

Clostridioides difficile fertőzések terápiás 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. Reglódi Dóra egyetemi tanár

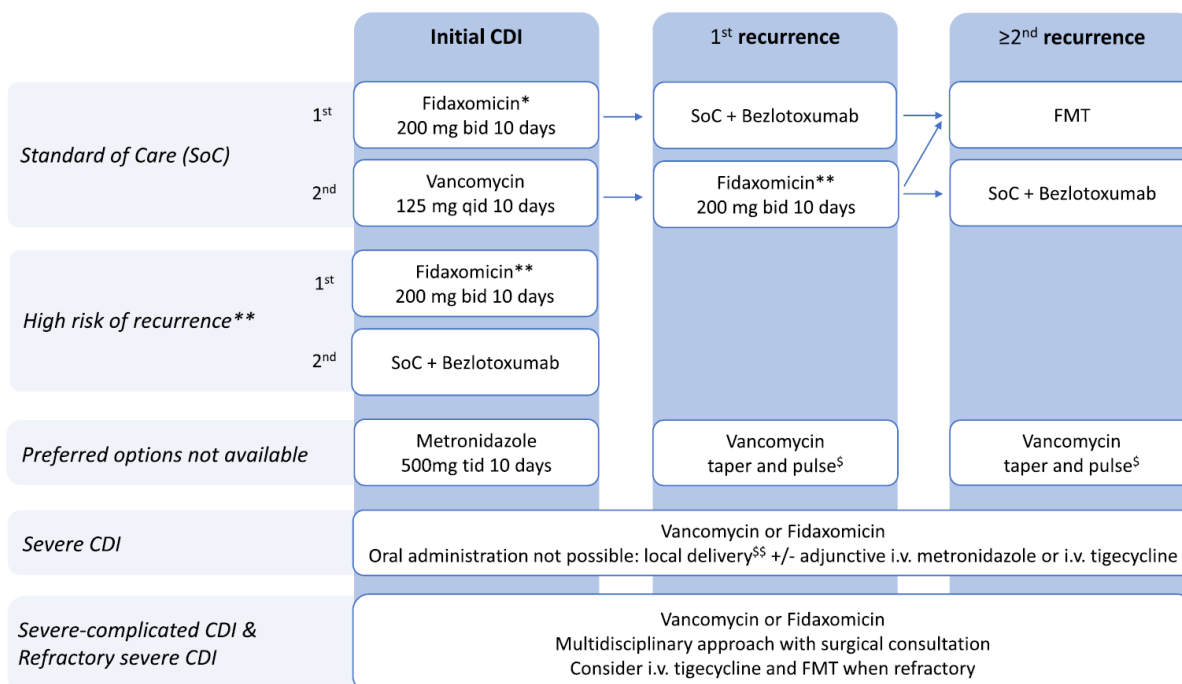
Pécs
2023

1. Bevezetés

A *Clostridioides* (korábbi elnevezéssel „*Clostridium*”) *difficile* fertőzések kezelése jelenleg csak részben megoldott feladat. A protokollokban szereplő antibiotikumok egyszerű esetekben rendszerint a tünetek megszűnéséhez vezetnek, a recidíva kialakulása azonban továbbra is gyakori. Komplikált, vagy recidív fertőzés során az alkalmazott antibiotikumtól függően különböző mértékben kell számolnunk terápia-refrakteritás, vagy további recidívák kialakulásának lehetőségével.

Bár a nozokomiális fertőzések klasszikus példajaként emlegetik, a kórokozót az esetek többségében már a kórházi felvételt megelőzően is hordozzák a páciensek [1]. Súlyos tüneteket a toxintermelő törzsek okoznak. Kórházi környezetben terjedését spóráinak az alkoholos kézfertőtlenítő szerekkel és az általánosan használt felületi fertőtlenítőszerekkel szembeni ellenálló képessége segíti elő. Szappanos kézmosással, illetve sporocid hatású fertőtlenítőszerek alkalmazásával korlátozható a kórházi terjedés, különösen fontos ez a toxintermelő törzsek esetében.

A tünetekkel járó fertőzés kezelésére a lefolyás súlyosságától és a recidivitástól függően első lépésben metronidazolt, vankomicint, esetleg már első lépésként fidaxomicint javasolnak a hazai [2] ajánlások. A metronidazol mellett észlelt gyakori recidíva miatt a frissített nemzetközi [3] ajánlások szerint a metronidazol jelenleg csak végszükség esetén javallott. Recidív fertőzésben széklet transzplantáció is végezhető. A felsorolt terápiás lehetőségek hatékonyságát számos klinikai vizsgálat hasonlította össze [4], de egyéb gyógyszerek hatékonyságára vonatkozóan is zajlanak kutatások [5-9] ezek közül az ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1. ábra) ajánlásában a bezlotoxumab és a tigecyclin szerepel.



* 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.

⁵ 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.

⁵⁵ Rectal or nasoduodenal delivery

1. ábra. Az ESCMID terápiás ajánlása CDI-ben.

Hatásmechanizmust tekintve három csoportra oszthatjuk a protokollokban alkalmazott módszereket: antibiotikum (metronidazol, vankomicin, fidaxomicin, tigecyclin), monoklonális antitest (bezlotoxumab) és széklet alkotóelemek bevitele (széklet transzplantáció). Az antibiotikumok a baktériumok szaporodásának gátlásával, vagy azok direkt elpusztításán, a monoklonális antitestek a toxinokhoz kötve, azok gátlásával, a széklet alkotóelemek pedig a direkt baktériumölő (fágok) mellett a kolonizációs rezisztencia helyreállításával vezethetnek

gyógyuláshoz. A közelmúltban publikált, székletből előállított, ismert baktérium-összetételű készítményekkel elért eredmények [10, 11] mellett sem egyértelmű, pontosan mi szükséges a donor székletből a kolonizációs rezisztencia helyreállításához. A hivatkozott közlemény például bizonyos baktériumtörzseket emel ki, a készítmény előállítása során a vírusokat és gombákat eltávolították, egyéb alkotórészek (szabad zsírsavak, fehérjék, egyéb metabolitok) azonban jelentős mennyiségben szintén beadásra kerülhettek.

A beadási módtól függően a széklet transzplantáció megterhelő lehet a betegek számára, a kutatásunk során használt liofilizált, kapszulázott formula segítségével a transzplantációval járó kellemetlenség minimálisra csökkenthető. A bélflóra lehetséges szerepét több betegséggel kapcsolatban is leírták [12, 13], e terület kutatását lendítheti fel a kapszulázott széklet-liofilizátum használata.

2. Célkitűzések

A széklet transzplantáció módszertana néhány kivételtől eltekintve a szondán át (nasogastricus, nasojejunalis, colonoscopia) történő bejuttatáson alapul. Bár az általunk alkalmazott protokoll szerinti 100 ml-es térfogat rendszerint nem megterhelő a betegek számára, a bejuttatás módja azonban okoz kellemetlenséget.

Az értekezés fő témája az általunk kidolgozott munkafolyamat, amely során a korábbi protokollban 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?

3. Módszerek

A kapszulák előállítására és kapcsolódó laboratóriumi vizsgálatok a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében, a kapszulák klinikai vizsgálata pedig az I-es számú Belgyógyászati Klinika Infektológia Tanszékén történt.

