

*Clostridioides difficile* fertőzések kezelési lehetőségei

Doktori (PhD) – értekezés



dr. Varga Adorján Balázs

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: dr. Péterfi Zoltán egyetemi docens

Társtémavezető: dr. Kocsis Béla egyetemi docens

Programvezető: dr. Kerényi Mónika egyetemi docens

Iskolavezető: prof. dr. Reglődi Dóra egyetemi tanár

Pécs

2023

## Tartalomjegyzék

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	3
<b>2. BEVEZETÉS</b> .....	5
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	7
3.1. CDI jelentősége .....	7
3.2. A CDI klinikuma .....	9
3.3. CDI antibiotikus kezelési lehetőségei .....	12
3.4. CDI egyéb kezelési lehetőségei .....	17
3.4.1. Monoklonális antitestek .....	17
3.4.2. A kolonizációs rezisztencia direkt helyreállítása .....	17
3.4.2.1. Széklet-transzplantáció .....	18
3.4.2.2. Baktériumtörzsek .....	20
3.5. Multiomics .....	20
3.5.1. Metagenom .....	21
3.5.2. Proteom .....	22
3.5.3. Rövid szénláncú szabad zsírsavak szerepe .....	22
<b>4. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	23
<b>5. MÓDSZEREK</b> .....	24
5.1. FMT – módszer .....	24
5.1.1. Donor .....	25
5.1.2. Székletminta feldolgozása .....	28
5.1.3. Kapszulák .....	29
5.1.4. Klinikai adatok gyűjtése, kiemelt esetek .....	29
5.1.4.1. Esettanulmányok .....	30
5.2. In vitro túlélés vizsgálata .....	32
5.3. Fehérje vizsgálat .....	33
5.4. SCFA meghatározás .....	34
5.5. Metagenomikai vizsgálat .....	34
5.6. Toxin ellenes antitestek mérése .....	36
5.7. Inzulinszükséglet felmérése FMT-t követően .....	37
<b>6. EREDMÉNYEK</b> .....	38
6.1. Kapszulázás megoldása .....	38
6.2. Klinikai eredmények .....	38
6.3. Csíraszám vizsgálatok eredménye .....	40
6.4. Fehérje vizsgálat eredményei .....	41
6.5. SCFA vizsgálat eredményei .....	47

<b>6.6.</b>	<b>Metagenom vizsgálat (16S rRNS) eredményei.....</b>	<b>51</b>
<b>6.7.</b>	<b>Toxin ellenes antitest eredmények .....</b>	<b>55</b>
<b>6.8.</b>	<b>Inzulinszükséglet vizsgálati eredményei FMT-t követően .....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>MELLÉKLET .....</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>PUBLIKÁCIÓK .....</b>	<b>63</b>
<b>10.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>67</b>
<b>11.</b>	<b>FORRÁSJEJYZÉK .....</b>	<b>68</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**AUC:** Area Under the Curve (görbe alatti terület)

**BMI:** Body Mass Index (testtömeg-index)

**BSA:** Bovin Serum Albumin

**CDI:** *Clostridioides difficile* Infekció

**CFU:** Colony Forming Unit (telepképző egység)

**CU:** Colitis Ulcerosa

**DNS:** DezoxiriboNukleinSav

**ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (enzimhez kötött immunoszorbens analízis)

**ESBL:** Extended-Spectrum Beta-Lactamase (széles spektrumú béta-laktamáz)

**FDR:** False Discovery Rate

**FMT:** Faecal Microbiota Transplant (széklet-transzplantáció)

**GC:** Gas Chromatography (gázkromatográfia)

**IgG:** Immunglobulin G

**LC-MS/MS:** Liquid Chromatography–Mass Spectrometry–Mass Spectrometry (folyadék kromatográfia – tömegspektrometria)

**MIC:** Minimum Inhibitory Concentration (legkisebb gátló koncentráció)

**MOF:** Multi Organ Failure (többszervi elégtelenség)

**NG:** NasoGastricus (orr-gyomor)

**NJ:** NasoJejunális (orr-éhbél)

**OTU:** Operational Taxonomic Unit (operatív rendszertani egység)

**PBS:** Phosphate Buffered Saline (foszfáttal pufferelt sóoldat)

**PBST:** Phosphate Buffered Saline + Tween (foszfáttal pufferelt sóoldat + Tween)

**PCoA:** Principal Coordinate Analysis

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (polimeráz-lánreakció)

**rRNS:** Riboszómális RiboNukleinSav

**RPM:** Round Per Minute (percenkénti fordulat)

**SCFA:** Short-Chain Fatty Acids (rövid szénláncú zsírsav)

**TMB:** TetraMetilBenzidin

**TRIS:** Trisz(hidroximetil)-aminometán

## 2. BEVEZETÉS

A nozokomiális fertőzések (healthcare-associated infections) a betegségek azon csoportja, amely egészségügyi dolgozók jelenléte ellenére, illetve az egészségügyi beavatkozások mellékhatásaként okoz jelentős terhelést a betegeknek és az egészségügyi ellátórendszernek egyaránt. A fertőzés kialakulásának körülményei következtében sok esetben kell már kezdetben is különböző antibiotikum-rezisztenciákkal számolnunk. A *Clostridioides difficile* fertőzés (CDI) az elmúlt évtizedek sokat emlegetett példája ennek a betegségcsoportnak.

A *Clostridioides difficile* baktériumot a klinikai tüneteket mutató páciensek gyakran már a kórházi kezelés kezdete előtt is hordozzák [1]. Kutatások szerint csecsemők bélflórájának is alapvető tagja [2], illetve a CDI-re jellemző tüneteket nem mutató (akár egészséges) populációban sem ritka a hordozása [3]. Ezek szerint tehát olyan nozokomiális fertőzésről beszélünk, amelynek kórokozója leggyakrabban valószínűleg nem a kórházi ellátás során jut be a szervezetbe, hanem a normál bélflóra tagjaként várja, hogy környezete a számára kedvező irányban változzon. Ez a jelenség a klasszikus fertőző betegségekkel szemben a nozokomiális fertőzések körében nem számít ritkaságnak. Kezelésének körülményessége azonban némiképp kiemelkedő helyet biztosít számára e szűkebb betegségcsoporton belül is. A környezetet – a kolonizációs rezisztenciát – baktericid, illetve bakteriosztatikus hatású gyógyszerekkel helyreállítani ugyanis lényegesen nagyobb kihívás, mint ugyanazokkal tönkretenni, leromlott állapotban tartani. Ennek ellenére léteznek nagyon jó hatékonyságú antibiotikumok (például a fidaxomicin), számuk azonban véges, ami azért is jelentős probléma, mert rezisztencia ezek ellen is kialakulhat [4].

Kézenfekvő lehetőség a kolonizációs rezisztencia közvetlen helyreállítása az egészséges bélflórára jellemző baktériumtörzsek, vagy akár rögtön egészséges bélflóra bélrendszerbe juttatásával, mely módszer egyáltalán nem új keletű. Feljegyzések szerint az ókori Kínában is ismerték ezt a módszert [5], de az állatgyógyászatban Európában is évszázadok óta bevett eljárás különböző, bélrendszerrel összefüggő kóros állapotok kezelésében, vagy például szarvasmarhák esetében a tejhozam javítása érdekében [6]. Mindkét megközelítés rendelkezik előnyökkel és hátrányokkal. A teljes bélflóra tulajdonképpen „késztermék”, de ezzel kórokozók átvitele is lehetséges [7, 8], ezért óvatosságra van szükség. A kiválasztott baktériumtörzsek bevitele ebből a szempontból biztonságosnak tekinthető, a bélflóra bonyolult felépítése azonban jelentősen megnehezíti a megfelelő összetétel meghatározását. A két megközelítés közötti verseny kiegyensúlyozottságát remekül jelzi, hogy a két módszer

néhány év különbséggel ért el addig a pontig, ahol már biztonsággal bekerülhetnek a kezelési protokollokba.

Kutatásunk fő célja a már bizonyítottan hatékony székletátültetés kivitelezésének magasabb szintre emelése, ennek részeként a betegek számára elfogadhatóbb, a klinikai gyakorlatban egyszerűbben végrehajtható eljárásá fejlesztése volt. Erre a célra liofilizált széklettel töltött kapszulákat tartottunk legmegfelelőbbnek a tárolás, szállítás és a felhasználás egyszerűsége miatt. A minta-előkészítés ezzel párhuzamosan elkerülhetetlenül bonyolultabbá vált, igyekeztünk ezért a munkafolyamatot úgy alakítani, hogy az egy normál munkaidőben dolgozó munkatárs napi feladatai közé is beilleszthető legyen. Ezek mellett célunk volt a székletátültetés alapjául szolgáló folyamatok vizsgálata is. Ennek érdekében kísérleteket és méréseket végeztünk a donor és a betegek székletében található baktériumflóra, fehérje- és rövid szénláncú szabadzsírsav-összetétel, illetve ezek változásainak vizsgálatára.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

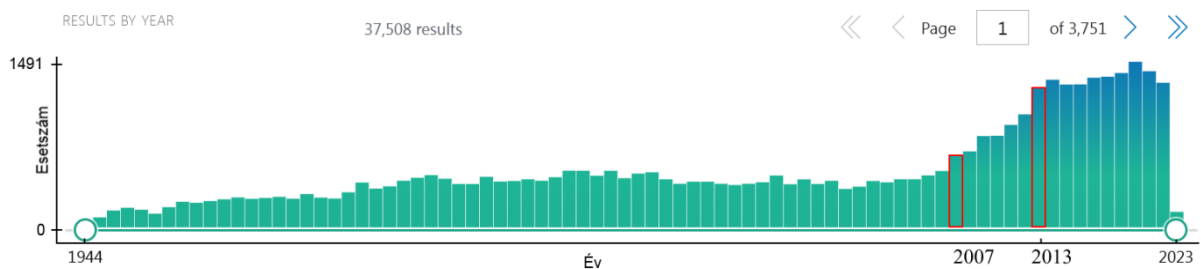
A korábbi nevén *Clostridium difficile*, a legutóbbi taxonómiai átnevezése után *Clostridioides difficile* anaerob spórák baktérium, mikroszkóp alatt pálcá alakú, Gram szerint pozitívan festődik. Spóráképző képességénél fogva ellenáll az általánosan használt felületi fertőtlenítőszernek, emellett a kiszáradást is jól tűri, így hosszabb ideig képes túlélni különböző felületeken [9]. Eltávolításához sporocid hatású fertőtlenítőszer, illetve szappanos kézmosás szükséges [10]. Tünetmentes egyének bélflórájában is gyakran megtalálható. Betegséget jellemzően akkor okoz, ha például antibiotikus kezelés, dysbiosis vagy immunszuppresszió következtében gyengül a bélflóra kolonizációs rezisztenciája. Egészségügyi, vagy ápolási intézményben betegek közötti terjedésének toxintermelő törzsek esetében van kiemelt jelentősége, ezek ugyanis súlyosabb lefolyást okoznak [11]. Kezelésében hagyományosan első lépésben metronidazolt, súlyosabb eset, illetve kiújulás kezelésére vankomicint alkalmaznak. Többszörös kiújulás, vagy nagyon súlyos lefolyás fidaxomicin alkalmazását indokolja [12]. A gyógyszeres terápia lehetőségei között említhető még a nitazoxanid, a rifaximin, a tigecklin és a teikoplanin és egyes monoklonális antitestek (például bezlotoxumab) alkalmazása [13, 14]. Nem gyógyszeres kezelési módszer a székletátültetés, mely a leghatékonyabb CDI elleni gyógyszerek hatékonyságával vetekszik [15]. A közelmúltban megjelent publikációk alapján *Firmicutes* törzsekből készült koncentrátummal (SER-109) is hasonlóan jó eredményeket értek el. [16, 17]

#### 3.1. CDI jelentősége

A CDI kiújulásának gyakorisága, a kórházi ellátás időigénye és költségei nagy terhet rónak az egészségügyi ellátórendszerre. Az Egyesült Államokban 2008-ban csak a járóbeteg ellátást tekintve 4,8 milliárd USD-ba került a CDI kezelése [18]. Betegenként ez körülbelül 3000 USD-t jelentett az első megbetegedés, körülbelül 15000 USD-t a recidívák esetekben [19]. Hazánkban egy 2013-ban megjelent közlemény [20] szerint 130–500 ezer Ft körüli költséggel számolhatunk kórházi esetenként.

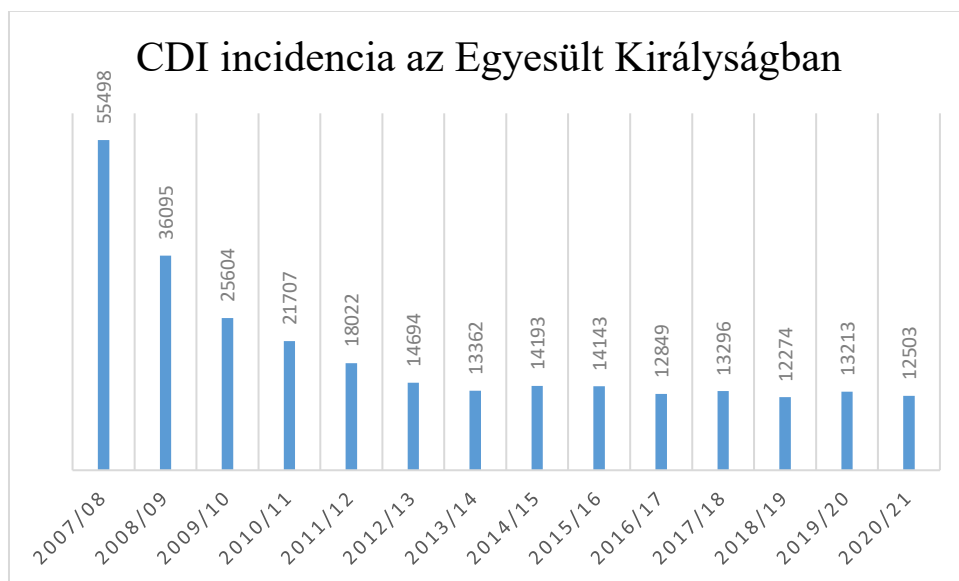
A disszertáció írásának idejében a PubMed adatbázisában a „*Clostridioides difficile* infection” kifejezésre rákeresve növekvő éves publikációs szám látható 2000-től 2014-ig, amelyet egy platófázis követ napjainkig (1. ábra).





1. ábra. A PubMed adatbázisában fellelhető közlemények száma 1944-től 2023-ig.

Ezt párhuzamba állítva az Egyesült Királyság 2007 és 2021 közötti CDI incidencia adataival valószínűsíthető (2. ábra), hogy a publikációs szám növekedésének megszűnése nem a betegség jelenlétének csökkenésével magyarázható. Már-már idealisztikusnak tűnik azt gondolni, hogy a két statisztika együttesen a tudományos munka gyakorlati eredményét szemlélteti – különösen a 2007 és 2013 közötti időszakban. Megjegyzendő, hogy a CDI az Egyesült Királyságban megfigyelt epidemiológiai változásai biztosan nem tükrözik a világ legnagyobb részében zajló folyamatokat.



2. ábra. A CDI incidenciája az Egyesült Királyságban 2007-től 2021-ig.

### 3.2. A CDI klinikuma

A kórlefolyásra több tényező is hatással van. Elsősorban a páciens alapvető egészségi állapota meghatározó: idős, legyengült szervezet, immunszupprimált állapot, hosszabb idejű antibiotikum alkalmazás súlyosabb klinikai tüneteket vetít előre. A *Clostridioides difficile* baktérium egyes törzsei képesek toxintermelésre is (A-toxin, B-toxin és bináris toxin), a 027 ribotípus például 16-szor több A-, és 23-szor több B-toxint termel [21]. E ribotípus a fokozott sporulációja miatt is kiemelkedő, továbbá gyakrabban fejleszt ki antibiotikum rezisztenciát, mindezzel szaporodási előnyt szerezve a többi törzssel szemben.

A betegség kiújulása szintén kedvezőtlen előjel mind a fennálló betegség elmúlása, mind az újabb kiújulások szempontjából. A rekurrens CDI kockázati tényezőit az alábbi felsorolás foglalja össze. [22]

- idős kor
- alacsony szérumalbumin szint
- rossz egészségi állapot, székletinkontinencia
- alacsony A-, vagy B-toxin ellenes immunglobulin titer
- B1/NAP1/027 törzs megléte
- kórházban szerzett CDI
- megelőző műtét
- egyidejű gyomorsavcsökkentő kezelés
- CDI-t követő, *Clostridioides difficilere* nem ható antibiotikus kezelés
- fluoroquinolon alkalmazása

Hatásukat tekintve az A-toxin enterotoxin, a sejtek közötti kapcsolatokat roncsolja, míg a B-toxin és a bináris toxin citotoxinok, a B-toxin támadáspontja a sejtvázat felépítő aktin filamentum. A toxinok együttesen tehát a bélnyálkahártya épségét megbontva váltják ki a tüneteket. A betegség járhat enyhe bélrendszeri tünetekkel, de akár fájdalmas, nyákos (ritkán véres) hasmenéssel is – például álhártya képződéssel járó pseudomembranosus enterocolitis esetében. Kórházi kezelést igénylő formája profúz, gyakori (napi 10-15 alkalmat meghaladó) vizes hasmenéssel jár, mely zöldes, vagy sárgás színű is lehet. Kifejezetten bűzös, jellegzetes szaga szinte diagnosztikus értékű.

Tartós, tünetmentes *Clostridioides difficile* hordozás csökkent kockázati tényezőt jelent CDI kialakulása szempontjából. Ennek hátterében az A- és B-toxin ellenes antitestek

megemelkedett szérumszintjét tartják valószínűnek. Hasonló védő hatás megfigyelhető toxint nem termelő törzsek esetében is mind ember, mind állatkísérletekben [23].

Az alábbiakban röviden összefoglalom a kórkép különböző megjelenési formáit. [3]

Nem súlyos *Clostridioides difficile* asszociált hasmenés és colitis: Endoszkópos, vagy mikrobiológiai vizsgálattal igazolt toxintermelő *Clostridioides difficile* okozta colitis hasmenéssel, szisztémás jelek és tünetek nélkül van jelen. Amennyiben endoszkóposan a vastagbélben nem csak gyulladás, hanem a nyálkahártya felszínén jellegzetes álhártyás hólyagocskák is láthatók, nem súlyos pseudomembranosus colitis áll fenn.

Súlyos pseudomembranosus colitis: Endoszkópos, vagy mikrobiológiai vizsgálattal igazolt toxintermelő *Clostridioides difficile* okozta colitis hasmenéssel, valamint kórházi ellátást igénylő szisztémás jelekkel és tünetekkel. Ilyen szisztémás jelnek tekinthetők a lentebb felsorolt súlyos CDI diagnosztikus kritériumok, illetve a napi 10 alkalomnál gyakoribb hasmenés. Intenzív osztályon kezelt betegnél jelentkező pseudomembranosus colitis minden esetben súlyosnak tekintendő. Az álhártyás colitis kolonoszkópos képe szinte diagnosztikus értékű, azonban például súlyosan immundeficiens, vagy gyulladásos bélbetegségben szenvedőkben ritkán hiányozhat.

Fulmináns pseudomembranosus colitis: Endoszkópos és/vagy mikrobiológiai vizsgálattal igazolt toxintermelő *Clostridioides difficile* okozta, rapidan progresszív colitis, amely életveszélyes szisztémás tünetekkel (magas láz, extrém leukocytosis, hypovolaemia, laktátacidosis, sokk), szervdiszfunkcióval (akut veseelégtelenség, szепtikus encephalopathia, légzési elégtelenség) és toxikus megacolonnal vagy akut hassal szövődik.

Toxikus megacolon: Ileussal vagy subileussal járó akut vastagbél és disztális vékonybél-tágulat, súlyos hasi fájdalommal és szisztémás tünetekkel.

Krónikus CDI: Heteken, hónapokon keresztül fennálló, mikrobiológiai vizsgálattal igazolt toxintermelő *Clostridioides difficile* okozta állapot, amelyet proteinvésztes enteropathiához vezető fertőzéses hasmenés, általános testi leromlás, fogyás, anémia, hypoalbuminaemia, oedema, ascites jellemez. Terápiára nem reagáló esetek természetesen súlyos fertőzésnek minősülnek. Perzisztáló krónikus fertőzésről akkor beszélünk, ha a tünetek folyamatosan fennállnak, rekurrálóról pedig akkor, ha a panaszok kezelésre csökkennek, vagy spontán gyengülnek, majd rövidesen újra visszatérnek.

Rekurrens CDI: jellemzi a legalább három enyhe-mérsékelt CDI epizód és sikertelen 6-8 hetes vankomicin terápia alternatív antibiotikummal (pl. fidaxomicin, rifaximin), vagy anélkül, vagy legalább két súlyos CDI, amely kórházi ellátást igényelt, és szignifikáns morbiditással társul.

Refrakter CDI: standard terápiára (vankomicin) legalább egy hétig nem reagáló mérsékelt CDI-t értünk alatta.

Súlyos CDI-ről akkor beszélünk, ha a fehérvérsejtszám  $\text{mm}^3$ -enként 15000 feletti, a szérumalbumin szint 3g/dl alatti, emellett hasi nyomásérzékenység áll fenn.

Szövődményes CDI: *Clostridioides difficile* fertőzés esetén legalább egy tényező a következők közül: intenzív osztályon történő kezelés szükségessége, hypotensio vasopressor alkalmazása mellett, vagy anélkül,  $38,5^\circ\text{C}$ -t meghaladó testhőmérséklet, ileus, vagy szignifikáns hasi distensio, megváltozott tudatállapot, fehérvérsejtszám  $35000/\text{mm}^3$  felett, vagy  $2000/\text{mm}^3$  alatt, szérumlaktát szint 2,2 mmol/l felett, vagy többszervi elégtelenség (MOF) jelei. [24]

Kutatásunkhoz az alábbi kritériumrendszert használtuk [1]:

- $38^\circ\text{C}$ -t meghaladó láz, hidegrázás
- hemodinamikai instabilitás, vagy szeptikus sokk jelei
- peritonitis tünetei, csökkent bélhangok, hasi nyomásérzékenység
- ileus jelei, hányás, bélmozgások hiánya
- emelkedett fehérvérsejtszám (15 G/l feletti érték)
- a kiindulási értéket több mint 50%-kal meghaladó szérumkreatinin-szint emelkedés
- hypoproteinaemia ( $<6\text{g/dL}$ ), anémia ( $<9\ \mu\text{mol/L}$ )
- emelkedett szérumlaktát szint ( $<0,6\ \text{mmol/L}$ )
- kolonoszkópiával igazolt pseudomembranosus colitis
- képalkotó vizsgálattal igazolt bélfali megvastagodás, a bélfal körüli zsírszövet megvastagodása, vagy más okkal nem magyarázható ascites
- röntgenvizsgálattal igazolt, 6 cm-t meghaladó vastagbél-tágulat
- balra tolt vérkép, az éretlen neutrophil granulocyták aránya 20% fölötti

### 3.3. CDI antibiotikus kezelési lehetőségei

#### A CDI kezelésében használható antibiotikumok:

A metronidazol a nitroimidazol antibiotikumok közé tartozik. Anaerob baktériumokkal szemben baktericid hatással rendelkezik, célpontja a nukleinsav szintézis, ezáltal akadályozza a bakteriális DNS megkettőződését. Szájon át, és parenterálisan is adható. Habár enyhe és mérsékelt fertőzésben jelenleg is hatékony, több közlemény is növekvő sikertelenségi arányokról és a tünetek lassabb oldódásáról számol be. Súlyos fertőzésekben vankomicinhez viszonyított hatékonyságáról megoszlanak a vélemények, egyes vizsgálatok szerint elmarad attól, mások szerint nincs szignifikáns különbség közöttük. A metronidazol per os alkalmazva nagyon jól felszívódik a tápcsatornából. Tünetmentes *Clostridioides difficile* hordozók székletében koncentrációja nulla, de hasmenés esetében is csak szerény mennyiségben mutatható ki a faecesből. Fenti tulajdonságai alapján nem ideális választás vastagbélre lokalizálódó fertőzések esetében, emellett egyes beszámolók magasabb minimális inhibitoros koncentrációt (MIC) mértek klinikai izolátumokkal. Összegzésként megállapítható, hogy a metronidazol tartalmú gyógyszerek jelenleg is elterjedten alkalmazott készítmények, aminek háttérében enyhe és mérsékelt CDI-ben mutatott hatékonyságuk és aránylag alacsony anyagi vonzatuk áll [26].

A vankomicin triciklikus glikozilált nem-riboszómális peptid, melyet a természetben az *Amycolatopsis orientalis* termel. A peptid a bakteriális sejtfalszintézist gátolja. Intravénás készítményekben alkalmazott hatóanyag, mely továbbra is jó eredményeket mutat CDI-ben. Normál dózisban adva a *Clostridioides difficile*vel szemben szükséges MIC értéket többszörösen meghaladja a székletben, a dózis emelésével nem javítjuk az antibakteriális hatását. A már említett hatékonyság mellett több szerző is 20%-os recidíva arányról számol be. Ennek háttérében a vankomicin természetes flóra visszatértét késleltető hatása és a visszamaradó *Clostridioides difficile* spórák germinációja állhat. CDI-ben történő alkalmazása ellen szól, hogy más patogének rezisztens törzseinek elszaporodását okozhatja a bélrendszerben (például *Enterococcus* és *Staphylococcus* törzsek). Összegzésként elmondható, hogy mivel szisztémás betegségekben is gyakran alkalmazott hatóanyag, elméletileg nem tekinthető ideális választásnak CDI kezelésében más rezisztens patogén baktériumok kisselektálódása miatt. [26]

A fidaxomicin makrociklusos antibiotikum, melyet fermentáció útján állítanak elő. Baktericid hatású, in vitro körülmények között alacsonyabb MIC-vel rendelkezik *Clostridioides difficile*

törzsekkel vizsgálva (beleértve a NAP1/B1/027 ribotípust), mint a metronidazol, vagy a vankomicin. [24] Hatásmódját tekintve az RNS polimerázzal interferálva a transzkripció gyors elnyomása (és így a bakteriális fehérjék képződésének gátlása) révén a DNS szintézist akadályozza. Hatásának módja és helye eltér a rifamycinekétől, így még nem tapasztaltak átfedő rezisztenciát a két csoport között. [27]

Szűk hatásspektrumának magyarázata az, hogy potensebben nyomja el a clostridiális RNS polimerázt mint más baktériumfajokét (Gram negatívokkal szemben például hatástalan.) Körülbelül 10 órás post-antibiotikus hatással rendelkezik, ami lehetővé teszi a napi kétszeri adagolást. A vankomicinhez hasonlóan, per os adva a fidaxomicin sem szívódik fel a bélrendszerből, így a hatás helyén a *Clostridioides difficile*vel szemben egyszerűbben elérhető a MIC. Szűk hatásspektrumából következően kevésbé károsítja a mikrobiom diverzitását, ezáltal mellékhatás-profilja is kedvezőbb. Lehetővé teszi a kolonizációs rezisztencia gyors helyreállítását, amely védelmet biztosít az újrafertőződéssel szemben. Megfigyelték toxintermelést csökkentő hatását is. Négy (közöttük két hipervirulens NAP-1) *Clostridioides difficile* törzset vizsgálva 60%-ot meghaladó csökkenést mértek, emellett a sporulációra is hasonló hatással volt. Előbbi jelenség a klinikai tünetek javulásáért, utóbbi a recidíva gyakoriságának csökkenéséért lehet felelős, de felmerült a kórházi körülmények közötti terjedés gátlása is, mint következmény.

