

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Praha, 2024

MUDr. Ivana Cibulková

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Dizertační práce

Změny střevního mikrobiomu v souvislosti s transplantací stolice
*Changes in the gut microbiome associated with faecal microbiota
transplantation*

Školitel: doc. MUDr. Jan Hajer, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 7.11.2024

Ivana Cibulková

Podpis

Identifikační záznam:

CIBULKOVÁ, Ivana. Změny střevního mikrobiomu v souvislosti s transplantací stolice. [Changes in the gut microbiome associated with faecal microbiota transplantation]. Praha, 2024. Počet stran 121, počet příloh 4. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Interní klinika FNKV a 3. LF UK 2022. Školitel doc. MUDr. Jan Hajer, Ph.D.

Klíčová slova: *Fekální mikrobiální transplantace; viabilita bakterií; mikrobiom; kultivační metody, integrita membrán; flow cytometrie; banka stolice.*

Key words: *Faecal microbial transplantation; bacterial viability; microbiome; culture methods, membrane integrity; flow cytometry; stool bank.*

Poděkování

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli doc. MUDr. Janu Hajerovi, Ph.D. z Gastroenterologického oddělení Fakultní nemocnice Bulovka a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za vedení dizertační práce, za jeho přístup a konzultace. Po celou dobu mi byl trpělivým rádce a průvodcem v oblasti postgraduálního studia i získávání praxe v rámci klinické specializace v oboru gastroenterologie.

Zvláštní poděkování patří doc. RNDr. Monice Cahové, Ph.D., z Institutu experimentální medicíny za spolupráci při sběru dat, laboratorní analýze a hodnocení výsledků. Velmi jí děkuji za její trpělivost při předávání odborných znalostí jak v laboratorní diagnostice, tak v oboru mikrobiologie, a za významnou pomoc při publikaci výsledků.

V klinické části projektu, realizované na Klinice anesteziologie a resuscitace Fakultní nemocnice Královské Vinohrady ve spolupráci s 3. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy, bych ráda vyjádřila velký dík prof. MUDr. Františkovi Duškovi, Ph.D., jehož odborné vedení, podpora a cenné rady byly neocenitelné při realizaci projektu i publikaci výsledků. Rovněž bych chtěla srdečně poděkovat celému týmu lékařů a sester tohoto oddělení za jejich neúnavnou podporu a významnou pomoc při klinické realizaci projektu.

Děkuji také kolegům z Mikrobiologického ústavu Akademie věd, ze Střediska cytometrie a mikroskopie, kde probíhala analýza na flow cytometru. Stejně tak patří můj dík kolegům z Ústavu lékařské mikrobiologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, kde probíhala kultivační analýza.

Závěrem chci velmi poděkovat mé rodině, především pak svému manželovi a dětem, za podporu a trpělivost během náročného období kombinovaného doktorského studia a klinické praxe.

Obsah

1. Přehled problematiky	10
1.1. Vymezení pojmů	10
1.2. Vlastnosti zdravé a dysbiotické mikrobioty.....	10
1.3. Funkce střevní mikrobioty.....	12
1.4. Faktory ovlivňující složení lidské mikrobioty.....	13
1.4.1. Prenatální období, porod a věk jedince	13
1.4.2. Strava	15
1.4.3. Hygienický režim	16
1.4.4. Antibiotika.....	17
1.5. Vztah mezi střevní mikrobiotou a zdravím hostitele	17
1.5.1. Mikrobiota a její vztah k obezitě, diabetu a metabolickým chorobám	18
1.5.2. Mikrobiota a její vztah k ateroskleróze a kardiovaskulárním onemocněním	19
1.5.3. Mikrobiota a její vztah k nádorovým onemocněním	20
1.5.4. Mikrobiota a její vztah k imunitně podmíněným onemocněním	21
1.5.5. Mikrobiota a její vztah k IBD	22
1.5.6. Specifika střevní mikrobioty u pacientů na JIP	22
1.6. Možnosti ovlivnění složení střevní mikrobioty.....	23
1.6.1. Prebiotika a probiotika	24
1.6.2. Fekální mikrobiální transplantace (FMT).....	26
1.7. Dosavadní znalosti o metodě FMT.....	26
1.7.1. Princip FMT	26
1.7.2. Doporučené postupy pro FMT	27
1.7.3. Vlastní metodologie FMT	27
1.7.4. Komplikace FMT	33
1.8. FMT - zavedené indikace	34
1.8.1. Infekce způsobené <i>Clostridioides difficile</i>	34
1.8.2. Použití FMT z indikace nespecifických střevních zánětů	38
1.8.3. Použití FMT z indikace závažných postantibiotických průjmů a syndromu bakteriálního přerůstání v tenkém střevě.....	38
1.8.4. Použití FMT z dalších indikací.....	39