A vizsgálat időtartama alatt egyetlen donortól kapott mintákat használtunk. Összesen 9 székletmintát dolgoztunk fel, a kapcsolódó méréseket is ezeken a mintákon végeztük.

2018. január és 2019. december között összesen 28 beteg kapott liofilizált székletet tartalmazó kapszulákat.

A donor kiválasztása (1. táblázat) és a laboratóriumi szűrővizsgálatok (2. táblázat) a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően zajlottak.

- 18 és 65 év közötti életkor
- 30 kg/m² 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, mint gyulladáscélú 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

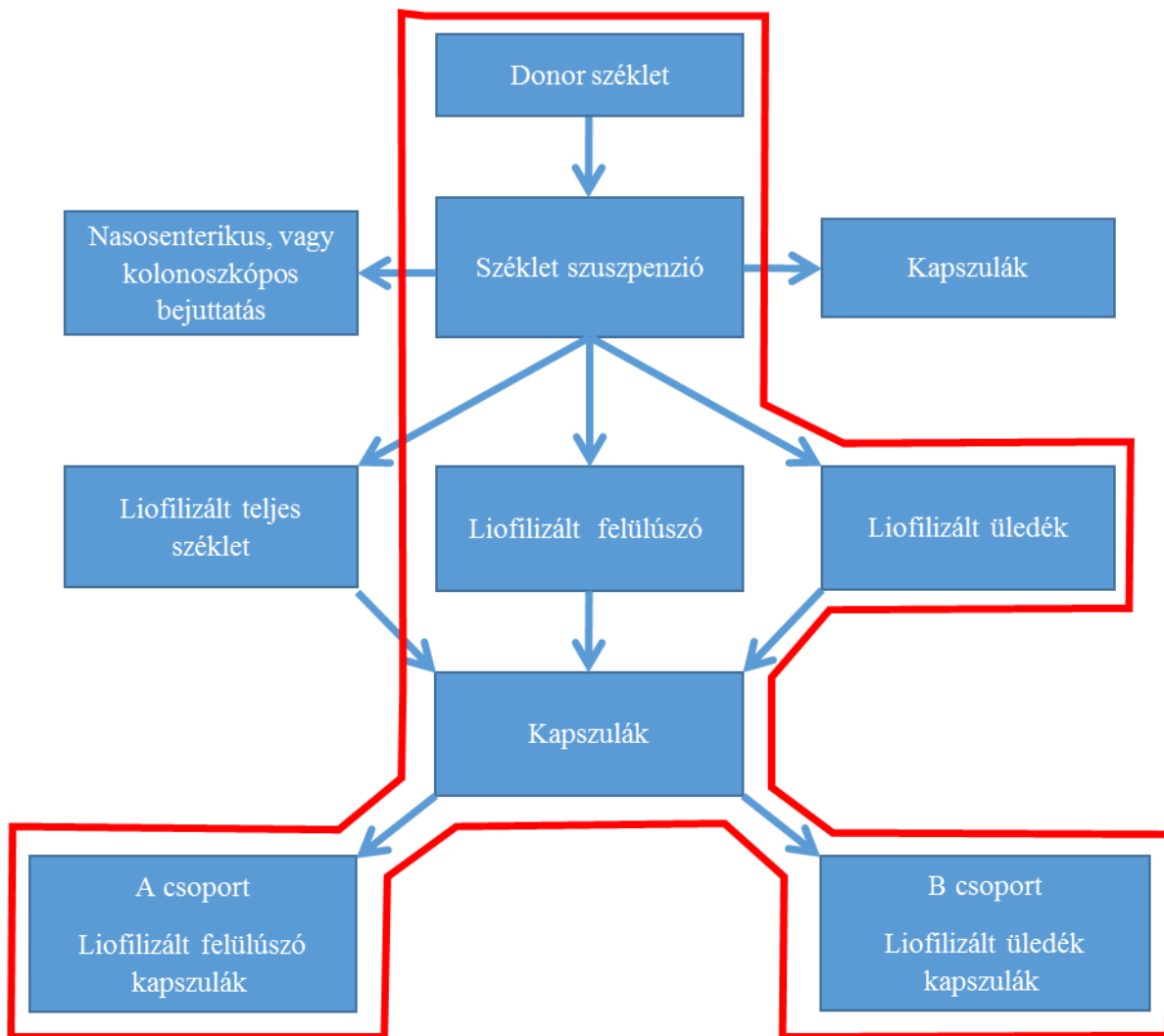
1. táblázat. A donor kiválasztásának kritériumai

Vizsgálat tárgya	Vér	Széklet
Baktérium	- <i>Treponema spp.</i>	- Enterális patogén tenyésztés: <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Campylobacter spp.</i> - <i>Helicobacter pylori</i> – enzimimmunpróba - Vankomicin rezisztens <i>Enterococcus</i> – antibiotikum érzékenységi teszt polirezisztens törzsek kiszűrése érdekében
Vírus	- Hepatitis A vírus IgM - Hepatitis B vírus felszíni antigén - Hepatitis C vírus elleni antitest - HIV 1 és 2	- Norovírus – enzimimmunpróba, vagy PCR - Rotavírus – enzimimmunpróba
Parazita	- <i>Entamoeba histolytica</i> - <i>Strongyloides stercoralis</i>	- Paraziták, vagy petéik - <i>Microsporidia</i> - <i>Giardia</i> antigén / enzimimmunpróba - <i>Cryptosporidium</i> enzimimmunpróba - <i>Isospora</i> és <i>Cyclospora</i> – saválló festés
Egyéb	- Teljes vérkép - Májfunkciós teszt - Süllyedés, C-reaktív protein	- <i>Clostridioides difficile</i> teszt - <i>Clostridioides difficile</i> toxin és glutamát dehidrogenáz antigén kimutatás

2. táblázat. Laboratóriumi szűrővizsgálatok a donor szűrésére.

A székletminták gyűjtése a donor otthonában történt, a feldolgozás során 60 g székletet homogenizáltunk 200 ml fiziológiás sóoldatban, szobahőn. A szuszpenziókat fém térszűrőkön keresztül szűrtük, majd 10 percen át centrifugáltuk (827 g). Az így kapott homogén szuszpenzióból 100 ml-t centrifugáltunk tovább 15 percig, 3309 g-vel, 4°C-ra előhűtött centrifugában. A felülúszót elválasztottuk az üledéktől, utóbbit a kezelhetőség érdekében 10 ml fiziológiás só oldatban szuszpendáltuk. A felülúszót és az üledéket külön edényben -20°C-on kifagyasztottuk, majd -40°C-on, $4 \cdot 10^{-4}$ mbar vákuum alatt, 36 órán át liofilizáltuk. A liofilizátumokat mozsárban homogenizáltuk, majd tömöríthetőségüktől függően „00” méretű kemény zselatin kapszulákba töltöttük. A liofilizált üledék és a liofilizált felülúszó esetében is egyaránt 4-6 kapszulára volt szükség. A 2. ábra összefoglalja a minta feldolgozásának fő lépéseit.

Összehasonlításképpen jegyezzük meg, hogy a hagyományos fagyasztott székletet alkalmazó centrumoknál egy terápiás adag 30-40 kapszulát [14], más liofilizált inokulumot alkalmazó protokollokban 2-40 kapszulát [15-17] jelent.



