostridium difficile* se datorează în mare parte tratamentului cu antibiotice.

Cele mai frecvente antibiotice implicate în producerea infecției au fost cefalosporinele (mai ales cele de generația a 3-a), penicilinele (mai ales ampicilina,

amoxicilina), lincomicina și clindamicina; uneori poate apărea și după folosirea unor agenți antineoplazici (methotrexatul sau fluorouracilul)^{40,52,53,54}.

La nivelul intestinului gros, bacilul produce două toxine majore: toxina A (*enterotoxina*) care produce blocarea absorbției lichidelor intestinale și o secreție crescută de albumina (*care se va depune sub formă de pseudomembrane*) și toxina B, cu efect citotoxic care potențează efectul toxinei A și produce necroze și accelerarea tranzitului intestinal (*diaree*)^{40,55}. După anul 2000, în Canada și SUA apar cazuri de I.C.D. determinate de ribotopul 027 cu o capacitate crescută de a produce toxine, o contagiozitate ridicată cu rata înaltă de transmitere interumană, evoluție comunitară și rezistență la fluorchinolone a tulpinilor bacteriene de *Clostridium difficile*. Bacilul *Clostridium difficile*, prezintă două forme viabile infectante^{40,56,57}:

- ✓ *forma vegetativă*, sensibilă la substanțe biocide și în mare parte distrusă de aciditatea gastrică;
- ✓ *forma sporulată*, cu supraviețuire mare, până la ani de zile în mediul extern, rezistentă la aciditatea gastrică și sensibilă la substanțe clorigene în concentrație adecvată (> 1000 ppm clor activ).

Pentru producerea unei infecții clinic manifestate (ICD) la om sunt obligatorii cel puțin două condiții/evenimente:

- expunere/contaminare cu CD patogen (toxigen);
- prezența unor condiții favorizante din care cele mai cunoscute, sunt:
 - ✓ spitalizarea sau asistența medico-socială în unități de îngrijire;
 - ✓ terapia cu antibiotice;
 - ✓ vârsta peste 65 ani;
 - ✓ intervențiile chirurgicale și explorările/abordările endoluminale la nivelul tractului digestiv;
 - ✓ tratamentele de lungă durată cu inhibitori ai pompei de protoni, blocante ale receptorului histaminic-2 sau, terapia cu citostatice, antiinflamatorii non-steroidice, imunoinhibitori, etc.;
 - ✓ poate apărea și în absența oricărui factor de risc⁵⁵.

2. 2. Tablou clinic

Simptomele clinice variază de la transportul asimptomatic, diaree ușoară sau moderată, la boala fulminantă reprezentată de megacolonul toxic (tabel 2)⁴⁰.

Cele mai incriminate antibiotice care produc infecția cu *Clostridium difficile* sunt penicilinele, cefalosporinele și clindamicina, dar *poate apărea și în absența oricărui factor de risc*^{40,55}.

Tabel II. Simptome apărute în cadrul infecției cu *C. Difficile*^{58,59}

Forme clinice de infecție cu <i>C. difficile</i>	Simptomatologie
Diaree - ușoară/medie	Diaree apoasă ± sânge fără modificări la colonoscopie
Colită fără pseudomembrane	Diaree cu sânge, dureri abdominale moderate spre severe, leucocitoză, febră, colită parțială evidențiată colonoscopic
Colită pseudomembranoasă	Diaree severă cu sânge, dureri abdominale atroce, febră, leucocitoză marcată, pseudomembrane colonoscopice

2. 3. Diagnostic paraclinic

Diagnosticul infecției cu *C. difficile* se poate stabili pe baza prezenței diareei și determinarea toxinelor din scaun.

Tulpinile netoxigene nu se consideră cauze ale bolii diareice.

Indicații de testare⁶⁰⁻⁶³:

- ✓ pacienții la care diareea apare după 48 de ore de la internare;
- ✓ diaree care au avut spitalizări recente sau tratament cu antibiotice, antisecretozii gastrice, imunosupresoare.

Metode de diagnostic^{50,64-66}

a. Teste de citotoxicitate

Sensibilitatea ridicată și testele sunt considerate "gold standard". Limite: durata - de aproximativ 2 zile.

b. Cultivare

Sensibilitate crescută (potențial screening).

Incubarea se face 48-72 ore în anaerobioză.

Medii de cultură adecvate:

- Clostridium difficile agar;
- Clostridium difficile selective agar;
- geloză-sânge Columbia cu supliment selectiv;
- cefoxitin-mannitol agar;
- agar.

Diagnosticul cert al ICD nu este suficient doar pe izolarea unei tulpini de *C. difficile*. Întotdeauna cultivarea trebuie combinată cu o metodă de detectare a toxinelor.

c. Depistarea toxinelor A și B prin metode imunoenzimatic

d. Depistarea toxinelor A și B prin metode moleculare

e. Depistarea enzimei GDH (glutamat dehidrogenaza) - sensibilitate ridicată, însă specificitate redusă (nu face diferența între tulpinile toxigene și netoxigene).

2. 4. Tratament

Metode generale: îndepărtarea completă atunci când este posibil, a factorului (factorilor) favorizant(i)(de exemplu – întreruperea administrării de antibiotic, de antisecretor gastric) - inițierea terapiei etiologice și a măsurilor de limitare a transmiterii interumane⁶⁷.

Terapia pentru infecția non-severă cu *C. difficile* (CDI) constă în metronidazol oral - 500 mg la fiecare 8 ore, sau vancomicină orală 125 mg la fiecare 6 ore^{50,53,68-70}. Vancomicina orală nu este absorbită sistemic și atinge niveluri predictibil de mari în colon. Schemele de administrare de 125 mg de patru ori pe zi și de 500 mg de patru ori pe zi sunt la fel de eficiente pentru tratamentul CDI non-severă⁶⁸. Vancomicina intravenoasă nu are nici un efect asupra colitei *C. difficile*, deoarece antibioticul nu este excretat în mod semnificativ în colon.

Durata tratamentului - durata recomandată a terapiei antibiotice inițiale pentru diaree non-severă cu *C. difficile* este de 10 până la 14 zile⁶⁹. Pacienții cu o infecție de bază care necesită o durată prelungită a antibioticelor prezintă un risc crescut de recurență⁷⁰.

Repetarea testelor scaunelor NU este justificată în timpul sau după tratamentul la pacienții care se recuperează sau nu prezintă simptome. Până la 50% dintre pacienți prezintă teste pozitive pentru scaun timp de șase săptămâni după terminarea terapiei. Mai multe studii randomizate au demonstrat eficacitatea echivalentă a metronidazolului și a vancomicinei pentru tratamentul CDI non-severă^{70,71,72}.

Într-un studiu prospectiv, randomizat, dublu-orb, incluzând 81 pacienți cu CDI ușoară sau moderată severă, metronidazolul și vancomicina au produs rate similare de vindecare clinică (90 față de 98%)⁷³. Datele dintr-un studiu randomizat ulterior demonstrează că metronidazolul este inferior față de vancomicină, în special în stabilirea infecției recurente și/sau severe^{68,70}.

Liniile directoare publicate în anii 1990 au susținut metronidazolul față de vancomicină ca terapie de primă linie⁷⁰⁻⁷⁴. Motivele includ costul mai mic al metronidazolului în raport cu vancomicina și eficacitatea clinică comparabilă în boală non-severă. În plus, utilizarea metronidazolului a fost favorizată față de vancomicină pentru a limita răspândirea enterococilor rezistenți la vancomicină (VRE), deși datele ulterioare au sugerat că riscul de colonizare a colonului VRE este echivalent cu aceste medicamente^{70,75,76}.

Limitele metronidazolului includ neuropatia periferică dependentă de doză și efectele secundare - greața și gust metalic. Cu toate că studiile de mai sus sunt limitate datorită metodologiilor observaționale, concluziile ridică posibilitatea ca metronidazolul să fie mai puțin eficace decât vancomicina orală⁷³.

Utilizarea vancomicinei pe cale orală este adecvată pentru terapia inițială a bolii non-severe la pacienții: gravidă, alăptare sau intoleranța/alergeni la metronidazol.

2.4.1. Boala recurentă

Prima recidivă - Semnele și simptomele recurenței sunt similare cu cele din episodul inițial, de obicei fără progresie în severitate⁷². Deoarece un test pozitiv de toxină a scaunului nu exclude transportul asimptomatic, ar trebui luate în considerare și alte cauze pentru diaree, inclusiv alte infecții, boală intestinală inflamatorie sau sindrom de intestin iritabil. Colonoscopia ar trebui luată în considerare în cazuri atipice pentru a evalua dovezile CDI și pentru a exclude alte etiologii.

Pentru tratamentul unui episod inițial al CDI, fidaxomicina a fost asociată cu o incidență mai scăzută a CDI recurente decât cu vancomicina (15% față de 25%)⁷⁷. Pentru tratamentul recidivei inițiale a CDI, răspunsul inițial la terapia cu fidaxomicină și vancomicină a fost comparabil, deși probabilitatea reapariției după patru săptămâni mai târziu este mai mică cu fidaxomicina decât cu vancomicina (20% față de 36%)⁷⁸.

Fidaxomicina este un agent alternativ pentru tratamentul unei recidive inițiale a CDI. Într-un studiu care a inclus 128 de pacienți cu o primă recurență CDI, rata de recurență a fost mai mică în rândul pacienților tratați cu fidaxomicină decât în rândul pacienților tratați cu vancomicină (19% față de 35%)^{78,79}.

Fidaxomicina este un antibiotic macrociclic care este bactericid împotriva *C. difficile* (spre deosebire de metronidazol și vancomicină, care sunt bacteriostatice)^{79,80}. Are un spectru antimicrobian mai restrâns decât metronidazolul sau vancomicina, conducând la o mai mică perturbare a microflorei anaerobe colonice normale⁷⁶⁻⁸¹.

Fidaxomicina poate fi o terapie adecvată la pacienții cu CDI recurentă sau poate ca terapie inițială la pacienții cu risc crescut de apariție a bolii recurente⁷⁹, deși parametrii pentru utilizarea cea mai potrivită sunt încă nedefiniți.

Fidaxomicina nu numai că reduce incidența bolii recurente, dar poate, de asemenea, reduce incidența reinfectării cu o tulpină diferită^{79,80}.

În megacolonul toxic sau ileus : vancomicină 500 mg la fiecare 6 ore, oral, la care se adaugă vancomicină 500 mg la fiecare 6-12 ore prin clismă terapeutică (în 100-500 ml lichid salin) și metronidazol 500 mg iv la fiecare 8 ore.

De la a doua recidivă: se administrează vancomicină oral, pe durată prelungită:

- ✓ 125 mg la 6 ore, 10-14 zile;
- ✓ apoi 125 mg la 12 ore, 7 zile;
- ✓ apoi 125 mg zilnic, 7 zile;
- ✓ apoi 125 mg la 2-3 zile, 14-56 de zile.

Utilizarea terapiei intermitente cu antibiotice se bazează pe o teorie că recăderea se poate datora prezenței sporilor persistenți care pot supraviețui terapiei cu antibiotice. Tratamentul intermitent poate permite sporilor să germineze în zilele în care nu se administrează antibiotice.

Tratamentele intermitente și cronice cu vancomicină au fost evaluate în studiile observaționale⁸¹⁻⁸⁴. Într-un studiu efectuat pe 163 de cazuri CDI, de exemplu, 29 de pacienți au fost tratați cu un regim continuu cu vancomicină și 7 au fost tratați cu un regim cu pulsuri vancomicină; rata de recurență a fost de 31% și, respectiv, 14%, comparativ cu o rată de recurență de 45% pentru alte regimuri⁸⁵.

Principalul avantaj farmacologic al vancomicinei față de metronidazol este că vancomicina nu este absorbită, astfel încât concentrațiile maxime ale medicamentului pot acționa intracolonic la locul infecției. Avantajul major al metronidazolului față de vancomicină este costul metronidazolului care este substanțial mai mic. În ceea ce privește activitatea în vitro, riscul de recidivă și potențialul de apariție a enterococilor rezistenți la vancomicină, medicamentele par a fi relativ similare^{70,81,86,87}.

Administrarea intracolonică a vancomicinei prin clismă (administrată în asocieră cu metronidazol intravenos) este o opțiune pentru pacienții care nu tolerează medicamentele pe cale orală, dar există riscul de perforare a colonului. Prin urmare, utilizarea vancomicinei intracolonic trebuie limitată la pacienții care nu răspund la tratamentele standard, iar procedura trebuie efectuată de personal cu experiență în administrarea clismei.

Abordarea clinică - recomandăm ca pacienții cu boală severă să fie tratați cu vancomicină orală (125 mg de patru ori pe zi). Pentru pacienții cu boală severă care nu demonstrează o îmbunătățire clinică, sugerăm creșterea dozei de vancomicină pe cale orală la 500 mg la fiecare 6 ore. Fidaxomicina se poate lua în considerare la pacienții care nu pot tolera vancomicina, deși sunt necesare mai multe date. La stabilirea ileusului, este adecvată adăugarea de metronidazol intravenos (500 mg la fiecare opt ore), vancomicină intracolonic la pacienții cu ileus profund.

Literatura scrisă înainte de apariția tulpinii hipervirulente a sugerat o intervenție chirurgicală pentru pacienții cu CDI cu boală severă care nu răspund la terapia medicală în decurs de 48 de ore, perforația intestinului sau eșecul sistemului multiorgan^{73,87,88}.

Cu toate acestea, la stabilirea CDI din cauza tulpinii hipervirulente, unii pacienți au progresat de la boală severă până la deces în mai puțin de 48 de ore. Mai mult, unii pacienți cu boală severă nu pot beneficia de terapie enterală datorită ileusului sau greței și vărsăturilor severe. Datele din literatura canadiană cu tulpina hipervirulentă au fost utilizate pentru a încerca să standardizeze criteriile pentru intervenția chirurgicală. Într-o revizuire retrospectivă, colectomia a fost cea mai benefică pentru pacienții imunocompetenți cu vârsta ≥ 65 ani cu un număr de

celule albe din sânge ≥ 20.000 celule/microL și/sau lactat de plasmă între 2,2 și 4,9 mEq/L^{89,90}.

Colectomia subtotală - este procedura pentru care există cea mai mare experiență în stabilirea intervenției chirurgicale de urgență pentru CDI^{55,74,89,90,91}. Într-o revizuire retrospectivă a 14 pacienți care au suferit o intervenție chirurgicală pentru CDI severă, au supraviețuit nouă pacienți, dintre care opt au avut colectomie subtotală și unul a avut o hemicolectomie dreaptă⁹². Patru dintre cei cinci pacienți care au decedat au suferit hemicolectomie stângă.

2.4.2. Terapii alternative

Rifaximin - serii mici de bolnavi au sugerat că terapia secvențială cu vancomicină urmată de rifaximin poate fi eficientă pentru tratamentul CDI recurent^{77,88,93}. Într-o serie, opt bolnavi cu CDI recurente au primit două săptămâni de rifaximină atunci când au fost asimptomatice, imediat după terminarea ultimului ciclu de vancomicină. Șapte pacienți nu au prezentat o recurență ulterioară a infecției⁹³.

Studiile privind *probioticele* sunt neconcludente în ceea ce privește beneficiile tratamentului.

Două meta-analize publicate în 2012, care evaluează eficacitatea probioticelor pentru tratamentul diareei asociate cu antibiotice, au sugerat un beneficiu al probioticelor pentru tratamentul CDAD^{94,95,96,97}, deși puține dintre studiile incluse au fost propuse pentru evaluarea CDAD. Înainte de aceste studii, autorii unei revizii Cochrane din 2008 a probioticelor pentru tratamentul CDAD, inclusiv patru studii randomizate, au concluzionat că nu există dovezi suficiente pentru a recomanda probioticele ca adjuvant la terapia antimicrobiană pentru tratamentul CDAD^{98,99}.

Aceste constatări sugerează că probioticele pot fi o terapie adjuvantivă utilă pentru terapia antimicrobiană pentru CDAD la pacienții cu boală recurentă non-severă, atâta timp cât nu există comorbidități semnificative.

Anticorpi monoclonali - Utilizarea adjuvantă a anticorpilor monoclonali împotriva toxinelor *C. difficile* A și B (în plus față de terapia cu antibiotice) pare să reducă rata de recurență a infecției cu *C. difficile*; acestea nu sunt încă disponibile pentru utilizarea clinică de rutină. Într-un studiu efectuat la 200 de pacienți cu *C. difficile* tratați cu antibiotice (metronidazol sau vancomicină) în plus față de anticorpii monoclonali sau cu placebo, ratele de recurență au fost de 7% comparativ cu 25%^{100,101,102,103}. Sunt necesare studii pentru a confirma aceste rezultate pentru boala recurentă.

Alternative antibiotice - O meta-analiză a 12 studii, inclusiv 1157 de participanți, a evaluat opt antibiotice diferite pentru tratamentul CDI: vancomicină, metronidazol, acid fusidic, nitazoxanidă, teicoplanină, rifampicină, rifaximină și

bacitracină¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. În comparațiile perechi, nici un antibiotic unic nu era în mod clar superior celui alt. Terapia combinată a fost încercată fără succes.

Transplantul de materii fecale - Bacteriologia fecală poate fi utilă pentru tratamentul pacienților cu CDI recurente și începe să fie folosită în unele țări încă de la prima recidivă.

3. Transplantul fecal

3. 1. Definiție, istoric

Primele înregistrări ale transplantului de materii fecale datează din China secolului al IV-lea, unde a fost aplicată "*supă galbenă*" în cazurile de intoxicații severe cu alimente și diaree.

Creștinul german Paullini (1643-1712) a fost primul care a subliniat teoria-potențialului terapeutic al excrețiilor umane în activitatea sa "Heilsame Dreck-Apotheke" (literalmente: nămol vindecător)^{107,108}. Descoperirea fundamentală de Antoni Van Leeuwenhoek că scaunul său conținea microbi - „Cele mai mici creaturi ale lui Dumnezeu”¹⁰⁹- precum și observații de la zoologul rus Metchnikoff (1845-1916), a pus bazele timpurii pentru domeniul modern al medicinei.

Despre această metodă s-a discutat prima dată în anul 1958 de către un medic australian, care a administrat pacienților clisme cu materii fecale provenite de la persoane sănătoase pentru refacerea florei intestinale cu bacterii benefice de tipul *Lactobacillus acidophilus* și *Bifidobacterium bifidus*^{107,110}.

Transplantul de materii fecale este folosit ca metodă terapeutică din anul 2004. Procedura constă în înlocuirea florei bacteriene din intestinul persoanei bolnave cu altă floră bacteriană provenită din materiile fecale ale unei persoane sănătoase, de preferință o rudă apropiată, dar nu o persoană cu care pacientul locuiește, presupunându-se că poate suferi aceleași dezechilibre ale florei intestinale. Donatorul trebuie să urmeze un anumit protocol pentru excluderea anumitor afecțiuni: infecții, viroze, parazitoze, virusuri hepatice, HIV. După prelevare, materiile fecale sunt omogenizate și mixate cu ser fiziologic steril pentru a le spori fluiditatea și apoi sunt administrate pacientului prin colonoscop, clismă sau pe tub nazo-jejunal, ocolind stomacul (din cauza acidității existente în stomac, populația bacteriană ar fi distrusă)¹¹¹⁻¹²⁰.

Tehnica este folositoare pentru restabilirea echilibrului între bacteriile de fermentație și cele de putrefacție, având în vedere că depășirea procentului de 15% a bacteriilor de putrefacție favorizează o serie de dezechilibre cu predispoziție la apariția infecțiilor^{112,121,122}.

3. 2. Metodologia FMT

3. 2. 1. Selecția donatorilor

Donatorii potențiali de scaun sunt identificați în general de către subiecți, de regulă, un partener intim sau o rudă de gradul I.

Riscul de transmitere a agenților infecțioși poate fi scăzut dacă rudele sau soții sunt donatori, deoarece sunt susceptibili să împartă ceva factori de risc infecțioși cu destinatarul.

Donatorii sunt excluși dacă au luat antibiotice în intervalul a 90 de zile de la procedura planificată. Donatorii sunt prospectiv testați pentru a determina eligibilitatea (tabel 3)^{123,124}.

Tabel III. Screening donatori

Screening-ul scaun donator

- Examen coproparazitologic
- Coprocultura:
 - include, în general: Salmonella, Shigella, Escherichia coli, O157: H7, Yersinia enterocolitica, și Campylobacter
- Toxina Clostridium difficile A și B
- Unii practicanți cer suplimentar antigenul Cryptosporidium și antigenul Giardia

Screening-ul seric al donatorilor

- HIV-1 și HIV-2
- Hepatita A, B și C

Comorbidități gastrointestinale

- istoric de boli inflamatorii intestinale
- istoric de sindrom de intestin iritabil, constipație cronică sau diaree cronică
- istoric de boli maligne gastrointestinale

Altă patologie

- teren atopic
- boli autoimune, de exemplu, scleroza multiplă
- fibromialgie, sindrom de oboseală cronică

3. 2. 2. Prepararea materialelor fecale

Nu există un protocol standardizat pentru prepararea fecalelor. Fecalele sunt, de obicei, colectate în ziua transplantului de la donator.