1.9.	Optimální složení filtrátu stolice pro metodu FMT	39
1.9.1.	Složení filtrátu stolice	40
1.9.2.	Výběr vhodného dárce stolice.....	40
1.10.	Efekt FMT	41
1.10.1.	Faktory ovlivňující úspěch FMT	41
1.10.2.	Ovlivnění mikrobiomu po FMT.....	42
1.11.	Legislativa FMT	42
1.11.1.	Právní regulace metody FMT ve světě	42
1.11.2.	Standardizace FMT jako léčivého přípravku.....	43
1.12.	Stanovení bakteriální viability ve vzorcích stolice	43
1.12.1.	Kultivační metody.....	44
1.12.2.	Stanovení integrity buněčných membrán pomocí barvení SYTO9 a propidium jodidu	44
1.12.3.	Jiné metody využívající integritu membrány ke zjištění životaschopnosti buněk	46
1.13.	Banka stolice	47
2.	<i>Hypotézy a cíle práce</i>	48
3.	<i>Metodologie.....</i>	50
3.1.	Protokol randomizované studie	50
3.2.	Subjekty	51
3.2.1.	Charakteristika dárců stolice pro FMT	51
3.2.2.	Myší modely	51
3.3.	Zpracování vzorků.....	52
3.3.1.	Příprava FMT filtrátu z dárcovské stolice	52
3.3.2.	Zpracování FMT filtrátu pro stanovení bakteriální viability pomocí kultivace	52
3.3.3.	Zpracování vzorků pro určení bakteriální viability pomocí stanovení membránové integrity	53
3.4.	Kultivace FMT filtrátu in vitro.....	55
3.5.	Průtoková cytometrie	56
3.6.	Statistické metody	57
4.	<i>Výsledky.....</i>	58
4.1.	Protokol studie FEBATRICE	58

4.2.	Kvantitativní analýza viability bakterií v hluboko zmraženém FMT filtrátu pomocí kultivačních metod	60
4.3.	Stanovení viability bakterií na základě měření integrity buněčné membrány	61
4.3.1.	Ověření použitelnosti metody měření integrity bakteriální buněčné membrány v materiálu stolice	61
4.3.2.	Ověření vlivu aerobních podmínek při přípravě vzorku pro analýzu	66
4.4.	Srovnání různých metod stanovení viability bakterií.....	67
5.	<i>Diskuze</i>	72
5.1.	Protokol klinické studie FEBATRICE	72
5.2.	Kvantitativní analýza viability bakterií v hluboko zmraženém FMT filtrátu pomocí kultivačních metod	76
5.2.1.	Použití kultivačních metod pro stanovení viability bakterií ve stolici	76
5.2.2.	Stabilitní studie, kvantitativní analýza viability mikrobioty.....	77
5.3.	Stanovení viability bakterií na základě měření integrity buněčné membrány	78
5.3.1.	Ověření použitelnosti metody měření integrity bakteriální buněčné membrány v materiálu stolice	78
5.3.2.	Kvantitativní a kvalitativní analýza viability mikrobioty v hluboko zmraženém FMT filtrátu pomocí stanovení membránové integrity a flow cytometrie	83
5.4.	Srovnání různých metod stanovení viability bakterií.....	84
6.	<i>Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce</i>	87
7.	<i>Souhrn</i>	89
8.	<i>Summary</i>	94
9.	<i>Seznam zkratk</i>	99
10.	<i>Seznam použité literatury</i>	102
11.	<i>Seznam publikací</i>	118
11.1.	Publikace, které jsou podkladem dizertace.....	118
11.2.	Publikace, které nejsou podkladem dizertace	119