2. ábra. A minta feldolgozásának fő lépései. A piros kontúr jelzi a jelenlegi protokollunkban szereplő lépéseket.

Mivel a natív kapszulák hatékonynak bizonyultak, enteroszolvens kapszulákat nem használtunk a klinikai vizsgálat során. Folyékony széklet kapszulázását is megkíséreltük, azonban a kapszulák vízhatlanítására szolgáló szuszpenziók deformálták a kapszulákat, emellett a módszert is bonyolultabbá tették, így végül ezeket a kapszulákat sem használtuk.

A liofilizátumok túlélési vizsgálataihoz négy hőmérsékleten (-80°C , -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ és $+20^{\circ}\text{C}$) tároltunk mintákat, ezekből 6 hónapon át végeztünk kioltásokat. Médiumként szilárd táptalajokat (véres agar, eozin-metilén agar, csokoládé agar, vankomicines csokoládé agar és Sabouraud agar) használtunk, a kolóniaformáló egységek (CFU) számolására 48 óra párhuzamos aerob és anaerob inkubálást (30°C) követően került sor.

A fehérjevizsgálatot 4 beteg széklet transzplantáció előtti és utáni, illetve a donor liofilizálás előtti és utáni mintáin végeztük a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézetében. A mintákat -80°C -on tároltuk, majd a Makszin és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján készítettük elő mikrochip elektroforézishez [19]. A komponensek molekulatömegeinek meghatározására kalibrációs görbéket használtunk, az eredményeket a teljes görbe alatti terület százalékában (AUC%) fejeztük ki.

A rövid szénláncú szabad zsírsavak meghatározását szintén négy beteg transzplantáció előtti és utáni, és a donor liofilizálás előtti és utáni mintáin végeztük. Emellett 6 egészséges önkéntes mintáit is elemeztük. A minta-előkészítés és a mérések szintén a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézetében, az ott kidolgozott protokoll szerint zajlottak. A gázkromatográfus mérések adataiból internetes adatbázis (NIST MS Search 2.0 library [20]) és az ismert belső standardok csúcsainak segítségével azonosítottuk a komponenseket.

A metagenomikai vizsgálatra a fehérje- és zsírsav-meghatározáshoz is kiválasztott 4 beteg transzplantáció előtti és utáni mintáit, továbbá natív donorszékletet, liofilizált üledéket és liofilizált felülúszót küldtünk (Institute of Clinical Molecular Biology, Kiel, Germany). Ezekon a mintákon 16S rRNS szekvenálást végeztek a disszertációban ismertetett protokoll szerint [21, 22]. A kapott adatokból alfa eloszlást, béta diverzitást határoztak meg és differenciál abundancia elemzést végeztek.

A *Clostridioides difficile* A és B toxin elleni antitest titerek méréséhez CDI miatt kezelt betegektől (n=47, 15 negatív kontroll egészséges önkéntestől) vett vért használtunk. A vészérumok előszítése és mérése PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetében von Bechtolsheim és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján történt [23], enzimhez kötött immunoszorbens analízis (ELISA) segítségével.

A CDI miatt felvételre került, egyidejűleg inzulinnal kezelt kettes típusú cukorbetegék széklet transzplantáció utáni inzulinszükségletének változását utólagos, telefonos megkeresés útján végeztük (n=11).

4. Eredmények

Kutatásunk fő eredménye egy alacsony eszköz- és munkaigényű munkafolyamat. A centrifuga és a liofilizáló berendezés kivételével minden eszköz egyszerűen és olcsón beszerezhető, pótolható, a teljes munkafolyamat körülbelül 8 munkaórát vesz igénybe. 72 órával a donorszéklet laboratóriumba érkezése után, egy asszisztens munkájával 4-6 adag, liofilizált székletet tartalmazó kapszulát tudunk felkínálni a betegeknek, vagy későbbi felhasználás céljából -20°C -on eltárolni. A klinikai vizsgálat tanúsága szerint az így tárolt minták 6 hónappal később is hatékonyan alkalmazhatóak. A kapszulák fagyasztóból történő kivételt követően rögtön beadhatóak a betegeknek, nincs szükség kiolvasztásra és egyéb előkészületekre, mint a fagyasztott székletsuszpenzió esetében. Bár a liofilizálás extra eszközigényt jelent a fagyasztott székletet tartalmazó kapszulák előállításának módszertanához viszonyítva, a térfogat csökkenése, a kapszulázás egyszerűsége és a beadás körülményei rugalmasságot tekintve mind a liofilizálás felé billentik a mérleg nyelvét.

A 28, liofilizált székletet tartalmazó kapszulával kezelt beteg egyikénél sem jelentkezett mellékhatás. Az A csoportba sorolt betegek ($n=16$) liofilizált felülúszót kaptak. Közülük 15-en gyógyultak meg egy adag kapszula beadását követően (93,75%). A kezelésre nem reagáló beteg kórelőzményében a transzplantációt megelőzően 22 recidíva szerepelt. Két gyógyult betegnél láttunk relapszust, melyet fidaxomicinnel sikerült kezelni. Az 1-es csoportból egy beteg hunyt el az utánkövetés időtartama alatt, a halál oka a CDI-vel nem összefüggő társbetegség volt.

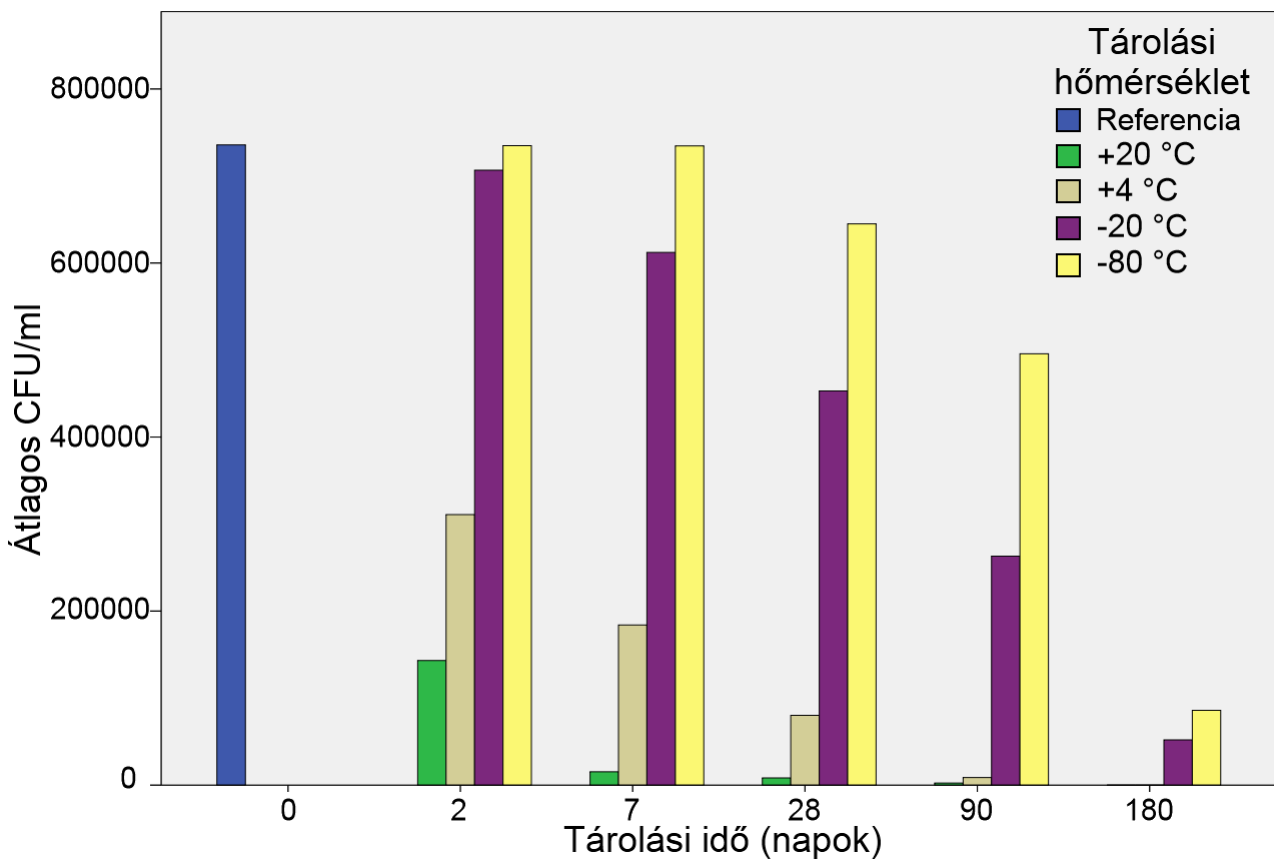
A B csoportba került betegek ($n=12$) liofilizált székletüledéket kaptak. 8 beteg gyógyult meg egy kezelés hatására, körükben nem is jelentkezett recidíva. Egy beteg újabb széklet transzplantációt követően, egy pedig fidaxomicin adása után gyógyult meg. a 2-es csoportból szintén egy beteg hunyt el az utánkövetés ideje alatt, más betegség következtében.