Se diluează suspensia de fecale (~ 150 ml) în soluție salină sterilă 0,9% (pentru a nu afecta bacteriile anaerobe,) până la un volum de 400-425 ml. Ulterior, suspensia este filtrată de mai multe ori. Această suspensie se transferă într-o fiolă sterilă și administrată în decurs de o oră.

Pacienții primesc 4 mg loperamidă pentru a reduce motilitatea intestinului imediat după FMT și la 6 ore după această procedură. Pacienții au primit o dietă normală după aproximativ 5 ore.

3. 2. 3. Mod de administrare

Căile de administrare a materialelor fecale includ: tubul nazogastric, gastroscopia, colonoscopia sau clisma rectală. Alegerea căii de administrare depinde și de tipul de boală și de locul anatomic al bolii.

a) Clisma - Multiple studii au arătat succesul FMT administrat prin clismă¹²⁵⁻¹³⁰. O serie de cazuri de 27 de pacienți cu *Clostridium difficile* refractar sau recurent care au primit FMT prin clismă de retenție, folosind scaun de la doi donatori sănătoși¹³¹. După FMT, 25 din 27 (93%) pacienți au prezentat rezoluție clinică. Nici o recidivă sau evenimente adverse nu au apărut la pacienții care au fost tratați cu succes cu FMT, cu o medie de timp de 427 de zile de urmărire după FMT. Eficacitatea FMT poate depinde de tehnica utilizată pentru curățirea colonului înainte de administrarea climei de fecale¹³². Curățirea (de exemplu, cu polietilenglicol oral, lavajul) poate reduce densitatea de *C. difficile*, inclusiv sporii inactivi care altfel metabolic ar putea converti la forme vegetative.

b) Colonoscopia - Spre deosebire de clisme, care, în general, pot ajunge doar la flexura splenică, colonoscopia permite administrarea de bacterii pe traiectul colonului și, eventual, intestinul distal unde sporii de *C. difficile* se pot afla, și permite inspectarea colonului pentru prezența colitei, pseudomembranelor, polipi sau cancer. O serie de studii au demonstrat că o singură administrare a fost extrem de eficace în eradicarea CD^{108,133,134,135}. Având în vedere ușurința de administrare atât în spital, cât și ambulatoriu și livrarea florei introduse la locul unde se află cele mai multe *C. difficile*, administrarea printr-un colonoscop a fost propusă ca și calea preferențială de livrare a microbiotei fecale¹³⁶. Cu toate acestea, colonoscopia trebuie efectuată cu precauție în această situație pentru a minimiza riscul de perforație. Eficacitatea FMT livrată prin intermediul colonoscopiei la pacienții cu recurențe CDI a fost stabilită în mai multe studii¹³⁷⁻¹⁴⁶.

c) Tub nasogastric/jejunal - Administrarea prin jejun cu livrare nazogastrică permite bacteriilor să ajungă la nivelul intestinului subțire și apoi de-a lungul colonului. FMT administrat în acest mod a fost demonstrat a fi de succes în mai multe studii¹⁴⁷⁻¹⁵². După perfuzia de fecale, pacienții au prezentat o diversitate de bacterii fecale, similar cu cel de la donatorii sănătoși, cu o creștere a speciilor *Bacteroidetes* și *Clostridium* IV și XI/Va și o scădere a speciilor de proteobacterii. Diareea ușoară, crampele abdominale care s-au rezolvat în trei ore de la perfuzarea fecalelor au fost cele mai frecvente efecte secundare (94% și respectiv 31%)^{107,153}.

d) Oral - Într-un studiu, cu 20 de pacienți cu cel puțin trei episoade ușoare până la moderate de CDI și eșecul unui șase până la opt săptămâni cronice cu vancomicină sau cel puțin două episoade de CDI severă care necesită spitalizare au fost tratați cu până la 30 de capsule FMT congelate în două zile consecutive^{154,155,156}. Diareea a fost rezolvată după tratamentul inițial la 14 din 20

de pacienți și la 4 din 6 non-responderi care au fost retrași. Nu au fost observate reacții adverse grave în timpul perioadei de urmărire de șase luni. Cu toate acestea, sunt necesare studii mai ample pentru a confirma aceste rezultate și pentru a evalua siguranța și eficacitatea pe termen lung.

3. 2. 4. Evenimente adverse

FMT este considerat un tratament sigur. Au fost raportate efecte adverse în opt (2,5%) din 317 de cazuri. Evenimente adverse frecvente ale FMT includ diaree tranzitorie, crampe abdominale și constipația. Răspunsurile inflamatorii tranzitorii, cum ar fi creșterea proteinei C reactive și febra sunt mai frecvente la pacienții cu IBD, a căror integritate mucosală a fost afectată¹⁵⁷.

3. 3. Aplicarea FMT în bolile gastrointestinale

3. 3. 1. Infecția cu Clostridium Difficile

Clostridium difficile este un anaerob gram-pozitiv, care cauzează diareea semnificativă la pacienții tratați cu antibiotice sau imunocompromiși.

Tratamentul standard este cu vancomicină sau/și metronidazol. Totuși, o parte semnificativă a pacienților cu CDI continuă să dezvolte CDI recurentă (RCDI), care poate duce la o morbiditate semnificativă și mortalitate. Antibioticele au fost implicate în patogeniza CDI. Utilizarea antibioticelor poate duce la disbioză (dezechilibru microbian), și acest lucru permite ca, C. difficile să înflorească¹⁵⁷⁻¹⁶¹. Pentru RCDI, fidaxomicina poate fi utilizată. A fost demonstrat că are o rată similară de vindecare ca și vancomicină, dar se pare că are rate mai scăzute de recurență (probabil datorită unui spectru mai restrâns de antimicrobiene, activitate și direcționare mai selectivă a C. difficile)¹⁶²⁻¹⁶⁴.

Literatura de până acum susține FMT pentru utilizarea în CDI ca fiind sigur, bine tolerat, eficient.

FMT este indicat atunci când nu există răspuns la terapia standard pentru cel puțin o săptămână.

Pentru CDI sever, este indicat atunci când nu există răspuns la tratament după o perioadă maximă adecvată, terapie timp de 48 de ore¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

3. 3. 2. Boala inflamatorie intestinală (IBD)

IBD este o tulburare intestinală care include colita ulcerativă (UC) și boala Crohn (CD). IBD este caracterizată prin inflamația cronică a tractului gastrointestinal, pacienții pot prezenta diaree, greață, scădere în greutate, pierderea apetitului, febră și abdomen dureros. Fiziopatologia exactă este necunoscută, dar cauza este multifactorială, datorită dezechilibrelor în microbiota intestinală, în epiteliul intestinal și imunitatea la persoanele sensibile genetic.

Dovezile care demonstrează că disbioza microbiană se leagă cu IBD-ul a condus la explorarea FMT ca terapie pentru această boală¹⁶⁸⁻¹⁶⁹. O recentă

revizuire sistematică și meta-analiză la 18 studii, incluzând 122 pacienți cu IBD tratați cu FMT, au descoperit clinic rate de remisiune de 36,2%. Analiza subgrupurilor a arătat că remisia clinică în cazul pacienților cu UC a fost de 22%, în timp ce pacienții mai tineri (cu vârsta între 7 și 20 de ani) au avut o rată de 64,1%, iar pacienții cu CD au avut o rată de 60,5%^{169,170}.

Există două studii clinice randomizate controlate, publicate, pentru explorarea utilizării FMT.

Primul studiu a înrolat și randomizat 75 de pacienți cu UC active. Ei au folosit FMT săptămânal și clisme cu apă pentru 6 săptămâni și au găsit remisiune (definită de Mayo Scor <3 și vindecarea completă a mucoaselor) în 24% din pacienții tratați cu FMT, comparativ cu 5% din grupul control tratați cu clisme cu apă^{171,172}.

Celălalt studiu a randomizat 50 de pacienți, UC ușoară până la moderată, FMT de la donator sau autolog prin tubul nasoduodenal, care a fost administrată o dată la începutul studiului și din nou la 3 săptămâni mai târziu. Dintre cei 37 de pacienți care au terminat urmărirea, nu a existat nicio diferență clinică și remisie endoscopică între cele două grupuri^{172,173}.

Rezultatele pot fi cauzate de diferențele dintre rutele de administrare, donatorii de scaune, planuri de dozare sau terapii concomitente.

Prin urmare, FMT ar trebui să fie utilizat cu prudență. Cu toate acestea, este clar că FMT nu este la fel de eficient în IBD, așa cum este în CDI (care are un nivel ridicat al ratelor de vindecare indiferent de metoda), și acest lucru este probabil datorită fiziopatologiei multifactoriale din IBD¹⁷².

3. 3. 3. Obezitatea și sindromul metabolic

Obezitatea este o tulburare caracterizată prin depozitarea în exces a țesutului adipos. Sindromul metabolic este caracterizat printr-o constelație de semne precum obezitate centrală, hipertensiune, dislipidemie și hiperglicemia care crește riscul de dezvoltare a bolilor cardiace și a diabetului zaharat^{167,173}.

Studiile recente indică că microbiota intestinală poate fi implicată în patofiziologia obezității^{173,174}. Au fost efectuate studii metagenomice legate de microbiomul intestinal la indivizii slabi și obezi și au raportat diferențe marcate între cele două. Microbiota intestinală la șoarecii obezi studiați a arătat o creștere a raportului Firmicutes/Bacteroides și a avut o capacitate crescută pentru extragerea energiei de la aportul alimentar¹⁷⁴.

Microbiota modificată găsită la persoanele obeze ar putea predispute la obezitate prin extracția crescută a energiei sau eventual printr-o interacțiune cu axul intestinal-cerebral care duce la scăderea consumului de energie sau prin influențarea sațiunii^{172,173}.

Recent, un mic studiu dublu-orb, randomizat, controlat a constatat că transplanturile de materii fecale de la slabi la obezi (cu sindrom metabolic) au avut

ca rezultat o îmbunătățire a sensibilității insulinei, diversitate intestinală microbiană și creșterea bacteriilor producătoare de butirat (*Roseburia intestinalis*) la pacienții obezi¹⁷³. Acest studiu demonstrează importanța pentru studiul viitor al FMT pentru tratamentul obezității, sindromului metabolic și diabetului zaharat.

3. 3. 4. Bolile gastrointestinale funcționale (FGID)

Tulburările gastrointestinale funcționale (FGID) sunt cele mai frecvent diagnosticate din cadrul bolilor gastro-intestinale în emisfera vestică^{158,174}. Ele sunt caracterizate de prezența simptomelor gastro-intestinale cu absența oricăror anomalii anatomice sau biochimice identificabile.

Sindromul intestinului iritabil (IBS) este cea mai răspândită formă de FGID și afectează 10-15% din populație și 20% din populația nord-americană.

IBS are un impact dăunător asupra calității vieții și pune o povară economică asupra sistemului de sănătate. Există patru subtipuri de IBS, pe baza simptomelor dominante experimentate de pacient. IBS-D este predominantă diaree, IBS-C este constipația predominantă, IBS-M este diaree mixtă și constipație^{155,173}. Fiziopatologia nu este bine definită, ci implică hipersensibilitatea viscerală, modificarea funcției de barieră, modificarea motilității gastrointestinale și o axă intestinală.

Un studiu pe 45 de pacienți cu constipație cronică la care s-a administrat FMT prin colonoscopie și ulterior clisme, a observat că 89% dintre pacienți au o ameliorare imediată a simptomelor în timp ce 60% au prezentat beneficiu la 9-19 luni¹⁷⁰.

Un alt studiu cu administrarea FMT la pacienții cu IBS (9 cu IBS-D, 3 cu IBS-C, 1 cu IBS-M) prin esogastroduodenoscopie, a constatat că 70% a avut simptome ameliorate de la 6-18 luni¹⁶⁶.

Se pare că FMT poate avea efect terapeutic pentru tratamentul FGID, totuși, concluziile nu pot fi făcute, deoarece datele disponibile sunt extrem de limitate și sensibile.

În ceea ce privește efectele adverse pe termen lung ale FMT, există o posibilitate teoretică a transferului de boli infecțioase nerecunoscute sau stimularea bolilor cronice (de exemplu obezitatea, diabetul, ateroscleroza, etc.) datorită modificării microbiotei intestinale. Cu toate acestea, pe termen lung, studii de monitorizare sunt necesare pentru a evalua aceste riscuri.

3. 4. Concluzii

Există o ascensiune și o acceptare crescândă pentru utilizarea terapeutică a FMT, datorită percepției sale ca un tratament "natural" și relativ ieftin^{109,173,174}.

În ciuda acestei percepții, există temeri legate de potențialul infecțios al terapiei pe termen lung, având în vedere faptul că studiile realizate sunt relativ puține pentru a evalua siguranța FMT, astfel încât, riscul, teoretic, rămâne¹⁷⁴.

Sunt multe eforturi depuse în prezent pentru explorarea rolului microbiotei intestinale în patofiziologia din multe alte condiții, inclusiv enterocolită necrotizantă, boală hepatică, cancerul colorectal, adenocarcinomul esofagian și gastric și autism^{107-111,174}.

În plus, observații de la pacienții tratați cu FMT pentru afecțiunile intestinale funcționale au înregistrat îmbunătățiri în comorbidități aparent fără legătură, dezvăluind un rol posibil pentru modificarea microbiotei intestinale în multe alte condiții^{173,174}. În funcție de rezultatele acestor investigații, FMT poate fi considerată o posibilitate terapeutică utilă pentru condiții suplimentare în viitor. Studiile clinice în derulare vor continua să ofere o perspectivă asupra acestui domeniu în dezvoltare.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

Obiectivele principale ale cercetării au fost următoarele:

- a. Folosirea transplantului fecal la pacienții cu infecții recidivante cu *Clostridium Difficile*, pe baza căruia să putem propune un protocol terapeutic simplu și eficient.
- b. Folosirea transplantului fecal în colita ulcerativă, ca terapie “de salvare” în cazurile refractare la tratamentul biologic sau ca alternativă terapeutică la pacienții tineri cu pusee repetate de activitate și care refuză tratamentul imunosupresiv.
- c. Evaluarea efectului unei băuturi fermentate vegetale probiotice cu *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 asupra compoziției bacteriene a fecalelor și asupra consistenței și frecvenței defecațiilor la voluntari sănătoși. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 are acțiune antibacteriană, în special pe bacteriile gram pozitive, motiv pentru care creșterea acesteia în compoziția bacteriană a viitorilor donatori sănătoși ar putea aduce beneficii în cazul transplantului fecal la pacienții cu *Clostridium difficile* sau alte colite infecțioase.

2. Metodologie generală

Studiile au fost efectuate în centrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie, Octavian Fodor, Cluj Napoca.

Primul studiu a fost un studiu prospectiv, în care au fost incluși 30 de pacienți, cu infecții recidivante cu *Clostridium Difficile*, în perioada 2013-2015.

Studiul doi a cuprins 10 pacienți cu colită ulcerativă refractară la terapia biologică.

Studiul trei a cuprins 10 pacienți sănătoși la care s-a evaluat efectul unei băuturi probiotice cu *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014.

Toate studiile au fost aprobate de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Ultimul studiu a fost efectuat în parteneriat cu Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj Napoca.

Indicațiile pentru efectuarea transplantului de fecale au fost:

- cel puțin o recidivă de *Clostridium Difficile* după terapia standard cu Vancomicina și Metronidazol;
- colită ulcerativă diagnosticată de cel puțin 1 an;
- colită ulcerativă refractară la terapia biologică standard;
- alternativă terapeutică la pacienții tineri cu pusee de activitate și care au avut rezerve pentru terapia imunosupresoare.

Colonoscopiile au fost efectuate de către gastroenterologi cu experiență (rata de intubare a cecului a fost de peste 98%), folosind video-colonoscoape Pentax, Olympus CL 160, Olympus CL 180 și Olympus Exera II.

Soluțiile de polietilenglicol au fost folosite pentru pregătirea pentru colonoscopie. Calitatea pregătirii colonului a fost evaluată de către fiecare endoscopist.

Criteriile de excludere din studiu au fost:

- terapia cu antibiotice pentru *Clostridium Difficile* a fost incompletă (mai puțin de 80% din cura standard);
- toxina A și B negativă după cura standard de antibiotice;
- colita ulcerativă care răspunde favorabil la terapia biologică;
- mai puțin de 80% din probele de materii fecale au fost colectate (studiul 3);

- băutura probiotică a fost consumată mai puțin de 3 zile și/sau sub 80% din cantitatea prevăzută (studiul 3).

S-au analizat următoarele date pentru fiecare pacient:

- sexul;
- vârsta;
- durata colitei ulcerative;
- extinderea colitei ulcerative;
- numărul puseelor de colită ulcerativă;
- numărul recidivelor de Clostridium Difficile;
- patologia asociată care a necesitat administrare de antibiotic;
- numărul scaunelor înainte și după transplantul de fecale;
- apariția febrei și a durerilor abdominale după transplantul de fecale;
- gradul de rudenie al donatorului;
- probele infecțioase pentru fiecare donator;
- probele inflamatorii înainte și după transplantul de fecale;
- toxina A și B înainte și după transplant (7 zile/6 luni/1 an);
- aspectul colonoscopic în momentul transplantului de fecale.

S-a folosit un chestionar de evaluare a frecvenței și consistenței scaunului în perioada de prescreening și în perioada de urmărire în conformitate cu scala Bristol.

Etapele procedurii transplantului de fecale: evaluarea eligibilității pacientului, consimțământul pacientului, determinarea și screening-ul donatorilor, întreruperea antibioticelor (vancomicina, metronidazol) cu 3 zile înainte de procedură.

În studiul 3 s-a folosit un chestionar de apreciere a complianței prin evaluarea cantității de băutură consumată (verificarea numărului de sticle, precum și a conținutului restant) și a efectelor adverse locale (gust neplăcut) și digestive (greață, balonare, dureri abdominale).

Pentru fiecare studiu în parte a fost descrisă metodologia specifică și analiza statistică.

3. Studiu 1. Transplantul fecal în infecțiile recidivante cu *Clostridium Difficile*

3.1. Introducere

Infecția cu *Clostridium Difficile* este în continuă creștere. Între 1996 și 2003 prevalența CDI s-a dublat în SUA, ajungând la 61/100.000^{175,176}, iar în 2010 incidența a fost estimată la 500.000/an, cu o mortalitate de până la 20.000 de cazuri pe an^{177,178}. Această adevărată epidemie în creștere se înregistrează la nivel mondial, fiind raportată în Europa¹⁷⁹, Taiwan¹⁸⁰, Coreea¹⁸¹ și Canada¹⁸². Este o infecție adesea nosocomială, CD fiind identificat în 10-20% din cazurile de diaree post antibiotice¹⁷⁵. În focarele epidemice agentul infecțios a fost identificat în 50% din cazuri¹⁷⁶.

Cazurile ușoare de CDI pot răspunde la terapia de susținere concomitent cu retragerea antibioticului implicat, dar formele moderate și persistente necesită un tratament de la 10 la 14 zile de metronidazol oral sau vancomicină. Vancomicina oral, până de curând, singura terapie aprobată de FDA (Alimentar Drug Administration) pentru terapia CDI, este scumpă, cu un cost aproximativ de până la 60\$ per tabletă. La doza recomandată de 125 până la 250 mg 4 ori pe zi, costul unui tratament de 10 zile la 14 zile regim poate depăși 2400\$¹⁸³.

Fidaxomicina este un nou antibiotic macrociclic, care elimină selectiv *C. Difficile* și care a arătat rate de vindecare clinice comparabile cu ale Vancomicinei, dar și acesta are un cost ridicat. În ciuda acestor opțiuni terapeutice, boala recidivează frecvent în până la 20% din cazuri după terapia inițială, iar răspunsul la terapia standard este redus. Este motivul pentru care s-au căutat alternative terapeutice pentru cazurile de infecție recidivantă¹⁸³.

Alternative posibile și opțiuni adjuvante includ probiotice, imunoglobuline intravenoase și terapia cu anticorpi monoclonali¹⁸⁴.

Cu toate acestea, niciunul nu au fost la fel de bine studiate sau cu eficiență dovedită ca FMT.

Transplantul de microbiota fecală (FMT), denumit și "transplant de fecale," devine rapid acceptat ca un tratament viabil, sigur și eficient, pentru infecția cu *Clostridium Difficile* recidivantă (CDI).

Terapia FMT în CDI funcționează teoretic prin înlocuirea sau consolidarea microbiomului protector al florei colonice naturale, care a fost perturbat de

antibiotice și/sau factori iatrogeni¹⁸⁵. O dată dezechilibrat sistemul gastrointestinal comensal (GI), bacteriile ca și *Clostridium difficile* are posibilitatea de a domina din cauza pierderii forței represive a populației bacteriene normale. FMT recrează microbiota fecală echilibrată, care permite suprimarea *C. difficile* și reconstruirea "rezistenței la colonizare"¹⁸⁶.