12. Přílohy.....	120
-------------------------	------------

1. Přehled problematiky

1.1. Vymezení pojmů

Na základě recentní literatury je zřejmé, že všechny živé eukaryotické organismy, včetně lidí, jsou přirozeně osídleny mikroorganismy na vnějších i vnitřních površích těla a žijí s nimi v intimním vztahu. Poměr mezi počtem lidských a mikrobiálních buněk je přibližně 1:1, nebo dokonce 1:10, vezmeme-li v úvahu pouze počet lidských jaderných buněk (tedy bez červených krvinek) [1,2]. V souvislosti s prudkým rozvojem poznání v této oblasti se v literatuře objevilo několik nových termínů v používání odborného názvosloví [3]. Mikrobiom je definován jako charakteristická mikrobiální komunita, která obývá určitý racionálně vymezený habitat s typickými fyzikálními a chemickými podmínkami. Termín mikrobiom nezahrnuje pouze v něm zapojené mikroorganismy, ale také jejich pole působnosti, ve kterém se formují specifické ekologické niky. Mikrobiom, který představuje dynamický a interaktivní mikro-ekosystém podléhající změnám v čase, je propojen s makro-ekosystémy včetně eukaryotických hostitelů, pro jejichž tělesné funkce a zdraví je potřebný nebo dokonce nezbytný. Termín mikrobiota označuje soubor jednotlivých živých mikroorganismů žijících v určitém prostředí. V lidském střevě zahrnuje archea, bakterie, houby (zejména kvasinky) a viry. Složení mikrobioty je formováno mnoha faktory a je výsledkem komplikované souhry mezi ní a hostitelem. Metagenom je výraz pro kolektivní genom, tj. soubor mikrobiálních genů a genomů, nacházejících se v mikrobiotě. Geny hostitele (člověka) pak představují oproti lidskému mikrobiomu menšinu, neboť se předpokládá, že souhrn mikrobiálních genomů převyšuje lidský genom asi 150x a rozšiřují tak funkční kapacitu člověka. Mikrobiom je tak pojmenován jako náš „druhý genom“ [4–6].

1.2. Vlastnosti zdravé a dysbiotické mikrobioty

Mikrobiota hraje klíčovou roli v lidském zdraví a onemocnění a je považována za "nový orgán", který doplňuje chybějící funkce hostitele [4,7–9]. Odhaduje se, že lidská gastrointestinální mikrobiota ve svém zdravém stavu obsahuje 500 až 2 000 druhů s několika biliony mikrobiálních buněk a její rozmanitost přispívá k fyziologické střevní

funkci [7,10,11]. Hustota mikroorganismů v gastrointestinálním traktu se zvyšuje aborálně, zatímco v žaludku nacházíme cca 10^3 buněk/ml, v distální části tenkého střeva je to přibližně cca 10^7 buněk/ml a v slepém a tlustém střevě zhruba 10^{11-13} buněk/ml. Většina střevní mikrobioty je řazena mezi přísné anaeroby [12].

U zdravého dospělého jedince převládají v zažívacím traktu dva striktně anaerobní základní kmeny, které tvoří většinu celkové populace. Prvním z nich je Bacteroidota, dříve Bacteroidetes, druhým dominantním kmenem je Bacillota, dříve Firmicutes [6].

Jaké je optimální složení mikrobiomu pro hostitele, není dosud známo. Velmi pravděpodobně se nejedná o jednu univerzální taxonomickou skladbu, ale bude se lišit v závislosti na vlastnostech konkrétního jedince (unikátní genetická výbava, imunologické nastavení apod.) a konkrétní fyziologické situaci. I přes toto tvrzení jsou však některé skupiny mikrobioty asociované s patologickými stavy a jiné naopak. Obecně lze tvrdit, že stabilní a rozmanitá bakteriální komunita ve střevě koreluje se zdravím hostitele [13].

Diversita neboli rozmanitost je důležitá ve všech ekosystémech, protože podporuje jejich stabilitu. Existují tři vzájemně propojené aspekty biodiverzity: alfa, beta a gama. Alfa-diverzita popisuje rozmanitost jednotlivých taxonů mikrobiomu v rámci vzorku (v daném prostředí, například ve střevě jednotlivce). Beta diverzita se vztahuje k variabilitě mikrobiální komunity mezi různými vzorky nebo jednotlivci. Gama-diverzitou označujeme celkovou pozorovanou rozmanitost všech vzorků [14].