Biztonságosságát tekintve nem tapasztalható eltérés súlyos mellékhatások tekintetében vankomicinnel összehasonlítva. Mindkét készítmény rossz felszívódási értékekkel rendelkezik, magas (körülbelül 1g/kg/nap) dózis alkalmazása mellett sem találtak toxicitásra utaló jeleket. Elenyésző számban találtak anémiát és leukopaeniát vankomicin és fidaxomicin kezelésben részesülő betegeknél. Ennek hátterében azonban nem-klinikai vizsgálatok során nem sikerült specifikus csontvelő károsító hatást kimutatni. A leukopaenia létrejötté fidaxomicin esetében 2%-ban, vankomicin esetében 1,9%-ban okozott halálos kimenetelű fertőzést. Rekurrens CDI előfordulását csökkentő hatása a relapszus szempontjából legnagyobb rizikójú betegcsoportban költséghatékonyá teszi [28].

Az alábbi antibiotikumok nem részei sem a magyarországi, sem az ESCMID ajánlásának, azonban szintén hatékonyak bizonyultak CDI kezelésében.

A nitazoxanid a thiazolidok csoportjába tartozik. Hatékonyságát tekintve *Clostridioides difficile*vel szemben a vankomicinhez mérhető. Refrakter, vagy rekurrens esetben tartják

lehetséges választásnak, azonban használatát a kevés bizonyíték és a magas költség akadályozza.

A rifaximin a gasztrointesztinum-szelektív rifamicin csoportba tartozó antibiotikum széles spektrumú antibiotikus aktivitással, azonban csupán elhanyagolható hatású a normál bélflórára, emellett in vitro kiváló eredményeket tud felmutatni *Clostridioides difficile*vel szemben. Rutinszerű alkalmazását akadályozza a *Clostridioides difficile* rezisztencia potenciálja.

A tigeciklin intravénásan adható tetraciklin származék, számos multirezisztens kórokozóval szemben hatékony.

A teikoplanin több, azonos glikopeptid törzssel rendelkező, major és minor komponensből álló készítmény, mely szintén jó eredményeket mutat. Elérhetősége és magas költsége korlátozzák alkalmazását.

A ridinilazol egy benzimidazol-származék, hatékonysága CDI-ben meghaladja a vankomicinét [29]. Jelenleg összehasonlító vizsgálata zajlik fidaxomicinnel szemben [30]. A CDI kezelésére kidolgozott hazai (Országos Epidemiológiai Központ Módszertani Levele 2016) [25] és az Európai Klinikai Mikrobiológiai és Infektológiai Társaság (ESCMID 2021) protokollja [12] közötti szembetűnő eltérés az, hogy az ESCMID szerint már az első CDI fertőzésben is fidaxomicin az elsőként választandó kezelés; metronidazolt csak más lehetőség híján, első fertőzésben, illetve súlyos CDI-ben kombinációban javasol. Kórképtől függően mindkét ajánlás tartalmaz antibiotikummal és anélkül történő kezelési módokat (1. és 2. táblázat).

CDI típusa	Beteg jellemzői	Kezelés módja
<b>Enyhe, középsúlyos CDI</b>	Beteg rekurráló infekcióra hajlamosító <u>rizikófaktor nélkül</u>	Metronidazol 3x500 mg per os 10 napig vagy Vancomycin 4x125 mg per os 10 napig, ha a metronidazol kontraindikált, a beteg nem tolerálja vagy a kezelés sikertelennek tűnik  Megjegyzések: Ebben az esetben a metronidazol és a vancomycin terápiás hatékonysága között nincs különbség. A metronidazolra adott terápiás válasz időtartama hosszabb, mint a vancomycin kezelésé. Amennyiben a per os metronidazol kezelés valamilyen okból nem lehetséges, per os vancomycin adása javasolt, miután az intravénásan adott metronidazol önmagában kevésbé hatékony.
	Beteg rekurráló infekcióra hajlamosító <u>rizikófaktorral</u>	Vancomycin 4x125 mg 10-14 napig vagy Fidaxomicin* 2x200 mg per os 10 napig  Megjegyzések: <b>Rekurráló infekcióra hajlamosító rizikófaktorok:</b> 65 évnél magasabb életkor, korábbi CDI az anamnézisben, egyidejű antibiotikum használat, súlyos alapbetegség, egyidejű protonpumpa kezelés, súlyos klinikai képpel kezdődő CDI.
<b>Súlyos, de nem komplikált CDI</b>	Beteg rekurráló infekcióra hajlamosító <u>rizikófaktor nélkül</u>	Vancomycin 4x125 mg 10-14 napig  Megjegyzés: A vancomycin dózisát meg lehet emelni 4x500 mg-ra is, de ezt a gyakorlatot alátámasztó evidencia nincs.
	Beteg rekurráló infekcióra hajlamosító <u>rizikófaktorral</u>	Vancomycin 4x125 mg per os 10-14 napig vagy Fidaxomicin* 2x200 mg 10 napig  Megjegyzés: A fidaxomicin kezelés a vancomycinhez képest mintegy 20%-kal alacsonyabb relapsus rátával jár. Ez a különbség nem mutatható ki a 027 PCR ribotípus okozta infekciók esetében.

\*Tértésmentesen csak támogatott indikációkban adható, infektológus dokumentált véleménye alapján.

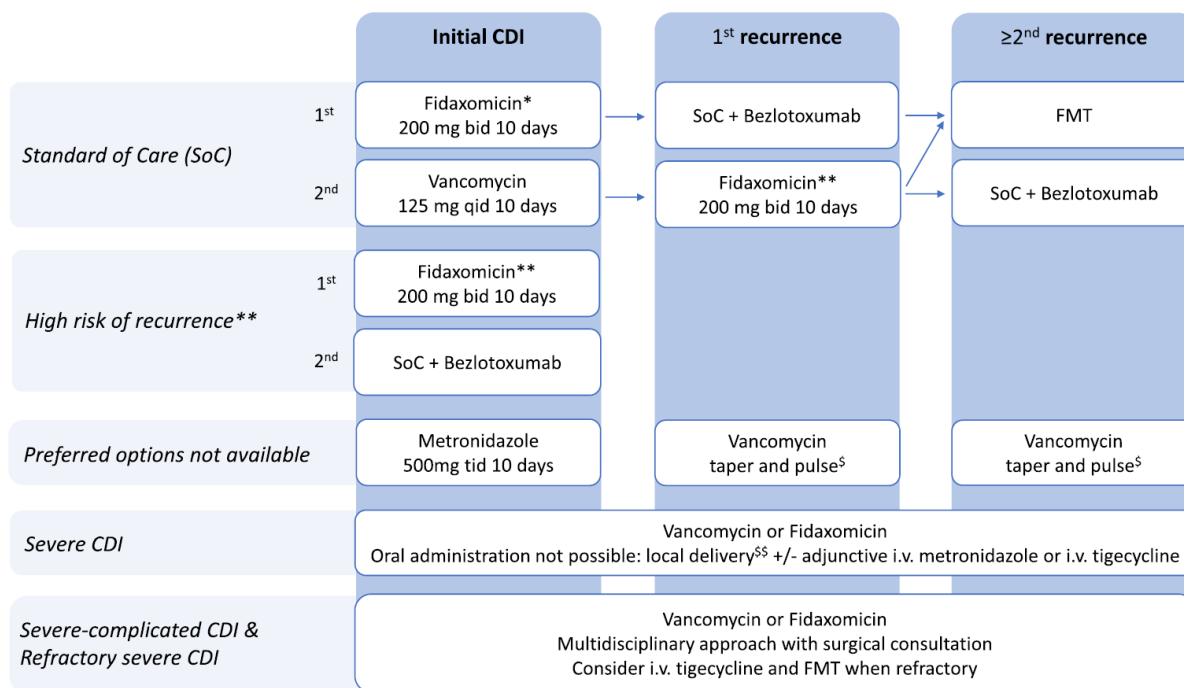
## 1. táblázat. A *Clostridioides difficile* infekció kezelése az Országos Epidemiológiai Központ Módszertani Levele alapján 2016-ban. (1/2)

CDI típusa	Kezelés módja
<b>Súlyos, komplikált CDI</b>	Vancomycin 4x125-500 mg per os vagy gyomor-duodenum szondán át és/vagy Vancomycin per rectum (4x 500 mg vancomycin 500 ml salinában vagy beöntő folyadékban) és Metronidazol 3x500 mg intravénásan és Tigecyclin 2x50 mg intravénásan (alkalmazása önmagában is megkísérélhető)  Megjegyzés: A tigecyclin alkalmazása több obszervációs vizsgálat kedvező eredménye alapján javasolt.  és megfelelő indikáció esetén (colon perforatio, progrediáló, az alkalmazott antibiotikum kezelésre nem reagáló súlyos septikus állapot, megacolon, ileus, akut has) sebészeti intervenció javasolt.  Megjegyzés: Az utóbbi évek klinikai tapasztalatai alapján korai műtét javasolt, még mielőtt a colitis igen súlyossá válna. A műtét indikációját jelenti a fenti klinikai kép mellett a szérum laktát megemelkedése 5mmol/l fölé. A colectomia alternatíváját jelentheti a diverting loop ileostomia, amely lehetővé teszi a colon lavage-t az antibiotikum kezelés mellett.
<b>Első, rekurráló CDI</b>	Metronidazol 3x500 mg 10 napig vagy Vancomycin 4x125 mg 10 napig vagy Fidaxomicin* 2x200 mg 10 napig  Megjegyzés: A fidaxomicin akkor választandó, ha a beteg alapbetegségei és állapota miatt további relapsusok várhatók.
<b>Többszörös, rekurráló CDI</b>	Vancomycin 4x125 mg 1-2 hétig, majd fokozatosan leépítve 6-7 héten keresztül (intermittáló vagy fokozatosan csökkentő dózisú leépítéssel) vagy Fidaxomicin* 2x200 mg vagy Széklet transzplantáció

\*Tértésmentesen csak támogatott indikációkban adható, infektológus dokumentált véleménye alapján.

## 1. Táblázat. A *Clostridioides difficile* infekció kezelése az Országos Epidemiológiai Központ Módszertani Levele alapján 2016-ban. (2/2)





\* Risk stratification for risk of recurrence may be applied for selective use of fidaxomicin in case of limited access or resources.

\*\* Consider extended fidaxomicin: 200 mg bid on day 1-5, 200 mg q48h on day 7-25. Most important risk factor for recurrence is age >65-70 years. Additional risk factor(s) to consider are healthcare-associated CDI, prior hospitalization ≤ 3 months, prior CDI episode, continued non-CDI antibiotic use, and PPI therapy started during/after CDI diagnosis. The risk of recurrence is assumed higher with more risk factors present.

§ Vancomycin taper and pulse: 2 weeks 125 mg qid, followed by 1 week 125 mg bid, then 1 week 125 mg qd, then 1 week 125 mg q48h, and finally 125 mg q72h for 1 week.

§§ Rectal or nasoduodenal delivery

2. táblázat. A Clostridioides difficile infekció kezelése – az ESCMID ajánlása 2021-ben.

### **3.4. CDI egyéb kezelési lehetőségei**

Míg antibiotikumokkal a kórosan elszaporodott baktériumot (is) megcélözva próbáljuk helyreállítani a normál bélflórát, addig az alábbiakban összefoglalt módszerek a *Clostridioides difficile* toxinjainak semlegesítésén (monoklonális antitestek), vagy az egészséges mikrokörnyezet újbóli megteremtésén (FMT, baktériumtörzsek) keresztül fejtik ki hatásukat. A baktériumot célzó direkt módszerként említhető még a bakteriofág terápia, amelyről számos közlemény jelent meg a közelmúltban [31-33].

#### **3.4.1. Monoklonális antitestek**

A bezlotoxumab egy monoklonális antitest, mely a *Clostridioides difficile* B toxinjához kötődik. Antibiotikus kezeléssel kombinálva 10-20%-kal csökkenti a recidíva fellépésének valószínűségét [13, 34]. Jobbszívfél-elégtelenségben is szenvedő betegek körében növelte a mortalitást [14], ezért ebben a betegcsoportban csak külön rizikómérlegelést követően szabad alkalmazni. Drágább a fidaxomicinnél, néhány kutatás azonban még így is költséghatékonynak találta [35-37].

Az actoxumabot eddig csak állatkísérletben, bezlotoxumabbal kombinálva találták hatékonynak a normál flóra helyreállításában [38].

#### **3.4.2. A kolonizációs rezisztencia direkt helyreállítása**

Az alábbi eljárások az egészséges mikrobiom helyreállításán keresztül szüntetik meg a *Clostridioides difficile* szaporodási előnyét. Az antibiotikumok ugyan elpusztítják a vegetatív állapotban lévő baktériumokat, a spórákra azonban nincsenek hatással. Megemlítendő, hogy bár a válogatott baktériumtörzsek esetében elenyésző mértékben számolhatunk a normál székletben található egyéb, esetleg CDI-ben hasznos alkotóelemekkel, a beadott baktériumok metabolitjai ebben az esetben is hozzájárulnak a mikrokörnyezet helyreállításához. A kolonizációs rezisztencia direkt helyreállításának fontos eleme az antibiotikumok hatásával összevetve, hogy a terápiát követően nem több ponton meggyengített, hanem diverz flóra marad hátra.

### 3.4.2.1. Széklet-transzplantáció

Első európai alkalmazása az állatgyógyászatban történetesen, Fabricius Aquapendente (1533-1619) itáliai anatómus transzfaunációnak nevezve írta le. Egyes források szerint már negyedik századi kínai leírások is említik a módszert [39]. Pseudomembranosus colitis terápiajában történő felhasználásáról először 1958-ban jelent meg közlemény [40], és azóta számos vizsgálatban bizonyult hatékony és biztonságos eljárásnak [41]. Jelenleg rekurrens CDI esetén képezi a terápiás eszköztár részét [42]. Metaanalízisek alapján 90%-os gyógyulási ráta érhető el alkalmazásával.

Az ideális donorok pontos ismérvei nem tisztázottak. Alapvetően a beteggel közeli kapcsolatban álló, egészséges, anamnézise és szűrővizsgálati eredményei alapján fertőző betegséggel nem rendelkező személyeket kérnek fel donációra. Kizáró tényező az elmúlt három hónap során zajlott antibiotikus kezelés, a gastroenterológiai-, vagy autoimmun betegség, a metabolikus szindróma, a krónikus fájdalom szindróma, illetve a kórelőzményben szereplő neurológiai betegség [43]. A fertőzésátvitel lehetőségének csökkentése érdekében bizonyos rizikócsoportokba (droghasználat, promiszkuitás) tartozó jelöltek is kizárásra kerülnek. Emellett a székletminták általános bakteriológiai, parazitológiai és *Clostridioides difficile* toxin vizsgálata, és a szérumminták HIV-1, HIV-2, EBV, CMV, hepatitis-A, -B, -C, *Treponema pallidum* irányú szűrése is rutinszerűen megtörténik [15]. A SARS-Cov-2 okozta járvány megjelenése újabb kihívás elé állította az egészségügyet. Mivel a székletben a vírus RNS a gyógyulást követően is sokáig kimutatható, a donorok szűrésére protokollokat dolgoztak ki [44-46].

Jelenleg négy különböző módon végeznek széklet transzplantációt. Végezhető rektális alkalmazással, de újabb közlemények nasogastricus (NG) és nasojejunalis (NJ) szondán át történő bejuttatást is hasonlóan hatékonynak mutatják. Az előnyök és hátrányok mérlegelése és a beteg kívánsága határozza meg az adott esetben használt módszert. NJ-szondák esetében képerősítő segítségével bizonyosodhatunk meg a szonda megfelelő helyzetéről, míg NG szondánál egyszerűbb eszközzel, fonendoszkóppal is elvégezhető a szükséges ellenőrző vizsgálat. Az erre a célra előkészített mintákat tárolhatjuk fagyasztva (akár -20°C-on) későbbi felhasználás céljából [15]. További lehetőség a kutatásunk fő témáját is jelentő kapszula bejuttatás. Ezen belül is lehetséges fagyasztott széklettel töltött kapszulák [47], és liofilizált inokulummal töltött kapszulák alkalmazása [48].

Esetsorozatok vizsgálatából kitűnt a széklet transzplantátumok hatékonysága rekurrens CDI-ben, beleértve a többszörös recidívákat követő újabb relapszus prevencióját is [15].

A beavatkozás sikertelenségének hátterében súlyos CDI fennállását, kórházi kezelést, többszöri CDI-asszociált kórházi felvételt valószínűsítene [49]. A hivatkozott közlemény érdekes adatként említi, hogy immunuszupprimált állapot és IBD fennállása nem növelte a korai (1 hónapon belüli) sikertelenség esélyét. Más források szerint azonban gyulladásoos bélbetegségben rendre alacsonyabb az FMT hatékonysága, például colitis ulcerosa betegségcsoportban 22%, Crohn betegség esetén 61% került csak remisszióba. Ennek hátterében állhat a mikrobiom megváltozott összetétele, a vizsgált betegcsoport több szempontból is nagymértékű heterogenitása, de a jelenséget magyarázhatják a donorszelekció eltérései, továbbá egyéb különbségek a kezelési módokban [43].

Az IBD kapcsán szükséges megemlíteni a CDI-n túli egyéb indikációkat is. A mikrobiom valószínűleg fontos szerepet játszik irritábilis bélbetegségben [50], elhízásban, metabolikus szindrómában és cukorbetegségben [51]. A jelenség pontosabb megértése és az FMT-ben rejlő további lehetőségek felderítése érdekében jelenleg is zajlanak vizsgálatok.

CDI-ben a székletátültetés alkalmazását a Magyar Epidemiológiai Társaság Módszertani Levele (1. táblázat) jelenleg többszörös, rekuráló fertőzésben, az ESCMID (2. táblázat) pedig súlyos komplikált és refrakter fertőzés esetén javasolja [25].

A minimális mellékhatások ellenére több tényező is korlátozza az FMT alkalmazását. A legjelentősebbek a páciensek ellenérzései, az alacsony, de létező patogénátvitel veszélye és a kontaminált vékonybél szindróma kialakulásának lehetősége orális útvonal esetén. A lehetséges szövődmények közé tartoznak az alkalmazott módszertől függően a kolonoszkópia által okozott bélperforáció (melynek rizikóját a lokális gyulladás növeli), illetve NG, vagy NJ szonda alkalmazása esetén a hányás és az azt követő aspiráció, amely tüdőgyulladásához vezethet.

### 3.4.2.2. Baktériumtörzsek

A széklet mikrobiom összetettsége jelentősen megnehezíti egy minimálisan szükséges készítmény előállítását. A székletben található vírusok száma nagyságrendekkel haladja meg a baktériumokét, de nem szabad figyelmen kívül hagyni a gombákat, a fágokat és az egyéb szerves vegyületeket, melyek lehetnek mikroorganizmusok metabolitjai, a bevitt táplálék részei, vagy az emberi szervezet által termelt anyagok [52]. Ezek kölcsönhatásaira példa az epesavak és a különböző baktériumok kapcsolata. A konjugált epesavak (cholsavszármazékok) segítik a *Clostridioides difficile* spóráinak germinációját, míg a (például *Firmicutes* törzshöz tartozó) baktériumok által dekonjugált epesavak gátolják azt [53, 54]. Ez a jelenség valószínűsíti, hogy a *Firmicutes* törzsbe tartozó fajok felelősek lehetnek az FMT CDI ellenes hatásáért. Ezt a feltevést kutatások is alátámasztották. Megfigyelték ugyanis, hogy FMT-t követően nőtt a *Firmicutes* törzs *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* és hasznos *Clostridiaceae* családjaiba tartozó baktériumok mennyisége, melyet gyógyulás kísért [55]. *Firmicutes* törzseket azonosítottak a bélrendszer butirát-termelésének hátterében is [56]. Spóraképző tulajdonságukat kihasználva egyszerűbben készíthető belőlük tisztított, szájon át adható koncentrátum, mint a *Bacteroidetes* törzsbe tartozó baktériumokból, amelyek szintén a normál bélflóra domináns részei. A közelmúltban jó eredményeket értek el egy SER-109 nevű készítménnyel, amelyet a fentieknek megfelelően, egészséges donorok székeltéből állítanak elő [16, 17].

### 3.5. Multiomics

A mikrobiom az emberi szervezet része, azzal szimbiózisban működő élő rendszer. Élő és élettelen alkotóinak száma mind mennyiségét, mind diverzitását tekintve meghaladja saját testi sejtjeinkét [57, 58]. A széklet mikrobiom vizsgálata több szinten is nehézségekbe ütközik. Már a mintavétel helye befolyásolja az eredményt; a vakbél és a végbél baktériumflórája között jelentős eltérés van, amely persze a mintában található metabolitokra is befolyással bír. A táplálkozás szintén okozhat eltéréseket, ezen kívül a minta tárolása és feldolgozása is hatással lehet az eredményekre. A béltartalom összetettsége egyúttal rengeteg információt is jelent, melynek feldolgozása komoly informatikai háttérrel igényel.

### 3.5.1. Metagenom

Metagenomikai vizsgálatok segítségével meghatározható egy mintában a mikroba-összetétel függetlenül attól, hogy az adott organizmus tenyésztendő-e, vagy sem. Elsősorban kvalitatív meghatározásra alkalmas ez a módszer és remekül követhető általa például a recipiens flóra változása FMT hatására.

Az *Akkermansia muciniphila*, egy nehezen tenyésztendő baktérium azonosítása is szekvenálás segítségével történt. Egészséges egyénben a bélflóra baktériumfajai közül a legnagyobb (akár 5%) részarányban ez a baktérium fordul elő [59]. Érdekes dinamikát írtak le az esetben: jelenléte alapvetően fordítottan arányos az elhízás mértékével [60-64], a gyulladással kapcsolatos paraméterekkel [65], az inzulin-rezisztenciával és a glükóz-intoleranciával [66]. Ugyanakkor a kettes típusú cukorbetegségben leggyakrabban alkalmazott metformin, vagy például a gyomor-bypass műtét jelentősen növelte a bélrendszerben ennek a baktériumnak részarányát, mely így elérte akár a 20%-ot [67-70]. Hatásának hátterében egy, a baktérium külső membránján található fehérjét (Amuc\_1100) valószínűsítettek, melynek immunmoduláns hatását írták le [71, 72].

A példa jól mutatja a metagenomika (gyógyszeres, vagy egyéb beavatkozások hatására bekövetkező metabolikus válaszok) jelentőségét a megfigyelések értelmezésében.

Széklelet-metagenomikai vizsgálatok számos vírus azonosításához is vezettek (**virom**), és kijelenthető, hogy a CDI-ben látható dysbiosis a viromot is érinti [73]. Bár FMT előtti szűrővizsgálatként továbbra sem életszerű a módszer alkalmazása, a mikrobiom működésének megértésében nélkülözhetetlen a virális elemek szerepének felderítése.

A bakteriofágok indirekt módon valószínűleg már jelenleg is részét képezik a CDI elleni terápiás eszköztárnak, hiszen FMT során elkerülhetetlenül megtörténik ezek átvitele is. Pontos szerepük nem ismert, felmerül azonban *Clostridioides difficile* ellenes fágok jelentősége. Egy közlemény szerint [73] CDI-ben emelkedik a *Caudovirales* rendbe tartozó fágok száma, azonban csökken mind a diverzitás, mind a különböző fajok száma. További megfigyelés volt, hogy amennyiben a donor széklete több *Caudovirales* fajt tartalmazott, mint a recipiensé, hatékony volt az FMT. Egy másik közlemény [74] szerint az FMT-n átesett betegek viromja akár 12 hónapig hordozta a donor viromjára jellemző jegyeket.

### **3.5.2. Proteom**

A proteomika segítségével átfogóan azonosítható és számszerűsíthető egy minta fehérje-összetétele, míg a metaproteomika a szervezet, illetve a bélflóra által szintetizált fehérjék azonosítását teszi lehetővé. Mindkét eljárás rendkívül erőforrás-igényes, léteznek azonban hatékony protokollok [75].

Egy metaproteomikai vizsgálat szerint egy egér székletére optimalizált LC-MS/MS (liquid chromatography–mass spectrometry–mass spectrometry) protokollt alkalmazva 18000 nem-redundáns peptidet azonosított, melynek 93%-a mikroba-eredetű volt. Ezek forrásaként több mint 600 mikrobafajt és 250 fehérje-családot azonosítottak [76]. Egy másik lehetőség a nyálkahártya-lavage vizsgálata. Egy kutatás 63%-nyi emberi, és 30%-nyi bakteriális peptidet talált ilyen mintákban [77]. Összehasonlításként, emberi székletmintákból történt fehérje izolálás során a humán eredetű fehérjék részaránya csak 30%-osnak mutatkozott egy publikáció szerint [78]. A fenti adatok remekül szemléltetik, milyen mértékben befolyásolja a mintavétel módszere és helye a kapott eredményeket.

### **3.5.3. Rövid szénláncú szabad zsírsavak szerepe**

A rövid szénláncú szabad zsírsavak (short-chain fatty acids – SCFAs) szerepe még nem tisztázott, azonban több kutatás is protektív hatásukat feltételezi [79]. Különösen a butirát (vajsav) tűnik fontosnak a bélflóra egészséges működésében [56, 80]. Pontos szerepük továbbra is kérdés. Lehetnek feltételei az egészséges mikrobiomnak, vagy termékei annak (több kutatás is hasznosnak találta a butiráttermelő fajokat) [81]. Vizsgálatuk tömegspektrometriával történik, alacsony molekulatömegük azonban megnehezíti a „háttérzajtól” való elkülönítésüket.

