

**Univerzita Karlova  
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicíně  
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta**

**MUDr. Jan Březina**

*Mikrobiální transplantace a její vliv na průběh ulcerózní kolitidy*

*Microbial transplantation and its effect on the course of ulcerative colitis*

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Pavel Drastich, Ph.D.

Praha, 2024

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 30. 1. 2024

.....

MUDr. Jan Březina

## IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

Březina, Jan. Mikrobiální transplantace a její vliv na průběh ulcerózní kolitidy. [*Microbial transplantation and its effect on the course of ulcerative colitis*]. Praha, 2024. 88 s. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta; Institut klinické a experimentální medicíny, Klinika hepatogastroenterologie. Školitel: doc. MUDr. Pavel Drastich, Ph.D.

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji mému vedoucímu disertační práce doc. MUDr. Pavlu Drastichovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a cennou pomoc po celou dobu mého doktorského studia. Děkuji Ing. Jakubu Mrázkovi, Ph.D. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR za pomoc a odbornou spolupráci. Dále děkuji své rodině a celému kolektivu Kliniky hepatogastroenterologie IKEM za podporu a pochopení.

S upřímným díkem,

Jan Březina

## ABSTRAKT

Komplexní etiopatogeneze idiopatických střevních zánětů (IBD) zůstává nejasná, přičemž jednou z hlavních příčin se jeví dysregulace slizniční imunity v reakci na specifické složky střevního mikrobiomu. Tato disertační práce zkoumá potenciál fekální mikrobiální transplantace (FMT) jako inovativní terapeutické intervence zaměřené na modifikaci mikrobiomu a ovlivnění průběhu IBD. FMT, spočívající v přenosu stolice od zdravého dárce k pacientovi, se ukázala jako vysoce účinná v léčbě rekurentní klostridiové kolitidy (CDI), kde je již považována za standardní léčebný postup. Ve vztahu k IBD však představuje FMT stále experimentální metodu, používanou převážně v rámci klinických studií. Současný systematický přehled uvádí, že účinek FMT na ulcerózní kolitidu (UC) je proměnlivý, jak z hlediska dosažení remise, tak klinické odpovědi. Nedávné randomizované kontrolované studie (RCT) pro UC, a s tím v souladu i námi prezentovaná data, ukazují na mírný až střední efekt FMT v této indikaci. Účinnost FMT ovlivňuje celá řada faktorů, zejména správný výběr dárce či dárců, diverzita jeho mikrobiomu, metody aplikace i frekvence podávání. V případě Crohnovy choroby (CD) jsou data zatím velmi omezená, ale naznačují malý efekt FMT v této indikaci. FMT je považována za bezpečnou metodu s minimem závažných nežádoucích účinků za předpokladu striktního dodržování kritérií pro výběr a vyšetření dárců.

Na základě dosavadních výsledků lze konstatovat, že FMT představuje slibný a bezpečný terapeutický přístup léčby UC. Pro definitivní závěry jsou však nezbytné další rozsáhlé, dobře navržené studie, které se zaměří na efektivitu metody v různých indikacích, schopnost navodit remisi u IBD, počet nutných aplikací FMT pro dosažení tohoto cíle, dlouhodobou bezpečnost a optimální způsoby aplikace.

## ABSTRACT

The complex etiopathogenesis of idiopathic inflammatory bowel diseases (IBD) remains unclear, with one of the main suspected causes being the dysregulation of mucosal immunity in response to specific components of the gut microbiome. This dissertation investigates the potential of faecal microbiota transplantation (FMT) as an innovative therapeutic intervention aimed at modifying the microbiome and influencing the course of IBD. FMT, involving the transfer of stool from a healthy donor to the patient, has proven highly effective in the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* colitis, where it is already considered a standard therapeutic procedure. However, in relation to IBD, FMT remains an experimental method, predominantly used in clinical studies. Current systematic reviews indicate that the effect of FMT on ulcerative colitis (UC) is variable, both in terms of achieving remission and clinical response. Recent randomized controlled trials for UC, in accordance with our presented data, show a mild to moderate effect of FMT in this indication. The effectiveness of FMT is influenced by a range of factors, particularly the correct selection of donor or donors, the diversity of their microbiome, methods of application, and frequency of administration. In the case of Crohn's disease, the data are still very limited, but suggest a minimal effect of FMT in this indication. FMT is considered a safe method with minimal adverse effects, provided strict criteria for donor selection and examination are adhered to.

Based on the current results, it can be concluded that FMT represents a promising and safe therapeutic approach for the treatment of UC. However, further extensive, well-designed studies are necessary to provide definitive conclusions, focusing on the method's effectiveness in various indications, its ability to induce remission in IBD, the number of FMT applications needed to achieve this goal, long-term safety, and optimal methods of application.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Idiopatické střevní záněty, ulcerózní kolitida, Crohnova choroba, klostridiová kolitida, fekální mikrobiální transplantace, mikrobiota, střevní bariéra.

## **KEYWORDS**

Inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn's disease, clostridial colitis, fecal microbial transplantation, microbiota, gut barrier.

# OBSAH

ÚVOD .....	10
HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	23
PUBLIKACE 1 .....	24
PUBLIKACE 2 .....	38
PUBLIKACE 3 .....	57
PUBLIKACE 4 .....	66
SOUHRNNÁ DISKUSE.....	73
ZÁVĚR A SCHRUTÍ.....	82
LITERÁRNÍ REFERENCE.....	83



## SEZNAM ZKRATEK

<b>5-ASA</b>	5-aminosalicylát
<b>6MP</b>	6-merkaptopurin
<b>16S rRNA</b>	16S ribosomální ribonukleová kyselina
<b>Anti-TNF</b>	Anti-tumor necrosis factor
<b>CD</b>	Crohnova choroba
<b>CDI</b>	<i>Clostridioides difficile</i> infekce
<b>CI</b>	Confidence interval
<b>CRP</b>	C-reaktivní protein
<b>EurFMT</b>	Evropský registr FMT
<b>FACTU</b>	Fekální mikrobiální transplantace u levostranné ulcerózní kolitidy
<b>FMT</b>	Fekální mikrobiální transplantace
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>IBD</b>	Idiopatické střevní záněty
<b>IL-10</b>	Interleukin 10
<b>LDA</b>	Lineární diskriminační analýza
<b>NOD2</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
<b>RCT</b>	Randomizovaná kontrolovaná studie
<b>SCFA</b>	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem
<b>SCCAI</b>	Simple Clinical Colitis Activity Index
<b>Ster</b>	Kortikosteroidy
<b>UC</b>	Ulcerózní kolitida

# ÚVOD

Lidské tělo, často považované za zázrak biologického inženýrství, není ostrovem izolovaným od okolního světa. Naopak, je domovem pro nespočet mikroorganismů, které s námi žijí v symbiotickém vztahu a ovlivňují naše zdraví, chování a mnoho dalších aspektů našeho života. Tento komplexní ekosystém mikroorganismů, označovaný jako lidský mikrobiom se v posledních desetiletích stal předmětem intenzivního vědeckého zkoumání.

Důvodem pro takový zájem je stále rostoucí důkaz o roli, jakou hraje mikrobiota v našem zdraví a onemocnění. Od trávicího systému až po kognitivní funkce, mikroorganismy, které s námi sdílejí naše tělo, ovlivňují naše fyziologické stavy, obranyschopnost a dokonce i naši psychiku. Ačkoli byla lidská mikrobiota po tisíce let součástí našeho bytí, teprve nedávno jsme začali rozkrývat její tajemství a důležitost.

Lidská mikrobiota může obsahovat až desetkrát více buněk než naše vlastní lidské tělo. Největší zastoupení má v gastrointestinálním traktu, a to jak celkovým počtem, tak i počtem druhů bakterií, který dle Human Microbiom Project dosahuje 3000, z nichž většinu nejsme zatím schopni ani kultivovat [1, 2]. Nedávné metagenetické analýzy stanovily katalog genů lidské mikrobioty s celkovým počtem 3,3 mil. jedinečných genů, což je přibližně stokrát více, než z kolika se skládá lidský genom [3]. Kmeny *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria* tvoří více než 99 % střevní mikroflóry. Kmen *Firmicutes* (včetně *Clostridia*) představuje více než 60 % druhů vázaných na sliznici tlustého střeva, zatímco *Enterobacteriaceae* jako *Escherichia coli* jsou relativně malou podskupinou, která představuje pouze 8 % všech bakterií střeva [4, 5]. Mikrobiotu však nepředstavují jen bakterie, ale i archea, houby, řasy, viry a fágy [6]. Nejnověji je mikrobiota definována tak, že se týká nejen společenství mikroorganismů, ale také celého spektra molekul produkovaných těmito mikroorganismy, včetně jejich strukturních prvků, metabolitů a molekul produkovaných koexistujícím hostitelem [6].

Střevní mikrobiota funguje jako samostatný orgán lidského těla. Ovlivňuje štěpení a vstřebávání živin, bariérovou funkci střevní sliznice, metabolismus, imunitní systém hostitele, produkuje vitamin K a biotin. Komenzální střevní mikrobiota metabolizuje nevstřebatelné sacharidy z potravy a produkuje mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které mohou představovat až 10 % denního energetického příjmu [4]. Zatímco mastné kyseliny, acetát, propionát a butyrát tvoří hlavní zdroj energie pro kolonocyty, zlepšují také slizniční bariérovou

funkci stimulací sekrece hlenu a udržováním integrity epitelu podporou těsného buněčného spojení [7]. Butyrát se také váže přímo na makrofágy a dendritické buňky, čímž zvyšuje produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 a ovlivňuje diferenciaci a proliferaci regulačních T lymfocytů [8-10]. Mikrobiota se také podílí na metabolizaci xenobiotických sloučenin, čímž ovlivňuje metabolismus léčiv a karcinogenezi [11, 12]. Mikrobiální hydrolázy žlučových solí dekonjugují primární žlučové kyseliny a vedou k tvorbě sekundárních žlučových kyselin, které kromě jiných účinků ovlivňují růst dalších bakterií [13]. Komezální mikroorganismy obývající lidský gastrointestinální trakt tedy hrají důležitou roli při metabolismu, imunitní adaptaci a zároveň potlačují růst konkurenčních invazních druhů [14].

U dysbiózy vede snížená koncentrace protektivních bakterií produkujících mastné kyseliny s krátkým řetězcem a akumulace toxických metabolitů střevních patogenů ke zvýšené koncentraci prozánětlivých mediátorů a zvýšené permeabilitě sliznice [4, 5]. Zhoršená imunoregulace hostitele s neúčinnou regulací vrozené imunitní odpovědi vede ke ztrátě tolerance k nepatogenním mikrobiálním antigenům a rozvoji zkříženě reaktivní autoimunity [4].

Vztah zdravé mikrobioty a hostitele představuje symbiózu. Změny mikrobioty mohou vést k narušení této symbiózy, a tím ke vzniku některých onemocnění. Tento patofyziologický mechanismus lze popsat na klostridiové kolitidě, ale mezi choroby se vztahem ke střevnímu mikrobiomu patří i IBD, syndrom dráždivého tračníku, jaterní encefalopatie, diabetes 2. typu, metabolický syndrom, nealkoholická steatohepatitida, obezita, ateroskleróza, idiopatická trombocytopenická purpura, roztroušená skleróza, alergie, autismus a další [15].

Fekální mikrobiální transplantace je léčebná metoda spočívající v přenosu stolice od zdravého dárce pacientovi. S jejím využitím lze obnovit mikrobiální homeostázu střeva, a ovlivnit tak výše zmíněná onemocnění. První zmínky o FMT se datují 2 000 let nazpět do staré Číny, kdy Ge Hong popisuje léčbu průjmů a otravy jídlem pomocí FMT [16]. Později beduíni léčili bakteriální úplavici konzumací čerstvého velbloudího trusu [17]. Tento lék byl aplikován německými lékaři za druhé světové války, kdy v severní Africe umírali vojáci na úplavici. Lékaři izolovali *Bacillus subtilis* z velbloudích výkalů používaných místními obyvateli trpícími touto chorobou a s dobrým efektem jej podávali infikovaným vojákům [18]. První článek v odborné literatuře o úspěšném použití FMT k léčbě pseudomembranózní kolitidy byl publikován v roce 1958 Eisemanem a kol. [19]. Od té doby byla publikována řada případů i studií naznačující účinnost FMT v léčbě některých

onemocnění. FMT je vysoce efektivní v léčbě rekurentní pseudomembranózní kolitidy [20]. V této indikaci se jedná o standardní, klinicky využitelnou metodu. Principem léčby je napravení „ekologické katastrofy“ způsobené většinou použitím antibiotik s následným přemnožením kmene *Clostridioides difficile*. Proto není překvapivé, že i jednorázové či dvojnásobné podání FMT vede k vysoké frekvenci vyléčení (81–94 %). Ostatní uvedené indikace, vč. IBD, jsou experimentální a jsou předmětem pouze klinických studií [21].

Vztah mikrobiomu a IBD není natolik objasněn jako u klostridiové kolitidy. I přes intenzivní výzkum není stále uspokojivě vysvětlena přesná etiopatogeneze IBD, nicméně jednou z teorií vzniku IBD je neadekvátní reakce imunitního systému na některé součásti střevního mikrobiomu. Tato souvislost byla doložena studii na zvířecích modelech, kdy absence mikrobiomu u geneticky predisponovaných myši zabránila rozvoji IBD. Je prokázáno, že u pacientů s IBD dochází ke snížení diverzity druhů i změnám zastoupení střevní mikroflóry. Existuje dostatek důkazů o úloze dysbiózy v patogenezi IBD [4, 22]. Několik známých predisponujících variant genů k IBD ovlivňuje způsoby interakce střeva s prostředím [23]. První identifikovaný predisponující gen pro Crohnovu chorobu NOD2 se účastní imunitní odpovědi na grampozitivní a gramnegativní bakterie [24]. Mutace NOD2 ovlivňují množství bakterií adherujících na sliznici [25] a transkripci protizánětlivého cytokinu IL-10 [26]. Mnoho studií zjistilo, že pacienti se zánětlivým onemocněním střev mají ve střevech méně bakterií produkujících mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), zejména *Faecalibacterium prausnitzii*, symbiotickou bakterii s dobře zdokumentovanými příznivými účinky pro hostitele [27, 28]. Ke zvrácení tohoto stavu dysbiózy, a tím i k potenciální léčbě IBD, se nabízí použití FMT.

## **1. Metodologie FMT**

### **1.1 Příprava a uchování FMT**

Zatím nebyl stanoven standardní protokol přípravy FMT. V publikovaných studiích jsou velké rozdíly ve zpracování stolice, použitých rozpouštědlech i způsobu homogenizace a filtrace materiálu. Malý počet subjektů i nedostatek kontrol v těchto studiích znesnadňují vyvození jednoznačných závěrů. Přestože každé pracoviště provádí FMT svým vlastním a často originálním způsobem, lze popsat všeobecně přijímaný základní algoritmus provedení. Nejčastěji se rozpouští 50 g čerstvé stolice ve fyziologickém roztoku o dostatečném objemu (150–500 ml). Jako rozpouštědlo užívají některá pracoviště i vodu nebo mléko. K dokonalému

promísení lze použít běžný kuchyňský mixér či tekutinu homogenizovat řádným protřepáním. Takto vzniklý roztok se dvakrát přefiltruje přes sterilní gázu k odstranění větších zbytků stolice [20]. Výsledný produkt, fekální transplantát, se používá buď čerstvý, a nebo ho lze uchovat hluboce zmrazený s glycerolem či lyofilizovaný k pozdějšímu použití [29].

V dostupných studiích FMT u klostridiové kolitidy měla voda jako rozpouštědlo vyšší míru vyléčení než fyziologický roztok (98,5 vs. 86 %), avšak relaps onemocnění byl popisován dvakrát častěji. Zvyšující se objem FMT vedl k mírně vyšší úspěšnosti léčby za předpokladu dostatečného množství rozpuštěné stolice (hmotnost < 50 g zapříčinila 4× častěji relaps onemocnění) [30]. Hamilton a kol. prokázali stejnou účinnost zmražené FMT jako čerstvé FMT v léčbě klostridiové kolitidy [31]. Po 12 týdnech zmražení FMT na -80 °C byla pozorována viabilita 80 % bakterií. Pokud bude tato skutečnost prokázána i u ostatních onemocnění, povede k podstatně praktičtějšímu způsobu distribuce a zvýšení dostupnosti FMT v podobě fekálních dárcovských bank, které budou shromažďovat zmrazenou či lyofilizovanou stolicí od kvalitních dárců. Dalším logickým krokem je příprava kapslí s lyofilizovaným či speciálně emulgovaným fekálním obsahem. K zajištění přesunu adekvátní kvantity mikrobimu bude však nutno aplikovat najednou velké množství kapslí (až 30) [29].

## 1.2 Výběr a vyšetření dárce

Výběr dárce představuje zásadní aspekt úspěšné FMT. Je důležitý jak z hlediska bezpečnosti, tak efektivity FMT. Dárci stolice pro léčbu klostridiové kolitidy jsou obvykle vybíráni z příbuzných, partnerů, přátel nebo zdravých dobrovolníků. U jiných indikací (např. autoimunitních) může být příbuzenský vztah na škodu. Každý typ dárce má své výhody i nevýhody. U příbuzných a partnerů může být menší riziko přenosu infekčních nemocí. Na druhou stranu nepříbuzní mají vzhledem k rozdílnému genetickému pozadí a prostředí větší šanci signifikantně změnit mikrobiotu příjemce. Nejobávanějším rizikem FMT je přenos infekce, proto musí být dárci pečlivě vyšetřeni. Potenciální dárci stolice by měli být dotázáni na cestovní historii, sexuální chování, předchozí operace, krevní transfuze a další faktory, které zvyšují riziko přenosných chorob. Dále je nutné se ptát na výskyt autoimunitních, nádorových a metabolických onemocnění u příbuzných prvního a druhého stupně. Dárci, kteří recentně užívali antibiotika či inhibitory protonové pumpy ovlivňující složení mikrobioty, by měli být vyloučeni. Dalším krokem je podrobné vyšetření vzorků krve a stolice (Tab. 1). V systematickém přehledu 317 pacientů s recidivující klostridiovou kolitidou Gough a kol. popisují mírně vyšší úspěšnost léčby u pacientů léčených FMT od příbuzných dárců (93 %) než

od nepříbuzných dárců (84 %) [30]. Tento jev nebyl pozorován u jiných chorob. Dále nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl u dárců stejného a opačného pohlaví. Zdá se, že profil mikrobiomu dárce u klostridiové kolitidy není důležitý. Dostupná data u ulcerózní kolitidy však naznačují vyšší úspěšnost léčby při použití stolice od dárce s větší diverzitou střevní mikrobioty [32]. Tato pozorování bude nutné ověřit dalšími dobře navrženými studiemi, nicméně volba ideálního dárce s adekvátním mikrobiomem bude do budoucna jistě stěžejní. U ostatních potenciálních indikací nejsou k výběru dárce v současné době dostupná data.

**Tabulka 1.** Vyšetření dárce stolice

<b>Krevní testy</b>	Krevní obraz, jaterní testy, železo
	hepatitida ABC, HIV-1, HIV-2, cytomegalovirus, Epstein – Barr, Herpes simplex, Varicella zoster, <i>Treponema pallidum</i>
<b>Testy stolice</b>	<i>Yersinia spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i>
	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. difficile</i> toxin, <i>Helicobacter pylori</i>
	Standardní parazitologické vyšetření

### 1.3 Způsob podání a příprava příjemce

FMT lze podat nazogastrickou sondou, nazojejunální sondou, při gastrokopii, koloskopii, klyzmatem a perorálně v kapsli. Dostupné studie FMT u klostridiové kolitidy neukazují signifikantní rozdíl mezi podáním nazogastrickou či nazojejunální sondou a koloskopickým podáním [20, 30, 33, 34]. V případě podání FMT nazogastrickou či nazojejunální sondou někteří autoři podávají inhibitory protonové pumpy ke snížení kyselosti žaludečního obsahu, což vede ke zvýšení přežívání dárcovské mikrobioty [35]. Při nazogastrickém a nazojejunálním podání klesá oproti podání do dolního zažívacího traktu počet aplikovaných bakterií i o několik řádů, přesto však přežívá dostatečné množství bakterií k navození potřebného efektu FMT. Nazogastrické podání skýtá riziko aspirace a následného rozvoje purulentní bronchopneumonie, pročež je tato metoda v současnosti opouštěna. Podání za Treitzovu řasu při gastrokopii či pomocí nazojejunální sondy toto riziko eliminuje, je však pro pacienty značně nepohodlné a z dlouhodobého hlediska nepoužitelné. Při koloskopickém podání je pacient připraven osmotickým laxativem, což může napomáhat k odstranění stávající

mikroflóry a usnadnění kolonizace střeva dárcovským mikrobiomem. FMT je možné při výkonu podat sprejováním do celého tlustého střeva, vzhledem k neúnosnosti častého opakování koloskopie je toto podání vhodné zejména pro klostridiovou kolitidu a první podání FMT v případě IBD. Pro opakované podávání se zdá být vhodné klyzma, k jehož delšímu udržení lze použít loperamid. V období těsně předcházejícím FMT někteří autoři podávají k potlačení mikrobioty příjemce antibiotika, zejména v léčbě klostridiové kolitidy [36]. Tyto postupy však nejsou ověřeny randomizovanými studiemi a každé centrum si vytváří svůj vlastní protokol.

V roce 2014 publikovali Younster a kol. pilotní práci s FMT v podobě perorálních kapslí k léčbě recidivující klostridiové kolitidy se 70% účinností po prvním podání 15 kapslí a 90% efektivitou po druhém podání stejného počtu kapslí [37]. U ostatních nemocí potenciálně léčitelných FMT není dostatek evidence k vyvození závěrů o účinnosti jednotlivých druhů podání. O způsobu léčby tak rozhoduje zejména anatomická lokalizace daného onemocnění. V případě IBD se zdá nejvhodnějším způsobem jednorázové podání koloskopické a formou klysmatu.

#### **1.4 Komplikace**

FMT je při dodržení přísných podmínek vyšetření dárce a vhodné indikaci považována za bezpečnou metodu. V Goughově systematickém přehledu 317 pacientů s recidivující klostridiovou kolitidou byl výskyt nežádoucích účinků 2,5 % za dodržení všech pravidel vyšetření dárce [30]. Vzhledem k několika případům aspirace při nazogastrickém podání se od něj většina autorů v současnosti odklání a preferují nazojejunální sondu, případně gastrokopické podání za Treitzovu řasu. Většina pacientů léčená FMT popisuje přechodný průjem nebo zácpu, méně často bolesti a křeče břicha. U IBD pacientů jsou častěji zaznamenávány horečky a krátkodobá elevace zánětlivých parametrů, což nejspíše souvisí s porušenou bariérovou funkcí střevní sliznice. Jak již bylo zmíněno výše, obávaným nežádoucím účinkem FMT je přenos infekčních nemocí. V dostupné literatuře k tomu došlo pouze ve dvou případech, kdy se jednalo o norovirovou enteritidu [38]. Dlouhodobá follow-up studie Brandta a kol. naznačuje vysokou bezpečnost FMT [39]. Další takové studie budou potřeba k zjištění souvislosti FMT se vznikem pozdních infekcí, zánětů a nádorových onemocnění.

## 2. Idiopatické střevní záněty

Jedná se o chronická rekurující zánětlivá onemocnění trávicího traktu provázená průjmy a bolestí břicha. Mezi IBD patří především Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. I přes intenzivní výzkum není stále uspokojivě objasněna přesná etiopatogeneze těchto onemocnění. Jednou z teorií vzniku IBD je neadekvátní reakce imunitního systému na některé složky střevní mikrobioty u geneticky predisponovaných jedinců [40, 41]. Tato souvislost byla dokázána studii na zvířecích modelech. Je prokázáno, že u pacientů s IBD dochází ke snížení diverzity druhů i změnám zastoupení střevní mikroflóry. Zejména je přítomna redukce kmene *Fermitutes* se snížením rodů *Bifidobacteria* a *Lactobacilus*. *Fermitutes* jsou hlavní producenti mastných kyselin s krátkým řetězcem, mezi něž patří i butyrát, který má imunoregulační vlastnosti [4]. Některé studie prokazují účinnost butyrátových klyzmat v léčbě refrakterních IBD [42, 43].

Léčba IBD v posledních desetiletích zaznamenala výrazný rozvoj. K již dlouhodobě užívaným skupinám léků, mezi něž patří aminosalicyláty, kortikosteroidy a imunosupresiva, přibyla biologická léčba. Přesto část pacientů na léčbu nereaguje a někteří mají významné nežádoucí účinky plynoucí z užívané terapie. I přes zavedení biologické léčby nedosahuje kvalita života mnohých pacientů požadované úrovně [44]. Jeden z dalších možných terapeutických postupů, jak ovlivnit IBD, představuje FMT. Principem účinku FMT u IBD je navození změny stávající mikrobioty, což nejspíše vyžaduje opakované, a nelze vyloučit, že i dlouhodobé, podávání FMT [45].

### 2.1 Ulcerózní kolitida

První publikovaný případ léčby UC pomocí FMT pochází z roku 1989 od Benneta a kol. Samotný Bennet si léčil pomocí FMT svoji sedm let trvající refrakterní UC, což vyústilo v jeho dlouhodobé klinické i histologické vyléčení [46]. V systematickém přehledu publikovaných případů z roku 2012 identifikují Anderson a kol. 18 pacientů s UC bez souběžně probíhající klostridiové kolitidy, kteří byli léčeni pomocí FMT. U 13 z 18 pacientů (72,2 %) došlo k navození remise s možností vysazení zbylých léků [47]. Tento systematický přehled ovšem zahrnuje pouze jednotlivé případy a série případů. Novější systematický přehled FMT u UC z roku 2015 udává velmi variabilní dosažení remise 0–68 % u 106 pacientů v šesti studiích (tab. 2) [48]. Kritéria remise a klinické odpovědi však byla u každé studie odlišná. Výtečný výsledek 92% klinické odpovědi dosáhla studie Borodyho, jednalo se však o retrospektivní studii zatíženou možnou zaujatostí při výběru pacientů. Vermiere a kol. léčili osm pacientů s medikamentózně refrakterní UC pomocí FMT [49]. Primárního cíle endoskopické remise



v osmém týdnu dosáhli dva z osmi pacientů. Při zhodnocení efektivity bylo zjištěno, že respondéři dostali FMT od dárce s bohatou a různorodou mikrobiotou.

**Tabulka 2.** Studie fekální mikrobiální transplantace u ulcerózní kolitidy [48]

Autor	Rok	Počet pac.	Diagnóza	Medikace	Klinické zlepšení	Remise
Angelberger	2013	5	Refrakt. UC	5-ASA (3)	20 %	
Borody	2012	62	Aktivní UC		92 %	68 %
Greenberg	2013	14	UC	Ster (10), Anti-TNF (4), 6MP (1)	63 %	
Kump	2013	9	Refrakt. UC		56 %	
Kump	2013	6	Refrakt. UC		33 %	0 %
Kunde	2013	10	Aktivní UC	5-ASA (7), 6MP (4), ster (3)	70 %	30 %

UC – ulcerózní kolitida, 5-ASA – aminosalicyláty, 6MP – 6-merkaptopurin, ster - kortikosteroidy

V roce 2015 publikovali Moayyedi a kol. výsledky z první randomizované placebem kontrolované studie FMT u aktivní UC [32]. Pěťasedmdesát pacientů s aktivní UC (Mayo skóre >4) bylo randomizováno do dvou větví studie, první byla léčena 50ml klyzmatem FMT 1× týdně celkově šest týdnů, druhá skupina dostávala placebo klyzma. Studii dokončilo 70 pacientů (36 FMT a 34 placebo). Remise onemocnění dosáhlo v léčené skupině 9 z 36 pacientů (24 %), ve skupině s placebem 2 z 34 (5 %), což byl statisticky signifikantní rozdíl. Sedm z devíti pacientů, kteří dosáhli remise, obdrželo FMT od stejného dárce. Nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl v nežádoucích účincích. Moayyediho studie zahrnovala velmi různorodou skupinu pacientů (48 % pacientů s pankolitidou, 37 % pacientů na léčbě steroidy, 23 % užívalo imunomodulátory a 9 % biologickou léčbu), ale 50ml klyzma se zdá být poměrně malé k rozpuštění ideálního množství stolice (50–60 g). Dále lze vytknout zmrazení fekálního transplantátu bez kryoprezervace a uchovávání FMT při pouhých –20 °C.

V další randomizované kontrolované studii FMT u UC publikované v roce 2015 Rossenovou a kol. randomizovali 50 pacientů do dvou větví léčených FMT od dárce a FMT

vlastními exkrementy (hrající roli placebo) [50]. FMT byla podávána cestou nazojejunální sondy celkově dvakrát, a to 0. a 3. týden. Primární cíle studie byly klinická remise (definovaná jako Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI)  $\leq 2$ ) a endoskopická odpověď (definovaná jako pokles endoskopického Mayo skóre nejméně o 1). Primárního cíle dosáhlo 7 z 23 pacientů léčených FMT od dárce a 5 z 25 pacientů léčených placebem. Studie neprokázala statisticky signifikantní rozdíl mezi FMT a placebem ( $p = 0,51$ ). U pacientů reagujících na léčbu bylo ve 12. týdnu studie zjištěno podobné složení mikrobiomu jako u jejich dárců. U pacientů nereagujících nebyla tato změna pozorována. U studie Rossenové lze jako limitaci shledat pouze dvě dávky FMT v průběhu celé studie a podání nazojejunální sondou, které snižuje přežívání podaných bakterií [50].

V roce 2017 Paramsothy a kol. uvedli výsledky dosud největší multicentrické studie FMT u UC [51]. 41 pacientů dostalo FMT formou jednorázové kolonoskopické infuze následovanou retenčním klyzmatem 5× týdně po dobu 8 týdnů, přičemž 40 pacientů bylo randomizováno k podání placebo. Endoskopická odpověď byla hodnocena v osmém týdnu. Ze 41 pacientů léčených dárcovskou FMT dosáhlo klinické a endoskopické remise bez steroidů 11 léčených (27 %). Ve skupině s placebem dosáhly primárního endpointu 3 pacienti (8 %). Obě skupiny měly podobný výskyt nežádoucích účinků (78 %, FMT; 83 %, placebo), které byly v naprosté většině případů mírné a samy odezněly. Závažné nežádoucí účinky byly pozorovány u dvou pacientů ve skupině FMT a u jednoho pacienta ve skupině s placebem. Analýza stolice ukázala zvýšenou mikrobiální diverzitu ve skupině s fekální mikrobiální transplantací. Pacienti v této studii dostávali mixovaný materiál FMT až od sedmi různých dárců. Navzdory použití více dárců, a přestože směs stolice měla zvýšenou mikrobiální diverzitu ve srovnání s jednotlivými vzorky stolice, míra klinické a endoskopické remise byla podobná jako v dřívějších studiích, které využívaly jednotlivé dárce. Zatímco celková účinnost se při použití více dárců nezlepšila, studie prokázala různou míru odezvy v závislosti na složení směsi. Byl identifikován efekt superdárce (při použití jeho stolice je dosaženo výrazně vyšší úspěšnosti FMT), kdy při zahrnutí jeho stolice do podané směsi byla dosažena 37% míra remise ve srovnání s 18 % pokud tento superdárce zahrnut nebyl [52].

Stejný kolektiv autorů v čele s Paramsothy v roce 2017 provedl meta-analýzu účinku FMT u UC [53]. Do systematického přehledu bylo zahrnuto 41 studií FMT u UC. Celkově klinické remise dosáhlo 201 z 555 (36 %) pacientů s UC. Ve čtyřech zahrnutých randomizovaných kontrolovaných studiích byl pozorován signifikantní přínos k navození klinické remise  $p=0,006$ . Dílčí analýzy naznačují, že dosažení remise se zlepšilo se zvýšeným

počtem infuzí FMT a podáváním do dolního gastrointestinálního traktu. Většina nežádoucích účinků byly přechodné mírné gastrointestinální potíže.

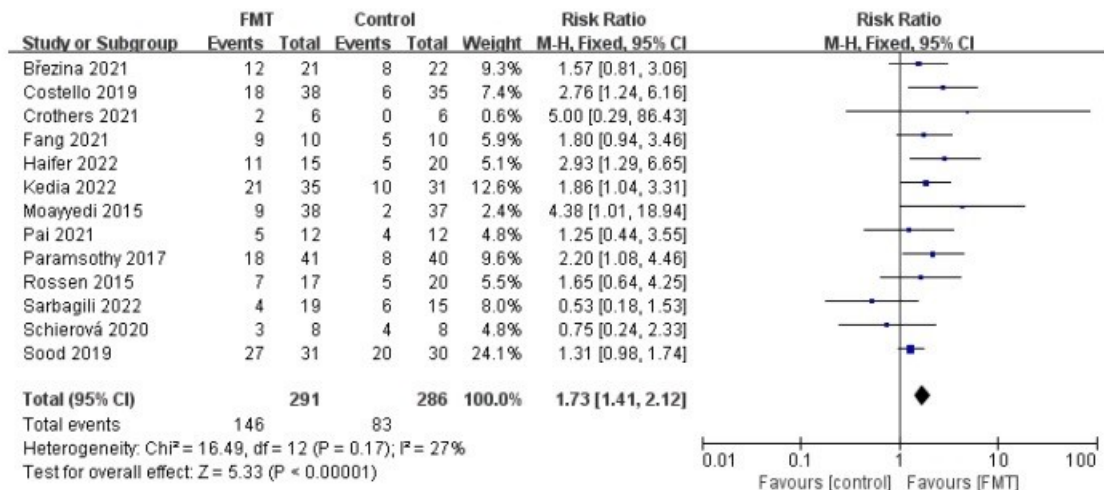
V roce 2019 Costello a kol. [54] zveřejnili výsledky multicentrické studie zahrnující 73 pacientů s mírnou až středně aktivní ulcerózní kolitidou, kteří byli randomizováni k podání anaerobně připravené FMT (38 pacientů) nebo autologní FMT (35 pacientů). FMT bylo podáno pomocí kolonoskopie a následně dvěma klyzmaty během 7 dnů. V otevřené části studie byla dárcovská FMT nabídnuta pacientům v rameni s autologní FMT po 8 týdnech. Pacienti byli sledováni po dobu 12 měsíců. Primárním výsledkem byla remise bez podávání steroidů v 8. týdnu, která byla definována jako celkové Mayo skóre  $\leq 2$  a endoskopické Mayo podskóre 0 nebo 1. Remise nastala u 12 z 38 pacientů (32 %) ve skupině alogenní FMT ve srovnání s pouze 3 z 35 pacientů (9 %) ve skupině autologní FMT. Pět pacientů z alogenní skupiny bylo stále v remisi po 12 měsících (13 %). Ve skupině alogenní FMT byly 3 závažné nežádoucí příhody, v autologní skupině 2.

