
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

EFICACITATEA TRANSPLANTULUI FECAL ÎN INFECȚIA CU CLOSTRIDIUM DIFFICILE RECURENTĂ

Doctorand **Maricoiu Mihaela Ramona (căs. Laszlo)**

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

CLUJ NAPOCA 2018



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
3STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Microbiota	17
1.1. Definiții de bază și dezvoltarea microbiotei	17
1.2. Funcțiile microbiotei normale	18
1.3. Modificări ale compoziției bacteriene de-a lungul tractului gastro-intestinal	18
1.3.1. Esofag, stomac și intestin subțire	18
1.3.2. Intestinul gros	19
1.4. Microbiota și metabolismul	19
1.5. Microbiomul GI în contextul dezvoltării și îmbătrânirii	20
1.6. Tulburări asociate cu alterarea microbiotei	21
1.6.1 Obezitatea și diabetul zaharat tip 2	21
1.6.2. Sindromul colonului iritabil	21
1.6.3 Bolile inflamatorii intestinale	22
1.6.4. Cancerul colorectal CCR	23
1.6.5. Bolile alergice	23
1.6.6. Boli neuropsihice	24
2. Infecția cu Clostridium Difficile	25
2.1. Definiție, istoric, epidemiologie, etiopatogeneza	25
2.1.1. Istoric	25
2.1.2. Epidemiologie	26
2.1.3 Etiopatogeneza	26
2.2. Tablou clinic	27
2.3. Diagnostic paraclinic	28
2.4. Tratament	30
2.4.1. Boala recurenta	32
2.4.2. Terapii alternative	35
3. Transplantul de microbiota fecala	35

3.1. Definiție, istoric	35
3.2. Metodologie FMT	36
3.2.1. Selecția donatorilor	36
3.2.2. Prepararea materialelor fecale	37
3.2.3. Mod de livrare	38
3.2.4. Evenimente adverse	38
83.3. Aplicarea FMT în bolile gastrointestinale	38
3.3.1. Infecția cu Clostridium Difficile	39
3.3.2. Boala inflamatorie intestinală	40
3.3.3. Obezitatea și sindromul metabolic	40
3.3.4. Bolile gastrointestinale funcționale	41
3.4. Concluzii	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală (eventual)	47
3. Studiul 1 - Transplantul fecal în infecțiile recidivante cu Clostridium difficile	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	54
3.5. Discuții	61
3.6. Concluzii	63
4. Studiul 2 - Indicațiile transplantului fecal în colita ulcerativă	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
4.3. Material și metodă	67
4.4. Rezultate	69
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	77

5. Studiul 3 - Evaluarea viabilității probioticelor cu Lactobacillus plantarum ATCC 8014 după trecerea prin sistemul gastrointestinal. Studiu pilot pe subiecți umani	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	80
5.3. Material și metodă	80
5.4. Rezultate	84
5.5. Discuții	86
5.6. Concluzii	87
6. Concluzii generale (sinteză)	89
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	91
REFERINȚE	93

Cuvinte cheie: Clostridium Difficile, transplant fecal, recidiva, colita ulcerativa, bautură probiotică

INTRODUCERE

Teza de față și-a propus să demonstreze eficiența transplantului de materii fecale în infecția recidivantă cu *Clostridium Difficile*. Ca și scopuri secundare s-a încercat să se dovedească eficiența microbiotei și a transplantului fecal în cadrul bolilor inflamatorii intestinale, și în special în colita ulcerativă, precum și efectul unei băuturi probiotice cu *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 asupra compoziției florei fecale pe subiecți umani.

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

Ratele în creștere de infectare cu *Clostridium difficile*, cu o mortalitate în creștere de până la 20 000 cazuri pe an, tratamentele cu antibiotice, puține la număr, foarte costisitoare, cum sunt Vancomicina și Fidaxomicina, al căror cost ridicat în obținerea acestor terapii este dificilă pentru mulți pacienți și o povară economică semnificativă pentru sistemul de sănătate, recidiva bolii care apare la 20% din pacienții care au urmat terapia inițială m-au făcut să mă aplec asupra acestei metode de tratament alternativ cu rate de succes constante și mai mari de 90% dintre cazurile de pacienți cu recidiva de infecție cu *Clostridium difficile*, care au fost tratați prin transplant de materii fecale (FMT).