A két csoport összesített gyógyulási aránya egy kezelés után 23/28-nak (82,14%) mutatkozott (3. táblázat)

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

3. táblázat. A vizsgált populációban elért eredményeink.

A kioltások alapján 600-szoros különbség van a felülúszó és az üledék csíraszama között. A túlélés a tárolási idővel és hőmérséklettel fordított arányosságot mutatott, mely megfelelt előzetes várakozásainknak. A -20°C -os tárolás megfelelő középútnak mutatkozott a -80°C -on és a hűtőszekrényben, vagy szobahőn történő tárolás között (3. ábra).



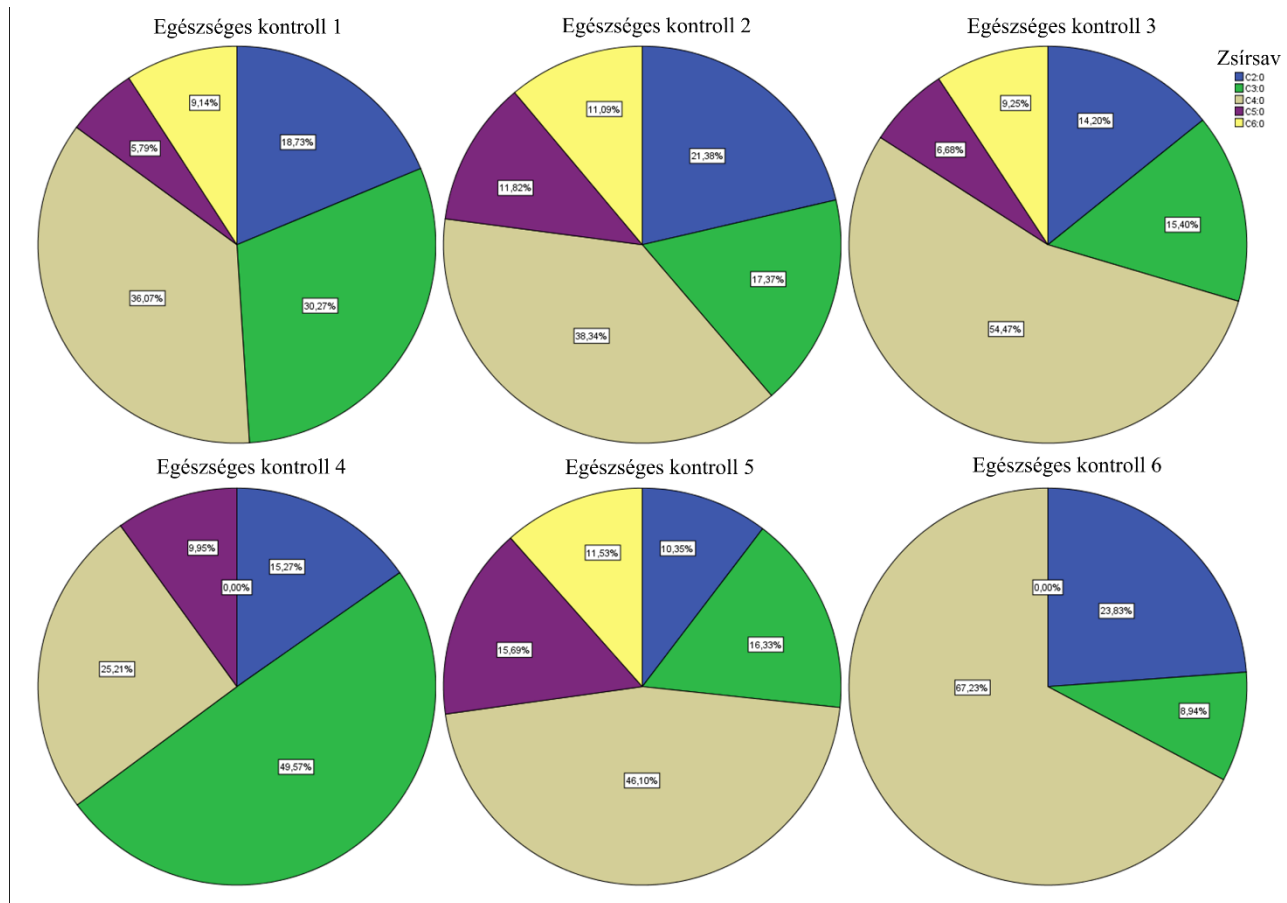
3. ábra. Kolónia formáló egységek számának változása a donor mintákban tárolási idő és tárolási hőmérséklet függvényében.

A fehérje vizsgálatok eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a liofilizálás és a tárolás befolyásolja a minták fehérjetartalmát. A liofilizálás hatására az 5-ös és 7-es komponens változásait figyeeltük meg (4. ábra). A széklet transzplantáció a sikeresen elvégzett 3 méréspar eredményei alapján nem volt hatással a vizsgált fehérjék relatív részarányára.