V roce 2019 Sood a kol. zveřejnili výsledky pilotní studie využití FMT k udržení remise u pacientů s dříve úspěšnou indukcí FMT [55]. Cílem studie bylo posoudit potenciál FMT při udržení remise bez steroidů u UC. Do studie bylo zařazeno 61 pacientů s UC v klinické remisi dosažené po opakované aplikaci FMT. Nemocní byli randomizováni k udržovací FMT nebo placebo pomocí kolonoskopické infuze každých 8 týdnů po dobu 48 týdnů. Studie zkoumala míru klinické (celkové Mayo skóre  $\leq 2$ , se všemi dílčími subskóre  $\leq 1$ ), endoskopické a histologické remise ve 48. týdnu. Z 31 pacientů randomizovaných k léčbě FMT setrvalo 27 (87,1 %) v klinické remisi ve srovnání s 66 % (20 z 30) pacientů, kterým bylo přiděleno placebo. Endoskopické remise bylo dosaženo v 58,1 % (vs. 26,7 % u placebo) a histologické remise v 45,2 % (vs. 16,7 % s placebem). Ve skupině FMT došlo k relapsu onemocnění u tří pacientů (9,7 %), ve skupině s placebem u osmi pacientů (26,7 %). Studie prokázala účinnost a bezpečnost opakované FMT při udržení remise u ulcerózní kolitidy. Podávání FMT formou endoskopické infuze každých 8 týdnů však není v reálné praxi dosažitelné.

Nejnovější systematický přehled od Feng a kol. publikovaný v září 2023 zahrnul 13 RCT zaměřených na účinnost FMT u pacientů s UC [56]. Do přehledu se zapojilo 580 pacientů, z toho 293 pacientů léčených FMT a 287 kontrolních pacientů. Metaanalýza ukázala, že klinická remise byla signifikantně vyšší u pacientů léčených FMT než v kontrolní skupině [RR = 1,73; 95% CI = (1,41, 2,12); P < 0,00001], Obr. 1; dosažení endoskopické remise bylo taktéž signifikantně vyšší ve skupině FMT než v kontrolní skupině [RR = 1,74; 95%

CI = (1,24, 2,44)]; P = 0.001]. Kromě toho nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly ve výskytu nežádoucích účinků mezi oběma skupinami [RR = 1,00; 95% CI = (0,86, 1,15); P = 0,96] [56]. Transplantace fekální mikrobioty prokázala potenciál jako terapeutická intervence k navození klinické remise u ulcerózní kolitidy, nicméně dosažení endoskopické remise a udržení dlouhodobé remise nadále představuje výzvu.

**Obr. 1.** Forest plot pro metaanalýzu klinické remise – Feng a kol. [56].



Z dosavadních dat lze tedy konstatovat mírný až střední efekt FMT u UC a důležitost výběru vhodného dárce. Vzhledem k předpokládanému mechanismu účinku formou mikrobiálního shiftu se jeví opakované a možná i dlouhodobé podání FMT s velkou výhodou.

## 2.2 Crohnova choroba

Zatímco většina studií FMT u IBD se týká pacientů s ulcerózní kolitidou, údajů o její roli u CD je výrazně méně. Variabilní lokalizace CD ztěžuje srovnávání jednotlivých pacientů a může ovlivnit výsledky v závislosti na způsobu podání FMT. Studie Yanga a kol. však neprokázala žádné významné rozdíly v míře klinické remise a nežádoucích účinků u 27 pacientů, kteří podstoupili FMT prostřednictvím gastroscopie nebo kolonoskopie [57]. Plánování kvalitních studií se srovnatelnými skupinami pacientů se u CD zdá být velmi obtížné. Prokázání endoskopické remise u CD může být také mnohem náročnější než u UC. Publikované studie ukazují rozporuplné výsledky, v některých případech došlo po FMT u CD dokonce ke klinickému zhoršení[53, 58].

Největší publikovaná studie o FMT u CD refrakterní na standardní léčbu zahrnovala 30 pacientů [59]. V této skupině byla provedena jednorázová FMT od nepřibuzného dárce cestou nazogastrické sondy. Nejvyšší účinnost (klinické zlepšení – 86,7 % a klinická remise – 76,7 %) FMT zaznamenala v prvním a druhém měsíci od aplikace. Postupně klesala v 6. a 15. měsíci sledování (66,7 % a 60 %). FMT byla zvláště účinná při zmírňování bolestí břicha souvisejících s CD. Studie také zjistila úpravu tělesné hmotnosti, hemoglobinu, albuminu a lipidového profilu v průběhu studie. Po FMT se v průběhu sledování nevyskytly žádné závažné nežádoucí účinky.

Jediná dosud publikovaná randomizovaná zaslepená RCT kontrolovaná fiktivní stolicí hodnotící úlohu FMT u CD měla zcela odlišný design [60]. Jednorázová FMT nebo sham transplantace fyziologickým roztokem byla provedena prostřednictvím kolonoskopie u pacientů s kolonickou nebo ileokolonickou formou CD, kteří před zákrokem dosáhli klinické remise pomocí systémových kortikosteroidů. Autoři předpokládali, že provedení FMT u pacientů, kteří dosáhli remise, by mohlo být účinnější pro udržení remise a bezpečnější než během aktivního zánětu. Primárním cílem studie byla změna mikrobioty na dárcovskou v 6. týdně, ale žádný z pacientů tohoto výsledku nedosáhl. Míra klinické remise bez steroidů po 10 a 24 týdnech byla 44,4 %, resp. 33,3 % ve skupině s falešnou transplantací a 87,5 %, resp. 50,0 % ve skupině s FMT, ale tento rozdíl nebyl statisticky významný. Autoři se domnívají, že tento nedostatek statistické významnosti mohl být způsoben malým počtem pacientů zařazených do studie (osm pacientů ve skupině FMT a devět pacientů ve skupině sham). Na druhou stranu byl zjištěn významný přínos FMT oproti sham proceduře s ohledem na endoskopickou aktivitu onemocnění a hladinu CRP, což naznačuje lepší kontrolu zánětu ve skupině FMT. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi vyšší kolonizací dárcovskou mikrobiotou a udržením remise. Dva pacienti nebyli mikrobiotou dárce kolonizováni vůbec a došlo u nich k časnému vzplanutí CD, podobně jako u pacientů ve skupině se sham transplantací. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v mikrobiálním profilu mezi účinnými a neúčinnými dárci FMT. Autoři se domnívají, že důvodem nedostatečného účinku jedné infuze mohl být nízký index podobnosti mezi mikrobiotou dárce a příjemce [60].

Nedávno byl publikován nový systematický přehled a metaanalýza hodnotící účinnost a bezpečnost FMT u pacientů s CD [61]. Vzhledem k tomu, že ve většině publikovaných studií chybí kontrolní skupiny, obsahují malý počet pacientů a používají různé protokoly FMT, je kvalita a množství dostupných údajů omezená. Nakonec bylo do analýzy zahrnuto pouze 12 studií (jedna RCT, sedm kohortových studií a čtyři případové studie). Celková míra klinické

remise a klinické odpovědi u pacientů s CD byla 62 %, resp. 79 %. Remise souvisela s pozitivní změnou střevního mikrobiomu. Ve většině studií dostávali pacienti pouze jednu infuzi FMT. Autoři naznačují, že k udržení dlouhodobé klinické odpovědi může být podobně jako u UC nutné opakování infuzí FMT. FMT čerstvou stolicí byla spojena s vyšší klinickou remisí než u FMT mraženou stolicí (73 % vs. 43 %;  $p < 0,05$ ). Většina nežádoucích účinků byla mírná a dočasná.

### 2.3 Pouchitida

Další možnou indikací pro FMT u IBD je pouchitida. Ta se vyskytuje až u 60 % pacientů s UC po proktokolektomii a je nejčastější dlouhodobou komplikací u této skupiny pacientů [62]. Přesná patogeneze pouchitidy zůstává nejasná, ale dysbióza představuje klíčový faktor. Tuto hypotézu podporují rozdíly ve složení mikrobioty mezi pacienty s pouchitidou a bez ní, role antibiotik v léčbě pouchitidy a probiotik v prevenci jejích recidiv [63, 64].

Recentní systematický přehled hodnotící roli FMT v léčbě chronické pouchitidy zahrnoval pouze devět studií lišících se designem i kritérii hodnocení [62]. Obecně byla klinická odpověď na FMT zaznamenána u 14 (31,8 %) ze 44 pacientů v různých časových bodech po FMT a klinická remise u 10 (22,7 %) pacientů. Dosud byla publikována pouze jedna RCT, která však neprokázala žádný příznivý účinek FMT a byla předčasně ukončena [65]. Autoři vyvozují, že nízká efektivita FMT v této indikaci je zapříčiněna minimálním usazením dárcovského mikrobiomu v ileálním vaku (pouze jeden ze šesti pacientů úspěšně podstoupil FMT). K vyhodnocení skutečného účinku FMT u pacientů s pouchitidou a optimální terapeutické strategie (způsob podání FMT, počet procedur a výběr dárce), budou zapotřebí další dobře navržené kontrolované studie.

# **HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE**

## **Hypotézy**

- 1) Fekální bakteriální transplantace příznivě ovlivňuje průběh ulcerózní kolitidy.
- 2) Fekální bakteriální transplantace vede k signifikantní změně mikrobiomu u pacientů s ulcerózní kolitidou.

## **Cíle práce**

- 1) Provedení randomizované kontrolované studie zaměřené na léčbu pacientů s ulcerózní kolitidou pomocí fekální bakteriální transplantace.
- 2) Hodnocení vlivu fekální bakteriální transplantace na průběh levostranné ulcerózní kolitidy.
- 3) Popis změn mikrobioty po fekální bakteriální transplantaci a jejich trvání v čase.

## **PUBLIKACE 1**



Article

# Fecal Microbial Transplantation versus Mesalamine Enema for Treatment of Active Left-Sided Ulcerative Colitis—Results of a Randomized Controlled Trial

Jan Březina <sup>1,\*</sup>, Lukáš Bajer <sup>1</sup>, Pavel Wohl <sup>1</sup>, Dana Ďuricová <sup>2</sup>, Pavel Hrabák <sup>3</sup>, Aleš Novotný <sup>3</sup>, Jana Koželuhová <sup>4</sup>, Milan Lukáš <sup>2</sup>, Jakub Mrázek <sup>5</sup>, Kateřina Olša Fliegerová <sup>5</sup>, Simona Kvasnová <sup>5</sup>, Mekadim Chahrazed <sup>5</sup>, Jan Mareš <sup>1</sup>, Julius Špičák <sup>1</sup> and Pavel Drastich <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Hepatogastroenterology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 14021 Prague, Czech Republic; bajl@ikem.cz (L.B.); pawo@ikem.cz (P.W.); janmares42@gmail.com (J.M.); jusp@ikem.cz (J.Š.); padr@ikem.cz (P.D.)
  - <sup>2</sup> Clinical and Research Centre for IBD ISCARE, 19000 Prague, Czech Republic; duricova@iscare.cz (D.Ď.); milan.lukas@email.cz (M.L.)
  - <sup>3</sup> 4th Department of Medicine—Department of Gastroenterology and Hepatology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 12808 Prague, Czech Republic; pavel.hrabak@vfn.cz (P.H.); novotnyaales@seznam.cz (A.N.)
  - <sup>4</sup> Gastroenterology Department, I. Internal Clinic, University Hospital in Pilsen, 30100 Pilsen, Czech Republic; kozeluhova@fnplzen.cz
  - <sup>5</sup> Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Science, v.v.i., 14220 Prague, Czech Republic; mrazek@iapg.cas.cz (J.M.); fliegerova@iapg.cas.cz (K.O.Ě.); kvasnova@iapg.cas.cz (S.K.); mekadim@iapg.cas.cz (M.C.)
- \* Correspondence: jan.brezina@ikem.cz; Tel.: +420-724-222-340



**Citation:** Březina, J.; Bajer, L.; Wohl, P.; Ďuricová, D.; Hrabák, P.; Novotný, A.; Koželuhová, J.; Lukáš, M.; Mrázek, J.; Fliegerová, K.O.; et al. Fecal Microbial Transplantation versus Mesalamine Enema for Treatment of Active Left-Sided Ulcerative Colitis—Results of a Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2753. <https://doi.org/10.3390/jcm10132753>

Academic Editors: Angelo Viscido and Andrew Day

Received: 15 May 2021  
Accepted: 16 June 2021  
Published: 22 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background and Aims: Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disease. Fecal microbial transplantation (FMT) is a promising alternative treatment. Methods: This multicenter, open-label, noninferiority trial randomized patients with active left-sided UC (Mayo score 4–10) equally to FMT or 5-aminosalicylic acid (5-ASA) enemas. FMT enemas were administered five times in the first week and then once weekly for 5 weeks. 5-ASA enemas were administered daily for 2 weeks and then every other day. The primary study endpoint was clinical remission, with a total Mayo score  $\leq 2$  at week 12 with no subscore  $>1$ . Results: Sixty-one patients were screened; 45 were enrolled and randomized to FMT ( $n = 23$ ) or 5-ASA ( $n = 22$ ). Twenty-one FMT and 22 5-ASA patients completed at least the week 4 study visit and were included in the mITT analysis. Twelve FMT (57%) and eight 5-ASA patients achieved the primary study endpoint. FMT noninferiority with 10% margin was confirmed (95% CI:  $-7.6\%$ ,  $48.9\%$ ). Adverse events occurred in 12 FMT (57%) and 13 5-ASA (59%) patients. Increased microbial diversity persisted 3 months after FMT. Conclusion: FMT is an effective treatment for left-sided UC and increased recipient microbiome diversity. Targeted microbiome modification may improve FMT efficacy. Further investigation is needed to guide donor and patient selection.

**Keywords:** ulcerative colitis; fecal microbial transplantation; 5-aminosalicylic acid

## 1. Introduction

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disease of the colonic mucosa and submucosa. Despite significant improvements in therapy, which include biological treatment, some patients continue having disease manifestations such as bloody diarrhea and cramps, as well as persistent colonic inflammation, while others experience adverse effects of medical therapy of varying severity. The pathogenesis of UC is not yet fully understood, but it is thought to involve failure to maintain immune and microbiome homeostasis. Compared with the general population, the gut microbiome in patients with UC is significantly less diverse and less stable over time [1,2]. It has not been established whether that is a

cause or a consequence of UC. The benefits of prebiotics, probiotics, and synbiotics in the treatment of UC are inconclusive [3,4]. Presumably, the most effective way to change the composition of the gut microbiome is fecal microbial transplantation (FMT). For example, FMT has shown excellent efficacy in recurrent *Clostridoides difficile* infection [5,6]; so far, five randomized controlled trials (RCTs) have reported promising results of FMT in the treatment of UC [7–11]. Three of four studies (Moayyedi et al., Paramsothy et al., and Costello et al.) examining FMT in inducing remission in active UC demonstrated FMT superiority over placebo [7,9,10]. However, differences in the methods and frequencies of administration and evaluation criteria do not allow clear conclusions to be drawn. None of the studies specifically evaluated patients with left-sided UC, which accounts for 30–50% of the cases [12]. Even though their clinical course and therapy may differ, left-sided colitis is perceived as the same disease as pancolitis [12]. In left-sided colitis, topical mesalamine is superior to oral therapies and topical steroids, and it has an excellent safety profile; therefore, it is considered a standard of care [13]. As FMT administered as an enema can be seen as a topical therapy, we decided to compare its efficacy and safety with that of mesalamine in the noninferiority FACTU (fecal bacteriotherapy for ulcerative colitis) trial, the first randomized controlled trial (RCT) to compare FMT enema with topical 5-aminosalicylic acid (5-ASA) therapy in patients with left-sided UC. For feasibility reasons, we decided for a noninferiority trial with the aim of paving the way for a possible larger trial in the future, which could even show the superiority of FMT to mesalamine.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

This was an open-label randomized noninferiority trial comparing the treatment efficacy of FMT enema and standard 5-ASA enema in patients with active left-sided UC. The patients were enrolled in four inflammatory bowel disease (IBD) centers in the Czech Republic. They were the Institute for Clinical and Experimental Medicine (IKEM, Prague, Czechia), Clinical and Research Centre for IBD (ISCARE, Prague, Czechia), General University Hospital in Prague, and University Hospital in Pilsen. The local research ethics committees at each site approved the trial, and the Ministry of Health of the Czech Republic authorized the use of FMT in the treatment of left-sided UC for this study. All participants gave their signed informed consent. The trial was registered on ClinicalTrials.gov, number NCT03104036 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03104036>, accessed on 25 January 2021).

### 2.2. Study Population

We enrolled adult patients younger than 70 years of age with clinically and endoscopically active left-sided UC (i.e., extent of more than 15 cm and less or to the lial flexure) of >3 months duration, a total Mayo score of 4–10, and endoscopy subscore  $\geq 2$ . Use of oral 5-aminosalicylates (stable dose for 8 weeks, maximal dose 4 g), thiopurines (stable dose for 8 weeks), and oral prednisone ( $\leq 10$  mg daily and stable for 4 weeks) was allowed. After inclusion, patients had to remain on the same dosage during the study period. The exclusion criteria are shown in detail in Table S1 (Supplementary Materials). Briefly, individuals with indeterminate colitis, Crohn's disease, irritable bowel syndrome, a history of bowel cancer, and positivity for *Clostridoides difficile* infection or another enteric pathogen, as well as pregnant or breastfeeding women, were excluded. Use of rectal corticosteroids or 5-aminosalicylate in the 4 weeks before enrolment, antibiotics or probiotics in the 8 weeks before enrolment, methotrexate in the 8 weeks before enrolment, or biological therapies or calcineurin inhibitors in the 12 weeks before enrolment was not allowed. At study entry, all potentially eligible patients underwent colonoscopy or sigmoidoscopy. We excluded those with gastrointestinal infections including bacterial and parasitic pathogens, cytomegalovirus, and *Clostridoides difficile*.

### 2.3. Randomization

Eligible patients were randomized 1:1 using a computer-generated randomization list stratified by gender and the receipt of immunosuppressive therapy. The randomization was performed centrally at IKEM in Prague.

### 2.4. Interventions

We administered 10 study FMT infusions to the treatment group, five in the first week and once weekly in the following 5 weeks. Participants in the 5-ASA group were treated with a standard-of-care regimen that included 4 g mesalamine enemas daily for 2 weeks and then every other day until the end of week 6. Enema tolerance was defined as retaining the enema for at least 15 min.

### 2.5. Clinical Outcomes

The primary study endpoint was clinical remission, which was defined as a total Mayo score  $\leq 2$  with no subscore  $> 1$  at week 12. Secondary endpoints were clinical response, defined as a reduction in total Mayo score  $\geq 2$  points, and endoscopic remission, defined as an endoscopic Mayo score of 0 at weeks 6 and 12. Endoscopic disease activity was assessed by sigmoidoscopy at weeks 6 and 12, and the total Mayo score was calculated. Endoscopies were performed and recorded at each study center and were then centrally assessed by two endoscopists blinded to the administered therapy. Any discrepancies were resolved by discussion and agreement. Adverse events were assessed at every study visit and reported following the Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 5.0.

### 2.6. FMT Enema Preparation

Fecal samples were collected at each center from healthy donors who were younger than 60 years of age. We excluded blood relatives, individuals hospitalized in the previous 3 months or treated with antibiotics or proton pump inhibitors in the previous 6 months, immunosuppressed individuals, and those with a history of chronic gastrointestinal tract problems (e.g., IBD, constipation, functional dyspepsia), autoimmune diseases, or obesity. Donors with a history of travel to risk areas in the previous 3 months were also excluded. All donors underwent rigorous screening for infectious diseases (Table S2, Supplementary Materials). Each study center was responsible for potential donor selection. Each stool sample was analyzed by 16S rRNA sequencing; at each center, a donor with the greatest microbiome diversity and an alternate were selected. We then used those donors for all the patients participating at a single center. Each patient received FMT from the same donor over the entire study.

Donor stool samples were evaluated by study staff for the presence of mucus and blood and assessed for consistency. The sample was weighed, 150 mL of saline was added for each 50 g of stool, and the suspension was homogenized with a standard kitchen mixer. The resulting product was filtered twice through sterile gauze to remove large stool residues. Glycerol was added as a cryoprotectant, and the sample was transferred to study containers. The volume of each infusion was 150–170 mL. The infusions were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . On the day of administration, the study infusions were thawed for 1 h at normal room temperature and then for 1 h in a  $37^{\circ}\text{C}$  bath. The study infusions were administered immediately after thawing to the patients at the study site.

### 2.7. Assessment and Analysis of the Microbiome

Fecal samples were collected at baseline and each study visit at weeks 2, 4, 6, and 12 in the FMT group, at weeks 2 and 12 in the 5-ASA group, and at the 1 year follow-up in all patients, if completed. Stool samples from patients and donors were frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Genomic DNA was extracted from frozen samples using Power Fecal DNA isolation kits (QIAGEN, Hilden, Germany) with bead-beating cell disruption in a FastPrep-24 homogenizer (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). The isolated DNA was checked with a NanoDrop 2000c UV/Vis spectrophotometer (Thermo

Scientific, Waltham, MA, USA) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The DNA was used to prepare V4-5 16S rDNA amplicons as described by Fliegerová et al. [14]. The amplicons were purified with a Monarch DNA Clean up kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and used for high-throughput sequencing on an Ion Torrent platform following the manufacturer's protocol.

Bacterial 16S rRNA gene sequences were obtained in FASTQ format for analysis with QIIME 2 2020.2 pipelines [15]. For sequence quality, DADA2 was used as a noise filter and to remove chimeric sequences [16]. VSEARCH was used for clustering and taxonomy classification of the filtered sequences using the SILVA database [17]. The Shannon index of diversity and principal coordinate analysis (PCoA) of Bray–Curtis distance were assessed after the samples were rarefied to 5000 sequences each. Linear discriminant analysis (LDA) with an effect size (LefSe) algorithm [18] in the Galaxy Web module (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>, accessed on 24 March 2021) was performed for biomarker identification. The factorial Kruskal–Wallis and pairwise Wilcoxon tests were used to detect taxa with significant differential relative abundance of bacterial families in treatment responders and non-responders. The alpha value was 0.05, with a threshold value of 2.0 for the logarithmic LDA scores of discriminative features.

### 2.8. Statistical Analysis

We aimed to recruit 50 patients with active UC (25 in each arm), based on a sample-size calculation that assumed a 30% remission rate in the 5-ASA arm [19] and a 60% remission rate in the FMT arm [20], requiring 80% power in a noninferiority design with a 95% two-sided confidence interval (CI) and a 10% noninferiority margin, and assuming a 5% attrition rate. Descriptive statistics (median, maximum, minimum values) were used to describe the results. The 95% CI of the differences in treatment success rate was calculated by bootstrapping with  $10^6$  iterations. For the secondary outcomes, differences between treatments were tested by Fisher's exact test. The analysis was performed in a modified intention-to-treat (mITT) population requiring tolerance of the treatment for inclusion. We used Python 3.7.4 (numpy 1.16.5, scipy 1.3.1, matplotlib 3.1.1) for the statistical analysis.

## 3. Results

Sixty-one patients were recruited between April 2017 and October 2020. After screening, 45 were randomly allocated to either FMT ( $n = 23$ ) or 5-ASA enema ( $n = 22$ ). Two patients in the FMT group who did not tolerate the first enema were not included in the final analysis. Forty-three patients, 21 in the FMT group and 22 in the 5-ASA group, completed at least the visit in week 4 and were included in mITT analysis (Figure 1). The baseline demographic and clinical characteristics of both groups were similar except for a longer disease duration in the FMT group, a difference that was not significant ( $p = 0.07$ , Table 1).

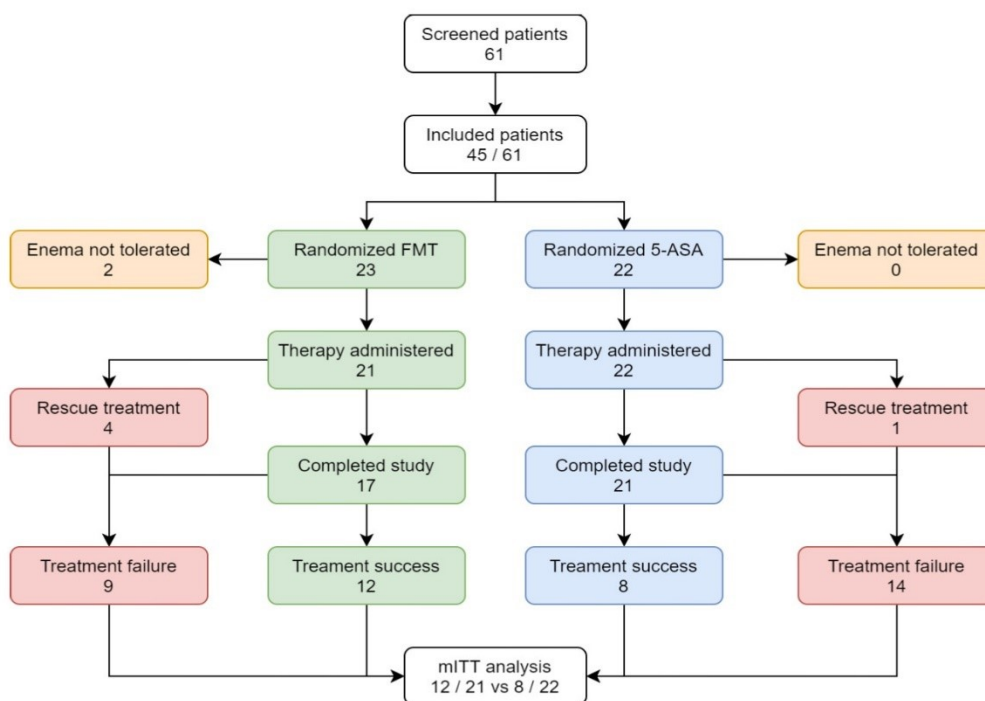


Figure 1. Trial profile. 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; FMT, fecal microbial transplant; mITT, modified intention-to-treat.

Table 1. Patient baseline characteristics.

	Fecal Microbiota Transplantation (n = 23)	5-ASA Enema (n = 22)
Male	12 (52%)	11 (50%)
Female	11 (48%)	11 (50%)
Age	39 (25–63)	39.5 (27–70)
Disease duration (years)	9 (1–20)	4.5 (0.6–20)
Prior biologic exposure	0 (0%)	0 (0%)
Concomitant therapy		
Oral 5-aminosalicylate	19 (83%)	18 (82%)
Oral steroids	3 (13%)	2 (9%)
Oral immunomodulator	5 (22%)	4 (18%)
Total Mayo score	6 (4–10)	6 (4–10)
Endoscopic Mayo = 2	19 (83%)	18 (82%)
Mayo = 3	4 (17%)	4 (18%)
Fecal calprotectin (µg/g)	1817.5 (166–6000)	1220 (80–6000)
C-reactive protein (mg/L)	2.3 (0.3–25)	2.1 (0.4–32.8)
White-cell count (×10 <sup>9</sup> cells/L)	7.9 (5.4–11.7)	6.3 (3.9–12.3)
Hemoglobin (g/L)	141 (107–163)	142 (104–161)

Data are the number of patients (%) or median (range). 5-ASA, 5-aminosalicylic acid.

### 3.1. Clinical Outcome

Table 2 presents the outcome results at weeks 6 and 12. Twelve of the 21 FMT patients (57%) and eight of the 22 5-ASA enema patients (36%) successfully achieved the primary study endpoint at week 12. The noninferiority of FMT with 10% margin was confirmed (95% CI:  $-7.6\%$ ,  $48.9\%$ ). Only one responder in each group was on corticosteroid therapy at week 12. No statistically significant between-group differences in the secondary outcomes were found. A clinical response was achieved at week 6 by 14 FMT patients (64%) and 12 5-ASA patients (55%,  $p = 0.53$ ) and at week 12 by 15 FMT patients (71%) and 12 5-ASA patients (55%,  $p = 0.35$ ). Endoscopic remission was achieved at week 6 by three FMT patients (14%) and one 5-ASA patient (5%),  $p = 0.34$ ) and at week 12 by three FMT patients (14%) and three 5-ASA patients (14%,  $p = 1.0$ ).

**Table 2.** Primary and secondary outcomes at weeks 6 and 12.

	Fecal Microbiota Transplantation ( $n = 21$ )	5-ASA Enema ( $n = 22$ )	95% CI for Difference
<b>Primary outcome</b>			
Clinical remission (week 12)	12 (57%)	8 (36%)	( $-7.6\%$ , $48.9\%$ )
<b>Secondary outcome</b>			
			<b>p-value</b>
Clinical response (week 6)	14 (64%)	12 (55%)	0.53
Clinical response (week 12)	15 (71%)	12 (55%)	0.35
Endoscopic remission (week 6)	3 (14%)	1 (5%)	0.34
Endoscopic remission (week 12)	3 (14%)	3 (14%)	1.0

5-ASA, 5-aminosalicylic acid; CI, confidence interval.

### 3.2. Safety

Twelve FMT patients (57%) and 13 5-ASA patients (59%) had at least one adverse event during the 12 week period of study observation. Between-group differences in the number or type of adverse events were not significant (Table 3). The most common adverse events were self-limiting gastrointestinal complaints. Five serious adverse events occurred during study treatment, four in patients with FMTs and one in a patient given 5-ASA enemas. In all cases, it was a worsening of colitis with the need for treatment intensification (i.e., an increase in oral corticoids in two cases, intravenous corticoids in one case, and biologic therapy in two cases). No patient required a colectomy during the study period or during the 1 year follow-up, if completed. Enema tolerance was generally good, with only two patients in the FMT group and none in the 5-ASA group experiencing intolerance.

**Table 3.** Adverse events.

	Fecal Microbiota Transplantation ( $n = 21$ )	5-ASA Enema ( $n = 22$ )
Total adverse events	22	21
Total patients with adverse events	12 (57%)	13 (59%)
Total patients with serious adverse events	4 (19%)	1 (5%)
Infection	1 (5%)	0 (0%)
Worsening of ulcerative colitis	8	9
Abdominal pain	5	8
Bloating	2	1
Rash	0	1
Fever	2	1

5-ASA, 5-aminosalicylic acid.

### 3.3. Donor Selection

Eleven donors from the four centers were tested for the most suitable microbiota composition. Following evaluation of relative taxonomies (Figure S1, Supplementary Materials) and calculation of diversity indices, four donors were chosen, one at each medical center. Phylum Firmicutes was predominant in all stool samples with a prevalence

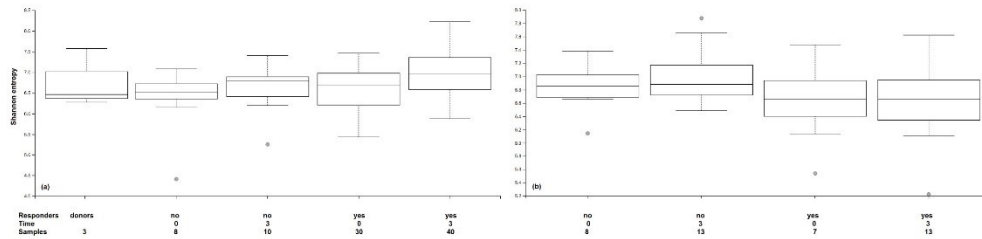
of families Lachnospiraceae (50.3–70.3%) and Ruminococcaceae (12.6–23%). The genera of butyrate-producing bacteria included *Blautia*, *Roseburia*, and *Faecalibacterium*.

#### 3.4. Microbiome Outcomes

The microbiome results obtained in the 3 months following treatment are reported here. The 1 year results are not available at this time because of study delays and will be published later. A total of 135 fecal samples from 35 patients were analyzed by high-throughput sequencing. Forty-seven samples were from 17 patients given 5-ASA enemas and 88 were from 18 patients with FMTs. A total of 13 phyla were detected in the stool samples from patients with UC in the FMT group. Two dominant phyla were found in all samples, Firmicutes (54.4–67.7%) and Bacteroidetes (15.5–27.1%), which were represented mainly by orders Clostridiales and Bacteroidales. The predominant Actinobacteria (7.6–16.6%) were Bifidobacteriales and Coriobacteriales. The predominant Proteobacteria (1.8–6%) were Gammaproteobacteria. The relative abundance of other phyla including Fusobacteria, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Tenericutes, Patescibacteria, Epsilonbacteraeota, Cyanobacteria, Cloacimonetes and Acidobacteria was very low (all  $\leq 0.5\%$ ). Three months after FMT treatment, decreases in the relative abundance of order Bacteroidales and family Bacteroidaceae were detected in the responders. The FMT responders showed partial clustering of microbiota after treatment and increased diversity indices (Figure 2). That was confirmed by LDA, which revealed 31 taxa with significantly different abundance (LDA scores  $> 2$ ) in responders and non-responders (Figure 3). Bacteroidales, Prevotellaceae, Veillonellaceae and Desulfobacteria were significantly higher in responders. Staphylococcaceae, Lactobacillaceae and Bifidobacteriaceae were significantly higher in non-responders. Lastly, PCoA of the Bray–Curtis distance matrix revealed a high clustering power of samples of personal origin, with only a minor contribution from FMT responders versus non-responders (Figure S2, Supplementary Materials).

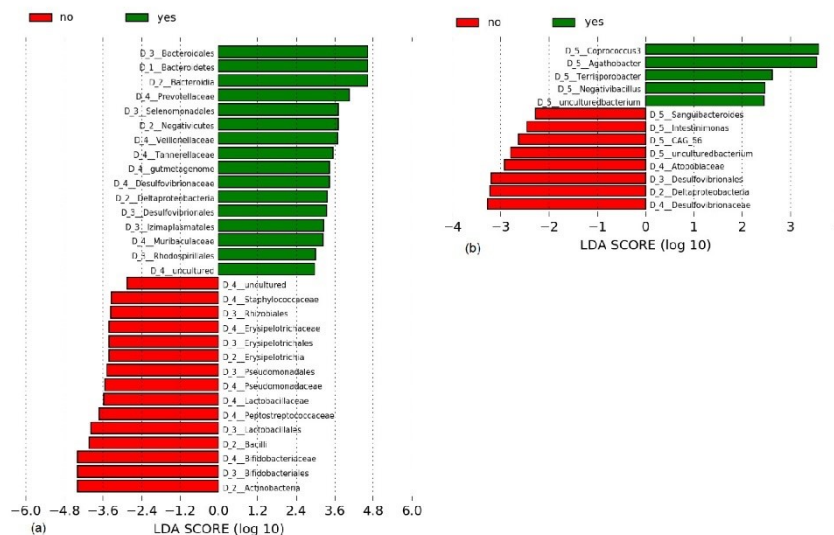
A total of eight phyla were identified in the samples of patients with UC in the 5-ASA group. Firmicutes (59.3–65.8%) and Bacteroidetes (19–30.7%) were the dominant phyla in all samples regardless of the time of sampling. Actinobacteria (5.7–9.1%), Proteobacteria (1–4.1%), and Tenericutes (0.1–2.1%) were present in all samples. Phylum Firmicutes was mainly represented by members of order Clostridiales, phylum Bacteroidetes was mainly represented by order Bacteroidales, and order Bifidobacteriales was the predominant representative of the phylum Actinobacteria. Other phyla, including Fusobacteria, Lentisphaerae, and Verrucomicrobia were detected at low frequencies (all  $\leq 0.5\%$ ). Three months after treatment, increased relative abundance of order Bacteroidales, primarily families Bacteroidaceae and Prevotellaceae, was still detected in the 5-ASA responders (Figure 4).