Patologický stav s nízkou bakteriální diverzitou, kdy dochází k narušení mikrobiální rovnováhy a poškození hostitele, se nazývá dysbióza [15]. Popis „patologického složení“ může být problematický, a proto je v dnešní době spíše snaha o definování patologického vztahu mezi mikrobiotou a lidským organismem. Ztráta mikrobiální diversity v zažívacím traktu člověka je asociována s řadou onemocnění, jak uvádím dále. Naopak zvýšená střevní mikrobiální diverzita je spojována s lepším zdravotním stavem a může se tak stát novým biomarkerem nebo ukazatelem lidského zdraví [16–18].

1.3. Funkce střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota plní mnoho funkcí v metabolismu a fyziologickém fungování lidského organismu. Mezi hlavní patří tvorba postbiotik, tj. produktů bakteriální fermentace různých substrátů, (např. syntéza vitamínů, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a další), metabolismus žlučových kyselin, degradace xenobiotik, dodatková extrakce energie z pro člověka nestravitelných substrátů (štěpení nestravitelné vlákniny), ovlivnění motility gastrointestinálního traktu, regulace funkce slizniční bariéry a obnovy epitelálních buněk a vaskularizace střeva, ovlivnění imunitní reakce a potlačení přemnožení střevních patogenů soutěžením o živiny a životní prostor (kolonizační rezistence) [7,10]. Pro fyziologické fungování zažívacího traktu člověka je klíčová mikrobiální homeostáza, definovaná oboustranně výhodným symbiotickým vztahem mezi střevními bakteriemi a hostitelem. Na druhém konci tohoto spektra je těžká dysbióza, stav s nízkou bakteriální diverzitou, při němž dochází k narušení mikrobiální rovnováhy a poškození hostitele (viz výše) [15]. Přestože většina studií zabývajících se vazbou mezi mikrobiomem a nemocí je asociativní, v posledních letech se objevuje stále mechanistických experimentů, které potvrzují, že mikrobiota hraje kauzální roli v patofyziologii vzniku i průběhu řady onemocnění [1,10,19,20].

Mezi nejvíce diskutované mechanismy patří vliv postbiotik, včetně SCFA (actetát, propionát, butyrát). Butyrát produkující bakterie dodávají energii střevním epitelálním buňkám, udržují funkční bariérovou funkci střeva, stimulují produkci ochranného hlenu a sekrečního imunoglobulinu IgA, a tím mají protektivní vliv před zánětem a infekcí [10]. Mikrobiota adherující na střevní epitel má pravděpodobně také zásadní vliv na vyžívání lidského imunitního systému cestou stimulačních signálů pro pomocné T-lymfocyty. V animálních studiích bylo prokázáno, že germ-free (bezmikrobní) myši mají významně redukováné lymfatické uzliny v gastrointestinálním traktu [11]. Interakce střevní mikrobioty s imunitním systémem ovlivňuje pravděpodobně také vnímavost organismu k rozvoji autoimunitních onemocnění [19]. Gramnegativní bakterie obsahují ve své buněčné stěně lipopolysacharidy (LPS), silné aktivátory imunitní odpovědi. Cirkulující hladiny LPS jsou zvýšené například u obézních DM2T myší, potkanů i lidí. Naopak produkce SCFA snižuje sekreci prozánětlivých cytokinů a ovlivňuje bariérovou funkci střeva správným fungováním mezibuněčných spojení pomocí tight junctions [20].

1.4. Faktory ovlivňující složení lidské mikrobioty

Celá řada endogenních a exogenních faktorů determinuje složení lidské střevní mikroflóry. Nejpozději při porodu je člověk osidlován mikrobiotou, a některé studie naznačují, že ke kontaktu mezi plodem a mikrobiotou matky může dojít už během vývoje v děloze. Způsob porodu patří mezi klíčové faktory podmiňující složení první mikrobioty. Mezi další faktory patří genetické vlastnosti, imunitní stav a přidružené choroby hostitele, strava (včetně doby kojení), xenobiotika (léky, zejména antibiotika nebo inhibitory protonové pumpy, potravinové doplňky atd), infekce, denní rytmus, fyzická zátěž, BMI, hygienické standardy a mnoho dalších [7,11,21–24].