Prima raportare a folosirii FMT pentru tratamentul CDI a fost publicată în 1983; o pacientă a avut o promptă și completă rezolvare a problemelor gastro-intestinale după FMT. În 2010, Garborg et al. au raportat rezultatele FMT la 70 pacienți cu CDI; transplantul fecal a fost eficient chiar și la pacienții cu CDI cauzate de tulpina NAP1/BI/027. Până în 2011, un număr total de 325 de cazuri de CDI au fost tratate cu FMT la nivel mondial, cu o rată medie de vindecare a 91%^{187,188}.

Deși impactul FMT asupra sistemului imunitar al destinatarului este complexă și imprevizibilă, investigațiile asupra efectelor microbilor asupra gazdei sunt importante și în curs de desfășurare.

FMT pentru CDI recidivante nu este încă o reglementare "aprobată" sau o modalitatea "recunoscută", cu toate acestea ratele sale de succes sunt în mod constant de >90%¹⁸⁹; este opțiunea corespunzătoare pentru pacienții care nu au posibilitatea de a elimina infecția în ciuda managementului tradițional.

3.2. Ipoteza de lucru/obiective

Scopul acestui studiu a fost să evaluăm experiența noastră în transplantul fecal la pacienții cu infecții recidivante cu *Clostridium Difficile*, pe baza căruia să putem propune un protocol terapeutic simplu și eficient.

Ne-am propus următoarele obiective:

- să evaluăm eficiența în timp a transplantului de materii fecale, precum și dacă există o concordanță între durata eficienței și gradul de rudenie al donatorului.
- să observăm posibilele efecte adverse imediate/tardive ale transplantului de materii fecale.

3.3. Material și metodă

Studiul a fost efectuat într-un singur centru, Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Octavian Fodor” Cluj-Napoca. A fost un studiu prospectiv, în care au fost incluși 30 de pacienți cu infecții recidivante cu *Clostridium Difficile* în perioada 2013-2015. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Indicațiile pentru efectuarea transplantului de materii fecale au fost:

- cel puțin o recidivă de *Clostridium Difficile* după terapia standard cu Vancomicina și Metronidazol (cel puțin 2 săptămâni);

- prezența colitei severe cu *Clostridium difficile* rezistente la tratament (persistența simptomelor - mai mult de 5 scaune apoase pe zi, mai mult de 14 zile de tratament cu vancomicină 500 mg la 6 ore și metronidazol 500 mg la 8 ore) ;
- Toxinele A și B pozitive asociate cu simptomatologia caracteristică, după terapia standard cu Vancomicina și Metronidazol.

Criteriile de excludere din studiu au fost:

- terapia cu antibiotice pentru *Clostridium Difficile* a fost incompletă (mai puțin de 80% din cura standard);
- toxinele A și B negative, fără simptomatologie prezentă, după cura standard de antibiotice;
- prezența indicației de tratament chirurgical;
- starea generală gravă (semne de sepsis sever - instabilitate hemodinamică, insuficiență multiplă de organ);
- refuzul pacienților.

Pregătirea pentru colonoscopie a fost realizată folosind soluții de polietilenglicol, majoritatea în maniera "*split-dose*". Pacienții care au fost considerați ca având pregătire precară, au fost excluși din studiu.

Majoritatea colonoscopiilor (29 cazuri) au fost efectuate sub analgosedare superficială cu midazolam și un singur caz a beneficiat de analgosedare profundă.

Timpul de retragere al colonoscopului a fost de minimum 8 minute pentru fiecare pacient și s-au analizat meticulos toate leziunile detectate.

S-au analizat următoarele date pentru fiecare pacient:

- sexul;
- vârsta;
- numărul recidivelor de *Clostridium Difficile*;
- patologia asociată care a necesitat administrare de antibiotic;
- numărul scaunelor înainte și după transplantul de materii fecale;
- apariția febrei și a durerilor abdominale după transplantul de materii fecale;
- gradul de rudenie al donatorului;
- probele infecțioase pentru fiecare donator;
- probele inflamatorii înainte și după transplantul de fecale;
- toxinele A și B înainte și după transplant (7 zile/6 luni/1 an).

S-a folosit un chestionar de evaluare a frecvenței și consistenței scaunului în perioada de prescreening și în perioada de urmărire, în conformitate cu scala Bristol.

Durata infecției cu CDI până la FMT a variat între 4 și 8 luni. Acesta s-a efectuat după semnarea consimțământului informat care a inclus discutarea colonoscopiei standard, riscurile legate de sedare, sângerare și perforare, riscurile de infecție și cele alergice. Au fost discutate și documentate reacțiile legate de FMT.

Înainte de FMT, toți pacienții au urmat terapie cu vancomicină și/sau metronidazol în una sau mai multe cure și au fost tratați cel puțin 2 săptămâni pentru cea mai recentă exacerbare CDI.

După efectuarea procedurii și înainte cu 3 zile procedurii, pacienții nu au mai primit vancomicină sau metronidazol. În decurs de 7 zile, pacienții au fost rugați să raporteze eventualele simptome post FMT (febră, balonare, dureri abdominale).

Donatorii potențiali de scaun au fost identificați de către subiecți, în general, un partener intim (soț/soție) sau rudă de gradul I/II.

Teste donatori:

- ✓ Examen coproparazitologic
- ✓ Coprocultura - include, în general: Salmonella, Shigella, Escherichia coli, O157: H7, Yersinia enterocolitica și Campylobacter
- ✓ Toxina Clostridium difficile A și B
- ✓ Antigenul Giardia
- ✓ HIV-1 și HIV-2
- ✓ Hepatita A, B și C
- ✓ Istoric de boli inflamatorii intestinale
- ✓ Istoric de sindrom de intestin iritabil, constipație cronică sau diaree cronică
- ✓ Istoric de boli maligne gastrointestinale, teren atopic, boli autoimune, de exemplu, scleroză multiplă, fibromialgie, sindrom de oboseală cronică

Donatorii au fost excluși dacă au luat antibiotice cu 90 de zile înainte de procedura planificată sau dacă n-au îndeplinit un set de criterii de eligibilitate.

În ceea ce privește prepararea materiilor fecale - nu există un protocol standardizat pentru prepararea fecalelor. Fecalele sunt colectate în ziua transplantului de la donator.

După colectarea materialului fecal de la donator (~ 100-150 gr), acesta se amestecă manual/blender pentru omogenizare cu soluție salină sterilă 0,9% 400 ml (pentru a nu distruge bacteriile anaerobe) până la un volum aproximativ de 300-350 ml. Ulterior, suspensia este filtrată de mai multe ori prin tampoane de tifon, pentru a elimina particulele din suspensie, evitând obstrucția canalului de

biopsie de la colonoscop (locul pe unde se va administra suspensia obținută). Această suspensie se transferă într-o flacon steril și se va administra în decurs de o oră de la preparare.

S-a folosit un chestionar de evaluare a frecvenței și consistenței scaunului în perioada de prescreening și în perioada de urmărire în conformitate cu scala Bristol.

Transplantul de materii fecale s-a efectuat după semnarea consimțământului informat care a inclus discutarea colonoscopiei standard, riscurile legate de sedare, sângerare și perforare, riscuri de infecție și cele alergice. Au fost discutate și documentate reacțiile legate de FMT.

FMT a fost administrat la toți pacienții prin intermediul colonoscopiei. S-au efectuat la majoritatea pacienților colonoscopie totală cu ileoscopie (29 cazuri) și într-un singur caz colonoscopie parțială, datorită riscului mare de perforație (s-a progresat până la nivelul colonului transvers). Începând de la nivelul ileonului, până la nivelul sigmei, a fost instilată prin intermediul canalului de biopsie câte o seringă de 50 ml cu suspensia preparată de la donator. Rectul a fost cruțat, pentru a evita eliminarea rapidă a suspensiei preparate.

Pacienții au primit 4 mg loperamidă pentru a reduce motilitatea intestinului, anterior și imediat după FMT, precum și la 6 ore după această procedură. Pacienții au primit o dietă normală după aproximativ 5 ore.

Toți pacienții au fost urmăriți post FMT timp de 12 luni, prin contact telefonic, iar în caz de probleme au revenit în cadrul spitalului.

Statistica

Datele categorice au fost descrise ca numere și procente. Datele distribuite în mod normal au fost prezentate ca medii și deviații standard (SD), în timp ce datele care nu au urmat distribuției normale au fost prezentate ca medii și intervale de interquartile (IQR) și intervale. Au fost utilizate intervale de încredere de 95% pentru medii. Normalitatea datelor a fost evaluată cu ajutorul schemelor quantile-quantile, stripcharts și testelor Shapiro-Wilk. Am folosit testul Friedman pentru a compara măsurătorile repetate ale datelor distribuite în mod normal, testul Kruskal-Wallis (pentru a compara mai multe grupuri independente cu variabilele continuu distribuite în mod normal) și testul Fisher exact (pentru a evalua dependența dintre variabilele categorice). Am considerat că două valori ale p -ului <0.05 sunt semnificative din punct de vedere statistic. Pentru calcul statistic și grafică, versiunea 3.2.3 a fost utilizată pentru toate calculele statistice.

3.4. Rezultate

Am inclus treizeci de pacienți cu infecție cu *Clostridium Difficile* recidivantă, care au primit transplant de materii fecale în perioada ianuarie 2013 - decembrie 2015, în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Octavian Fodor" Cluj-Napoca.

Durata infecției cu CDI până la FMT a variat între 4 și 8 luni.

Din totalul de pacienți, 14 (46,67%) au fost de sex feminin și 16 (53,33%) au fost de sex masculin. Vârsta medie pe întregul lot a fost de 57,8 ani, vârsta minimă 5 ani, iar cea maximă 83 ani.

Caracteristicile demografice ale pacienților la cele două grupuri sunt redată în tabelul IV.

Tabel IV. Caracteristicile demografice

Sex	Nr.	% (95% CI)
F	14	46.67 (28.34 - 65.67)
M	16	53.33 (34.33 - 71.66)

Numărul de recidive

Numărul maxim de recidive, premergător terapiei prin FMT a fost de 4 și a fost semnalat la 2 pacienți (6,67%), iar numărul minim a fost de 1 și a fost semnalat la 10 pacienți (33,33%). Distribuția numărului de recidive este reprezentată în figura 1.

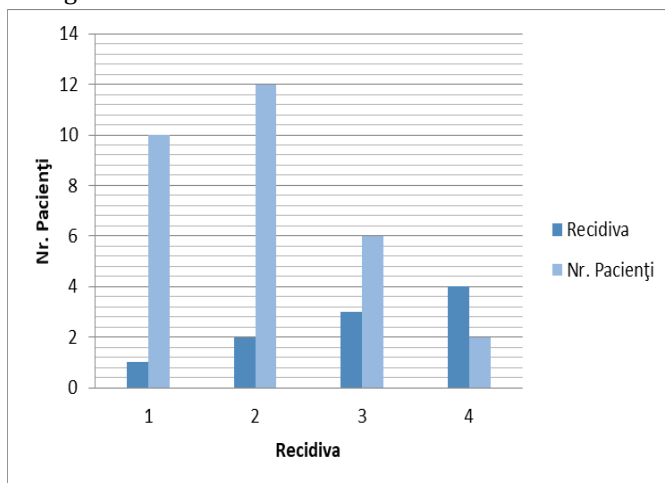


Fig.1. Numărul de recidive

Înainte de transplantul de materii fecale, toți pacienții au urmat terapie cu vancomicină (și/sau metronidazol) în una sau mai multe cure și au fost tratați cel puțin 2 săptămâni pentru cea mai recentă exacerbare CDI. 70% dintre pacienți au urmat cura cu vancomicină și metronidazol 14 zile, 13% au primit terapie cu vancomicină (intoleranța la metronidazol), 17% terapie cu metronidazol (intoleranța sau alergie la vancomicina), figura 2.

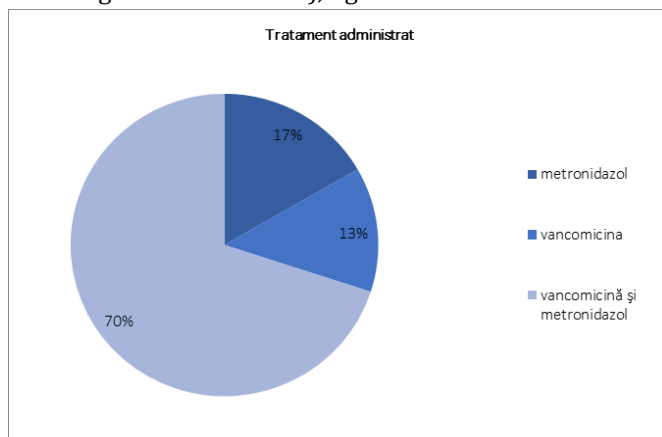


Fig.2. Tratamentul antibiotic administrat pentru infecția cu *Clostridium Difficile*

Testând diferența globală între grupurile de antibiotice pentru *Clostridium Difficile*, în ceea ce privește numărul de recidive, s-a obținut un $p=0,003$, această constatare fiind reprezentată în figura 3.

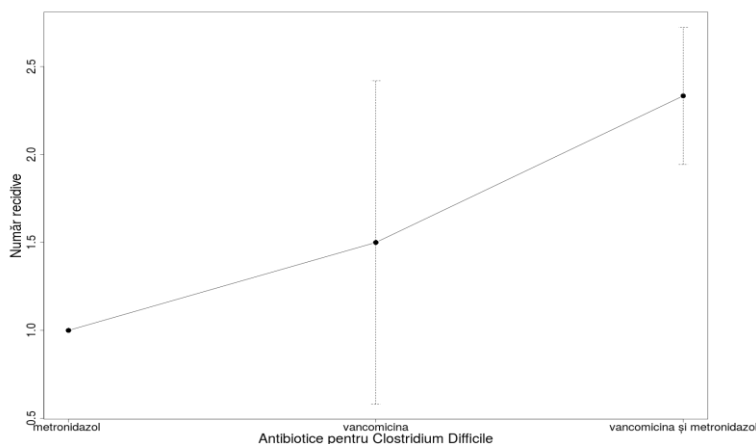


Fig.3. Număr recidive în funcție de Antibiotice pentru *Clostridium Difficile*

Se remarcă recidivele dese la cei tratați cu vancomicină și metronidazol. Acest rezultat se explică prin gravitatea cazurilor tratate cu asocierea dintre cele două antibiotice.

Un singur pacient nu a prezentat patologie asociată (muncitor în cadru spitalicesc), restul fiind cu diferite boli asociate care au dus la scăderea imunității precum și folosirea diferitelor clase de antibiotice. Între bolile asociate a predominat ciroza hepatică (întâlnită la 10 pacienți), urmată apoi de afecțiunile respiratorii (întâlnite la 8 pacienți) (fig. 4).

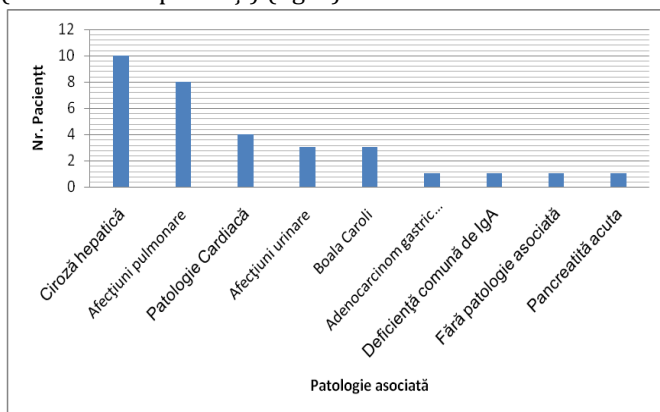


Fig.4. Distribuția patologiei asociate

Dintre antibioticele folosite au predominat Cefort-ul, Ciprofloxacina și Augmentinul (tabel V).

Tabel V. Antibiotice pretransplant pentru patologia asociată

Antibiotice pretransplant pentru patologie asociată	Nr. pacienți	%
cefort	9.00	31.03
ciprofloxacina	5.00	17.24
augmentin	4.00	13.70
amoxicilina	2.00	6.90
biseptol	2.00	6.90
colistin	2.00	6.90
meropenem	1.00	3.45
tienam	1.00	3.45

Testând diferența globală (neținând cont de comparații luate două câte două) între grupurile de antibiotice pretransplant pentru alte afecțiuni în ceea ce privește numărul de recidive, s-a obținut un $p = 0.256$, fiind reprezentată în figura 5.

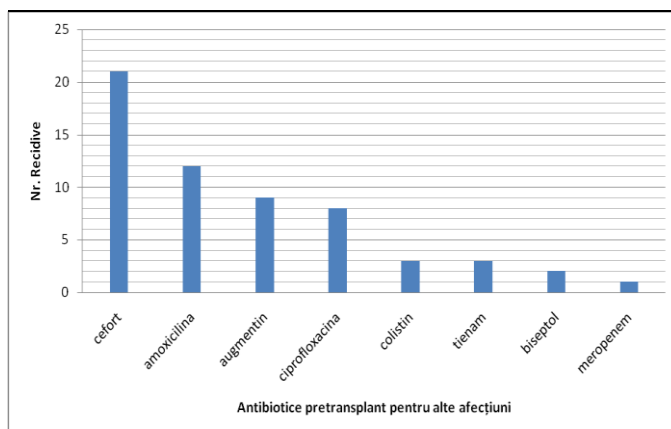


Fig.5. Număr recidive în funcție de antibioticele pretransplant pentru alte afecțiuni

Aspectul colonoscopic

O proporție importantă de pacienți au prezentat mucoasă cu aspect normal, 56,67%, fără prezența pseudomembranelor.

Pseudomembranele au fost prezente în proporție de 20%, iar ulcerările în proporție de 23,33% (figura 6). La un singur pacient nu s-a putut efectua colonoscopie totală datorită afectării severe a colonului (numeroase pseudomembrane) și riscului mare de perforație. În acest caz, progresia a fost până la nivelul colonului transvers.

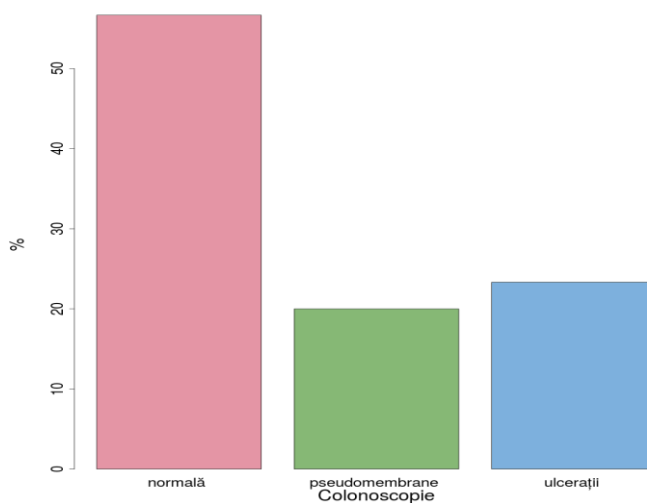


Fig.6. Distribuția aspectului colonoscopic

Caracteristicile donatorilor

Donatorii potențiali de scaun au fost identificați de către subiecți fiind, în general, un partener intim (soț/soție) sau rudă de gradul I/II.

Astfel, 53,33% dintre donatori au fost rude de gradul I, 13,33% rude de gradul II și o proporție importantă, 33,34% parteneri intimi (soț/soție) care conviețuiesc în același mediu cu pacienții (tabel VI).

Tabel VI. Distribuția variabilei donator

Gradul de rudenie	Nr. pacienti	%
rudă grad I	16.00	53.33
rudă grad II	4.00	13.33
Parteneri(sot/sotie)	10.00	33.34

Evoluția posttransplant

După transplantul fecal s-au înregistrat 2 recidive la aproximativ 7 zile post FMT, cu simptomatologie clinică și toxine A și B pentru Clostridium pozitive. 28 de pacienți nu au mai prezentat recăderi post FMT în decursul celor 12 luni de urmărire, fiind asimptomatici și prezentând rezultate negative pentru toxinele specifice CD. Grupul cu recidivă este procentual mai mic cu 86.66 % față de grupul fără recidivă (figura 7).

Cei doi pacienți care au prezentat recădere post FMT au urmat din nou terapie cu Vancomicină și Metronidazol timp de 14 zile, conform protocolului, după care nu au mai prezentat recidivă în decursul celor 12 luni de urmărire.

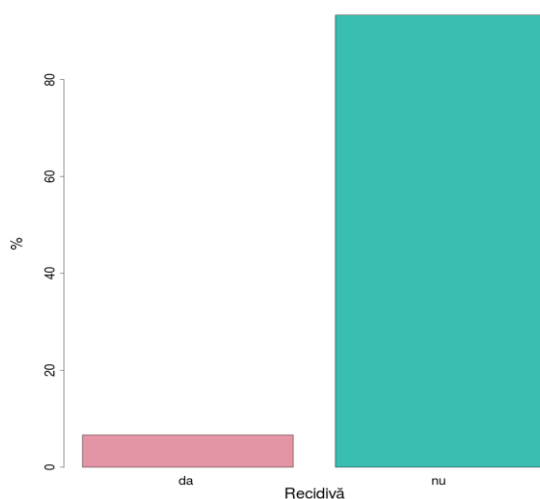


Fig.7. Distribuția recidivei

Evoluția post FMT la toți pacienții a fost favorabilă, obținându-se o semnificație statistică în ceea ce privește media numărului de scaune la 7 zile/6 luni/1 an (s-a obținut, $p = 0.0170172216109093$, *testul Friedman*) (Figura 8).