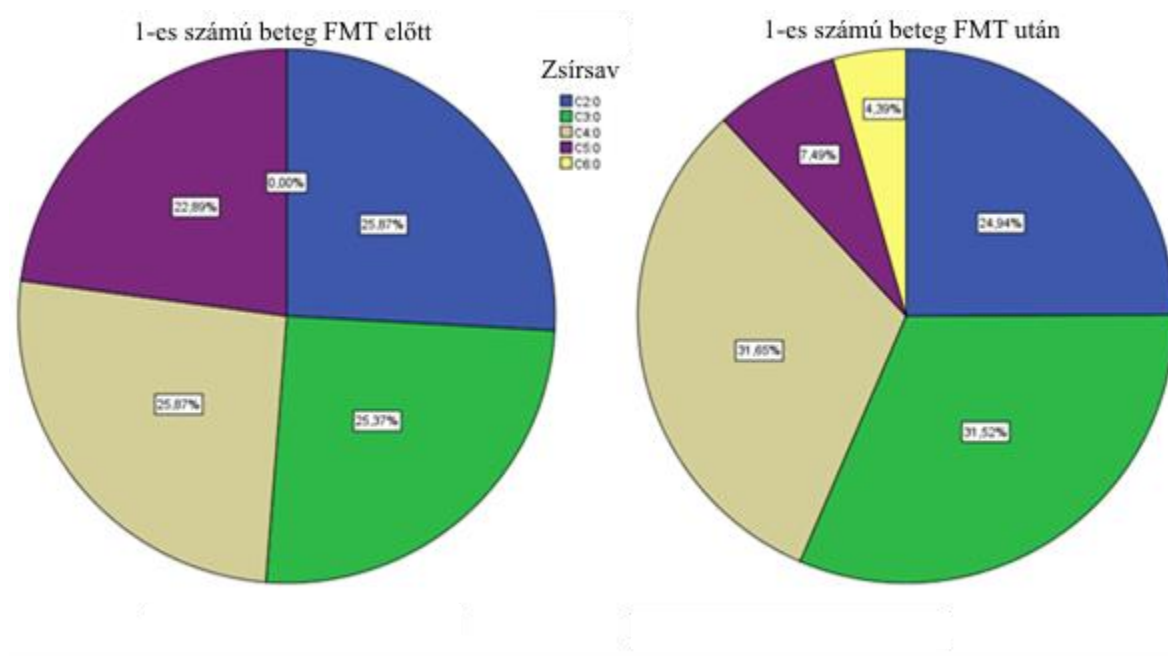


4. ábra. Az egyes fehérjekomponensek relatív arányainak változása liofilizálás hatására.

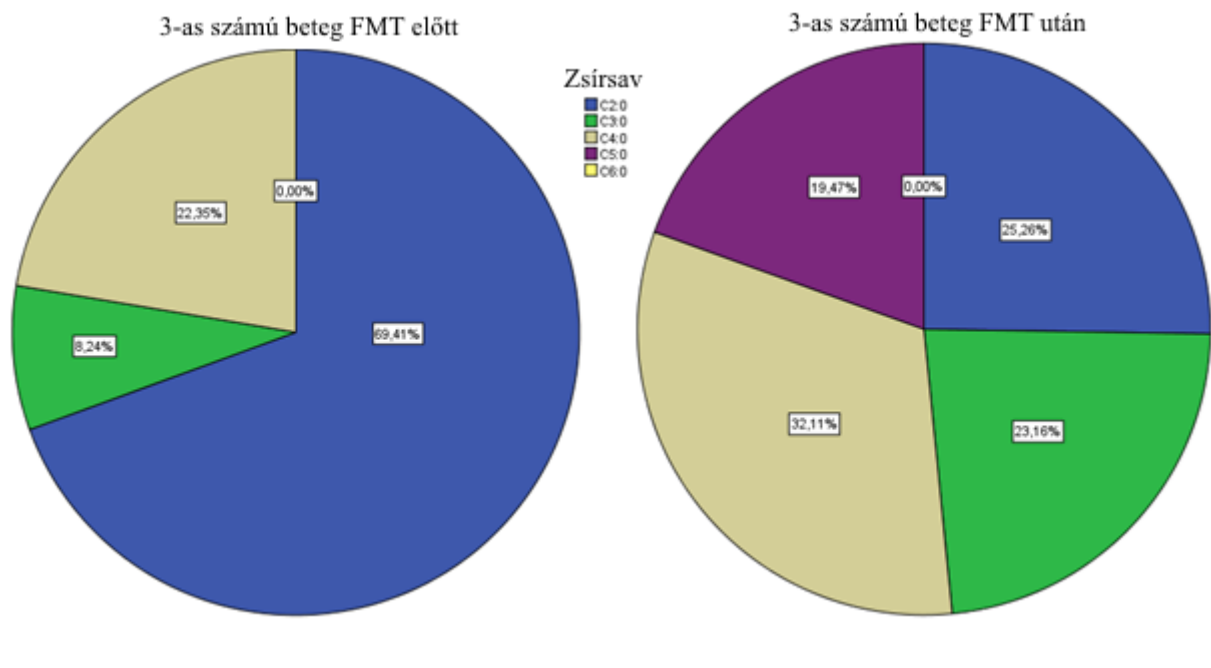
A rövid szénláncú szabad zsírsavak vizsgálata során a 6 egészséges kontroll (ide számítva a donort is) közül 5-nél diverzebb zsírsav-összetételű székletet találtunk, mint a transzplantáció előtt álló CDI betegeknél (5. ábra). A széklet transzplantációt követően a recipiensek mintáiban a zsírsav diverzitás növekedését láttuk, mely így hasonlóbba vált a donor mintájában mért értékekhez. Elsősorban a C4:0 (vajsav) aránya növekedett a recipiensek mintáiban a kezelést követően (6-8. ábra).



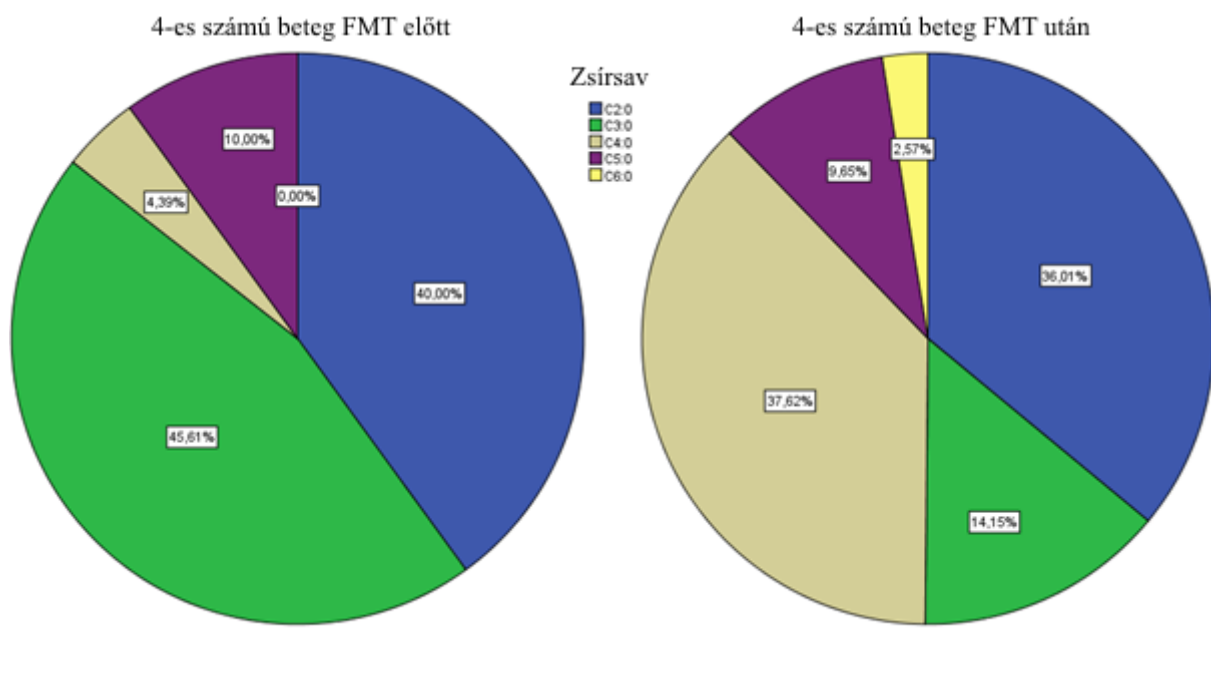
5. ábra. Rövid szénláncú szabad zsírsavak arányai az egészséges kontrollok mintáiban.