Significant changes in the microbial taxa after 5-ASA treatment were not seen in the patients who were tested (Figure 4). However, linear LDA effect size revealed differences in the relative abundance of 13 taxa between responders and non-responders (Figure 3). The main differences were the enhanced presence of the genera *Coprococcus* and *Agathobacter* in responders and family Desulfobacteriaceae and class Deltaproteobacteria in non-responders.

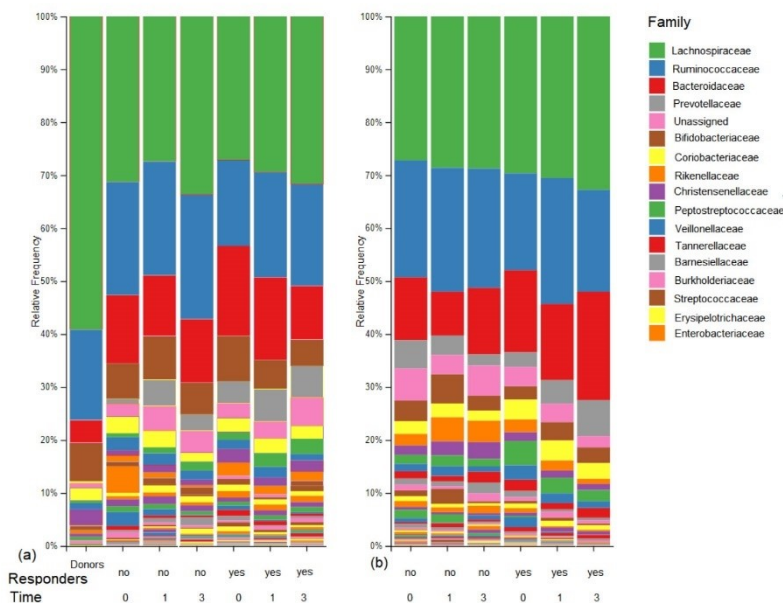


**Figure 2.** Microbial diversity expressed as Shannon entropy index of treatment responders and non-responders for (a) 5-aminosalicylates group and (b) fecal microbial transplantation group and the donors. The samples are grouped based on responsiveness to the treatment (yes/no) and time point of a sample collection 0 (before therapy) and 3 (weeks 1–12), the circle symbol represents outliers.





**Figure 3.** Linear discriminant analysis (LDA) scores of the microbial taxa of responders (yes) and non-responders (no) to (a) fecal microbial transplantation and (b) 5-aminosalicylic acid treatment of patients with left-sided ulcerative colitis.



**Figure 4.** Relative abundance of fecal bacteria at the family level in all 135 samples from 35 patients with left-sided ulcerative colitis treated by (a) fecal microbial transplantation or (b) aminosalicylic acid. Donor profiles are shown in (a). The results are grouped by responsiveness to the treatment (yes/no) and the time of collection: 0 (before treatment), 1 (2–4 weeks after treatment), and 3 (12 weeks after treatment).

#### 4. Discussion

This study assessed the clinical efficacy of FMT enema in patients with left-sided UC with mild to moderate disease activity. Our results provide evidence that FMT enemas were not clinically inferior to standard care with 5-ASA enemas. More than half of the FMT patients experienced clinical remission at week 12. Differences in the secondary outcomes of clinical response and endoscopic remission achieved in the FMT group and the 5-ASA enema comparator group were not significant. Treatment with FMT enemas had a good safety profile and was generally well tolerated. We observed increased gut microbial diversity in both groups; however, over 3 months of follow-up, FMT sustained an effect compared to 5-ASA group.

Five RCTs have been published to date on the use of FMT in UC. Four evaluated the achievement of remission in active UC [7–10] and one evaluated the maintenance of remission [11]. Two were published in 2015 and were terminated early for presumed lack of effectiveness [7,8]. However, in one of those studies by Moayyedi et al., a final analysis found that remission, with a full Mayo score of <3, was achieved at week 7 by 25% of the participants after receiving once-weekly FMT enemas for 6 weeks [7]. A subsequent study by Paramsothy et al. found that a very intensive FMT regimen including a single colonoscopic administration followed by enemas given 5 days per week for 8 weeks achieved a steroid-free clinical remission rate of 27% compared with 8% for placebo [9]. Similar results were obtained by an Australian study that reported a steroid-free remission of 32%, despite a much less intensive treatment regimen of one colonoscopic infusion followed by two enemas over 7 days [10]. In our study, 57% of the patients treated with FMT enemas achieved clinical remission at week 12. The remission rate is higher than that reported in previous studies, and it does not appear to be affected by corticoid use, which was minimal in our study. Only one FMT patient using corticosteroids achieved clinical remission, for a hypothetical steroid-free clinical remission rate of 52%. The results may have been influenced by our study population, which included only patients with mild to moderately active UC compared with moderate to severe UC in previous studies. We also believe that the patients in our FMT group benefited from the intervention regimen, in which five consecutive administrations in the first week and five enemas in each of the following 5 weeks promoted and sustained the microbiome changes.

Key features distinguishing our trial from previous studies of FMT in UC were donor selection by 16S rRNA sequencing and the focus on left-sided UC. Previous studies have reported that FMT using material from donors with high microbiome diversity was associated with improved clinical outcomes in the treatment of UC [7]. Donor prescreening to select those with the highest microbiome diversity could improve the effectiveness of FMT, but this has to be verified in future studies.

Previous studies of the efficacy of FMT for the treatment of UC did not take into account the extent of UC. By including patients with pancolitis, left-sided colitis, and proctitis, the topical effect of FMT might be overlooked. UC was characterized by Moayyedi et al. as a disorder that originates in the rectum, with the rectum as the site of most dysbiosis [21]. Pancolitis in *Clostridoides difficile* infection has been effectively treated by FMT retention enemas [22], but UC is characterized by a complex interaction of genetics, microbiome, and environment that might result in increased resistance to the therapeutic effect of FMT in extensive disease [23]. Therefore, we hypothesized that focusing on left-sided UC might lead to better treatment efficacy. Further study comparing FMT efficacy in disease that varies in extent is needed for clarification.

Our study was designed to test the noninferiority of FMT to 5-ASA enema for the treatment of UC. FMT has already been shown to be superior to placebo for the treatment of UC [7,9,10]. That was an important step toward achieving its clinical application, but comparison to other available treatments is necessary. As a superiority trial would require a number of patients beyond the capabilities of our four centers, we opted for the noninferiority design. First, proof on noninferiority allows applying an alternative treatment with some other beneficial properties different from the treatment success. Second, as FMT

tends to be actually superior to 5-ASA in treatment success, our study makes the starting point easier for a future superiority trial. The potential future patients are not put at risk of receiving a potentially highly inferior treatment. Only one responder in each group was on corticosteroid therapy at week 12.

Recently, it was reported that the diversity, composition, and bacterial interaction patterns in mucosal samples of patients with UC were altered after 5-ASA treatment [24]. In this study, Shannon's diversity index of fecal microbiota was lower in patients with UC before FMT treatment and in non-responders than it was in healthy donors. The diversity index increased in the patients who responded to FMT, and the microbiota composition changed to resemble that seen in a healthy donor. Similar findings were discussed by Khanna et al. in a review published in 2017 [25].

In this study, the relative abundance of Lachnospiraceae and Ruminococcaceae increased gradually and that of Bacteroidaceae decreased gradually, becoming similar to the abundance in healthy donors. The opposite was noticed in the non-responder patients. An increase in family Lachnospiraceae was also observed in our previous study [26]. At the genus level, *Blautia* and *Faecalibacterium* increased and *Bacteroides* decreased after FMT treatment, but their abundance remained different from that in healthy donors. Consistent with our finding, a significant increase of *F. prausnitzii* after FMT was reported in patients with mild to moderately active UC [27]. Similar to our findings, in a study of FMT in patients with *Clostridioides difficile* infection, the relative abundance of *Faecalibacterium* was significantly increased in those with IBD and that of *Blautia* was increased in those without IBD. After FMT, the abundance of *Bacteroides* was increased in patients with IBD [25].

In this study, LEfSe analysis indicated that there were differences in the intestinal microbiota between responders and non-responder patients after FMT treatment. Sokol et al. suggested that the success of FMT therapy and donor microbiota colonization might be affected by the recipient's baseline characteristics [28]. In our patients, FMT enemas from all four donors had positive effects on the recipients' microbiota and host health despite differences in the pretreatment bacterial profiles. 5-ASA treatment caused an increase in Firmicutes and Actinobacteria phyla and a decrease in *Proteobacteria* 1 month after treatment, which was also observed by Olaisen et al. in 2019 [29]. However ongoing monitoring found that the changes in microbiota composition were reversed by 3 months, suggesting that the original core mucosa was able to restore its original composition. In our FMT patients, the increase in Firmicutes, mainly family Lachnospiraceae, and decrease in Bacteroidaceae and Enterobacteriaceae were maintained at 3 months after treatment. The persistence of a microbiota shift toward the donor composition is in agreement with previous studies that tested long-term fecal microbiota transplantation in patients with *Clostridioides difficile* infection [30] and in healthy volunteers [31]. However, this is the first study to report the benefits of FMT in patients with UC. LDA of pretreatment microbiota did not identify any microbial species associated with patient responsiveness to either 5-ASA or FMT.

Our study has some limitations. The main limitation is its open-label design, which might have led to overestimation of clinical remission and FMT response rates because of the placebo effect. However, in a recent Australian trial of FMT in patients with active UC, efficacy did not differ between the blinded and open-label arms [9]. Another drawback was the inability to enroll the planned number of study participants because recruitment was limited by the small number of participating centers and the discontinuation of study funding. Despite these limitations, we achieved the primary endpoint. A minor limitation was the reduced number of stool samples included in the microbial analysis because of storage problems at one study center.

In conclusion, our study evidence supports FMT enema as a promising treatment of left-sided UC, which is associated with a significant increase in microbiome diversity. Targeted microbiome modification may contribute to increased FMT efficacy, with potential as a novel option for difficult-to-treat UC. Further research is needed to identify suitable donors and patients for FMT and to clarify long-term outcomes.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10132753/s1>: Figure S1. Relative abundance of common bacterial families of stool donors; Principal coordinate analysis showing Bray Curtis distance matrix between patients treated by (a) aminosalicylates and (b) faecal microbial transplantation; Table S1. Study exclusion criteria; Table S2. Donor examination.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.B., M.L., J.M. (Jan Mareš) and P.D.; formal analysis, J.M. (Jan Mareš); investigation, J.B., L.B., P.W., P.H., A.N., J.K., M.L., J.M. (Jakub Mrázek), K.O.F., S.K. and M.C.; methodology, K.O.F. and J.Š.; supervision, J.M. (Jakub Mrázek) and P.D.; writing—original draft, J.B. and J.M. (Jakub Mrázek); writing—review and editing, D.D. and P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant number 16-27449A.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by The Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital (protocol code G 14-08-57, 13 August 2014).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data underlying this article can be shared on reasonable request to the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy reasons.

**Conflicts of Interest:** D.D. has received lecture fees from Takeda, Janssen, and Pfizer.

## References






- Lloyd-Price, J.; Arze, C.; Ananthakrishnan, A.N.; Schirmer, M.; Avila-Pacheco, J.; Poon, T.W.; Andrews, E.; Ajami, N.J.; Bonham, K.S.; Brislawn, C.J.; et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* **2019**, *569*, 655–662. [[CrossRef](#)]
- Duvallet, C.; Gibbons, S.M.; Gurry, T.; Irizarry, R.A.; Alm, E.J. Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kaur, L.; Gordon, M.; Baines, P.A.; Iheozor-Ejiofor, Z.; Sinopoulou, V.; Akobeng, A.K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, *3*, CD005573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Laurell, A.; Sjöberg, K. Prebiotics and synbiotics in ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2017**, *52*, 477–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Van Nood, E.; Vrieze, A.; Nieuwdorp, M.; Fuentes, S.; Zoetendal, E.G.; de Vos, W.M.; Visser, C.E.; Kuijper, E.J.; Bartelsman, J.F.; Tijssen, J.G.; et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 407–415. [[CrossRef](#)]
- Quraishi, M.N.; Widlak, M.; Bhala, N.; Moore, D.; Price, M.; Sharma, N.; Iqbal, T.H. Systematic review with meta-analysis: The efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, *46*, 479–493. [[CrossRef](#)]
- Moayyedi, P.; Surette, M.G.; Kim, P.T.; Libertucci, J.; Wolfe, M.; Onishi, C.; Armstrong, D.; Marshall, J.K.; Kassam, Z.; Reinisch, W.; et al. Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 102–109.e6. [[CrossRef](#)]
- Rossen, N.G.; Fuentes, S.; van der Spek, M.J.; Tijssen, J.G.; Hartman, J.H.; Duflou, A.; Lowenberg, M.; van den Brink, G.R.; Mathus-Vliegen, E.M.; de Vos, W.M.; et al. Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 110–118.e4. [[CrossRef](#)]
- Paramsothy, S.; Kamm, M.A.; Kaakoush, N.O.; Walsh, A.J.; van den Bogaerde, J.; Samuel, D.; Leong, R.W.L.; Connor, S.; Ng, W.; Paramsothy, R.; et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **2017**, *389*, 1218–1228. [[CrossRef](#)]
- Costello, S.P.; Hughes, P.A.; Waters, O.; Bryant, R.V.; Vincent, A.D.; Blatchford, P.; Katsikeros, R.; Makanyanga, J.; Campaniello, M.A.; Mavrangelos, C.; et al. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2019**, *321*, 156–164. [[CrossRef](#)]
- Sood, A.; Mahajan, R.; Singh, A.; Midha, V.; Mehta, V.; Narang, V.; Singh, T.; Singh Pannu, A. Role of Faecal Microbiota Transplantation for Maintenance of Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Pilot Study. *J. Crohns Colitis* **2019**, *13*, 1311–1317. [[CrossRef](#)]
- Da Silva, B.C.; Lyra, A.C.; Rocha, R.; Santana, G.O. Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 9458–9467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cohen, R.D.; Woseth, D.M.; Thisted, R.A.; Hanauer, S.B. A meta-analysis and overview of the literature on treatment options for left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2000**, *95*, 1263–1276. [[CrossRef](#)]

14. Fliegerova, K.; Tapio, I.; Bonin, A.; Mrazek, J.; Callegari, M.L.; Bani, P.; Bayat, A.; Vilkki, J.; Kopečný, J.; Shingfield, K.J.; et al. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe* **2014**, *29*, 80–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahe, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584. [[CrossRef](#)]
18. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60. [[CrossRef](#)]
19. Biancone, L.; Gionchetti, P.; Blanco Gdel, V.; Orlando, A.; Annese, V.; Papi, C.; Sostegni, R.; D’Inca, R.; Petruzzello, C.; Casa, A.; et al. Beclomethasone dipropionate versus mesalazine in distal ulcerative colitis: A multicenter, randomized, double-blind study. *Dig. Liver Dis.* **2007**, *39*, 329–337. [[CrossRef](#)]
20. Anderson, J.L.; Edney, R.J.; Whelan, K. Systematic review: Faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *36*, 503–516. [[CrossRef](#)]
21. Rajilic-Stojanovic, M.; Shanahan, F.; Guarner, F.; de Vos, W.M. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 481–488. [[CrossRef](#)]
22. Kassam, Z.; Hundal, R.; Marshall, J.K.; Lee, C.H. Fecal transplant via retention enema for refractory or recurrent *Clostridium difficile* infection. *Arch. Intern. Med.* **2012**, *172*, 191–193. [[CrossRef](#)]
23. Shen, Z.H.; Zhu, C.X.; Quan, Y.S.; Yang, Z.Y.; Wu, S.; Luo, W.W.; Tan, B.; Wang, X.Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 5–14. [[CrossRef](#)]
24. Xu, J.; Chen, N.; Wu, Z.; Song, Y.; Zhang, Y.; Wu, N.; Zhang, F.; Ren, X.; Liu, Y. 5-Aminosalicylic Acid Alters the Gut Bacterial Microbiota in Patients With Ulcerative Colitis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1274. [[CrossRef](#)]
25. Khanna, S.; Raffals, L.E. The Microbiome in Crohn’s Disease: Role in Pathogenesis and Role of Microbiome Replacement Therapies. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2017**, *46*, 481–492. [[CrossRef](#)]
26. Schierova, D.; Brezina, J.; Mrazek, J.; Fliegerova, K.O.; Kvasnova, S.; Bajer, L.; Drastich, P. Gut Microbiome Changes in Patients with Active Left-Sided Ulcerative Colitis after Fecal Microbiome Transplantation and Topical 5-aminosalicylic Acid Therapy. *Cells* **2020**, *9*, 2283. [[CrossRef](#)]
27. Chen, H.T.; Huang, H.L.; Xu, H.M.; Luo, Q.L.; He, J.; Li, Y.Q.; Zhou, Y.L.; Nie, Y.Q.; Zhou, Y.J. Fecal microbiota transplantation ameliorates active ulcerative colitis. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 2650–2660. [[CrossRef](#)]
28. Sokol, H.; Landman, C.; Seksik, P.; Berard, L.; Montil, M.; Nion-Larmurier, I.; Bourrier, A.; Le Gall, G.; Lalande, V.; De Rougemont, A.; et al. Fecal microbiota transplantation to maintain remission in Crohn’s disease: A pilot randomized controlled study. *Microbiome* **2020**, *8*, 12. [[CrossRef](#)]
29. Olaisen, M.; Spigset, O.; Flatberg, A.; Granlund, A.V.B.; Brede, W.R.; Albrektsen, G.; Royset, E.S.; Gilde, B.; Sandvik, A.K.; Martinsen, T.C.; et al. Mucosal 5-aminosalicylic acid concentration, drug formulation and mucosal microbiome in patients with quiescent ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2019**, *49*, 1301–1313. [[CrossRef](#)]
30. Jalanka, J.; Hillamaa, A.; Satokari, R.; Mattila, E.; Anttila, V.J.; Arkkila, P. The long-term effects of faecal microbiota transplantation for gastrointestinal symptoms and general health in patients with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2018**, *47*, 371–379. [[CrossRef](#)]
31. Goloshchapov, O.V.; Olekhovich, E.I.; Sidorenko, S.V.; Moiseev, I.S.; Kucher, M.A.; Fedorov, D.E.; Pavlenko, A.V.; Manolov, A.I.; Gostev, V.V.; Veselovsky, V.A.; et al. Long-term impact of fecal transplantation in healthy volunteers. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## **PUBLIKACE 2**

Article

# Gut Microbiome Changes in Patients with Active Left-Sided Ulcerative Colitis after Fecal Microbiome Transplantation and Topical 5-aminosalicylic Acid Therapy

Dagmar Schierová <sup>1,\*</sup>, Jan Březina <sup>2</sup>, Jakub Mrázek <sup>1,\*</sup>, Kateřina Olša Fliegerová <sup>1</sup>,  
Simona Kvasnová <sup>1</sup>, Lukáš Bajer <sup>2</sup> and Pavel Drastich <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Animal Physiology and Genetics of the Czech Academy of Science, v.v.i., 142 20 Prague, Czech Republic; fliegerova@iapg.cas.cz (K.O.F.); kvasnova@iapg.cas.cz (S.K.)

<sup>2</sup> Hepatogastroenterology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague, Czech Republic; brej@ikem.cz (J.B.); lukasbajer1@gmail.com (L.B.); padr@ikem.cz (P.D.)

\* Correspondence: schierova@iapg.cas.cz (D.S.); mrazek@iapg.cas.cz (J.M.); Tel.: +420-2-6709-0509 (D.S.); +420-2-6709-0506 (J.M.)

Received: 25 August 2020; Accepted: 9 October 2020; Published: 13 October 2020



**Abstract:** Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory bowel disease, and intestinal bacteria are implicated in the pathogenesis of this disorder. The administration of aminosalicylates (5-ASA) is a conventional treatment that targets the mucosa, while fecal microbial transplantation (FMT) is a novel treatment that directly targets the gut microbiota. The aim of this study was to identify changes in fecal bacterial composition after both types of treatments and evaluate clinical responses. Sixteen patients with active left-sided UC underwent enema treatment using 5-ASA ( $n = 8$ ) or FMT ( $n = 8$ ) with a stool from a single donor. Fecal microbiota were analyzed by 16S rDNA high-throughput sequencing, and clinical indices were used to assess the efficacy of treatments. 5-ASA therapy resulted in clinical remission in 50% (4/8) of patients, but no correlation with changes in fecal bacteria was observed. In FMT, remission was achieved in 37.5% (3/8) of patients and was associated with a significantly increased relative abundance of the families Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, and Clostridiaceae of the phylum Firmicutes, and Bifidobacteriaceae and Coriobacteriaceae of the phylum Actinobacteria. At the genus level, *Faecalibacterium*, *Blautia*, *Coriobacteria*, *Collinsella*, *Slackia*, and *Bifidobacterium* were significantly more frequent in patients who reached clinical remission. However, the increased abundance of beneficial taxa was not a sufficient factor to achieve clinical improvement in all UC patients. Nevertheless, our preliminary results indicate that FMT as non-drug-using method is thought to be a promising treatment for UC patients.

**Keywords:** ulcerative colitis; microbiome; fecal microbiome transplantation; 5-ASA

## 1. Introduction

Ulcerative colitis (UC) is a type of inflammatory bowel disease (IBD) characterized by chronic inflammation of the large intestine with remitting periods of relative quiescence and periods of mild to severe flares that affect the patient's quality of life substantially. Diarrhea mixed with blood accompanied with abdominal pain are the main symptoms. A sharply rising prevalence of this disease has been seen in developed countries, but a rapidly increasing incidence in newly industrialized countries is also evident. Its global prevalence is predicted to affect up to 30 million individuals by 2025 [1]. The precise etiology of UC is not clear; however, it is well documented that UC patients suffer from intestinal disturbance, reduced species diversity and richness, increased gut mucosa permeability,

and hampered immune response that manifests in an inflammatory milieu of the patients' colon [2]. Although it is still not known whether the dysbiosis is a cause or consequence of the disease, one possible way to revert this dysbiotic state to healthy homeostasis is a fecal microbiome transplantation (FMT), which is still considered an alternative method of treatment.

The first treatment option for mild or moderate UC that helps to reduce inflammation are aminosalicylates, specifically 5-aminosalicylic acid (5-ASA). This drug can be used as a short-term treatment for flare-ups but can also be taken long-term to maintain remission. Most of the time they are only administered orally, and thus do not reach their full potential in the colon [3]. The effect of 5-ASA on the intestinal microbial community is usually studied in mucosa, which is a target site of action. Xu et al. [4] demonstrated a higher abundance of Firmicutes and lower levels of Proteobacteria in the inflamed mucosa of 5-ASA-treated patients. Olaisen et al. [5] determined that the mucosal 5-ASA concentration was positively associated with mucosal bacterial diversity and bacterial compositions. A high mucosal 5-ASA concentration was also found to be related to the reduced abundance of pathogenic bacteria such as Proteobacteria and increased abundance of several favorable families (Lachnospiraceae and Ruminococcaceae) and genera such as *Faecalibacterium* and *Coprococcus*. 5-ASA may have beneficial effects on the mucosal microbiome, with high concentrations altering dysbiosis in UC. Olaisen et al. [5] highlighted that mucosal 5-ASA concentration is associated with changes in mucosal bacterial composition, however, the fecal microbiota was not changed to the same extent.

As opposed to 5-ASA treatment, FMT is directly focused on changing the composition of the intestinal microbiota. Emerging evidence is proving an important effect of the human gut microbiota on health, as well as the involvement of the intestinal bacteria in several diseases. Patients with UC indeed have a different microbial community in their colon compared to healthy subjects, and specific members of the intestinal microbiota were found to be dramatically affected. Typically, UC is characterized by decreased Firmicutes, in particular, beneficial butyrate-producing bacteria are diminished while members of Bacteroidetes and Proteobacteria are increased, with this being associated with disease relapse [6,7]. The goal of FMT in UC patients is therefore to achieve greater bacterial diversity; to accomplish a higher bacterial similarity of the recipient to the donor; to introduce beneficial taxa; and, most importantly, to establish a new less inflammation-prone community in the recipient colon. The main aim is of course the remission of disease. FMT was shown to be highly effective in the treatment of *Clostridium difficile* infection [8,9], and in UC patients it seems to be a promising new therapeutic option, which, however, to date has not achieved results as good as *C. difficile* treatment [10].

Several studies have already demonstrated a positive influence of FMT and its potential therapeutic value for the treatment of UC. Significantly increased bacterial diversity was described in the majority of studies [11–15], however, it is not the only prerequisite for successful FMT, as Kump et al. [16] and Damman et al. [17] did not find alpha diversity differences but still observed temporary disease remission in some patients. A significantly increased similarity of the patient to the donor was described by several authors [10,15,16,18], indicating a high rate of microbiota transfer and shift of the bacterial community to a new, healthier composition. FMT resulted in increased levels of certain beneficial taxa such as *Faecalibacterium prausnitzii* and other butyrate-producing bacteria belonging mainly to the families Lachnospiraceae and Ruminococcaceae of the phylum Firmicutes [12,16,19,20]. The loss of potentially harmful taxa such as adherent-invasive *Escherichia coli* [21] and decreased abundance of members from the family Enterococcaceae [6,16,20] is another positive impact of FMT. Already, more than 30 years have passed from the first documented FMT in a UC patient [22], yet we still lack details about choosing a suitable donor, the mode of FMT application, and the reasons why some UC patients do not respond to FMT or relapse, even after initial remission induced by FMT [10]. Research in this field is therefore of high importance.

In this study, we aimed to determine the influence of 5-ASA topical treatment and FMT treatment on the fecal bacterial community in patients with left-sided UC and to evaluate the consequent clinical response. Patients with active left-sided UC were chosen due to the favorable



inflammation localization, which is a site that can be easily reached by enema. Sixteen UC patients during the therapy provided 60 stool samples, which were analyzed using a high-throughput sequencing (HTS) approach for bacterial diversity at various phylogenetic levels. The preliminary results of this work endeavor to contribute to the scientific debate about the effectiveness of FMT for UC patients and elucidating its non-responsiveness in some subjects.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients, Donor, and Study Design

A total of 60 samples were collected from 16 outpatients who met the UC diagnostic criteria on the basis of typical clinical, endoscopic, and histologic findings carried out at the hepatogastroenterology clinic of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (Prague, Czech Republic). Patients were randomized into two groups, FMT ( $n = 8$ ) and 5-ASA ( $n = 8$ ), according to the type of treatment. The treatment regimen of the FMT group consisted of an enema prepared from 50 g of donor stool dissolved in 150 mL of saline solution administered 5 times in the 1st week, then once a week until the end of the 6th week. The stool for FMT was prepared from multiple samples originating from 1 donor collected before the start of the study. Fresh stool was weighed, diluted in physiological solution, and homogenized in a household blender. The homogenate was then twice filtered through gauze and mixed well with 17 g of pharmaceutical-grade glycerol. The suspension was aspirated into 200 cc syringes and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . This donor stool preparation was defrosted for 1 hour at room temperature and completely thawed at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in water bath prior to application. The treatment regimen of the 5-ASA group consisted of an enema with 4 g of mesalazine (5-ASA) administered daily for 2 weeks, then every 2nd day until the end of the 6th week. Fecal samples were collected before the start of treatment; during the treatment on weeks 2, 4, and 6 (24 h prior to the enema application); and after the treatment on week 12. Sample collection was not fully complete however, each patient provided at least 1 sample before and 1 sample during the treatment (Table S3). The stool donor was a healthy middle-aged man (32 years old) with a BMI (body mass index) of 23.8 who was not related to any of the patients. The donor's medical and surgical history was obtained and showed no history of infectious, autoimmune, and gastrointestinal disease; chronic diseases or allergies; drug or chemotherapy use; antibiotic therapy within the past 6 months; or hospitalization in the last 3 months. The donor underwent laboratory evaluation including blood testing (complete blood count), C-reactive protein test, erythrocyte sedimentation rate test, biochemical tests for viral disease, and stool testing for infectious bacteria and parasites. A high-throughput sequencing of 16S rDNA of the donor's stool sample was performed before FMT treatment to exclude the presence of undesirable/harmful bacteria. The patients and donor were informed about the potential risks and benefits of FMT, and all participants in the experiment gave their written informed consent to the protocol, which was approved by the Ethics Committee of Institute of Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital (NCT03104036).

### 2.2. DNA Extraction

Stool samples from patients and the donor were frozen and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and subsequently approximately 1 g of each sample was freeze-dried (LYOVAC GT 2, Leybold Heraeus). Genomic DNA was extracted from lyophilized samples using the method of Yu and Morrison [23], combining rapid beating in a FastPrep-24 homogenizer (MP Biomedicals) with purification in QIAamp DNA Stool Mini Kit columns (Qiagen). The concentration and purity of extracted nucleic acids were checked using a NanoDrop 2000c UV-VIS spectrophotometer (Thermo Scientific). DNA extracts were stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until their use.

### 2.3. PCR Amplification and High-throughput Sequencing

The amplification of the bacterial variable V4-V5 region of 16S rRNA was performed according to Fliegerova et al. [24] using EliZyme HS Robust MIX Red (Elisabeth Pharmacon) and  $10\text{ }\mu\text{M}$  of each

primer (forward: GGATTAGATACCCTGGTAGT, reverse: CACGACACGAGCTGACG). The thermal cycling conditions included initial denaturation for 10 min at 95 °C followed by 30 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 57 °C, and 30 s at 72 °C. PCR amplicons (~300 bp) were purified and libraries were prepared using the NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (New England BioLabs) and Ion Xpress Barcode Adapters 1–96 Kit (ThermoFisher Scientific). Libraries were consequently pooled, with their equimolar concentration determined with a KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems). The sequencing template was prepared in a One Touch 2 instrument using an Ion PGM OT2 HiQ View Kit (ThermoFisher Scientific). HTS was performed in an Ion Torrent PGM platform with an Ion 316 Chip Kit v2 BC (ThermoFisher Scientific) using an Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's protocols.

#### 2.4. Bioinformatic Analysis

Raw sequences retrieved from the Ion Torrent Software Suite in the fastq format were processed using the software Qiime2, which was specifically designed for microbial ecology [25]. Sequences were quality filtered, trimmed, dereplicated, and denoised using DADA2 software, and chimeras were removed [26]. Taxonomy was assigned with a VSEARCH-based consensus classifier against Greengenes database version 13.8 [27]. Sequences were rarefied at a minimum sequencing depth of 5221 reads (Figure S1). The analysis of bacterial diversity was assessed through alpha diversity (Chao1, evenness, Faith's phylogenetic diversity, and Shannon index) and beta diversity (Jaccard's distance metric) using the Qiime2 pipeline. EMPEROR was used for the visualization of principal coordinates analysis [28]. Boxplots were created using the libraries numpy 1.18.3, pandas 1.0.3, matplotlib 3.2.1, and seaborn 0.10.1 in Python version 3.8.2. Sequence information was deposited in the Sequence Read Archive under the accession number PRJNA645883.

#### 2.5. Statistical Analysis

Alpha diversities among patient groups were compared by non-parametric tests using either the Mann–Whitney *U* test for two groups or Kruskal–Wallis *H* test for multiple groups. Statistical *p*-values and *q*-values with Benjamini–Hochberg false discovery rate correction are reported. In the same manner, *p*-value and *q*-value correction are shown for PERMANOVA with 999 permutations on beta diversities among the studied groups. Additionally, the PERMDISP test was done to support the PERMANOVA results. Differential abundance analysis was performed on the Huttenhower Galaxy Server using linear discriminant analysis effect size with the standard parameters [29].

### 3. Results

#### 3.1. Study Group Characterization and Clinical Response

This study included 16 patients, 8 men (M) and 8 women (F), suffering from left-sided UC who received either 5-ASA ( $n = 8$ ) or FMT ( $n = 8$ ) enema treatment. Basic patient characteristics are summarized in Table 1. Samples were collected before the start of treatment (baseline) and at multiple time points during the treatment; in total we received 21 samples from 8 patients of 5-ASA group at three sampling points and 39 samples from 8 patients of FMT group at five sampling points (Table S3). On the basis of their Mayo score (disease activity index) at weeks 6 and 12, we divided the subjects into responders and non-responders. Treatment responders were considered subjects with an achieved clinical remission, defined as a Mayo score  $\leq 2$ , with no subscore  $> 1$ , which was the primary endpoint. Secondary endpoints were (a) clinical response, defined as a reduction in Mayo score of at least 2, and (b) endoscopic remission defined as an endoscopic Mayo score of 0. Treatment non-responders thus did not achieve the primary endpoint, but they may or may not have achieved secondary endpoints. In the FMT group, 37.5% (three out of eight subjects) reached the primary endpoint, 62.5% (five out of eight) had a clinical response, and 12.5% (one out of eight subjects) reached endoscopic remission. In the 5-ASA group 50% (four out of eight subjects) reached the primary endpoint, 62.5% (five out

of eight subjects) had a clinical response, and 37.5% (three out of eight subjects) reached endoscopic remission. In the 5-ASA group, men and women were distributed equally between responders and non-responders, while the effect of FMT therapy was less evident in women, as only one female reached clinical remission. The fecal sample used for FMT treatment was obtained from one donor who underwent rigorous selection criteria and screening investigations. The inclusion and exclusion criteria of the patients and donor are described in Tables S1 and S2, respectively. No adverse events were reported during the treatment and 6 weeks after treatment.

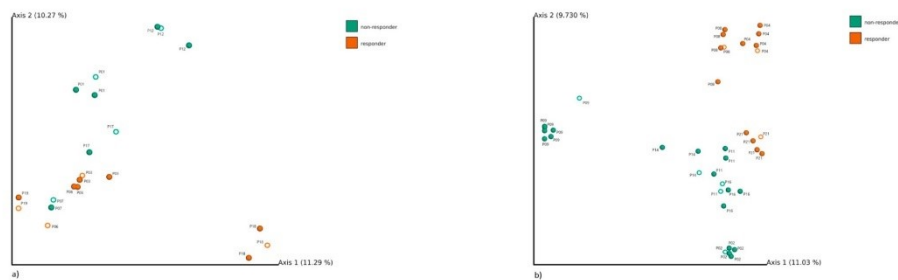
**Table 1.** Patient study group characteristics before therapy.