1.4.1. Prenatální období, porod a věk jedince

V otázce počátku kolonizace střeva napanuje v současnosti ve vědecké komunitě shoda. Existují dvě hlavní názorové linie. První skupina předpokládá již prenatální expozici plodu mikroorganismům a druhá skupina se přiklání k názoru, že první interakce s mikroorganismy nastává při porodu. Možnost prvního setkání s mikrobiotou v prenatálním období potvrzují studie, kde autoři popisují tzv. placentální mikrobiotu jak v případě předčasných porodů, tak i porodů v termínu [25,26]. To by znamenalo, že již vznikající imunitní systém plodu je vystaven mikroorganismům a s nimi asociovaným antigenům. Tento závěr byl zpochybněn ve studii, kde autoři ukázali, že mikrobiota detekovaná v placentě pomocí molekulárně genetických metod může být z velké části výsledkem kontaminace vzniklé během odběru vzorků nebo kontaminace laboratorních kitů používaných pro izolaci mikrobiální DNA a následné sekvenování. Tyto převratné výsledky poukazují [27]. Autoři nebyli schopni kultivačními metodami detekovat žádné mikroorganismy, proto hledali možný zdroj bakteriální DNA a našli ho jak v samotných izolačních kitech, tak jako kontaminaci odebíraných vzorků. Nepodařilo se však prokázat zdroj kontaminace pro všechny bakteriální nukleové kyseliny nalezené v placentální mikrobiotě, např. *Streptococcus agalactiae*. Kromě toho je třeba mít na paměti, že zdaleka ne všechny mikroorganismy jsme schopni kultivovat pomocí běžně dostupných kultivačních metod. V kontrastu se studií prezentující výsledky o placentální mikrobiotě jako kontaminaci je publikace, která popisuje placentální mikrobiotu jak na základě sekvenačních dat, tak i kultivačních technik [28]. V tomto článku byli autoři schopni

detekovat mikroorganismy v plodu v průběhu druhého trimestru těhotenství. Autoři vzali v úvahu i závěry skupiny de Gofau a kol. zpochybňující přítomnost placentálního mikrobiomu a použili adekvátní kontroly k vyloučení možné kontaminace vzorků jak při vlastním odběru, tak následné izolaci bakteriální DNA pro sekvenční analýzy. Tyto převratné výsledky poukazují na možné prenatální setkání s mikroorganismy, které umožňuje formování komplexních vztahů mezi mikrobiotou a imunitním systémem od samého počátku vzniku obou velmi těsně propojených světů. Otázka, zda intrauterinní prostředí je zcela sterilní či zda už v prenatálním vývoji je plod vystaven mikrobiálnímu světu není dosud uzavřena.

Shoda naopak panuje v názoru, že k masivní kolonizaci organismu novorozence dochází v okamžiku porodu, přičemž vliv způsobu porodu je zásadní. Vzorky stolice kojenců a matek ukázaly, že střevní mikrobiota vaginálně porozených novorozenců je taxonomicky podobná střevní a vaginální mikrobiotě matky na rozdíl od střevní mikrobioty dětí narozených císařským řezem, která se podobá mikrobiotě nalezené na kůži matek. Ve vzorcích mekonium získaných od vaginálně narozených novorozenců byla popsána vysoká četnost *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus spec.*, zatímco v mekoniu novorozenců narozených císařským řezem to byli zástupci *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium spp.* [29,30]. Kolonizace novorozeneckého tlustého střeva laktobacily a bifidobakteriemi přenesenými z mateřské vaginy poskytuje novorozenci výhody pro jejich metabolické vlastnosti, jako je schopnost metabolizovat laktózu z mateřského mléka a jiné oligosacharidy na imunomodulační SCFA a konjugované trans-linolové kyseliny (tCLA). U těchto látek bylo prokázáno, že snižují produkci prozánětlivých eikosanoidů regulací transkripce cyklooxygenázy 2 (COX-2) a indukci protizánětlivé makrofágové diferenciaci [31–33].