6. ábra. Rövid szénláncú szabad zsírsavak arányai az 1-es számú beteg mintáiban FMT előtt és után

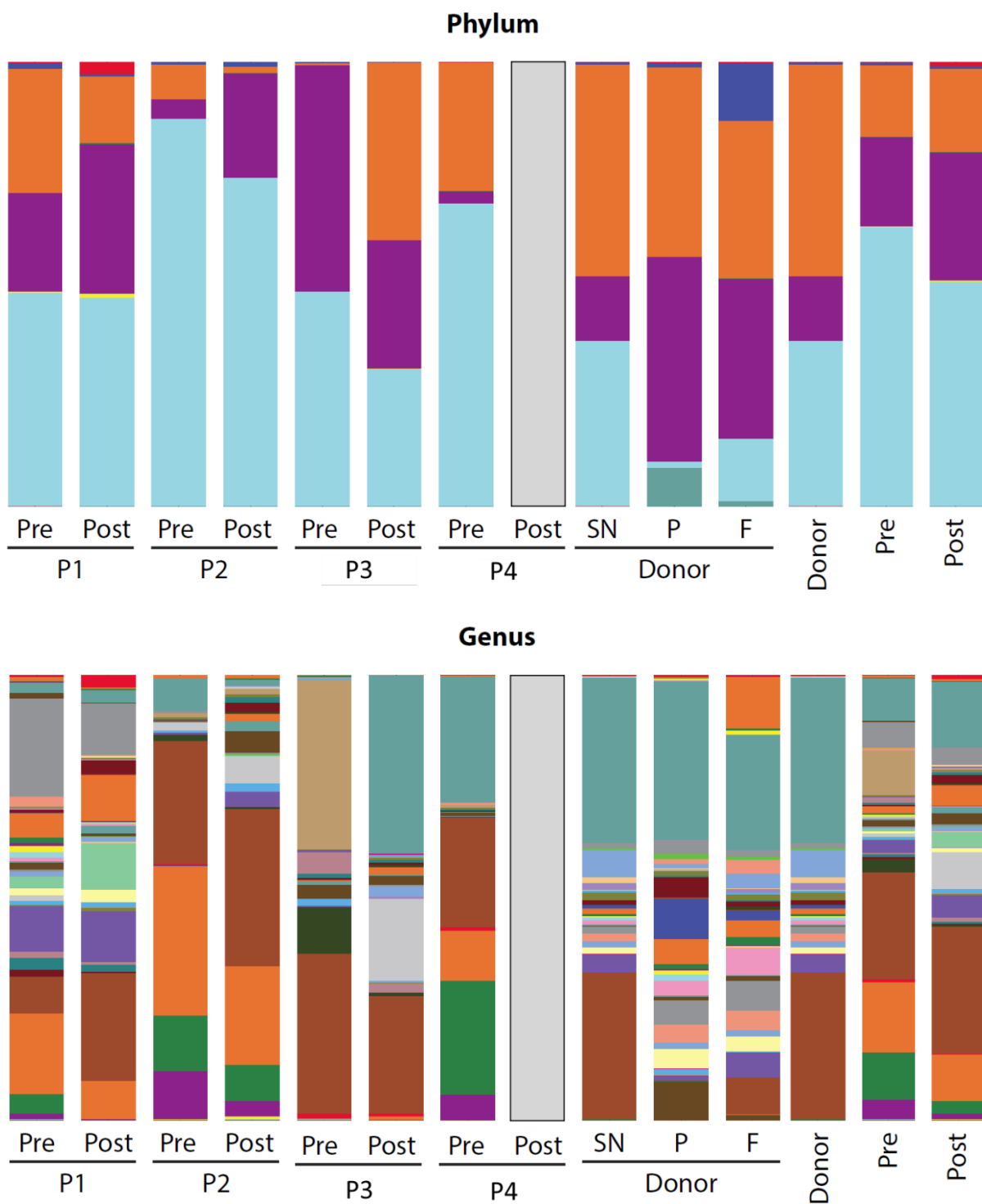


7. ábra. Rövid szénláncú szabad zsírsavak arányai a 3-as számú beteg mintáiban FMT előtt és után



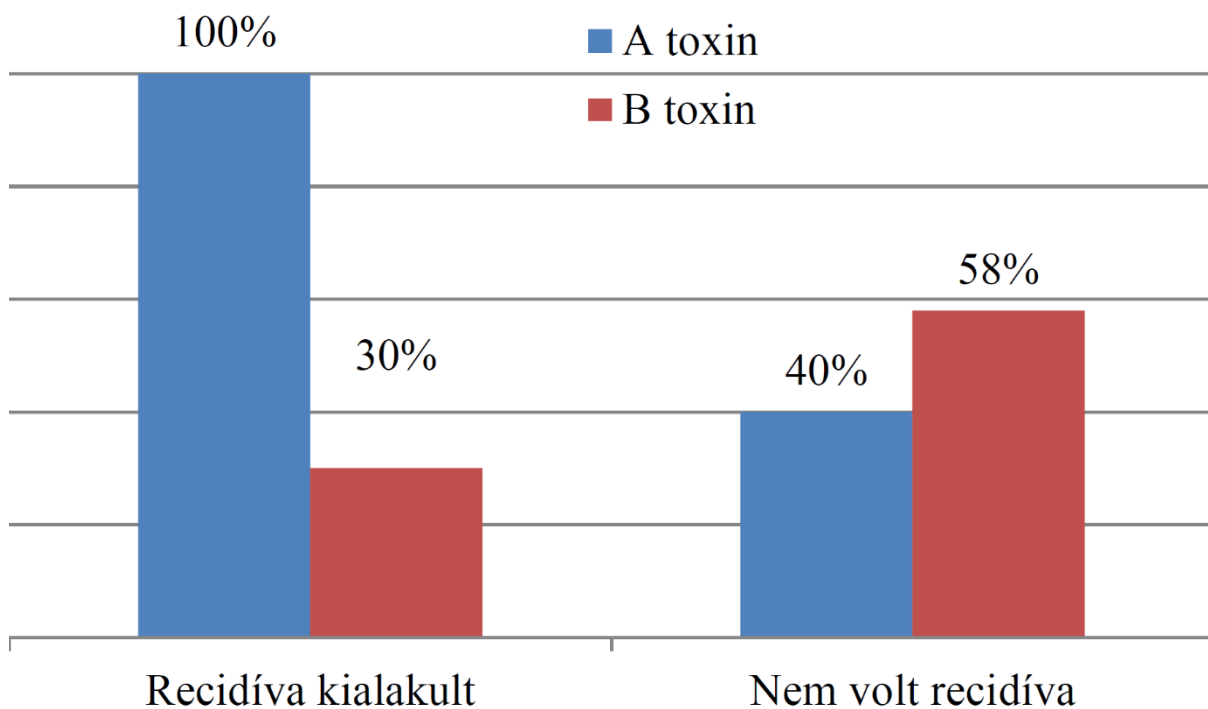
8. ábra. Rövid szénláncú szabad zsírsavak arányai a 4-es számú beteg mintáiban FMT előtt és után

A metagenomikai vizsgálatok a betegek mintáinak diverzitás eltolódását mutatták széklet transzplantációt követően. Az eredmények alapján a betegek transzplantációt követő mintáiban a donoréhoz hasonló diverzitás volt megfigyelhető (9. ábra). A 4-es számú beteg FMT utáni mintáját nem sikerült megfelelő mértékben szekvenálni. Az alacsony esetszám mellett az interindividuális különbségek nem voltak értelmezhetőek. A donor mintáinak (natív, liofilizált felülúszó és liofilizált üledék) összehasonlítása eltéréseket mutatott mind genus, mind phylum szinten.