Principalul obiectiv al acestui studiu a fost de a prezenta un rezumat al acestei opțiuni terapeutice pentru punerea frecventă în aplicare și acceptarea acestui tratament eficient.

Al doilea obiectiv al studiului a fost să evaluăm eficiența în timp a transplantului de materii fecale precum și, dacă există o concordanță între durata eficienței și gradul de rudenie al donatorului.

Studiul a fost efectuat într-un singur centru. A fost un studiu prospectiv, în care au fost incluși 30 de pacienți, cu infecții recidivante cu *Clostridium Difficile*, în perioada 2013-2015.

Indicațiile pentru efectuarea transplantului de materii fecale au fost:

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

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

Datele categorice au fost descrise ca numere și procente. Datele distribuite în mod normal au fost prezentate ca medii și deviații standard (SD) în timp ce datele care nu au urmat distribuției normale au fost prezentate ca medii și intervale de interquartile (IQR) și interval. Au fost utilizate intervale de încredere de 95%.

Durata infecției cu CDI până la FMT a variat între 4 și 8 luni. Acesta s-a efectuat după semnarea consimțământului informat care a inclus discutarea colonoscopiei standard, riscurile

legate de sedare, sângerare, și perforare, riscuri de infecție și cele alergice. Au fost discutate și documentate reacțiile legate de FMT.

Numărul maxim de recidive a fost 4 și a fost semnalat la 2 pacienți (6,67%) iar numărul minim a fost 1 și a fost semnalat la 10 pacienți (33,33%).

Donatorii potențiali de scaun au fost identificați de către subiecți, în general, un partener intim sau rudă de gradul I.

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

53,33% dintre donatori au fost rude de gradul I, 13,33% rude de gradul II. O proporție importantă de pacienți au prezentat colonoscopie normală, 56,67%, fără prezența pseudomembranelor. Pseudomembranele au fost prezente în proporție de 20% iar ulcerările în proporție de 23,33%.

Evoluția post FMT la toți pacienții a fost favorabilă, obținându-se semnificație statistică în ceea ce privește media numărului de scaune la 7 zile/6 luni/1 an (s-a obținut, $p = 0.017$, *testul Friedman*). De asemenea s-a testat asocierea între donator și Recidivă și s-a obținut $p=0.43$ (testul Fisher exact), observându-se ca ambele recidive au fost la rudele de gradul I și II, neintalnindu-se la pacienții la care donatorii au fost soția sau soțul, adică cei care conviețuiesc în același mediu.

Studiu 2. Indicațiile transplantului fecal în colita ulcerativă

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

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

Principalul obiectiv al acestui studiu a fost de a prezenta un rezumat al acestei opțiuni terapeutice pentru punerea frecventă în aplicare și acceptarea acestui tratament eficient.

În cadrul studiului de față, am utilizat transplantul de microbiota fecală la pacienții cu colita ulcerativă pentru a vedea dacă modificarea florei bacteriene colonice are sau nu efecte, dacă poate induce remisiunea, tipul remisiunii rezultate și durata acesteia.

Indicațiile pentru efectuarea transplantului de materii fecale a fost:

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

Au fost evaluate:

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

b) remisiunea biologică (VSH, leucocite, PCR, hematologica)

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

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

Donatorii potențiali de scaun au fost identificați de către subiecți, în general, un partener intim sau rudă de gradul I.

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

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

Toți participanții au prezentat colita ulcerativă cu scor Mayo endoscopic 2 sau 3, și erau sub terapie cu 5 ASA, imunosupresoare sau terapie biologică. Din toatul pacienților, 30 % au fost sub terapie cu 5 ASA, 60% sub terapie cu 5 ASA și terapie biologică iar 10 % sub terapie cu 5 ASA și terapie imunosupresoare (Imuran).