#### 4. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezés fő témája az általunk kidolgozott munkafolyamat, amely során a korábbi protokollunkban is használt szuszpenzió adagokat liofilizáljuk, kapszulákba töltjük, majd a felhasználásig fagyasztoóban tároljuk. Célunk a tárolhatóság, a tolerálhatóság és az eljárás rugalmasságának javítása volt.

A liofilizált székletet tartalmazó kapszulák hatékonyságának vizsgálatán túl az alábbi kérdésekre igyekeztünk választ találni:

- Csökken-e a gyógyulási arány, ha csak a szuszpenzió felülúszóját, vagy csak üledékét használjuk?
- Milyen hatása van a tárolási időnek és hőmérsékletnek a mintákban található baktériumok túlélésére?
- Milyen hatása van a liofilizálásnak a minták protein- és rövid szénláncú szabadzsírsav tartalmára?
- Milyen változások figyelhetők meg a betegek székletmintáiban a széklet transzplantációt követően protein- és rövid szénláncú szabadzsírsav összetétel, illetve metagenom tekintetében?
- Milyen eltérések figyelhetők meg egészséges és *Clostridioides difficile* fertőzés miatt kezelt betegek bélflórájának protein- és rövid szénláncú szabadzsírsav összetétele között?
- Milyen prediktív értékkel bír a *Clostridioides difficile* A, illetve B toxinja ellen termelődött IgG szintje a recidívára vonatkozóan?
- Milyen arányban csökken kettes típusú cukorbetegség körében széklet transzplantációt követően az inzulinszükséglet?



## 5. MÓDSZEREK

Kutatásunk fő iránya a székletátültetés gyakorlati alkalmazási módjának továbbfejlesztése volt. (1) Elsősorban egy hatékony kapszulázási protokollt akartunk létrehozni. (2) Ezzel párhuzamosan azt kívántuk vizsgálni, hogy elégséges-e CDI-ben egy baktériummentes (illetve lényegesen csökkentett csíraszámmal rendelkező) felülúszó beadása. Korábbi kiváló eredmények birtokában a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ I. számú Belgyógyászati Klinika Infektológia Tanszék CDI miatt kezelt betegeit vontuk be a vizsgálatba. (3) A klinikai vizsgálat mellett 4 betegről, a donortól és további 5 egészséges egyéntől kapott mintákon metagenomikai, fehérje- és zsírsavprofil vizsgálatokat végeztünk. A donortól kapott mintákat túlélési vizsgálatnak is alávetettük. A 4 beteg kiválasztásának kritériuma az volt, hogy a tervezett mérések (elsősorban a metagenomikai vizsgálat) időpontjában álljon rendelkezésünkre transzplantáció előtti és utáni minta.

(4) Korábbi vizsgálataim során retrospektív módon felmértem, hogy az egyidejűleg cukorbetegség miatt inzulinkezelésben részesült betegcsoportban milyen arányban volt szükség FMT-t követően az inzulin dózis módosítására. (5) Ezzel párhuzamosan vizsgáltam a *Clostridioides difficile* A-, és B-toxin ellenes antitestek szintje és a recidíva kialakulása közötti kapcsolatot.

### 5.1. FMT – módszer

FMT-t az aktuális kezelési ajánlásnak megfelelő esetekben alkalmaztunk. A disszertációban közölt eredmények kapszulába töltött széklet-liofilizátum, ezen belül is felülúszó, vagy üledék beadásának eredményeként keletkeztek.

### 5.1.1. Donor

Irodalmi adatokat és a várható esetszámot figyelembe véve úgy döntöttünk, hogy a székletmintákat a klinikai vizsgálat teljes tartama alatt lehetőség szerint egy donortól fogjuk szerezni. A donor kiválasztása a nemzetközi ajánlásnak megfelelő szempontok alapján, közvetlen megkeresés útján történt, aki aztán ellenszolgáltatás nélkül vállalta a feladatot. A kiválasztás kritériumai:

- 18 és 65 év közötti életkor
- 30 kg/m<sup>2</sup> alatti BMI
- Nem áll fenn metabolikus szindróma
- Nem áll fenn mérsékelt, vagy súlyos alultápláltság
- Az elmúlt 6 hónapban nem részesült antibiotikus kezelésben
- Nem volt hasmenéssel járó betegsége az elmúlt 3-6 hónapos időszakban
- Nem szenvedett *Clostridioides difficile* fertőzésben
- Nincs immunrendszeri betegsége, nem áll immunszuppresszív kezelés alatt
- Nem áll fenn kábítószer használat, vagy más jelentős rizikófaktor HIV, vagy virális hepatitis fertőzésre
- Az elmúlt 3 hónapban nem járt trópusi országban
- Nem szenved gyomor-bélrendszeri betegségben (gyulladásos bélbetegség, irritábilis bél szindróma, gyomor-bélrendszeri malignitás), nem esett át nagyobb hasi műtéten, emellett panaszmentes
- Nem szenved autoimmun, vagy atópiás betegségben
- Nem szenved krónikus fájdalom szindrómában (fibromyalgia), vagy krónikus fáradtság szindrómában
- Nincs idegrendszeri rendellenessége
- Anamnézisében nem szerepel malignitás

Donorunk magas, vékony testalkatú, normál BMI-vel rendelkező, húszas éveiben járó kaukázusi férfi normál étrenddel, nem egészségügyi dolgozó. Rizikófelmérő kérdőív kiértékelése és protokoll szerinti szűrővizsgálatot követően elláttuk a szükséges információkkal és eszközökkel a megfelelő mintagyűjtés érdekében. A laboratóriumi szűrővizsgálatok a következőkből álltak:

- Baktériumok:
  - Vértől:
    - *Treponema spp.*
  - Székletből:
    - Enterális patogén tenyésztés: *Salmonella, Shigella, Campylobacter spp.*
    - *Helicobacter pylori* – enzimimmunpróba
    - Vankomicin rezisztens *Enterococcus* – antibiotikum érzékenységi teszt polirezisztens törzsek kiszűrése érdekében
- Vírusok:
  - Vértől:
    - Hepatitis A vírus IgM
    - Hepatitis B vírus felszíni antigén
    - Hepatitis C vírus elleni antitest
    - HIV 1 és 2
  - Székletből:
    - Norovírus – enzimimmunpróba, vagy PCR
    - Rotavírus – enzimimmunpróba
- Paraziták:
  - Vértől:
    - *Entamoeba histolytica*
    - *Strongyloides stercoralis*
  - Székletből:
    - Paraziták, vagy petéik
    - *Microsporidia*
    - *Giardia* antigén / enzimimmunpróba
    - *Cryptosporidium* enzimimmunpróba
    - *Isospora* és *Cyclospora* – saválló festés
- Egyéb:
  - Vértől:
    - Teljes vérkép
    - Májfunkciós teszt
    - Süllyedés, C-reaktív protein
    - HbA1c

- Székletből:
  - *Clostridioides difficile* teszt
  - *Clostridioides difficile* toxin és glutamát dehidrogenáz antigén kimutatás

Klinikai vizsgálatunk a SARS-Cov-2 vírus első igazolt európai megjelenése előtt zajlott, ezért nem került sor ilyen irányú szűrésre.

A széklet gyűjtése a donor otthonában történt nem steril, légmentesen zárható mintagyűjtő edénybe, a minta szobahőmérsékleten szállítva jutott 1 órán belül a mintafeldolgozó laboratóriumba.

### 5.1.2. Székletminta feldolgozása

A mintafeldolgozásnak protokollunk szerint a székletürítést követő 6 órán belül meg kellett kezdődnie. A folyamat egy, kizárólag erre a célra fenntartott lamináris elszívóboxban zajlott előzetes alkoholos felületfertőtlenítést követően.

60 g székletet homogenizáltunk egy háztartási mixer segítségével zárható tetejű tartályban 200 ml fiziológiás (0.9%) só oldatban, szobahőn. Az így kapott szuszpenziót kétszeri szűrés segítségével szabadítottuk meg a nagyobb méretű szilárd anyagoktól. A mechanikai szűrés útján nehezen eltávolítható szilárd anyagokat egy rövid idejű, alacsony g értékű centrifugálással (MPW-380R, Poland) távolítottuk el (10 perc, 827 g, szobahőn). Ehhez a mintákat 50 ml-es centrifugacsövekbe (Sarstedt Inc. Nümbrecht, Germany) töltöttük. Ezzel a módszerrel körülbelül 120 ml, makroszkóposan homogén szuszpenzió állítható elő egy 60 grammnyi széklet adagból. Ezt követően 100 ml-es adagokban kezeltük a mintát (nasogastricus szondával történő bejuttatás esetén ezt a mennyiséget kapja meg a beteg; ez a kiindulási térfogat)

A kapszulák előállítására céljából előkészített minták ezután további centrifugáláson mentek keresztül, ezúttal 15 percig, 3309 g-vel, 4°C-ra előhűtött centrifugában. E lépés eredményeként 30 ml körüli üledék keletkezik, amelyhez a további kezelést megkönnyítendő 10 ml fiziológiás (0.9%) sóoldatot adtunk. A felülúszót (70 ml körüli térfogat) két részre osztva, az üledéket (40 ml körüli térfogat) pedig egészben, 5 cm átmérőjű üvegedényekben -20°C-on tároltuk 12 órán keresztül.

A -20°C-os mintákat aztán -40°C-on,  $4 \cdot 10^{-4}$  mbar vákuum alatt, 36 órán át liofilizáltuk (Freeze Dryer Heto Drywinner model DW1.0), majd a liofilizált mintákat porcelánmozsárban homogenizáltuk szobahőn.

### 5.1.3. Kapszulák

A homogén liofilizátumokat kapszulázó eszköz (Capsule Machine, Capsule Connection, LLC, Prescott AR. USA) segítségével az adott mennyiségnek megfelelő számú, „00” méretű kemény zselatin kapszulákba töltöttük. A 100 ml kiindulási térfogatból 4-6 db liofilizált üledéket és 4-6 db liofilizált felülúszót tartalmazó kapszula készült attól függően, hogy mennyi volt az adott minta szárazanyag-tartalma, és hogy mennyire volt tömöríthető a kapszulázás során. A kapszulákat ezt követően a felhasználásig -20°C-on tároltuk. A liofilizált felülúszóval és üledékkel töltött kapszulák külső megjelenése csak színárnyalatban különbözött egymástól.

Ezek a kapszulák vízben oldhatók, gyomorsavnak nem állnak ellen. Terveink között szerepelt enteroszolvens kapszulák (Vcaps® Enteric Capsules, Capsugel, Cambridge, MA, USA) kipróbálása is a liofilizátumok gyomorsav elleni védelme érdekében. Ezek a kapszulák egy mérettel kisebbek, „0”-s méretűek voltak, ebből eredően a szükséges kapszula mennyiség 45%-kal növekedett egy adag liofilizátum kapszulázásához. A normál kapszulák sikeressége miatt végül nem alkalmaztunk enteroszolvens kapszulákat a klinikai vizsgálat során.

Terveztük liofilizátatlan széklet-szuszpenzió kapszulázását is. Ehhez egy vízben nem oldódó bevonatot kellett létrehoznunk a kapszulák belső falán. Két készítménnyel próbálkoztunk:

- Eudragit® L 30 D-55 (Ph. Eur. Methacrylic Acid – Ethyl Acrylate Copolymer 187 (1:1) 30%-os diszperzió)
- Eudragit® RS 30 D (Ph. Eur. 0.3 % Sodium Laurilsulfate, 1.2% 188 Polysorbate 80 – vizes diszperzió 30%-os szárazanyag-tartalommal)

Mindkét diszperzió deformálta a kapszulákat, melyek a bevonást követően (ha nem is tökéletesen, de) megfelelően zárhatóak maradtak. A deformáció mértéke hajszárító alkalmazásával csökkenthetőnek bizonyult. Vízrel való érintkezést követően az Eudragit® L 30 D-55 esetében 60 percig, az Eudragit® RS 30 D esetében 5 percig tartották szilárdságukat az előkezelt kapszulák.

### 5.1.4. Klinikai adatok gyűjtése, kiemelt esetek

A disszertáció alapját képező betegadatok a 2018. január és 2019. december között kezelt betegektől származnak. Ez idő alatt összesen 28 páciens részesült kapszulás FMT-ben kapszulák segítségével. A beavatkozást visszatérő CDI esetén ajánlottuk fel akkor, ha

legalább két recidíva jelentkezett 1 éven belül. A beteg-felvilágosítást és a beleegyező nyilatkozat aláíratását követően a pácienseket véletlenszerűen besoroltuk a felülúszót (A csoport – 16 beteg), vagy az üledéket (B csoport – 12 beteg) kapók csoportjába. Az A csoport átlagéletkora 64,79 év volt, 10 nő és 6 férfi tartozott ide. A B csoport átlagéletkora 66,47 év volt, 7 nő és 5 férfi alkotta. A korábbi recidívák számának mediánja 2 volt mindkét csoportban (3. táblázat).

	Nő / férfi / össz.	Átlagéletkor	Korábbi recidívák száma (medián)
A csoport	10 / 6 / 16	64,79 év	2
B csoport	7 / 5 / 12	66,47 év	2

3. táblázat. Az FMT-n átesett betegek

Az FMT-re váró pácienseknél a beavatkozást megelőző napon leállították a metronidazol, vagy vankomicin kezelést, emellett (ha eddig nem zajlott) protonpumpa-gátló terápiát kezdtek a baktériumok túlélési esélyeinek javítása érdekében. A gyorsabb célba érést elősegítendő, és a hányás valószínűségének csökkentése érdekében metoklopramid is szerepelt az előkészítés protokolljában. A betegek a transzplantáció napján a kapszulák bevétele előtt nem ehettek. A pácienseknek nagyjából 5 perc alatt, egyesével kellett bevenniük a 4-6 db kapszulát. Ezt követően 2 órán keresztül nem ehettek, ez idő alatt legalább félülő testhelyzetben kellett maradniuk.

A gyógyulást a klinikai tünetek megszűnésében, a recidívát a tünetek 6 hónapon belüli újbóli jelentkezésében, a betegek utánkövetésének időtartamát pedig egy évben határoztuk meg.

#### 5.1.4.1. Esettanulmányok

A négy kiválasztott beteg esettörténete (4. táblázat):

Az 1-es számú beteg 83 éves kaukázusi férfi volt 2-es típusú cukorbetegséggel és magas vérnyomással. Kórházi felvételére 3 hónapon belüli negyedik CDI recidívája miatt került sor. A fertőzést *Clostridioides difficile* A toxin vizsgálattal igazolták. Sikertelen kezelési próbálkozás történt metronidazollal, vankomicinnel és fidaxomicinnel is. Székletminta nyeresét követően liofilizált felülúszót tartalmazó kapszulákat kapott (A csoport) ambuláns kezelés keretében.

A 2-es számú beteg 82 éves kaukázusi nő volt 2-es típusú cukorbetegséggel és magas vérnyomással. Két hónapon belül a második CDI recidívát észlelték nála. Az első CDI epizód imipenemmel és cilasztatinnal kezelt (ESBL termelő) *Klebsiella pneumoniae* szepszis alatt jelentkezett. A legutóbbi CDI recidíva nem reagált vankomicinre. Székletminta nyerését követően szintén liofilizált felülúszót tartalmazó kapszulákat kapott (A csoport.)

A 3-as számú beteg 82 éves kaukázusi nő volt, szintén 2-es típusú cukorbetegséggel, magas vérnyomással, reumatológiai problémákkal. Felvételére második CDI epizód miatt került sor; az elsőt metronidazollal kezelték. Átmeneti tünetmentes időszak után újra recidíva alakult ki nála, mely nem reagált vankomicinre. Székletminta nyerését követően liofilizált üledéket tartalmazó kapszulákat kapott (B csoport).

A 4-es számú beteg egy 66 éves kaukázusi férfi volt krónikus alkoholfogyasztással, aki a sürgősségi ambulancián át érkezett emelkedett gyulladási paraméterekkel és akut veseelégtelenséggel. Hasmenése amoxicillin/klavulánsav kezelés során kezdődött. Sikeresnek induló vankomicin kezelése alatt ismét fokozódtak hasmenéses panaszai, ezért székletminta nyerését követően liofilizált üledéket tartalmazó kapszulákat kapott (B csoport.)

	1-es sz. beteg	2-es sz. beteg	3-as sz. beteg	4-es sz. beteg
<b>Csoport</b>	Felülúszó (A)	Felülúszó (A)	Üledék (B)	Üledék (B)
<b>Életkor</b>	83	82	82	66
<b>Nem</b>	Férfi	Nő	Nő	Nő
<b>Recidívák száma</b>	4	2	2	2
<b>Megelőző antibiotikus kezelések</b>	metronidazol, vankomicin, fidaxomicin	metronidazol, vankomicin, fidaxomicin	metronidazol, vankomicin, fidaxomicin	metronidazol
<b>Rizikófaktorok</b>	rCDI	radiációs colitis, vékonybél-rezekció, húgyúti fertőzés - augmentin (amoxicillin + klavulánsav), ceftriaxon, kórházi kezelés rCDI	UTI - ceftriaxon, rCDI	augmentin (amoxicillin + klavulánsav)
<b>Első FMT sikeres?</b>	igen	igen	igen	nem

4. táblázat. A négy, protein-, zsírsav- és metagenomikai vizsgálatra is kiválasztott beteg demográfiai adatai, kórtörténeti összefoglalója.



## 5.2. In vitro túlélés vizsgálata

A túlélési vizsgálatokat a donor liofilizálás előtti és utáni mintáin végeztük annak kiderítésére, hogy a minták módszerünkkel meddig tárolhatóak el a hatékonyság csökkenése nélkül.

A mintafeldolgozás időpontjában hígítási sort készítettünk a liofilizálásra szánt (felülúszó, üledék) minták és a két frakció szétválasztása előtti széklet-szuszpenzió 1-1 ml-éből. Ezen minták kioltása azonnal megtörtént. A liofilizálás végeztével 0,01 g körüli mennyiségeket mértünk ki a liofilizátumokból azonnali kioltásra, valamint 2 nappal, 1 héttel, 1 hónappal, 3 hónappal és 6 hónappal későbbi kioltás céljából. A kimért mintákat 4 különböző hőmérsékleten tároltuk:  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$  és  $+20^{\circ}\text{C}$  (szobahőmérséklet), tehát 21-21 mintavétel történt a két különböző liofilizátumból. A mintavételeket 9 feldolgozott székletmintából végeztük (összesen 378 mintavételt végeztünk.)

A kioltandó mintákat első lépésben az eredeti koncentrációra hígítottuk a liofilizálás előtt és után mért tömegek ismeretében, ezt követően tízes hígítási sort készítettünk. A hígítási sorokból szilárd táptalajokra szélesztettünk, majd a táptalajokat aerob és anaerob módon,  $30^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. Hígításonként 1-1 kioltás készült az alábbi táptalajok a mindegyikére:

- véres agar (aerob és anaerob inkubálás)
- csokoládé agar
- csokoládé agar vankomicinnel
- eozin-metilénkék agar
- Sabouraud agar

A telepszámlálást 48 órával a kioltást követően végeztük, az egyértelműen fertőzött táptalajokat kizártuk a csíraszám-számolásból. Egyértelműen fertőzöttként jelöltünk minden olyan táptalajt, ahol a nagyobb hígítás ellenére többszörös csíraszámot, vagy nem a szélesztésnek megfelelő telepeket észleltünk. A csíraszámokat CFU/ml-ben fejeztük ki (Colony Forming Unit).

### 5.3. Fehérje vizsgálat

A székletben található fehérjék vizsgálatát a 4 kiválasztott beteg és a donor mintáin végeztük el. A donor esetében vizsgáltunk liofilizálás utáni mintát is. A mintákból vizes szuszpenziókat készítettünk, majd a mérésig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on, Eppendorf csövekben tároltuk azokat. A minták koncentrációi között jelentős eltérések voltak, ezért kvalitatív meghatározásra került sor. A méréseket a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézetében végeztük Makszin és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján [82]. Mikrochip elektroforézist High Sensitivity Protein 250 LabChip kit segítségével Agilent 2100 Bioanalyzer rendszeren (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A készülékben a lézer segítségével mértük a fluoreszcenciát 630 nm-es excitációs és 680 nm-es emissziós hullámhosszon, ez részletesen egy korábbi közleményünkben olvasható [83]. A kit mikrochipeket és reagenseket tartalmaz: High Sensitivity Protein 250 Labeling Dye, DMSO, ethanolamine, Protein 250 standard jelölő puffer (SLB, 300 mM Tris/HCl, pH >8.5), Gel Matrix (4.5% polydimethyl acrylamide - alapú lineáris polimer oldat - pH 8), Destaining oldat, és minta puffer. A kicsapó oldatot (SDS-t és dithiothreitol (DTT) tartalmaz) 3.5  $\mu\text{l}$  1 M DTT (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) 100  $\mu\text{l}$  minta pufferhez adásával készítettük elő. A protokollt emberi székletben található fehérjékre optimalizáltuk a megfelelő elválasztás és érzékenység érdekében.

A minta előkészítésének első lépése 5 perces centrifugálás volt 1500 g-vel (3500 RPM), ezt követően 4,5  $\mu\text{l}$  felülúszóhoz 0.5  $\mu\text{l}$  SLB oldatot adtunk. A fehérjék fluoreszcens jelölése érdekében 4.5  $\mu\text{l}$  mintához kevertünk 0.5  $\mu\text{l}$  hígított fluoreszcens festék-DMSO oldatot, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A maradék, nem kötődött festék kioltása 0.5  $\mu\text{l}$  etanolamin hozzáadásával és 10 perces inkubálással történt szobahőmérsékleten. A jelölt mintákat kétszer 6  $\mu\text{l}$  ioncserélt vízzel hígítottuk, majd 4  $\mu\text{l}$  hígított mintaoldathoz adtunk 2  $\mu\text{l}$  kicsapó oldatot, ezt 5 perces inkubáció követte  $100^{\circ}\text{C}$ -on, végül ismét centrifugáltuk. Az így kapott mintákból 6  $\mu\text{l}$ -t pipettáztunk a mikrocsipek polydimethyl-acrylamide-alapú lineáris polimer oldattal (pH 8) töltött csatornáiba. A megfelelő lyukba kicsapó oldatot töltöttünk.

A mintákat 1000 V feszültséggel kezeltük 80 másodpercig (a kezelt térfogat körülbelül 40 pl volt), majd az elválasztást 1000 V feszültséggel folytattuk 60 másodpercen keresztül  $30^{\circ}\text{C}$ -on. Minden mintát legalább háromszor vizsgáltunk. A fehérjekomponensek molekulatömegeit az említett publikációban található kalibrációs görbékkel határoztuk meg. A görbe alatti területekből (AUC) előbb kiszámoltuk az egyes alkotók relatív arányait, majd a teljes AUC %-ában fejeztük ki azokat.

#### **5.4. SCFA meghatározás**

A székletben található rövid szénláncú szabad zsírsavakat a C2:0 (ecetsav) és C7:0 (önantsav) közötti tartományban vizsgáltuk, elsősorban a butirát (vajsav, C4:0) szintjének változásaira voltunk kíváncsiak. Ehhez a vizsgálatához is a kiválasztott 4 betegtől, a donortól és további 5 egészséges önkéntestől szerzett mintákat használtuk fel. A betegek esetében transzplantáció előtti és utáni, a donortól liofilizálás előtti és utáni mintákat hasonlítottunk össze. Ahogyan a fehérjevizsgálat esetében, úgy itt is problémát okozott a minták eltérő koncentrációja, ezért csak kvalitatív elemzést tudtunk végezni.

A mintákból vizes szuszpenziót készítettünk, majd a mérésekig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on, Eppendorf csövekben tároltuk azokat. Az SCFA mérések szintén a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézetében történtek. A szuszpenziók 100 mg-ját 1 ml desztillált vízben hígítottuk, majd 10 percig vortexeltük, ezután 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Következő lépésként az oldatokat 10 percig centrifugáltuk 15000 g-n (10000 RPM). A felülúszót automata pipettával leszívtuk, majd belső standard oldattal kevertük. Ezt filtrálás követte (Low Protein Binding Hydrophilic LCR (PTFE) Membrane  $0.2\mu\text{m}$ , Millex<sup>®</sup>, Tullagreen, Ireland), melynek során közvetlenül GC (gázkromatográfiához használatos) csövekbe töltöttük a mintákat.

A méréshez Agilent Technologies 6890N gázkromatográfot használtunk 5975-ös tömegszelektív detektorral (Agilent, Waldbronn, Germany.) Az adatelemzést GC/MSD CHEMSTATION (Version D.03.01, Agilent) szoftverrel végeztük. A komponensek azonosítása NIST MS Search 2.0 library [84] és az ismert standardok csúcsainak segítségével történt. Belső standardként a C7:0 metil-észter formáját használtuk.

#### **5.5. Metagenomikai vizsgálat**

Metagenomikai vizsgálatra összesen 11 mintát küldtünk. Ezek egyrészt a 4 már említett betegtől (FMT előtt és után), másrészt a donortól (natív széklet, liofilizált felülúszó, liofilizált üledék) származtak. A natív székletmintákat a gyártó utasításainak megfelelően transzportcsövekbe (OMNIgene OMR-200, DNA Genotek, Canada) helyezve, míg a liofilizált mintákat kapszulákba töltve küldtük a kiválasztott laboratóriumba (Institute of Clinical Molecular Biology, Kiel, Germany), ahol 16S rRNS szekvenálást végeztünk az alábbi protokoll szerint.

DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen) segítségével a gyártó protokollja szerint DNS-t izoláltunk a székletmintákból. A kinyert DNS-t 100 µl eluáló pufferrel oldottuk le a szűrőmembránról, majd -80°C-on tároltuk. A 16S profil készítése és a MiSeq szekvenálás Sommer et al. közleményeiben [85, 86] leírtaknak megfelelően történt. A közleményekben leírtaktól annyiban térünk el, hogy a 16S gén V3-V4 régióját a 141F és a 806R jelű primerekkel amplifikáltuk.