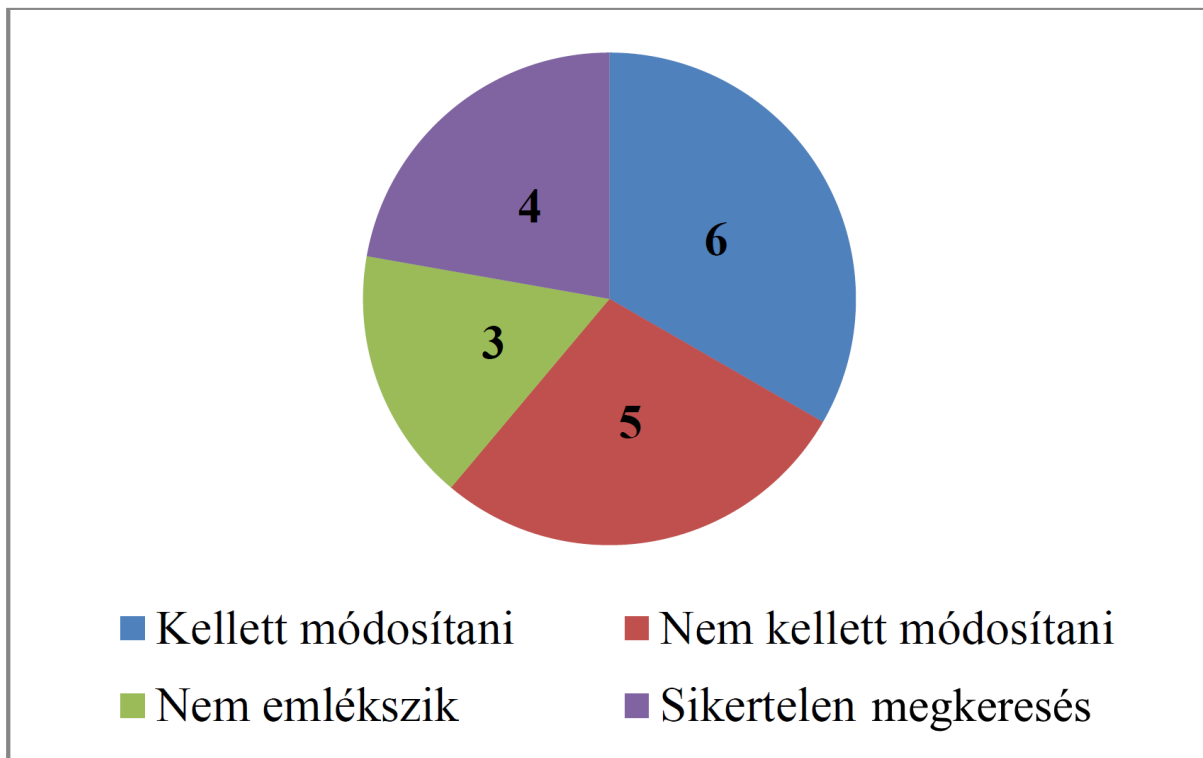
9. ábra. Összefoglalás phylum and genus szinten. Pre: a négy páciens FMT előtti mintáinak átlaga. Post: a négy páciens FMT utáni mintáinak átlaga. SN: felülűszó. P: üledék. F: natív széklet.

A toxin ellenes antitestek és a recidíva kialakulásának vizsgálata felemás eredményt hozott. A 47 beteg közül azoknál, akiknél kialakult a későbbiekben recidíva, minden esetben alacsony volt az A toxin ellenes antitest titer. Az anti-B toxin titer vizsgálata nem mutatott ilyen mértékű következetességet, a recidív eseteknek csupán 30%-ában mértük alacsony szintjét (10. ábra).



10. 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.

A széklet transzplantációban részesült, inzulinnal kezelt cukorbetegség csoportjában 6 beteg inzulinszükséglete csökkent, míg 5 beteg inzulinszükséglete változatlan maradt a beavatkozást követően (11. ábra).



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

5. Megbeszélés

Kutatásunk a székletátültetés CDI kezelésében történő felhasználására szorítkozott, de mindvégig a szélesebb körű alkalmazást célozva. Kapszulakészítési protokollunk egyaránt teszi rugalmasabbá a

székletátültetést a jelenlegi indikációkban, és könnyíti meg további területek kutatását. A mintafeldolgozás során használt eszközök egyszerűen beszerezhetőek és használhatóak, a kapszulák pedig hatékonyan tárolhatóak, beadásuk pedig külön előkészületek nélkül kivitelezhető. Továbbra is nyitott kérdés, hogy a széklet mely alkotórészei felelősek a kedvező hatásért. Az általunk használt, liofilizált felülúszót tartalmazó kapszulák nem voltak ugyan csíramentesek, de nagyságrendekkel kevesebb kolóniaformáló egységet tartalmaznak, mint a liofilizált üledéket tartalmazók. Megemlítendő emellett, hogy (ennél az esetszámnál nem szignifikáns) különbséget találtunk a két kapszulatípus hatékonysága között, a felülúszót, tehát az alacsonyabb csíraszámot tartalmazó kapszulák javára. Továbbá az is az egyéb alkotórészek jelentősége mellett szól, hogy hat hónapos tárolást követően is hatékonyan alkalmaztunk felülúszót tartalmazó kapszulákat, pedig a kioltások eredményei szerint fél év -20°C-os tárolás után ezekben a mintákban már nem volt életképes baktérium. Látszólag ellentmondásos irodalmi adatok lelhetőek fel ebben a témakörben. Ott és társai steril széklet-szűrlettel is jó eredményeket értek el [24], míg egy másik kutatás bizonyos baktériumtörzsek kombinációját találta hatékonyának [10, 11]. Sem a mi kutatásunk, sem az általam talált források nem bocsátkoztak a vírusok pontosabb szerepének felderítésébe. Már a metagenomika elterjedése előtt is egyértelmű volt, hogy a bélflóra jelentős részét alkotják. Kölcsonhatásaik és szerepük kutatása a metagenomikának köszönhetően egyrésztől lehetségessé vált, másrésztől a rengeteg új információ nehezített is a kutatók dolgán. A toxin ellenes antitestek eredményeink alapján segíthetnek előre jelezni, hogy adott betegnél kialakul-e a későbbiekben recidíva. A székletátültetés alkalmazása egyéb betegségekből jelenleg intenzíven vizsgált kérdés, ennek egy példája a cukorbetegség és a bélflóra kapcsolata. Az általunk vizsgált populációban is voltak olyan betegek, akiknél a transzplantációt követően csökkent a külső inzulinigény. A liofilizált, kapszulázott széklet az egyéb lehetséges indikációk célzott vizsgálatát lendítheti előre.