Characteristics	5-ASA Group (n = 8)	FMT Group (n = 8)
Male/female	4:4	4:4
Age median (range)	40 (31–66)	37.5 (28–62)
Number of samples provided per patient median (range)	3 (2,3)	5 (3–7)
Mayo score median (range)	5.5 (4–9)	5.5 (3–9)
Endoscopic Mayo score median (range)	2 (2–2)	2 (2–2)
CRP mg/L median (range)	0.85 (0.2–10.4)	1.35 (0.2–13.2)
WBCC $\times 10^9$ median (range)	5.5 (4.0–8.4)	7.9 (6.2–9.0)
Patients on thiopurines	1	1
Patients on corticosteroids	2	0
Patients on mesalazine	8	6

### 3.2. Alpha and Beta Diversity

Alpha diversity, which evaluates the species richness and evenness; Faith's phylogenetic distance; and Shannon diversity showed no significant differences between the FMT and 5-ASA treatment groups, nor between the responder and non-responder subgroups inside each cohort. Additionally, at the baseline, responders could not be distinguished from non-responders. A non-significant increase was detected in Shannon diversity index, for both responders and non-responders, 2 weeks after both therapy types compared to the baseline (Figure S2). A higher Shannon index was still observed when more samples from different sampling points after therapy initiation were included in the calculation, indicating that FMT and 5-ASA can, to a certain extent, influence the microbial alpha diversity of UC patients.

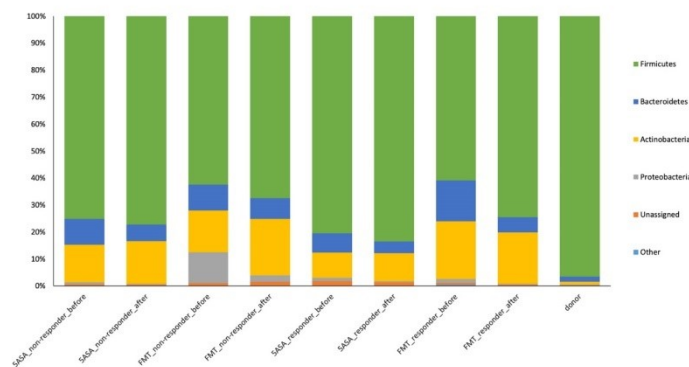
Beta diversity, which evaluates the similarity of bacterial communities among samples, was assessed using Jaccard's non-phylogenetic distance matrix. As early as 2 weeks after the therapy initiation, we could differentiate responders from non-responders in both the FMT group (PERMANOVA  $p = 0.001$ , PERMDISP  $p = 0.100$ ) and 5-ASA group (PERMANOVA  $p = 0.003$ , PERMDISP  $p = 0.099$ ). Figure 1 shows the separation of responders and non-responders within the 5-ASA treatment group (21 samples) and FMT treatment group (39 samples) resulting from the analysis of samples at the baseline and at different sampling points after therapy initiation. The separation of FMT cluster centroids was documented by PERMANOVA  $p = 0.001$ , however, the results can be partially influenced by high intergroup variability (PERMDISP  $p = 0.022$ ). The separation of 5-ASA cluster centroids is supported by PERMANOVA  $p = 0.001$  (PERMDISP  $p = 0.053$ ). At the baseline, responders could not be differentiated from non-responders in the FMT group (PERMANOVA  $p = 0.066$ , PERMDISP  $p = 0.336$ ) nor in the 5-ASA group (PERMANOVA  $p = 0.223$ , PERMDISP  $p = 0.414$ ). As for the similarity of subjects to the donor after FMT, Figure S3 shows that FMT responders were closer (more similar) to the donor than FMT non-responders (Mann–Whitney  $U$  test,  $p = 0.00003$ ).



**Figure 1.** Principal coordinate analysis showing Jaccard's distance matrix between responders (orange) and non-responders (green) for (a) aminosalicylates (5-ASA) group (8 patients) and (b) fecal microbiome transplantation (FMT) group (8 patients). Samples collected before therapy are shown as hollow spheres (8 samples per each 5-ASA and FMT group), samples collected after therapy initiation are shown as full spheres (13 samples for 5-ASA and 31 samples for FMT group); samples belonging to one patient are described with the same number.

### 3.3. Taxonomical Composition

In total, 9 phyla, 142 genera, and 184 species were detected in the samples of UC patients. Firmicutes (41–94%) were detected as the dominant phylum in all samples, regardless of treatment, except for one sample (19%) from the FMT group at the baseline, in which Proteobacteria (52%) were flourishing. The second most abundant were Actinobacteria (1–38%), and/or Bacteroidetes (1–37%), as shown in Figure 2. Firmicutes were mainly represented by the order Clostridiales; Bacteroidetes were mainly represented by the order Bacteroidales; and in Actinobacteria, the order Bifidobacteriales predominated. Other phyla including Fusobacteria, Tennericutes, Acidobacteria, Planctomyceles, and TM7 were detected with low frequencies ( $\leq 0.4\%$ ).



**Figure 2.** Relative abundance of fecal bacteria at the phylum level in all 60 samples from 16 ulcerative colitis (UC) patients with active left-sided colitis and the donor grouped by therapy type (FMT, 5-ASA), responsiveness (responder, non-responder), and time point of a sample collection (before therapy or at multiple time points after therapy initiation). Fusobacteria, Tennericutes, Acidobacteria, Planctomyceles, and TM7 with low relative abundance are summarized as “Other”.

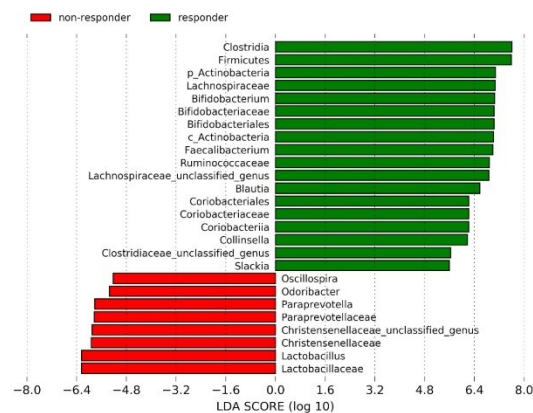
The donor stool was dominated by Firmicutes, with a prevalence of the families Lachnospiraceae (67%) and Ruminococcaceae (17%). The relative abundance of Actinobacteria (1%) and Bacteroidetes (2%) was quite low, represented by the family Coriobacteriaceae and the families Prevotellaceae and Bacteroidaceae, respectively. *F. prausnitzii* was present with a frequency of 3% in the stool of the donor.

Venn diagram analysis shows the number of genera shared between the donor and the subjects of the FMT group before treatment (Figure 3A), and at all sampling points after the start of the treatment (Figure 3B). Collectively, stool samples of non-responders after FMT contained the highest number of unique genera (62), while for FMT responders, the diagram shows only four unique genera (Figure 3B). Such a big difference indicates that non-responders still harbored a high amount of their original unique genera. After FMT, responders retained 50 original genera from their previously determined 67 genera (75%) and accepted 17 new genera. In contrast, non-responders retained 61 of their original 65 genera, indicating that 94% of genera remain unchanged, which could be one of the reasons for their therapy non-responsiveness. Interestingly, this shift was not evident at week 2 after the beginning of therapy, when both subgroups kept all their original bacterial settlement, which was only enriched by several new genera (data not shown). This fact indicates that at this time point only new genera occurred in the community with no bacterial replacement, meaning the new community structure had not yet been established.



**Figure 3.** Venn diagram analysis of bacterial genera in healthy donor and patients with active left-sided UC treated with FMT (a) before the therapy (baseline) and (b) at all sampling points after the start of therapy. The number in each region represents genera shared between the sample groups (overlapping regions) or genera unique for the sample group. Number of subjects inside the group is indicated in parentheses.

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was applied to the set of samples to determine bacterial taxa with significantly different levels of abundance in responders and non-responders in both treatment groups. No differentially abundant taxa were determined between responders and non-responders inside the 5-ASA treatment group. In the FMT group, collectively, 26 significantly different taxa were identified between responders and non-responders (linear discriminant analysis score > 2), however, at baseline, the therapy responsiveness was not found to be significantly associated with any bacterial taxa. On the family level, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, and Clostridiaceae of phylum Firmicutes, and Bifidobacteriaceae and Coriobacteriaceae of phylum Actinobacteria were significantly increased in the subgroup of FMT responders. At the genus level, *Faecalibacterium* and *Blautia* (Ruminococcaceae), *Coriobacteria*, *Collinsella*, *Slackia* (Coriobacteriaceae), and *Bifidobacterium* (Bifidobacteriaceae) were significantly more abundant in FMT responders. In the subgroup of FMT non-responders, the families Lactobacillaceae, with an increased *Lactobacillus* genus, and Christensenellaceae, both of the phylum Firmicutes, and Paraprevotellaceae of the phylum Bacteroidetes, with an increased *Paraprevotella* genus, were present with a significantly higher frequency. At the genus level, *Oscillospira* (Ruminococcaceae) and *Odoribacter* (Porphyromonadaceae) also had a higher abundance in FMT non-responders (Figure 4). For more detailed analysis at the species level, refer to Figure S4.



**Figure 4.** Linear discriminant analysis (LDA) scores of responders and non-responders in the FMT group of patients with active left-sided UC on different taxonomical levels (phylum, class, order, family, genus) for all sampling points including baseline. Actinobacteria phylum and class are distinguished using shortcuts p and c, respectively.

To elucidate the microbiome alteration during the first 4 weeks, we performed the LefSe analysis of samples collected at week 2 and 4 after FMT. At week 2, FMT responders showed significantly increased abundance of unclassified Clostridiaceae, and unclassified *Prevotella*, *Slackia*, and *Turicibacter* compared to non-responders (Figure S5). At week 4, significantly increased *Faecalibacterium prausnitzii* was detected in responders and unclassified genus of Christensenellaceae and *Paraprevotella* were detected in non-responders (Figure S6). These preliminary results indicate the bacterial abundance changes over time and the community composition instability between week 2 and 4. Except *Turicibacter*, all significantly increased taxa were present in the overall LefSe analysis (Figure 4).

#### 4. Discussion

In this monocentric work, 16 patients with active left-sided UC lasting more than 3 months were enrolled to study the effect of FMT in comparison with 5-ASA treatment administrated by enema. Major differences exist between these therapies, as FMT has a direct influence on the microbiota composition, while 5-ASA should act as an anti-inflammatory agent. 5-ASA compounds, usually administrated orally, are a highly effective treatment for UC [30,31]. The delivery systems designed for conveying 5-ASA to the colon include various pH-dependent polymers, microgranules encapsulated into ethyl cellulose, or azo-bound derivatives. However, none of these compounds are as effective as the topical formulations [32]. However, patients do not easily accept local therapy, and long-term treatment may not be acceptable to many patients [33]. In patients with irritable bowel syndrome, it was reported that 5-ASA reduces the amount of fecal bacteria quite drastically, by over 40% [34]. Microbiota changes after 5-ASA treatment have been found in mucosa, and to a lesser degree also in feces [5]. In mucosa, an inverse correlation with disease severity was shown for *F. prausnitzii*, other short-chain fatty acids producers, and many more bacteria after 5-ASA treatment [4,5]. A high mucosal 5-ASA concentration was related to a reduced abundance of pathogenic bacteria in mucosa such as Proteobacteria, and increased abundance of several favorable bacteria such as *Faecalibacterium*. In feces, *Prevotella* and *Sutterella* were decreased upon an increase in 5-ASA in mucosal tissue [5]. *Sutterella* is thought to contribute to UC pathogenesis by its ability to degrade mucosal protective immunoglobulin A (IgA) antibody [35,36]. We did not find any significant differences in alpha bacterial diversity between 5-ASA treatment responders and non-responders. However, significant Jaccard distances between these subgroups showed some effect of mesalazine

application in responders, which is also supported by a Mayo score index  $\leq 2$ . Perhaps analysis of mucosal microbiome, which is at the site of mesalazine's action, would reveal more profound changes; however, more research is needed to elucidate this effect.

FMT as an alternative treatment of UC patients is attracting increased attention, and the number of studies has been growing steadily in recent times. Although several trials have given promising results [11,12,37,38] (see systematic reviews [10,39,40]), many unanswered questions remain that require further research.

The increased microbiota diversity reported by several authors in UC patients after FMT from multi-donor blended stool (2–7 donors) [11–15] was not found in our study using one donor for all patients. The finding reported in this work of no significant differences in Shannon diversity in FMT responders and non-responders between the baseline and any other sampling point after therapy initiation is in agreement with the studies of Damman et al. [17] and Kump et al. [16], who, however, described temporal changes in mucosal, but not fecal samples 7 days after FMT. Both studies [16,17] used individual stool donation, which means that each donor provided a stool for one, at most two recipients. Tian et al. [41] even described non-significantly decreased Shannon and Chao indices after FMTs, but still observed positive clinical outcomes and improved symptoms in the patient with UC. The same authors [41] did not find differences in beta diversity; however, in our study, statistically significant results were obtained from pairwise PERMANOVA analyses. Jaccard distances between samples revealed the separation of responders and non-responders after FMT treatment, however, the high variability of samples within the FMT group analyzed in this work has to be taken into consideration. Furthermore, a higher similarity of responders with the donor was found in the FMT group. This finding is in agreement with several studies [10,15,16,18,42], however, not all of them reported the correlation between the bacterial shift towards the healthy donor and clinical response [16].

The efficacy of FMT is here further supported by the lower proportion of the original genera maintained by responders, and the relatively high proportion of original genera maintained by non-responders. In FMT non-responders, the number of unique genera was high, which indicates unsuccessful restoration of the disrupted microbiome, inability to replace a certain proportion of original genera, and possibly resistance of some genera to this type of intervention. From a statistical point of view, these results could however be influenced by the higher number of FMT non-responders (five subjects) compared to responders (three subjects), which could increase the diversity within the subgroup of non-responders. Shi et al. [10] emphasized, on the basis of 25 trials using FMT treatment for UC, that patients sharing increased bacterial similarity with the donor can exhibit different clinical outcomes, and thus the mere presence of healthy microbiota is not sufficient to achieve a positive effect of FMT. In contrast, according to Kump et al. [38], the taxonomic composition of the donor's intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of FMT in UC patients. Our preliminary results could also raise a question of a gender factor role in FMT efficacy. We noted that there was only one female responding to FMT treatment by stool donated by a man. This finding, however, must be assessed with great caution due to the small number of subjects analyzed in this study. Nonetheless, it is increasingly apparent that sex is one of the important variables affecting the gut microbiota [43–45]. The FMT animal model study even showed that female recipients lost significantly more weight after receiving the male microbiota compared with the weight after receiving the female microbiota [46]. Sex or gender factors should not be ignored by researchers; however, this association has not yet been sufficiently investigated.

The "proper" taxonomical composition of a healthy microbiome is, however, still unknown, largely because of the huge inter-individual variability across the entire population. Hence, the selection of a good donor is quite challenging, although there is some evidence that certain donors can be better than others with respect to FMT efficiency. Nevertheless, we still do not have specific criteria for donor selection. Literature data suggest that certain bacterial taxa in the donor microbiota seem to be associated with treatment response to FMT, especially *Akkermansia muciniphila* [38], butyrate-producing *F. prausnitzii* [20,38], *Roseburia intestinalis* [6] and *Roseburia faecis* [20], *Butyrivibrio crossotus*, *Anaerobutyricum hallii*

(reclassified *Eubacterium hallii*) [6], and some members of the families Ruminococcaceae [37,38] and Lachnospiraceae [37], which have been identified as favorable bacteria for UC treatment. On the other hand, some pro-inflammatory bacteria of the phylum Proteobacteria and *Ruminococcus gnavus* are thought to be harmful [6]. Recently, the term “super-donor” has been proposed to describe donors whose stools result in significantly more successful FMT outcomes than the stools of other donors [37,47], and the bacteria mentioned above should be part of their intestinal microbiota.

We have identified several of the beneficial bacterial taxa in the microbiome of the donor who provided the sample for the FMT performed here, including *F. prausnitzii* (3%), members of the Ruminococcaceae family (20%), and a high percentage of bacteria of the Lachnospiraceae family (48%), which were also present in the stool of the most successful donor of the Moayyedi study [37].

Two Lachnospiraceae clusters were identified here as significantly increased in responders after FMT therapy, similar to the findings of Kump et al. [16] and Angelberger et al. [20]. Many Lachnospiraceae members have been detected in the human intestine [48] and some exhibit important hydrolytic activities (e.g., xylanase,  $\beta$ -xylosidase  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, pectin methyl-esterase, pectate lyase, N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase) [49]. Lower amounts of Lachnospiraceae were previously reported in a subject suffering from UC [50], however, Vacca et al. [51] pointed out the increased abundance of Lachnospiraceae in the intestinal lumen of subjects with different diseases, thus indicating the possible controversial role of this taxon. Nevertheless, several genera are known for their positive effect on health, especially butyrate-producing strains of *Butyrivibrio*, *Roseburia*, *Anaerostipes*, or *Coprococcus* [52].

FMT also significantly induced a higher abundance of the family Ruminococcaceae in responders and two important members of this taxon, *F. prausnitzii* and *Blautia*. Both these genera are abundant in the human intestinal microbiota of healthy adults [53], while reduced levels of *F. prausnitzii* and/or *Blautia* have been reported in UC individuals [54]. The positive effect of these bacteria is attributed to the production of butyrate. Butyrate plays a major role in gut physiology, with numerous beneficial effects on health through anti-inflammatory activities in the colonic mucosa, protection against pathogen invasion, modulation of the immune system, and reduction of cancer progression [55,56]. *F. prausnitzii* has even been suggested to constitute a marker of a healthy gut [57,58]. The increased levels of *F. prausnitzii* after FMT found in this study have been also reported by Chen [14] and Fuentes [6], indicating a positive influence of FMT. However, we did not find any data about the effect of FMT on *Blautia* in UC patients in the corresponding literature.

Ten taxa elevated in FMT responders belonged to the phylum Actinobacteria, with significantly increased Bifidobacteriaceae and Coriobacteriaceae at the family level. Bifidobacteria are believed to exert positive health benefits on the host via their metabolic activities [59] and have been successfully used in UC patients as a probiotic treatment, resulting in remission throughout the trial [60]. As the family Bifidobacteriaceae was found to be reduced in most IBD patients [61], we can consider the increase found in this study to be favorable. *Collinsella* and *Slackia* are both members of the family Coriobacteriaceae. In the gut, Coriobacteriaceae perform important functions, such as the conversion of bile salts and steroids and the activation of dietary polyphenols [62]. *Slackia* was found in low numbers in human feces of healthy subjects, and it is thought to play an important role in gut health [63]. Some species are involved in equol production (daidzein-to-equol conversion), which is exclusively a product of the intestinal bacterial metabolism of dietary isoflavones. Equol possesses estrogenic activity and is superior to all other isoflavones in terms of antioxidant activity [64]. We did not find any literature data correlating the abundance of this genus with ulcerative colitis. However, *Collinsella* was found at lower frequencies in children and adults with UC and Crohn’s disease (CD) [65,66], and in patients with irritable bowel syndrome [67]. A significant decrease in the family Coriobacteriaceae was observed in stool samples from patients with CD [68], however, some authors consider *Collinsella* to be a pathobiont because its occurrence has been associated with type 2 diabetes [69], the progression of insulin resistance during pregnancy [70], rheumatoid arthritis [71], and cholesterol metabolism [72]. In the CACO-2 epithelial cell line, *Collinsella* increased gut permeability by reducing the expression



of tight-junction proteins and inducing the expression of interleukin 17 (IL-17) network cytokines, which are frequently involved in inflammatory diseases [71]. The assessment of the increased levels of this bacterium in UC patients after FMT is thus quite complicated, and the clinical relevance of the members of family Coriobacteriaceae for gut health will certainly receive increased attention.

Several taxa were found at higher frequencies in the patients with UC who were classified as FMT non-responders. Surprisingly, the increased taxa of the phylum Firmicutes are mostly associated with a healthy gut. Christensenellaceae (order Clostridiales), a recently described family, seem to be a highly heritable and important player in human health [73]. Members of this family have been associated with healthy dietary habits [73] and with human longevity [74], were negatively correlated with serum lipids [75], were enriched in individuals with low body mass index [76], and increased after diet-induced weight loss [77]. Christensenellaceae were consistently depleted in individuals with Crohn's disease [78–80] and UC [68,81,82], which is contrary to our results. As the relative abundance of Christensenellaceae was found to be increased with age [73,83], the possible association with the higher median age of FMT non-responders (42 years) compared to responders (28 years) in this study should be noted. Mancabelli et al. [84] reported Christensenellaceae to be one of the taxa considered a signature of a healthy gut, and cultured members of Christensenellaceae have potential as therapeutic probiotics for the improvement of human health [85]. However, the functional role of Christensenellaceae in the gut is still not understood.

*Oscillospira* of the family Ruminococcaceae is a common genus found in about 60% of all individuals in several large metagenomic datasets of the fecal human microbiota [86] and is also thought to have positive contributions for human health due to its putative butyrate production [87]. A meta-analysis of five microbiota studies in patients with IBD indicated a significantly reduced incidence of *Oscillospira* in patients with CD [88], but we did not find any information about the abundance of this genus in UC patients.

The role of Lactobacilli, which are generally recognized as beneficial for human health for their probiotic effects, is not so unequivocally clear in gut inflammatory diseases. The proportions of these bacteria are frequently either positively or negatively correlated with human disease and chronic conditions [89]. Several studies show that *Lactobacillus* is depleted in IBS patients [90,91], decreased in UC patients [65], and increased in CD patients [92]. It is not known whether *Lactobacillus* participates in the disease or has simply adapted to survive the pro-inflammatory gut environment. Additionally, the effect of probiotic *Lactobacillus* consumption differs, only resulting in improved clinical symptoms in IBS and UC patients [93–95]. Knowledge about metabolic differences among strains and/or species of Lactobacilli could be useful to evaluate variations in the involvement and contributing factor of this genus in different diseases [89].

Two genera elevated in FMT non-responders belonged to the phylum Bacteroidetes. *Odoribacter* (family Porphyromonadaceae, order Bacteroidales) is a butyrate-producing member of the human intestinal microbiome [96] and its proper abundance is crucial for a healthy gut [97]. A reduced frequency of this genus was found in patients with the most severe form of UC (pancolitis) [97] and CD patients [98]. On the other hand, higher levels of *Odoribacter* were correlated with an improved state of health with CD [99]. As this genus is thought to play a positive role against gut inflammation, the increased abundance found in our work can be evaluated as beneficial. This, however, cannot be deduced for *Paraprevotella* (family Prevotellaceae, order Bacteroidales). This genus is characterized by the production of succinic acid [100], which can be associated with microbiome dysbiosis and intestinal inflammation [101]. Normally, succinate is detected at low concentrations in the gut lumen because of its rapid conversion into propionate; however, several studies found a higher concentration of succinate in IBD patients [102], and an association between succinate accumulation in the gut lumen and microbiota disturbances has recently emerged [101,103]. Here, we have to emphasize that *Odoribacter* is a succinate-consuming bacterium, and its increased abundance may be theoretically related to *Paraprevotella* succinate production. The role of succinate in inflammatory processes within

the gut is however unclear [101], and more research is required to elucidate the implications of succinate on intestinal inflammation.

On the basis of our results, we can conclude that 5-ASA topical treatment resulting here in 50% remission is an adequate type of therapy, however, we were unable to identify the fecal bacterial changes associated with the cure response. FMT is in our opinion a promising treatment method for patients suffering from UC. Despite the only 37.5% clinical remission achieved by FMT in this study, the increased abundance of butyrate-producing bacteria indicates a positive bacterial shift. Our data indicate that the presence or increased abundance of these beneficial bacteria is not a sufficient factor to achieve improved clinical outcomes. The replacement of certain intestinal bacteria with health-promoting genera seems to be an indispensable condition for successful FMT therapy. This study has some limitations, however. The small number of patients enrolled in this study, partially caused by the focus on subjects with left-sided UC and the incomplete set of patient stool samples, mean that this work should be treated as a preliminary study, and thus further evaluation is needed. A larger cohort of patients including control groups could be used to further elucidate the changes in microbiota after FMT and to evaluate the clinical response. The results of such studies can help to understand which bacterial groups are beneficial, but also transferable from a donor to recipient. FMT has the potential to be established as an effective and safe treatment for UC patients, especially when standard treatment has failed. The research in this field is still limited, with many problems that need to be solved and many questions that need to be answered in order to confirm the efficacy of this alternative approach supported by clinical outcomes.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/10/2283/s1>: Figure S1: Rarefaction curves showing sequencing depth (number of reads) and the average number of features (sequence variants) found in the stool samples of patients with active left-sided UC ( $n = 16$ ) and a donor ( $n = 1$ ). Patients are indicated by the letter P, donor by letter D. Figure S2: Alpha diversity represented by Shannon diversity index in the patients with active left-sided ulcerative colitis for FMT ( $n = 8$ ) and 5-ASA ( $n = 8$ ) groups showing responders and non-responders before the treatment and at all sampling points after the start of treatment. Figure S3: Box plots showing Jaccard's distance of patients with active left-sided ulcerative colitis to donor, which was significantly different between FMT responders and FMT non-responders ( $p = 0.00003$ ). Analysis, including all sample points after the start of the FMT therapy, shows that non-responders were more distant from the donor, indicating that their fecal microbiomes were less similar to the donor's microbiome than to the microbiome of responders. Figure S4: Linear discriminant analysis scores of responders and non-responders in the FMT group of patients with active left-sided ulcerative colitis on different taxonomical levels (phylum, class, order, family, genus, and species) for all sampling points including baseline. To distinguish Actinobacteria phylum and class, we used shortcuts p and c, respectively. Figure S5: Linear discriminant analysis scores of responders in the FMT group of patients with active left-sided ulcerative colitis on different taxonomical levels (order, family, genus, and species) for week 2 after treatment initiation. Non-responders did not show LDA score  $> 2$ , and hence are not shown. Figure S6: Linear discriminant analysis scores of responders and non-responders in the FMT group of patients with active left-sided ulcerative colitis on different taxonomical levels (family, genus, and species) for week 4 after treatment initiation. Table S1: Patient inclusion and exclusion criteria. Table S2: Donor inclusion and exclusion criteria. Table S3: Stool sample collection scheme.

**Author Contributions:** This study was conceptualized by J.M. and P.D.; methodology was designed by J.M. and P.D.; formal analysis was performed by D.S.; investigation by D.S. and S.K.; patient resources were collected by J.B., L.B., and P.D.; original draft was prepared by D.S. and later reviewed and edited by K.O.F. Visualizations were made by D.S. Funding was acquired by P.D. and J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Ministry of Health of Czech Republic, grant number 16-27449A.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Siew, N.C.; Hai, S.Y.; Nima, H.; Underwood, F.E.; Whitney, T.; Benchimol, E.I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Wu, J.C.Y.; Chan, F.K.L.; et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies. *Lancet* **2017**, *390*, 2769–2778. [CrossRef]
2. Tamboli, C.; Neut, C.; Desreumaux, P.; Colombel, J. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* **2004**, *53*, 1–4. [CrossRef] [PubMed]

3. Harris, M.S.; Lichtenstein, G.R. Review article: Delivery and efficacy of topical 5-aminosalicylic acid (mesalazine) therapy in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *33*, 996–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Xu, J.; Chen, N.; Wu, Z.; Song, Y.; Zhang, Y.; Wu, N.; Zhang, F.; Ren, X.; Liu, Y. 5-Aminosalicylic Acid Alters the Gut Bacterial Microbiota in Patients With Ulcerative Colitis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Olaisen, M.; Spigset, O.; Flatberg, A.; Granlund, A.V.B.; Brede, W.R.; Albrektsen, G.; Røyset, E.S.; Gilde, B.; Sandvik, A.K.; Martinsen, T.C.; et al. Mucosal 5-aminosalicylic acid concentration, drug formulation and mucosal microbiome in patients with quiescent ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2019**, *49*, 1301–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fuentes, S.; Rossen, N.G.; Van Der Spek, M.J.; Hartman, J.H.A.; Huuskonen, L.; Korpela, K.; Salojärvi, J.; Aalvink, S.; De Vos, W.M.; D’Haens, G.R.; et al. Microbial shifts and signatures of long-term remission in ulcerative colitis after faecal microbiota transplantation. *ISME J.* **2017**, *11*, 1877–1889. [[CrossRef](#)]
7. Yilmaz, B.; Juillerat, P.; Øyås, O.; Ramon, C.; Bravo, F.D.; Franc, Y.; Fournier, N.; Michetti, P.; Mueller, C.; Geuking, M.; et al. Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn’s disease. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 323–336. [[CrossRef](#)]
8. Gough, E.; Shaikh, H.; Manges, A.R. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent clostridium difficile infection. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *53*, 994–1002. [[CrossRef](#)]
9. Lee, C.H.; Belanger, J.E.; Kassam, Z.; Smieja, M.; Higgins, D.; Broukhanski, G.; Kim, P.T. The outcome and long-term follow-up of 94 patients with recurrent and refractory Clostridium difficile infection using single to multiple fecal microbiota transplantation via retention enema. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *33*, 1425–1428. [[CrossRef](#)]
10. Shi, Y.; Dong, Y.; Huang, W.; Zhu, D.; Mao, H.; Su, P. Fecal microbiota transplantation for ulcerative colitis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157259. [[CrossRef](#)]
11. Costello, S.P.; Hughes, P.A.; Waters, O.; Bryant, R.V.; Vincent, A.D.; Blatchford, P.; Katsikeros, R.; Makanyanga, J.; Campaniello, M.A.; Mavrangelos, C.; et al. Effect of Fecal Microbiota Transplantation on 8-Week Remission in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2019**, *321*, 156–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Paramsothy, S.; Kamm, M.A.; Kaakoush, N.O.; Walsh, A.J.; Bogaerde, J.V.D.; Samuel, D.; Leong, R.W.L.; Connor, S.; Ng, W.; Paramsothy, R.; et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **2017**, *389*, 1218–1228. [[CrossRef](#)]
13. Jacob, V.; Crawford, C.; Cohen-Mekelburg, S.; Viladomiu, M.; Putzel, G.G.; Schneider, Y.; Chabouni, F.; O’Neil, S.; Bosworth, B.; Woo, V.; et al. Single Delivery of High-Diversity Fecal Microbiota Preparation by Colonoscopy Is Safe and Effective in Increasing Microbial Diversity in Active Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 903–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chen, H.; Huang, H.; Xu, H.; Luo, Q.; He, J.; Li, Y.; Zhou, Y.; Nie, Y.; Zhou, Y. Fecal microbiota transplantation ameliorates active ulcerative colitis. *Exp. Ther. Med.* **2020**, 2650–2660. [[CrossRef](#)]
15. Cui, B.; Li, P.; Xu, L.; Zhao, Y.; Wang, H.; Peng, Z.; Xu, H.; Xiang, J.; He, Z.; Zhang, T.; et al. Step-up fecal microbiota transplantation strategy: A pilot study for steroid-dependent ulcerative colitis. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 298. [[CrossRef](#)]
16. Kump, P.K.; Gröchenig, H.-P.; Lackner, S.; Trajanoski, S.; Reicht, G.; Hoffmann, K.M.; Deutschmann, A.; Wenzl, H.H.; Petritsch, W.; Krejs, G.J.; et al. Alteration of intestinal dysbiosis by fecal microbiota transplantation does not induce remission in patients with chronic active ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 2155–2165. [[CrossRef](#)]
17. Damman, C.J.; Brittnacher, M.J.; Westerhoff, M.; Hayden, H.S.; Radey, M.; Hager, K.R.; Marquis, S.R.; Miller, S.I.; Zisman, T.L. Low level engraftment and improvement following a single colonoscopic administration of fecal microbiota to patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133925. [[CrossRef](#)]
18. Rossen, N.G.; Fuentes, S.; Van Der Spek, M.J.; Tijssen, J.G.; Hartman, J.H.A.; Duflou, A.; Löwenberg, M.; Brink, G.R.V.D.; Mathus-Vliegen, E.M.H.; De Vos, W.M.; et al. Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 110–118. [[CrossRef](#)]

19. Venegas, D.P.; De La Fuente, M.K.; Landskron, G.; González, M.J.; Quera, R.; Dijkstra, G.; Harmsen, H.J.M.; Faber, K.N.; Hermoso, M.A. Short chain fatty acids (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 277. [[CrossRef](#)]
20. Angelberger, S.; Reinisch, W.; Makristathis, A.; Lichtenberger, C.; Dejaco, C.; Papay, P.; Novacek, G.; Trauner, M.; Loy, A.; Berry, D. Temporal Bacterial Community Dynamics Vary Among Ulcerative Colitis Patients After Fecal Microbiota Transplantation. *Am. J. Gastroenterol.* **2013**, *108*, 1–11. [[CrossRef](#)]
21. Lee, J.G.; Han, D.S.; Jo, S.V.; Reum Lee, A.; Park, C.H.; Eun, C.S.; Lee, Y. Characteristics and pathogenic role of adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease: Potential impact on clinical outcomes. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216165. [[CrossRef](#)]
22. Borody, T.; George, L.; Andrews, P.; Brandl, S.; Noonan, S.; Cole, P.; Hyland, L.; Mrogan, A.; Maysey, J.; Moore-Jones, D. Bowel-flora alteration: A potential cure for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome? *Med. J. Aust.* **1989**, *150*, 604. [[CrossRef](#)]
23. Yu, Z.; Morrison, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* **2004**, *36*, 808–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fliegerova, K.; Tapio, I.; Bonin, A.; Mrazek, J.; Callegari, M.L.; Bani, P.; Bayat, A.; Vilkki, J.; Kopečný, J.; Shingfield, K.J.; et al. Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe* **2014**, *29*, 80–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)]
27. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584. [[CrossRef](#)]
28. Vázquez-Baeza, Y.; Pírrung, M.; Gonzalez, A.; Knight, R. EMPERor: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. *GigaScience* **2013**, *2*, 16. [[CrossRef](#)]
29. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60. [[CrossRef](#)]
30. Cottone, M.; Renna, S.; Modesto, I.; Orlando, A. Is 5-ASA Still the Treatment of Choice for Ulcerative Colitis? *Current Drug Targets* **2011**, *12*, 1396–1405. [[CrossRef](#)]
31. Wang, Y.; Parker, C.; Feagan, B.; MacDonald, J. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis.pdf. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, CD000544.
32. Safdi, M.; DeMicco, M.; Sninsky, C.; Banks, P.; Wruble, L.; Deren, J.; Koval, G.; Nicols, T.; Targan, S.; Taylor, D.; et al. A double-blind comparison of oral versus rectal mesalazine versus combinational therapy in the treatment of distal ulcerative colitis. *Immunol. Microbiol. Inflammat. Dis.* **1995**, *108*, A909.
33. Kane, S.; Huo, D.; Aikens, J.; Hanauer, S. Medication nonadherence and the outcomes of patients with quiescent ulcerative colitis. *Am. J. Med.* **2003**, *114*, 39–43. [[CrossRef](#)]
34. Andrews, C.N.; Griffiths, T.A.; Kaufman, J.; Vergnolle, N.; Surette, M.G.; Rioux, K.P. Mesalazine (5-aminosalicylic acid) alters faecal bacterial profiles, but not mucosal proteolytic activity in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 374–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Moon, C.; Baldrige, M.T.; Wallace, M.A.; Burnham, C.-A.D.; Virgin, H.W.; Stappenbeck, T.S. Vertically transmitted fecal IgA levels distinguish extra-chromosomal phenotypic variation. *Nature* **2015**, *521*, 90–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kaakoush, N.O. Sutterella Species, IgA-degrading Bacteria in Ulcerative Colitis. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 1–3. [[CrossRef](#)]
37. Moayyedi, P.; Surette, M.G.; Kim, P.T.; Libertucci, J.; Wolfe, M.; Onischi, C.; Armstrong, D.; Marshall, J.K.; Kassam, Z.; Reinisch, W.; et al. Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 102–109. [[CrossRef](#)]
38. Kump, P.; Wurm, P.; Gröchenig, H.P.; Wenzl, H.; Petritsch, W.; Halwachs, B.; Wagner, M.; Stadlbauer, V.; Eherer, A.; Hoffmann, K.M.; et al. The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2018**, *47*, 67–77. [[CrossRef](#)]