Také doba ukončení kojení má velký dopad na rané složení a funkci dětské mikrobioty a její dozrávání v mikrobiotu dospělou [29]. V časném dětství se pak složení střevní mikrobioty stává stabilnější. Střevní mikrobiota dospělých je ve srovnání s kojenci stabilní, ale specifické mikrobiální druhy a poddruhy (kmeny) se enormně liší mezi jednotlivci a každý dospělý člověk tak má svůj vlastní jedinečný mikrobiom. U starších lidí se střevní mikrobiota stává kompozičně nestabilní a méně různorodá, což jsou události, které jsou spojeny s poklesem imunokompetence souvisejícím s věkem. Mikrobiota starších lidí také vykazuje větší interindividuální variabilitu než mikrobiota

mladších dospělých a očekávaně významně koreluje s mírou křehkosti, komorbiditami a nutričním stavem [8].

1.4.2. Strava

Dietní návyky a strava patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty. Specifické složky stravy hrají roli v mikrobiálním složení a následně produkci bakteriálních metabolitů. Ty zásadně ovlivňují fyziologii hostitele, a některé z nich se mohou podílet na navození stavu systémového zánětu a metabolické endotoxémie, čímž pravděpodobně přispívají k patogenezi diabetu, obezity a jiných civilizačních onemocnění [34].

Tradiční „západní strava“ s vysokým obsahem tuku, zpracovaného cukru a nízkým obsahem vlákniny je asociována se změnami ve složení a funkčních projevech střevní mikrobioty. Mezi charakteristické rysy mikrobioty příslušníků industriální společnosti patří snížení produkce SCFA a zvýšení obsahu lipopolysacharidu (LPS), což zvyšuje riziko chronických onemocnění souvisejících s výživou, obezitou a diabetem. Konzumace velkého množství masa a živočišných tuků mění zastoupení bakterií podílejících se na biotransformaci žlučových kyselin (ŽK), což ovlivňuje spektrum produktů biotransformace. Zvyšuje se zastoupení těch ŽK, které jsou asociovány se zánětlivými střevními onemocněními, např. kyselina deoxycholová [7]. Zvýšená konzumace různorodé rostlinné stravy bohaté na vlákninu je asociována se zvýšenou tvorbou produktů fermentace vlákniny, např. SCFA, u kterých byla prokázána řada pozitivních účinků na zdraví hostitele včetně protizánětlivého působení [33,34].

De Filippo a kol. srovnali střevní mikrobiom a metabolom obyvatel rurální vesnice, příměstské vesnice a hlavního města Burkina Fasso a obyvatel Benátek. Obyvatelé rurálního prostředí se vyznačovali vyšší alfa diverzitou střevního mikrobiomu, vyšším zastoupením bakterií rodu *Prevotella* a vyšším obsahem SCFA ve stolici [35]. Naopak střevní mikrobiom západní populace se vyznačuje sníženou alfa diversitou. Tím se stává mikrobiom západní populace více zranitelný a citlivý na environmentální stres. Je pravděpodobné, že za tento rozdíl je odpovědná zcela odlišná dieta západní civilizace, zejména nadbytek živočišných bílkovin a tuků a nízké množství rostlinných polysacharidů [23,35,36]. Velmi pravděpodobně se na něm podílí i vliv sezónní a cyklické stravy

v rozvojových zemích na rozdíl od celoročně zajištěného příjmu stabilně vysokotučné a kalorické diety v západních zemích [33].