6. Összefoglalás

- A standard székletsuszpenzió liofilizálására és kapszulázására tervezett munkafolyamat egyszerűen és rövid idő alatt végrehajtható, a napi klinikai rutinba beilleszthető.
- Mószernk több időt és felszerelést igényel a fagyaszott székklettel töltött kapszulák előállításánál, a kapszulák elkészítése, tárolása és beadása azonban rugalmasabb.
- A kidolgozott protokollunk a nagy centrumokban alkalmazott 30-40 db kapszulás dózissal szemben 6 db kapszula beadása mellett is hatékonynak bizonyult.
- A liofilizált székkletet tartalmazó kapszulák hatékonysága nem marad el a hagyományos eljárás hatékonyságától, mely így továbbra is a leghatékonyabb gyógyszeres kezeléshez (fidaxomicin) mérhető.
- A kapszulázott formula a betegek számára kevésbé megterhelő, az egészségügyi személyzet szempontjából rugalmasabban alkalmazható.
- Bár a liofilizált székkletfelülúszót tartalmazó kapszulák CFU száma 600-szor alacsonyabb a liofilizált üledéket tartalmazó kapszulákban mérhetőnél, a hatékonyságot ez nem csökkenti.
- A kapszulák -20°C-on tárolva 6 hónapig hatékonyságsökkenés nélkül felhasználhatóak
- A liofilizálás és a tárolás valószínűleg befolyásolja a székkletminták fehérjetartalmát.
- Székkletátültetést követően a recipiensek mintáiban mérhető rövid szénláncú szabad zsírsav diverzitás hasonlóbb a donor mintáiban mérhetőhöz, mint a beavatkozás előtt.
- A baktériumtörzsek szintén a donoréhoz hasonlóbb, megnövekedett diverzitást mutattak székkletátültetés következtében.
- Az A toxin ellenes antitest titer minden olyan betegnél alacsony volt a fertőzést követően, akinél később recidíva alakult ki.
- Kettes típusú cukorbetegség körében székkletátültetést követően 11-ből 6 beteg esetében kellett csökkenteni az inzulin dózist.

Elért eredmények és megfigyelések:

1. Kidolgoztuk és standardizáltuk a transzplantációra szánt liofilizált székklet filtrátum kapszulába helyezésének módszertanát.
2. A liofilizált székkletet tartalmazó kapszulák jól alkalmazhatóak *Clostridioides difficile* fertőzések kezelésére.
3. Centrifugálás segítségével megközelítőleg 600-szoros különbség érhető el kolóniaformáló egység koncentrációját tekintve az üledék és a felülúszó között.
4. A székkletből készült felülúszó és üledék liofilizátuma külön-külön is hatékony
5. A kemény zselatin kapszulák gyomorsavnak ellenálló bevonat nélkül is megfelelnek a liofilizátumok bejuttatására.
6. A kapszulázott, liofilizált székklet tárolása -20°C-on 6 hónapig nem csökkenti a gyógyulási arányt.
7. A székkletben található rövid szénláncú szabad zsírsavak diverzitása székkletátültetést követően növekszik, hasonlóbb lesz a donor székkletében mérhetőhöz.
8. A *Clostridium difficile* A toxin ellenes antitest titer alacsony szintje a fertőzést követően jól korrelál a későbbi recidíva kialakulásával.

Az értekezés gyakorlati hasznosíthatósága

A *Clostridioides difficile* fertőzések kezelésére rendelkezésre álló eszköztár egy lényeges eleme a székkletátültetés. Ennek a módszernek a rugalmasabbá tétele hozzájárul a nagyobb arányú alkalmazáshoz. Ezzel párhuzamosan, a nasogastricus, és nasojejunalis szondák elhagyása a módszertanból és a kisebb térfogat miatt javuló szállíthatóság és tárolhatóság egyszerűbbé teszi a kutatást egyéb indikációk esetében. Az a megfigyelés, mely szerint nagyon alacsony csírszám mellett sem csökken a hatékonyság, további dóziscsökkentést, vagy egyéb alkotóelemek elhagyásának lehetőségét valószínűsíti. Így hatékonyabb készletgazdálkodás, illetve a biztonságosság növelése érhető el. A protein- és szabadzsírsav vizsgálatok eredményei hozzájárulhatnak a CDI-ben kifejtett hatáshoz szükséges alkotórészek felderítéséhez. A toxin ellenes antitestek vizsgálati eredményei felhasználhatók a recidívák előjelzésére, ezáltal felkészülhetünk

egy adott beteg esetében a fertőzés kiújulására, esetleg el is kerülhetjük azt. A cukorbetegség körében székletátültetést követő inzulinszükséglet csökkenés remek példája a módszerben rejlő további lehetőségeknek, bár például cukorbetegség esetében terápiás eljárásaként egyelőre még nem jön szóba.

7. Közlemények

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, Vágvölgyi 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

9. 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 biostatisztika 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.

References:

1. Péterfi, Z., *A Clostridium difficile-fertőzések korszerű terápiája*. 2015 http://medicalonline.hu/gyogyitas/cikk/a_clostridium_difficile_fertozesek_korszeru_terapiaja.
2. Kurcz, A., et al., *Az Országos Epidemiológiai Központ Módszertani levele a clostridium difficile fertőzések diagnosztikájáról, terápiájáról és megelőzéséről*. Országos Epidemiológiai Központ, 2016.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Ford, A.C., et al., *Irritable bowel syndrome*. Lancet, 2020. **396(10263)**: p. 1675-1688 DOI: 10.1016/s0140-6736(20)31548-8.
13. Aron-Wisniewsky, 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.
14. Kao, D., et al., *Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent Clostridium difficile Infection: A Randomized Clinical Trial*. JAMA, 2017. **318(20)**: p. 1985-1993.
15. Jiang, Z.D., et al., *Safety and preliminary efficacy of orally administered lyophilized fecal microbiota product compared with frozen product given by enema for recurrent Clostridium difficile infection: A randomized clinical trial*. PLoS One, 2018. **13(11)**: p. e0205064.
16. Staley, C., et al., *Successful Resolution of Recurrent Clostridium difficile Infection using Freeze-Dried, Encapsulated Fecal Microbiota; Pragmatic Cohort Study*. Am J Gastroenterol, 2017. **112(6)**: p. 940-947.
17. Hecker, M.T., et al., *Fecal Microbiota Transplantation by Freeze-Dried Oral Capsules for Recurrent Clostridium difficile Infection*. Open Forum Infect Dis, 2016. **3(2)**: p. ofw091.
DOI: 10.1038/ajg.2017.6.
18. Makszin, L., et al., *Microchip gel electrophoretic analysis of perchloric acid-soluble serum proteins in systemic inflammatory disorders*. ELECTROPHORESIS, 2018. **40** DOI: 10.1002/elps.201800378.
19. *NIST MS Search 2.0 library*. <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>.
20. 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.

22. 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.
23. 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.
24. 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.