A PCR-t GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) használatával Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix (NEB) oldattal végeztük a következők szerint: 98°C 3 percen át, majd 25x (98°C 20 másodpercig, 55°C 30 másodpercig, 72°C 45 másodpercig), majd 72 °C 10 percen keresztül, a mintát végül 4°C-on tartottuk. A PCR reakciók teljesítményét agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztük.

A normalizálás SequalPrep Normalization Plate Kit (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) felhasználásával történt. Az így normalizált amplikonokból azonos mennyiségeket pooloztunk, majd szekvenáltunk Illumina MiSeq (2 x 300 nt) segítségével. Az így nyert adatokat a MacQIIME v1.9.1 [87] adatbázissal vetettük össze. A refrakciót 4062 kiolvasás/mintában határoztuk meg a minimális átfedések és a differenciált szekvenálási mélység érdekében. A szekvenciákat OTU-khoz (operatív rendszertani egység) rendeltük az Uclust algoritmust [88] és a Greengenes adatbázist [89] használva. A minőségi szűrést a kiméra szekvenciák eltávolításával (ChimeraSlayer [90]), a csak egyszer előforduló, és a PyNAST algoritmussal [91] nem egyeztethető szekvenciák törlésével végeztük. FastTree 2 [92] segítségével referencia phylogenetikai fát készítettünk.

A relatív előfordulásokat az egy OTU-ban történt kiolvasások és a minta összes szekvenciájának arányaiból számoltuk. A béta diverzitást a Bray-Curtis eltérés módszerével határoztuk meg [93], és koordinátarendszerben ábrázoltuk. Az alfa eloszlást az OTU-k teljes számának, Chao1 gazdagság, Shannon entrópia és Simpson index összehasonlításával határoztuk meg. A differenciál abundancia elemzést nem paraméteres t-próba segítségével végeztük, a p-értékeket többszörös teszteléshez és FDR (False Discovery Rate) korrekcióhoz igazítottuk.

Az alfa eloszlás használata lehetővé teszi a mikrobiális közösségek belső sokféleségének elemzését, ahol az adott mintában található egyedi mikroorganizmusok diverzitását méri. Az alfa diverzitás becslése segíti a mikrobiális közösség struktúrájának és ökológiai jellemzőinek feltárását, valamint a fajok közötti arányok és dominancia mértékének megértését a mintában.

A béta diverzitás azon módszer, amelyet a metagenomikai vizsgálatok során alkalmaznak az egyedi baktériumfajok közötti különbségek feltérképezésére. Ez a diverzitási mérték segít megérteni, hogy milyen mértékben különbözik egymástól a minták összetétele. Minél nagyobb a béta diverzitás, annál nagyobb a fajok közötti változatosság.

A Simpson-index a fajok dominanciájának és egyenletes eloszlásának mérésével segít a mikrobiális populációk sokféleségének értékelésében és összehasonlításában különböző minták, vagy körülmények között. Azt mutatja meg, hogy két véletlenszerűen kiválasztott egyed a közösségből milyen valószínűséggel tartozik ugyanahhoz a fajhoz. Minél magasabb a Simpson-index, annál nagyobb a sokféleség, mert magasabb a különböző fajokkal való találkozás valószínűsége. Viszont minél alacsonyabb a Simpson-index, annál alacsonyabb a sokféleség, és nagyobb dominancia van egy vagy néhány fajnak a közösségben. A Simpson-index skálája 0 és 1 között mozog, ahol 0 végtelen sokféleséget jelent (az összes faj egyenlő mértékben elterjedt), és 1 teljes dominanciát jelent egyetlen fajnak.

A Shannon-entrópia mérése segít azonosítani és összehasonlítani a mikrobiális közösségek diverzitását, és információt nyújt a fajok egyenlőtlenességéről, vagy dominanciájáról a mintákban. Magasabb értéket mutat, ha a mintában több különböző faj van jelen, és ha ezek egyenlő arányban fordulnak elő (egyenletes eloszlás). Ha viszont egy, vagy néhány domináns faj dominál a többi fajhoz képest, akkor a Shannon-entrópia alacsonyabb lesz, mert a fajok közötti eloszlás egyenlőtlenebb.

A Chao1 gazdagság (Chao1 richness) a mikrobiális közösségekben található fajok számának becslésére használható. Ez a becslési módszer figyelembe veszi az úgynevezett egyedi vagy, ritka fajokat, amelyekből csak egyetlen egyed található a mintában. A Chao1 gazdagság becslése a mintában rejtett előforduló fajokat is figyelembe veszi, és közelíti az összes faj jelenlétét. Ezáltal segít megbecsülni a mikrobiális közösség általános fajgazdagságát a mintában. A Chao1 richness értéke tehát információt nyújt a mikrobiális sokféleség mértékéről és a fajok számáról a vizsgált mintában.

## **5.6. Toxin ellenes antitestek mérése**

A toxin ellenes antitestek vizsgálatához CDI miatt kezelt betegek szérumát gyűjtöttük a rutin laborvizsgálatokkal egy időben. A vérvételeket igyekeztünk az antibiotikus terápia 8. napjára időzíteni. A mintákat a vérvételi csövekben szállítottuk a laboratóriumba, ahol a mérésekig -80°C-on tároltuk azokat. Az ELISA vizsgálatot von Bechtolsheim és munkatársai által közölt

protokoll szerinti ELISA (enzimhez kötött immunoszorbens analízis) módszerrel végeztük, az alábbiak szerint [94].

Első lépésként A és B toxint TRIS (tris(hidroximetil)-aminometán) pufferben vettük fel, majd az ELISA lemezhez kötöttük és másnapig 4°C-on inkubáltuk. Másnap eltávolítottuk a kötőfolyadékot, és PBS (Phosphate Buffered Saline) + 0,05% Tween oldattal kimostuk a lyukakat, a mosófolyadékot leöntöttük. A mosási lépést háromszor ismételtük. Minden lyukba 200 µl Superblock oldatot mértünk, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt a lépést ismételt mosás követte. A tesztelendő szérumokat 1:100 arányban hígítottuk PBS-Tween (PBST) oldatban az A toxinhoz, 1:800 arányban a B toxinhoz. Minden oldatból 100 µl-t mértünk a megfelelő lyukakba, az üres lyukakat PBS-Tween oldattal töltöttük fel. A lemezeket 60 percig 37°C-on inkubáltuk, eközben előkészítettük a PBST-BSA (0,2 g BSA, 40 ml PBST) oldatokat a másodlagos antitestekhez, ezeket is 37°C-on inkubáltuk. Az inkubációt ismét 3 mosási ciklus követte, a másodlagos antitestet (goat anti-human Ig-HRP) 1:30000 arányban elegyítettük PBST-BSA oldattal. Az elegyből 100 µl-t mértünk a megfelelő lyukakba, az üres lyukakat PBST-BSA oldattal töltöttük fel, ezt ismét 60 perces inkubálás követte 37°C-on. Az inkubálás után 3 mosási ciklus következett, majd a lyukakat TMB (tetrametilbenzidin) chromogen szubsztrát oldattal 100 µl-es mennyiségeivel töltöttük fel. Ezt követően lefedtük a lemezeket, hogy azokat ne érje fény, majd 30 percig 23°C-on inkubáltuk. A reakció leállítására lyukanként 100 µl 1 M töménységű H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-t használtunk. A fényabszorpciót 450 nm BMG Optima spektrométerrel mértük.

Összesen 47, páciensektől levett vérmintát használtunk, a negatív kontroll 15 egészséges önkéntes széruma volt. A betegek 8 hetes utánkövetésén át regisztráltuk az esetleges recidívákat.

### **5.7. Inzulinszükséglet felmérése FMT-t követően**

Az FMT-t követő inzulinszükséglet változását FMT-n átesett, 2-es típusú cukorbetegség miatt inzulinkezelésben részesülő betegek megkeresése útján vizsgáltuk. Retrospektív felmérésünk során a 2012 és 2016 közötti időszakban kezelt betegek között 18, kritériumainknak megfelelő személyt találtunk. Tizenöt esetben sikerült a beteggel, vagy hozzátartozójával telefonbeszélgetést folytatnunk, és 11 esetben kaptunk használható információt. A felmérés során azt a kérdést tettük fel, hogy kellett-e a kezelést követően változtatni az inzulindózison.

## **6. EREDMÉNYEK**

### **6.1. Kapszulázás megoldása**

Fő célkitűzésünk egy hatékonyan alkalmazható kapszulázási munkafolyamat létrehozása volt. Ezen a téren végeredményként egy összesen körülbelül 8 órányi munkát igénylő protokollt tudtunk kidolgozni, mely orvosi végzettséget nem igényel, és egy személy által végrehajtható. A legbonyolultabb annak megszervezése volt, hogy a donorszéklet ideális időszakban kerüljön a laborba, a kezdeti lépések időigényessége miatt. A legmegfelelőbb az volt, ha hétfőn dél körül érkezett a laborba a székletminta, ami nagyjából 2-3 órás előkészítést követően 2-3 óra alatt a megfelelő centrifugálási lépések után éjszakára a fagyasztóba kerülhetett. Másnap reggel az előhűtött liofilizáló-berendezés munkába állítása a maga körülbelül 5 perces időigényével gyakorlatilag elhanyagolható volt, melyet 36 (a gyakorlatban a biztonság kedvéért és praktikus okokból kifolyólag inkább 48) órás szabadon felhasználható időszak követett. Csütörtök délelőtt a liofilizátumok porítása és kapszulázása szintén nem vett igénybe többet 2 óránál. Megjegyzendő, hogy ezekbe az időtartamokba a munkaterület előkészítéséhez, majd a munkafolyamatok végeztével az eszközök és a munkaterület alapvető tisztításához szükséges időt is beleszámoltam.

Összefoglalva tehát, módszerünk segítségével egy asszisztens 72 óra leforgása alatt elő tud állítani összesen 4-6 adag kapszulát. Ez ugyan lényegesen hosszabb idő, mint amennyi a NG, NJ, vagy kolonoszkópos beadáshoz használt székletsuszpenzió előkészítéséhez szükséges, viszont az elkészült kapszulák gond nélkül és tartósan tárolhatók -20°C-os fagyasztóban is. A kis térfogat miatt a fagyasztóból kivéve rögtön sor kerülhet az FMT-re.

### **6.2. Klinikai eredmények**

A székletátültetés hatékonysága eddig is ismert volt, ahogyan az is, hogy mind a metronidazolnál, mind a vankomicinnél jobb gyógyulási- és recidíva mutatókkal rendelkezik. Az esetszámok növekedése egyre pontosabb összehasonlítást tesz lehetővé a fidaxomicin klinikai adataival. Klinikai vizsgálatunk során az FMT korábbi modalitásai esetében mért hatékonyság volt az összehasonlítási pont.

Ahogyan az várható volt, a betegekben kevesebb ellenérzést váltott ki a kapszulák bevitelének gondolata a különböző szondákon át történő bejuttatással szemben. Megjegyzendő azonban, hogy recidiváló CDI-ben általában eddig sem volt szükség jelentős

rábeszélésre. A klinikai vizsgálat során összesen 28 esetben végeztünk FMT-t kapszulák segítségével. Ezek végrehajtása során nem tapasztaltunk rendellenességet; a legsúlyosabb szövődmény enyhe hasi panasz volt.

Az 1-es csoportban (itt a betegek liofilizált felülúszót tartalmazó kapszulákat kaptak) 16-ból 15 beteg gyógyult meg egy adag kapszula beadását követően (93,75%). A gyógyultak közül ketten röviddel (3 héten belül) a transzplantáció után relapszusba kerültek, de fidaxomicin adását követően ők is ismét tünetmentessé váltak. (A gyógyultak csoportjában egy beteg esetében IBD miatt kolektómiát hajtottak végre.) Az utánkövetés ideje alatt egy beteg elhunyt a CDI-vel nem összefüggő társbetegség miatt. A kezelésre nem reagáló beteg anamnézisében az FMT-t megelőzően összesen 22 recidíva szerepelt.

A 2-es csoportban (itt a betegek liofilizált üledéket tartalmazó kapszulákat kaptak) 12 betegből 8 gyógyult meg az első dózist követően (66,67%). Közülük senkinél nem tapasztaltunk recidívát, egyikük széklete azonban *Clostridioides difficile* A toxin pozitív maradt úgy, hogy a páciensnek nem voltak klinikai tünetei. Két beteg a meg nem gyógyultak közül a terápiás eszköztár többi tagjára sem reagált, egyikük újabb FMT, másikuk végül fidaxomicin kezelést követően gyógyult meg. Az utánkövetés során egy beteg elhunyt el, más betegség következtében.

A teljes gyógyulási arány 23/28 (82,14%) volt, az eredményeket az 5. táblázatban foglaltam össze.

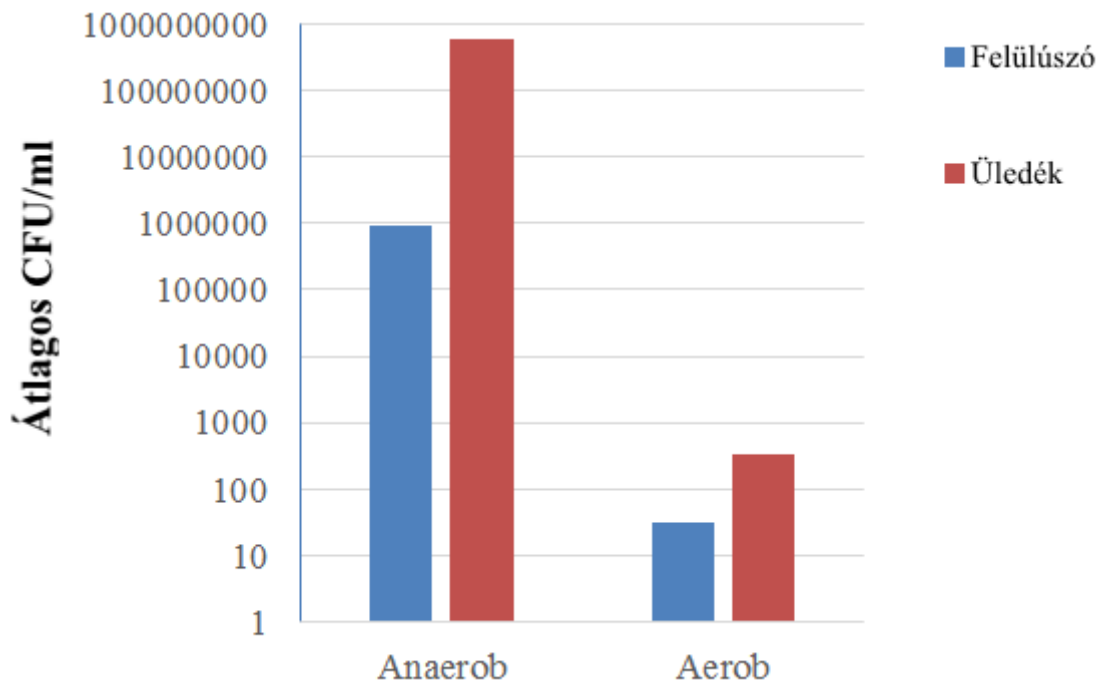
	Sikeres	Sikertelen	Összes
A csoport	15	1	16
B csoport	8	4	12

5. táblázat. A vizsgált populációban elért eredményeink.

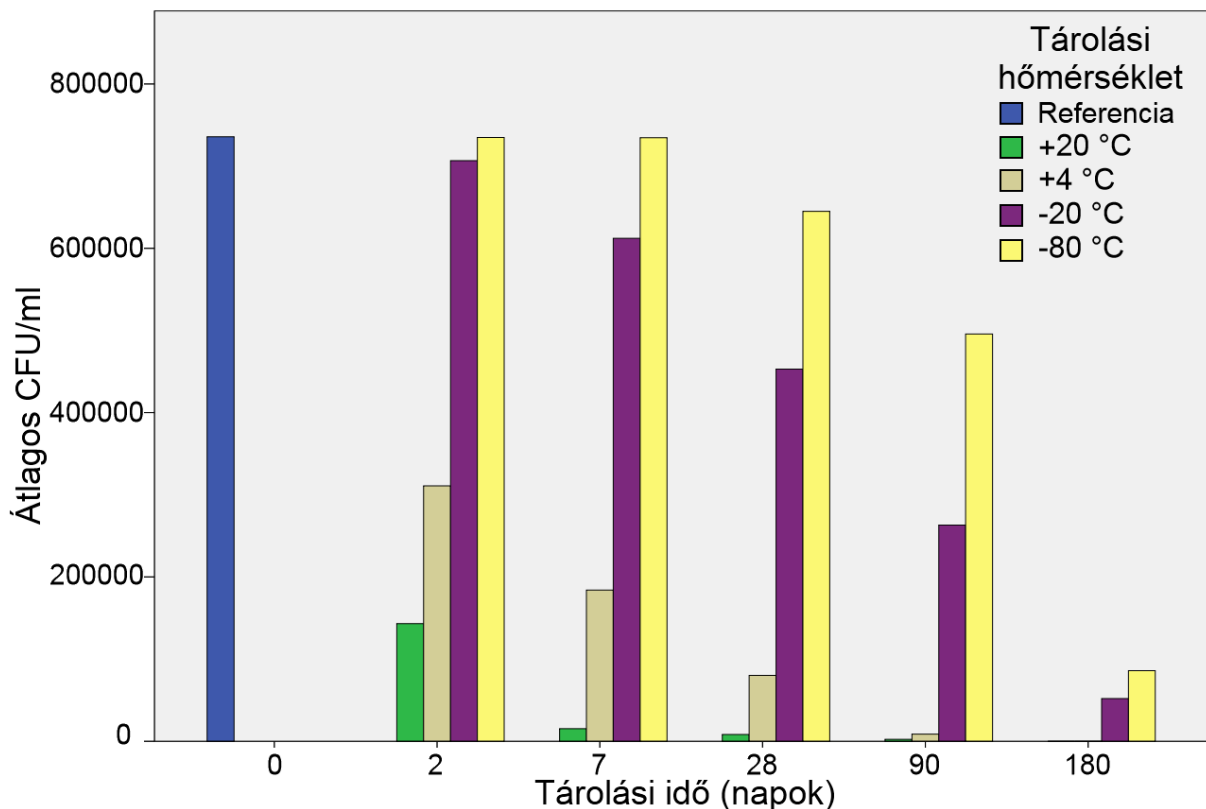


### 6.3. Csíraszám vizsgálatok eredménye

A kioltások által arról is képet kaptunk, hogy mennyire csökkenti a csíraszámot a centrifugálás a beadandó mintákban. Párhuzamosan végzett aerob és anaerob tenyésztések segítségével körülbelül 600-szoros különbséget találtunk a felülúszó és az üledék CFU számai között. A felülúszóban átlagosan  $5 \cdot 10^6$  CFU/ml, míg az üledékben átlagosan  $3 \cdot 10^9$  CFU/ml értékkel számolhatunk (3. ábra). Nem vizsgáltuk, hogy a felülúszóban maradt csíraszám háttérben milyen arányban állhatnak spórák. A túlélési vizsgálatok eredményeit a 4. ábra foglalja össze.



3. ábra. Átlagos CFU/ml értékek a felülúszóban és az üledékben a liofilizálást megelőzően.



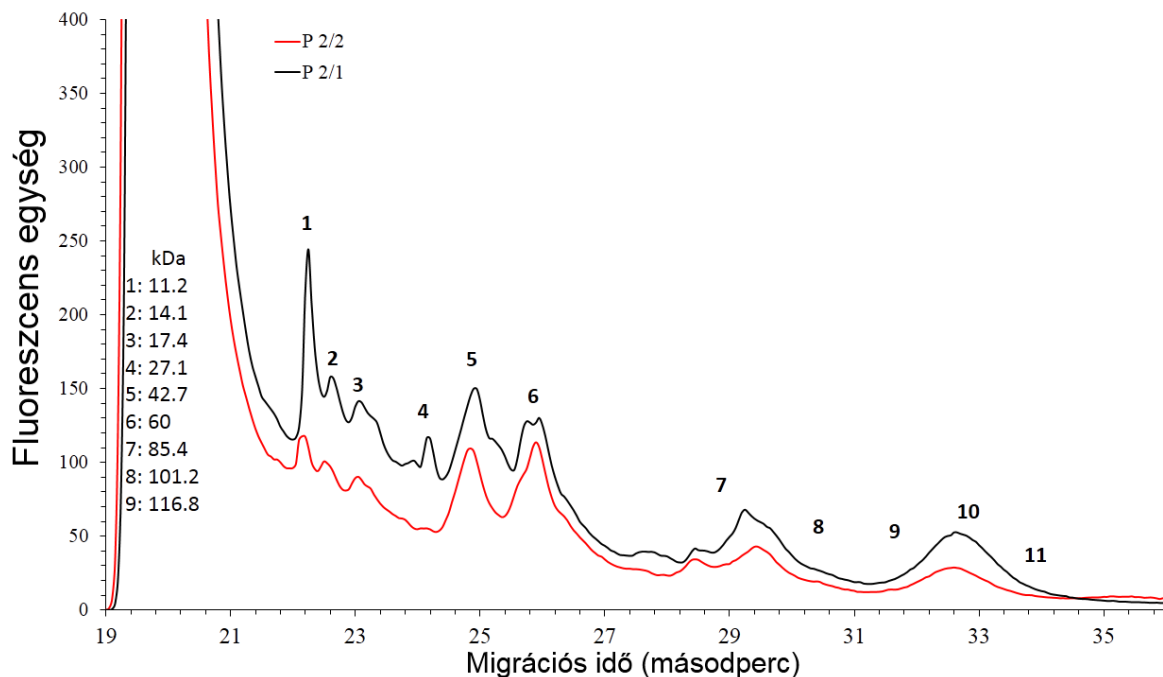
4. ábra. CFU/ml értékek változása a donor mintákban tárolási idő és tárolási hőmérséklet függvényében. A referencia oszlop a széklet üledék közvetlenül a liofilizálást követő kioltási eredményét (0. nap), a többi oszlop liofilizált üledék minták kioltási eredményét mutatja.

A referencia oszlop a közvetlenül az üledék liofilizálás utáni CFU értéket mutatja ( $9 \cdot 10^5$  CFU/ml). Az adatok 9 kioltási sorozat aerob és anaerob eredményeit tükrözik. A kísérlet alapján a túlélés a tárolási hőmérséklettel és a tárolási idővel fordítottan volt arányos. A túlélés tehát  $-80^\circ\text{C}$ -on volt a legkedvezőbb, de a legnagyobb különbséget a  $-20^\circ\text{C}$ -on és a  $+4^\circ\text{C}$ -on tartott minták között láttuk. Ez alapján a  $-20^\circ\text{C}$ -on történő tárolás 6 hónapig megfelelőnek tűnik a túlélést tekintve.

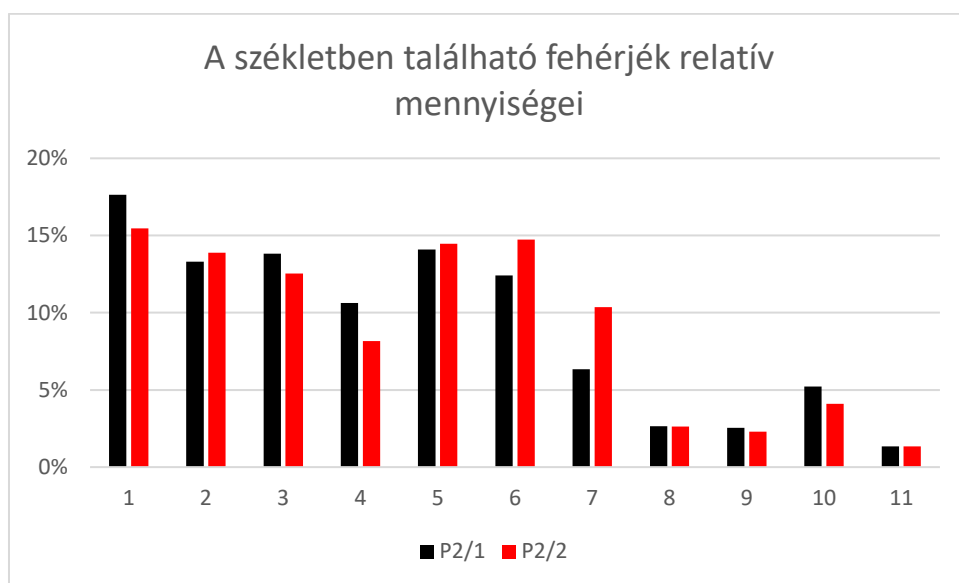
#### 6.4. Fehérje vizsgálat eredményei

A székletben található fehérjék vizsgálata változásokra enged következtetni FMT, liofilizálás és tárolás hatására is. Az FMT-t megelőzően és az azt követően vett mintákban a legtöbb vizsgált komponens relatív részarányának változása  $n=3$  esetszám mellett nem mutatott különbséget.

A 2-es számú beteg esetében a 7-es számmal jelölt komponens aránya növekedett (5. és 6. ábra).

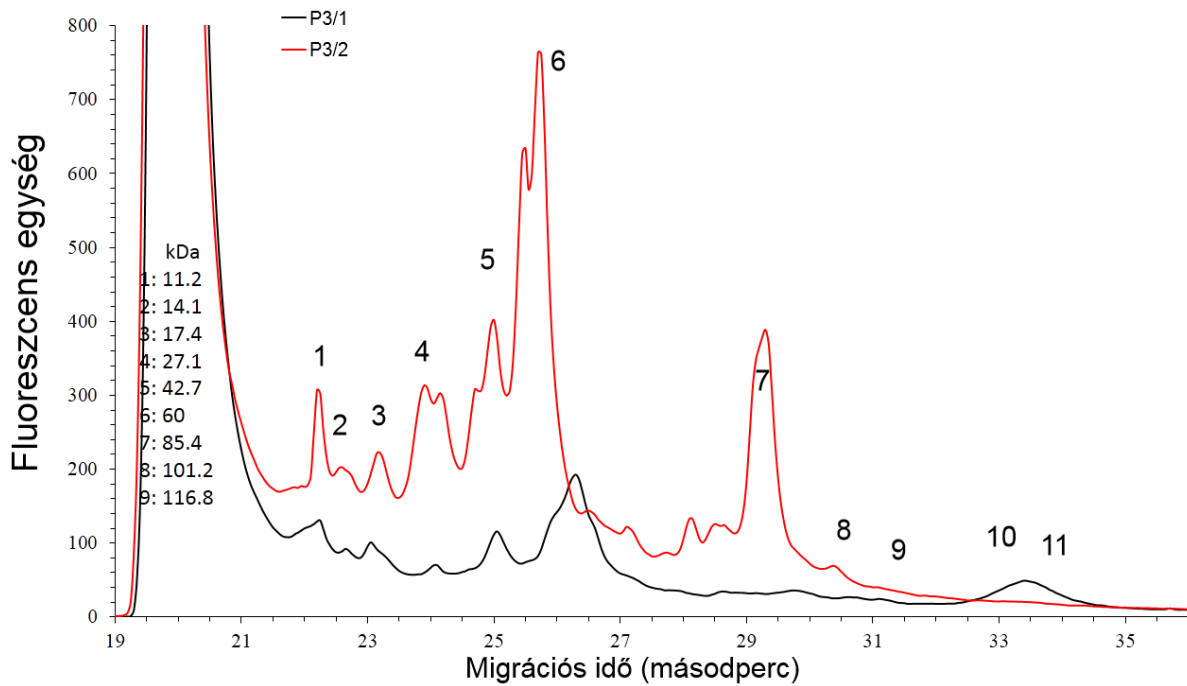


5. ábra. A székletben található fehérjék FMT előtt és után a 2-es számú beteg esetében. (Fekete – FMT előtt, piros – FMT után.)