39. Narula, N.; Kassam, Z.; Yuan, Y.; Colombel, J.F.; Ponsioen, C.; Reinisch, W.; Moayyedi, P. Systematic Review and Meta-analysis: Fecal Microbiota Transplantation for Treatment of Active Ulcerative Colitis. *Inflammat. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 1702–1709. [[CrossRef](#)]
40. Cao, Y.; Zhang, B.; Wu, Y.; Wang, Q.; Wang, J.; Shen, F. The value of fecal microbiota transplantation in the treatment of ulcerative colitis patients: A systematic review and meta-analysis. *Gastroenterol. Res. Pr.* **2018**, *2018*. [[CrossRef](#)]
41. Tian, Y.; Zhou, Y.; Huang, S.; Li, J.; Zhao, K.; Li, X.; Wen, X.; Li, X.A. Fecal microbiota transplantation for ulcerative colitis: A prospective clinical study. *BMC Gastroenterol.* **2019**, *19*, 116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Doherty, M.K.; Ding, T.; Koumpouras, C.; Telesco, S.E.; Monast, C.; Das, A.; Brodmerkel, C.; Schloss, P.D. Fecal microbiota signatures are associated with response to ustekinumab therapy among crohn's disease patients. *mBio* **2018**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kim, Y.S.; Unno, T.; Kim, B.; Park, M. Sex Differences in Gut Microbiota. *World J. Mens Health* **2020**, *38*, 48–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dominianni, C.; Sinha, R.; Goedert, J.J.; Pei, Z.; Yang, L.; Hayes, R.B.; Ahn, J. Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence The Human Gut Microbiome. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ding, T.; Schloss, P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature* **2014**, *509*, 357–360. [[CrossRef](#)]
46. Fransen, F.; van Beek, A.A.; Borghuis, T.; Meijer, B.; Hugenholtz, F.; Jongh, C.V.D.G.-D.; Savelkoul, H.F.; de Jonge, M.I.; Faas, M.M.; Boekschoten, M.V.; et al. The impact of gut microbiota on gender-specific differences in immunity. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 754. [[CrossRef](#)]
47. Wilson, B.C.; Vatanen, T.; Cutfield, W.S.; O'Sullivan, J.M. The super-donor phenomenon in fecal microbiota transplantation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 1–11. [[CrossRef](#)]
48. Odamaki, T.; Kato, K.; Sugahara, H.; Hashikura, N.; Takahashi, S.; Xiao, J.Z.; Abe, F.; Osawa, R. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: A cross-sectional study. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 90. [[CrossRef](#)]
49. Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Springer: New York, NY, USA, 2009.
50. Frank, D.N.; Amand, A.L.S.; Feldman, R.A.; Boedeker, E.C.; Harpaz, N.; Pace, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *104*, 13780–13785. [[CrossRef](#)]
51. Vacca, M.; Celano, G.; Calabrese, F.M.; Portincasa, P.; Gobbetti, M.; Angelis, M. De The controversial role of human gut lachnospiraceae. *Microorganisms* **2020**, *8*, 573. [[CrossRef](#)]
52. Vital, M.; Karch, A.; Pieper, D.H. Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: An Overview Using Omics Data. *mSystems* **2017**, *2*, e00130-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hold, G.L.; Schwartz, A.; Aminov, R.I.; Blaut, M.; Flint, H.J. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 4320–4324. [[CrossRef](#)]
54. Chen, G.L.; Zhang, Y.; Wang, W.Y.; Ji, X.L.; Meng, F.; Xu, P.S.; Yang, N.M.; Ye, F.Q.; Bo, X.C. Partners of patients with ulcerative colitis exhibit a biologically relevant dysbiosis in fecal microbial metacommunities. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 4624–4631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Plöger, S.; Stumpf, F.; Penner, G.B.; Schulzke, J.D.; Gäbel, G.; Martens, H.; Shen, Z.; Günzel, D.; Aschenbach, J.R. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1258*, 52–59. [[CrossRef](#)]
56. Miquel, S.; Martín, R.; Rossi, O.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Chatel, J.M.; Sokol, H.; Thomas, M.; Wells, J.M.; Langella, P. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 255–261. [[CrossRef](#)]
57. Laursen, M.F.; Laursen, R.P.; Larnkjær, A.; Mølgaard, C.; Michaelsen, K.F.; Frøkiær, H.; Bahl, M.I.; Licht, T.R. Faecalibacterium Gut Colonization Is Accelerated by Presence of Older Siblings. *mSphere* **2017**, *2*, e00448-17. [[CrossRef](#)]

58. Björkqvist, O.; Repsilber, D.; Seifert, M.; Brislaw, C.; Jansson, J.; Engstrand, L.; Rangel, I.; Halfvarson, J. Alterations in the relative abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* correlate with changes in fecal calprotectin in patients with ileal Crohn's disease: A longitudinal study. *Scand. J. Gastroenterol.* **2019**, *54*, 577–585. [[CrossRef](#)]
59. O'Callaghan, A.; Sinderen, D. van Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 925. [[CrossRef](#)]
60. Venturi, A.; Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Johansson, R.; Zucconi, E.; Brigidi, P.; Matteuzzi, D.; Campieri, M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: Preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1999**, *13*, 1103–1108. [[CrossRef](#)]
61. Alam, M.T.; Amos, G.C.A.; Murphy, A.R.J.; Murch, S.; Wellington, E.M.H.; Arasaradnam, R.P. Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathogens* **2020**, *12*, 1–8. [[CrossRef](#)]
62. Lee, T.; Clavel, T.; Smirnov, K.; Schmidt, A.; Lagkouvardos, I.; Walker, A.; Lucio, M.; Michalke, B.; Schmitt-Kopplin, P.; Fedorak, R.; et al. Oral versus intravenous iron replacement therapy distinctly alters the gut microbiota and metabolome in patients with IBD. *Gut* **2017**, *66*, 863–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Cho, G.S.; Ritzmann, F.; Eckstein, M.; Huch, M.; Briviba, K.; Behnsilian, D.; Neve, H.; Franz, C.M.A.P. Quantification of *Slackia* and *Eggerthella* spp. In human feces and adhesion of representative strains to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Setchell, K.D.R.; Brown, N.M.; Lydeking-Olsen, E. The Clinical Importance of the Metabolite Equol—A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavones. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3577–3584. [[CrossRef](#)]
65. Sjöberg, F.; Barkman, C.; Nookaew, I.; Östman, S.; Adlerberth, I.; Saalman, R.; Wold, A.E. Low-complexity microbiota in the duodenum of children with newly diagnosed ulcerative colitis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186178. [[CrossRef](#)]
66. Seishima, J.; Iida, N.; Kitamura, K.; Yutani, M.; Wang, Z.; Seki, A.; Yamashita, T.; Sakai, Y.; Honda, M.; Yamashita, T.; et al. Gut-derived *Enterococcus faecium* from ulcerative colitis patients promotes colitis in a genetically susceptible mouse host. *Genome Biology* **2019**, *20*, 252. [[CrossRef](#)]
67. Kassinen, A.; Krogius-Kurikka, L.; Mäkituokko, H.; Rinttilä, T.; Paulin, L.; Corander, J.; Malinen, E.; Apajalahti, J.; Palva, A. The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly From That of Healthy Subjects. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 24–33. [[CrossRef](#)]
68. Imhann, F.; Vila, A.V.; Bonder, M.J.; Fu, J.; Gevers, D.; Visschedijk, M.C.; Spekhorst, L.M.; Alberts, R.; Franke, L.; van Dullemen, H.M.; et al. The Interplay of Host Genetics and the Gut Microbiota Underlying the Onset and Clinical Presentation of Inflammatory Bowel Disease. *Gut* **2018**, *67*, 108–119. [[CrossRef](#)]
69. Lambeth, S.M.; Carson, T.; Lowe, J.; Ramaraj, T.; Leff, J.W.; Luo, L.; Bell, C.J.; Shah, V. Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Obes.* **2015**, *2*, 1–7. [[CrossRef](#)]
70. Gomez-Arango, L.F.; Barrett, H.L.; Wilkinson, S.A.; Callaway, L.K.; McIntyre, H.D.; Morrison, M.; Dekker Nitert, M. Low dietary fiber intake increases *Collinsella* abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes* **2018**, *9*, 189–201. [[CrossRef](#)]
71. Chen, J.; Wright, K.; Davis, J.M.; Jeraldo, P.; Marietta, E.V.; Murray, J.; Nelson, H.; Matteson, E.L.; Taneja, V. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* **2016**, *8*, 43. [[CrossRef](#)]
72. Ridlon, J.M.; Kang, D.J.; Hylemon, P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 241–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Waters, J.L.; Ley, R.E. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Biagi, E.; Franceschi, C.; Rampelli, S.; Severgnini, M.; Ostan, R.; Turroni, S.; Consolandi, C.; Quercia, S.; Scurti, M.; Monti, D.; et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 1480–1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ferrer, M.; Ruiz, A.; Lanza, F.; Haange, S.B.; Oberbach, A.; Till, H.; Bargiela, R.; Campoy, C.; Segura, M.T.; Richter, M.; et al. Microbiota from the distal guts of lean and obese adolescents exhibit partial functional redundancy besides clear differences in community structure. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 211–226. [[CrossRef](#)]

76. Goodrich, J.K.; Waters, J.L.; Poole, A.C.; Sutter, J.L.; Koren, O.; Blekhan, R.; Beaumont, M.; Van Treuren, W.; Knight, R.; Bell, J.T.; et al. Human genetics shape the gut microbiome. *PubMed Commons. Cell* **2014**, *159*, 789–799. [[CrossRef](#)]
77. Alemán, J.O.; Bokulich, N.A.; Swann, J.R.; Walker, J.M.; Rosa, J.C.; Battaglia, T.; Costabile, A.; Pechlivanis, A.; Liang, Y.; Breslow, J.L.; et al. Fecal microbiota and bile acid interactions with systemic and adipose tissue metabolism in diet-induced weight loss of obese postmenopausal women. *J. Transl. Med.* **2018**, *16*, 244. [[CrossRef](#)]
78. Pérez-Brocá, V.; García-López, R.; Nos, P.; Beltrán, B.; Moret, I.; Moya, A. Metagenomic analysis of Crohn's disease patients identifies changes in the virome and microbiome related to disease status and therapy, and detects potential interactions and biomarkers. *Inflammatory Bowel Diseases* **2015**, *21*, 2515–2532. [[CrossRef](#)]
79. Pascal, V.; Pozuelo, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Campos, D.; Santiago, A.; Martínez, X.; Varela, E.; Sarrabayrouse, G.; Machiels, K.; et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* **2017**, *66*, 813–822. [[CrossRef](#)]
80. Wright, E.K.; Kamm, M.A.; Wagner, J.; Teo, S.M.; De Cruz, P.; Hamilton, A.L.; Ritchie, K.J.; Inouye, M.; Kirkwood, C.D. Microbial Factors Associated with Postoperative Crohn's Disease Recurrence. *J. Crohn's Colitis* **2017**, *11*, 191–203. [[CrossRef](#)]
81. Papa, E.; Docktor, M.; Smillie, C.; Weber, S.; Preheim, S.P.; Gevers, D.; Giannoukos, G.; Ciulla, D.; Tabbaa, D.; Ingram, J.; et al. Non-invasive mapping of the gastrointestinal microbiota identifies children with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39242. [[CrossRef](#)]
82. Rajilić-Stojanović, M.; Shanahan, F.; Guarner, F.; Vos, W.M. De Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflammatory Bowel Diseases* **2013**, *19*, 481–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Yatsunenko, T.; Rey, F.E.; Manary, M.J.; Trehan, I.; Dominguez-Bello, M.G.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Baldassano, R.N.; Anokhin, A.P.; et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **2012**, *486*, 222–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Mancabelli, L.; Milani, C.; Lugli, G.A.; Turrone, F.; Cocconi, D.; van Sinderen, D.; Ventura, M. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, *93*, 1–10. [[CrossRef](#)]
85. Chang, C.J.; Lin, T.L.; Tsai, Y.L.; Wu, T.R.; Lai, W.F.; Lu, C.C.; Lai, H.C. Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* **2019**, *27*, 615–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Konikoff, T.; Gophna, U. Oscillospira: A Central, Enigmatic Component of the Human Gut Microbiota. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 523–524. [[CrossRef](#)]
87. Gophna, U.; Konikoff, T.; Nielsen, H.B. Oscillospira and related bacteria—from metagenomics species to metabolic features. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 835–841. [[CrossRef](#)]
88. Walters, W.A.; Xu, Z.; Knight, R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 4223–4233. [[CrossRef](#)]
89. Heeney, D.D.; Gareau, M.G.; Marco, M.L. Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 140–147. [[CrossRef](#)]
90. Liu, H.N.; Wu, H.; Chen, Y.Z.; Chen, Y.J.; Shen, X.Z.; Liu, T.T. Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver Dis.* **2017**, *49*, 331–337. [[CrossRef](#)]
91. Zhuang, X.; Xiong, L.; Li, L.; Li, M.; Chen, M. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *32*, 28–38. [[CrossRef](#)]
92. Wang, W.; Chen, L.; Zhou, R.; Wang, X.; Song, L.; Huang, S.; Wang, G.; Xia, B. Increased proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 398–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Oliva, S.; Di Nardo, G.; Ferrari, F.; Mallardo, S.; Rossi, P.; Patrizi, G.; Cucchiara, S.; Stronati, L. Randomised clinical trial: The effectiveness of Lactobacillus reuteri ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *35*, 327–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ford, A.C.; Quigley, E.M.M.; Lacy, B.E.; Lembo, A.J.; Saito, Y.A.; Schiller, L.R.; Soffer, E.E.; Spiegel, B.M.R.; Moayyedi, P. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **2014**, *109*, 1547–1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Ganji-Arjenaki, M.; Rafieian-Kopaei, M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 2091–2103. [[CrossRef](#)]
96. Göker, M.; Gronow, S.; Zeytun, A.; Nolan, M.; Lucas, S.; Lapidus, A.; Hammon, N.; Deshpande, S.; Cheng, J.F.; Pitluck, S.; et al. Complete genome sequence of odoribacter splanchnicus type strain (1651/6 T). *Stand. Genom. Sci.* **2011**, *4*, 200–209. [[CrossRef](#)]
97. Morgan, X.C.; Tickle, T.L.; Sokol, H.; Gevers, D.; Devaney, K.L.; Ward, D.V.; Reyes, J.; A Shah, S.; Leleiko, N.; Snapper, S.B.; et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* **2012**, *13*, R79. [[CrossRef](#)]
98. Lewis, J.D.; Chen, E.Z.; Baldassano, R.N.; Otley, A.R.; Anne, M.; Lee, D.; Bittinger, K.; Bailey, A.; Friedman, E.S.; Albenberg, L.; et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe* **2015**, *18*, 489–500. [[CrossRef](#)]
99. Wang, Y.; Gao, X.; Ghoulane, A.; Hu, H.; Li, X.; Xiao, Y.; Li, D.; Yu, G.; Zhang, T. Characteristics of faecal microbiota in paediatric Crohn's disease and their dynamic changes during infliximab therapy. *J. Crohn's Colitis* **2018**, *12*, 337–346. [[CrossRef](#)]
100. Morotomi, M.; Nagai, F.; Sakon, H.; Tanaka, R. Paraprevotella clara gen. nov., sp. nov. and Paraprevotella xylaniphila sp. nov., members of the family "Prevotellaceae" isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 1895–1900. [[CrossRef](#)]
101. Connors, J.; Dawe, N.; Limbergen, J. Van The role of succinate in the regulation of intestinal inflammation. *Nutrients* **2019**, *11*, 25. [[CrossRef](#)]
102. Ooi, M.; Nishiumi, S.; Yoshie, T.; Shiomi, Y.; Kohashi, M.; Fukunaga, K.; Nakamura, S.; Matsumoto, T.; Hatano, N.; Shinohara, M.; et al. GC/MS-based profiling of amino acids and TCA cycle-related molecules in ulcerative colitis. *Inflam. Res.* **2011**, *60*, 831–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Fernández-Veledo, S.; Vendrell, J. Gut microbiota-derived succinate: Friend or foe in human metabolic diseases? *Rev. Endocr. Metab. Dis.* **2019**, *20*, 439–447. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## **PUBLIKACE 3**



Contents lists available at ScienceDirect

## The Lancet Regional Health - Europe

journal homepage: [www.elsevier.com/lanepe](http://www.elsevier.com/lanepe)

Research paper

## The use of Faecal Microbiota Transplantation (FMT) in Europe: A Europe-wide survey

Simon Mark Dahl Baunwall<sup>a</sup>, Elisabeth M Terveer<sup>b,c</sup>, Jens Frederik Dahlerup<sup>a</sup>, Christian Erikstrup<sup>d</sup>, Perttu Arkkila<sup>e</sup>, Maria JGT Vehreschild<sup>f,g,h,i</sup>, Gianluca Janiro<sup>j</sup>, Antonio Gasbarrini<sup>k</sup>, Harry Sokol<sup>k,l,m</sup>, Patrizia K Kump<sup>n</sup>, Reetta Satokari<sup>o</sup>, Danny De Looze<sup>p</sup>, Séverine Vermeire<sup>q</sup>, Radislav Nakov<sup>r</sup>, Jan Brezina<sup>s</sup>, Morten Helms<sup>t</sup>, Jens Kjeldsen<sup>u,v</sup>, Anne A Rode<sup>w</sup>, Sabrina Just Kousgaard<sup>x</sup>, Laurent Alric<sup>y</sup>, Caroline Trang-Poisson<sup>z</sup>, Julien Scanzi<sup>aa</sup>, Alexander Link<sup>ab</sup>, Andreas Stallmach<sup>ac</sup>, Juozas Kupcinskas<sup>ad</sup>, Peter Holger Johnsen<sup>ae</sup>, Kjetil Garborg<sup>af,ag</sup>, Eugenia Sánchez Rodríguez<sup>ah</sup>, Lena Serrander<sup>ai</sup>, Robert J Brummer<sup>aj</sup>, Katerina Tatiana Galpérine<sup>am,ak</sup>, Simon D Goldenberg<sup>al</sup>, Benjamin H Mullish<sup>am</sup>, Horace RT Williams<sup>am</sup>, Tariq H Iqbal<sup>an</sup>, Cyriel Ponsioen<sup>ao</sup>, Ed J Kuijper<sup>c,g,ap,aq,ar</sup>, Giovanni Cammarota<sup>j</sup>, Josbert J Keller<sup>c,as,at</sup>, Christian Lodberg Hvas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Hepatology and Gastroenterology, Aarhus University Hospital, Palle Juul-Jensens Boulevard 99, DK-8200 Aarhus, Denmark

<sup>b</sup> Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

<sup>c</sup> Netherlands Donor Faeces Bank, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

<sup>d</sup> Department of Clinical Immunology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

<sup>e</sup> Department of Gastroenterology, Helsinki University Hospital and Helsinki University, Helsinki, Finland

<sup>f</sup> Department of Internal Medicine II, Infectious Diseases, University Hospital Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

<sup>g</sup> ESCMID Study Group for Host and Microbiota Interaction (ESGHAMI), Basel, Switzerland

<sup>h</sup> Department I of Internal Medicine, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>i</sup> German Centre for Infection Research (DZIF), Partner site Bonn-Cologne, Germany

<sup>j</sup> Digestive Disease Center, CEMAD, Fondazione Policlinico Universitario Gemelli IRCCS, Rome, Italy

<sup>k</sup> Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Saint Antoine Hospital, Gastroenterology Department, Paris, France

<sup>l</sup> INRA UMRI 319 Micalis, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France

<sup>m</sup> French Group of Faecal Microbiota Transplantation (GTF), Paris, France

<sup>n</sup> Division of Gastroenterology and Hepatology, Medical University of Graz, Graz, Austria

<sup>o</sup> Human Microbiome Research Program, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland

<sup>p</sup> Department of Gastroenterology, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium

<sup>q</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, KU Leuven University Hospitals Leuven & KU Leuven, Belgium

<sup>r</sup> Clinic of Gastroenterology, Tsaritsa Yoanna University Hospital, Sofia, Bulgaria

<sup>s</sup> Hepatogastroenterology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague, Czech Republic

<sup>t</sup> Department of Infectious Diseases, Copenhagen University Hospital Hvidovre, Denmark

<sup>u</sup> Department of Medical Gastroenterology, Odense University Hospital Research Unit of Medical Gastroenterology, Odense, Denmark

<sup>v</sup> Department of Clinical Research, University of Southern Denmark, Odense, Denmark

<sup>w</sup> Department of Medicine, Zealand University Hospital, Koge, Denmark

<sup>x</sup> Department of Gastrointestinal Surgery, Aalborg University Hospital, Aalborg, Denmark

<sup>y</sup> Department of Internal Medicine and Digestive Diseases, IRD Toulouse 3 University, Toulouse, France

<sup>z</sup> Gastroenterology Department, Institut des maladies de l'Appareil Digestif (IMAD), Centre d'Investigation Clinique IMAD, University Hospital, Hotel-Dieu, Nantes, France

<sup>aa</sup> Gastroenterology Department, Centre Hospitalier de Thiers, Thiers, France

<sup>ab</sup> Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany

<sup>ac</sup> Department of Internal Medicine IV (Gastroenterology, Hepatology, and Infectious Diseases), Jena University Hospital, Jena, Germany

<sup>ad</sup> Department of Gastroenterology and Institute for Digestive Research, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

<sup>ae</sup> University Hospital of North Norway Harstad, Harstad, Norway

<sup>af</sup> Department of Transplantation Medicine, Oslo University Hospital, Oslo, Norway

<sup>ag</sup> Institute of Health and Society, University of Oslo, Oslo, Norway

<sup>ah</sup> Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

**Abbreviations:** CDI, Clostridioides difficile infection; ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control; FMT, Faecal microbiota transplantation; IQR, Interquartile range; SARS-CoV-2, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; UEG, United Gastroenterology European; REDCap, Research Data Capture software

\* Corresponding author.

E-mail address: [chrishva@rm.dk](mailto:chrishva@rm.dk) (C.L. Hvas).

<sup>ai</sup> Division of Clinical Microbiology, Linköping University Hospital, Linköping, Sweden

<sup>aj</sup> Nutrition-Gut-Brain Interactions Research Centre, Faculty of Medicine and Health, School of Medical Sciences, Örebro University, Örebro, Sweden

<https://doi.org/10.1016/j.lanpe.2021.100181>

2666-7762/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

- <sup>a</sup><sub>k</sub> Infectious Diseases Service, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland  
<sup>a</sup><sub>l</sub> Centre for Clinical Infection and Diagnostics Research (CIDR), King's College London and Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust, London, United Kingdom  
<sup>a</sup><sub>m</sub> Department of Metabolism, Digestion and Reproduction, Faculty of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom  
<sup>a</sup><sub>n</sub> Department of Gastroenterology, Institute of Immunology and Immunotherapy, University of Birmingham, University Hospital, Birmingham, United Kingdom  
<sup>a</sup><sub>o</sub> Department of Gastroenterology and Hepatology, Amsterdam University Medical Centers, Amsterdam, the Netherlands  
<sup>a</sup><sub>p</sub> Centre for Microbiota Analysis and Therapeutics, Leiden University Medical Centre, Leiden, the Netherlands  
<sup>a</sup><sub>q</sub> National Reference Laboratory for *Clostridium difficile*, Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands  
<sup>a</sup><sub>r</sub> National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands  
<sup>a</sup><sub>s</sub> Department of Gastroenterology, Haaglanden Medical Center, The Hague, the Netherlands  
<sup>a</sup><sub>t</sub> Department of Gastroenterology and Hepatology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

## ARTICLE INFO

## Article History:

Received 30 April 2021  
 Revised 18 June 2021  
 Accepted 2 July 2021  
 Available online 19 July 2021

## Keywords:

Faecal microbiota transplantation  
 FMT  
 Stool banking  
*Clostridioides difficile*

## ABSTRACT

**Background:** Faecal microbiota transplantation (FMT) is an emerging treatment modality, but its current clinical use and organisation are unknown. We aimed to describe the clinical use, conduct, and potential for FMT in Europe.

**Methods:** We invited all hospital-based FMT centres within the European Council member states to answer a web-based questionnaire covering their clinical activities, organisation, and regulation of FMT in 2019. Responders were identified from trials registered at [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) and from the United European Gastroenterology (UEG) working group for stool banking and FMT.

**Findings:** In 2019, 31 FMT centres from 17 countries reported a total of 1,874 (median 25, quartile 10–64) FMT procedures; 1,077 (57%) with *Clostridioides difficile* infection (CDI) as indication, 791 (42%) with experimental indications, and 6 (0.3%) unaccounted for. Adjusted to population size, 0.257 per 100,000 population received FMT for CDI and 0.189 per 100,000 population for experimental indications. With estimated 12,400 (6,100–28,500) annual cases of multiple, recurrent CDI and indication for FMT in Europe, the current European FMT activity covers approximately 10% of the patients with indication. The participating centres demonstrated high safety standards and adherence to international consensus guidelines. Formal or informal regulation from health authorities was present at 21 (68%) centres.

**Interpretation:** FMT is a widespread routine treatment for multiple, recurrent CDI and an experimental treatment. Embedded within hospital settings, FMT centres operate with high standards across Europe to provide safe FMT. A significant gap in FMT coverage suggests the need to raise clinical awareness and increase the FMT activity in Europe by at least 10-fold to meet the true, indicated need.

**Funding:** NordForsk under the Nordic Council and Innovation Fund Denmark (j.no. 8056 00006B).

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## 1. Introduction

Faecal microbiota transplantation (FMT) is an emerging treatment to target and modulate the human intestinal microbiota [1]. The use of FMT is highly effective in patients with recurrent *Clostridioides difficile* infection (CDI) [2] and is embedded in international guidelines and consensus reports [3–5]. Promising results indicate that FMT may also be effective in other diseases such as ulcerative colitis, multidrug resistant organism carriage, irritable bowel syndrome, hepatic encephalopathy, and other conditions where the intestinal microbiota may contribute to disease pathogenesis [1,6–8].

The use of FMT has surged since the first randomised clinical trial in 2013 demonstrated that FMT was superior to antibiotics for recurrent CDI [9]. FMT has since undergone drastic technological improvements, and infrastructures are now being implemented internationally to serve a growing demand for safe FMT, especially for the large group of patients suffering from multiple CDI recurrences after failing antibiotics and where FMT is the only effective treatment [10–16]. International consensus reports guide FMT practices [3–5], but the actual dissemination of FMT in clinical practice, the potential to provide it, and how it is operated and regulated are heterogeneous and largely unknown.

The aim of the present study was to describe the clinical use, conduct and potential for FMT in Europe.

## 2. Methods

In this Europe-wide, cross-sectional survey conducted in March 2020, we invited hospital-based FMT centres across Europe to answer

questions specific to their clinical FMT activities in 2019. The survey was organised by the United Gastroenterology European (UEG) working group for stool banking and FMT [4]. All working group members agreed and approved of the study conduct.

## 2.1. The questionnaire

The online survey (Supplementary file 1) comprised items designed to cover six overall domains related to (i) demographics (ii) activity, treatment modalities, and indications used in 2019, (iii) organisation of donor recruitment and screening, (iv) organisation of laboratory preparation facilities, (v) organisation of clinical application and follow-up, and (vi) regulation and auditing.

Prior to launch, a pilot survey was conducted in May 2019 in Iceland, Norway, Sweden, Finland, and Denmark. Based on the feedback from the pilot, a revised survey was validated by six members of the UEG working group to form the final survey. Following approval by the working group, the survey was constructed as a web-based questionnaire using the Research Data Capture software (REDCap) ([www.redcap.au.dk](http://www.redcap.au.dk)), hosted by Aarhus University, Denmark.

## 2.2. Eligibility criteria and definitions

We defined an FMT site as any site with ongoing or previous clinical FMT activity, and we classified each FMT site according to its operation and activity as either an FMT clinic/service or an FMT centre:

- An FMT clinic/service was defined as an FMT site that solely offers a clinical service for providing FMT with preparations distributed

## Research in context

### Evidence before this study

FMT infrastructures have emerged internationally to meet a growing demand for safe FMT, but the current clinical use, organisation, and dissemination of FMT are unknown. We searched PubMed for all available literature on clinical FMT activity until the 24th of March 2020 using a combination of the terms “Fe(a)cal microbiota transplantation” with and without “survey”. We found several consensus guidelines, FMT centre descriptions, and three studies on national/regional FMT coverage. None provided generalisable evidence for the clinical activity at an international or continental level, and we concluded that a joint European collaboration was needed to assess the current clinical use, conduct, and potential of FMT in Europe.

### Added value of this study

We document that FMT is a widespread treatment and estimate that 1874 hospital-based FMT procedures were performed in Europe in 2019. Insights from the study provide the first estimates of the current supply and demand for FMT in Europe and documents how numerous FMT centres operate across Europe with high safety standards to make the treatment accessible to patients and providers. These data may guide future clinical practice and decision-making on how to perceive, use, and regulate FMT in Europe.

### Implications of all the available evidence

The results confirm that FMT has become a routine treatment that clinicians should familiarize themselves with to secure their patients the most effective treatment. Despite being recommended by clinical societies, the current clinical use covers approximately 10% of the patients with multiple, recurrent CDI and indication for FMT, indicating a significant underuse that emphasises the need to raise clinical awareness and increase the European FMT activity by 10-fold.

to them from external providers and has no donor activity nor stool preparation.

- An FMT centre was defined as an FMT site that actively recruits and screens donors, prepares stool for clinical use (routine and/or experimental) and performs local procedures with or without distribution.

Only FMT centres were included to avoid potential double count of procedures. As a harmonised definition, FMT was defined as the procedure of transferring intestinal microbiota from processed stool donated by a single donor.

### 2.3. Participating FMT centres

Active FMT centres in the European Council member states were identified within the UEG working group<sup>[4]</sup> and from completed or on-going clinical trials, registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) by February 2nd, 2020. FMT sites registered at [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) were identified using the search string “f(a)ecal microbiota transplantation”, and contact information for investigators and sponsors was extracted and reviewed. Hospital-based, European FMT sites that had provided contact information were contacted for potential participation in the survey.

Following initial consent to participate, dedicated members from each FMT centre answered the survey. A unique participation link

was e-mailed to every participant. All participants had a four-week window to respond to the survey with biweekly automated reminders. Non-responders were contacted by email and telephone.

### 2.4. Statistical analysis

All data were entered in REDCap. All working group members were offered access to all data. Institution-specific data are presented anonymously.

For statistical analyses, we used R version 3.6.1 with the “dplyr” extension package. The statistics were descriptive, and were presented as counts for proportional data with rounded percentages of totals, and as medians with 25–75% interquartile ranges (IQR) for continuous, numerical data. Proportional data was derived from the total number of participating FMT centres if not stated otherwise, and missing data were counted as no where appropriate. Answers not listed among the original options was added as categorical options. When applicable, data were grouped based on country and standardised towards a population size of 100,000 according to each country's population size. Population data were obtained from the World Bank Open Data hub ([data.worldbank.org](http://data.worldbank.org)) and based on the population sizes of 2019.

### 2.5. Role of the funding source

The funder of the study had no role in study design, data acquisition, analysis, and interpretation, nor decision to submit the manuscript.

## 3. Results

From the [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) registrations, we identified 65 European FMT sites. Fig. 1 presents the inclusion process for screening the FMT centres included in the study. Of the 42 FMT sites eligible for contact and screening as an FMT centre, 33 were already part of, or identified by, the UEG working group collaboration, and 9 FMT sites were unrelated. Eight FMT sites did not respond to the initial contact.

In total, 34 FMT sites (Fig. 1) from 17 countries across Europe agreed to participate in the survey and confirmed FMT activity consistent with being FMT centres in 2019. In total, 31/34 (91%) FMT centres completed the survey (Table 1) that was sent on 10 March 2020. Among these, 12 (39%) were part of the UEG working group, 18 (58%) were identified by UEG working group members, and 1 (3%) from [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

### 3.1. Clinical activity of FMT in Europe

Across all FMT centres, a total of 1874 hospital-based FMT procedures (median 25, IQR: 10–64 per FMT centres) were reported for 2019 (Fig. 2, Table 1): 1077 (58%) with CDI as the indication and 791 (42%) with non-CDI indications. Six (0.3%) procedures had unknown indications. Adjusted to population size, 0.257 per 100,000 population received FMT for CDI and 0.189 per 100,000 population for non-CDI indications (Table 1). Ten FMT centres reported that they distributed FMT preparations to other FMT clinics, and this accounted for 244 preparations in total with a median of 9 (IQR: 5–35) distributed per centre for the year 2019.

FMT was used for routine purposes in 24 (77%) of the 31 participating FMT centres, and/or for research purposes in 23 (74%). This research activity was performed within clinical trials in 18 (78%) of the 23 centres using FMT for research purposes and/or according to research protocols (non-clinical trials) in 11/23 (48%). Table 2 describes the specified routine and investigational (within trials) indications for using FMT.

Among delivery methods, colonoscopy was preferred by most FMT centres (11/31, 36%), followed by rectal enema (8/31, 26%) and

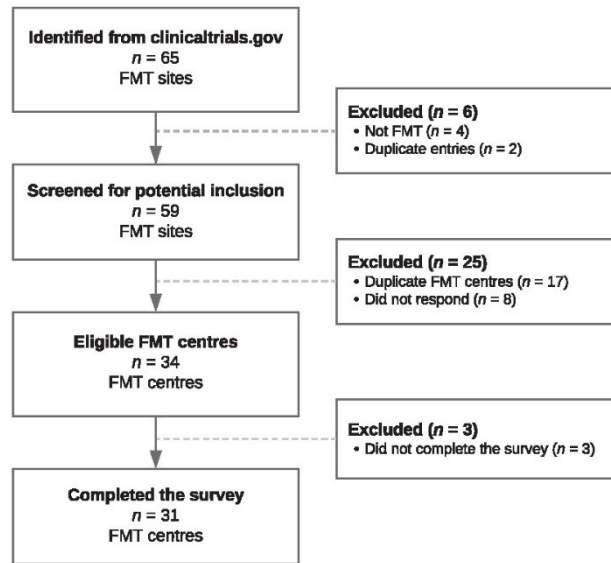


Fig. 1. Study flow chart of the screened FMT centres included in the study and reason for exclusion.