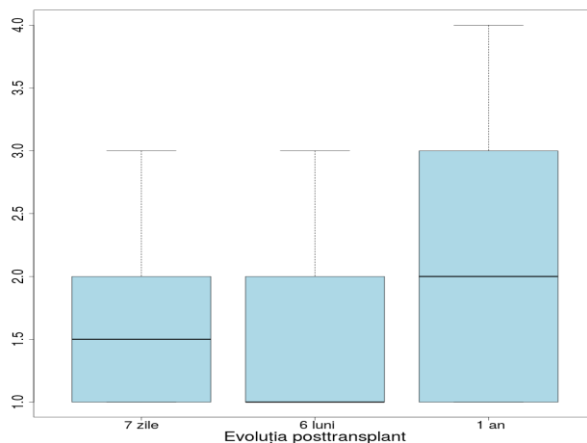


Fig.8. Evoluția posttransplant (număr scaune/zi)

La 6 luni, media numărului de scaune în funcție de donator a fost de 2 scaune/zi la cei la care donatorii au fost rude de gradul II și parteneri intimi (soțul), respectiv de 1 scaun/zi, la cei cu donatori rude de gradul I și parteneri intimi (soția) (figura 9).

Testând diferența globală (neținând cont de comparații luate două câte două) între grupurile variabile donator în ceea ce privește numărul de scaune la 6 luni s-a obținut, $p = 0.039$, (testul ANOVA)

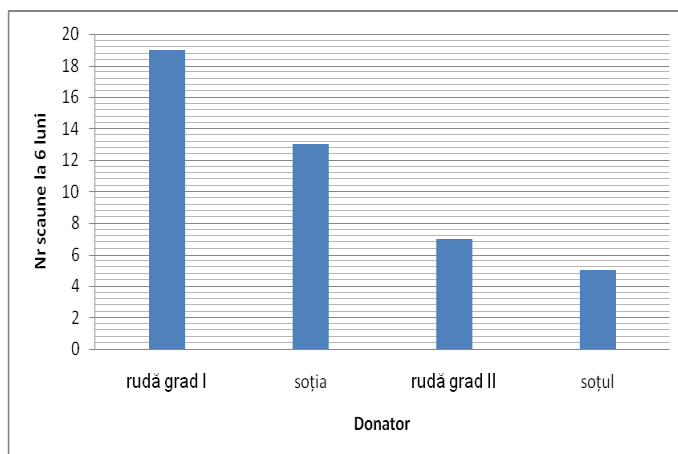


Fig.9. Număr scaune la 6 luni în funcție de donator

De asemenea, s-a testat asocierea între donator și Recidivă și s-a obținut $p=0.43$ (testul Fisher exact), observându-se că ambele recidive au fost la rudele de gradul I și II, neîntâlnindu-se la pacienții la care donatorii au fost parteneri intimi (soț/soție), adică la cei care conviețuiesc în același mediu (figura 10).

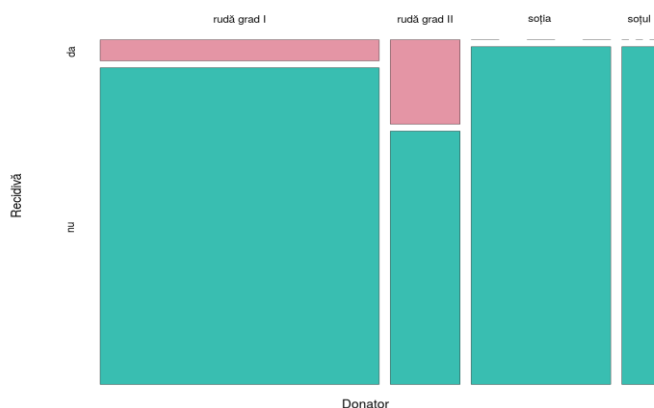


Fig.10. Recidivă în funcție de donator

Din punct de vedere biologic post FMT, toți pacienții au prezentat o ușoară creștere a probelor inflamatorii față de valoarea inițială (VSH și CRP), ulterior acestea revenind la normal.

Post transplant fecal, din punct de vedere clinic, s-a observat apariția febrei la 8 pacienți (26.67 (12.28 - 45.89) în primele 3 zile post FMT, care a cedat spontan după aceste 3 zile (figura 11).

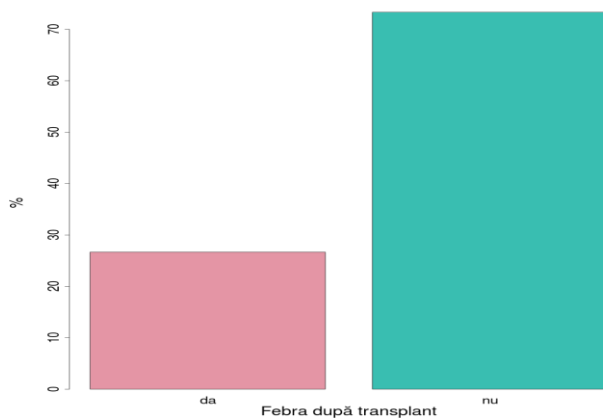


Fig.11. Distribuția febrei după transplant

De asemenea, 2 pacienți au prezentat dureri abdominale severe în primele 2 zile post FMT, care au cedat la antialgice. Restul pacienților au prezentat dureri moderate (10 pacienți), respectiv dureri ușoare (13 pacienți), care nu au necesitat administrarea de antialgice (figura 12).

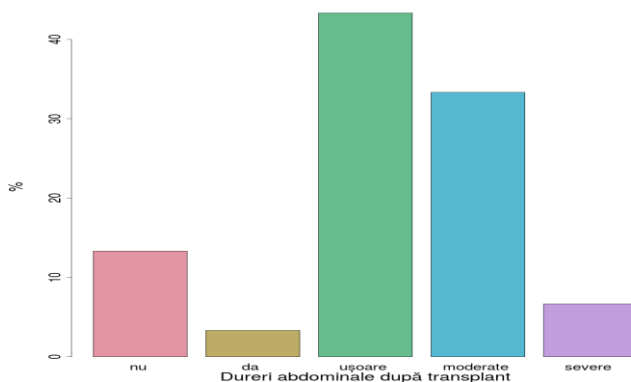


Fig.12. Distribuția durerii după transplant

3.5. Discuții

Această serie de 30 de pacienți, prima publicată în România la pacienții cu CDI recurentă, la care s-a folosit spre administrarea materialului fecal colonoscopia, prezintă dovezi clare care arată că transplantul de materii fecale este un tratament sigur și eficient pentru infecțiile recidivante cu *Clostridium Difficile*.

Obiectivul studiului a fost atins în ceea ce privește evaluarea eficacității FMT.

Rezultatele noastre, cu o rată de succes de 93%, au arătat date comparabile cu cele din literatura de specialitate, care ratele de răspuns primar sunt de până la 90%¹⁸⁷.

Ca și în cazul preparării scaunului, nu există un consens clar asupra celei mai bune metode de administrare. În studiul nostru, s-a preferat ca mod de administrare colonoscopia totală, care a fost efectuată la 29 dintre cazuri, la un singur caz efectuându-se colonoscopie parțială, datorită riscului mare de perforație. Nu s-au înregistrat evenimente secundare după efectuarea colonoscopiei, în ceea ce privește procedura. Studii anterioare raportează un răspuns mai bun la FMT, atunci când este administrat prin intermediul colonoscopiei (86%-100%) versus clisme (79%-98%)^{190,191,192}. Cu toate acestea, FMT prin colonoscopie este asociat cu riscuri de perforare, infecție, sângerare și durere. Deși metoda prin sondă nasogastrică este mai puțin eficientă, cu rate de succes de 73% până la 83%, este mai ușor de efectuat decât sunt celelalte metode, costuri mai mici și prezintă riscuri mai mici pentru pacient^{193,194}.

S-a remarcat că cele mai multe recidive în ceea ce privește terapia pentru *Clostridium Difficile* au fost la cei tratați cu vancomicină și metronidazol, acest rezultat explicându-se prin gravitatea cazurilor tratate cu cele două antibiotice.

Durata infecției cu CDI până la FMT a variat între 4 și 8 luni, iar dintre patologii asociate au predominat ciroza hepatică urmată apoi de patologia pulmonară.

Evoluția posttransplant a fost favorabilă în majoritatea cazurilor (28 cazuri), cu o medie a scaunelor/zi la 7 zile respectiv 6 luni, de 2 scaune/zi, iar la 1 an o medie de 3 scaune/zi. Cei doi pacienți care au prezentat recădere post FMT au urmat din nou terapie cu Vancomicină și Metronidazol timp de 14 zile, conform protocolului, după care nu au mai prezentat recidivă în decursul celor 12 luni de urmărire.

De remarcat că din cei care au avut tabloul clinic al unui sindrom diareic, la colonoscopie majoritatea (56,67%) nu prezentau pseudomembrane, dovada diagnosticului precoce. Pseudomembranele și ulcerările au fost prezente la 23,33% și, respectiv, 20%.

În ceea ce privește apariția efectelor adverse postFMT, am observat apariția febrei (26% dintre cazuri) și a durerilor abdominale de intensitate severă (2 cazuri) până la intensitate ușoară, care au cedat ulterior la antialgice sau spontan. Apariția acestor efecte adverse sunt descrise și în literatură, în funcție de rutele de administrare. Pentru rutele de administrare prin colonoscopie în 22 de publicații¹⁹⁵, 13,0% dintre pacienți (în 10 publicații) au prezentat disconfort abdominal după FMT, iar febra tranzitorie a avut loc la 2,8% dintre pacienți. Administrarea prin tractul gastro-intestinal superior a fost mai predispusă la apariția disconfortului abdominal în comparație cu administrarea prin tractul gastro-intestinal inferior, iar febra a fost observată în procente similare la cele 2 administrări¹⁹⁶.

Am constatat că recidivele au fost prezente la rudele de gradul I și II, ca și donator, spre deosebire de cei care au avut ca și donator, partenerii intimi (soț/soție), care conviețuiesc în același mediu cu pacientul. Contactele intime (de exemplu, soț/soție) au avantajul unor factori de risc partajați în mediul înconjurător, ceea ce poate reduce la minimum riscul transmiterii unui agent infecțios. Rudele de gradul I pot avea un avantaj teoretic de a împărți cel mai mare număr de specii microbiene în microbiota intestinală cu pacientul^{190,191}. În mod similar, este posibil să se speculeze că bărbații ar putea fi donatori preferați față de femei, deoarece femeile ar putea, teoretic, să prezinte microbiote care sunt mai probabil asociate cu boala autoimună și IBS^{194,195}. Alții au emis ipoteza că donatorii potriviți în funcție de vârstă și sex pot fi avantajoși, deși, în prezent, nu există date care să susțină această ipoteză¹⁹⁶.

Potențialul de transmitere a agenților infecțioși este o preocupare în cadrul terapiei FMT. Studii anterioare au prezentat apariția de noi afecțiuni secundare

terapiei cu FMT, inclusiv neuropatie periferică, boala Sjogren, purpură trombocitopenică idiopatică și poliartrită reumatoidă¹⁹⁷. Alții au raportat îmbunătățiri în afecțiuni medicale preexistente, inclusiv alergii, sinuzită și artrită. Aceste noi condiții sau îmbunătățiri, nu pot fi atribuite în mod direct FMT, dar constituie un obiect de interes pentru cercetările ulterioare în interacțiunea dintre microbiota și bolile autoimune, respectiv rolul său în FMT^{198,199}.

Chiar dacă nu am adus ceva nou față de restul articolelor din literatură publicate pe această temă până în acest moment, prin acest studiu am vrut să subliniem importanța și necesitatea transplantului fecal în infecția recidivantă cu *Clostridium Difficile*. După știința noastră, cercetarea reprezintă primul studiu de acest fel din România.

Suntem conștienți de limitele studiului, legat îndeosebi de numărul limitat de subiecți testați, de lipsa unui grup de control și, bineînțeles, la fel cum este descris și în literatura recentă, de lipsa experienței legată de apariția efectelor adverse pe termen lung. Chiar dacă practicienii cred cu tărie ca FMT este eficient și sigur, un studiu randomizat controlat poate fi necesar înainte ca acest tratament să fie acceptat de comunitatea medicală. Donatorul standard, protocoalele de screening și tratament optim, de asemenea, trebuie să fie dezvoltate și investigate.

În funcție de rezultatele acestor investigații, FMT poate fi considerat o terapie potențială utilă și pentru alte condiții suplimentare în viitor. Studiile clinice în desfășurare vor continua să ofere o perspectivă asupra acestui domeniu în creștere.

3.6. Concluzii

Transplantul de materii fecale la bolnavii infectați cu *Clostridium Difficile* constituie o metodă eficientă de tratament.

Reacțiile adverse tratamentului sunt minore și tranzitorii.

FMT nu prezintă complicații intra sau periprocedurale și oferă o rată mare de vindecare a infecției cu *Clostridium Difficile*.

Această metodă de tratament ieftină și eficientă ar putea constitui “un început de drum în România” pentru tratamentul recurenței infecției cu *Clostridium Difficile*.

4. Studiu 2. Transplantul fecal în colita ulcerativă

4.1. Introducere

Transplantul fecal utilizat cu succes în tratamentul infecției persistente cu *Clostridium Difficile* a câștigat teren și în bolile inflamatorii. Există argumente teoretice care justifică utilizarea sa în colita ulcerativă sau boala Crohn.

“Comunitatea” bacteriană de la nivel colonic este extrem de largă cuprinzând 10-14 celule microbiene cu peste 3 milioane de gene bacteriene. Totalitatea populației microbiene de la nivel intestinal poartă numele de microbiom. Domină diviziile Bacteroides și Firmicutes și speciile Bacteroides, Fecalibacterium și Bifidobacterium^{200,201}.

Bacteriile joacă un rol important în inițierea și perpetuarea inflamației intestinale din cadrul bolilor inflamatorii intestinale cu particularități evidente între boala Crohn și colita ulcerativă.

Microbiota intestinală este cea mai mare și mai diversă comunitate de microbi din corpul uman. Microbiota intestinală sau populația de microorganisme a intestinului constituie doar o fracțiune din complexitatea microbiomului intestinal, care include o gamă variată de gene microbiene și produse genetice ale microbiotei. În timpul perioadelor de bună sănătate, microbiomele intestinale acționează simbiotic pentru a produce vitamine, reprimă extinderea organismelor patologice și pentru a facilita digestia substraturilor dietetice, tot timpul în contact permanent cu sistemul imunitar gazdă²⁰². În plus, microbiomele contribuie la reînnoirea celulelor epiteliale intestinale și dezvoltarea sistemului imunitar enteric. Această comunitate diversă de bacterii, ciuperci, bacteriofagi există în colonii cu densitate variabilă în tractul gastrointestinal, densitatea microbiană cea mai mare ajungând la 10^{12} celule/g de conținut luminal în colon²⁰³. Au fost făcute încercări de a delimita ceea ce constituie compoziția microbiană "sănătoasă" a microbiomului intestinal, cu rezultate variate și oarecum disparate. Dificultatea de a defini un microbiom "sănătos" se bazează pe complexitatea și variațiile găsite în microbiomele fecale, cu peste 1000 de specii potențiale bacteriene capabile să colonizeze intestinalele umane. În ciuda variației mari găsite în microbiomele individului, majoritatea speciilor (>90%) aparțin filelelor Bacteroidetes și Firmicutes^{204,205}.

Boala intestinală inflamatorie (IBD) reprezintă un grup heterogen de afecțiuni inflamatorii cronice imune mediate de sistemul imunitar, care afectează tractul gastro-intestinal. Există două fenotipuri primare ale IBD, colită ulceroasă

(UC) și boală Crohn (CD). UC se caracterizează prin inflamație cronică continuă și circumferențială a mucoasei care se extinde proximal din rect, dar este izolată de colon. În comparație, inflamația stereotipică observată în CD este neuniformă și transmurală și poate afecta orice parte a tractului gastro-intestinal. Deși etiologia IBD este înțeleasă incomplet, studiile recente susțin ipoteza că IBD rezultă dintr-o interacțiune complexă a geneticii, a disfuncției imune și a declanșatorilor de mediu care ar putea exercita efectul prin modificări ale microbiotei intestinale²⁰⁶.

Este evident că în colita ulcerativă există o disbioză, adică un dezechilibru în compoziția microbiomului intestinal²⁰³. Este evident faptul că acest dezechilibru duce la o comunicare anormală între comunitatea bacteriană și sistemul imunitar al mucoasei colonice. Prin schimbarea compoziției, bacteriile intraluminală induc stimuli proinflamatori, responsabili de leziunile mucoasei caracteristice colitei ulcerative²⁰⁴.

Cercetări recente arată că disbioza în colita ulcerativă este caracterizată prin diminuarea concentrației unor bacterii producătoare de butyrate ca *Rosaburria hominis* și *Faecalibacterium parusnitzii* ambele din (phylum) divizia Firmicutes²⁰⁵. Având în vedere aceste argumente teoretice, mai multe publicații evaluează efectul transplantului de materii fecale în bolile inflamatorii intestinale. Rezultatele sunt contradictorii, dar este de subliniat faptul că efectele favorabile nu lipsesc, îndeosebi la pacienții cu colită ulcerativă (CU)²⁰⁷⁻²⁰⁹.

S-a observat că șoarecii cu deficit de IL-10 dezvoltă enterocolită spontană, care seamănă cu cea umană, IBD și care depinde de existența microflorei intestinale²¹⁰. Mai mult, într-un studiu efectuat utilizând șobolani transgenici HLA-B27, s-a constatat că tipul sălbatic dezvoltă spontan colită cronică, dar au arătat că nu atunci când au fost ținuti într-un mediu fără germeni²¹¹. Un raport recent a arătat că transplantul de materii fecale de la pacienții cu UC care conțin un număr redus de bacterii anti-inflamatorii Firmicutes, la șoarecii fără germeni a crescut severitatea colitei în parte prin creșterea expresiei genelor legate de Th17 și a genei asociate cu Th17, expansiunea celulelor CD4 care exprimă IL-17A în vivo²¹².

În aceste condiții, am încercat și noi să evaluăm efectul FMT la pacienții cu CU și să evaluăm indicațiile FMT în CU, răspunzând astfel întrebării dacă FMT este o alternativă terapeutică sau este rezervată doar anumitor pacienți.

4.2. Ipoteza de lucru/obiective

În cadrul studiului de față, am utilizat transplantul de microbiotă fecală la pacienții cu colită ulcerativă, refractari la terapia biologică sau ca alternativă terapeutică la pacienții tineri cu pusee repetate de activitate și care refuză tratamentul imunosupresiv.

Ne-am propus următoarele obiective: să observăm dacă modificarea florei bacteriene colonice are sau nu efecte, dacă poate induce remisiunea, tipul remisiunii rezultate și durata acesteia.

4.3. Material și metodă

Studiul a fost efectuat într-un singur centru, Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Octavian Fodor” Cluj-Napoca. A fost un studiu prospectiv, în care au fost incluși 10 pacienți cu colită ulcerativă refractară la terapia biologică sau care refuză tratamentul imunosupresiv, în perioada 2013-2015. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca.

Indicațiile pentru efectuarea transplantului de materii fecale au fost:

- pacienți cu colită ulcerativă cu scor Mayo endoscopic 2 sau 3 refractări la terapia biologică
- pacienții tineri cu pusee repetate de activitate și care au rezerve pentru tratamentul imunosupresiv, cu scor Mayo endoscopic 2 sau 3.

Criteriile de excludere din studiu au fost:

- pacienți cu colită ulcerativă recent depistată
- pacienți cu colită ulcerativă cu răspuns clinic și/sau endoscopic la terapia biologică sau tratamentul imunosupresiv
- colită ulcerativă severă, necontrolată
- pacienții cu infecții active sau necontrolate bacteriene, virale sau fungice care necesită terapie sistemică
- refuzul pacienților.

Donatorii potențiali de scaun au fost identificați de către subiecți, în general, un partener intim (soț/soție) sau rudă de gradul I/II.

Donatorii au fost excluși dacă au luat antibiotice cu 90 de zile înainte de procedura planificată sau dacă n-au îndeplinit un set de criterii de eligibilitate.

În ceea ce privește prepararea materiilor fecale - nu există un protocol standardizat pentru prepararea fecalelor. Fecalele sunt colectate în ziua transplantului de la donator.

După colectarea materialului fecal de la donator (~ 100-150 gr) într-un recipient steril, acesta se amestecă manual/blender pentru omogenizare, cu soluție salină sterilă 0,9% 400 ml (pentru a nu distruge bacteriile anaerobe,) până la un volum aproximativ de 300-350 ml. Ulterior, suspensia este filtrată de mai multe ori prin tampoane de tifon, pentru a elimina particulele din suspensie, evitând obstrucția canalului de biopsie de la colonoscop (locul pe unde se va administra suspensia obținută). Această suspensie se transferă într-un flacon steril și se va administra în decurs de o oră de la preparare.