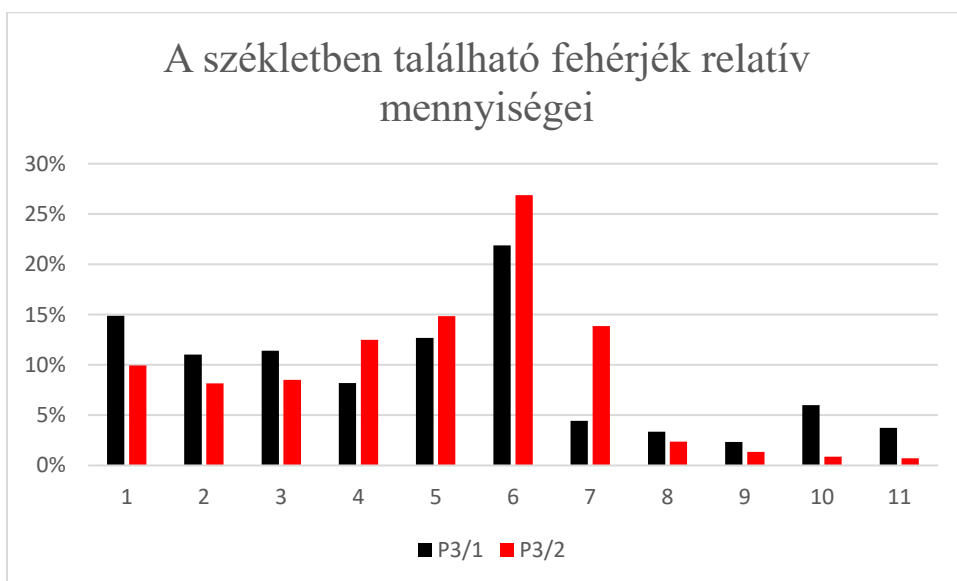


6. ábra. A székletben található fehérjék relatív mennyiségei FMT előtt és után a 2-es számú beteg esetében. (Fekete – FMT előtt, piros – FMT után.)

A 3-as számú beteg FMT utáni mintájában a 4, 5, 6 és a 7-es komponens arányának növekedését tapasztaltuk (7. és 8. ábra).

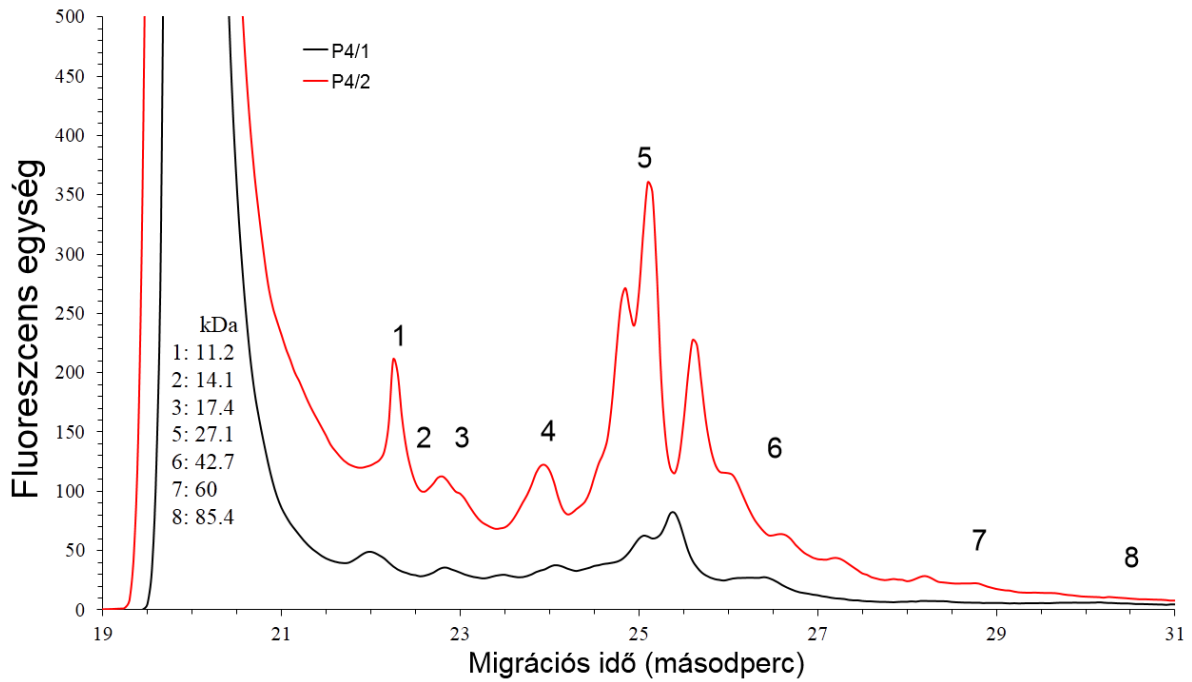


7. ábra. A székletben található fehérjék FMT előtt és után a 3-as számú beteg esetében. (Fekete – FMT előtt, piros – FMT után.)

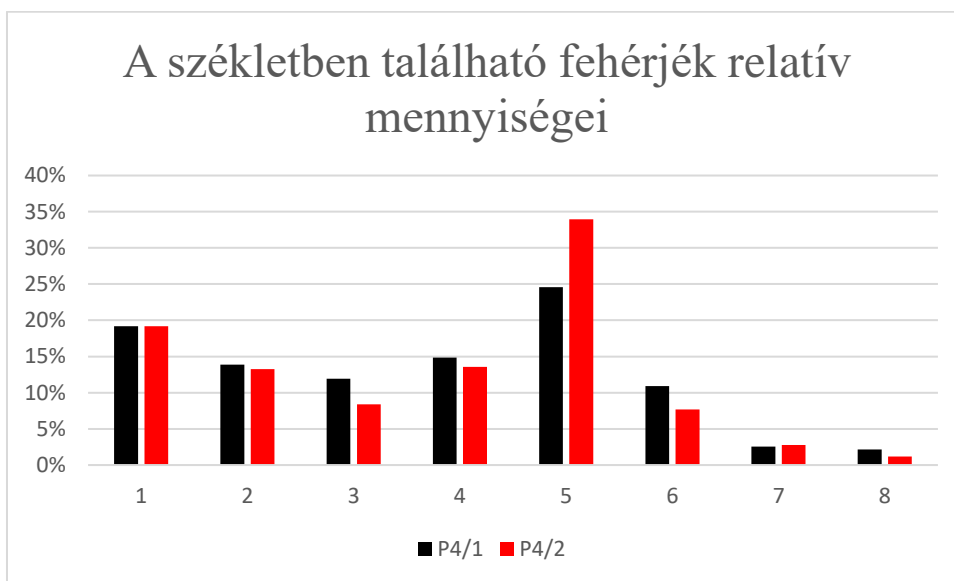


8. ábra. A székletben található fehérjék relatív mennyiségei FMT előtt és után a 3-as számú beteg esetében. (Fekete – FMT előtt, piros – FMT után.)

A 4-es számú beteg mintájában csak az 5-ös komponens aránya növekedett FMT-t követően (9. és 10. ábra)



9. ábra A székletben található fehérjék FMT előtt és után a 4-es számú beteg esetében. (Fekete – FMT előtt, piros – FMT után.)

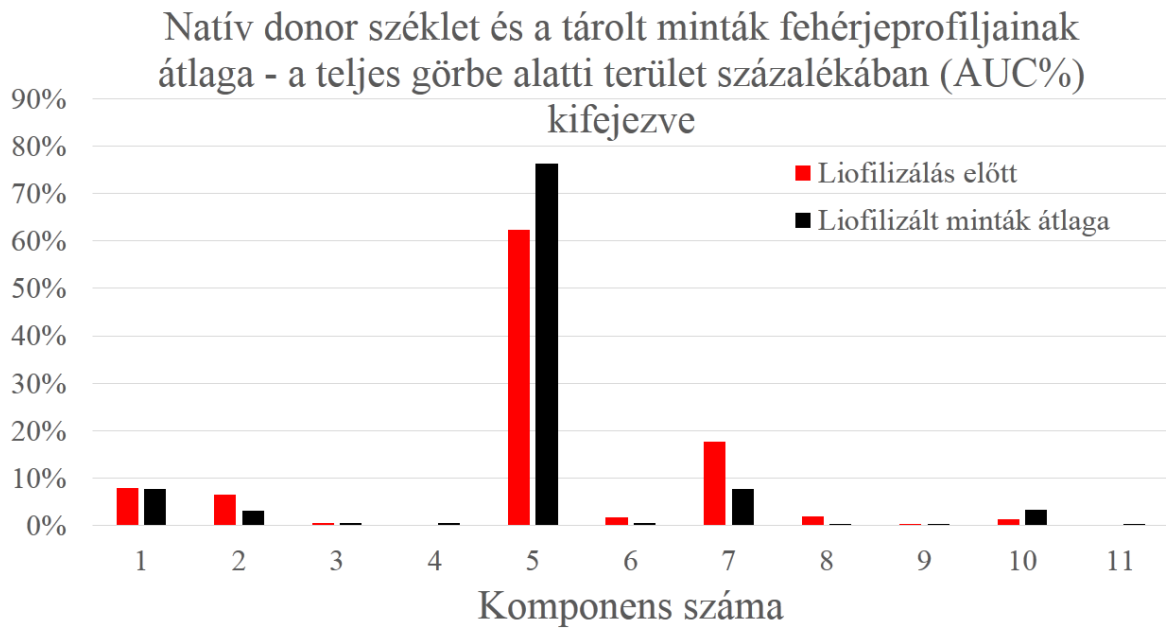


10. ábra. A székletben található fehérjék relatív mennyiségei FMT előtt és után a 4-es számú beteg esetében. (Fekete – FMT előtt, piros – FMT után.)

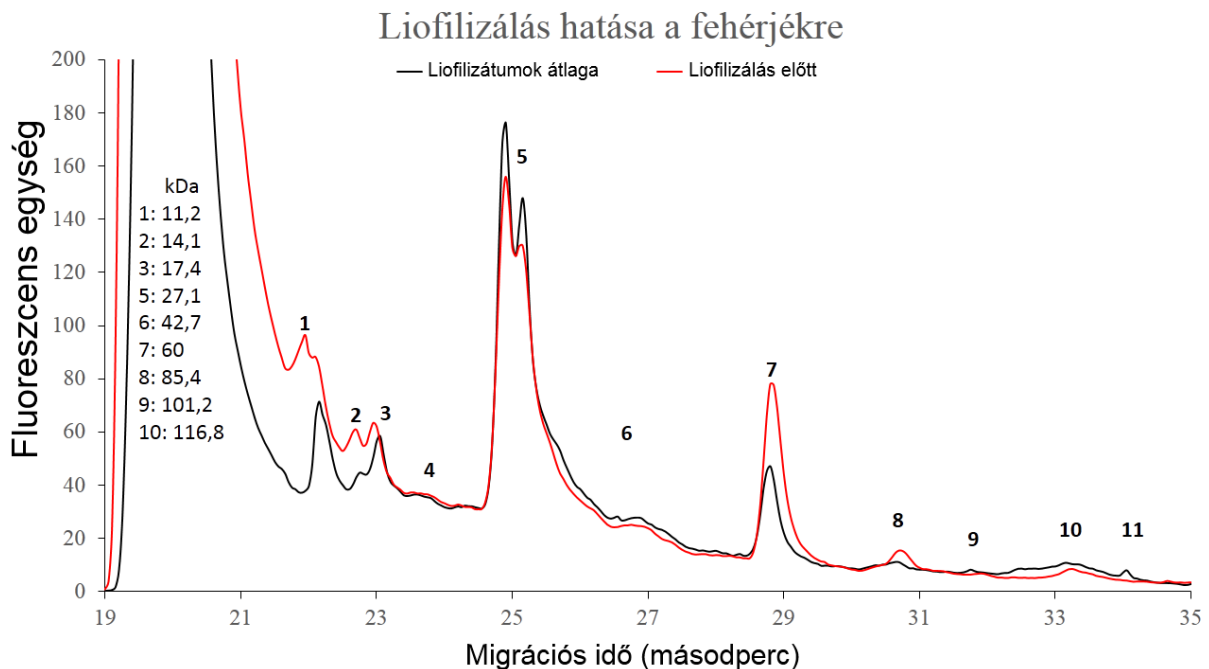
Az 1-es számú beteg mintáinak vizsgálata sajnos nem vezetett felhasználható adatokhoz.

A donor mintáinak vizsgálata során az 5-ös és a 7-es komponens arányainak változását figyeltük meg a liofilizálás hatására. A betegek mintáinak esetében e két komponens relatív

menyiség mindhárom betegnél emelkedett FMT-t követően. A két említett komponens azonosítására nem végeztünk vizsgálatot (11. és 12. ábra).

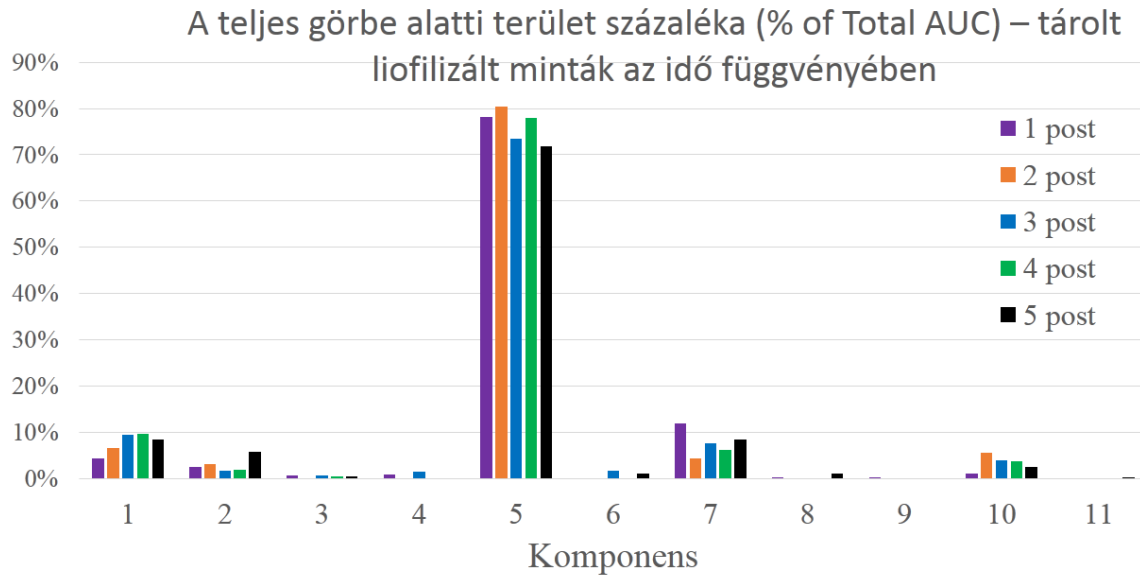


11. ábra. A donor székletének fehérje-összetételei liofilezés előtt (piros) és után (fekete).

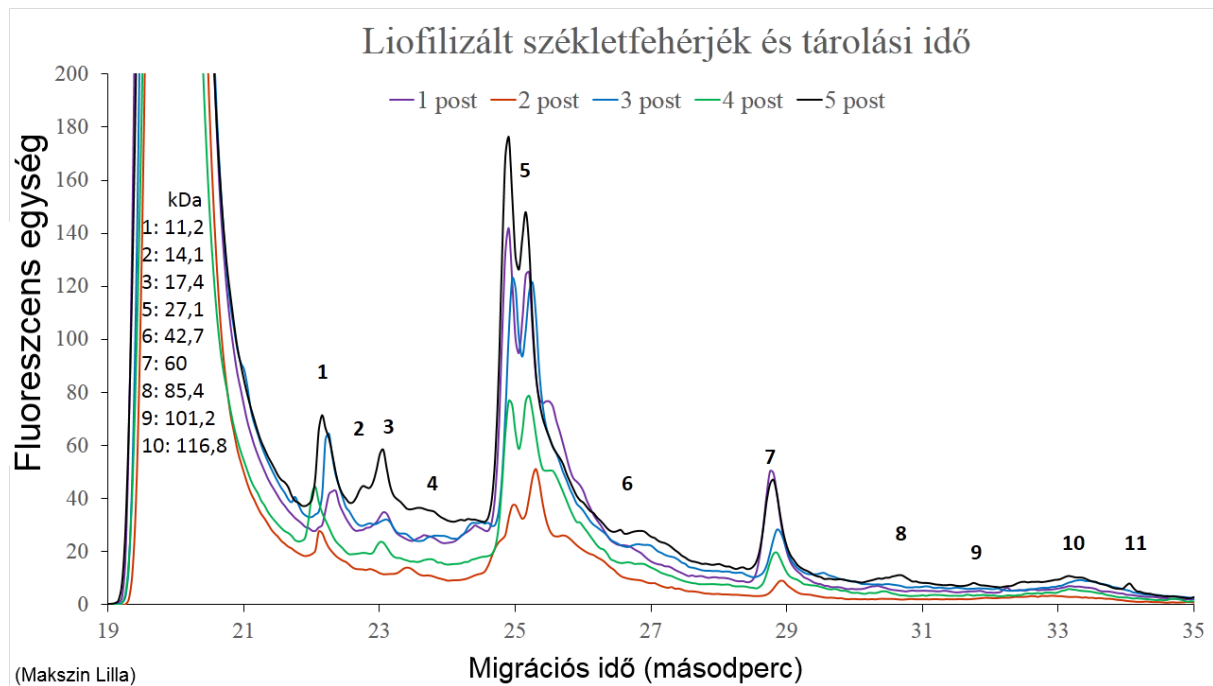


12. ábra. A donor széklet fehérje-összetételének vizsgálata liofilezés előtt (piros) és után (fekete).

A -80°C-on tárolt minták komponenseinek AUC% változásai a tárolási idővel összevetve nem tűnnek következetesnek (13. és 14. ábra).



13. ábra. A donor székletének fehérje-összetételei a tárolási idő függvényében.

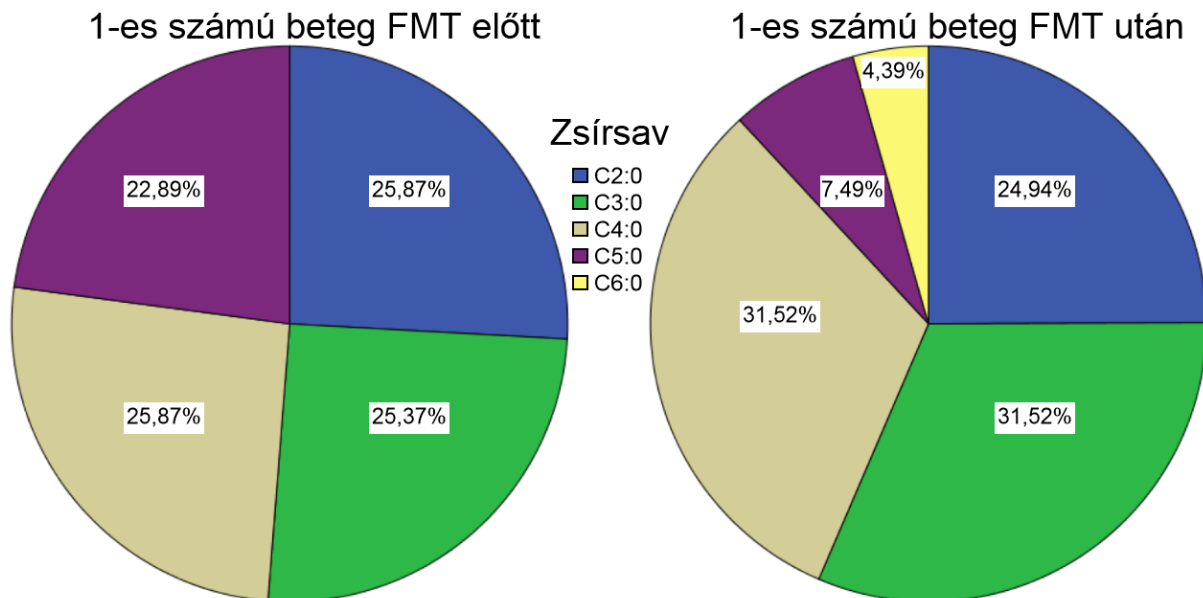


14. ábra. A donor széklet fehérje-összetételének vizsgálata a tárolási idő függvényében.

## 6.5. SCFA vizsgálat eredményei

A rövid szénláncú szabadzsírsavak vizsgálatai több szempontból és érdekesnek bizonyultak. Egyrészt a 6 egészséges önkéntes (beleértve a donort is) közül ötven diverzebb SCFA-összetételű széklettel rendelkeztek, mint az FMT előtt álló CDI-s betegek. Másrészt FMT-t követően a donor székletében is megfigyelhető diverzitás felé való eltolódást találtunk a páciensek mintáinak vizsgálata során. Különösen a C4:0 (vajsav) aránya növekedett a FMT-t követően.

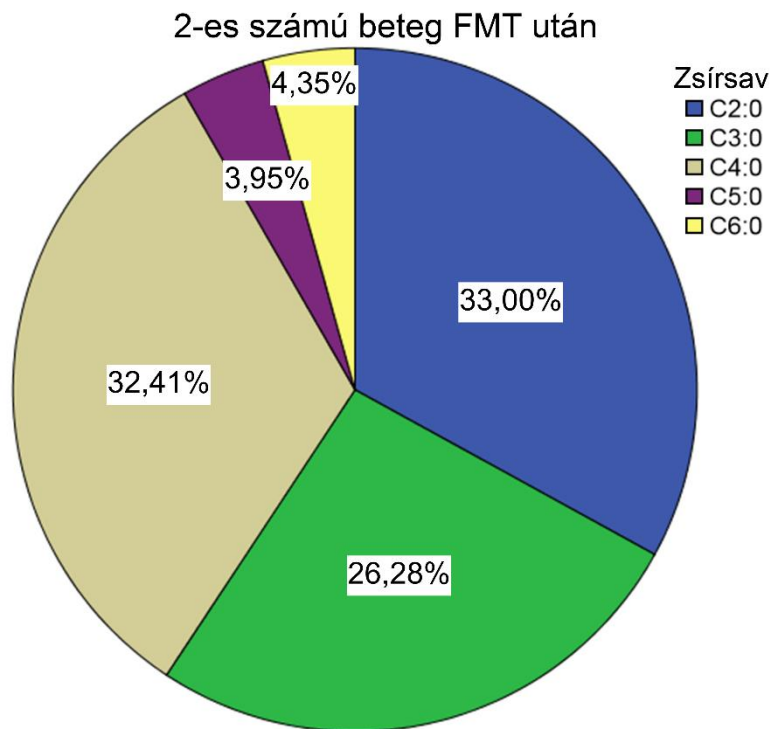
Az 1-es számú beteg FMT utáni mintájában a C4:0 és a C5:0 (valeriánsav) komponensek aránya nagyobb, a C3:0 (propionsav) és C6:0 (kapronsav) komponensek aránya kisebb volt, mint az FMT-t megelőzően (15. ábra).



15. ábra. SCFA-összetétel az 1-es számú beteg FMT előtti és utáni mintáiban.

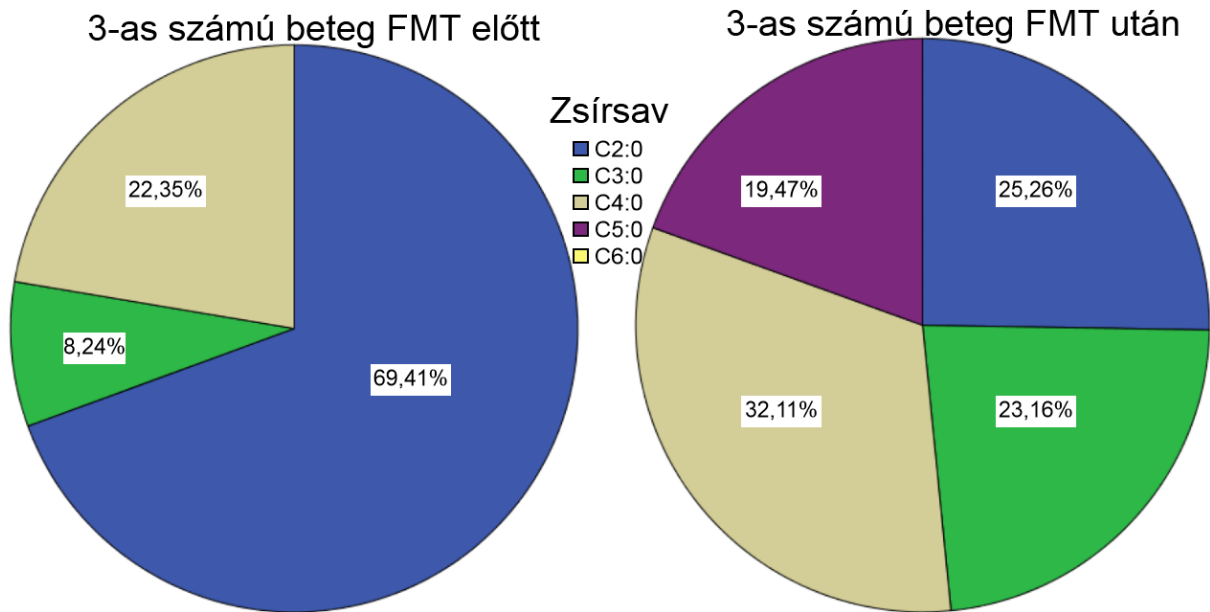


A 2-es számú beteg FMT előtti mintájának GC-MS méréséből sajnos nem kaptunk használható adatokat. A rendelkezésre álló minta híg és nyákos volta nehézkessé tette a homogenizálást, így az analizálásra szánt mintában nem mutatkoztak csúcsok a kromatogramon. Az FMT utáni mintában a C2:0, C3:0 és C4:0 komponensek nagyjából azonos arányt mutattak, míg a C5:0 és C6:0 komponensek aránya alacsony volt a transzplantációt követően (16. ábra).