Legend: Definitions: FMT site: any site with ongoing or previous clinical activity; FMT centre: a FMT site that had donor recruitment, stool preparation, and clinical activity. With or without distribution.

Abbreviations: FMT: Faecal Microbiota Transplantation.

upper gastrointestinal tract tube insertion (8/31, 26%). Administration by capsules was the most common delivery method at 3 (10%) of the 31 centres while capsules were available at 6/31 (19%) centres as glycerol-based and at 3/31 (10%) centres as lyophilised formulations. 1/31 (3%) centre preferred gastroscopy. Repeat FMT administration as part of the same treatment was practiced at 23/31 (74%) centres, either by predefined criteria at 12/23 (52%) or without predefined criteria at 11/23 (48%) centres. Indication for repeat administration included (i) severe/fulminant CDI, (ii) refractory CDI unresponsive to antibiotics, (iii) recurrent CDI following previous FMT failure, and/or (iv) within trials for experimental indications.

### 3.2. Donor recruitment and screening practices

Donations for FMT relied solely on anonymous donors at 18 (58%), both related (known to the patient) and anonymous donors at 12 (39%), and related donors only at 1 (3%) of the 31 centres. For donor recruitment, most FMT centres used restricted advertising e.g., among students or local societies (17/31, 55%) or personal recruitment e.g., among blood donors (13/31, 42%). Health care professionals were allowed as donors in 14 (45%) of the 31 centres, was a deferral criterion in 16 (52%) centres and unknown in 1 (3%). Reimbursement was not offered in 18/31 (58%), whereas 6/31 (19%)

Table 1  
The clinical use of faecal microbiota transplantation (FMT) in Europe in 2019 according to country, indication, and population size.

Country	Centres no.	Total FMT procedures	Indication CDI no.	FMT for CDI per 100,000*	Indication Non-CDI no.	FMT for non-CDI per 100,000*
United Kingdom	3	690	279	0.417	411	0.615
Denmark	5	305	294	5.053	11	0.189
Italy	1	150	120	0.199	30	0.050
Sweden	2	96	66	0.642	30	0.292
Finland	1	90	60	1.087	30	0.543
France	4	88	68	0.101	14	0.021
Germany	3	86	39	0.047	47	0.057
Czech Republic	1	83	3	0.028	80	0.750
Netherlands	1	82	42	0.242	40	0.231
Norway	2	61	31	0.580	30	0.561
Austria	1	60	8	0.090	52	0.586
Belgium	2	27	15	0.131	12	0.104
Switzerland	1	20	16	0.187	4	0.047
Lithuania	1	18	18	0.646	0	0.000
Iceland	1	8	8	2.214	0	0.000
Bulgaria	1	5	5	0.072	0	0.000
Spain	1	5	5	0.011	0	0.000
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>1874</b>	<b>1077</b>	<b>0.257</b>	<b>791</b>	<b>0.189</b>

\* Per 100,000 population

Abbreviations: CDI: *Clostridioides difficile* infection, no: Number.

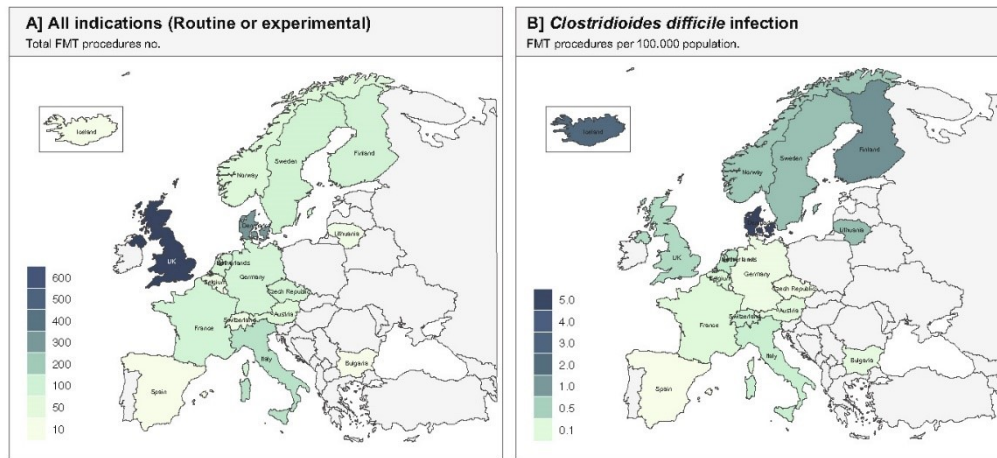


Fig. 2. Total clinical activity of faecal microbiota transplantation (FMT) across Europe and for *Clostridioides difficile* infections adjusted to per 100,000 population.

provided routine reimbursement per donation, and 4/31 (13%) provided a reimbursement per donation when used in clinical trials.

The selection of donors for FMT was based solely on the absence of risk factors or screening/testing parameters (clinical, biochemical, and faecal) in 25/31 (81%) centres, while 6/31 (19%) had additional

positive selection criteria based on intestinal microbiota patterns. A questionnaire-based, pre-screening of all donor candidates was performed at 28 (90%) of the 31 centres, and 23 (74%) performed complete re-screening of all donors following each donation period. The median number of donations per donation period was 5 within a median duration of 35 days (Table 3). Twelve (38%) FMT centres had no specified limit for a maximum length of donation period (the period between two consecutive screening rounds [4]).

Table 2

Reported routine and investigational indications in faecal microbiota transplantation (FMT) in Europe, 2019.

Indication	n*	%
<b>Routine clinical indications. (n = 30 centres)</b>		
<i>Clostridioides difficile</i> infection (CDI):		
Recurrent CDI	30	100%
Antibiotic refractory CDI	27	90%
Critical CDI	14	47%
<b>Experimental (outside trials) indications. (n = 30 centres)</b>		
Ulcerative colitis	4	13%
Multidrug resistant organisms carriage	3	10%
Graft versus host disease	2	7%
Irritable bowel syndrome	1	3%
Pouchitis	1	3%
Antibiotic-associated diarrhoea, not CDI	1	3%
<b>Investigational (within trials) indications. (n = 24 centres)</b>		
Ulcerative colitis	11	46%
Irritable bowel syndrome	7	30%
Multidrug resistant organisms carriage	5	21%
Recurrent CDI	3	13%
Index CDI	3	13%
Refractory CDI	2	8%
Crohn's disease	2	8%
Pouchitis	2	8%
Graft versus host disease	2	8%
Obesity	2	8%
Spondyloarthropathy	2	8%
Liver cirrhosis, hepatic encephalopathy	2	8%
Critical CDI	1	4%
Antibiotic-associated diarrhoea, not CDI	1	4%
Parkinson's disease	1	4%
Chemotherapy-related diarrhoea	1	4%
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	1	4%
Chronic fatigue syndrome	1	4%
Microscopic colitis	1	4%

\* 1 unanswered response in total.

Abbreviations: CDI: *Clostridioides difficile* infection, NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease.

### 3.3. Processing and preparation of stool for FMT

Most FMT centres (19/31, 61%) reported using frozen FMT preparations or a combination of both fresh and frozen preparations (8/31, 26%). Fresh preparations only were used at 3 (10%) centres. One (3%) FMT centre did not respond to this question. The processing and preparation of donor faeces for FMT preparations were handled within the facilities of clinical microbiology or immunology departments (14/31, 45%), research laboratories (12/31, 39%), certified FMT laboratories (2/31, 6%), clinical departments on site (2/31, 6%), or pharmacies (1/31, 3%). The specific summary of preparation details is presented in Table 3.

### 3.4. Organisation of the FMT centres

Maintaining the FMT centres engaged a variety of multi-disciplinary personnel that included physicians, nurses, laboratory technicians, pharmacists, production managers, and research assistants. Follow-up of all patients was documented in 27 (87%) of the 31 FMT centres and was practiced largely through clinical face-to-face appointments (20/27, 74%), telephone calls (20/27, 74%), medical record follow-up (16/27, 59%) and/or by written questionnaires (2/27, 7%). The longest median follow-up time for patients who received an FMT for CDI was 26 months (range 12–52 months).

Eight (26%) of the 31 centres had a formal auditing system, and 26/31 (84%) maintained a centralised database for their FMT activities and procedures. Standardised recording of adverse events was done at 19/31 (61%) centres, and 12/31 (39%) reported them to an external party, i.e., national authorities or central national registries. Fourteen of 29 (48%, 2 unanswered) centres had defined contraindications for FMT.

**Table 3**  
Summary of the reported preparation practices across the participating FMT centres for preparing stool for faecal microbiota transplantation (FMT).

Preparation conduct	Responders	n	%
<b>Fresh or frozen FMT used</b>			
Only frozen	31	19	61%
Both fresh and frozen	31	8	26%
Only fresh	31	3	10%
Unanswered	31	1	13%
<b>Quarantined FMT preparations until fulfilment of release criteria</b>			
Yes	31	26	84%
No	31	5	16%
<b>Routine quality controls instated</b>			
No	31	16	52%
Yes	31	14	45%
Unanswered	31	1	3%

Preparation details	Responders	Median	[IQR]
Maximum time from defecation to initiation of processing (hours)	29	4	[2 - 6]
Average donation weight (gr)	31	120	[65 - 150]
Average amount of faeces pr FMT preparation (gr.)	31	50	[50 - 60]
Average no. of donations per donation cycle (no.)	27	5	[5 - 8•5]
Maximum duration of donation period, average (days)	19	35	[22•5 - 60]
- Had no defined limits for the length of donation period.	12	••	••
Maximum average storage at 20°C (months)	4	6	[5 - 6]
Maximum average storage at 80°C (months)	26	12	[10•5 - 22•5]

Abbreviations: FMT: Faecal microbiota transplantation, Gr: Grams, IQR: Interquartile range; No: number.

### 3.5. Safety

Most centres (26/31, 84%) had quarantine measures to prevent release of FMT preparations until fulfilment of defined release criteria (27 FMT centres used frozen preparations allowing for these practices), and 14/31 (45%) performed routine quality controls. Accreditation of FMT preparation and/or clinical trial conduct was done in 20 (65%) of the 31 FMT centres. Thirteen (42%) of 31 centres had a Good Manufacturing Practice (GMP) accreditation of the FMT preparation, and 18 of 26 centres (69%, 5 centres had no on-going trials) conducted their clinical trials according to the principles for Good Clinical Practice (GCP). Seven of 30 (23%, 1 unanswered) had specific protocols for FMT preparations for use in immunocompromised patients.

### 3.6. Regulation

Regulation varied across countries and centres. Formal regulation was in place at 12/31 (39%) centres; of whom 7/31 (23%) were regulated by the national medicines' authorities, 4/31 (13%) were regulated by the national tissue authorities, and 1/31 (3%) were regulated locally by the hospital administration. Informal regulation where the centres were in dialogue with the national health authorities were present at 9/31 (29%) centres, and 3/31 (10%) centres reported having ethics approval only. Seven (23%) centres reported having no regulation.

## 4. Discussion

In this Europe-wide survey of clinical FMT activity and conduct, we estimate that approximately 2000 hospital-based FMT procedures were performed across the European countries in 2019. The main indication for FMT was *Clostridioides difficile* infection. In addition, FMT was widely used as an experimental treatment for several conditions, both within and outside of clinical trials. The survey results provide novel insights into how hospital-based FMT centres operate with high safety standards across Europe, and it represent the first complete estimate of the current supply and demand for FMT in Europe. These data are pivotal to guide future clinical practices and

decision-making regarding how to perceive, use, and regulate FMT in Europe.

The survey points to a significant unmet potential for the use of FMT. Currently, FMT is recommended for patients with multiple recurrences of CDI, i.e. three or more infections [17, 18]. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) has since 2016 collected surveillance data on the CDI incidence within acute care hospitals in the European countries and estimates that 124,000 (95% CI: 61,000–285,000) patients are diagnosed with CDI annually in Europe [19]. With an anticipated 10% occurrence of multiple, recurrent CDI [20, 21], the approximately 12,400 (95% CI: 6,100–28,500) patients with multiple, recurrent CDI and indication for FMT are far from matched by the current annual 1077 FMT procedures performed for CDI. This amounts to a significant gap in FMT coverage. Despite being a conservative measure not accounting for CDI-attributable mortality nor community-acquired CDI, it suggests that FMT is currently reserved for the most severe instances and that there is a need to increase clinical awareness and scale the European FMT activity by a 10-fold factor to meet the true demand, even in countries with frequent use of FMT.

To enable a large-scale use that meets the estimated need, distribution of FMT preparations to clinicians at treatment sites without the extensive infrastructure required for preparing FMT is required. In the survey, most of the FMT centres reported operating locally, and the 250 FMT preparations distributed to FMT clinics in 2019 indicate that the capacity for most FMT centres to distribute to other regional/national clinics is developing. Improving this capacity is essential to secure equal access for all patients. Rather than promoting the formation of new local FMT centres, scaling the established FMT centres to reach the critical capacity enabling them to become centralised stool banks capable of widespread distribution may prove the best model for making FMT widely accessible in the immediate future [22]. Similar to blood centres, the ideal for stool banks is to provide clinicians access to safe, ready-to-use FMT preparations while the stool banks handle the extensive logistics and documentation [10, 23].

The degree to which widespread access to FMT is achieved depends on how easily an FMT is performed locally. Technological refinements have now simplified the FMT procedure, especially the

use of encapsulated FMT containing frozen/freeze-dried stool sourced from anonymous donors have made the operations highly scalable [24, 25]. Most FMT centres in this survey reported colonoscopy as their preferred method of application, and although colonoscopy is suggested to be most effective in recurrent CDI [2], colonoscopy is logistically demanding. Transitioning to other treatment modalities with an increased ease of use such as encapsulated FMT, enema or similar, holds the potential to improve capacity.

International consensus guidelines exist to guide FMT centres [3–5], and the responses to the current survey indicate the degree to which these guidelines are adhered to. Most participating centres had defined practices for donor recruitment and screening as well as the laboratory preparations similar to those described in the consensus guidelines, indicating high adherence. Nonetheless, fresh donations were still used at some FMT centres, which per se cannot fulfil international requirements for donor screening. This practice may be needed for new, novel indications or represent a novel FMT centre in development.

As a next step in the continuous harmonisation of FMT in Europe, the present survey points to the need for shared, consensus-based definitions of operational metrics for measuring and comparing FMT centres and later stool banks. These could be similar to those used in endoscopy centres [26] and should (i) help indicate the FMT centre's current level of development, (ii) endorse quality measures for auditing, (iii) facilitate improvement, and (iv) assist in identifying current barriers to dissemination. For FMT, these metrics could include measurable performance indicators such as donor deferral rates, number of released, ready-to-use FMT preparations, number of procedures for certain indications, waste of preparations, as well as quality indicators such as adherence to the international standards for donor screening and laboratory handling or the level of implementation of e.g., stool bank capacity.

The safety of FMT remains a pivotal aspect of its use in clinical practice. While the vigorous screening of donors drastically reduces the short-term infectious risks following FMT, the long-term consequences of FMT are still unknown [27]. A united European approach is necessary to respond to future adverse events and inform clinical practices [28]. Most participating FMT centres maintained a centralised database and recorded adverse events in a predefined manner, which allows for long-term donor/recipient traceability. Compiled, annual summaries of the long-term follow-up from these registries may prove valuable in addressing the long-term safety of FMT and indicate whether the risk profile changes with indication.

Regulation of FMT is handled differently across Europe and greatly influences the national conduct and access to FMT. About 40% had formal regulation from either the national medical or tissue authorities, and most others reported they were in dialogue with their respective national competent authorities, although without formal regulation. Regulation is pivotal to the safety and credibility of FMT, but it remains controversial which jurisdictions should be applied. Currently, common consensus emphasise FMT should be considered a transfer of tissue if the transferred stool has not been subjected to substantial modifications rendering it comparable to a medicinal product [29]. A common European legislative framework for FMT is warranted and may include criteria for applying tissue and cells standards and potentially also medicines legislation [30].

The use of FMT will likely increase as a standard treatment for recurrent CDI and other indications where FMT is currently investigational. The results of this survey consolidate that FMT should be considered a routine treatment. Still, maintaining an FMT centre is not without challenges. As highlighted by the recent outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the subsequent COVID-19 pandemic, unknown adverse circumstances arise, which forces FMT centres to temporarily cease activity and reorganise while adapting in order to maintain their clinical activity [31,32]. The future success of the FMT centres in part depends on this ability to adapt locally and make strong collaborations internationally.

Important limitations apply to the study. Despite a high response rate, three centres did not respond and other FMT centres may be present in Europe, which we did not reach in this survey. Only hospital-based FMT centres were included, and the estimated activity is a conservative measure, subject to recall bias and accuracy limitations. By including all known FMT centres as well as those from the most commonly used public trial registry, we targeted the institutions with the largest capacity to provide FMT. However, we could not evaluate geographical variations, e.g., access in rural versus urban areas, nor the total population covered by FMT centres in each country. While the estimates and reporting of organisations in this manuscript reflects the reported activity in 2019, the current practice may have changed, and the emergence of FMT centres in the Eastern Europe has changed the regional access in Europe.

In conclusion, FMT has become a routine treatment for multiple, recurrent CDI and is a common investigational treatment for other diseases where the intestinal microbiota may be a contributing factor. Widespread FMT centres with high safety standards operate across Europe and may emerge to serve an increasing demand for FMT. A significant gap exists between the current number of FMT procedures and the European estimates for multiple, recurrent CDI, suggesting the need to increase clinical awareness and scale the European FMT activity at least by a 10-fold increase to meet the true, indicated need.

#### Contributors

Study concept and design: CLH, SMDB, JJK, EMT, PA, MJGTV, HS, PKK, JFD, GI, AG, GC.

Acquisition of data: SMDB, EMT, JFD, CE, PA, MJGTV, GI, AG, HS, PKK, RS, DDL, SV, RN, JB, MH, JK, AAR, SJK, LA, CTP, JS, AL, AS, JK, PHJ, KG, ESR, LS, RJB, KTG, SDG, BHM, HRTW, THI, CP, EJK, GC, JJK, CLH. Statistical analysis of data: SMDB. Analysis and interpretation of data: CLH, SMDB, JFD, CE, EMT, JJK. First draft: SMDB, CLH. Critical revision of manuscript for important intellectual content: SMDB, EMT, JFD, CE, PA, MJGTV, GI, AG, HS, PKK, RS, DDL, SV, RN, JB, MH, JK, AAR, SJK, LA, CTP, JS, AL, AS, JK, PHJ, KG, ESR, LS, RJB, KTG, SDG, BHM, HRTW, THI, CP, EJK, GC, JJK, CLH. All authors revised and approved the final manuscript. SMDB and CLH had primary access to all the data in the study, all other were offered access. JFD also had full access and verified it. All authors accepted final responsibility for the decision to submit for publication.

#### Declaration of interest

Andreas Stallmach reports consulting fees from Institut Allergosan, MSD, Norgine, lecture fees and travel support from Astellas, Ferring, Janssen, MSD.

Benjamin H. Mullish reports consultancy fees from Finch Therapeutics Group.

Simon D. Goldenberg reports Consultancy fees from Astellas, Enterobiotix, Menarini, MSD, Pfizer, Shionogi and research grants from Shionogi.

Laurent Alric reports consultant/speaker/investigator fees from AbbVie, BMS, Gilead, Janssen, and Merck.

Cyriel Ponsioen reports grant support from Takeda, consultancy fees from Takeda, Shire, and Pliant, and speaker's fees from Tillotts and Pfizer.

Caroline Trang-Poisson reports lecture fees from AbbVie, Amgen, Janssen, MaaT Pharma, MSD, takeda, advisory board fees from Arena, CT scout, MSD and meeting from AbvVie, takeda, MSD, and Janssen.

Maria Vehreschild reports research grants from 3 M, Astellas Pharma, Biontech, DaVolterra, Evonik, Gilead Sciences, Glycom, Immunicon, MaaT Pharma, Merck/MSD, Organobalance, Seres Therapeutics, Takeda Pharmaceutical, and speaker fees and/or consulting from Alb Fils Kliniken GmbH, Arderypharm, Astellas Pharma, Basilea, Bio-Mérieux, DaVolterra, Farmak International Holding GmbH,



Ferring, Gilead Sciences, Immunic AG, MaaT Pharma, Merck/MSD, Pfizer, Roche, Organobalance, and SocraTec R&D GmbH.

Severine Vermeire reports consulting fees from Prodigest/MRM Health.

Elisabeth Terveer and Ed Kuijper reports research grants from Vedanta Bioscience, Boston.

Simon Mark Dahl Baunwall, Christian Lodberg Hvas, Jens Frederik Dahlerup, Christian Erikstrup report research grant from the Innovation Fund Denmark (j.no. 8056–00006B).

All other authors declare no competing interest.

#### Acknowledgments

The authors thank Stefan Haraldsson, MD, at the Department of Gastroenterology, Landspítali University Hospital, Reykjavik, Iceland for contributing data to the study.

#### Data availability statement

Data are available upon request in blinded format, respecting the anonymity of each institution.

#### Funding

This study was funded by NordForsk under the Nordic Council and the Innovation Fund Denmark (j.no. 8056–00006B). The funding was independent of the study conduct. BHM is the recipient of an NHR Academic Clinical Lectureship (CL-2019-21-002). The Department of Metabolism, Digestion and Reproduction at Imperial College London receives financial and infrastructure support from the NHR Imperial Biomedical Research Centre (BRC) based at Imperial College Healthcare NHS Trust and Imperial College London

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100181>.

#### References

- [1] Allegretti JR, Mullish BH, Kelly C, Fischer M. The evolution of the use of faecal microbiota transplantation and emerging therapeutic indications. *Lancet* 2019;394:420–31.
- [2] Baunwall SMD, Lee MM, Eriksen MK, et al. Faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile* infection: an updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine* 2020;29–30:100642.
- [3] Cammarota G, Ianiro G, Kelly CR, et al. International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 2019;68:2111–21.
- [4] Keller JJ, Ooijsaar RE, Hvas CL, et al. A standardised model for stool banking for faecal microbiota transplantation: a consensus report from a multidisciplinary UEG working group. *United Eur Gastroenterol J* 2021;9:229–47 2050640620967898.
- [5] Mullish BH, Quraishi MN, Segal JP, et al. The use of faecal microbiota transplant as treatment for recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection and other potential indications: joint British Society of Gastroenterology (BSG) and Healthcare Infection Society (HIS) guidelines. *J Hosp Infect* 2018;100(Suppl 1):S1–S31.
- [6] Ianiro G, Eusebi LH, Black CJ, Gasbarrini A, Cammarota G, Ford AC. Systematic review with meta-analysis: efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2019;50:240–8.
- [7] Ghani R, Mullish BH, McDonald JAK, et al. Disease prevention not decolonization - a model for faecal microbiota transplantation in patients colonized with multidrug-resistant organisms. *Clin Infect Dis* 2021;72:1444–7.
- [8] Bajaj JS, Salzman NH, Acharya C, et al. Faecal microbial transplant capsules are safe in hepatic encephalopathy: a phase 1, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology* 2019;70:1690–703.
- [9] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013;368:407–15.
- [10] Terveer EM, van Beurden YH, Goorhuis A, et al. How to: establish and run a stool bank. *Clin Microbiol Infect* 2017;23:924–30.
- [11] Nakov R, Lyutakov I, Mitkova A, et al. Establishment of the first stool bank in an Eastern European country and the first series of successful faecal microbiota transplantations in Bulgaria. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2021;25:390–6.
- [12] Costello SP, Tucker EC, La Brooy J, Schoeman MN, Andrews JM. Establishing a faecal microbiota transplant service for the treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2016;62:908–14.
- [13] Jørgensen SMD, Hansen MM, Erikstrup C, Dahlerup JF, Hvas CL. Faecal microbiota transplantation: establishment of a clinical application framework. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2017;29:e36–45.
- [14] McCune VL, Quraishi MN, Manzoor S, et al. Results from the first English stool bank using faecal microbiota transplant as a medicinal product for the treatment of *Clostridioides difficile* infection. *EClinicalMedicine* 2020;20:100301.
- [15] Rode AA, Bytzer P, Pedersen OB, Engberg J. Establishing a donor stool bank for faecal microbiota transplantation: methods and feasibility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:1837–47.
- [16] Kragtsnaes MS, Nilsson AC, Kjeldsen J, et al. How do I establish a stool bank for faecal microbiota transplantation within the blood- and tissue transplant service? *Transfusion* 2020;60:1135–41.
- [17] McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 2018;66:e1–e48.
- [18] Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(Suppl 2):1–26.
- [19] European centre for disease prevention and control. *Clostridium difficile* infections. ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018.
- [20] Smitis WK, Iyeras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16020.
- [21] Louie TJ, Miller MA, Mullane KM, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 2011;364:422–31.
- [22] Quraishi MN, Segal J, Mullish B, et al. National survey of practice of faecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection in the UK. *J Hosp Infect* 2017;95:444–5.
- [23] Jørgensen SMD, Hvas CL, Dahlerup JF, et al. Banking feces: a new frontier for public blood banks? *Transfusion* 2019;59:2776–82.
- [24] Kao D, Roach B, Silva M, et al. Effect of oral capsule- vs colonoscopy-delivered faecal microbiota transplantation on recurrent *Clostridium difficile* infection: a randomized clinical trial. *JAMA* 2017;318:1985–93.
- [25] Staley C, Hamilton MJ, Vaughn BP, et al. Successful resolution of recurrent *Clostridium difficile* infection using freeze-dried, encapsulated faecal microbiota: pragmatic cohort study. *Am J Gastroenterol* 2017;112:940–7.
- [26] Bisschops R, Rutter MD, Areia M, et al. Overcoming the barriers to dissemination and implementation of quality measures for gastrointestinal endoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and United European Gastroenterology (UEG) position statement. *Endoscopy* 2021;53:196–202.
- [27] Vendrik KEW, Terveer EM, Kuijper EJ, et al. Periodic screening of donor faeces with a quarantine period to prevent transmission of multidrug-resistant organisms during faecal microbiota transplantation: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2021;21:711–21.
- [28] Kuijper EJ, Allegretti J, Hawkey P, et al. A necessary discussion after transmission of multidrug-resistant organisms through faecal microbiota transplantations. *Lancet Infect Dis* 2019;19:1161–2.
- [29] Keller JJ, Vehreschild MJ, Hvas CL, et al. Stool for faecal microbiota transplantation should be classified as a transplant product and not as a drug. *United Eur Gastroenterol J* 2019;7:1408–10.
- [30] Hvas CL, Baunwall SMD, Erikstrup C. Faecal microbiota transplantation: a life-saving therapy challenged by commercial claims for exclusivity. *EClinicalMedicine* 2020;24:100436.
- [31] Ianiro G, Mullish BH, Kelly CR, et al. Reorganisation of faecal microbiota transplant services during the COVID-19 pandemic. *Gut* 2020;69:1555–63.
- [32] Ianiro G, Mullish BH, Hvas CL, et al. SARS-CoV-2 vaccines and donor recruitment for FMT. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2021;6:264–6.

## **PUBLIKACE 4**

# Fekální mikrobiální transplantace u idiopatických střevních zánětů

## Faecal microbial transplantation in inflammatory bowel disease

J. Březina, L. Bajer, J. Špičák, P. Drastich

*Klinika hepatogastroenterologie, Transplantcentrum, IKEM, Praha*

**Souhrn:** Etiopatogeneze idiopatických střevních zánětů (IBD) není dosud plně objasněna. Jednu z teorií vzniku IBD představuje neadekvátní reakce slizniční imunity na některé složky střevního mikrobiomu. Možným terapeutickým přístupem, jak změnit složení mikrobiomu, a tím potažmo i ovlivnit průběh IBD, je užití fekální mikrobiální transplantace (FMT). FMT je léčebná metoda spočívající v přenosu stolice od zdravého dárce pacientovi, čímž dochází k obnovení mikrobiální homeostázy střeva po různě dlouhou dobu. FMT je vysoce efektivní v léčbě rekurentní klostridiové kolitidy a v této indikaci se jedná o standardní, klinicky využitelnou metodu. V případě IBD se jedná pouze o experimentální metodu užívanou jen v klinických studiích. V nejnovějším systematickém přehledu FMT je u ulcerózní kolitidy popisován výrazně variabilní efekt FMT v dosažení remise i klinické odpovědi. Recentně byly publikovány dvě randomizované kontrolované studie s FMT u ulcerózní kolitidy s rozporupnými výsledky, které nepřinášejí jasné důkazy o účinnosti této metody. Nicméně studie u UC naznačují příznivý efekt závislý na vhodném výběru dárce s bohatým a dostatečně diverzifikovaným mikrobiomem, na způsobu aplikace FMT a frekvenci FMT. Data k vyvozování závěrů u Crohnovy choroby jsou nedostatečná, zdá se však, že FMT má v této indikaci minimální efekt. FMT je bezpečná metoda s minimem nežádoucích účinků při zachování striktních kritérií vyšetření dárců. Dosavadní studie ukazují jen mírný efekt FMT u ulcerózní kolitidy, nicméně se jedná o slibnou a bezpečnou metodu. Bude třeba dalších dobře navržených studií na dostatečném počtu pacientů k objasnění otázek efektivity, míry navození remise, nutného počtu FMT k navození remise, dlouhodobé bezpečnosti a vhodného způsobu podání FMT.

**Klíčová slova:** fekální bakteriální transplantace – mikrobiom – idiopatické střevní záněty – ulcerózní kolitida – Crohnova choroba – klostridiová kolitida

**Summary:** The etiopathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) is not yet fully understood. One theory proposes that IBD onset is an overreaction of the gut immune system to some parts of the gut microbiome. Thus, one therapeutic approach is to employ a fecal microbiota transplant (FMT) to change the composition of the gut microbiome. FMT involves transplanting fecal matter or stool from a healthy donor to a recipient, leading to the reestablishment of gut microbiome homeostasis for a certain period of time. FMT is a standard, clinical procedure that is highly effective for the treatment of recurrent clostridium difficile colitis. FMT in IBD is an experimental method used only in clinical trials. Recent studies have shown that FMT has a highly variable effect on disease remission and clinical response. Two randomized control studies of FMT treatment of ulcerative colitis have been published, but have yielded inconsistent results, thus providing no compelling evidence for the effectiveness of this procedure. However, studies of FMT treatment of ulcerative colitis suggest that beneficial effects depend on the donor having a rich and diversified microbiome, method of administration, and the frequency of FMT. Finally, the effectiveness of FMT treatment of Crohn's disease has not yet been investigated thoroughly; however, the data so far indicate minimal beneficial effects of FMT for Crohn's disease patients. To sum up, FMT is a safe method with minimum adverse effects when the donor is carefully selected. Although FMT treatment of ulcerative colitis is only moderately effective, it represents a safe and promising therapeutic approach. However, there is an urgent need for a more thorough investigation of FMT in larger cohorts of patients to clarify the effectiveness, remission induction rate, necessary number of FMT, long term safety, and proper application of FMT.

**Key words:** fecal bacterial transplantation – microbiome – inflammatory bowel diseases – ulcerative colitis – Crohn's disease – clostridium difficile colitis

## Úvod

Lidský mikrobiom obsahuje 10× více buněk, než z kolika se skládá lidské tělo. Největší zastoupení má v gastrointestinálním traktu, a to jak celkovým počtem, tak i počtem druhů bakterií, který může dosahovat až 40 000 [1], z nichž většinu nejsme zatím schopni ani kultivovat. Nedávné metagenetické analýzy stanovily katalog genů lidské mikrobioty s celkovým počtem 3,3 mil. jedinečných genů, což je přibližně 150× více, než z kolika se skládá lidský genom [2]. Střevní mikrobiota funguje jako samostatný orgán lidského těla. Ovlivňuje štěpení a vstřebávání živin, bariérovou funkci střevní sliznice, metabolismus, imunitní systém hostitele, produkuje vitamin K, biotin a mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Vztah zdravé mikrobioty a hostitele představuje symbiózu. Změny mikrobioty mohou vést k narušení této symbiózy, a tím ke vzniku některých onemocnění. Tento patofyziologický mechanismus lze popsat na klostridiové kolitidě, ale mezi choroby se vztahem ke střevnímu mikrobiomu patří i idiopatické střevní záněty (IBD), syndrom dráždivého tračníku, jaterní encefalopatie, diabetes 2. typu, metabolický syndrom, nealkoholická steatohepatitida, obezita, ateroskleróza, idiopatická trombocytopenická purpura, roztroušená skleróza, alergie, autizmus a další.

Fekální mikrobiální transplantace (FMT) je léčebná metoda spočívající

v přenosu stolice od zdravého dárce pacientovi. Lze jí obnovit mikrobiální homeostázu střeva, a ovlivnit tak výše zmíněná onemocnění. První zmínky o FMT se datují 2 000 let nazpět do staré Číny, kdy Ge Hong popisuje léčbu průjmů a otravy jídlem pomocí FMT [3]. První článek v odborné literatuře o úspěšném použití FMT k léčbě pseudomembranózní kolitidy byl publikován v roce 1958 Eisemanem et al [4]. Od té doby byla publikována řada případů i studií naznačující účinnost FMT v léčbě některých onemocnění. FMT je vysoce efektivní v léčbě rekurentní pseudomembranózní kolitidy. V této indikaci se jedná o standardní, klinicky využitelnou metodu. Principem léčby je napravení „ekologické katastrofy“ způsobené většinou použitím antibiotik s následným přemnožením kmene *Clostridium difficile*. Proto není překvapivé, že i jednorázové či dvojnásobné podání FMT vede k vysoké frekvenci vyléčení (81–94 %). Ostatní uvedené indikace, vč. IBD, jsou experimentální a jsou předmětem pouze klinických studií.

Vztah mikrobiomu a IBD není natolik objasněn jako u pseudomembranózní kolitidy. I přes intenzivní výzkum není stále uspokojivě vysvětlena přesná etiopatogeneze IBD, avšak jednou z teorií vzniku IBD je neadekvátní reakce imunitního systému na některé součásti střevního mikrobiomu. Tato

souvislost byla dokázána studii na zvířecích modelech, kdy absence mikrobiomu u geneticky predisponovaných myší zabránila rozvoji IBD. Je prokázáno, že u pacientů s IBD dochází ke snížení diverzity druhů i změnám zastoupení střevní mikroflóry, je však otázkou, zda se jedná o příčinu, nebo následek. K zvrácení tohoto stavu, a tím i k potenciální léčbě IBD, se nabízí použití FMT.

## Metodologie FMT

### Příprava a uchování FMT

Zatím nebyl stanoven standardní protokol přípravy FMT. V publikovaných studiích jsou velké rozdíly ve zpracování stolice, použitých rozpouštědlech i způsobu homogenizace a filtrace materiálu. Malý počet subjektů i nedostatek kontrol v těchto studiích znesnadňují vyvození jednoznačných závěrů. Přestože každé pracoviště provádí FMT svým vlastním a často originálním způsobem, lze popsat všeobecně přijímaný základní algoritmus provedení. Nejčastěji se použije 50 g čerstvé stolice ve fyziologickém roztoku o dostatečném objemu (150–500 ml). Jako rozpouštědlo užívají některá pracoviště i vodu nebo mléko. K dokonalému promísání lze užít běžný kuchyňský mixér či tekutinu homogemizovat na způsob shakeování. Takto vzniklý roztok se dvakrát přefiltruje přes obyčejnou sterilní gázu (obr. 1) k odstranění větších zbytků stolice [5]. Výsledný produkt, fekální transplantát (obr. 2),



Obr. 1. Filtrace přes sterilní gázu.  
Fig. 1. Filtration through sterile gauze.