După transplantul de materii fecale, pe perioada de urmărire de 1 an, s-a observat creșterea procentului de pacienți cu 5 ASA (80%), scăderea procentului de pacienți cu terapie biologică (10%) precum și pacienții cu 5 ASA și terapie imunosupresoare (10%). Pacienții care au recăzut la 6 luni au fost sub terapie cu 5 ASA pe perioada urmăririi după transplantul fecal iar pacientul care nu a răspuns la transplant a fost de la început sub 5 ASA și Adalimumab, iar după transplant s-a efectuat switch pe alta terapie biologică.

La 2 pacienți s-a constata prezența anticorpilor anti-infliximab (anticorpi pozitivi iar nivelul de Infliximab la pacientul 3 =4,49ug/ml, pacientul 4 =0,24ug/ml) iar la un pacient nivelul Infliximabului era foarte scăzut și după micșorarea intervalului de administrare și după dublarea dozei. La un pacient justificarea efectuării FMT a fost determinată de puseele repetate și rezerva lui față de tratamentul biologic și imunodepresiv.

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

Interpretări concludente cu privire la eficacitatea și siguranța FMT nu sunt posibile din cauza numărului mic de pacienți, în acest studiu. Cu toate acestea, combinația de rezultate clinice cu analiza microbiomului reprezintă o abordare nouă, care va informa studiile viitoare mai mari.

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

Lactobacillus plantarum a fost testat pentru a evidenția rolul lui în afecțiunile gastrointestinale. Aceasta bacterie este capabilă de a suprima creșterea bacteriilor producătoare de gaze în intestine și poate avea un beneficiu la unii pacienți care suferă de diaree acută virală sau infecțioasă, intestin iritabil sau boli inflamatorii intestinale.

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 a fost studiat doar în studii experimentale. Astfel scopul acestui studiu a fost de a evalua viabilitatea unui băuturi probiotice cu *L. plantarum* ATCC 8014 la trecerea prin sistemul gastrointestinal și concentrația bacteriană fecală la voluntari sănătoși imediat după consumul băuturii probiotice. Obiectivele secundare au constat în evaluarea complianței la băutura a subiecților dar și evaluarea asupra frecvenței și consistenței scaunului. Am putea extrapola ca o concentrația crescută de *Lactobacillus Plantarum* regăsită în fecale după consum ar putea modula flora bacteriană gastrointestinală cu efecte benefice asupra subiecților umani, iar asocierea a mai multor tulpini ar duce beneficii la pacienții cu IBS cu diaree.

Studiul a fost efectuat într-un singur centru. A fost un studiu prospectiv, în care au fost incluși 10 subiecți sănătoși, în perioada 2015-2016.

Durata totală a studiului a fost de 21 zile :

- perioada de prescreening de 7 zile cu semnare consimțământ, completarea chestionarului de apreciere a tranzitului intestinal conform scalei Bristol, aplicare criteriilor de includere și excludere
- perioada de studiu propriu-zis de 5-7 zile: perioada de pre-administrare (1-2 zile) în care s-au colectat probe de scaun, perioada de administrare a băuturii probiotice (3 zile) și perioada post-administrare (1-2 zile) în care s-au colectat probe de scaun. În perioada de administrare, participanții au consumat zilnic odată/zi dimineața pe stomac gol, 100 ml de băutura rece păstrată în frigider la 5 grade Celsius.
- perioada de urmărire de 7 zile în care s-a completat chestionarul de complianță, chestionarul de apreciere a tranzitului intestinal conform scalei Bristol și s-au aplicat criteriile de excludere.

La toți subiecții au fost decelate colonii de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 înainte de consum. Media numărului de colonii înainte de consum a fost de 3.02×10^5 . S-a observat o creștere semnificativă a concentrației de *Lactobacillus Plantarum* imediat după consum, la toți subiecții până $9,57 \times 10^7$. Media de colonii a crescut cu 6,55% , față de procentul inițial, cu semnificație statistică ($P < 0,05$).

S-au găsit modificări importante în ceea ce privește consistența și frecvența scaunelor. La jumătate din subiecți consistența scaunului a crescut iar frecvența a scăzut.