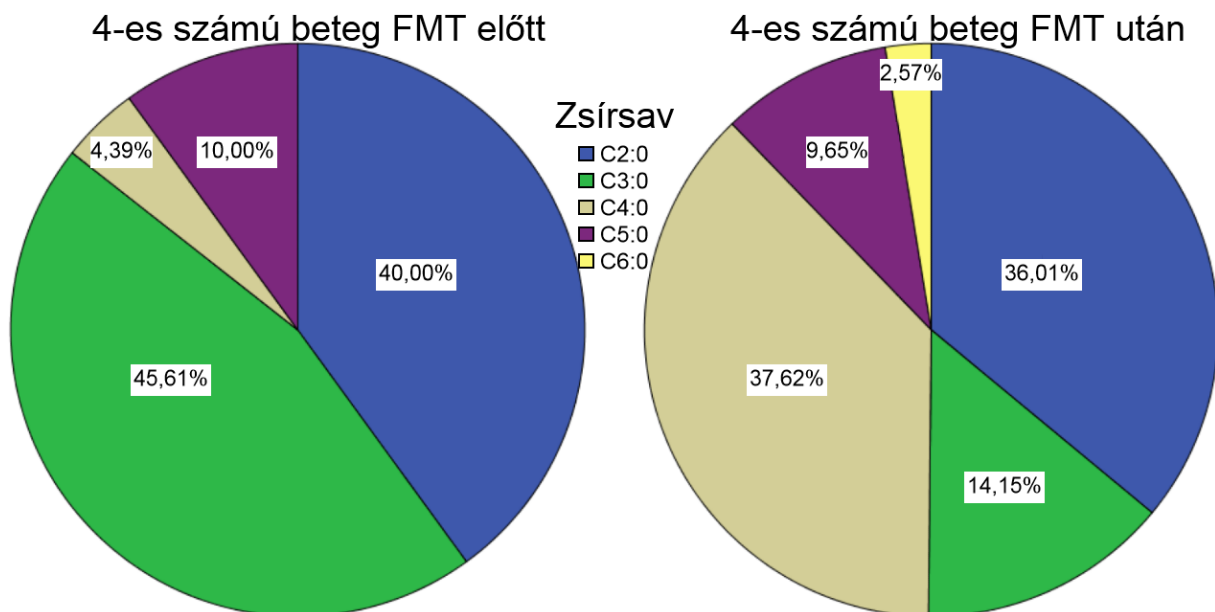
16. ábra. SCFA-összetétel a 2-es számú beteg FMT utáni mintájában.

A 3-as számú beteg FMT előtti mintájában a C2:0 komponens jelentős dominanciáját láttuk, a beavatkozás utáni minta ezzel szemben rövid szénláncú szabad zsírsavak részarányai közel azonosá váltak (17. ábra).



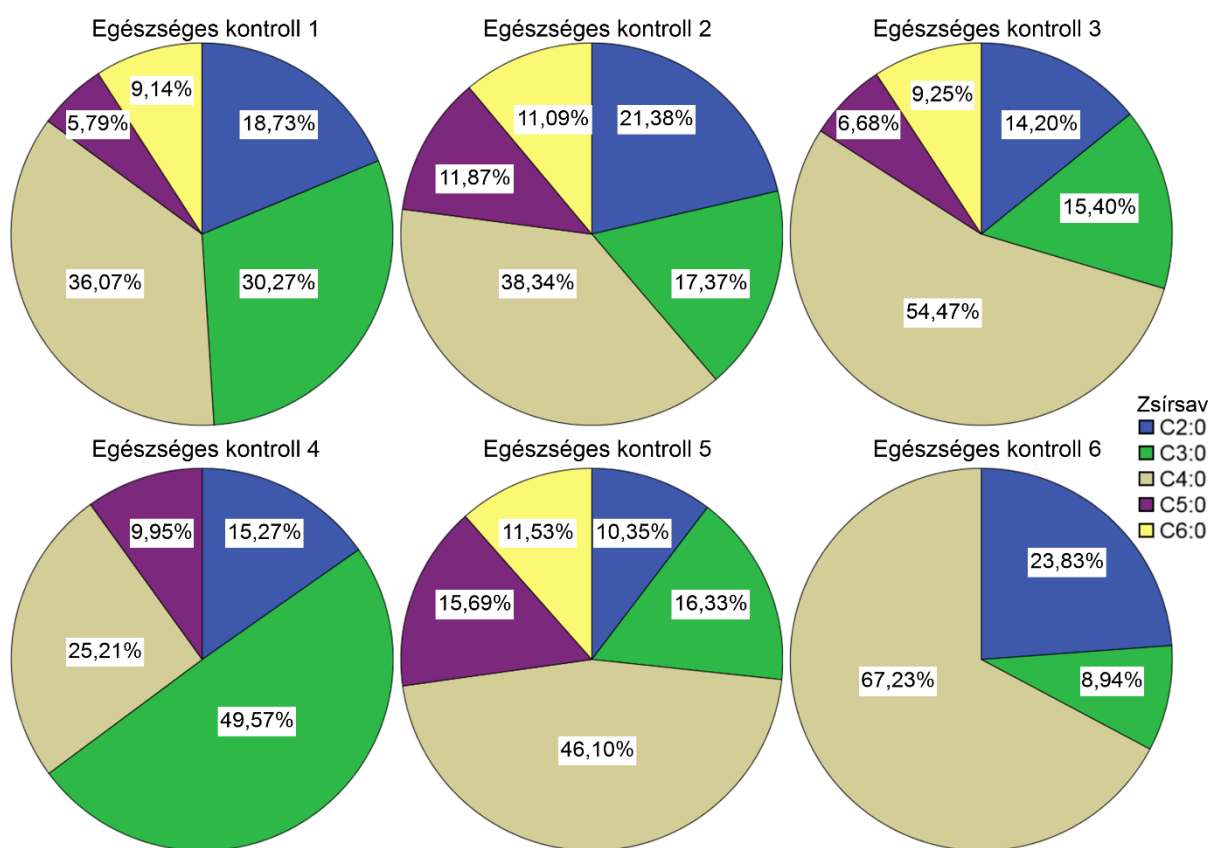
17. ábra. SCFA-összetétel a 3-as számú beteg FMT előtti és utáni mintáiban.

A 4-es számú beteg esetében a C4:0 komponens arányának növekedése és a C3:0 komponens arányának csökkenése volt látható (18. ábra).



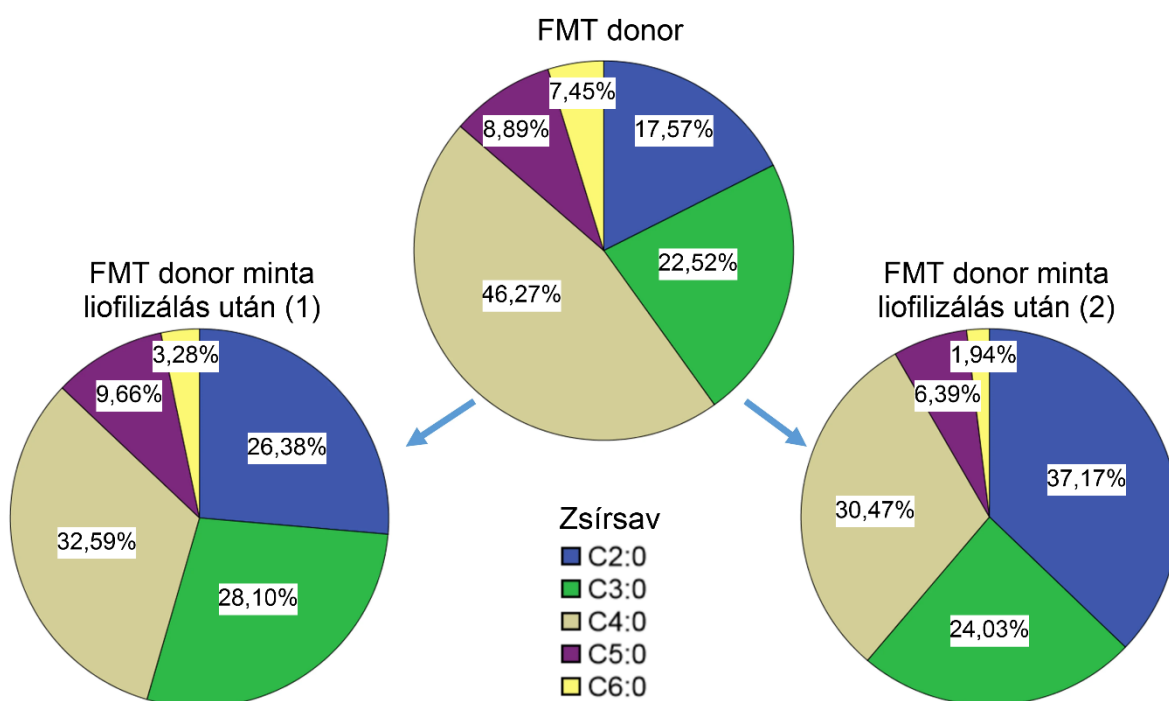
18. ábra. SCFA-összetétel a 4-es számú beteg FMT előtti és utáni mintáiban.

Az egészséges csoport mintái között a C4:0 (vajsv) 6-ból 5 esetben mutatkozott domináns komponensnek (19. ábra).



19. ábra. Egészséges kontrollok székletének SCFA-összetételei.

Mérési eredményeink szerint a liofilizálás során csökkent a C4:0 részaránya a donorszékletben (20. ábra).

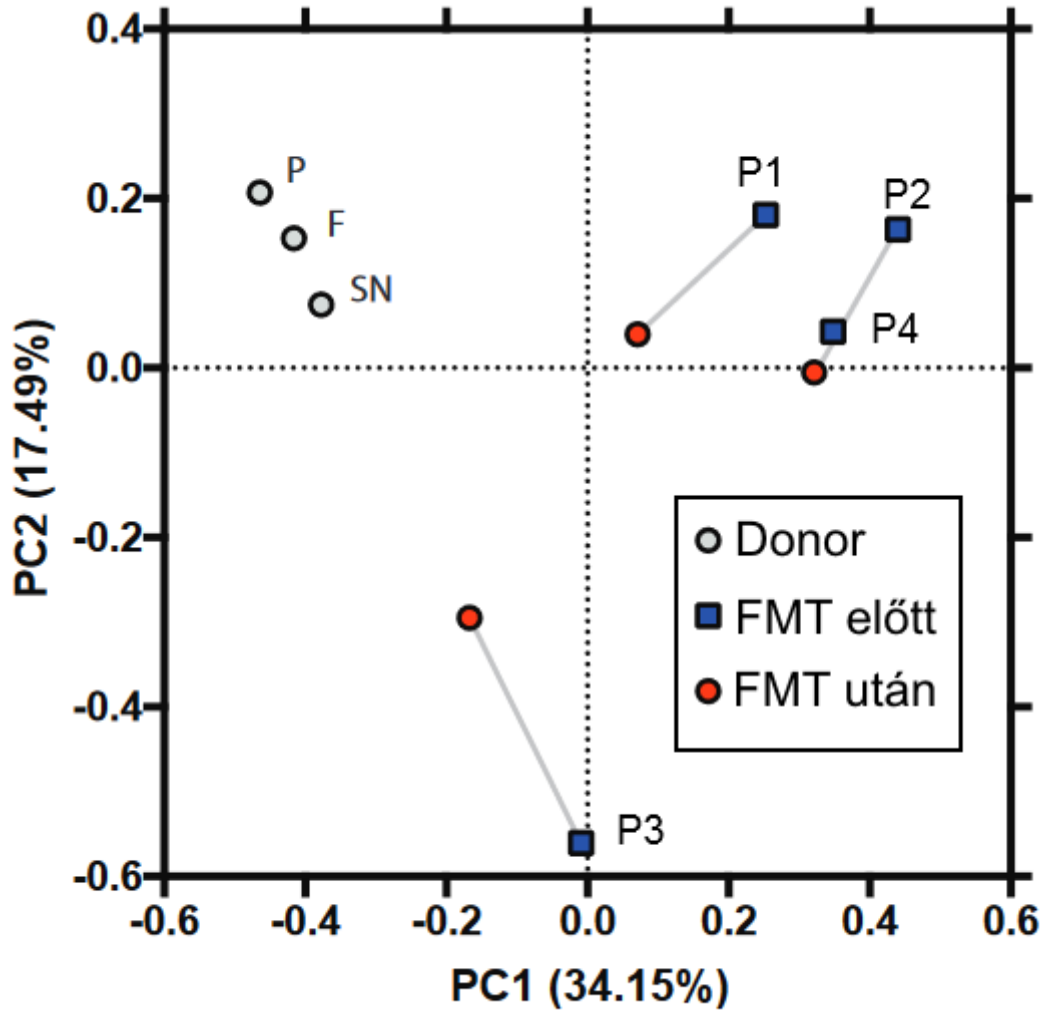


20. ábra. A donorszéklet SCFA-összetételének változásai liofilizálást követően.

## 6.6. Metagenom vizsgálat (16S rRNS) eredményei

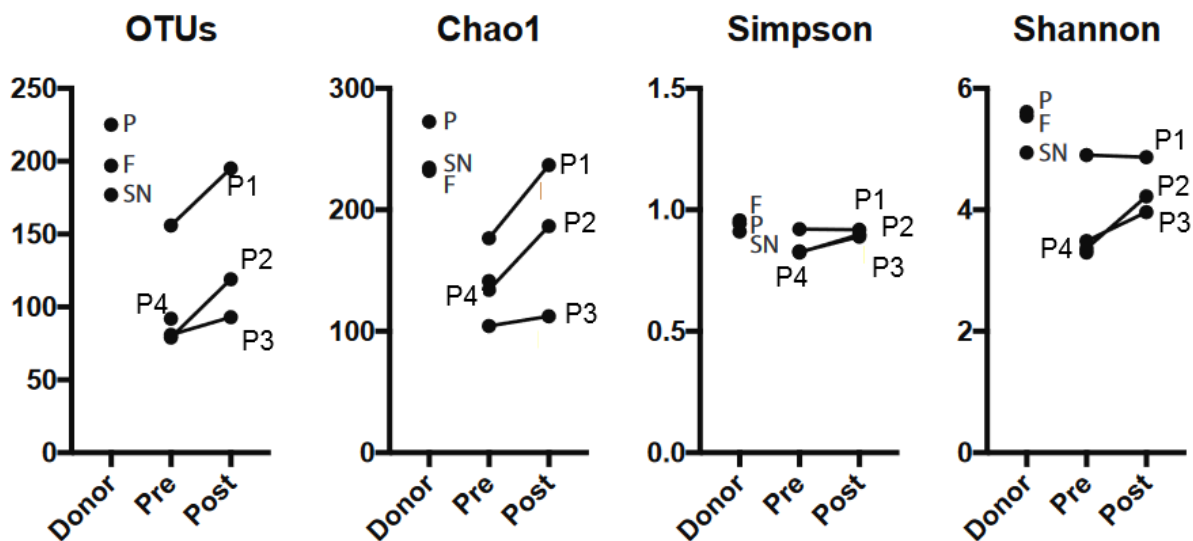
A metagenom vizsgálatát 16S riboszómális RNS analízisével végeztük a négy már tárgyalt beteg és a donor natív székletéből, illetve az FMT során használt liofilizált felülúszóból és liofilizált üledékből. A *4-es számú beteg* FMT utáni mintáját nem sikerült olyan mértékben szekvenálni, hogy az eredmények összehasonlíthatóak legyenek a többi minta esetében kapottakkal.

Az interindividuális különbségek  $n=4$  esetszám mellett nem eredményeztek statisztikailag szignifikáns taxonómiai különbségeket. A PCoA eredményei szerint azonban az FMT utáni minták hasonlóbbak voltak a donor széklethez. Az alábbi ábrán a donor mintájához viszonyított távolságok láthatók (21. ábra).



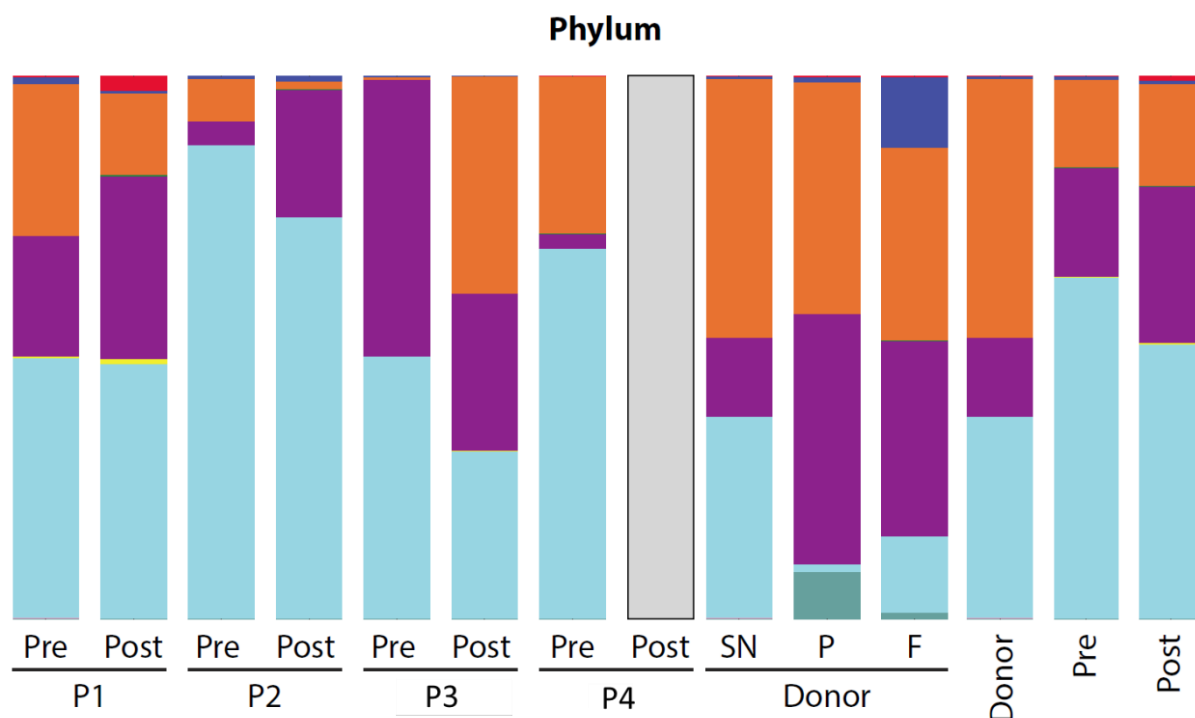
21. ábra. Donor és páciens minták béta diverzitás Principal Coordinate Analysis (PCoA) eredményei. SN: Supernatant (felülúszó), P: Pellet (üledék), F: Native faeces (feldolgozatlan széklet), P1-P4: páciens minták.

Ennek megfelelően az alfa diverzitás is közeledést mutat a donornál tapasztalhatóhoz FMT-t követően, amely az 22. ábrán a diverzitás mértékének növekedésében látható.

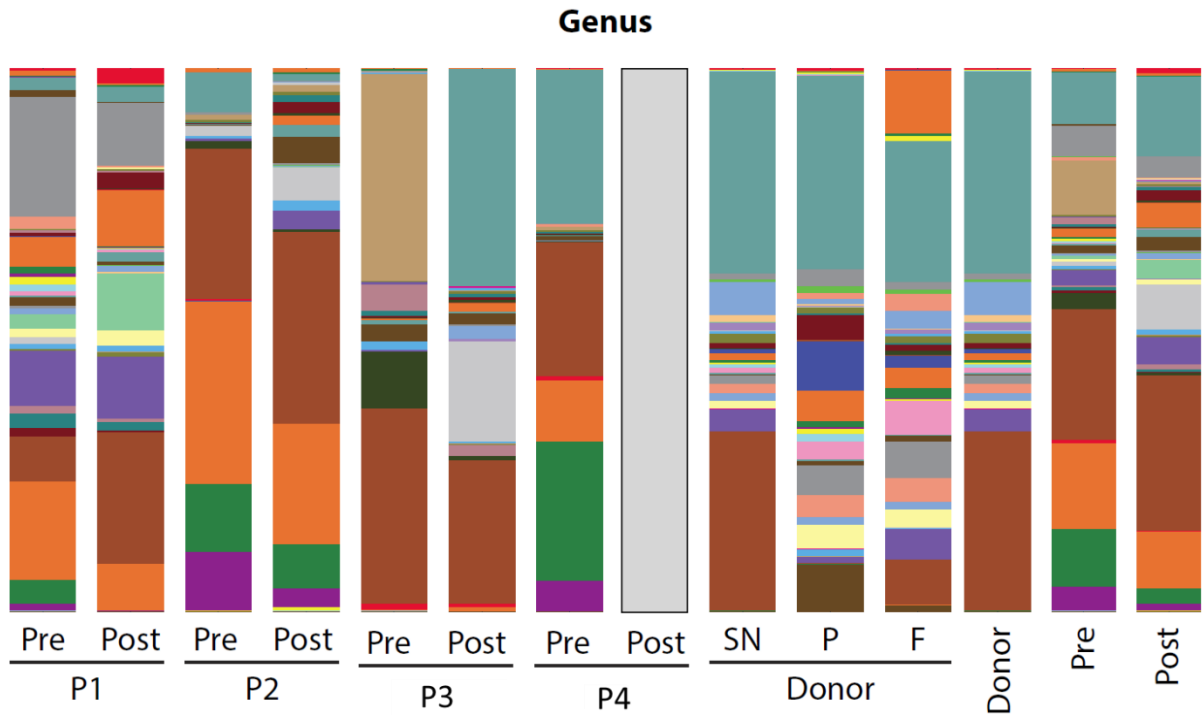


22. ábra. A donor és páciens minták alfa diverzitás analízise (OTU, Chao1, Shannon, Simpson) SN: Supernatant (felülúszó), P: Pellet (üledék), F: Native faeces (feldolgozatlan széklet), P1-P4: páciens minták.

A liofilizált minták és a natív széklet taxonómiai áttekintése az egyes taxonok relatív részarányának változásait mutatja (23. és 24. ábra, színek az 1. mellékletben).



23. ábra. Phylum szintű összefoglaló (az egyes törzseket színek jelölik.) A két utolsó oszlop az FMT előtti és utáni minták átlagait ábrázolja, Pre: FMT előtt, Post: FMT után, SN: Supernatant (felülúszó), P: Pellet (üledék), F: Native faeces (feldolgozatlan széklet), P1-P4: páciens minták.



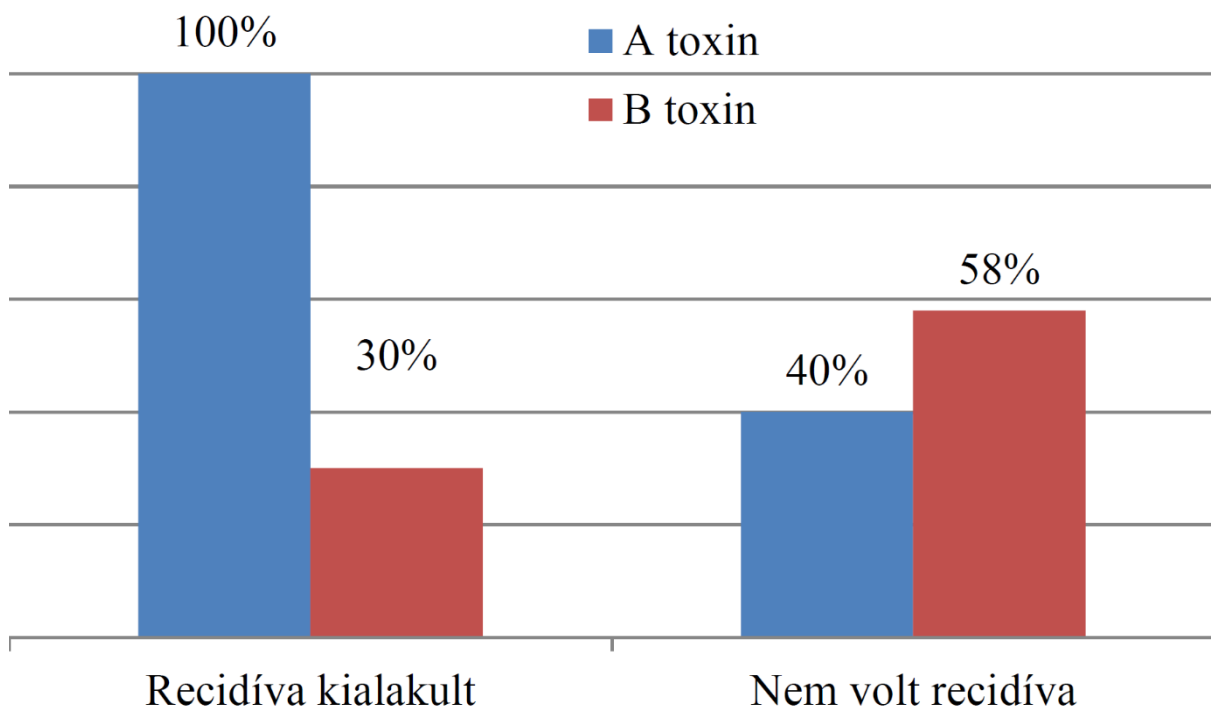
24. ábra. Genus szintű összefoglaló (a színek az egyes nemzetségekre utalnak.) Az utolsó két oszlop az FMT előtti és utáni minták átlagait ábrázolja, Pre: FMT előtt, Post: FMT után, SN: Supernatant (felülúszó), P: Pellet (üledék), F: Native faeces (feldolgozatlan széklet), P1-P4: páciens minták.