Transplantul de materii fecale s-a efectuat după semnarea consimțământului informat care a inclus discutarea colonoscopie standard, riscurile legate de sedare, sângerare și perforare, riscuri de infecție și cele alergice. Au fost discutate și documentate reacțiile legate de FMT.

FMT a fost administrat la toți pacienții prin intermediul colonoscopiei. S-a efectuat la toți pacienții colonoscopie totală cu ileoscopie. Începând de la nivelul ileonului, până la nivelul sigmei, a fost instilată prin intermediul canalului de biopsie câte o seringă de 50 ml cu suspensia preparată de la donator. Rectul a fost crușat, pentru a evita eliminarea rapidă a suspensiei preparate.

Pacienții au primit 4 mg loperamidă pentru a reduce motilitatea intestinului, anterior și imediat după FMT, precum și la 6 ore după această procedură. Pacienții au primit o dietă normală după aproximativ 5 ore.

În decurs de 7 zile pacienții au fost rugați să raporteze eventualele simptome post FMT (febră, balonare, dureri abdominale).

Toți pacienții au fost urmăriți post FMT timp de 12 luni, prin contact telefonic, iar în caz de probleme au revenit în cadrul spitalului.

S-au urmărit următoarele date pentru fiecare pacient:

- sexul
- vârsta
- durata bolii
- extinderea bolii
- terapia principală înainte și după FMT
- numărul scaunelor înainte și după transplantul de materii fecale
- prezența produselor patologice înainte și după transplantul de materii fecale
- apariția febrei și a durerilor abdominale după transplantul de materii fecale
- gradul de rudenie al donatorului
- probele inflamatorii înainte și după transplantul de fecale
- aspectul colonoscopic în momentul transplantului de materii fecale – scor Mayo endoscopic
- durata eficacității FMT.

Au fost evaluate:

a) remisia clinică: dispariția simptomelor (dureri, disconfort abdominal) scăderea numărului de scaune sau apariția scaunului normal, dispariția produselor patologice din scaun (mucus, sânge);

b) remisiunea biologică (VSH, PCR, leucocite, hemoglobina);

c) remisiunea endoscopică (reducerea scorului Mayo cu cel puțin 3 puncte sau instalarea vindecării mucosale).

Statistica

Datele categorice au fost descrise ca numere și procente. Datele distribuite în mod normal au fost prezentate ca medii și deviații standard (SD), în timp ce datele care nu au urmat distribuției normale au fost prezentate ca medii și intervale de interquartile (IQR) și intervale. Au fost utilizate intervale de încredere de 95% pentru medii. Normalitatea datelor a fost evaluată cu ajutorul schemelor quantile-quantile, stripcharts și testelor Shapiro-Wilk. Am folosit testul Friedman pentru a compara măsurătorile repetate ale datelor distribuite în mod normal, testul Kruskal-Wallis (pentru a compara mai multe grupuri independente cu variabilele continuu distribuite în mod normal) și testul Fisher exact (pentru a evalua dependența dintre variabilele categorice). Am considerat că două valori ale p -ului <0.05 sunt semnificative din punct de vedere statistic. Pentru calcul statistic și grafic, versiunea 3.2.3 a fost utilizată pentru toate calculele statistice.

4.4. Rezultate

Zece pacienți au primit FMT în perioada ianuarie 2013 - decembrie 2015, în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Octavian Fodor" Cluj-Napoca. Toți participanții au prezentat colită ulcerativă cu scor Mayo endoscopic 2 sau 3, refractari la terapia biologică, precum și pacienți tineri cu pusee repetate de activitate și care au avut rezerve pentru tratamentul imunosupresiv.

Din totalul de pacienți, 4 au fost de sex feminin și 6 au fost de sex masculin. Vârsta medie pe întregul lot a fost de 35 (26.75 - 50.25) ani, vârsta minimă 26 ani, iar cea maximă 53 ani.

Tratamentul actual și după transplantul de materii fecale

Toți participanții au prezentat colită ulcerativă cu scor Mayo endoscopic 2 sau 3 și erau sub terapie cu 5 ASA, imunosupresoare sau terapie biologică. Din totalul pacienților, 3 pacienți au fost sub terapie cu 5 ASA, 6 sub terapie cu 5 ASA și terapie biologică, iar 1 pacient sub terapie cu 5 ASA și terapie imunosupresoare (Imuran). După transplantul de materii fecale, pe perioada de urmărire de 1 an, s-a observat creșterea numărului de pacienți la care remisiunea a putut fi menținută numai cu 5 ASA (8), scăderea numărului de pacienți cu terapie biologică (1). S-a încercat reprezentarea numerică a terapiei înainte și după transplant (figura 13). Pacienții care au recăzut la 6 luni au fost sub terapie cu 5 ASA pe perioada urmăririi după transplantul fecal, iar pacientul care nu a răspuns la transplant a fost de la început sub 5 ASA și Adalimumab, iar după transplant s-a efectuat switch pe altă terapie biologică.

3 pacienți au fost non-responderi la terapia cu Infliximab (anticorpi pozitivi, nivelul Infliximabului era foarte scăzut și după micșorarea intervalului de administrare și după dublarea dozei). La un pacient, justificarea efectuării FMT a

fost determinată de puseele repetate și rezerva lui față de tratamentul biologic și imunosupresiv.

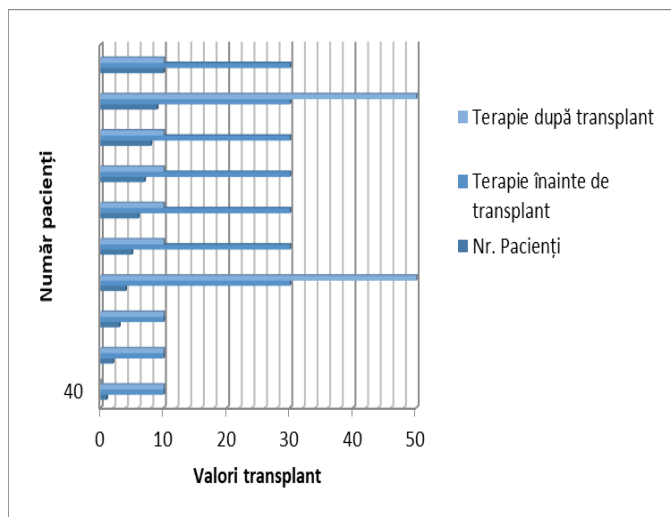


Fig.13. Distribuția numerică a terapiei înainte/după transplant
(10= 5ASA; 30= 5ASA+biologic; 50= 5ASA+Imuran)

Caracteristicile donatorilor

Donatorii potențiali de scaun au fost identificați de către subiecți, în general, un partener intim (soț/soție) sau rudă de gradul I/II.

6 dintre donatori au fost rude de gradul I, 2 rude de gradul II, iar 2 parteneri intimi (soț/soție) (tabel VII).

Tabel VII. Repartiția donatorilor

Grad donatori	Nr.
rudă grad I	6.00
rudă grad II	2.00
parteneri (soț/soție)	2.00

Nu s-a observat o asociere între gradul de rudenie al donatorilor și recidive.

Aspectul colonoscopic și prezența produselor patologice în scaun

O proporție importantă de pacienți au prezentat înainte de transplantul fecal aspect de pancolită în momentul colonoscopiei (6 pacienți), iar 4 pacienți au prezentat aspect de colită stângă.

După efectuarea transplantului fecal, un singur pacient nu a răspuns la terapia inițială cu transplant fecal, acesta fiind cu pancolită în momentul efectuării transplantului fecal, aspect care s-a păstrat și ulterior.

La 6 luni s-a înregistrat o nouă recidivă la un singur pacient din cei 9, aspectul colonoscopic fiind însă de colită stângă (fiind cu pancolită inițial), iar la 1 an, au prezentat recidivă și ceilalți 8 pacienți, aspectul colonoscopic fiind diferit față de aspectul inițial, procentele inversându-se în favoarea colitei stângi.

S-a încercat reprezentarea numerică a aspectului colonoscopic înainte/după transplant fecal (figura 14). Scorul Mayo endoscopic până în momentul recidivei la toți pacienții (exceptând pacientul non-responder) a fost Mayo endoscopic $\frac{1}{2}$.

4 pacienți au prezentat numai scaune cu sânge (colită stângă), iar 6 pacienți au avut scaune cu sânge și mucus (pancolită), înainte de efectuarea transplantului fecal.

După efectuarea transplantului fecal, până în momentul recidivei, pacienții au prezentat doar scaune cu urme de sânge.

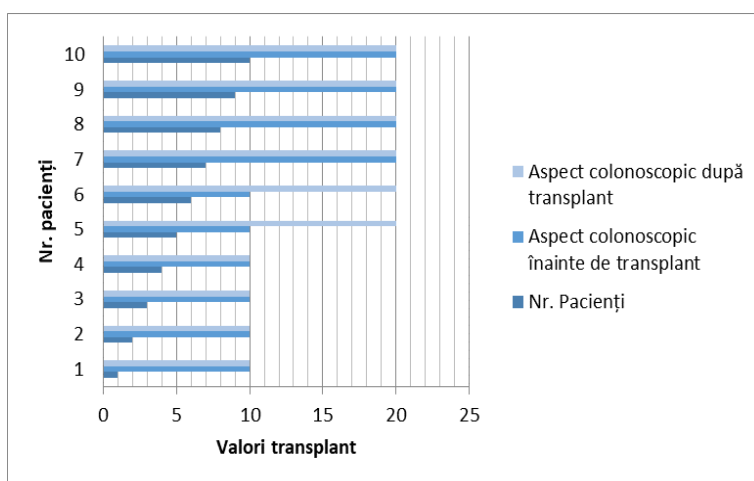


Fig.14. Aspectul colonoscopic înainte/după transplantul fecal
(10=pancolită; 20=colită stângă)

Evoluția posttransplant

Post transplant fecal, din punct de vedere clinic, s-a observat apariția febrei la 1 pacient [10 (0.25 - 44.5)], în primele 3 zile post FMT, care a cedat spontan după aceste 3 zile (figura 15).

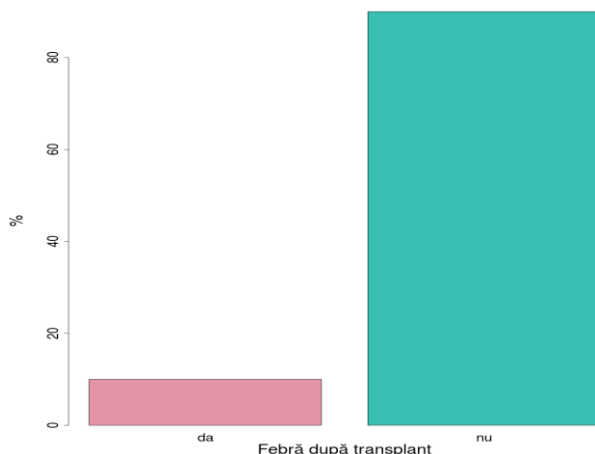


Fig.15. Distribuția febrei după transplant

De asemenea, 3 pacienți au prezentat dureri abdominale moderate, în primele 2 zile post FMT, care au cedat la antialgice. Restul pacienților au prezentat dureri ușoare (70 (34.75 - 93.33) care nu au necesitat administrarea de antialgice (figura 16). Folosind o scală a durerii, majoritatea pacienților pre FMT, au prezentat dureri abdominale severe/moderate.

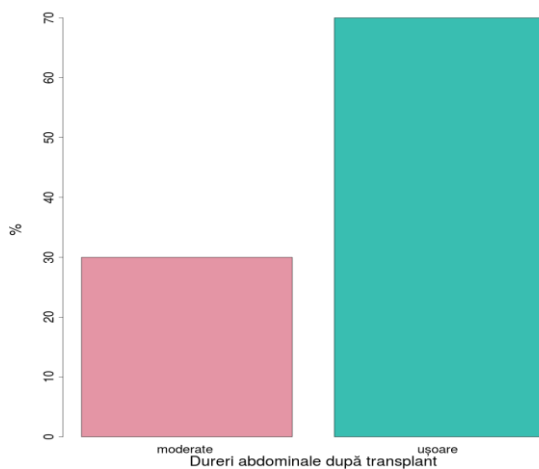


Fig.16. Distribuția durerii după transplant

Din punct de vedere biologic post FMT, toți pacienții au prezentat la o lună scăderea probelor inflamatorii față de valoarea inițială (VSH și CRP). Scăderea a fost observată începând cu prima săptămână după transplant, dar o scădere importantă și semnificativă a fost observată la o lună post transplant.

Grupul pretransplant are valori mai mari decât grupul la o lună cu 0.6 - în ce privește diferența între medianele variabilei CRP (mg/L, $p=0.009$, (având ca parametru 45) (testul Wilcoxon pereche) (figura 17).

Grupul pretransplant are valori mai mari decât grupul la o lună cu 30 - în ce privește diferența între medianele variabilei VSH (mm/h, $p=0.009$, (având ca parametru 45) (testul Wilcoxon pereche) (figura 18).

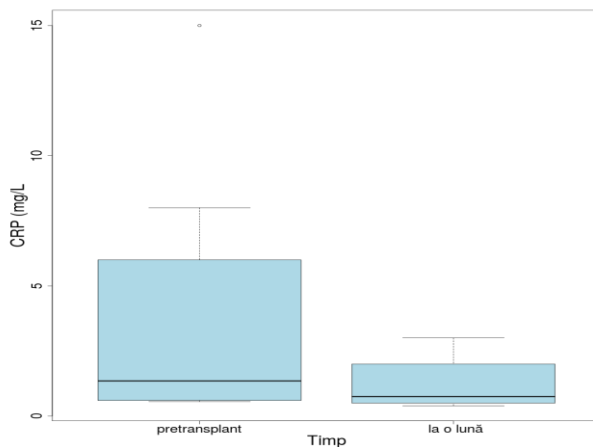


Fig.17. CRP (mg/L) în funcție de timp

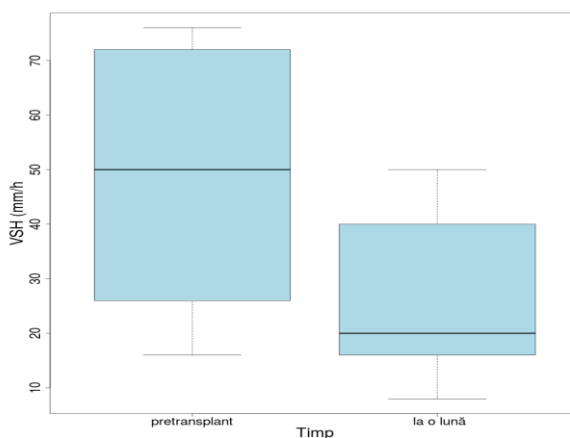


Fig.18. VSH (mm/h) în funcție de timp

Ținând cont de aspectul colonoscopic și de valorile probelor inflamatorii, s-a observat că grupul colită stângă are valori mai mari decât grupul pancolită cu 1.95 (95% CI -9 - 7.3) în ce privește diferența între medianele variabilei CRP (mg/L), $p = 0.83$, (având ca parametru 10.5) (testul Mann Whitney U) (figura 19).

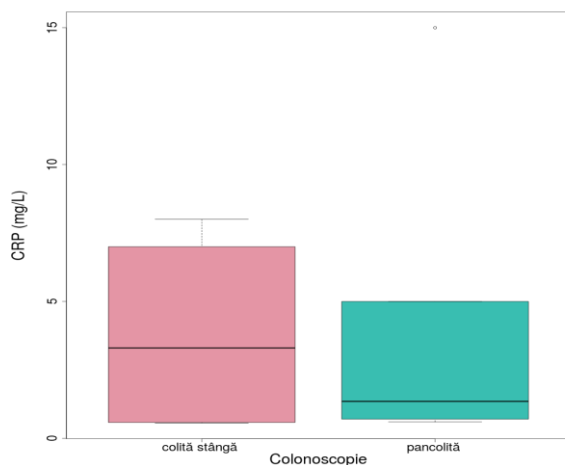


Fig.19. CRP (mg/L) în funcție de extinderea leziunilor

După transplantul fecal un pacient nu a răspuns la terapie, fiind necesară trecerea acestuia pe o altă terapie biologică decât cea inițială. 9 pacienți au răspuns, dar efectul terapiei fiind de 6 luni la 1 pacient și respectiv 1 an la 8 pacienți (figura 20).

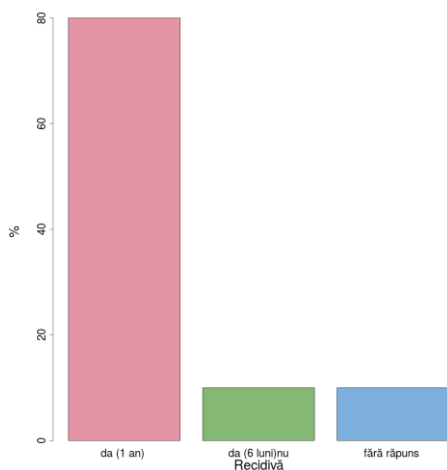


Fig.20. Distribuția recidivei

Numărul de scaune pe zi înainte de transplant a fost în medie de 8,1/zi, iar după, media a fost de 2,9/zi. Posttransplant, simptomatologia clinică s-a ameliorat la 9 pacienți, în scaun observându-se doar câteva striuri sanghinolente, iar numărul scaunelor/zi s-a ameliorat semnificativ, până în momentul apariției recidivei (6 luni, 1 an) (figura 21).

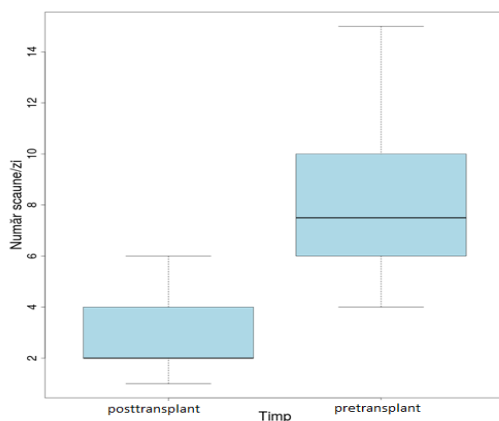


Fig.21. Număr scaune/zi în funcție de timp

Grupul posttransplant are valori mai mici decât grupul pretransplant cu 5.5 - în ce privește diferența între medianele variabilei Număr scaune/zi, $p=0.006$, (având ca parametru 0) (testul Wilcoxon pereche).

4 pacienți au necesitat terapie biologică din momentul recidivei (aici este inclus și pacientul care nu a răspuns la transplant) și 6 pacienți au răspuns la terapia cu 5 ASA și terapia imunosupresoare din momentul recidivei posttransplant.

De asemenea, s-a testat asocierea între forma colitei ulcerative și prezența apendicelui și s-a obținut $p=0.033$ (testul Fisher exact).

Riscul ca variabila colonoscopie să fie pancolită este de 6.5 (95% CI 0.48 - 88.75) ori mai mare la cei din grupul cu prezența apendicelui față de cei din grupul apendicetomizați (figura 22). Aspectul colonoscopic după transplantul de materii fecale a demonstrat reducerea extinderii leziunilor la 50% din pacienți.

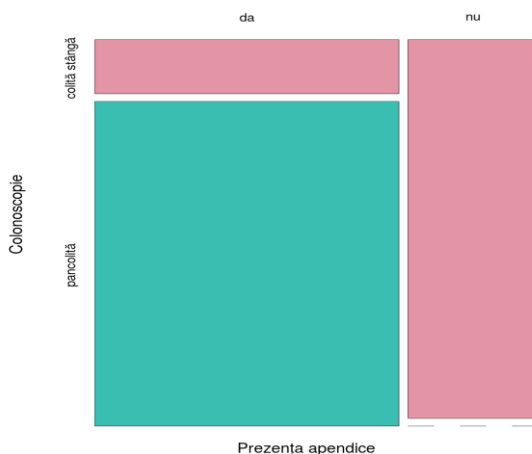


Fig.22. Prezența apendicelui și aspectul colonoscopic

4.5. Discuții

Studiile de transplant de microbiotă fecală la pacienții cu colită ulcerativă sunt rare și limitate ca număr. Transplantul de materii fecale este postulat a fi în siguranță. De ce am ales FMT: justificare patogenetică (cum am spus la introducere), necesitatea găsirii unei noi terapii după ineficiența terapiei biologice sau pacienți cu rezerve față de imunosupresoare și terapia biologică. Am propus testarea terapiei FMT- care nu are efecte adverse, iar în caz de nereușită se putea încerca ca și alternativă terapia biologică.

O proporție importantă de pacienți au prezentat înainte de transplantul fecal aspect de pancolită în momentul colonoscopiei (6 pacienți), iar 4 pacienți au prezentat aspect de colită stângă. După efectuarea transplantului fecal, un singur pacient nu a răspuns la terapia inițială cu transplant fecal, acesta fiind cu pancolită în momentul efectuării transplantului fecal, aspect care s-a păstrat și ulterior.