CONCLUZII GENERALE

1. Rezultatele obținute constituie o dovadă a eficienței utilizării transplantului de fecale în infecția recidivantă cu *Clostridium Difficile* și reprezintă un argument pentru necesitatea unor cercetări viitoare.
2. Transplantul de materii fecale prezintă o rată mare de vindecare a infecției cu *Clostridium Difficile*.
3. Numărul relativ mic de bolnavi luați în studiu derivă din durata scurtă a studiului, respectiv din faptul ca bolnavii, dar probabil și unii medici sunt încă rezervați față de aceasta metodă de tratament.
4. Transplantul de materii fecale pentru infecțiile recidivante cu *Clostridium Difficile* este o metodă eficientă, sigură și cu rezultate durabile pentru pacienții care nu răspund la terapia tradițională.
5. Aceste rezultate pot constitui un moment de sensibilizare a noastră și a bolnavilor la această metodă de tratament. Studiile noastre privind utilizarea transplantului de fecale în infecția cu *Clostridium Difficile* și în bolile inflamatorii intestinale (colita ulcerativă) reprezintă o prioritate în România.
6. Există o concordanță între eficiența transplantului și gradul de rudenie al donatorilor. La pacienții cu infecție recurentă cu *Clostridium difficile* s-a observat recidiva posttransplant în cazul donatorilor de grad I și II, în schimb în cadrul partenerilor intimi nu s-a decelat nici o recidivă. În cazul colitei ulcerative nu s-a observat nici o relație între donator și recidivă.
7. După efectuarea transplantului fecal la pacienții cu colită ulcerativă, a scăzut semnificativ numărul pacienților care au necesitat terapie biologică și imunosupresoare.
8. Reacțiile adverse la tratamentul prin FMT sunt minore și tranzitorii. Nu s-au înregistrat complicații majore.
9. Transplantul de materii fecale, ieftină și eficientă ar putea constitui “un început de drum în România” pentru tratamentul recurenței infecției cu *Clostridium Difficile*.
10. Efectul *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 asupra florei intestinale apare imediat după încetarea consumului de băutură, acesta fiind reprezentat de creșterea numărului de colonii /ml, precum și de modificarea consistenței și frecvenței scaunului la o subpopulație de subiecți sănătoși.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

EFFICIENCY OF FECAL TRANSPLANTATION IN RECURRENT CLOSTRIDIUM DIFFICILE INFECTION

Phd candidate: **Maricoiu Mihaela Ramona (married Laszlo)**

Phd coordinator: Prof. Dr. **Vasile Andreica**

CLUJ NAPOCA 2018



TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Microbiota	17
1.1. Basic definitions and development of the microbiota	17
1.2. Functions of the normal microbiota	18
1.3. Changes in the bacterial composition along the gastrointestinal tract	18
1.3.1. Esófago, stomach and small intestines	18
1.3.2. Large intestine	19
1.4. Microbiota and metabolism	19
1.5. GI microbiomes in the context of development and aging	20
1.6. Disorders associated with microbiota alteration	21
1.6.1 Obesity and type 2 diabetes	21
1.6.2. Irritable bowel syndrome	21
1.6.3 Inflammatory bowel diseases	22
1.6.4. Colorectal Cancer	23
1.6.5. Allergic diseases	23
1.6.6. Neuropsychic diseases	24
2. Infection with Clostridium Difficile	25
2.1. Definition, history, epidemiology, etiopathogenesis	25
2.1.1. History	25
2.1.2. Epidemiology	26
2.1.3 Etiopathogenesis	26
2.2. Clinical picture	27
2.3. Paraclinic diagnosis	28
2.4. Treatment	29
2.4.1. The recurrent disease	30
2.4.2. Alternative therapies	32
3. Fecal microbiota transplantation	35