A taxonometriai eredmények részletes leírása meghaladja a disszertáció kereteit, emellett az alacsony esetszámot tekintve a részletekbe menő elemzés relevanciája megkérdőjelezhető.

## 6.7. Toxin ellenes antitest eredmények

A *Clostridioides difficile* A és B toxin ellenes antitest titer vizsgálatát 47 CDI miatt kezelt betegnél végeztük el. Az ELISA vizsgálatok azt mutatták, hogy azon betegek körében, ahol később kialakult recidíva, minden esetben alacsony volt az A toxin ellenes antitest titer. Ebben a csoportban a B toxin ellenes antitest titer csak 30%-ban volt alacsony. Azon betegek, akiknél nem alakult ki recidíva, 40%-ban volt alacsony az A, 58%-ban a B toxin ellenes antitest titer (25. ábra).

Az alacsony és magas titer közötti határértéket a kontrollcsoportban mért érték alapján határozták meg: az A toxin esetében a határérték 0,2-es optikai denzitási érték (450nm-en mérve), a B toxin esetében 0,03-as optikai denzitási érték (450 nm) volt.

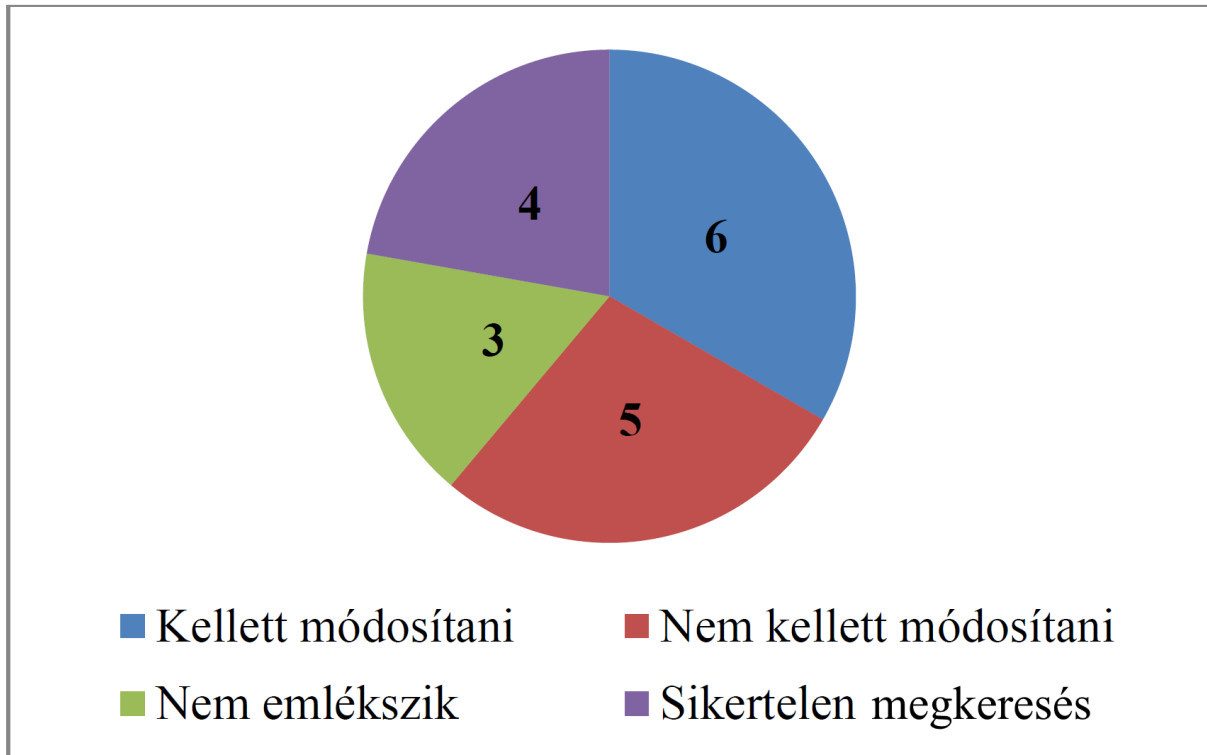


**25. ábra.** Alacsony A toxin (kék) és B toxin (piros) ellenes antitest titer előfordulása azon betegeknél, akiknél később kialakult, illetve azoknál, akiknél később sem alakult ki recidíva.



### 6.8. Inzulinszükséglet vizsgálati eredményei FMT-t követően

Az inzulinszükséglet csökkenésének vizsgálatához megfelelő 18 beteget találtunk megfelelőnek az FMT-n átesettek között. Tizenöt beteget, vagy hozzátartozójukat sikerült elérnünk, de csak összesen 11 esetben kaptunk felhasználható információt. Hat beteg esetében csökkenteni kellett az inzulindózist, 5 esetben pedig nem volt erre szükség (26. ábra).



**26. ábra.** Retrospektív felmérés az FMT-t követő inzulinszükséglet változásának vizsgálatára.

## 7. MEGBESZÉLÉS

Az ismertett klinikai vizsgálat és az ahhoz kapcsolódó mérések, kísérletek a székletátültetés módszertanának fejlesztése jegyében zajlottak. Bár a kutatási téma *Clostridioides difficile* fertőzések terápiája volt, számomra a személyes motivációt az FMT egyéb területeken feltételezett pozitív hatásai adták, elsősorban a mikrobiom inzulinrezisztenciára gyakorolt befolyása. A választott téma keretei és a jelenleg érvényes terápiás protokollok nem adtak lehetőséget más betegcsoportok közvetlen vizsgálatára, azonban a leírt kapszulázási munkafolyamat lényegesen egyszerűbbé és rugalmasabbá tette a székletátültetést, új eszközt adva más felhasználási módok felderítéséhez. A liofilizált, kapszulázott széklet segítségével elkerülhető a nasogastricus, vagy nasojejunális szonda használata, ezáltal az elkövetkező klinikai vizsgálatok tervezésénél kevesebb rizikóval kell számolnunk, emellett a kapszulák bevétele egyáltalán nem megterhelő a betegek számára. Javul a beavatkozások tervezhetősége, helyhez kötöttségük pedig csökken. Ezek a tényezők remélhetőleg a vizsgálatokhoz szükséges engedélyek egyszerűbb megszerzését eredményezik majd, és a kutatás felgyorsulásához vezetnek a közeljövőben.

Vizsgálataink alapján a széklet transzplantációt az alábbiak szerint célszerű végezni:

- A feltételeknek megfelelő, és a szükséges szűrővizsgálatokon átesett donoroktól a várható felhasználás függvényében rendszeresen kérünk székletmintát.
- A székletminta feldolgozása a székletürítést követő 6 órán belül kezdődjön meg.
  - o A székletminta feldolgozását a jelen disszertációban leírt metodika alapján javasoljuk.
  - o '00' méretű kemény zselatin kapszulák védőbevonat nélküli kapszulák megfelelően használhatóak.
  - o A liofilizált mintákat a felhasználásig tároljuk -20°C-on.
  - o A liofilizált, -20°C-on tárolt minta 6 hónapon belül megfelelő hatékonysággal felhasználható
- A pácienseknél a beavatkozást megelőző napon állítsuk le a metronidazol, vagy vankomicin kezelést, emellett kezdjük protonpumpa-gátló terápiát.
  - o A bélmotilitás fokozására és a hányás veszélyének csökkentésére adjunk metoklopramidot.
  - o A betegek a transzplantáció napján a kapszulák bevétele előtt ne egyenek.
  - o A betegek a kapszulák bevitelét követően legkorábban 2 óra múlva egyenek, ez idő alatt maradjanak legalább félülő testhelyzetben.

- A sikeres beavatkozást követően 6 hónapos utánkövetést javasolunk.

Az általunk alkalmazott, liofilizált felülúszóval töltött kapszulák közel sem voltak baktériummentesek, azonban bennük lényegesen alacsonyabb csíraszámokat mértünk, mint a liofilizált üledéket tartalmazókban, vagy a korábbi eljárás szerint beadott teljes székletben. Igazán izgalmas kérdés, hogy valóban a beadott baktériumok állnak-e a kolonizációs rezisztencia helyreállításának hátterében, még izgalmasabb kérdés pedig, hogy ha nem a baktériumok, akkor mégis mi? Röviddel klinikai vizsgálatunk megkezdését követően jelent meg egy publikáció, mely mechanikai szűrés segítségével előállított, baktériummentes székletkészítmény hatékony alkalmazásáról számolt be [95]. Ez azt sugallja, hogy nem a beadott baktériumok, sem azok spórái, hanem a széklet ezeknél kisebb méretű alkotói lehetnek felelősek a hatásért. A mi kioltási eredményeink is azt mutatták, hogy 6 hónap után ugyan a liofilizált felülúszók életképes baktériumot, vagy baktériumspórát nem tartalmaztak, CDI-ben mégis továbbra is hatékonyak voltak. Ezen baktérium-túlélési eredmények támpontot adnak arra vonatkozóan, hogy az 1-2, esetleg 6 hónappal később felhasznált kapszulák (melyeket addig -20°C-on tároltunk) mennyivel tartalmazhattak kevesebb életképes baktériumot, mint a frissen felhasználtak. A közelmúltban közölt, meghatározott baktériumtörzsekkel elért eredmények ezzel szemben azt sugallják, hogy egyes törzsek adása igenis hatékony [16, 17]. Ez utóbbi vizsgálatok esetében nem találtam egyértelmű leírást arra vonatkozóan, hogy a kiválasztott törzseken kívül mi maradhatott még a beadandó készítményben. Ezeket a törzseket ugyanis nem tenyésztés útján, hanem donorszéklet tisztításával például etanol segítségével nyerték.

Saját eredményeink szempontjából azért is érdekes kérdések ezek, mert (bár ennél az esetszámnál statisztikailag nem szignifikáns) eltérést találtunk a felülúszó és az üledék hatékonysága között, az előbbi javára. A két készítmény liofilizálás előtti térfogatai 7:3 (felülúszó: üledék) arányban oszlottak meg, tehát minden olyan komponens, amely a centrifugálás hatására nem került a makroszkóposan üledékként meghatározott frakcióba, az a liofilizált felülúszóban nagyobb mennyiségben van jelen. Az általunk használt táptalajokon tenyészthető baktériumok és gombák vonatkozásában kaptunk információt az FMT során bevitt mikroorganizmusok egy részéről, a vírusok mennyiségét és minőségét azonban egyáltalán nem vizsgáltuk. Tekintettel ez utóbbiak átlagos molekulatömegére, valószínűleg jelentős mennyiség került transzplantálásra, a felülúszó esetében megint csak nagyobb mennyiségben, mint az üledéket használva. A metagenomikai vizsgálatok segítségével

számos új vírust fedeztek fel [96], de már ezt megelőzően is zavarba ejtően nagy diverzitással kellett számolni. Az interakciók felderítése számos önálló disszertáció alapjául szolgálhat.

Függetlenül attól, hogy pontosan mely mikrobák, vagy esetleg más komponensek felelősek az FMT CDI-ben kiváltott hatásáért, a mikrobiom összetétele megváltozik a beavatkozás hatására. Az alacsony esetszám (három adatpár) nem teszi lehetővé messzemenő következtetések levonását a kapott eredményekből. (Anyagi forrásaink összesen 11 minta elemzésére voltak elegendők.) Az összesítő ábrákon ugyanakkor látszik az FMT hatása mind alfa, mind béta diverzitás tekintetében. Különösen a recidiváló esetekben lett volna érdekes a transzplantációt követő több időpontban történő mintavétel és azok metagenomikai vizsgálata. Az elvégzett szekvenálás csak phylum szintű azonosítást tett lehetővé, azonban a metabolikus betegségekben többek szerint [61, 65, 67, 71] szerepet játszó *Akkermansia* törzseket ezek segítségével is sikerült azonosítani mind a donor, mind néhány beteg székletében. A liofilizált minták és a natív széklet taxonómiai áttekintése az egyes taxonok relatív részarányának változásait mutatja, amely változás a minta-előkészítés, de a liofilizálás következménye is lehet.

A mikrobiom megváltozása nyomon követhető a székletben található mikroorganizmusok életterét alkotó egyéb összetevőket tekintve is [51, 60, 97, 98]. Az alacsony esetszám mellett az újra és újra előforduló kieső minták e vizsgálatok során is megnehezítik a tanulságok levonását. Irodalmi [81], és saját adataink alapján valószínűnek tűnik, hogy a rövid szénláncú szabad zsírsavak egészséges egyénekben nagyobb diverzitást és a C4:0 (vajsav) magasabb részarányát mutatják. Azt is láthattuk, hogy FMT-t követően a donor SCFA-profiljához hasonlóbbá válnak a páciensek mintáinak zsírsavprofiljai. A jelenség hátterében az SCFA termelő baktériumok újbóli elszaporodása állhat, de nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget sem, miszerint a transzplantátummal bevitt SCFA-k jelentősebb mértékben hozzájárulnak a kolonizációs rezisztencia helyreállításához.

A székletben található fehérjék közül metabolitok és antitestek is lényegesek lehetnek a mikrobiom szimbiózisában [99, 100]. Ezzel párhuzamosan egy baktérium által szekretált metabolit a bélfalon átjutva hírvivő molekulaként a szervezet egyéb folyamataira is hatással lehet [81, 101]. Az antitestek szerepet játszhatnak egyes mikroorganizmusokkal, vagy azok termékeivel szemben, mint például a *Clostridioides difficile* A és B toxin esetében. Átfogó proteomikai vizsgálat végzésére nem volt erőforrásunk, azonban mikrochip elektroforézis segítségével alapszintű képet kaptunk a minták fehérje összetételéről. FMT-t követően két komponens relatív részarányának változásait figyeltük meg, ugyanez a két komponens

mutatott változást liofilizálás hatására is. A kapott adatokból úgy tűnik, a tárolás (legalábbis -80°C-on) nem befolyásolja a fehérje összetételt. Későbbi kutatás részeként érdemes lenne (például ELISA segítségével) azonosítani a két említett komponenst. Eredményeink alapján egyes fehérjék titerének vizsgálata segíthet megjósolni a későbbi recidívák kialakulását. Elsősorban a *Clostridioides difficile* A toxin elleni antitest kezelés során mért alacsony titer tűnik ígéretesnek ezen a téren, habár az irodalmi adatok közel sem kecsegtetnek 100%-os prediktív értékkel [102].

Metaproteomikai vizsgálatok segíthetnek a nagyobb összefüggések megértésében, például, hogy mi a szerepe a mikrobiomnak az inzulinháztartásban. A metagenomika és metaproteomika által nyert adatok birtokában világossá válhat, hogy milyen változások vezethetnek a mikrobiom megváltozását követően például az inzulinrezisztencia csökkenéséhez. Az inzulinigény változására vonatkozó retrospektív felmérésünk csak az FMT-n átesett pácienseket vette alapul, holott a mikrobiom bármely antibiotikus kezelés hatására megváltozik. Ez a klinikai gyakorlatban antibiotikumok alkalmazását kísérő vércukorszint-kilengések képében jelenik meg, így célszerű lett volna a metronidazol, vagy vankomicin hatására meggyógyultak körére is kiterjeszteni a felmérést.

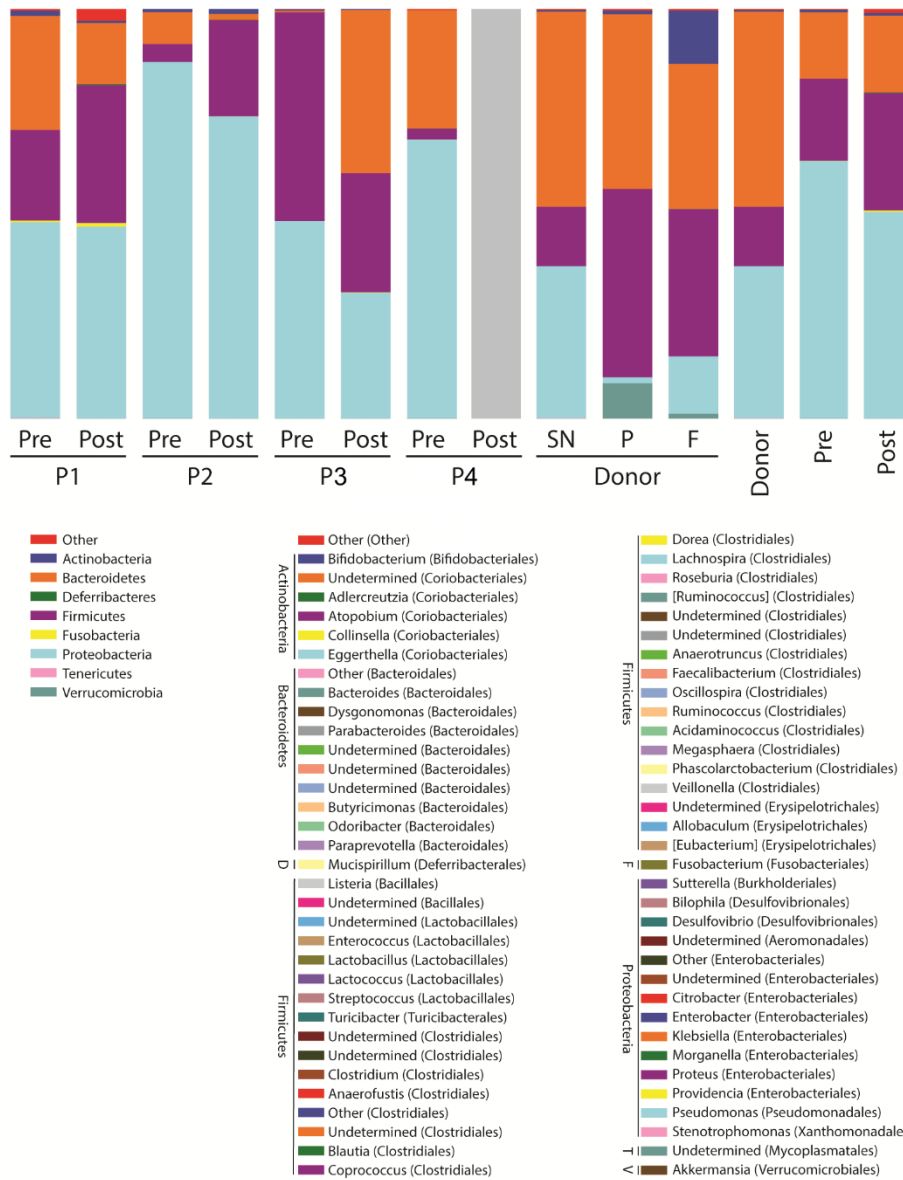
A jelenlegi aktuális terápiás ajánlások egyike sem említi első helyen a székletátültetést sem CDI, sem más betegség esetében. Ugyan több centrumban már rutinszerűen alkalmazzák visszatérő CDI kezelésében, ebben a betegségben valószínűleg a jövőben sem lesz elsőként választandó kezelési mód. Minden igyekezet ellenére a beadandó minta összetettsége mindig magában hordozza egy iatrogén fertőzés veszélyét, ahogyan arra az elmúlt években sajnos volt is példa [7, 8]. Ilyen veszéllyel antibiotikumok esetében nem kell számolni, a gyártó pontosan ellenőrizni tudja, mi kerül a készítménybe. A két megközelítés között féltúton helyezkednek el az ismert összetételű baktériumkoncentrátumok [16, 17]. Ha a közeljövőben valami, hát ezek vehetik át a biztonságos, önmagában olcsó, de kevésbé hatékony metronidazol, esetleg vankomicin helyét a terápiás eszköztárban.

A baktériummentes készítmények hatékonysága ugyanakkor rávilágít a valószínűleg leglényegesebb, jelenleg még szürke zónára. Ha a CDI fertőzések egy része gyógyítható baktériummentes székletkészítménnyel, akkor a baktériumkoncentrátum sikertelen eseteinek hátterében egy olyan komponens hiánya, elégtelen mennyisége állhat, amelyet a koncentrátumok előállításánál során előltek, denaturáltak, vagy kihígítottak. Ez a komponens a teljes székletben értelemszerűen megtalálható, így valószínű, hogy a székletátültetés továbbra is a protokoll részét fogja képezni. Az esetek egy részében azonban sem antibiotikum, sem

teljes széklet alkalmazása nem vezetett gyógyuláshoz. E csoport létezése talán a nem megfelelő donorválasztásnak, de mindenképpen a mikrobiomról rendelkezésünkre álló információk hiányosságainak az eredménye.

A *Clostridioides difficile* fertőzés az egyetlen betegség, melyben jelenleg rutinszerűen alkalmaznak székletátültetést, így a legtöbb információ is erről a területről származik. Más bélbetegségekben, például ulceratív colitisben (CU), vagy Crohn betegségben is zajlanak klinikai vizsgálatok. Több helyen már jelentős esetszámmal tartanak, az evidenciák azonban még váratnak magukra. Egyedi esetleírások [103-105] alapján – ahogyan azt egy betegünkénél mi is láttuk – az FMT CU-ban javíthat a beteg állapotán. Szem előtt kell azonban tartani, hogy ezek mind egyedi megfigyelések, a betegek alapvetően más indikáció alapján részesültek transzplantációban, így az eredmények fenntartással kezelendők. Az evidenciák hiánya és az általánosan alkalmazott FMT-metodika együttesen hátráltatják a terület további kutatását. Reményeink szerint a kapszulák alkalmazása elhárít egy sor, jelenleg fennálló akadályt mind a betegek (megterhelő beavatkozás, ellenérzések), mind az engedélyezés (beavatkozás rizikói), mind az infrastruktúra (beavatkozás eszköz- és időigénye, helyhez kötöttsége) tekintetében.

## 8. MELLÉKLET



1. melléklet. A phylum és genus szintű összefoglalók színekódja.

## 9. PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

2019. december - von Bechtolsheim Felix, Varga Adorján, Szereday László, Polgár Beáta, Balassa Tímea, Kocsis Béla, Péterfi Zoltán, Mikó Éva: *Development of a new serological assay for the diagnosis of Clostridium difficile infections with prognostic value*. JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS 167 Paper: 105777, 6 p. (Q3, IF: 1,707)
2021. március - Mintál Kitti, Tóth Attila, Hormay Edina, Kovács Anita, László Kristóf, Bufa Anita, Marosvölgyi Tamás, Kocsis Béla, Varga Adorján, Vizvári Zoltán, Cserjési Renáta, Péczely László, Ollmann Tamás, Lénárd László, Karádi Zoltán: *Novel probiotic treatment of autism spectrum disorder associated social behavioral symptoms in two rodent models*. SCIENTIFIC REPORTS. doi: 10.1038/s41598-022-09350-2 (Q1, IF: 4,380)
2021. június - Varga Adorján, Kocsis Béla, Sipos Dávid, Kása Péter, Vigvári Szabolcs, Pál Szilárd, Dembrovszky Fanni, Farkas Kornélia, Péterfi Zoltán: *How to Apply FMT More Effectively, Conveniently and Flexible – A Comparison of FMT Methods*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. doi: 10.3389/fcimb.2021.657320 (Q1, IF: 5,293)
2022. március - Mintál Kitti, Tóth Attila, Hormay Edina, Kovács Anita, László Kristóf, Bufa Anita, Marosvölgyi Tamás, Kocsis Béla, Varga Adorján, Vizvári Zoltán, Cserjési Renáta, Péczely László, Ollmann Tamás, Lénárd László, Karádi Zoltán: *Novel probiotic treatment of autism spectrum disorder associated social behavioral symptoms in two rodent models*. SCIENTIFIC REPORTS 12 : 1 Paper: 5399 , 14 p. doi: 10.1038/s41598-022-09350-2 (Q1, IF: 4.379)
2023. január - Varga Adorján, Makszin Lilla, Bufa Anita, Sipos Dávid, Kása Péter, Pál Szilárd, Rosenstiel Philip, Sommer Felix, Kocsis Béla, Péterfi Zoltán: *Efficacy of lyophilised bacteria-rich faecal sediment and supernatant with reduced bacterial count for treating patients with Clostridioides difficile Infection – A novel method for capsule faecal microbiota transfer*. FRONTIERS IN CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY 13 Paper: 1041384 , 15 p. doi: 10.3389/fcimb.2023.1041384 (Q1, IF: 6,073)
2023. január - Péterfi Zoltán, Varga Adorján, Vigvári Szabolcs, Sipos Dávid. *Széklettranszplantáció aktuális hazai helyzete*; Central European Journal of Gastroenterology and Hepatology / Gasztroenterológiai És Hepatológiai Szemle. In press

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 21,832



Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

2018. február - Ács Kamilla, Kocsis Béla, Balázs Viktória Lilla, Kerekes Erika Beáta, Csikós Eszter, Varga Adorján, Krisch Judit, Vágvolgyi Csaba, Horváth Györgyi: *Illóolajok, illóolaj-komponensek és antibiotikumok együttes alkalmazásának lehetőségei légúti infekciók esetén*. Gyógyszerészet, ISSN 0017-6036 , 2018. (62. évf.), 2. sz., 73-79. p.
2018. július – Balázs Viktória L., Horváth Barbara, Varga Adorján, Ács Kamilla, Kerekes Erika, Kocsis Béla, Széchenyi Aleksandar, Krisch Judit, Horváth Györgyi: *A borsmenta, a fahéj, a kakukkfű és a szegfűszeg illóolajok különböző emulzióinak hatása Pseudomonas aeruginosa által képzett biofilm képződésre*. ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA, in press
2019. augusztus - Balázs Viktória Lilla, Horváth Barbara, Kerekes Erika, Ács Kamilla, Kocsis Béla, Varga Adorján, Böszörményi Andrea, U. Nagy Dávid; Krisch Judit, Széchenyi Aleksandar, Horváth Györgyi: *Anti-Haemophilus Activity of Selected Essential Oils Detected by TLC-Direct Bioautography and Biofilm Inhibition*. MOLECULES. doi: 10.3390/molecules24183301 (Q1, IF: 3.060)
2019. november - Horváth Barbara, Balázs Viktória L., Varga Adorján, Böszörményi Andrea, Kocsis Béla, Horváth Györgyi, Széchenyi Aleksandar: *Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on Streptococcus mutans biofilm treatment*. SCIENTIFIC REPORTS. doi: 10.1038/s41598-019-52998-6 (Q1, IF: 4.525)

Összesített impakt faktor: 29,417

Az értekezés témájához kapcsolódó kongresszusi előadások jegyzéke:

2017.10.28. Doktoranduszok a Klinikai Kutatásokban – Pécs

*Clostridium difficile* colitis terápiás lehetőségei

Varga Adorján, Kappéter Ágnes, Feiszt Zsófia, Sipos Dávid, Vigvári Szabolcs, Kocsis Béla, Mikó Éva, Szereday László, Felix von Bechtolsheim, Péterfi Zoltán

2018.05.18. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia – Pécs

Options and future possibilities in the treatment of *Clostridium difficile* infection

Adorján Varga, Béla Kocsis, Ágnes Kappéter, Zsófia Feiszt, Dávid Sipos, Szabolcs Vigvári, Éva Mikó, László Szereday, Felix von Bechtolsheim, Zoltán Péterfi

Absztraktkötet ISBN: 978-963-429-210-4

2018.08.31. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése – Pécs

Treatment options of *Clostridium difficile* infection: our latest experiences with fecal microbiota transplant

A. Varga, B. Kocsis, D. Sipos, Sz. Vigvári, P. Kása, Sz. Pál, É. Mikó, L. Szereday, F. Bechtolsheim, Z. Péterfi

2018.09.21. 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs – Szeged (CESPT2018)

Our experiences with freeze-dried fecal supernatant capsules in *Clostridium difficile* infection

Adorján Varga, Béla Kocsis, Dávid Sipos, Szabolcs Vigvári, Péter Kása, Szilárd Pál, Lilla Makszin, Péter Hantz, Tamás Kovács, Zoltán Péterfi

2018.10.27. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MedPÉCS)

Capsules against *Clostridium difficile* infections - our first experiences

Adorján Varga, Béla Kocsis, Dávid Sipos, Szabolcs Vigvári, Péter Kása, Szilárd Pál, Lilla Makszin, Péter Hantz, Tamás Kovács, Zoltán Péterfi

2019.09.13. Szintentartó tanfolyam oxiológia, Pécs

Az a csodálatos mikrobiom

Péterfi Zoltán, Sipos Dávid, Varga Adorján, Kocsis Béla

2019.03.29-31 FIGAMU, Balatonalmádi

A széklet-transzplantáció új kérdései

Varga Adorján, Kocsis Béla, Sipos Dávid, Vigvári Szabolcs, Kása Péter, Pál Szilárd, Makszin Lilla, Hantz Péter, Kovács Tamás, Péterfi Zoltán

2022.10.01. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 49. kongresszusa, Miskolc

A mikrobiom szerepe a bélbetegségekben és széklet transzplantáció

Péterfi Zoltán, Vigvári Szabolcs, Sipos Dávid, Varga Adorján, Kocsis Béla

Poszterek:

2018.03.23. - Fiatal Gasztroenterológusok Munkacsoportjának XIII. Kongresszusa -  
Balatonalmádi

Salmonellosist követő *Clostridium difficile* fertőzés – avagy a bélflóra nem felejt

Varga Adorján, Kocsis Béla, Kappéter Ágnes, Feiszt Zsófia, Sipos Dávid, Vigvári Szabolcs, Mikó Éva, Szereday László, Felix von Bechtolsheim, Péterfi Zoltán

2018.09.16-19. - The Human Microbiome, Heidelberg

Microbial and bacteriophage communities of food, fecal, and environmental samples

Ildikó Miklóssy, Adorján Varga, Ildikó Katalin Nagy, Maria Antoniadou, Mihály Óvári, Klára Pásztorné Huszár, Krisztina Kovács, Erzsébet Takács, Erwin Rosenberg, Béla Kocsis, Björn Rotter, Zoltán Péterfi, Tamás Kovács, Péter Hantz

2018. szeptember 20-22. - 12th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, Szeged

Enteric film coating of capsules with freeze-dried fecal supernatant in *Clostridium difficile* infection

Kása, P., Varga, A., Kocsis, B., Nagy, R., Péterfi, Z. , Pál, Sz.