Obr. 2. Fekální transplantát.  
Fig. 2. Faecal transplant.

se nejčastěji užívá čerstvý nebo ho lze uchovat hluboce zmražený s glycerolem či lyofilizací k pozdějšímu použití.

V dostupných studiích FMT u klostridiové kolitidy měla voda jako rozpouštědlo vyšší míru vyléčení než fyziologický roztok (98,5 vs. 86 %), avšak relaps onemocnění byl popisován 2x vyšší. Zvyšující se objem FMT vedl k mírně vyšší úspěšnosti léčby za předpokladu dostatečného množství rozpuštěné stolice (hmotnost < 50 g zapříčinila 4x častěji relaps onemocnění) [6]. Hamilton et al prokázali stejnou účinnost zmražené FMT jako čerstvé FMT v léčbě klostridiové kolitidy [7]. Po 12 týdnech zmražení FMT na -80 °C byla pozorována viabilita 80 % bakterií. Pokud bude tato skutečnost prokázána i u ostatních onemocnění, povede k podstatně praktičtějšímu způsobu distribuce a zvýšení dostupnosti FMT v podobě fekálních dárcovských bank, které budou shromažďovat zmraženou či lyofilizovanou stolici od kvalitních dárců. Dalším logickým krokem je příprava kapslí s lyofilizovaným či speciálně emulgovaným fekálním obsahem. K zajištění přesunu adekvátní kvantity mikrobiomu bude však nutno aplikovat najednou velké množství kapslí (až 30).

#### Výběr a vyšetření dárce

Výběr dárce představuje zásadní aspekt úspěšné FMT. Je důležitý jak z hlediska bezpečnosti, tak efektivity FMT. Dárci stolice pro léčbu klostridiové kolitidy jsou obvykle vybíráni z příbuzných, partnerů, přátel nebo zdravých dobrovolníků. U jiných indikací (např. autoimunitních) může být příbuzenský vztah na škodu. Každý typ dárce má své výhody i nevýhody. U příbuzných a partnerů může být menší riziko přenosu infekčních nemocí. Na druhou stranu nepřibuzní mají vzhledem k rozdílnému genetickému pozadí a prostředí větší šanci významně změnit mikrobiom příjemce. Největším rizikem FMT je přenos infekce, proto musí být dárci pečlivě vyšetřeni.

**Tab. 1. Vyšetření dárce stolice.**

Tab. 1. Screening of the stool donor.

<b>Krevní testy</b>	krvení obraz, jaterní testy, železo hepatitida ABC, HIV-1, HIV-2, cytomegalovirus, virus Epstein-Barrové, <i>Herpes simplex</i> , <i>Varicella zoster</i> , <i>Treponema pallidum</i>
<b>Testy stolice</b>	<i>Yersinia spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. difficile toxin</i> , <i>Helicobacter pylori</i> standardní parazitologické vyšetření

Potenciální dárci stolice by měli být dotázáni na cestovní historii, sexuální chování, předchozí operace, krevní transfuze a další faktory, které zvyšují riziko přenosných chorob. Dále bychom se měli ptát na výskyt autoimunitních, nádorových a metabolických onemocnění u příbuzných prvního a druhého stupně. Dárci, kteří recentně užívali antibiotika či inhibitory protonové pumpy ovlivňující složení mikrobioty, by měli být vyloučeni. Dalším krokem je podrobné vyšetření vzorků krve a stolice (tab. 1). V systematickém přehledu 317 pacientů s recidivující klostridiovou kolitidou Gough et al popisují mírně vyšší úspěšnost léčby u pacientů léčených FMT od příbuzných dárců (93 %) než od nepřibuzných dárců (84 %). Tento jev nebyl pozorován u jiných chorob. Dále nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl u dárců stejného a opačného pohlaví [6]. Zdá se, že profil mikrobiomu dárce u klostridiové kolitidy není důležitý. Dostupná data u ulcerózní kolitidy (UC) však naznačují vyšší úspěšnost léčby při použití stolice od dárce s větší diverzitou střevní mikrobioty. Tato pozorování bude nutné ověřit dalšími dobře navrženyými studiemi, nicméně volba ideálního dárce s adekvátním mikrobiomem bude do budoucna jistě stěžejní. U ostatních potenciálních indikací nejsou k výběru dárce v současné době dostupná data.

#### Způsob podání a příprava příjemce

FMT lze podat nazogastrickou sondou, nazojejunální sondou, při gastrokopii, koloskopii, klyzmatem a perorálně

v kapsli. Dostupné studie FMT u klostridiové kolitidy neukazují signifikantní rozdíl mezi podáním nazogastrickou či nazojejunální sondou a koloskopickým podáním [5,6,8–10]. V případě podání FMT nazogastrickou či nazojejunální sondou někteří autoři podávají inhibitory protonové pumpy ke snížení kyselosti žaludečního obsahu, což vede ke zvýšení přežívání dárcovského mikrobiomu. Při nazogastrickém a nazojejunálním podání klesá počet aplikovaných bakterií i o několik řádů, i přesto však přežívá dostatečné množství bakterií k navození potřebného efektu FMT. Nazogastrické podání skýtá riziko aspirace a následného rozvoje purulentní bronchopneumonie, protože je tato metoda v současnosti opouštěna. Podání za Treitzovu řasu při gastrokopii či pomocí nazojejunální sondy toto riziko eliminuje, je však pro pacienty značně nepohodlné a z dlouhodobého hlediska nepoužitelné. Při koloskopickém podání je pacient připraven osmotickým laxativem, což může napomáhat odstranit stávající mikroflóru a usnadnit tím kolonizaci střeva dárcovským mikrobiomem. FMT je možné při výkonu podat sprejováním do celého tlustého střeva, vzhledem k neúnosnosti častého opakování koloskopie je toto podání vhodné zejména pro klostridiovou kolitidu a první podání FMT v případě IBD. Pro opakovaně podávání se zdá být vhodné klyzma, k jehož delšímu udržení lze použít loperamid. V období těsně předcházejícím FMT někteří autoři podávají k potlačení mikrobiomu příjemce antibiotika, zejména v léčbě klostridiové kolitidy [11]. Tyto postupy však

nejsou ověřeny randomizovanými studii a každé centrum si vytváří svůj vlastní protokol.

V roce 2014 publikovali Younster et al pilotní práci s FMT v podobě perorálních kapslí k léčbě recidivující klostridiové kolitidy se 70% účinností po prvním podání 15 kapslí a 90% efektivitou po druhém podání stejného počtu kapslí [12]. U ostatních nemocí potenciálně léčitelných FMT není dostatek evidence k vyvození závěrů o účinnosti jednotlivých druhů podání. O způsobu léčby tak rozhoduje zejména anatomická lokalizace daného onemocnění. V případě IBD se zdá nejvhodnějším způsobem jednorázové podání koloскопické a formou klyzmatu.

### Komplikace

FMT je při dodržení přísných podmínek vyšetření dárce a vhodné indikaci považována za bezpečnou metodu. V Goughově systematickém přehledu 317 pacientů s recidivující klostridiovou kolitidou byl výskyt nežádoucích účinků 2,5% za dodržení všech pravidel vyšetření dárce [6]. Vzhledem k několika případům aspirace při nazogastričním podání se od něj většina autorů v současnosti odklání a preferují nazojejunální sondu, případně gastroскопické podání za Treitzovu řasu. Většina pacientů léčená FMT popisuje přechodný průjem nebo zácpu, méně často bolesti a křeče břicha. U IBD pacientů jsou častěji zaznamenávány horečky a krátkodobá elevace zánětlivých parametrů, což nejspíše souvisí s porušenou bariérovou funkcí střevní sliznice. Jak již bylo zmíněno výše, obávaným nežádoucím účinkem FMT je přenos infekčních nemocí. V dostupné literatuře k tomu došlo pouze ve dvou případech, kdy se jednalo o norovirovou enteritidu [13]. Dlouhodobá follow-up studie Brandta et al naznačuje vysokou bezpečnost FMT [14]. Další takové studie budou potřeba k zjištění souvislosti FMT se vznikem pozdních infekcí, zánětů a nádorových onemocnění.

### Idiopatické střevní záněty

Jedná se o chronická rekurující zánětlivá onemocnění trávicího traktu provázaná průjmy a bolestí břicha. Mezi IBD patří především Crohnova choroba (CD) a UC. I přes intenzivní výzkum není stále uspokojivě objasněna přesná etiopatogeneze těchto onemocnění. Jednou z teorií vzniku IBD je neadekvátní reakce imunitního systému na některé složky střevní mikrobiální flóry u geneticky predisponovaných jedinců [15,16]. Tato souvislost byla dokázána studii na zvířecích modelech. Je prokázáno, že u pacientů s IBD dochází ke snížení diverzity druhů i změnám zastoupení střevní mikroflóry. Zejména je přítomna redukce kmene *Fermitutes* se snížením rodů *Bifidobacteria* a *Lactobacillus*. *Fermitutes* jsou hlavní producenti mastných kyselin s krátkým řetězcem, mezi něž patří i butyrát, který má imunoregulační vlastnosti [17]. Některé studie prokazují účinnost butyrátových klyzmat v léčbě refrakterních IBD [18,19].

Léčba IBD v posledních desetiletích zaznamenala výrazný rozvoj. K již dlouhodobě užívaným skupinám léků, mezi něž patří steroidy, aminosalicyláty a imunosupresiva, přibyla biologická léčba (BL). Přesto část pacientů na léčbu nereaguje a někteří mají významné nežádoucí účinky plynoucí z užívané terapie. I přes zavedení BL nedosahuje kvalita života mnohých pacientů požadované úrovně [20]. Jeden z dalších možných terapeutických postupů, jak ovlivnit IBD, představuje FMT. Principem účinku FMT u IBD je navození změny stávajícího mikrobiomu, což nejspíše vyžaduje opakované, a nelze vyloučit, že i dlouhodobé, podání FMT.

### Ulcerózní kolitida

První publikovaný případ léčby UC pomocí FMT pochází z roku 1989 od Beneta et al. Samotný Bennet si léčil pomocí FMT svoji sedm let trvající UC, což vyústilo v jeho dlouhodobé klinické i histologické vyléčení [21]. V systematickém přehledu publiko-

vaných případů z roku 2012 identifikuje Anderson et al 18 pacientů s UC bez souběžně probíhající klostridiové kolitidy, kteří byli léčeni pomocí FMT. U 13 z 18 pacientů (72,2%) došlo k navození remise s možností vysazení zbylých léků [22]. Tento systematický přehled ovšem zahrnuje pouze jednotlivé případy a série případů. Nejnovější systematický přehled FMT u UC z roku 2015 udává velmi variabilní dosažení remise 0–68% u 106 pacientů v šesti studiích (tab. 2) [23]. Kritéria remise a klinické odpovědi však byla u každé studie odlišná. Výtečný výsledek 92% klinické odpovědi dosáhla studie Borodyho, jednalo se však o retrospektivní studii zatíženou možnou zaujatostí při výběru pacientů. Vermiere et al léčili osm pacientů s medikamentózně refrakterní UC pomocí FMT. Primárního cíle endoskopické remise v osmém týdnu dosáhli dva z osmi pacientů. Při zhodnocení efektivity bylo zjištěno, že respondéři dostali FMT od dárce s bohatou a různorodou mikrobiotou [24].

V roce 2015 publikovali Moayyedi et al výsledky z první randomizované placebem kontrolované studie fekální bakteriální transplantace u aktivní UC. Pěťasedmdesát pacientů s aktivní UC (Mayo skóre > 4) bylo randomizováno do dvou větví studie, první byla léčena 50ml klyzmatem FMT 1× týdně celkově šest týdnů, druhá skupina dostávala placebové klyzma. Studii dokončilo 70 pacientů (36 FMT a 34 placebo). Remise onemocnění dosáhlo v léčbě skupině 9 z 36 pacientů (24%), ve skupině s placebem 2 z 34 (5%), což byl statisticky signifikantní rozdíl. Sedm z devíti pacientů, kteří dosáhli remise, obdrželo FMT od stejného dárce. Nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl v nežádoucích účincích. Moayyediho studie zahrnovala velmi různorodou skupinu pacientů (48% pacientů s pankolitidou, 37% pacientů na léčbě steroidy, 23% užívalo imunosupresiva a 9% BL) a 50ml klyzma se zdá být poměrně malé k rozpuštění ideálního

**Tab. 2. Studie fekální mikrobiální transplantace u ulcerózní kolitidy [23].**

Tab. 2. Studies of faecal microbial transplantation in ulcerative colitis [23].

Autor	Rok	Počet pacientů	Diagnóza	Medikace	Klinické zlepšení	Remise
Angelberger	2013	5	refrakterní UC	5-ASA (3)	20 %	
Borody	2012	62	aktivní UC		92 %	68 %
Greenberg	2013	14	UC	ster (10), anti-TNF (4), 6MP (1)	63 %	
Kump	2013	9	refrakterní UC		56 %	
Kump	2013	6	refrakterní UC		33 %	0 %
Kunde	2013	10	aktivní UC	5-ASA (7), 6MP (4), ster (3)	70 %	30 %

UC – ulcerózní kolitida

množství stolice (50–60g). Dále lze vytknout zmrazení fekálního transplantátu bez kryoprezervace a uchovávání FMT při pouhých  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [25].

V další randomizované kontrolované studii FMT u UC publikované v roce 2015 Rossenovou et al randomizovali 50 pacientů do dvou větví léčených FMT od dárce a FMT vlastními exkrementy (hrající roli placebo). FMT byla podávána cestou nazojejunální sondy celkově dvakrát, a to 0. a 3. týden. Primární cíle studie byly klinická remise (definovaná jako Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI)  $\leq 2$ ) a endoskopická odpověď (definovaná jako pokles endoskopického Mayo score nejméně o 1). Primárního cíle dosáhlo 7 z 23 pacientů léčených FMT od dárce a 5 z 25 pacientů léčených placebem. Studie neprokázala statisticky signifikantní rozdíl mezi FMT a placebem ( $p = 0,51$ ). U pacientů reagujících na léčbu bylo ve 12. týdnu studie zjištěno podobné složení mikrobiomu jako u jejich dárců. U pacientů nereagujících nebyla tato změna pozorována. U studie Rossenové lze jako nedostatek shledat pouze dvě dávky FMT v průběhu celé studie a podání nazojejunální sondou, které snižuje přežívání podaných bakterií [26].

Závěry těchto dvou randomizovaných kontrolovaných studií jsou tedy rozporuplné. K vyvození jednoznačných závěrů bude potřeba dalších dobře designovaných studií na dostatečném vzorku pacientů. Z dosavadních dat lze konstatovat mírný až střední efekt FMT u UC a důležitost výběru vhodného dárce. Vzhle-

dem k předpokládanému mechanismu účinku formou mikrobiálního shiftu se jeví opakované a možná i dlouhodobé podání FMT s velkou výhodou.

### Crohnova choroba

Data týkající se léčby CD pomocí FMT jsou velmi omezená. V Andersonově systematickém přehledu je popsáno šest pacientů s CD léčených FMT. Léčba vedla k navození remise v jednom případě (16,6 %) [22]. Gordon et al v roce 2014 publikovali případ pacienta s těžkou CD, který zareagoval na léčbu FMT [27]. K posouzení efektivity a bezpečnosti FMT u pacientů s CD je na [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) registrováno několik studií.

### Závěr

Fekální bakterioterapie představuje ideální metodu k ovlivnění složení mikrobiomu u střevních zánětlivých onemocnění. U klostridiové kolitidy prokázala svoji vysokou účinnost a zařadila se do standardních doporučených postupů pro rekurentní formu nemoci. Fekální bakterioterapie u UC v nejnovějším systematickém přehledu navozuje remisi a klinickou odpověď ve velmi variabilním rozsahu 0–68 %, resp. 20–90 %. Data k vyvození závěrů u CD jsou velmi insuficientní, zdá se však, že v této indikaci má FMT minimální efekt.

FMT u pacientů s IBD byla obecně dobře tolerovaná, s minimálními nežádoucími účinky zahrnujícími bolesti břicha, febrilie a přechodný vzestup zánětlivých parametrů, což souvisí nejspíše s porušenou bariérovou funkcí

střevní sliznice. Obávaný přenos infekčních nemocí nebyl v recentních studiích s dodržением protokolu vyšetření dárce zaznamenán.

S výjimkou dvou výše zmíněných randomizovaných studií jsou ostatní práce publikované na téma FMT u IBD série případů a nekontrolované, často retrospektivní studie s nízkou kvalitou provedení. Nelze proto vyvozovat jasné závěry stran efektivity FMT v této indikaci. V příštích několika letech lze očekávat větší množství kvalitních dat vzhledem k četným randomizovaným studiím registrovaným na [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (sedm studií na téma FMT u UC, dvě na téma FMT u CD, tři na téma FMT u IBD). Tyto studie mají za cíl zodpovědět otázky efektivity, míry navození remise, klinické odpovědi, nutného počtu transplantací k navození remise, dlouhodobé bezpečnosti a vhodného způsobu podání FMT. Dále mohou přispět k lepšímu porozumění vztahu mezi mikrobiomem, střevní sliznicí a hostitelem. I přes značnou kontroverzi a rozporuplné výsledky lze FMT považovat za slibnou metodu. Čas a zejména další studie odhalí, zda se jedná o progresivní účinnou metodu nebo jde o jednu ze slepých uliček medicíny.

### Studie FACTU

Pod záštitou Pracovní skupiny pro IBD při České gastroenterologické společnosti ČLS JEP je připravena multicentrická, randomizovaná, kontrolovaná a prospektivní studie FACTU (Fekální bakterioterapie u levostra-

nné UC). Ve studii jsou dvě větve o cca 25 pacientech, první bude léčena klyzmatem FMT a druhá standardním mesalazinovým klyzmatem. Mezi zařazovací kritéria patří levostranná kolitida > 15 cm trvající déle než tři měsíce, Mayo skóre 4–9 a endoskopické Mayo score  $\geq 2$ . Délka studie je plánována na 12 týdnů. Podávání FMT je plánováno 10x u jednoho pacienta během prvních šesti týdnů studie. Primárním cílem studie je klinická remise definovaná jako Mayo score < 2 s žádným subscore > 1. Sekundárními cíli jsou endoskopická remise definovaná jako endoskopické Mayo score = 0 a klinická odpověď definovaná jako snížení Mayo score  $\geq 2$ . Studie již získala veškerá nutná povolení ke svému zahájení. Její start je plánován na jaro 2016. V případě zájmu o zařazení pacienta do studie kontaktujte dr. Březinu na emailové adrese jan.brezina@ikem.cz.

#### Literatura

- Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(1): 4–10.
- Qin J, Li R, Raes J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464(7285): 59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Zhang F, Luo W, Shi Y et al. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol* 2012; 107(11): 1755. doi: 10.1038/ajg.2012.251.
- Eiseman B, Silen W, Bascom GS et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 1958; 44(5): 854–859.
- van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2013; 368(5): 407–415. doi: 10.1056/NEJMoa1205037.
- Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2011; 53(10): 994–1002. doi: 10.1093/cid/cir632.
- Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ et al. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 2012; 107(5): 761–767. doi: 10.1038/ajg.2011.482.
- Postigo R, Kim JH. Colonoscopic versus nasogastric fecal transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a review and pooled analysis. *Infection* 2012; 40(6): 643–648. doi: 10.1007/s15010-012-0307-9.
- Persky SE, Brandt LJ. Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(11): 3283–3285.
- Yoon SS, Brandt LJ. Treatment of refractory/recurrent *C. difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44(8): 562–566. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181dac035.
- Angelberger S, Reinisch W, Makristathis A et al. Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation. *Am J Gastroenterol* 2013; 108(10): 1620–1630. doi: 10.1038/ajg.2013.257.
- Youngster I, Russell GH, Pindar C et al. Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *Jama* 2014; 312(17): 1772–1778. doi: 10.1001/jama.2014.13875.
- Schwartz M, Gluck M, Koon S. Norovirus gastroenteritis after fecal microbiota transplantation for treatment of *Clostridium difficile* infection despite asymptomatic donors and lack of sick contacts. *Am J Gastroenterol* 2013; 108(8): 1367. doi: 10.1038/ajg.2013.164.
- Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 2012; 107(7): 1079–1087. doi: 10.1038/ajg.2012.60.
- Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(5): 968–984. doi: 10.1002/ibd.21866.
- DuPont AW, DuPont HL. The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8(9): 523–531. doi: 10.1038/nrgastro.2011.133.
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134(2): 577–594. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.059.
- Vernia P. Butyrate in the treatment of ulcerative colitis. *Digest Liver Dis* 2007; 1(Suppl 1): 27–30. doi: 10.1016/S1594-5804(08)60008-X.
- Hamer HM, Jonkers DM, Vanhoutvin SA et al. Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. *Clin Nutr* 2010; 29(6): 738–744. doi: 10.1016/j.clnu.2010.04.002.
- Lix LM, Graff LA, Walker JR et al. Longitudinal study of quality of life and psychological functioning for active, fluctuating, and inactive disease patterns in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14(11): 1575–1584. doi: 10.1002/ibd.20511.
- Bennet JD, Brinkman M. Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet* 1989; 1(8630): 164.
- Anderson JL, Edney RJ, Whelan K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36(6): 503–516. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05220.x.
- Rossen NG, MacDonald JK, de Vries EM et al. Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: a systematic review. *World J Gastroenterol* 2015; 21(17): 5359–5371. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5359.
- Vermeire S, Joossens M, Verbeke K et al. Donor species richness determines faecal microbiota transplantation success in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2015; jiv203. doi: 10.1093/ecco-jcc/jiv203.
- Moayyedi P, Surette MG, Kim PT et al. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2015; 149(1): 102–109. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.001.
- Rossen NG, Fuentes S, van der Spek MJ et al. Findings from a randomized controlled trial of fecal transplantation for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2015; 149(1): 110–118.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.03.045.
- Gordon H, Harbord M. A patient with severe Crohn's colitis responds to Faecal Microbiota Transplantation. *J Crohn Colitis* 2014; 3(8): 256–257. doi: 10.1016/j.crohns.2013.10.007.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy. The author declares he has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Doručeno/Submitted: 15. 1. 2016  
Přijato/Accepted: 29. 1. 2016

MUDr. Jan Březina  
Klinika hepatogastroenterologie  
Transplantcentrum  
IKEM  
Videňská 1958/9  
140 21 Praha 4  
jan.brezina@ikem.cz



## SOUHRNNÁ DISKUSE

**Publikace č. 1** hodnotila klinickou účinnost FMT klyzmatu u pacientů s mírně až středně aktivní levostrannou UC v randomizované kontrolované studii FACTU. Výsledky studie poskytují důkaz, že klyzma FMT není inferiorní v navození klinické remise vůči klyzmatu 5-ASA. U více než poloviny pacientů léčených FMT došlo ve 12. týdnu ke klinické remisi. Rozdíly v ostatních sekundárních cílech studie (klinická odpověď a endoskopická remise) nebyly mezi porovnávanými skupinami statisticky signifikantní (**Tab. 3**). Léčba klyzmaty FMT měla dobrý bezpečnostní profil a byla obecně dobře snášena. V obou skupinách jsme pozorovali zvýšenou diverzitu střevních mikroorganismů. Toto zvýšení si však ve 3. měsíci studie zachovala jen skupina pacientů po úspěšné FMT.

**Tabulka 3.** Primární a sekundární cíle studie FACTU v týdnu 6 a 12.

	<b>FMT</b> <b>(n = 21)</b>	<b>5-ASA enema</b> <b>(n = 22)</b>	<b>95% CI for</b> <b>difference</b>
<b>Primary outcome</b>			
Clinical remission (week 12)	12 (57 %)	8 (36 %)	(-7.6; 48.9) %
<b>Secondary outcomes</b>			<b>p-value</b>
Clinical response (week 6)	14 (64 %)	12 (55 %)	0.53
Clinical response (week 12)	15 (71 %)	12 (55 %)	0.35
Endoscopic remission (week6)	3 (14 %)	1 (5 %)	0.34
Endoscopic remission (week 12)	3 (14 %)	3 (14 %)	1.0

V době publikování naší studie bylo publikováno pět RCT o použití FMT u UC. Čtyři hodnotily dosažení remise u aktivní UC [32, 50, 51, 54] a jedna hodnotila udržení remise [55]. Dvě byly publikovány v roce 2015 a byly předčasně ukončeny pro předpokládanou nedostatečnou účinnost [32, 50]. V jedné z těchto studií Moayyediho a kol. však závěrečná analýza zjistila, že remise s celkovým Mayo skóre <3 dosáhlo v 7. týdnu 25 % účastníků, kteří dostávali klyzmata FMT jednou týdně po dobu 6 týdnů [32]. Studie Paramsothyho a kol.

odhalila, že velmi intenzivní režim FMT zahrnující jednorázové kolonoskopické podání s klyzmaty podávanými 5 dní v týdnu po dobu 8 týdnů dosáhl klinické remise bez steroidů u 27 % pacientů ve srovnání s 8 % u placeba [51]. Podobných výsledků dosáhla i australská studie, která zaznamenala 32% remisi bez steroidů, a to navzdory mnohem méně intenzivnímu léčebnému režimu zahrnujícímu jednu kolonoskopickou infuzi následovanou dvěma klyzmaty během 7 dnů [54]. V naší studii dosáhlo 57 % pacientů léčených FMT klinické remise ve 12. týdnu. Míra remise je vyšší, než uváděly předchozí studie, a nezdá se, že by byla ovlivněna užíváním kortikoidů, které bylo v naší studii minimální. Klinické remise dosáhl pouze jeden pacient užívající kortikosteroidy při FMT, takže hypotetická míra klinické remise bez steroidů činila 52 %. Výsledky mohly být ovlivněny naší studijní populací, která zahrnovala pouze pacienty s mírnou až středně aktivní UC ve srovnání se středně těžkou až těžkou UC v předchozích studiích. Domníváme se také, že pacienti v naší skupině FMT profitovali z intervenčního režimu, kdy pět po sobě jdoucích podání v prvním týdnu následovalo jedno klyzma za týden po dobu pěti týdnů, což mohlo podpořit a udržet změny mikrobioty.

Klíčovými rysy, které odlišují naši studii od předchozích studií FMT u UC, byl výběr dárců pomocí sekvenování 16S rRNA a zaměření na levostrannou UC. Předchozí studie uváděly, že FMT s použitím materiálu od dárců s vysokou diverzitou mikrobiomu byla spojena s lepšími klinickými výsledky při léčbě UC [32]. Screening dárců za účelem výběru dárců s nejvyšší diverzitou mikrobiomu by mohl zlepšit účinnost FMT, toto tvrzení je však třeba ověřit v budoucích studiích.

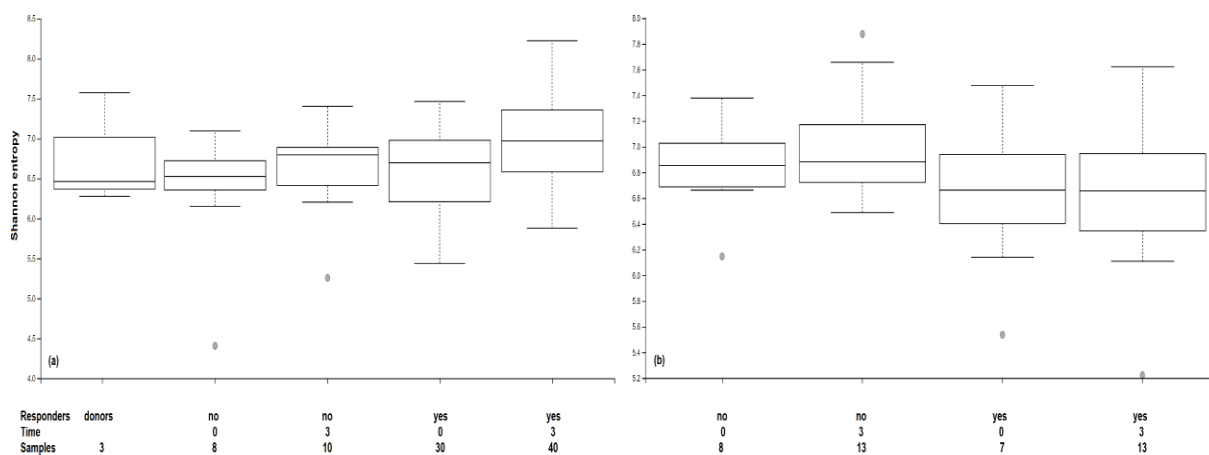
Předchozí studie účinnosti FMT při léčbě UC nezohledňovaly rozsah UC. Zařazením pacientů s pankolitidou, levostrannou kolitidou a proktitidou mohlo dojít k přehlédnutí topického účinku FMT. Moayyedi a kol. charakterizovali UC jako onemocnění, které vzniká v rektu, přičemž rektum je místem největší dysbiózy [66]. Pankolitida při infekci *Clostridoides difficile* byla účinně léčena retenčními klyzmaty FMT [67], ale UC je charakterizována komplexní interakcí genetiky, mikrobiomu a prostředí, což může vést ke zvýšené rezistenci vůči terapeutickému účinku FMT u rozsáhlého onemocnění [68]. Proto jsme předpokládali, že zaměření na levostrannou UC by mohlo vést k lepší účinnosti léčby. K zhodnocení tohoto předpokladu budou zapotřebí další studie srovnávající účinnost FMT u různých rozsahů onemocnění.

Cílem naší studie bylo ověřit non-inferioritu FMT oproti klyzmatu 5-ASA při léčbě UC. Bylo již prokázáno, že FMT je v léčbě UC lepší než placebo [32, 51, 54]. To byl důležitý krok k dosažení jejího klinického uplatnění, ale i studie srovnávající FMT se standardními léčebnými postupy jsou důležité. Protože studie superiority by vyžadovala počet pacientů přesahující

možnosti našich čtyř center, rozhodli jsme se pro design non-inferiority. Důkaz o non-inferioritě umožňuje aplikovat alternativní léčbu s některými potenciálně prospěšnými vlastnostmi odlišnými od standardní léčby. Naše studie usnadní další výzkum superiority, protože budoucí pacienti nebudou vystaveni riziku, že obdrží neefektivní léčbu.

Recentně bylo uvedeno, že diverzita a složení mikrobiomu ve vzorcích sliznic pacientů s UC byly po léčbě 5-ASA změněny [69]. V naší studii byl Shannonův index diverzity fekální mikrobioty u pacientů s UC před léčbou FMT a u non-respondérů nižší než u zdravých dárců. U pacientů, kteří reagovali na FMT, se index diverzity zvýšil a složení mikrobioty se změnilo tak, že se podobalo složení pozorovanému u zdravého dárce (**obr. 2**).

**Obr. 2** - Mikrobiální diverzita vyjádřená jako Shannonův entropický index u respondérů a non-respondérů léčby pro (a) skupinu 5-ASA a (b) skupinu s FMT. Vzorky jsou seskupeny na základě odpovědi na léčbu (ano/ne) a časového bodu odběru vzorku 0 (před léčbou) a 3 (týdny 1-12), symbol kruhu představuje odlehlé hodnoty.

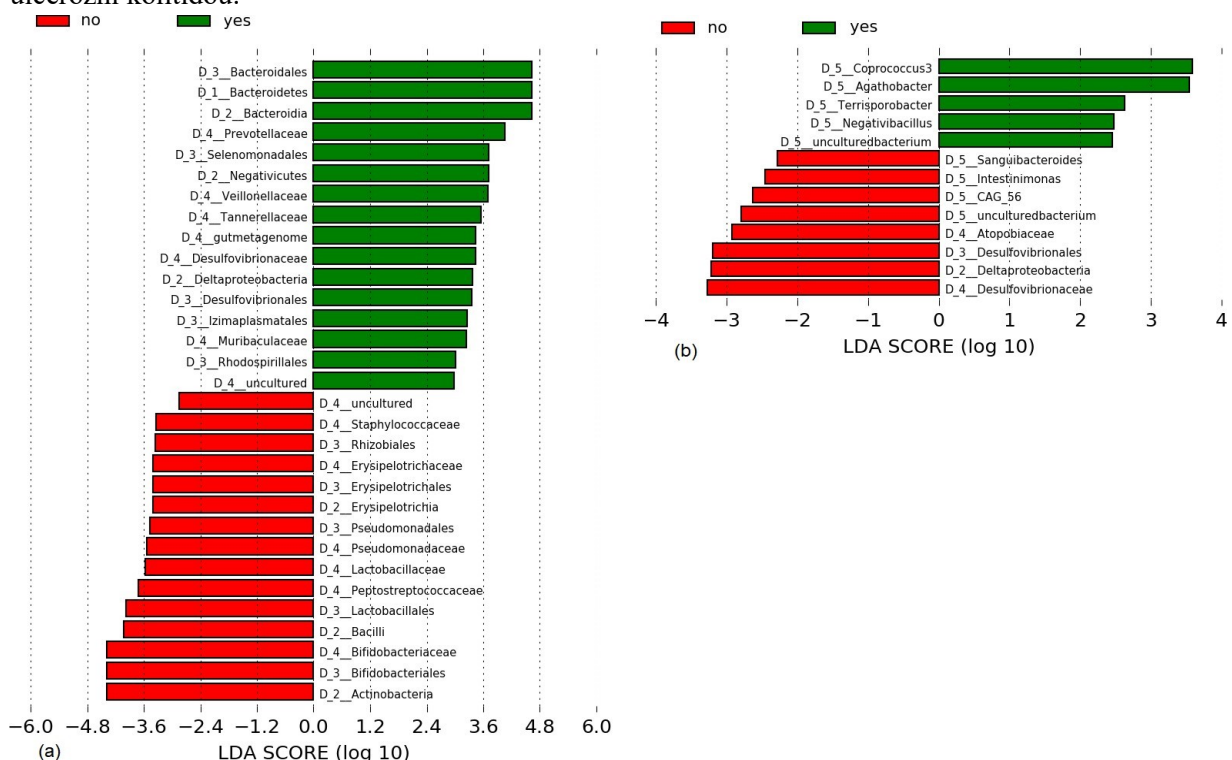


Podobnými výsledky se zabývali Khanna a kol. v přehledovém článku publikovaném v roce 2017 [70]. V této studii se relativní početnost *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* postupně zvyšovala a četnost *Bacteroidaceae* se postupně snižovala, až se přiblížila četnosti u zdravých dárců. U pacientů bez odpovědi byl zaznamenán opak. Nárůst čeledi *Lachnospiraceae* byl pozorován i v naší předchozí studii [71]. Na úrovni rodů se po léčbě FMT zvýšil počet *Blautia* a *Fecalibacterium* a snížil počet *Bacteroides*, ale jejich abundance zůstala odlišná od abundance u zdravých dárců. V souladu s naším zjištěním byl u pacientů s mírnou až středně aktivní UC zaznamenán významný nárůst *F. prausnitzii* po FMT [72]. Podobně jako v našem případě byla ve studii FMT u pacientů s infekcí *Clostridoides difficile* zjištěna významně zvýšená relativní abundance *Faecalibacterium* u pacientů s IBD a zvýšená

abundance *Blautia* u pacientů bez IBD. Po FMT byla u pacientů s IBD zvýšena abundance *Bacteroides* [70].