3.1. Definition, history	35
3.2. FMT methodology	36
3.2.1. Donor selection	36
3.2.2. Preparation of fecal materials	36
3.2.3. Delivery mode	37
3.2.4. Adverse events	38
3.3. Application of FMT to gastrointestinal diseases	38
3.3.1. Infection with Clostridium Difficile	38
3.3.2. Inflammatory intestinal disease	38
3.3.3. Obesity and metabolic syndrome	39
3.3.4. Functional gastrointestinal diseases	40
3.4. Conclusions	40
PERSONAL CONTRIBUTION	43
1. Working hypothesis / objectives	45
2. General methodology (eventually)	47
3. Study 1 - Fecal transplantation in recurrent infections with Clostridium difficile	49
3.1. Introduction	49
3.2. Working hypothesis / objectives	50
3.3. Material and method	50
3.4. Results	54
3.5. Discussions	61
3.6. Conclusions	63
4. Study 2 - Indications of fecal transplantation in ulcerative colitis	65
4.1. Introduction	65
4.2. Working hypothesis / objectives	66
4.3. Material and method	67
4.4. Results	69
4.5. Discussions	76
4.6. Conclusions	77

5. Study 3 - Assessment of viability of probiotics with Lactobacillus plantarum ATCC 8014 after passage through the gastrointestinal system. Pilot study on human subjects	79
5.1. Introduction	79
5.2. Working hypothesis / objectives	80
5.3. Material and method	80
5.4. Results	84
5.5. Discussions	86
5.6. Conclusions	87
6. General Conclusions (Synthesis)	89
8. Originality and innovative contributions of the thesis	91
REFERENCES	93

Keywords: Clostridium Difficile, fecal transplantation, recurrence, ulcerative colitis, probiotic drink

INTRODUCTION

This thesis intends to prove the efficiency of fecal transplantation in recurrent *Clostridium Difficile* infection. The secondary objectives refer to an attempt to prove the efficiency of microbiota and fecal transplantation in case of inflammatory bowel diseases, too and especially in ulcerative colitis, as well as the effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 on the composition of the fecal flora in human subjects.

Study 1. Fecal transplantation in recurrent *Clostridium Difficile* infections

The growing rate of *Clostridium difficile* infections, with increasing mortality rates of up to 20.000 cases per year, treatments with antibiotics that are few in number and very expensive – such as Vancomycin and Fidaxomylin – the high costs of which are a burden for many patients and for the health system, a recurrence of the disease occurring in 20% of the patients who underwent initial therapy, made me address this alternative treatment method with constant success rates of over 90% in patients with recurrent *Clostridium difficile* infections, who have been treated by fecal microbiota transplantation (FMT).

The main objective of this study is to present a summary of this therapeutic option for frequent utilization and acceptance of this efficient treatment.

The second objective of the study was to assess the efficiency of fecal microbiota transplantation in time, as well as to see whether there is a correspondence between efficiency duration and the donor's degree of kinship.

The study was carried out in a single center. It was a prospective study that included 30 patients with recurrent *Clostridium Difficile* infections, between 2013 and 2015.

The indications for performing fecal microbiota transplantation were:

- at least one recurrence of *Clostridium Difficile* after standard therapy with Vancomycin and Metronidazole (at least 2 weeks);
- positive toxin A and B after standard therapy with Vancomycin and Metronidazole.

The colonoscopies were performed by experienced gastroenterologists (the cecal intubation rate was over 90%) using Pentax, Olympus CL 160, Olympus CL 180 and Olympus Exera II video colonoscopes.

Categorical data is described in the form of numbers and percentages. Normally distributed

data was presented as mean and standard deviations (SD), while the data that did not undergo normal distribution was presented as interquartile range (IQR) and mean. 95% reliable intervals have been used for means.

The duration of the CDI up to the FMT varied from 4 to 8 months. The procedure was carried out after the patient had signed the consent form which included a discussion on standard colonoscopy, risks related to sedation, bleeding and perforation, infection and allergy-related risks. FMT-related reactions have also been discussed and documented.

The maximum number of recurrences was 4 and it was encountered in 2 patients (6.67%) and the minimum number was 1 and was encountered in 10 patients (33.33%).

Potential fecal matter donors were identified by the subjects, generally an intimate partner or a first-degree relative.

Donors were excluded in case of intake of antibiotics up to 90 days prior to the planned procedure or if they did not fulfill a set of eligibility criteria.

53.33% of the donors were first-degree relatives. A significant percentage of the patients presented normal colonoscopy, 56.67%, without pseudo-membrane. Pseudo-membranes were present in 20% of the patients and ulcerations in 23.33%.