1 pacient a recidivat la 6 luni de la efectuarea transplantului de microbiotă, iar ceilalți 8 au prezentat recidiva la 1 an de la efectuarea transplantului fecal.

4 pacienți au necesitat terapie biologică din momentul recidivei (aici este inclus și pacientul care nu a răspuns la transplant) și 6 pacienți au răspuns la terapia cu 5 ASA și terapia imunosupresoare din momentul recidivei posttransplant. Studii anterioare arată că FMT ar putea atinge remisia clinică la 63% dintre pacienții cu IBD, în timp ce 76% dintre pacienți ar putea înceta să mai ia medicamente legate de IBD^{209,210}. Cu toate acestea, un studiu care a inclus cinci pacienți cu UC activ moderat până la sever, a arătat că niciunul dintre ei nu a obținut remisie după FMT până în săptămâna 12 și un răspuns clinic pozitiv a fost observat numai la un singur pacient²¹¹.

Spre deosebire de transplantul fecal din infecția recidivantă cu *Clostridium Difficile*, la pacienții cu colită ulcerativă nu s-a observat o asociere între gradul de rudenie al donatorilor și recidive.

Din punct de vedere biologic post FMT, toți pacienții au prezentat la o lună scăderea probelor inflamatorii față de valoarea inițială (VSH și CRP). Scăderea a fost observată începând cu prima săptămână după transplant, dar o scădere importantă și semnificativă a fost observată la o lună post transplant. În literatura de specialitate s-a afirmat că nivelurile CRP nu sunt capabile să prezică eficacitatea clinică imediată, dar CRP scade semnificativ la 1 lună după FMT la pacienții care au obținut un răspuns clinic²⁰⁹.

De asemenea, există o asociere între forma colitei ulcerative și prezența apendicelui. S-a observat că la pacienții cu apendice prezent, forma colitei ulcerative este mult mai severă și extinsă decât la cei apendicetomizați. Studiile anterioare afirmă că apendicectomia are un efect moderator asupra răspunsurilor imune inflamatorii patogene ale intestinului. S-a observat că pacienții fără apendice tind să aibă un risc mai mic pentru colita ulcerativă, comparativ cu cei cu

apendice prezent^{208,211,212}. Mai recent, Bolin și colaboratorii au folosit apendicectomia ca tratament pentru proctita ulcerativă și au constatat o ameliorare a simptomelor la 90% dintre pacienți, cu remisie completă la 40% dintre pacienți^{213,214}.

În ceea ce privește apariția efectelor adverse post transplant fecal, așa cum sunt descrise și în literatura de specialitate, s-a observat apariția febrei la un pacient, iar la 2 pacienți apariția durerilor abdominale, care au cedat la antialgice obișnuite. Studii anterioare afirmă că remisia clinică și endoscopică este prezentă la toți pacienții care au dezvoltat febră după FMT fără bacteremie. Această constatare poate fi explicată prin răspunsul imun sistemic tranzitoriu în timpul grefării microbiotei donatoare²¹⁴. Prin urmare, presupunem că febra după FMT poate fi un bun predictor al remisiunii clinice.

Tratamentul IBD evoluează rapid. Astfel, multe tratamente convenționale și noi droguri s-au dovedit eficiente, inclusiv aminosalicilați, steroizi, agenți imunosupresori și terapii biologice. Cu toate acestea, unii pacienți devin refractari la managementul standard, iar unele terapii au efecte adverse semnificative, mulți pacienți necesitând o intervenție chirurgicală. În ciuda tratamentului medical, un număr semnificativ de pacienți continuă să prezinte simptome ușoare, dar au o calitate slabă a vieții. Având în vedere rolul microbiotei intestinale în declanșarea inflamației în IBD, au fost investigate tratamente care manipulează microbiota, inclusiv utilizarea probioticelor și prebioticele, cu dovezi variabile pentru eficacitatea lor. În acest context, FMT devine un tratament microbiologic alternativ pentru IBD cu eficacitate uluitoare.

Comparativ cu rezultatele obținute pentru infecția cu CD, eficacitatea FMT în UC este mai promițătoare, însă sunt necesare cercetări suplimentare^{211,213,214}. Mai mult, cu excepția refractară, nu este încă clar dacă FMT are o valoare terapeutică potențială pentru pacienții cu IBD indusă în remisie prin terapia medicală convențională sau cei cu IBD ușoară.

În ciuda entuziasmului și explozia în activitatea de cercetare a FMT, probleme importante rămân, în afară de cele care se referă la indicațiile terapeutice potențiale. Acestea includ metodologia de administrare, răspunsurile imunologice, precum și implicațiile pe termen lung în modificarea compoziției microbiotei.

Sunt necesare studii mai ample pentru verificarea eficienței pe loturi mai mari de pacienți în diferite faze evolutive și sub diferite tratamente.

4.6. Concluzii

După efectuarea transplantului fecal la pacienții cu colită ulcerativă, numărul pacienților care au fost tratați cu terapie biologică și imunosupresoare a scăzut semnificativ.

Pe perioada de urmărire, aspectul Mayo endoscopic s-a îmbunătățit, ajungând la un scor de $\frac{1}{2}$ de la scorul inițial de 2-3.

Parametrii biologici (CRP, VSH) au scăzut semnificativ, dovada eficienței acestui tratament.

Efectele secundare apărute în perioada de urmărire au fost minore și tranzitorii.

Posttransplant, evoluția clinică a fost favorabilă.

5. Studiu 3. Evaluarea viabilității probioticelor cu *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 după trecerea prin sistemul gastrointestinal. Studiu pilot pe subiecți umani

5.1. Introducere

Comunitățile microbiene care populează tractul gastrointestinal uman sunt modelate de multiple influențe de mediu, stilul de viață, evenimente de viață și procesul de îmbătrânire²¹⁵. Probioticele sunt microorganisme care au proprietăți benefice pentru gazdă: suprimarea creșterii sau a legării epiteliale și/sau invaziei bacteriilor patogene, îmbunătățirea funcției barierei intestinale și modularea sistemului imunitar^{215,216}. Cele mai multe produse comerciale au fost derivate din surse alimentare, în special produse din lapte. Lista acestor microorganisme continuă să crească și include tulpini de bacili ai acidului lactic (*Lactobacillus* și *Bifidobacterium*), tulpini nepatogene de *Escherichia coli* (*E. coli* Nissle 1917), tulpini nepatogene de drojdie (*Saccharomyces boulardii*), *Clostridium butyricum* și *Streptococcus salivarius*²¹⁷.

Lactobacillus plantarum a fost testat pentru a evidenția rolul lui în afecțiunile gastrointestinale. Această bacterie este capabilă de a suprima creșterea bacteriilor producătoare de gaze în intestine și poate avea un beneficiu la unii pacienți care suferă de diaree acută virală sau infecțioasă, intestin iritabil sau boli inflamatorii intestinale^{218,219}. *Lactobacillus plantarum* reduce complicațiile postoperatorii la pacienții posttransplant hepatic²²⁰, dar nu reduce translocția bacteriană la pacienții cu rezecții colonice sau intervenții chirurgicale abdominale²²¹. Studiile cu probiotice au folosit o singură tulpină de bacterii sau un mixt de mai multe tulpini, date recente demonstrând că o mixtură de tulpini ar aduce beneficii prin scăderea incidenței diareei acute virale, scăderea constipației la gravide, scăderea complicațiilor postoperatorii, scăderea flatulenței și a balonării în IBS și îmbunătățirea calității vieții în IBS^{222,223}. Totuși, acestea nu și-au dovedit eficacitatea pe ameliorarea durerii abdominale la pacienții cu IBS într-o metaanaliză recent condusă²²⁴.

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 a fost studiat doar în studii experimentale. In vitro, *L. plantarum* ATCC 8014 are un efect inhibitor asupra unei game largi de microorganisme, inclusiv bacterii Gram-negative, cât și Gram-pozitive. Bacteria eliberează bacterocina care este o proteină cu rol inhibitor și care este sensibilă la variațiile de temperatură și pH^{225,226}. Am pornit de la ipoteza că și alte tulpini ale speciei de *Lactobacillus plantarum*, cum ar fi în cazul nostru *L. plantarum* ATCC 8014 ar aduce beneficii la pacienții cu afecțiuni gastrointestinale. Astfel, scopul acestui studiu a fost de a evalua viabilitatea unei băuturi probiotice cu *L. plantarum* ATCC 8014 la trecerea prin sistemul gastrointestinal și concentrația bacteriană fecală la voluntari sănătoși imediat după consumul băuturii probiotice. Obiectivele secundare au constat în evaluarea complianței la băutură a subiecților, dar și evaluarea asupra frecvenței și consistenței scaunului. Am putea extrapola că o concentrație crescută de *Lactobacillus Plantarum* regăsită în fecale după consum ar putea modula flora bacteriană gastrointestinală cu efecte benefice asupra subiecților umani, iar asocierea a mai multor tulpini ar duce beneficii la pacienții cu IBS cu diaree.

5.2. Ipoteza de lucru/obiective

Obiectivul principal al acestui studiu a fost evaluarea efectului unei băuturi fermentate vegetale probiotice cu *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 pe compoziția bacteriană a fecalelor și pe consistența și frecvența defecațiilor la voluntari sănătoși.

Având în vedere că *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 are acțiune antibacteriană, în special pe bacteriile gram pozitive, ne-am propus creșterea acesteia în compoziția bacteriană a viitorilor donatori sănătoși, ceea ce ar putea aduce beneficiu în cazul transplantului fecal la pacienții cu *Clostridium Difficile* sau alte colite infecțioase.

5.3. Material și metodă

Studiul a fost efectuat într-un singur centru, Institutul Regional de Gastroenterologie și Hepatologie "Octavian Fodor" Cluj-Napoca, în cooperare cu USAMV Cluj-Napoca. A fost un studiu prospectiv, în care au fost incluși 10 subiecți sănătoși, în perioada 2015-2016. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

Au fost înrolați în studiu zece voluntari sănătoși cu vârste cuprinse între 18 și 65 de ani, care au semnat consimțământul informat.

Criteriile de excludere au fost antecedentele personale de afecțiuni digestive incluzând:

- ✓ sindromul de colon iritabil;
- ✓ bolile inflamatorii intestinale;
- ✓ boala diverticulară;
- ✓ diareea acută sau cronică;
- ✓ constipația cronică;
- ✓ cancerele digestive;
- ✓ rezecțiile gastrice sau intestinale.

Subiecții au fost informați să nu efectueze tratament cu:

- ✓ inhibitori de pompă de protoni;
- ✓ antiacide, laxative;
- ✓ antidiareice;
- ✓ antibiotice timp de cel puțin 30 zile înainte de începerea și pe parcursul

studiului;

- ✓ de asemenea, li s-a interzis să consume probiotice sau prebiotice cu cel puțin 14 zile înainte de începerea și pe parcursul studiului.

În rest, participanții au fost rugați să-și continue dieta lor normală.

Designul studiului

Durata totală a studiului a fost de 21 zile (Fig. 23) :

- perioada de prescreening de 7 zile cu semnare consimțământ, completarea chestionarului de apreciere a tranzitului intestinal, conform scalei Bristol, aplicarea criteriilor de includere și excludere

- perioada de studiu propriu-zisă de 5-7 zile, perioada de pre-administrare (1-2 zile) în care s-au colectat probe de scaun, perioada de administrare a băuturii probiotice (3 zile) și perioada post-administrare (1-2 zile) în care s-au colectat probe de scaun. În perioada de administrare, participanții au consumat zilnic o dată/zi dimineața pe stomacul gol, 100 ml de băutură rece păstrată în frigider la 5 grade C.

- perioada de urmărire de 7 zile în care s-a completat chestionarul de complianță, chestionarul de apreciere a tranzitului intestinal, conform scalei Bristol și s-au aplicat criteriile de excludere.

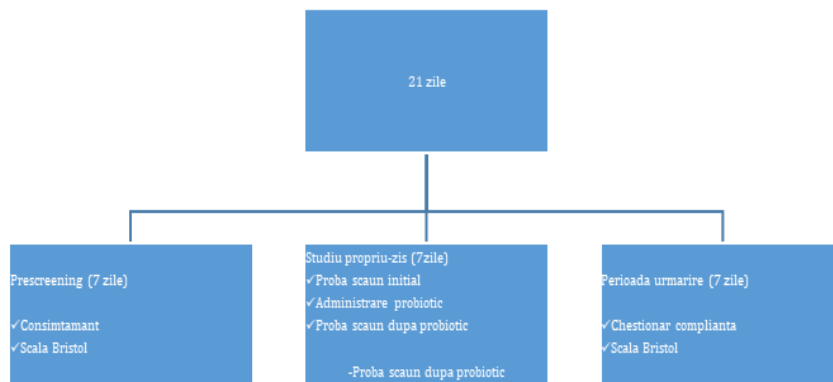


Fig.23. Study design

Băutura probiotică a fost produsă în cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca în luna septembrie 2016. Metoda utilizată va fi descrisă pe larg ulterior.

S-a folosit un chestionar de evaluare a frecvenței și consistenței scaunului în perioada de prescreening și în perioada de urmărire în conformitate cu scala Bristol²²⁷.

S-a folosit un chestionar de apreciere a complianței prin evaluarea cantității de băătură consumată (verificarea numărului de sticle, precum și a conținutului restant) și a efectele adverse locale (gust neplăcut) și digestive (greață, balonare, dureri abdominale).

Participanții au fost excluși din analiză dacă mai puțin de 80% din probele de materii fecale au fost colectate sau băutura probiotică a fost consumată mai puțin de 3 zile și/sau sub 80% din cantitatea prevăzută.

Băutura probiotică

Monitorizarea microbiologică

Prepararea inoculului. *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 a fost utilizat în acest studiu. Compoziția mediului: 20 gl-1 agar, 10 gl-1 extract de drojdie, 20 gl-1 peptonă și 20 gl-1 glucoză. Mediul de cultură a fost MRS bulion (creat de Man, Rogosa și Sharpe, firma Merck, oraș Berlin, Germania).

Condiții de fermentație. Fermentațiile au rulat la temperatura de 37°C, cu agitare de 180 rpm, în condiții anaerobe, în bioreactor (Fermac 360, volum de 2.9 L, firma Electrolab, USA). Ca agent de corecție a pH-ului s-a utilizat o soluție de NaOH

(20%). A fost monitorizată dinamica de creștere optimă pentru cele două bacterii în spectrul de pH de 5-7. Vasul bioreactorului a fost sterilizat la 121°C pentru 30 minute.

Din vasul de fermentație s-a prelevat câte un 1mL din proba care a fost utilizat la înglobarea în mediu MRS agar (creat de Man, Rogosa și Sharpe, firma Merck, oraș Berlin, Germania), iar apoi a fost incubat la 37 °C pentru 24 de ore.

Biomasa. Materialul în cantitate de 5 ml a fost centrifugat, peletul spălat și apoi depozitat în fiole pentru determinarea gravimetrică a biomasei.

Cantitatea de biomasă formată pe perioada fermentației lui *L. plantarum* este cuprinsă la pH de 6 între 7.5-8 g/L.

L. plantarum s-a dezvoltat în concentrație de 2×10^{10} CFU/ml la pH6.

Îmbuteliere băutură de fermentație cu probiotic

Materialul biologic proaspăt (mere, morcovi, sfeclă de zahăr, struguri) a fost achiziționat din Bistrița (România). Produsele înainte de prelucrare au fost presortate, curățate, alese, spălate cu apă de la robinet și uscate cu aer. Toate operațiunile au fost efectuate manual. Ulterior probele au fost trecute individual printr-un storcător de fructe și legume Heininger HSJ-160RD, USA, Motor DC, 80 RPM cu recipient pentru pulpă, pentru a separa cojile și piețele necesare. Pulpă obținută a fost din nou presată manual, pentru o mai bună separare a sucului din fructe și legume.

Resturile au fost măcinate fin într-un procesor de alimente Nutribullet (USA) de 600w. Produsele rezultate au fost folosite ca ingrediente, împreună cu apa de la robinet în diferite procente pentru a obține băuturile probiotice. Băuturile finale au fost ambalate în sticle de 100 ml și sigilate.

Pasteurizarea a fost realizată prin tratamentul termic la 70 grade C în bain-marie timp de 15 minute. Pentru îmbuteliere s-a folosit sticlă de culoare închisă pentru a evita eventualele procese de oxidare ce pot avea loc în prezența luminii. Pentru stabilitatea băuturii a fost necesară dezvoltarea unui sistem inteligent de adăugare a capsulelor cu bacterii probiotice și compuși bioactivi. A fost achiziționat de la Wildcaps Dosing solutions (<http://wildcaps.com/>) - capace pentru sticle care să permită eliberarea controlată a capsulelor în momentul consumului. Modul prevăzut de utilizare: se îndepărtează dopul, se scoate manșonul și se răstoarnă microcapsulele conținute în acesta în băutură, se agită și se consumă băutura probiotică.

Sticlutele au fost elaborate de către SC ARGO ROM PLASTICS S.A.

Condiții de păstrare

Băutura a fost păstrată la frigider, la temperaturi între 2 și 8 grade Celsius, perioada de valabilitate la frigider fiind de aproximativ 6 luni.

Administrare băutură probiotică

În perioada de administrare, participanții au consumat zilnic o dată/zi dimineața, pe stomacul gol, 100 ml de băutură rece păstrată în frigider 5 grade C.

Culturile bacteriologice

Au fost colectate două probe de fecale de 20 grame, din scaunul de dimineață: una în perioada de preadministrare, iar a doua în perioada postadministrare. Imediat, peste probele de fecale, a fost adăugată soluție de glicerină pură, concentrație 99,95%, elaborată în cadrul farmaciei din cadrul IRGH »O.Fodor« (pentru menținerea bacteriilor lactice), apoi transportate la temperatura ambientală în aceeași zi pentru prelucrare.

Condițiile de prelucrare a scaunului

Acestea au fost păstrate la temperatura de -18°C până la determinarea numărului de bacterii probiotice. Pentru a determina numărul de bacterii probiotice viabile din probele de fecale, acestea au fost decongelate, iar mai apoi s-a cântărit 1 g din fiecare probă. Proba astfel cântărită este introdusă în 9 ml ser fiziologic (soluție salină 0,85 %).

S-a utilizat câte 1 ml probă pentru incubare pe placa Petri. Peste 1 ml de probă se adaugă aproximativ 15 ml mediu MRS agar (creat de Man, Rogosa și Sharpe, firma Sifin, oraș Berlin, Germania) steril adus la temperatura de 38-39°C. După 72 ore de incubare la 37°C, în condiții aerobe, s-a calculat numărul de unități formatoare de colonii (CFU) de *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 (CFU/g).

Statistica

Datele categorice au fost descrise ca numere și procente. Datele distribuite în mod normal au fost prezentate ca medii și deviații standard (SD), în timp ce datele care nu au urmat distribuției normale au fost prezentate ca medii și intervale de interquartile (IQR) și intervale. Au fost utilizate intervale de încredere de 9% pentru medii. Normalitatea datelor a fost evaluată cu ajutorul schemelor quantile-quantile, stripcharts și testelor Shapiro-Wilk. Am considerat că două valori ale p-ului <0.05 sunt semnificative din punct de vedere statistic. Pentru calcul statistic și grafică, versiunea 3.2.3 a fost utilizată pentru toate calculele statistice.

5.4. Rezultate

Au fost înrolați în studiu zece voluntari sănătoși cu vârsta cuprinsă între 18 și 65 de ani, care au semnat consimțământul informat. Media de vârstă a fost de 35,3 ani (min. 26 –max. 55). În total au fost 7 femei și 3 bărbați.

Toți cei 10 subiecți au terminat studiul.

Pe baza chestionarelor, complianța subiecților la consumul băuturii a fost de 100%. Nici un subiect nu s-a plâns de gust și nu au existat efecte adverse locale sau sistemice în timpul consumului.

Numărul coloniilor de *L. plantarum* ATCC 8014 înainte de consum

La toți subiecții au fost decelate colonii de *L. plantarum* ATCC 8014 înainte de consum. Media numărului de colonii înainte de consum a fost de 3.02×10^5 .

Imediat după consumul băuturii probiotice, s-a observat o creștere semnificativă a concentrației de *Lactobacillus Plantarum* la toți subiecții până $9,57 \times 10^7$. Media de colonii a crescut cu 6,55%, față de procentul inițial (figura 24), cu semnificație statistică ($P < 0,05$).