Ve studii FACTU lineární diskriminační analýza (LDA) ukázala, že po léčbě FMT existují rozdíly ve střevní mikrobiotě mezi pacienty s odpovědí a bez odpovědi (Obr 3). Sokol a kol. naznačili, že úspěšnost léčby FMT a kolonizace mikrobioty dárce mohou být ovlivněny výchozími charakteristikami příjemce [60]. U našich pacientů měly klyzmata FMT od všech čtyř dárců pozitivní účinky na mikrobiotu příjemců a zdraví hostitele navzdory rozdílům v bakteriálních profilech před léčbou. Léčba 5-ASA způsobila měsíc po léčbě nárůst fyly *Firmicutes* a *Actinobacteria* a pokles fyly *Proteobacteria*, což pozorovali také Olaisen a kol. v roce 2019 [73]. Průběžným sledováním však bylo zjištěno, že změny ve složení mikrobioty byly do 3 měsíců zvráceny, což naznačuje, že původní jádro sliznice bylo schopno obnovit své složení. U našich pacientů po FMT se po 3 měsících od léčby udržel nárůst *Firmicutes*, především čeledi *Lachnospiraceae*, a pokles *Bacteroidaceae* a *Enterobacteriaceae*. Přetrvávající posun mikrobioty směrem k dárcovskému složení je v souladu s předchozími studiemi, které testovaly dlouhodobou transplantaci fekální mikrobioty u pacientů s infekcí *Clostridoides difficile* [74] a u zdravých dobrovolníků [75]. Toto je však první studie, která uvádí tento přínos FMT u pacientů s UC.

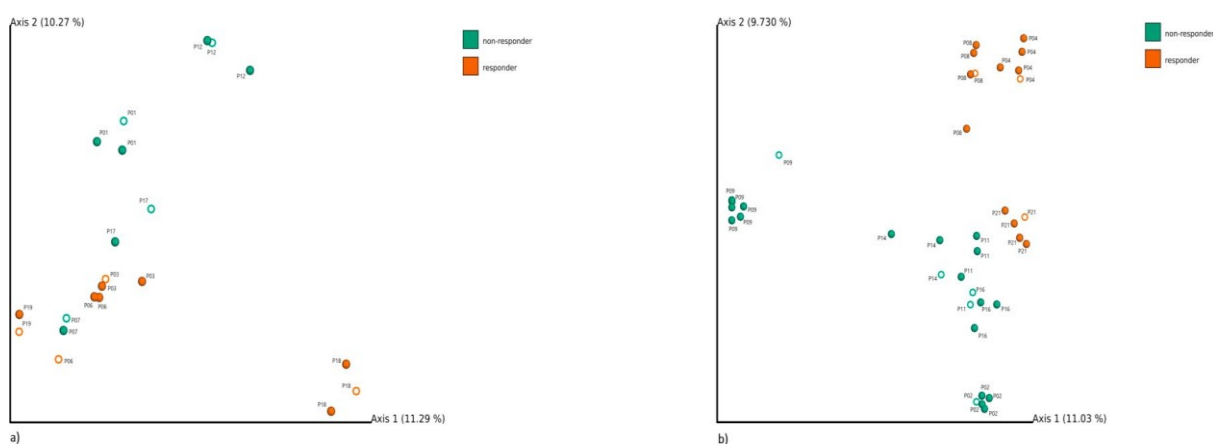
**Obr. 3** - Lineární diskriminační analýza (LDA) mikrobiálních taxonů reagujících (ano) a nereagujících (ne) na (a) transplantaci stolice a (b) léčbu 5-aminosalicylovou kyselinou u pacientů s levostrannou ulcerózní kolitidou.



**Publikace č. 2** se zaměřuje na hlubší analýzu změn mikrobioty po FMT v největším centru studie FACTU. Do této subanalýzy bylo zařazeno 16 pacientů s levostrannou UC trvající déle než 3 měsíce. Osm pacientů bylo léčeno FMT a 8 pacientů klyzmatem 5-ASA. Změny mikrobioty po léčbě 5-ASA byly dříve zjištěny ve sliznici a v menší míře také ve stolici [73]. Ve sliznici byla prokázána inverzní korelace závažnosti onemocnění u *F. prausnitzii*, producentů mastných kyselin s krátkým řetězcem. Vysoká koncentrace 5-ASA ve sliznici souvisela se sníženým výskytem patogenních bakterií, jako jsou *Proteobakterie*, a zvýšeným výskytem několika příznivých bakterií, jako jsou *Faecalibacterium*. Ve stolici se při zvýšení 5-ASA ve slizniční tkáni snížil počet *Prevotella* a *Sutterella* [73]. Předpokládá se, že *Sutterella* přispívá k patogenezi UC svou schopností degradovat slizniční imunoglobulin A (IgA) [76, 77].

Nezjistili jsme žádné významné rozdíly v alfa diverzitě bakterií mezi respondéry a non-respondéry léčby 5-ASA. Významné změny Jaccardovy vzdálenosti mezi těmito podskupinami však ukazují na určitý vliv mesalazinu u respondérů (**Obr. 4**).

**Obr. 4** – Jaccardovy vzdálenosti mezi reagujícími (oranžová) a nereagujícími (zelená) pro (a) skupinu 5-ASA (8 pacientů) a (b) skupinu FMT (8 pacientů). Vzorky odebrané před terapií jsou zobrazeny jako duté sféry (8 vzorků pro každou skupinu 5-ASA a FMT), vzorky odebrané po zahájení terapie jsou zobrazeny jako plné sféry (13 vzorků pro 5-ASA a 31 vzorků pro skupinu FMT); vzorky patřící jednomu pacientovi jsou popsány stejným číslem.



Zvýšená diverzita mikrobioty, kterou uvádí několik studií u pacientů s UC po FMT z mixované stolice od více dárců (2-7 dárců) [51, 54, 72, 78, 79], nebyla v naší subanalýze, při použití jednoho dárce pro všechny pacienty, zjištěna. Tyto výsledky jsou v souladu se studii Dammana a kol. [80] a Kumpa a kol. [81], kteří však popsali časové změny

ve vzorcích sliznice. Obě studie, používaly individuální dárcovství stolice, což znamená, že každý dárcem poskytl stolicí pro jednoho, maximálně dva příjemce. Tian a kol. [82] dokonce popsali nesignifikantní snížení Shannonova a Chaova indexu po FMT, ale přesto pozorovali pozitivní klinické výsledky a zlepšení symptomů u pacientů s UC. Stejní autoři nezjistili rozdíly v beta diverzitě, v naší studii však byly statisticky významné výsledky získány z párových analýz PERMANOVA. Jaccardovy vzdálenosti mezi vzorky odhalily oddělení respondérů a non-respondérů po léčbě FMT, je však třeba vzít v úvahu vysokou variabilitu vzorků v rámci skupiny analyzované v této práci (**Obr. 5**). Dále byla ve skupině FMT zjištěna vyšší podobnost respondérů s dárcem. Toto zjištění je ve shodě s několika studiemi [50, 79, 81, 83, 84], nicméně ne všechny uvádějí korelaci mezi bakteriálním posunem ke zdravému dárci a klinickým efektem [81].

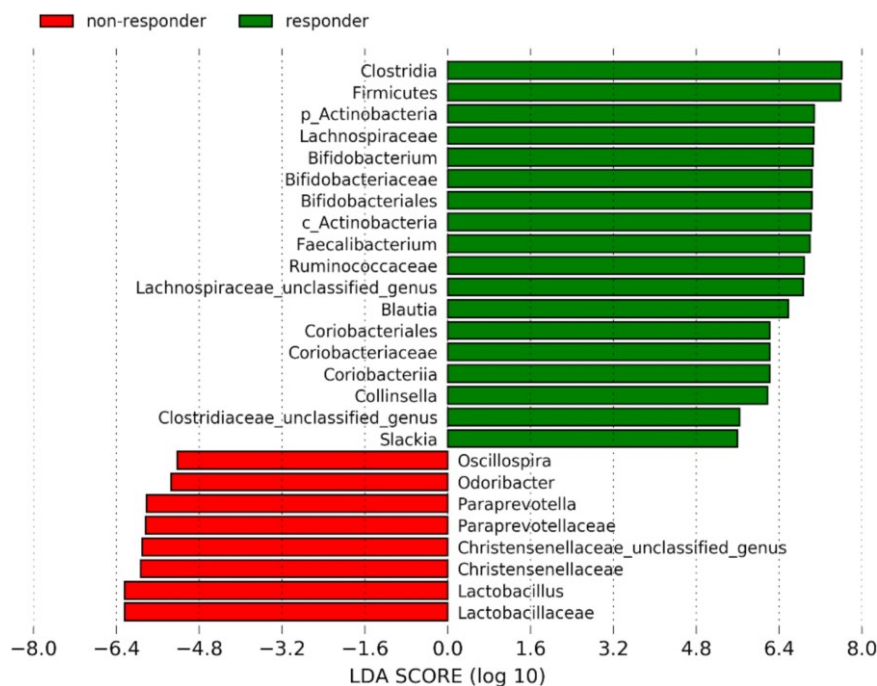
Účinnost FMT je zde dále podpořena nižším podílem původních rodů u respondentů a relativně vysokým podílem původních rodů u nereagujících. U nereagujících na FMT byl vysoký počet unikátních rodů, což naznačuje neúspěšnou obnovu narušené mikrobioty, neschopnost nahradit určitý podíl původních rodů a možnou rezistenci některých rodů vůči tomuto typu intervence. Z hlediska statistiky však mohly být tyto výsledky ovlivněny vyšším počtem nereagujících na FMT (pět subjektů) ve srovnání s respondenty (tři subjekty), což by mohlo zvýšit diverzitu v rámci podskupiny nereagujících. Shi a kol. zdůraznili, na základě 25 studií používajících léčbu FMT pro UC, že pacienti sdílející zvýšenou bakteriální podobnost s dárcem mohou mít různé klinické výsledky, a tudíž samotná přítomnost zdravé mikrobioty není dostatečná k dosažení pozitivního efektu FMT [83]. Naopak, podle Kumpa a kol., taxonomické složení střevní mikrobioty dárce je hlavním faktorem ovlivňujícím účinnost FMT u pacientů s UC [85].

Správné taxonomické složení zdravého mikrobiomu je stále neznámé z důvodů velké individuální variability v populaci. Výběr vhodného dárce pro FMT je proto složitý a dosud pro něj nemáme specifická kritéria. Některé bakterie v mikrobiotě dárce, jako *Akkermansia muciniphila*, butyrát-produkující *F. prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* a *Roseburia faecis*, *Butyrivibrio crossotus*, *Anaerobutyricum hallii*, a některé členy rodin *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae*, jsou považovány za příznivé pro léčbu UC [32, 36, 45, 85].

V našem výzkumu jsme identifikovali několik příznivých bakteriálních taxonů v mikrobiotě dárce FMT, včetně *F. prausnitzii* (3 %), členů rodiny *Ruminococcaceae* (20 %) a vysokého procenta bakterií z rodiny *Lachnospiraceae* (48 %) (**Obr. 5**). Dvě skupiny *Lachnospiraceae* byly identifikovány jako významně zvýšené u respondentů po FMT terapii, podobně jako v zjištěních Kumpa a kol. a Angelbergera a kol. [36, 81]. Mnoho členů

*Lachnospiraceae* bylo detekováno v lidském střevě z nichž některé vykazují důležité hydrolytické vlastnosti [86].

**Obr. 5** - LDA reagujících a nereagujících v skupině pacientů s FMT na různých taxonomických úrovních (kmen, třída, řád, čeleď, rod) pro všechny bodu vzorkování včetně výchozího stavu. Kmen *Actinobacteria* a třída jsou rozlišeny pomocí zkratk p a c.



FMT také významně zvýšilo u respondentů hojnost rodiny *Ruminococcaceae*, zejména dvou důležitých členů tohoto taxonu, *F. prausnitzii* a *Blautia*. Oba tyto rody jsou hojně přítomny v lidské střevní mikrobiotě zdravých dospělých, zatímco u jedinců s UC byly hlášeny snížené hladiny *F. prausnitzii* a *Blautia* [87, 88]. Pozitivní účinek těchto bakterií je přisuzován produkci butyrátu. Butyrát hraje důležitou roli ve fyziologii střev, s mnoha příznivými účinky na zdraví prostřednictvím protizánětlivých aktivit v kolonické sliznici, ochrany proti invazi patogenů, modulace imunitního systému a snižování progresu rakoviny [89]. *F. prausnitzii* byl dokonce navržen jako marker zdravého střeva [90].

Zvýšená přítomnost taxonů kmene *Firmicutes*, obvykle spojená se zdravým střevem, byla v našem výzkumu zjištěna u těch, kteří nereagovali. Rodina *Christensenellaceae*, součást řádu *Clostridiales*, je popisována pro své zdravotní přínosy, jako je asociace se zdravými stravovacími návyky, dlouhověkostí, nižší hladiny sérových lipidů a nižší index tělesné hmotnosti [91]. Na rozdíl od očekávání byly *Christensenellaceae* sniženy u pacientů s Crohnovou chorobou a UC, ale naše studie našla zvýšené množství u těch, kteří nereagovali

na FMT. *Oscillospira*, rod z rodiny *Ruminococcaceae*, je běžný ve střevě člověka a může mít zdravotní přínosy díky produkci butyrátu [92]. Jeho výskyt je snížen u pacientů s Crohnovou chorobou, ale informace u pacientů s UC chybí.

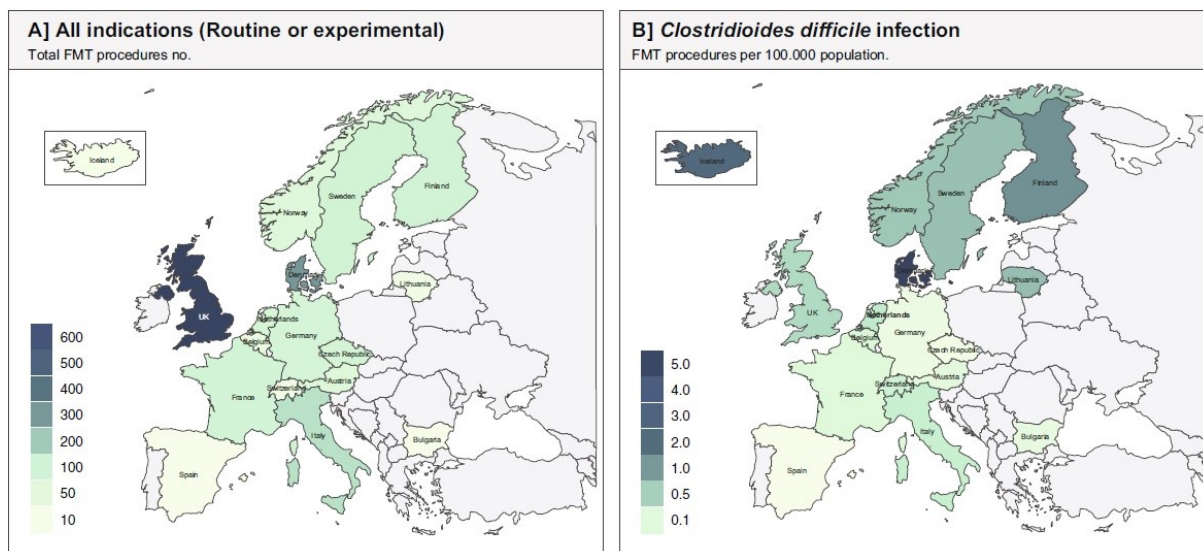
Role laktobacilů, které jsou pro své probiotické účinky obecně uznávány jako prospěšné pro lidské zdraví, není tak jednoznačně jasná u zánětlivých onemocnění střev. U IBD je *Lactobacillus* snížen u pacientů s UC, ale zvýšen u pacientů s Crohnovou chorobou [93].

U nonrespondérů FMT bylo zjištěno zvýšení rodů *Odoribacter* a *Paraprevotella* z kmene *Bacteroidetes*. *Odoribacter*, producent butyrátu, je důležitý pro zdravé střevo a byl spojen se zlepšeným stavem u pacientů s Crohnovou chorobou [94, 95]. Naopak, *Paraprevotella*, producent kyseliny jantarové, může být spojen s dysbiózou mikrobiomu a střevním zánětem [96]. Zatímco zvýšená přítomnost *Odoribacteru* může být prospěšná, role kyseliny jantarové ve střevním zánětu zůstává nejasná a vyžaduje další výzkum.

**Publikace č. 3** je průzkumem použití FMT v Evropě. Zabývá se klinickým využitím, prováděním a potenciálem FMT v Evropě. Studie je průřezovým průzkumem z roku 2020, který zval nemocniční centra FMT po celé Evropě, aby sdílela své klinické aktivity, organizaci a regulaci FMT v roce 2019. Zpráva uvádí, že v roce 2019 bylo v 31 centrech ve 17 zemích provedeno 1874 procedur FMT, převážně pro infekci *Clostridioides difficile* (**Obr. 6**). Studie zdůrazňuje vysoké bezpečnostní standardy a dodržování mezinárodních směrnic účastnickými centry. Z průzkumu vyplývá, že současná aktivita FMT pokrývá pouze asi 10 % pacientů s indikacemi pro podání FMT, což naznačuje potřebu zvýšit klinické povědomí a aktivitu FMT v Evropě. Práce vyzývá k desetinásobnému zvýšení aktivity FMT, aby byla splněna skutečná poptávka po léčbě, a zdůrazňuje význam standardizace a rozšiřování praxe FMT. Studie dále upozorňuje na rozdíly v přístupech a regulacích FMT mezi jednotlivými evropskými zeměmi. Tyto rozdíly mohou mít dopad na dostupnost a kvalitu FMT pro pacienty. Autoři zdůrazňují potřebu harmonizace regulací a postupů v celé Evropě, aby se zajistila lepší dostupnost a standardizace této terapie. Zvláště se zaměřují na potřebu větší spolupráce mezi zdravotnickými odborníky, regulačními orgány a patientskými skupinami. Věří, že tato spolupráce povede k lepšímu pochopení a využití FMT v léčbě různých onemocnění. Tato studie vedla k založení prospektivního celoevropského registru FMT „EurFMT“, který by měl v budoucnu pomoci v nalezení odpovědí na mnohé dosud nezodpovězené otázky, které s použitím FMT vyvstávají.



**Obr. 6** – Počet FMT v celé Evropě pro všechny indikace (A) a pro infekce *Clostridioides difficile* (B) upravený na 100 000 obyvatel.



**Publikace č. 4** je přehledová práce na téma FMT u IBD za použití dostupné literatury v roce 2016.

## ZÁVĚR

Tato disertační práce přináší komplexní pohled na využití fekální mikrobiální transplantace u idiopatických střevních zánětů, především ulcerózní kolitidy a Crohnovy choroby. Disertační práce splnila všechny vytyčené cíle doktorského studia.

Zatímco etiopatogeneze IBD zůstává neúplně pochopená, FMT se ukazuje jako slibný terapeutický přístup vzhledem k potenciálu modifikovat střevní mikrobiotu a ovlivnit tak průběh četných onemocnění. Výzkum ukázal, že FMT je vysoce účinná v léčbě rekurentní klostridiové kolitidy a nabízí nové možnosti pro léčbu UC. V případě Crohnovy choroby jsou data o účinnosti FMT méně konkrétní, ale naznačují možný pozitivní vliv. Naše data o účinnosti klyzmat FMT u levostranné UC doplňují již publikované mezinárodní studie a prokazují mírný až střední efekt FMT v této indikaci. Důležitým faktorem efektivity FMT je výběr vhodného dárce, diverzita jeho mikrobioty, metody aplikace a frekvence podávání FMT.

Přestože dosavadní výsledky ukazují na FMT jako na slibnou a bezpečnou metodu v léčbě onemocnění gastrointestinálního traktu, zůstává mnoho otázek nezodpovězených. Pro definitivní závěry o efektivitě FMT v jednotlivých indikacích, počtu nutných aplikací, dlouhodobé bezpečnosti a optimálním způsobu podání jsou nezbytné další rozsáhlé a dobře navržené studie. Významná je rovněž potřeba standardizace metodiky a postupů, která umožní přesnější hodnocení a srovnání výsledků mezi různými centry a studii.

Naše práce přináší důležité poznatky a otevírá cestu k dalšímu výzkumu v této dynamicky se rozvíjející oblasti medicíny, s potenciálem významně ovlivnit léčbu IBD a dalších onemocnění spojených se střevním mikrobiomem.

## LITERÁRNÍ REFERENCE

1. Frank, D.N. and N.R. Pace, *Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008. **24**(1): p. 4-10.
2. *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. *Nature*, 2012. **486**(7402): p. 207-14.
3. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. *Nature*, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
4. Sartor, R.B., *Microbial influences in inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(2): p. 577-94.
5. Kriss, M., et al., *Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery*. *Curr Opin Microbiol*, 2018. **44**: p. 34-40.
6. Berg, G., et al., *Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges*. *Microbiome*, 2020. **8**(1): p. 103.
7. Sugihara, K. and N. Kamada, *Diet-Microbiota Interactions in Inflammatory Bowel Disease*. *Nutrients*, 2021. **13**(5).
8. Furusawa, Y., et al., *Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells*. *Nature*, 2013. **504**(7480): p. 446-50.
9. Nishida, A., et al., *Can control of gut microbiota be a future therapeutic option for inflammatory bowel disease?* *World J Gastroenterol*, 2021. **27**(23): p. 3317-3326.
10. Kim, C.H., *Control of lymphocyte functions by gut microbiota-derived short-chain fatty acids*. *Cell Mol Immunol*, 2021. **18**(5): p. 1161-1171.
11. Li, H., J. He, and W. Jia, *The influence of gut microbiota on drug metabolism and toxicity*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2016. **12**(1): p. 31-40.
12. Dzutsev, A., et al., *The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(1): p. 17-31.
13. Foley, M.H., et al., *Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and host-microbiome crosstalk in the gastrointestinal tract*. *PLoS Pathog*, 2019. **15**(3): p. e1007581.
14. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(7): p. 688-93.
15. Ooijevaar, R.E., et al., *Clinical Application and Potential of Fecal Microbiota Transplantation*. *Annu Rev Med*, 2019. **70**: p. 335-351.
16. 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.
17. Smits, L.P., et al., *Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(5): p. 946-53.
18. de Groot, P.F., et al., *Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future*. *Gut Microbes*, 2017. **8**(3): p. 253-267.
19. Eiseman, B., et al., *Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis*. *Surgery*, 1958. **44**(5): p. 854-9.
20. van Nood, E., et al., *Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile**. *N Engl J Med*, 2013. **368**(5): p. 407-15.
21. Cammarota, G., et al., *European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice*. *Gut*, 2017. **66**(4): p. 569-580.

22. Eckburg, P.B. and D.A. Relman, *The role of microbes in Crohn's disease*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(2): p. 256-62.
23. Kostic, A.D., R.J. Xavier, and D. Gevers, *The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead*. Gastroenterology, 2014. **146**(6): p. 1489-99.
24. Ogura, Y., et al., *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
25. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
26. Philpott, D.J. and S.E. Girardin, *Crohn's disease-associated Nod2 mutants reduce IL10 transcription*. Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 455-7.
27. Deleu, S., et al., *Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD?* EBioMedicine, 2021. **66**: p. 103293.
28. He, X., S. Zhao, and Y. Li, *<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>: A Next-Generation Probiotic in Gut Disease Improvement*. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2021. **2021**: p. 6666114.
29. Zain, N.M.M., et al., *Design and manufacture of a lyophilised faecal microbiota capsule formulation to GMP standards*. J Control Release, 2022. **350**: p. 324-331.
30. Gough, E., H. Shaikh, and A.R. Manges, *Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent Clostridium difficile infection*. Clin Infect Dis, 2011. **53**(10): p. 994-1002.
31. Hamilton, M.J., et al., *Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent Clostridium difficile infection*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(5): p. 761-7.
32. Moayyedi, P., et al., *Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial*. Gastroenterology, 2015. **149**(1): p. 102-109 e6.
33. Postigo, R. and J.H. Kim, *Colonoscopic versus nasogastric fecal transplantation for the treatment of Clostridium difficile infection: a review and pooled analysis*. Infection, 2012. **40**(6): p. 643-8.
34. Persky, S.E. and L.J. Brandt, *Treatment of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(11): p. 3283-5.
35. Urbonas, T., et al., *Fecal Microbiome Transplantation for Recurrent Clostridioides difficile Infection: Treatment Efficacy, Short and Long-term Follow-up Results from Consecutive Case Series*. J Gastrointestin Liver Dis, 2021. **30**(4): p. 470-476.
36. Angelberger, S., et al., *Temporal bacterial community dynamics vary among ulcerative colitis patients after fecal microbiota transplantation*. Am J Gastroenterol, 2013. **108**(10): p. 1620-30.
37. Youngster, I., et al., *Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing Clostridium difficile infection*. JAMA, 2014. **312**(17): p. 1772-8.
38. Schwartz, M., M. Gluck, and S. Koon, *Norovirus gastroenteritis after fecal microbiota transplantation for treatment of Clostridium difficile infection despite asymptomatic donors and lack of sick contacts*. Am J Gastroenterol, 2013. **108**(8): p. 1367.
39. Brandt, L.J., et al., *Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(7): p. 1079-87.
40. Nagalingam, N.A. and S.V. Lynch, *Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(5): p. 968-84.

41. DuPont, A.W. and H.L. DuPont, *The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(9): p. 523-31.
42. Vernia, P., et al., *Combined oral sodium butyrate and mesalazine treatment compared to oral mesalazine alone in ulcerative colitis: randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study*. Dig Dis Sci, 2000. **45**(5): p. 976-81.
43. Hamer, H.M., et al., *Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission*. Clin Nutr, 2010. **29**(6): p. 738-44.
44. Lix, L.M., et al., *Longitudinal study of quality of life and psychological functioning for active, fluctuating, and inactive disease patterns in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(11): p. 1575-84.
45. Fuentes, S., et al., *Microbial shifts and signatures of long-term remission in ulcerative colitis after faecal microbiota transplantation*. The ISME Journal, 2017. **11**(8): p. 1877-1889.
46. Bennet, J.D. and M. Brinkman, *Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora*. Lancet, 1989. **1**(8630): p. 164.
47. Anderson, J.L., R.J. Edney, and K. Whelan, *Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2012. **36**(6): p. 503-16.
48. Rossen, N.G., et al., *Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(17): p. 5359-71.
49. Vermeire, S., et al., *Donor Species Richness Determines Faecal Microbiota Transplantation Success in Inflammatory Bowel Disease*. J Crohns Colitis, 2016. **10**(4): p. 387-94.
50. Rossen, N.G., et al., *Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis*. Gastroenterology, 2015. **149**(1): p. 110-118 e4.
51. Paramsothy, S., et al., *Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2017. **389**(10075): p. 1218-1228.
52. Wilson, B.C., et al., *The Super-Donor Phenomenon in Fecal Microbiota Transplantation*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 2.
53. Paramsothy, S., et al., *Faecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis*. J Crohns Colitis, 2017. **11**(10): p. 1180-1199.
54. 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.
55. Sood, A., et al., *Role of Faecal Microbiota Transplantation for Maintenance of Remission in Patients With Ulcerative Colitis: A Pilot Study*. J Crohns Colitis, 2019. **13**(10): p. 1311-1317.
56. Feng, J., et al., *Efficacy and safety of fecal microbiota transplantation in the treatment of ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 14494.

57. Yang, Z., et al., *Fecal Microbiota Transplant via Endoscopic Delivering Through Small Intestine and Colon: No Difference for Crohn's Disease*. *Dig Dis Sci*, 2020. **65**(1): p. 150-157.
58. Kump, P. and C. Högenauer, *Any Future for Fecal Microbiota Transplantation as Treatment Strategy for Inflammatory Bowel Diseases?* *Digestive Diseases*, 2016. **34**(Suppl. 1): p. 74-81.
59. Cui, B., et al., *Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn's disease: Safety, feasibility, and efficacy trial results*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2015. **30**(1): p. 51-58.
60. Sokol, H., et al., *Fecal microbiota transplantation to maintain remission in Crohn's disease: a pilot randomized controlled study*. *Microbiome*, 2020. **8**(1): p. 12.
61. Cheng, F., et al., *Fecal microbiota transplantation for Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis*. *Techniques in Coloproctology*, 2021. **25**(5): p. 495-504.
62. Cold, F., et al., *Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Chronic Pouchitis: A Systematic Review*. *Microorganisms*, 2020. **8**(9): p. 1433.
63. Selvig, D., et al., *Fecal Microbiota Transplantation in Pouchitis: Clinical, Endoscopic, Histologic, and Microbiota Results from a Pilot Study*. *Digestive Diseases and Sciences*, 2020. **65**(4): p. 1099-1106.
64. Kousgaard, S.J., et al., *Clinical results and microbiota changes after faecal microbiota transplantation for chronic pouchitis: a pilot study*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2020. **55**(4): p. 421-429.
65. Herfarth, H., et al., *Combined Endoscopic and Oral Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Antibiotic-Dependent Pouchitis: Low Clinical Efficacy due to Low Donor Microbial Engraftment*. *Inflamm Intest Dis*, 2019. **4**(1): p. 1-6.
66. Rajilić-Stojanović, M., et al., *Phylogenetic Analysis of Dysbiosis in Ulcerative Colitis During Remission*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2013. **19**(3): p. 481-488.
67. Kassam, Z., et al., *Fecal Transplant via Retention Enema for Refractory or Recurrent Clostridium difficile Infection*. *Archives of Internal Medicine*, 2012. **172**(2): p. 191-193.
68. Shen, Z.H., et al., *Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation*. *World J Gastroenterol*, 2018. **24**(1): p. 5-14.
69. Xu, J., et al., *5-Aminosalicylic Acid Alters the Gut Bacterial Microbiota in Patients With Ulcerative Colitis*. *Frontiers in Microbiology*, 2018. **9**.
70. Khanna, S. and L.E. Raffals, *The Microbiome in Crohn's Disease: Role in Pathogenesis and Role of Microbiome Replacement Therapies*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2017. **46**(3): p. 481-492.
71. Schierová, D., et al., *Gut Microbiome Changes in Patients with Active Left-Sided Ulcerative Colitis after Fecal Microbiome Transplantation and Topical 5-aminosalicylic Acid Therapy*. *Cells*, 2020. **9**(10): p. 2283.
72. Chen, H.T., et al., *Fecal microbiota transplantation ameliorates active ulcerative colitis*. *Exp Ther Med*, 2020. **19**(4): p. 2650-2660.
73. Olaisen, M., et al., *Mucosal 5-aminosalicylic acid concentration, drug formulation and mucosal microbiome in patients with quiescent ulcerative colitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019. **49**(10): p. 1301-1313.
74. Jalanka, J., et al., *The long-term effects of faecal microbiota transplantation for gastrointestinal symptoms and general health in patients with recurrent Clostridium difficile infection*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018. **47**(3): p. 371-379.

75. Goloshchapov, O.V., et al., *Long-term impact of fecal transplantation in healthy volunteers*. BMC Microbiol, 2019. **19**(1): p. 312.
76. Moon, C., et al., *Vertically transmitted faecal IgA levels determine extra-chromosomal phenotypic variation*. Nature, 2015. **521**(7550): p. 90-93.
77. Kaakoush, N.O., *Sutterella Species, IgA-degrading Bacteria in Ulcerative Colitis*. Trends Microbiol, 2020. **28**(7): p. 519-522.
78. Jacob, V., et al., *Single Delivery of High-Diversity Fecal Microbiota Preparation by Colonoscopy Is Safe and Effective in Increasing Microbial Diversity in Active Ulcerative Colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2017. **23**(6): p. 903-911.
79. Cui, B., et al., *Step-up fecal microbiota transplantation strategy: a pilot study for steroid-dependent ulcerative colitis*. Journal of Translational Medicine, 2015. **13**(1): p. 298.
80. Damman, C.J., et al., *Low Level Engraftment and Improvement following a Single Colonoscopic Administration of Fecal Microbiota to Patients with Ulcerative Colitis*. PLOS ONE, 2015. **10**(8): p. e0133925.
81. Kump, P.K., et al., *Alteration of Intestinal Dysbiosis by Fecal Microbiota Transplantation Does not Induce Remission in Patients with Chronic Active Ulcerative Colitis*. Inflammatory Bowel Diseases, 2013. **19**(10): p. 2155-2165.
82. Tian, Y., et al., *Fecal microbiota transplantation for ulcerative colitis: a prospective clinical study*. BMC Gastroenterol, 2019. **19**(1): p. 116.
83. Shi, Y., et al., *Fecal Microbiota Transplantation for Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLOS ONE, 2016. **11**(6): p. e0157259.
84. Doherty, M.K., et al., *Fecal Microbiota Signatures Are Associated with Response to Ustekinumab Therapy among Crohn's Disease Patients*. mBio, 2018. **9**(2).
85. Kump, P., et al., *The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2018. **47**(1): p. 67-77.
86. Odamaki, T., et al., *Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study*. BMC Microbiology, 2016. **16**(1): p. 90.
87. Hold, G.L., et al., *Oligonucleotide Probes That Detect Quantitatively Significant Groups of Butyrate-Producing Bacteria in Human Feces*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(7): p. 4320-4324.
88. Chen, G.L., et al., *Partners of patients with ulcerative colitis exhibit a biologically relevant dysbiosis in fecal microbial metacommunities*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(25): p. 4624-4631.
89. Plöger, S., et al., *Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1258**(1): p. 52-59.
90. Björkqvist, O., et al., *Alterations in the relative abundance of Faecalibacterium prausnitzii correlate with changes in fecal calprotectin in patients with ileal Crohn's disease: a longitudinal study*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2019. **54**(5): p. 577-585.
91. Waters, J.L. and R.E. Ley, *The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health*. BMC Biol, 2019. **17**(1): p. 83.
92. Gophna, U., T. Konikoff, and H.B. Nielsen, *Oscillospira and related bacteria – From metagenomic species to metabolic features*. Environmental Microbiology, 2017. **19**(3): p. 835-841.

93. Heeney, D.D., M.G. Gareau, and M.L. Marco, *Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride?* Current Opinion in Biotechnology, 2018. **49**: p. 140-147.
94. Morgan, X.C., et al., *Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment.* Genome Biology, 2012. **13**(9): p. R79.
95. Wang, Y., et al., *Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy.* Journal of Crohn's and Colitis, 2017. **12**(3): p. 337-346.
96. Connors, J., N. Dawe, and J. Van Limbergen, *The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation.* Nutrients, 2019. **11**(1): p. 25.