Post-FMT evolution was favorable for all the patients. Statistical significance was achieved in terms of the average number of stools over 7 days/6 months/1 year ($p=0.017$, *Friedman test*). Also, we tested the connection between donor and recurrence and obtained $p=0.43$ (Fisher's exact test), noting that both recurrences had been in first and second degree relatives and not in patients in case of which the donor had been the spouse, namely people sharing the same living environment.

Study 2. Indications for fecal transplantation in ulcerative colitis

Fecal transplantation, successfully used in the treatment of persistent *Clostridium Difficile* infections, has gained ground in inflammatory diseases, too. There are theoretical arguments justifying its use in ulcerative colitis or Crohn's disease.

It is obvious that in ulcerative colitis a dysbiosis is present, namely an imbalance in the composition of the intestinal microbiome. This balance clearly leads to abnormal communication between the bacterial community and the immunity system of the colonic mucosa. By changing the composition, intraluminal bacteria induce pro-inflammatory stimuli responsible for the lesions of the mucosa that are characteristic of ulcerative colitis.

The main objective of this study was to present a summary of this therapeutic option for frequent utilization and acceptance of this efficient treatment.

Using fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis, as necessary therapy, "safeguarding" therapy in biological treatment-refractory cases, as an elective therapeutic method in CD superinfection or as a therapeutic alternative in young patients with repeated activity bursts and who have reservations about the immunosuppressive or biological treatment.

In this study we used fecal microbiota transplantation in patients with ulcerative colitis in order to see whether a change in the colonic bacterial flora produces effects or not, whether it can induce remission, the type of resulting remission and its duration.

The indications for performing fecal transplantation were:

- patients with ulcerative colitis with a Mayo endoscopic score of 2 or 3 biological therapy-refractory events
- young patients with repeated activity bursts and who have reservations about the immunosuppressive or biological treatment

The following aspects were evaluated: **a) clinical remission**: disappearance of symptoms (abdominal pain, discomfort), decreasing the number of stools or onset of normal stool, disappearance of pathological products from the stool (mucus, blood); **b) biological remission** (VSH, leucocytes, CRP, hematological), **c) endoscopic remission** (reducing the Mayo score by at least 3 points or onset of mucosal healing)

Over 7 days the patients were asked to report possible symptoms after FMT (fever, bloating, abdominal pain).

Potential stool donors were identified by the subjects, generally an intimate partner or first-degree relative.

Donors were excluded in case of intake of antibiotics up to 90 days prior to the planned procedure or if they did not fulfil a set of eligibility criteria.

All the patients were monitored post-FMT for 12 months, by phone contact and in case of any problem they returned to the hospital.

All the participants suffered from ulcerative colitis with a Mayo endoscopic score of 2 or 3 and were under treatment with 5-ASA, immunosuppressant drugs or biological therapy. From the total number of participants, 30% were under treatment with 5-ASA, 60% under treatment with 5-ASA and biological therapy and 10% under treatment with 5-ASA and immunosuppressant therapy (Imuran).

After the fecal transplantation, during the monitoring period of 1 year, we observed an increase in the percentage of patients with 5-ASA (80%), decrease in the percentage of patients under biological therapy (10%), as well as of the patients under 5-ASA and immunosuppressant therapy (10%). The patients who relapsed after 6 months were under 5-ASA treatment over the duration of the fecal transplantation and the patient who did not respond to the transplant was initially under 5-ASA and Adalimumab therapy and after the transplant he was switched to another biological therapy.

In case of 2 patients the presence of anti-infliximab antibodies (positive antibodies and the level of Infliximab in patient 3 =4,49ug/ml, in patient 4 =0,24ug/ml) was documented, while in case of one patient the Infliximab level was very low also after a reduction in the administration interval and after the doubling of the dose. In one patient, the justification for carrying out the FMT was determined by the repeated bursts and reservation about the biological and immunosuppressive treatment.

After the fecal transplantation, one patient did not respond to the therapy and therefore he needed to be switched to a different biological therapy than the initial one, while 9 patients responded to the therapy and its effect lasted for 6 months in 1 patient, namely for 1 month in 8 patients.