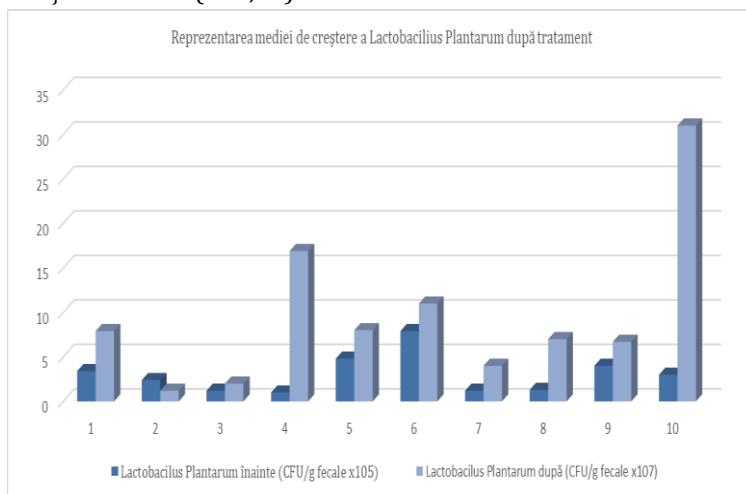


Fig.24. Numărul coloniilor de *Lactobacillus Plantarum* înainte și după terapie detaliat pe pacient

Consistența și frecvența scaunelor înainte și după terapie

S-au găsit modificări importante în ceea ce privește consistența și frecvența scaunelor. La jumătate din subiecți consistența scaunului a crescut (figura 25), iar frecvența a scăzut (tabel VIII).

Tabel VIII. Frecvența și consistența (scala Bristol 1,2,3- constipație, 4,5 – scaun de aspect normal, 6,7 - diaree) înainte și după terapia probiotică (median and range)

	Înainte (n=10)	După (n=10)
Frecvența	1 (1-4)	0,75 (0,5-2)
Consistență	4,5 (4-5)	2,7 (1-5)

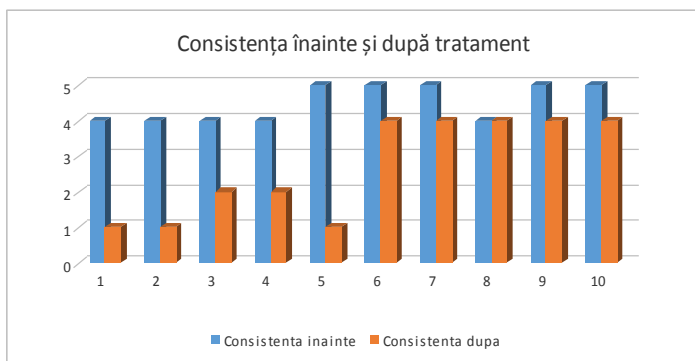


Fig.25. Consistența înainte și după terapie, detaliat pe pacient

5.5. Discuții

În studiul de față am evaluat compoziția florei bacteriene fecale după administrarea unei soluții probiotice cu *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 pe subiecți sănătoși și am observat că există o proporție semnificativ crescută de bacterii detectate imediat în scaunul subiecților. Astfel, putem spune că populația de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 este bine conservată în băutura probiotică propusă și a rezistat trecerii prin sistemul gastrointestinal.

Am demonstrat în acest studiu că după un timp relativ scurt de consum a 2×10^{10} CFU/zi de *L. plantatum* ATCC 8014, pentru numai 3 zile, imediat postconsum se regăsește o concentrație mare de bacterii în fecale, cu repercursiuni clinice importante asupra frecvenței și consistenței scaunului. Putem extrapola că folosirea acestui produs într-un timp scurt poate aduce beneficii pacienților cu diaree și IBS. În studiile anterioare, băuturile probiotice cu Lactobacili sunt promovate ca o modalitate de tratament pentru diverse boli gastrointestinale și pentru îmbunătățirea stării generale de sănătate²²⁷⁻²²⁹. Cu toate acestea, există încă multe controverse în ceea ce privește rolul bacteriilor probiotice și efectele lor asupra organismului uman și a florei intestinale. Într-o metaanaliză recentă, probioticele cu Lacobacilli și/sau Bifidobacteria s-au dovedit a fi benefice la pacienții cu IBS în ceea ce privește balonarea, flatulența și consistența scaunului²³⁰⁻²³².

Având în vedere că *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 are beneficii asupra bacteriilor gram pozitive, împiedicând dezvoltarea acestora în tractul gastro-intestinal²³³, am încercat prin această băutură să creștem benefic populația bacteriană a donatorilor sănătoși, cu folosirea ulterioară a materiilor fecale în transplantul fecal în caz de infecție recurentă cu *Clostridium Difficile*.

Dintre lactobacili, *L. acidophilus*, *L. plantatum* 299v, *L.p* CECT 17484, CECT 7485, *L. casei*, *L. rhamonosus*, și-au dovedit eficacitatea în studii multicentrice

singure sau în combinație la pacienții cu diaree acută virală sau infecțioasă, IBS, în scăderea complicațiilor postoperatorii²³³⁻²³⁶.

Tulpina *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 nu a fost testată pe subiecții umani, neexistând până în prezent date suficiente despre caracteristicile și efectele sale la oameni. La fel ca celelalte tulpini de *L. plantarum*, *L. plantarum* ATCC 8014 se leagă de mucus, reușind să se mențină și să crească în tubul gastrointestinal, de asemenea, eliberează bactericine cu rol în inhibarea bacteriilor patogene^{236,237}.

Suntem conștienți de limitele studiului, reprezentate îndeosebi de numărul limitat de subiecți testați și de lipsa unui grup de control. Nu am evaluat celelalte tulpini de *L. plantatum* sau alte populații sau subpopulații bacteriene din fecale.

După cunoștințele noastre, acesta este primul studiu din literatură care evaluează efectul unei băuturi probiotice cu *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 asupra compoziției florei fecale pe subiecți umani. În viitor ne-am propus să studiem beneficiile *L. plantatum* ATCC 8014 într-un studiu dublu orb randomizat placebo-controlat la pacienții cu IBS cu diaree, precum și un studiu de transplant fecal, cu administrarea anterioară a preparatului donatorilor, urmat ulterior de măsurarea concentrației de lactobacili după transplant și verificarea în timp a eficienței.

5.6. Concluzii

Acest studiu arată că o băutură probiotică care conține *Lactobacillus plantatum* ATCC 8014 traversează bariera gastrointestinală și crește semnificativ numărul de lactobacili în materiile fecale ale voluntarilor sănătoși. Efectul observat al *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 asupra florei intestinale apare imediat după încetarea consumului băuturii, acesta fiind reprezentat de creșterea numărului de colonii/ml, precum și de modificarea consistenței și frecvenței scaunului la o subpopulație de subiecți.

Am reușit să demonstrăm că *Lactobacillus plantarum* rezistă pasajului, că nu determină efecte secundare și că se regăsește în concentrație semnificativ crescută postconsum în fecale.

6. Concluzii generale

1. Rezultatele obținute constituie o dovadă a eficienței utilizării transplantului de fecale în infecția recidivantă cu *Clostridium Difficile* și reprezintă un argument pentru necesitatea unor cercetări viitoare.
2. Transplantul de materii fecale prezintă o rată mare de vindecare a infecției cu *Clostridium Difficile*.
3. Numărul relativ mic de bolnavi luați în studiu derivă din durata scurtă a studiului, respectiv din faptul că bolnavii, dar probabil și unii medici sunt încă rezervați față de această metodă de tratament.
4. Transplantul de materii fecale pentru infecțiile recidivante cu *Clostridium Difficile* este o metodă eficientă, sigură și cu rezultate durabile pentru pacienții care nu răspund la terapia tradițională.
5. Aceste rezultate pot constitui un moment de sensibilizare a noastră și a bolnavilor la această metodă de tratament. Studiile noastre privind utilizarea transplantului de fecale în infecția cu *Clostridium Difficile* și în bolile inflamatorii intestinale (colită ulcerativă) reprezintă o prioritate în România.
6. Există o concordanță între eficiența transplantului și gradul de rudenie al donatorilor. La pacienții cu infecție recurentă cu *Clostridium difficile* s-a observat recidiva posttransplant în cazul donatorilor de grad I și II, în schimb în cadrul partenerilor intimi nu s-a decelat nici o recidivă. În cazul colitei ulcerative nu s-a observat nici o relație între donator și recidivă.
7. După efectuarea transplantului fecal la pacienții cu colită ulcerativă, a scăzut semnificativ numărul pacienților care au necesitat terapie biologică și imunosupresoare.
8. Reacțiile adverse la tratamentul prin FMT sunt minore și tranzitorii. Nu s-au înregistrat complicații majore.
9. Transplantul de materii fecale, ieftin și eficient ar putea constitui “un început de drum în România” pentru tratamentul recurenței infecției cu *Clostridium Difficile*.

10. Efectul *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 asupra florei intestinale apare imediat după încetarea consumului de băutură, acesta fiind reprezentat de creșterea numărului de colonii/ml, precum și de modificarea consistenței și frecvenței scaunului la o subpopulație de subiecți sănătoși.

7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

1. Această serie de cazuri, prima publicată în România la pacienții cu CDI, la care s-a folosit ca mod de administrare a transplantului fecal, colonoscopia, prezintă dovezi clare care arată că transplantul de materii fecale este un tratament sigur și eficient pentru infecțiile recidivante cu *Clostridium Difficile*. Aproximativ 20% dintre pacienții cu infecție cu *Clostridium Difficile* care sunt tratați farmacologic pot prezenta reapariția infecției în termen de 6 luni de la data când antibioticul a fost întrerupt.
2. În contextul clinic, FMT a fost folosit pentru a reduce semnificativ riscul de CDI recurentă, prin creșterea diversității microbiene și modificarea mediului metabolic în tractul intestinal al beneficiarilor.
3. Studiile de transplant de microbiotă fecală la pacienții cu colită ulcerativă sunt rare și limitate la câteva cazuri clinice. De ce s-a ales FMT: justificarea patogenetică (cum s-a spus și la introducere), necesitatea găsirii unei noi terapii după ineficiența terapiei biologice sau la pacienții cu rezerve față de imunosupresoare și terapie biologică.
4. Studiile de față ar putea identifica legătura lipsă dintre eficacitatea FMT și impactul acesteia asupra comunităților microbiene și inflamației mucoaselor.
5. O contribuție inovatoare o constituie demonstrarea eficienței în timp a transplantului de materii fecale, precum și existența unei concordanțe între durata eficienței și gradul de rudenie al donatorului, în cazul transplantului fecal la pacienții cu *Clostridium Difficile*.
6. În tratamentul CDI, rămâne să se determine dacă efectele FMT convenționale se datorează modificărilor profilurilor metabolice gazdă, comunităților bacteriene sau introducerii peptidelor donatorului care modifică răspunsurile imunitare ale gazdei.

7. Chiar dacă are un număr limitat de cazuri, acest studiu aduce în prim plan rolul esențial al microbiotei intestinale în sănătatea umană, precum și eficiența transplantului fecal, atât în infecția cu *Clostridium difficile* (CDI), cât și a bolii inflamatorii intestinale (IBD).

REFERINȚE

1. Fouhy F, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C, Cotter PD. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*. 2012; 3(3):203-220.
2. Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013 Jul; 6(4):295-308.
3. Bull MJ, Plummer NT. The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med (Encinitas)*. 2014 Dec; 13(6):17-22.
4. Eamonn M. M. Quigley, FRCP, FACP, FACP, FRCPI. Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterology & Hepatology* Volume 9, Issue 9 September 2013 : 560-569.
5. Loh G, Blaut M. Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes*. 2012; 3(6):544-555.
6. Flint HJ, Scott KP, Louis P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol and Hepatol* 2012; 9:577-589.
7. Dave M, Higgins PD, Middha S, et al. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res* 2012; 160:246-257.
8. Jose C. Clemente, Luke K. Ursell, Laura Wegener Parfrey, and Rob Knight. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell* 148, March 16, 2012, 1258-1270.
9. Sahil Khanna, MBBS and Pritish K. Tosh. A Clinician's Primer on the Role of the Microbiome in Human Health and Disease. *Mayo Clin Proc*. n January 2014; 89 (1):107-114.
10. Backhe F, Fraser CM, Ringel Y, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(5):611-622.
11. Ley, R. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010; 26: 5-11.
12. Ley, R., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C., Knight, R. and Gordon, J. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 11070-11075.
13. Ley, R., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Ramey, R., Bircher, J. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008; 320: 1647-1651.

14. Ley, R., Peterson, D. and Gordon, J. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*.2006; 124: 837–848.
15. Ley, R., Turnbaugh, P., Klein, S. and Gordon, J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006; 444: 1022–1023.
16. Turnbaugh, P., Ley, R., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R. and Gordon, J. The human microbiome project. *Nature*. 2007; 449: 804–810.
17. Larsen, N., Vogensen, F., van den Berg, F., Nielsen, D., Andreasen, A., Pedersen, B. et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*.2010; 5: e9085.
18. Ghoshal UC, Shukla R, Ghoshal U, et al. The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe? *Int J Inflam*. 2012; 2012:151085.
19. Spiller R, Lam C. An update on post-infectious irritable bowel syndrome: role of genetics, immune activation, serotonin and altered microbiome. *J Neurogastroenterol Motil*. 2012; 18(3):258-268.
20. Pimentel M, Lembo A, Chey WD, et al. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med*. 2011; 364(1):22-32.
21. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 2005; 128(3):541-551.
22. McKernan DP, Fitzgerald P, Dinan TG, Cryan JF. The probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 displays visceral antinociceptive effects in the rat. *Neurogastroenterol Motil*. 2010; 22(9):1029-1035.
23. Zeng J, Li Y-Q, Zuo X-L, Zhen Y-B, Yang J, Liu C-H. Clinical trial: effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008; 28(8):994-1002.
24. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med*. 2007; 13(1):35-37.
25. Kamiya T, Eang L, Forsythe P, et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut*.2006; 55(2):191-196.
26. Saulnier, D., Riehle, K., Mistretta, T., Diaz, M., Mandal, D., Raza, S. et al. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011; 141: 1782–1791.
27. Jeffery, I., Quigley, E., Ohman, L., Simren, M. and O'Toole, P. The microbiota link to irritable bowel syndrome: An emerging story. *Gut Microbes* 2012; 3: 572–576.
28. Sartor RB, Muehlbauer M. Microbial host interactions in IBD: implications for pathogenesis and therapy. *Curr Gastroenterol Rep*. 2007; 9(6):497-507.
29. Shanahan F. The microbiota in inflammatory bowel disease: friend, bystander, and sometime-villain. *Nutr Rev*. 2012; 70(suppl 1):S31-S37.
30. Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F. and Guarner, F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol.Hepatol*. 2012; 9: 599–608.

31. Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006; 55: 205–211.
32. Morgan, X., Tickle, T., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K., Ward, D. et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012; 13: R79.
33. Kostic, A., Gevers, D., Pedamallu, C., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 292–298.
34. Arthur, J., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J., Fan, T. et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science.* 2012; 338: 120–123.
35. Kostic, A., Gevers, D., Pedamallu, C., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* 2012; 22: 292–298.
36. Russell SL, Finlay BB. The impact of gut microbes in allergic diseases. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012; 28(6):563-569.
37. Hornig M. The role of microbes and autoimmunity in the pathogenesis of neuropsychiatric illness. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25(4):488-795.
38. Bartlett JG. Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.
39. Bartlett JG, Moon N, Chang TW, et al. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 1978; 75:778-782.
40. Silviu Epuran, Elena Rusu, Adriana Sbarcea, Simona Mușat. *Clostridium Difficile*: epidemiologie si etiologie. *Revista Romana de Boli Infectioase* – vol. XVII, Nr.1, 2014; 28-30.
41. Johnson S, Samore MH, Farrow KA, et al. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med* 1999; 341:1645-1651.
42. Miller M, Gravel D, Mulvey M, et al. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in Canada: patient age and infecting strain type are highly predictive of severe outcome and mortality. *Clin Infect Dis* 2010; 50:194-201.
43. Pépin J, Saheb N, Coulombe MA, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1254-1260.
44. He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet* 2013; 45:109-113.
45. Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005; 353:2442-2449.
46. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a

- region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004; 171:466-472.
47. Pépin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ* 2005; 173:1037-1042.
 48. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005; 353:2433-2441.
 49. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, et al. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:273-280.
 50. Goorhuis A, Van der Kooi T, Vaessen N, et al. Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 2007; 45:695-703.
 51. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, et al. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 Suppl 6:2-18.
 52. Hall AJ, Curns AT, McDonald LC, et al. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007. *Clin Infect Dis* 2012; 55:216-223.
 53. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 2008; 47:1162-1170.
 54. Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM, et al. All-cause and disease-specific mortality in hospitalized patients with *Clostridium difficile* infection: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 2013; 56:1108-1116.
 55. Belmares J, Johnson S, Parada JP, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* over the course of 10 years in a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1141-1147.
 56. Walk ST, Micic D, Jain R, et al. *Clostridium difficile* ribotype does not predict severe infection. *Clin Infect Dis* 2012; 55:1661-1668.
 57. Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, et al. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 2015; 372:825-834.
 58. Gerding DN, Johnson S, Peterson LR, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16:459-477.
 59. Kim KH, Fekety R, Batts DH, et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1981; 143:42-50.
 60. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320:204-210.
 61. Samore MH, Venkataraman L, DeGirolami PC, et al. Clinical and molecular

- epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Med* 1996; 100: 32-40.
62. Freedberg DE, Salmasian H, Cohen B, et al. Receipt of Antibiotics in Hospitalized Patients and Risk for *Clostridium difficile* Infection in Subsequent Patients Who Occupy the Same Bed. *JAMA Intern Med* 2016; 176:1801-1808.
 63. Curry SR, Muto CA, Schlackman JL, et al. Use of multilocus variable number of tandem repeats analysis genotyping to determine the role of asymptomatic carriers in *Clostridium difficile* transmission. *Clin Infect Dis* 2013; 57:1094-1102.
 64. Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med* 2013; 369:1195-1205.
 65. Zacharioudakis IM, Zervou FN, Pliakos EE, et al. Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2015; 110:381-390.
 66. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31:431-455.
 67. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:409-415.
 68. Gravel D, Miller M, Simor A, et al. Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. *Clin Infect Dis* 2009; 48:568-576.
 69. Palmore TN, Sohn S, Malak SF, et al. Risk factors for acquisition of *Clostridium difficile*-associated diarrhea among outpatients at a cancer hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:680-684.
 70. Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *N Engl J Med* 2008; 359:1932-1940.
 71. Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA* 2015; 313:398-408.
 72. Hu MY, Katchar K, Kyne L, et al. Prospective derivation and validation of a clinical prediction rule for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology* 2009; 136:1206-1214.
 73. Mullane KM, Miller MA, Weiss K, et al. Efficacy of fidaxomicin versus vancomycin as therapy for *Clostridium difficile* infection in individuals taking concomitant antibiotics for other concurrent infections. *Clin Infect Dis* 2011; 53:440-447.
 74. Wilcox MH, Howe R. Diarrhoea caused by *Clostridium difficile*: response time for treatment with metronidazole and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:673-679.
 75. Koo HL, Koo DC, Musher DM, DuPont HL. Antimotility agents for the treatment of

- Clostridium difficile* diarrhea and colitis. Clin Infect Dis 2009; 48:598-605.
76. Nelson R. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. Cochrane Database Syst Rev 2007; CD004610.
 77. Drekonja DM, Butler M, MacDonald R, et al. Comparative effectiveness of *Clostridium difficile* treatments: a systematic review. Ann Intern Med 2011; 155:839-847.
 78. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol 2013; 108: 478-498.
 79. Leffler DA, Lamont JT. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. Gastroenterology 2009; 136:1899-1912.
 80. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2014; 20 Suppl 2:1-26.
 81. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. Clin Infect Dis 2007; 45:302-307.
 82. Wenisch C, Parschalk B, Hasenhündl M, et al. Comparison of vancomycin, teicoplanin, metronidazole, and fusidic acid for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Clin Infect Dis 1996; 22:813-818.
 83. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am J Gastroenterol 1997; 92: 739-750.
 84. Carmeli Y, Eliopoulos GM, Samore MH. Antecedent treatment with different antibiotic agents as a risk factor for vancomycin-resistant *Enterococcus*. Emerg Infect Dis 2002; 8:802-807.
 85. Al-Nassir WN, Sethi AK, Li Y, et al. Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:2403-2406.
 86. Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. Clin Infect Dis 2005; 40:1591-1597.
 87. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ 2004; 171:466-472.
 88. Pépin J, Valiquette L, Gagnon S, et al. Outcomes of *Clostridium difficile*-associated disease treated with metronidazole or vancomycin before and after the emergence of NAP1/027. Am J Gastroenterol 2007; 102: 2781- 2788.
 89. Pepin J. Vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* Infection: for whom is this expensive bullet really magic? Clin Infect Dis 2008; 46:1493-1498.