2018.10.27. - Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (MedPÉCS)

Salmonellosis followed by *Clostridium difficile* infection

Adorján Varga, Béla Kocsis, Ágnes Kappéter, Zsófia Feiszt, Dávid Sipos, Szabolcs Vigvári, Péter Kása, Szilárd Pál, Lilla Makszin, Zoltán Péterfi

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezés létrejöttéért köszönettel tartozom témavezetőimnek, dr. Péterfi Zoltánnak és dr. Kocsis Bélának. Iránymutatásuk, tanításuk, türelmük és hozzáállásuk nem csak eredményessé, de élvezetessé is tette a közös munkát. Köszönöm prof. dr. Emőd Levente és dr. Szűcs György tanácsait, melyekkel a kutatás és a disszertáció írása során bőkezűen elláttak.

Köszönöm a PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet és az I. számú Belgyógyászati Klinika Infektológia Tanszék munkatársainak segítségét és támogatását. Köszönöm prof. dr. Reuter Gábornak, dr. Kerényi Mónikának és dr. Schneider Györgynek az Intézetben végzett munka támogatását. Kiemelten köszönöm dr. Sipos Dávidnak a bevezetést mintafeldolgozás mikéntjébe és dr. Meggyes Mátyásnak a közös mérések során megosztott kutatói tapasztalatokat.

A PTE ÁOK Bioanalitikai Intézet munkatársainak szintén meghatározó szerepet jutott az értekezés elkészültében, külön köszönöm a méréseket dr. Makszin Lillának és dr. Bufa Anitának, illetve dr. Farkas Kornéliának a biostatistika területén nyújtott segítséget.

Köszönöm dr. Pál Szilárd és dr. Kása Péter a kapszulázás módszerének kidolgozása során adott hasznos tanácsait.

A metagenomikai vizsgálatok elvégzéséért és az eredmények értelmezéséért köszönöm dr. Felix Sommer hozzájárulását.

Köszönöm továbbá dr. Ács Kamillának és dr. Balázs Viktória Lillának a közös projekteket és az azokhoz végzett mérések során megosztott tapasztalatokat.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családom és barátaim türelmét, támogatását, segítségét, illetve aktív közreműködését.

## 11. FORRÁSJEGYZÉK

### References:

1. Péterfi, Z., *A Clostridium difficile-fertőzések korszerű terápiája*. 2015 [http://medicalonline.hu/gyogyitas/cikk/a\\_clostridium\\_difficile\\_fertozesek\\_korszeru\\_terapiaj\\_a](http://medicalonline.hu/gyogyitas/cikk/a_clostridium_difficile_fertozesek_korszeru_terapiaj_a).
2. Jangi, S. and J.T. Lamont, *Asymptomatic colonization by Clostridium difficile in infants: implications for disease in later life*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010. **51**(1): p. 2-7 DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181d29767.
3. Nagy, G.G., et al., *Detailed methodological recommendations for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea with faecal transplantation*. Orvosi Hetilap, 2013. **154**(1): p. 10-19 DOI: 10.1556/oh.2013.29514.
4. Sholeh, M., et al., *Antimicrobial resistance in Clostridioides (Clostridium) difficile derived from humans: a systematic review and meta-analysis*. Antimicrob Resist Infect Control, 2020. **9**(1): p. 158 DOI: 10.1186/s13756-020-00815-5.
5. Zhang, F., et al., *Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation?* Am J Gastroenterol, 2012. **107**(11): p. 1755; author reply p.1755-6 DOI: 10.1038/ajg.2012.251.
6. DePeters, E.J. and L.W. George, *Rumen transfaunation*. Immunol Lett, 2014. **162**(2 Pt A): p. 69-76 DOI: 10.1016/j.imlet.2014.05.009.
7. DeFilipp, Z., et al., *Drug-Resistant E. coli Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant*. N Engl J Med, 2019. **381**(21): p. 2043-2050 DOI: 10.1056/NEJMoa1910437.
8. Zellmer, C., et al., *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Transmission via Fecal Microbiota Transplant*. Clin Infect Dis, 2021. **72**(11): p. e876-e880 DOI: 10.1093/cid/ciaa1486.
9. Kramer, A., I. Schwebke, and G. Kampf, *How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review*. BMC Infect Dis, 2006. **6**: p. 130 DOI: 10.1186/1471-2334-6-130.
10. Cooper, C.C., R.L. Jump, and T. Chopra, *Prevention of Infection Due to Clostridium difficile*. Infect Dis Clin North Am, 2016. **30**(4): p. 999-1012 DOI: 10.1016/j.idc.2016.07.005.
11. Chandrasekaran, R. and D.B. Lacy, *The role of toxins in Clostridium difficile infection*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(6): p. 723-750 DOI: 10.1093/femsre/fux048.
12. van Prehn, J., et al., *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for Clostridioides difficile infection in adults*. Clin Microbiol Infect, 2021. **27 Suppl 2**: p. S1-s21 DOI: 10.1016/j.cmi.2021.09.038.
13. Wilcox, M.H., et al., *Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection*. N Engl J Med, 2017. **376**(4): p. 305-317 DOI: 10.1056/NEJMoa1602615.
14. Merck Sharp & Dome Corp. 2016 [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/761046s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/761046s000lbl.pdf).
15. Vigvari, S., et al., *Faecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infections*. Infect Dis (Lond), 2015. **47**(2): p. 114-6 DOI: 10.3109/00365548.2014.969305.
16. McGovern, B.H., et al., *SER-109, an Investigational Microbiome Drug to Reduce Recurrence After Clostridioides difficile Infection: Lessons Learned From a Phase 2 Trial*. Clin Infect Dis, 2021. **72**(12): p. 2132-2140.
17. Feuerstadt, P., et al., *SER-109, an Oral Microbiome Therapy for Recurrent Clostridioides difficile Infection*. N Engl J Med, 2022. **386**(3): p. 220-229 DOI: 10.1056/NEJMoa2106516.
18. Dubberke, E.R. and M.A. Olsen, *Burden of Clostridium difficile on the healthcare system*. Clin Infect Dis, 2012. **55 Suppl 2**(Suppl 2): p. S88-92.
19. Ghantaji, S.S., et al., *Economic healthcare costs of Clostridium difficile infection: a systematic review*. J Hosp Infect, 2010. **74**(4): p. 309-18 DOI: 10.1016/j.jhin.2009.10.016.

20. Gulácsi, L., et al., [*Clostridium difficile* infection: epidemiology, disease burden and therapy]. *Orv Hetil*, 2013. **154**(30): p. 1188-93 DOI: 10.1556/oh.2013.29674.
21. Warny, M., et al., *Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe*. *Lancet*, 2005. **366**(9491): p. 1079-84 DOI: 10.1016/s0140-6736(05)67420-x.
22. Choi, H.K., et al., *Risk factors for recurrence of Clostridium difficile infection: effect of vancomycin-resistant enterococci colonization*. *J Korean Med Sci*, 2011. **26**(7): p. 859-64.
23. Cohen, S.H., 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**(5): p. 431-55 DOI: 10.1086/651706.
24. Youngster, I., 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**(11): p. 1515-22 DOI: 10.1093/cid/ciu135.
25. Kurcz, A., et al., *Az Országos Epidemiológiai Központ Módszertani levele a clostridium difficile fertőzések diagnosztikájáról, terápiájáról és megelőzéséről*. Országos Epidemiológiai Központ, 2016.
26. Venugopal, A.A. and S. Johnson, *Current state of Clostridium difficile treatment options*. *Clin Infect Dis*, 2012. **55 Suppl 2**(Suppl 2): p. S71-6 DOI: 10.1093/cid/cis355.
27. Srivastava, A., et al., *New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: 'switch region'*. *Curr Opin Microbiol*, 2011. **14**(5): p. 532-43 DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.030.
28. Mullane, K., *Fidaxomicin in Clostridium difficile infection: latest evidence and clinical guidance*. *Ther Adv Chronic Dis*, 2014. **5**(2): p. 69-84 DOI: 10.1177/2040622313511285.
29. Vickers, R.J., et al., *Efficacy and safety of ridinilazole compared with vancomycin for the treatment of Clostridium difficile infection: a phase 2, randomised, double-blind, active-controlled, non-inferiority study*. *Lancet Infect Dis*, 2017. **17**(7): p. 735-744 DOI: 10.1016/s1473-3099(17)30235-9.
30. *A Study of Ridinilazole (SMT19969) compared with fidaxomicin for the treatment of Clostridium difficile infection (CDI)*. 2016  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02784002>.
31. Selle, K., et al., *In Vivo Targeting of Clostridioides difficile Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicrobials*. *mBio*, 2020. **11**(2) DOI: 10.1128/mBio.00019-20.
32. Whittle, M.J., et al., *A Novel Bacteriophage with Broad Host Range against Clostridioides difficile Ribotype 078 Supports SlpA as the Likely Phage Receptor*. *Microbiol Spectr*, 2022. **10**(1): p. e0229521 DOI: 10.1128/spectrum.02295-21.
33. Mondal, S.I., et al., *Bacteriophage endolysins as a potential weapon to combat Clostridioides difficile infection*. *Gut Microbes*, 2020. **12**(1): p. 1813533 DOI: 10.1080/19490976.2020.1813533.
34. Gerding, D.N., et al., *Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection in Patients at Increased Risk for Recurrence*. *Clin Infect Dis*, 2018. **67**(5): p. 649-656 DOI: 10.1093/cid/ciy171.
35. Prabhu, V.S., et al., *Cost-effectiveness of Bezlotoxumab Compared With Placebo for the Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection*. *Clin Infect Dis*, 2018. **66**(3): p. 355-362 DOI: 10.1093/cid/cix809.
36. Salavert, M., et al., *Cost-Effectiveness Analysis of Bezlotoxumab Added to Standard of Care Versus Standard of Care Alone for the Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection in High-Risk Patients in Spain*. *Adv Ther*, 2018. **35**(11): p. 1920-1934 DOI: 10.1007/s12325-018-0813-y.
37. Chen, J., et al., *Cost-effectiveness of bezlotoxumab and fidaxomicin for initial Clostridioides difficile infection*. *Clin Microbiol Infect*, 2021. **27**(10): p. 1448-1454 DOI: 10.1016/j.cmi.2021.04.004.

38. Džunková, M., et al., *The Monoclonal Antitoxin Antibodies (Actoxumab-Bezlotoxumab) Treatment Facilitates Normalization of the Gut Microbiota of Mice with Clostridium difficile Infection*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016. **6**: p. 119 DOI: 10.3389/fcimb.2016.00119.
39. Gerke, H., *Whats the lowdown on "fecal transplattation"*. Health at Iowa. U of Iowa, 2014.
40. Eiseman, B., et al., *Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis*. *Surgery*, 1958. **44**(5): p. 854-9.
41. Kelly, C.R., et al., *Fecal microbiota transplant for treatment of Clostridium difficile infection in immunocompromised patients*. *Am J Gastroenterol*, 2014. **109**(7): p. 1065-71 DOI: 10.1038/ajg.2014.133.
42. Wittmann, T., et al., *Az Emberi Erőforrások Minisztériuma egészségügyi szakmai irányelve a hagyományos széklet-transzplantációs eljárás kivitelezéséről*. 2020. EüK. 12. szám EMMI irányelv 1, 2020  
[http://www.hbcs.hu/uploads/jogszabaly/3169/fajlok/2020\\_EuK\\_12\\_szam\\_EMMI\\_iranyelv\\_1.pdf](http://www.hbcs.hu/uploads/jogszabaly/3169/fajlok/2020_EuK_12_szam_EMMI_iranyelv_1.pdf).
43. Vincze, Á. and Z. Péterfi, *Székletátültetés 2016-ban*. 2016  
[http://www.medicalonline.hu/gyogyitas/cikk/szekletatultetes\\_2016\\_ban](http://www.medicalonline.hu/gyogyitas/cikk/szekletatultetes_2016_ban).
44. Nagy, G.G., et al., *A székletmikrobiota-transzplantáció technológiájának és minőségirányítási hátterének újragondolása a SARS-CoV-2 víruspandémia kapcsán*. *Orvosi Hetilap OH*, 2020. **161**(44): p. 1858-1871 DOI: 10.1556/650.2020.32023.
45. Ianiro, G., et al., *Reorganisation of faecal microbiota transplant services during the COVID-19 pandemic*. *Gut*, 2020. **69**(9): p. 1555-1563.
46. Segal, J.P., et al., *Mechanisms underpinning the efficacy of faecal microbiota transplantation in treating gastrointestinal disease*. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 2020. **13**: p. 1756284820946904-1756284820946904 DOI: 10.1177/1756284820946904.
47. Vigvari, S., et al., *Faecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection using a lyophilized inoculum from non-related donors: A case series involving 19 patients*. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2019. **66**(1): p. 69-78 DOI: 10.1556/030.64.2017.042.
48. Varga, A., et al., *How to Apply FMT More Effectively, Conveniently and Flexible - A Comparison of FMT Methods*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021. **11**: p. 657320 DOI: 10.3389/fcimb.2021.657320.
49. Fischer, M., et al., *Predictors of Early Failure After Fecal Microbiota Transplantation for the Therapy of Clostridium Difficile Infection: A Multicenter Study*. *Am J Gastroenterol*, 2016. **111**(7): p. 1024-31 DOI: 10.1038/ajg.2016.180.
50. Ford, A.C., et al., *Irritable bowel syndrome*. *Lancet*, 2020. **396**(10263): p. 1675-1688 DOI: 10.1016/s0140-6736(20)31548-8.
51. Aron-Wisnewsky, J., et al., *Metabolism and Metabolic Disorders and the Microbiome: The Intestinal Microbiota Associated With Obesity, Lipid Metabolism, and Metabolic Health-Pathophysiology and Therapeutic Strategies*. *Gastroenterology*, 2021. **160**(2): p. 573-599 DOI: 10.1053/j.gastro.2020.10.057.
52. Belkaid, Y. and T.W. Hand, *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. *Cell*, 2014. **157**(1): p. 121-41 DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
53. Weingarden, A.R., et al., *Changes in Colonic Bile Acid Composition following Fecal Microbiota Transplantation Are Sufficient to Control Clostridium difficile Germination and Growth*. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0147210 DOI: 10.1371/journal.pone.0147210.
54. Sorg, J.A. and A.L. Sonenshein, *Chenodeoxycholate is an inhibitor of Clostridium difficile spore germination*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(3): p. 1115-7 DOI: 10.1128/jb.01260-08.
55. Jiang, Z.D., et al., *Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection - fresh, or frozen, or lyophilised microbiota from a small pool of healthy donors delivered by colonoscopy*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017. **45**(7): p. 899-908 DOI: 10.1111/apt.13969.

56. den Besten, G., et al., *The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism*. J Lipid Res, 2013. **54**(9): p. 2325-40 DOI: 10.1194/jlr.R036012.
57. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body*. PLoS Biol, 2016. **14**(8): p. e1002533 DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533.
58. Bianconi, E., et al., *An estimation of the number of cells in the human body*. Ann Hum Biol, 2013. **40**(6): p. 463-71 DOI: 10.3109/03014460.2013.807878.
59. Derrien, M., et al., *Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 5): p. 1469-1476 DOI: 10.1099/ijs.0.02873-0.
60. Everard, A., et al., *Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice*. Diabetes, 2011. **60**(11): p. 2775-86 DOI: 10.2337/db11-0227.
61. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9066-71 DOI: 10.1073/pnas.1219451110.
62. Everard, A., et al., *Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity*. Isme j, 2014. **8**(10): p. 2116-30 DOI: 10.1038/ismej.2014.45.
63. Ojo, B., et al., *Mango Supplementation Modulates Gut Microbial Dysbiosis and Short-Chain Fatty Acid Production Independent of Body Weight Reduction in C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet*. J Nutr, 2016. **146**(8): p. 1483-91 DOI: 10.3945/jn.115.226688.
64. Leal-Díaz, A.M., et al., *Aguamiel concentrate from Agave salmiana and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased Akkermansia muciniphila in C57BL6 mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34242 DOI: 10.1038/srep34242.
65. Schneeberger, M., et al., *Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16643 DOI: 10.1038/srep16643.
66. Song, H., et al., *Red pitaya betacyanins protects from diet-induced obesity, liver steatosis and insulin resistance in association with modulation of gut microbiota in mice*. J Gastroenterol Hepatol, 2016. **31**(8): p. 1462-9 DOI: 10.1111/jgh.13278.
67. Shin, N.R., et al., *An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice*. Gut, 2014. **63**(5): p. 727-35 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-303839.
68. Forslund, K., et al., *Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota*. Nature, 2015. **528**(7581): p. 262-266 DOI: 10.1038/nature15766.
69. de la Cuesta-Zuluaga, J., et al., *Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading Akkermansia muciniphila and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut*. Diabetes Care, 2017. **40**(1): p. 54-62 DOI: 10.2337/dc16-1324.
70. Wang, Z., et al., *Gut microbiome differences between metformin- and liraglutide-treated T2DM subjects*. Endocrinol Diabetes Metab, 2018. **1**(1): p. e00009 DOI: 10.1002/edm2.9.
71. Plovier, H., et al., *A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice*. Nat Med, 2017. **23**(1): p. 107-113 DOI: 10.1038/nm.4236.
72. Ottman, N., et al., *Pili-like proteins of Akkermansia muciniphila modulate host immune responses and gut barrier function*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173004 DOI: 10.1371/journal.pone.0173004.
73. Zuo, T., et al., *Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in Clostridium difficile infection is associated with treatment outcome*. Gut, 2018. **67**(4): p. 634-643 DOI: 10.1136/gutjnl-2017-313952.
74. Draper, L.A., et al., *Long-term colonisation with donor bacteriophages following successful faecal microbial transplantation*. Microbiome, 2018. **6**(1): p. 220 DOI: 10.1186/s40168-018-0598-x.



75. Gonzalez, C.G., et al., *High-Throughput Stool Metaproteomics: Method and Application to Human Specimens*. mSystems, 2020. **5**(3) DOI: 10.1128/mSystems.00200-20.
76. Lai, L.A., et al., *Metaproteomics Study of the Gut Microbiome*. Methods Mol Biol, 2019. **1871**: p. 123-132 DOI: 10.1007/978-1-4939-8814-3\_8.
77. Li, X., et al., *A metaproteomic approach to study human-microbial ecosystems at the mucosal luminal interface*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e26542 DOI: 10.1371/journal.pone.0026542.
78. Verberkmoes, N.C., et al., *Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota*. Isme j, 2009. **3**(2): p. 179-89 DOI: 10.1038/ismej.2008.108.
79. Theriot, C.M., et al., *Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to Clostridium difficile infection*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3114 DOI: 10.1038/ncomms4114.
80. Martin-Gallausiaux, C., et al., *SCFA: mechanisms and functional importance in the gut*. Proc Nutr Soc, 2021. **80**(1): p. 37-49 DOI: 10.1017/s0029665120006916.
81. Cani, P.D., *Human gut microbiome: hopes, threats and promises*. Gut, 2018. **67**(9): p. 1716-1725 DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316723.
82. Makszin, L., et al., *Microchip gel electrophoretic analysis of perchloric acid-soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders*. Electrophoresis, 2019. **40**(3): p. 447-454 DOI: 10.1002/elps.201800378.
83. Makszin, L., et al., *Quantitative microfluidic analysis of S- and R-type endotoxin components with chip capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2012. **33**(22): p. 3351-60 DOI: 10.1002/elps.201270163.
84. *NIST MS Search 2.0 library*.  
<https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>.
85. Sommer, F., et al., *Altered mucus glycosylation in core 1 O-glycan-deficient mice affects microbiota composition and intestinal architecture*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85254 DOI: 10.1371/journal.pone.0085254.
86. Sommer, F., et al., *The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear Ursus arctos*. Cell Rep, 2016. **14**(7): p. 1655-1661 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.026.
87. *MacQIIME v1.9.1*. . <http://www.wernerlab.org/software/macqiime>.
88. *Uclust*. [https://www.drive5.com/usearch/manual/uclust\\_algo.html](https://www.drive5.com/usearch/manual/uclust_algo.html).
89. *Greengenes*. <https://www.metagenomics.wiki/tools/16s/qiime/install/greengenes>.
90. *ChimeraSlayer*. <https://bio.tools/chimeraslayer>.
91. Caporaso, J.G., et al., *PyNASt: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment*. Bioinformatics, 2009. **26**(2): p. 266-267 DOI: 10.1093/bioinformatics/btp636.
92. Price, M.N., P.S. Dehal, and A.P. Arkin, *FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9490 DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.
93. *Bray-Curtis dissimilarity*. <https://www.statology.org/bray-curtis-dissimilarity/>.
94. von Bechtolsheim, F., et al., *Development of a new serological assay for the diagnosis of Clostridium difficile infections with prognostic value*. J Microbiol Methods, 2019. **167**: p. 105777 DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105777.
95. Ott, S.J., et al., *Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium difficile Infection*. Gastroenterology, 2017. **152**(4): p. 799-811 e7 DOI: 10.1053/j.gastro.2016.11.010.
96. Xie, G., J. Yu, and Z. Duan, *New strategy for virus discovery: viruses identified in human feces in the last decade*. Sci China Life Sci, 2013. **56**(8): p. 688-96 DOI: 10.1007/s11427-013-4516-y.
97. Martin-Gallausiaux, C., et al., *SCFA: mechanisms and functional importance in the gut*. Proceedings of the Nutrition Society, 2020. **80**(1): p. 37-49 DOI: 10.1017/S0029665120006916.
98. Parada Venegas, D., et al., *Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 277 DOI: 10.3389/fimmu.2019.00277.

99. Li, X., et al., *A metaproteomic approach to study human-microbial ecosystems at the mucosal luminal interface*. PloS one, 2011. **6**(11): p. e26542-e26542 DOI: 10.1371/journal.pone.0026542.
100. Verberkmoes, N.C., et al., *Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota*. The ISME Journal, 2009. **3**(2): p. 179-189 DOI: 10.1038/ismej.2008.108.
101. Sommer, F. and e. al., *The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos**. Cell Reports, 2016. **14**(7): p. 1655-1661 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.026.
102. Kyne, L., et al., *Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea*. Lancet, 2001. **357**(9251): p. 189-93 DOI: 10.1016/s0140-6736(00)03592-3.
103. Blachaert, C., B. Strubbe, and H. Peeters, *Fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis*. Acta Gastroenterol Belg, 2019. **82**(4): p. 519-528.
104. Costello, S.P., et al., *Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial*. Jama, 2019. **321**(2): p. 156-164 DOI: 10.1001/jama.2018.20046.
105. Crothers, J.W., et al., *Daily, oral FMT for long-term maintenance therapy in ulcerative colitis: results of a single-center, prospective, randomized pilot study*. BMC Gastroenterol, 2021. **21**(1): p. 281 DOI: 10.1186/s12876-021-01856-9.