Conclusive interpretations concerning the efficiency and safety of FMT are not possible because of the small number of patients included in this study. Still, the combination of clinical results and microbiome analysis represents a new approach that will inform future larger studies.

Study 3. Assessment of the viability of probiotics with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 after passage through the gastrointestinal tract. Pilot study on human subjects.

Lactobacillus plantarum was tested in order to highlight its role in gastrointestinal diseases. This bacterium is capable of suppressing the growth of gas-producing bacteria in the intestines and may be beneficial to certain patients suffering from acute viral or infectious diarrhea, irritable bowel syndrome or inflammatory bowel diseases.

Lactobacillus plantarum **ATCC 8014** was analyzed only in experimental studies. Thus, the purpose of this study was to assess the viability of a probiotic drink with *L. plantarum* ATCC 8014 while passing through the gastrointestinal system and the fecal bacterial concentration in healthy volunteers right after the intake of the probiotic drink. The secondary objectives consisted in the assessment of the subjects' compliance with the drink, but also in the assessment of the frequency and consistency of the stool. We might extrapolate that the high concentration of *Lactobacillus Plantarum* found in the fecal matter after the intake of the drink might modulate the gastrointestinal bacterial flora with beneficial effects on human subjects, while the association of several strains might benefit patients with IBS and diarrhea.

The study was carried out in a single center. It was a prospective study which included 10 healthy subjects, between 2015 and 2016.

The study lasted 21 days:

- the prescreening period of 7 days – signing of the consent form, filling out the form for the evaluation of the intestinal transit according to the Bristol scale, applying the inclusion and exclusion criteria
- the duration of the study was 5-7 days: pre-administration period (1-2 days) in which stool samples were taken, administration period of the probiotic drink (3 days) and post-administration period (1-2 days) in which stool samples were taken. In the administration period the participants took once a day, on an empty stomach, a 100ml cold drink kept in the fridge at 5 degrees Celsius.
- the observation period of 7 days – filling out the compliance form, the form for the evaluation of the intestinal transit according to the Bristol scale, applying the exclusion criteria

L. plantarum ATCC 8014 has been traced in all the subjects before the intake. The average number of colonies before the intake was 3.02×10^5 . A significant increase in *Lactobacillus Plantarum* immediately after the intake was observed in all the patients, up to 9.57×10^7 . The average number of colonies increased by 6.55% compared to the initial percentage, revealing statistical significance ($P < 0.05$).

Significant changes have been found in terms of the consistency and frequency of the stools. In half of the subjects the consistency increased and the frequency dropped.

GENERAL CONCLUSIONS

1. The obtained results are proof of the effectiveness of the use of faecal transplantation in recurrent infection with Clostridium Difficile and are an argument for the necessity of future research.
2. Fecal transplantation has a high rate of healing of Clostridium Difficile infection.
3. The relatively small number of patients in the study derives from the short duration of the study, namely the fact that the patients, but probably some doctors, are still reserved for this treatment method.
4. Fecal transplantation for recurrent infections with Clostridium Difficile is an effective, safe and sustainable method for patients who are not responding to traditional therapy.
5. These results can be a moment of awareness of us and the patients of this treatment method. Our studies on the use of faecal transplantation in Clostridium Difficile infection and inflammatory bowel disease (ulcerative colitis) are a priority in Romania.
6. There is a concordance between the transplant efficiency and the donor's degree. In patients with recurrent infection with Clostridium difficile, recurrent post-transplantation was observed in the case of first and second-degree donors, whereas in the intimate partners there was no recurrence. In the case of ulcerative colitis, no relationship between the donor and the relapse was observed.
7. After faecal transplantation in patients with ulcerative colitis, the number of patients requiring biological and immunosuppressive therapy was significantly reduced.
8. Adverse reactions to treatment with FMT are minor and transient. There were no major complications.
9. Fecal transplantation could be a "start-up in Romania" for the treatment of recurrence of Clostridium Difficile infection.
10. Effect on the intestinal flora of Lactobacillus plantarum ATCC8014 occurs immediately after termination of the consumption of the beverage, which is represented by increasing the number of colonies / ml, and consistent change in stool frequency and a sub-population of healthy subjects.