90. Borody TJ, Warren EF, Leis SM, et al. Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38:475-483.
91. Bolton RP, Culshaw MA. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. *Gut* 1986; 27:1169-1172.
92. Kleinfeld DI, Sharpe RJ, Donta ST. Parenteral therapy for antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *J Infect Dis* 1988; 157:389.
93. Friedenberg F, Fernandez A, Kaul V, et al. Intravenous metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile* colitis. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:1176-1180.
94. Fekety R, Silva J, Kauffman C, et al. Treatment of antibiotic-associated *Clostridium difficile* colitis with oral vancomycin: comparison of two dosage regimens. *Am J Med* 1989; 86:15-19.
95. Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 2011; 364:422-431.
96. Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, et al. Treatment of first recurrence of *Clostridium difficile* infection: fidaxomicin versus vancomycin. *Clin Infect Dis* 2012; 55 Suppl 2:S154-161.
97. Tedesco FJ, Gordon D, Fortson WC. Approach to patients with multiple relapses of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Am J Gastroenterol* 1985; 80: 867-868.
98. Venugopal AA, Johnson S. Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic approved for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2012; 54:568-574.
99. Hecht DW, Galang MA, Sambol SP, et al. In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:2716-2719.
100. Ackermann G, Löffler B, Adler D, Rodloff AC. In vitro activity of OPT-80 against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2280-2282.
101. De Bruyn G, Saleh J, Workman D, et al. Defining the optimal formulation and schedule of a candidate toxoid vaccine against *Clostridium difficile* infection: a randomized phase 2 clinical trial. *Vaccine*. 2016 ; 34:2170-2178.
102. Foglia G, Shah S, Luxemburger C, et al. *Clostridium difficile*: development of a novel candidate vaccine. *Vaccine*. 2012 ; 30:4307-4309.
103. Sheldon E, Kitchin N, Peng Y, et al. A phase 1, placebo-controlled, randomized study of the safety, tolerability, and immunogenicity of a *Clostridium difficile* vaccine administered with or without aluminum hydroxide in healthy adults. *Vaccine*. 2016 ; 34:2082-2091.
104. Kociolek LK, Gerding DN. Breakthroughs in the treatment and prevention of *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016 ; 13:150-160.

105. Louie T, Nord CE, Talbot GH, et al. Multicenter, double-blind, randomized, phase 2 study evaluating the novel antibiotic cadazolid in patients with clostridium difficile infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 ; 59:6266-6273.
106. Basseres E, Endres BT, Khaleduzzaman M, et al. Impact on toxin production and cell morphology in *Clostridium difficile* by ridinilazole (SMT19969), a novel treatment for *C. difficile* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2016 ; 71:1245-1251.
107. Bakken JS. Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe* 2009; 15:285-289.
108. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; 368:407-415.
109. Borody TJ, Warren EF, Leis S, et al. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37:42-47.
110. Anderson JL, Edney RJ, Whelan K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36:503-516.
111. Kump PK, Gröchenig HP, Lackner S, et al. Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:2155-2165.
112. Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, et al. Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology* 2015; 149:223-237.
113. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59-65.
114. Robinson CJ, Bohannan BJ, Young VB. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74:453-476.
115. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010; 330:1768-1773.
116. Sharma R, Young C, Neu J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:305879.
117. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* 2007; 1:56-66.
118. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 Suppl 1:4554-4561.
119. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, et al. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9:27-38.
120. Tvede M, Rask-Madsen J. Bacteriotherapy for chronic relapsing *Clostridium difficile* diarrhoea in six patients. *Lancet* 1989; 1:1156.
121. Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, et al. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis* 2008;

- 197:435-438.
122. Khoruts A, Dicksved J, Jansson JK, Sadowsky MJ. Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:354-360.
 123. Grehan MJ, Borody TJ, Leis SM, et al. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:551-561.
 124. Floch MH. Fecal bacteriotherapy, fecal transplant, and the microbiome. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:529-530.
 125. Rohlke F, Surawicz CM, Stollman N. Fecal flora reconstitution for recurrent *Clostridium difficile* infection: results and methodology. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:567-570.
 126. Schwan A, Sjölin S, Trottestam U, Aronsson B. Relapsing *Clostridium difficile* enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. *Scand J Infect Dis* 1984; 16:211-215.
 127. Persky SE, Brandt LJ. Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3283-3285.
 128. You DM, Franzos MA, Holman RP. Successful treatment of fulminant *Clostridium difficile* infection with fecal bacteriotherapy. *Ann Intern Med* 2008; 148:632-633.
 129. Yoon SS, Brandt LJ. Treatment of refractory/recurrent *C. difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44:562-566.
 130. Silverman MS, Davis I, Pillai DR. Success of self-administered home fecal transplantation for chronic *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8:471-473.
 131. MacConnachie AA, Fox R, Kennedy DR, Seaton RA. Faecal transplant for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a UK case series. *QJM* 2009; 102:781-784.
 132. Nieuwdorp M, van Nood E, Speelman P, et al. [Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea with a suspension of donor faeces]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2008; 152:1927-1932.
 133. Russell G, Kaplan J, Ferraro M, Michelow IC. Fecal bacteriotherapy for relapsing *Clostridium difficile* infection in a child: a proposed treatment protocol. *Pediatrics* 2010; 126:e239-242.
 134. Aas J, Gessert CE, Bakken JS. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis* 2003; 36:580-585.
 135. Faust G, Langelier D, Haddad H, et al. Treatment of recurrent pseudomembranous colitis with stool transplantation: Report of six cases. *Can J Gastroenterol* 2002; 16:A43.
 136. Landy J, Al-Hassi HO, McLaughlin SD, et al. Review article: faecal transplantation therapy for gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34:409-415.

137. Kassam Z, Hundal R, Marshall JK, Lee CH. Fecal transplant via retention enema for refractory or recurrent *Clostridium difficile* infection. *Arch Intern Med* 2012; 172:191-193.
138. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1079-1087.
139. Trubiano JA, Gardiner B, Kwong JC, et al. Faecal microbiota transplantation for severe *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25:255-257.
140. Kassam Z, Lee CH, Yuan Y, Hunt RH. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 500-508.
141. Drekonja D, Reich J, Gezahegn S, et al. Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med* 2015; 162:630-638.
142. Brandt LJ, Borody TJ, Campbell J. Endoscopic fecal microbiota transplantation: "first-line" treatment for severe *clostridium difficile* infection? *J Clin Gastroenterol* 2011; 45:655.
143. Gallegos-Orozco JF, Paskvan-Gawryletz CD, Gurudu SR, Orenstein R. Successful colonoscopic fecal transplant for severe acute *Clostridium difficile* pseudomembranous colitis. *Rev Gastroenterol Mex* 2012; 77:40-42.
144. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2011; 53:994-1002.
145. Bowden TA Jr, Mansberger AR Jr, Lykins LE. Pseudomembraneous enterocolitis: mechanism for restoring floral homeostasis. *Am Surg* 1981; 47: 178-183.
146. Gustafsson A, Lund-Tønnesen S, Berstad A, et al. Faecal short-chain fatty acids in patients with antibiotic-associated diarrhoea, before and after faecal enema treatment. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:721-727.
147. Garborg K, Waagsbø B, Stallemo A, et al. Results of faecal donor instillation therapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Scand J Infect Dis* 2010; 42:857-861.
148. McCrea M, Guskiewicz K, Randolph C, et al. Incidence, clinical course, and predictors of prolonged recovery time following sport-related concussion in high school and college athletes. *J Int Neuropsychol Soc* 2013; 19:22-33.
149. Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P, et al. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 1992; 102:875-878.
150. Kullen MJ, Amann MM, O'Shaughnessy MJ, et al. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J Nutr* 1997; 127:89-94.
151. McNulty NP, Yatsunencko T, Hsiao A, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci*

- Transl Med 2011; 3:106ra106.
152. Petrof EO, Gloor GB, Vanner SJ, et al. Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. *Microbiome* 2013; 1:3.
 153. Postigo R, Kim JH. Colonoscopic versus nasogastric fecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a review and pooled analysis. *Infection* 2012; 40:643-648.
 154. EISEMAN B, SILEN W, BASCOM GS, KAUVAR AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 1958; 44:854-859.
 155. Kelly CR, Khoruts A, Staley C, et al. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on Recurrence in Multiply Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2016; 165:609-616.
 156. Kelly CR, de Leon L, Jasutkar N. Fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection in 26 patients: methodology and results. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46:145-149.
 157. Youngster I, Sauk J, Pindar C, et al. Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. *Clin Infect Dis* 2014; 58:1515-1522.
 158. Dutta SK, Girotra M, Garg S, et al. Efficacy of combined jejunal and colonic fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014; 12:1572.
 159. Ilan Youngster, George H. Russell, Christina Pindar, et al. Oral, Capsulized, Frozen Fecal Microbiota Transplantation for Relapsing *Clostridium difficile* Infection. *JAMA* 2014:1772-1778.
 160. Saraiya N, Poeth K, Hirsch B, et al. Fecal microbiota transplant for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection via encapsulated cryopreserved concentrated fecally derived bacteria: A cohort review. Abstract and oral presentation, IDWeek, Philadelphia, PA, October 2014.
 161. Miao CL, Mowery AD, Khara HS, et al. *Difficile* small bowel enteritis after total proctocolectomy successfully treated with fecal transplant. *Am J Gastroenterol* 2014; 109:S442.
 162. De Leon LM, Watson JB, Kelly CR. Transient flare of ulcerative colitis after fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1036-1038.
 163. Borody TJ, Wettstein AR, Hills L, et al. *Clostridium difficile* infection complicating inflammatory bowel disease: pre-treatment and post-treatment findings. Abstract accepted for DDW, San Diego, CA, 17-22 May 2008.
 164. Duplessis CA, You D, Johnson M, Speziale A. Efficacious outcome employing fecal bacteriotherapy in severe Crohn's colitis complicated by refractory *Clostridium difficile* infection. *Infection* 2012; 40:469-472.
 165. Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, Khoruts A. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile*

- infection. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 761-767.
166. Kunde S, Pham A, Bonczyk S, et al. Safety, tolerability, and clinical response after fecal transplantation in children and young adults with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56:597-601.
 167. Borody TJ, Wettstein A, Nowak A, et al. Fecal microbiota transplantation (FMT) eradicates *Clostridium difficile* infection (CDI) in inflammatory bowel disease (IBD). 21st United European Gastroenterology Week 2013, Session: Beneficial and detrimental effects of bacteria in the GI tract, October 15, 2013.
 168. Wang S, Xu M, Wang W, et al. Systematic Review: Adverse Events of Fecal Microbiota Transplantation. *PLoS One* 2016; 11:e0161174.
 169. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology* 2013; 138:1-11.
 170. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:790-801.
 171. Borody T, Fischer M, Mitchell S, Campbell J. Fecal microbiota transplantation in gastrointestinal disease: 2015 update and the road ahead. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 9:1379-1391.
 172. Borody TJ, Warren EF, Leis SM, et al. Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38:475-483.
 173. Khoruts A, Sadowsky MJ, Hamilton MJ. Development of fecal microbiota transplantation suitable for mainstream medicine. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13:246-250.
 174. Lee CH, Steiner T, Petrof EO, et al. Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016; 315:142-149.
 175. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic associated diarrhea. *N Engl J Med*.2002; 346: 334-39.
 176. McFarland LV. Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections – epidemiology and current treatment strategies. *Curr Opin Gastroenterol*.2009; 25: 24-35.
 177. McDonald LC, Owings M and Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*.2006; 12: 409-15.
 178. Heinlen L and Ballard J. *Clostridium difficile* infection. *Am J Med Sci*.2010; 340: 247-52.
 179. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH. et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital based survey. *Lancet*.2011; 377: 63-73.
 180. Lee YC, Wang JT, Chen AC, Sheng WH, Chang SC, Chen YC. Changing incidence and clinical manifestations of *Clostridium difficile*-associated diarrhea detected by combination of glutamate dehydrogenase and toxin assay in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012; 45: 287-95.

181. Ray A, Robert Smith, Jacob Breaux. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium Difficile* infection: The Ochsner Experience. *Ochsner J.* Winter.2014; 14:538-44.
182. Faming Zhang, Wensheng Luo, Yan Shi, Zhining Fan and Guozhong Ji. Should We Standardize the 1,700 Year- Old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol.* 2102; 107:1755-56.
183. Colleen R. Kelly, Lauren de Leon and Niren Jasutkar. Fecal Microbiota Transplantation for Relapsing *Clostridium difficile* Infection in 26 Patients Methodology and Results. *Journal of Clinical Gastroenterology.*2012; 46: 145–49.
184. Rubin TA, Gessert CE, Aas J, Bakken JS. Fecal microbiome transplantation for rectal *Clostridium Difficile* infection: report on a case series. *Anaerobe.*2013; 19:22-26.
185. Grehan MJ, Borody TJ, Leis SM, Campbell J, Mitchell H and Wettstein A. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora. *J Clin Gastroenterol.*2010; 44: 551–61.
186. Brandt LJ and Reddy SS. Fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Clin Gastroenterol.* 2011; 45(Suppl): S159–S67.
187. Garborg K, Waagsbo B, Stallemo A, Matre J, Sundoy A. Results of faecal donor instillation therapy for recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Scand J Infect Dis.* 2010; 42: 857-61.
188. Bang BW, Park JS, Kim HK et al. Fecal Microbiota Transplantation for Refractory and Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Case Series of Nine Patients. *Korean Gastroenterol.*2017; 69:226-31.
189. Gough E, Shaikh H and Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.*2011; 53: 994–02.
190. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol.*2013; 108: 478-98.
191. Miriam L. Boyle, RN, BSN Lisa A et al. Fecal Microbiota Transplant to Treat Recurrent *Clostridium difficile* Infections. *Critical Care Nurse.*2015; 35: 51-63.
192. Guo B, Harstall C, Louie T, Veldhuyzen van Zanten S, Dieleman LA (2012). Systematic review: faecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 35: 865-75.
193. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Health Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.*2010; 31: 431-55.
194. Festi D, Schiumerini R, Birtolo C et al. Gut microbiota and its pathophysiology in disease paradigms. *Dig Dis.* 2011; 29: 518–24.
195. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol.*2012; 107: 1079-87.
196. Mattila E, Uusitalo-Seppala R, Wuorela M et al. Fecal transplantation, through colonoscopy, is effective therapy for recurrent *Clostridium difficile*

- infection. *Gastroenterology*. 2012; 142:490-96.
197. Aas J, Gessert CE, Bakken JS. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: a series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 580-85.
 198. Rao K and Safdar N. Fecal microbiota for the treatment of *Clostridium Difficile* infection. *J Hosp Med*. 2016; 11: 56-61.
 199. Gupta A. and Khanna S. Fecal microbiota transplantation. *JAMA*. 2017; 318:102.
 200. Robles-Alonso V, Guarner F. Gut microbes. *W. Gastroenterol News*, July 2014; 19: 6-11.
 201. Caitriona M. Guinane and Paul D. Cotter. Role of the Gut Microbiota in Health and Chronic Gastrointestinal Disease. *Ther Adv Gastroenterol*. 2013; 6(4):295-308.
 202. Borody TJ, Paramsothy S, Agrawal G. Fecal Microbiota Transplantation: Indications, Methods, Evidence, and Future Directions. *Curr Gastroenterol Rep* 2013; 15(8):337.
 203. Guarner F. What is the role of the enteric commensal flora in IBD? *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Oct;14 Suppl 2:S83-4.
 204. Machiels K, Joossens M, Sabino J. et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014 Aug; 63(8):1275-83.
 205. Sieglinde Angelberger , Walter Reinisch, Athanasios Makristathis et al. Temporal Bacterial Community Dynamics Vary Among Ulcerative Colitis Patients After Fecal Microbiota Transplantation. *The American Journal of Gastroenterology*. 2013; 108(10):1620-30.
 206. Mihaela Laszlo, Lidia Ciobanu, Oliviu Pascu, Vasile Andreica. Fecal transplantation indications in ulcerative colitis. Preliminary study. *Clujul Medical* 2016 Vol. 89 no. 2: 224-28.
 207. Kruiz W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:853-8.
 208. Stephen M, Vindigni, Elizabeth K Broussard, Christina M Surawicz. Fecal Microbiota Transplant and Probiotics for *Clostridium difficile* and Beyond. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 2013; 7(7):615-28.
 209. Mihaela Laszlo, Oliviu Pascu. Full Clinical and Endoscopic Remission Following Fecal Microbiota Transplant with Moderate-Severe Treatment-Resistant Ulcerative Colitis. *Revista J Gastroint Dig Syst* 2014, 4:2
 210. Mihaela Laszlo, Oliviu Pascu, Daniel-Corneliu Leucuta, Vasile Andreica. Fecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridium difficile* infection: the first prospective study of 30 patients in Romania. *Revista Română de Medicină de Laborator* 2018; 2:201-10.
 211. Sahil Khanna , Pritish K. Tosh. A Clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. *Mayo Clinic Proceedings*, January 2014; 89:107-14.
 212. Pam Harrison. Microbiome Opens Door to Brave New World of Therapeutics 2013

- April 03. Available from: <http://www.medscape.com>, April 03, 2013.
213. Zhang F, Luo W, Shi Y, Fan Z, Ji G. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol*. 2012; 107:1755.
 214. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307:1915-20.
 215. Hansen JJ, Sartor RB. Therapeutic Manipulation of the Microbiome in IBD: Current Results and Future Approaches. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2015; 13:105.
 216. Paściak M, Górska S, Jawiarczyk N, Gamian A. Lactobacillus johnsonii glycolipids, their structure and immunoreactivity with sera from inflammatory bowel disease patients. *Microb Biotechnol*. 2016 Oct 21.
 217. Nami Y, Haghshenas B, Abdullah N, Barzegari A, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine. *J Med Microbiol*. 2015 Feb; 64(Pt 2):137-46.
 218. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15:501. Vanderhoof JA. Probiotics and intestinal inflammatory disorders in infants and children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30 Suppl 2:S34-8.
 219. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahrné S, Jeppsson B. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2000 May; 95(5):1231-8.
 220. Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, Müller AR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2002 Jul 15; 74(1):123-7.
 221. McNaught CE, Woodcock NP, MacFie J, Mitchell CJ. A prospective randomised study of the probiotic Lactobacillus plantarum 299V on indices of gut barrier function in elective surgical patients. *Gut*. 2002 Dec; 51(6):827-31.
 222. Mangell P, Thorlacius H, Syk I, Ahrné S, Molin G, Olsson C, Jeppsson B. Lactobacillus plantarum 299v does not reduce enteric bacteria or bacterial translocation in patients undergoing colon resection. *Dig Dis Sci*. 2012 Jul; 57(7):1915-24.
 223. Lorenzo-Zúñiga V, Llop E, Suárez C, Alvarez B, Abreu L, Espadaler J, Serra J. I.31, a new combination of probiotics, improves irritable bowel syndrome-related quality of life. *World J Gastroenterol*. 2014 Jul 14;20(26):8709-16.
 224. Kujawa-Szewieczek A, Adamczak M, Kwiecień K, Dudzicz S, Gazda M, Więcek A. The Effect of Lactobacillus plantarum 299v on the Incidence of Clostridium difficile Infection in High Risk Patients Treated with Antibiotics. *Nutrients*. 2015 Dec 4;7(12):10179-88.
 225. Zhang Y, Li L, Guo C, Mu D, Feng B, Zuo X, Li Y. Effects of probiotic type, dose and treatment duration on irritable bowel syndrome diagnosed by Rome III criteria: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol*. 2016 Jun 13; 16(1):62.
 226. Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L.A., Grenther, W.B., Wyrick, P.B., Tonkonogy, S.L., and Sartor, R.B. (2002). Lactobacillus plantarum 299v in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm. Bowel*.

Dis. Anul 2002, 8: 71-80.

227. Bradley W. Lash, Tami H. Mysliwiec, Hassan Gourama. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology* 22 (2005) 199–204.
228. O'Donnell L, Virjee J, Heaton K. Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. *Br Med J* 1990; 300: 439–40.
229. Sinn DH, Song JH, Kim HJ, Lee JH, Son HJ, Chang DK, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC, Rhee PL. Therapeutic effect of *Lactobacillus acidophilus*-SDC 2012, 2013 in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci.* 2008 Oct; 53(10):2714-8.
230. Hong KS, Kang HW, Im JP, Ji GE, Kim SG, Jung HC, Song IS, Kim JS. Effect of probiotics on symptoms in Korean adults with irritable bowel syndrome. *Gut Liver.* 2009 Jun; 3(2):101-7.
231. Michail S, Kenche H. Gut microbiota is not modified by Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial of VSL#3 in Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2011 Mar; 3(1):1-7.
232. Ki Cha B, Mun Jung S, Hwan Choi C, Song ID, Woong Lee H, Joon Kim H, Hyuk J, Kyung Chang S, Kim K, Chung WS, Seo JG. The effect of a multispecies probiotic mixture on the symptoms and fecal microbiota in diarrhea-dominant irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Gastroenterol.* 2012 Mar; 46(3):220-7.
233. Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L.A., Grenther, W.B., Wyrick, P.B., Tonkonogy, S.L., and Sartor, R.B. (2002). *Lactobacillus plantarum* 299v in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm. Bowl. Dis. Anul* 2002, 8: 71-80.
234. Bradley W. Lash¹, Tami H. Mysliwiec, Hassan Gourama. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology* 22 (2005) 199–204.
235. Gonzalez-Paramas, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J.C. (2004). Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 234–238.
236. D. A. M. Goossens, D. M. A. E. Jonkers, M. G. V. M. Russel, E. E. Stobbering & R. W. Stockbregger. The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 23, 255–263.
237. Koebnick C, Wagner I, Leitzmann P, et al. Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *Can J Gastroenterol* 2003; 17:655-659.