1.4.3. Hygienický režim

Již dávno před zavedením sekvenačních technik byla popsána tzv. hygienická hypotéza která uvádí, že fyziologická mikrobiota je nepostradatelná pro rozvoj a udržení tolerantního imunitního stavu. Tato hypotéza popisuje význam mikrobioty a její metabolické a imunologické souhry se slizničními povrchy hostitele [33]. Dle této teorie má vyšší hygienický standard obyvatel západního světa paradoxně zásadní vliv na sníženou diversitu jejich mikrobioty. Důsledkem vysokého hygienického standardu je zhoršení přirozené samoobnovovací schopnosti našeho mikrobiomu a horizontálního přenosu bakterií. Je popisován vztah zvýšeného hygienického standardu s autoimunitními onemocněními, ale i s alergickými onemocněními nebo některými maligními lymfoproliferativními poruchami. Během svého vývoje byl komplexní lidský organismus vystaven tlaku rozpoznat, které složky mikrobiomu jsou neškodné a není třeba na ně reagovat imunitní odpovědí, a naopak, které organismy jsou patogenní a je zapotřebí je eliminovat. K tomu byla zapotřebí adaptivní imunitní odpověď se svou imunologickou pamětí pro následné generace imunitních buněk. Vzájemná adaptace obou stran (imunitní systém hostitele-mikrobiota) pak vedla k metabolické a imunologické symbióze, založené na včasné výchově imunitních buněk hostitele různorodou mikrobiální komunitou [33]. Nabízí se otázka, jakým způsobem může osídlení člověka mikrobiotou po jeho narození snížit frekvenci alergických nebo autoimunitních onemocnění. Velmi silné imunitní reakce proti infekčním agens by mohly soutěžit s imunitními reakcemi namířenými proti slabým antigenům, jako jsou alergeny nebo autoantigeny. Ukazuje se však, že funguje více různých mechanismů, které mohou být odlišné v závislosti na infekčním agens [37]. Hygienická hypotéza je pravděpodobně také jedním z vysvětlení nerovnoměrného geografického rozšíření autoimunitních onemocnění ve světě. U jedinců stěhujících se ze zemí s nízkým výskytem autoimunitních onemocnění do zemí s vysokým výskytem se onemocnění rozvine s frekvencí hostitelské země za předpokladu, že k přesunu došlo v mladém věku [38].

1.4.4. Antibiotika

Další faktor, který zásadně negativně ovlivňuje mikrobiom, je masivní expozice antibiotikům. Ta často vede k eliminaci klíčových bakteriálních taxonů nebo celých funkčních skupin, které jsou spojeny s narušením správného fungování imunitního systému a řadou chronických onemocnění u obyvatel vyspělých západních kultur. Bylo popsáno, že více než třetina podávaných antibiotik je indikována zbytečně či v rozporu s platnými doporučeními [39]. Nadužívání antibiotik vede mimo jiné k vyšší incidenci infekce CD (*Clostridioides difficile*), vzniku multirezistentních bakteriálních infekcí a pravděpodobně i ovlivnění buněčného energetického metabolismu poškozením mitochondrií, které dále přispívá k orgánovému selhání [40].

1.5. Vztah mezi střevní mikrobiotou a zdravím hostitele

Jak bylo popsáno výše, složení a funkčnost střevní mikrobioty souvisí se zdravím hostitele. Již Hippokrates (400 let př. n. l.) tvrdil, že „špatné trávení je kořenem všeho zla“ a že „smrt sedí ve střevech“. Dnes již víme, že lidská střevní mikrobiota vykonává mnoho funkcí (viz výše) a rozmanitá, stabilní homeostáza střevního mikrobiomu je klíčová pro fyziologické fungování nejen trávicího traktu [6]. Na druhém konci tohoto spektra je závažná dysbióza, stav nízké bakteriální diversity s narušením ekosystému mikrobiální rovnováhy [41]. Dysbióza střevní mikrobioty je spojena s chorobami od lokalizovaných gastroenterologických poruch po respirační, metabolické, jaterní a kardiovaskulární nemoci včetně aterosklerózy nebo astmatu [7,42–45]. Je řada prací, které se snaží objasnit kauzalitu a souvislosti mezi mechanismy onemocnění zprostředkovaných mikrobiotou, která by mohla pomoci při objevení nových terapeutických a preventivních strategií [1,10,19,20,46].

Práce na zvířecích modelech, kde přenos střevní mikrobioty z nemocného člověka na bezmikrobního (germ-free) zdravého zvířecího příjemce vedl k přenosu nemocného fenotypu, dokazují, že se mezi mikrobiotou a onemocněním jedná o kauzální, a nikoliv asociativní vztah. Střevní mikrobiota charakteristická vyšší produkcí trimethylaminu vyvolala u příjemce (ApoE -/- myši) zvýšenou tvorbu aterosklerotických plátů [47]. Podobné závěry prokázala i studie zaměřená na přenos fenotypu IBD kolitidy

pomocí transferu mikrobioty [48]. V jiných studiích bylo dokumentováno, že mikrobiom přenesený metodou FMT od obézních dárců indukuje výrazně větší přírůstek hmotnosti a nárůst celkového tělesného tuku u germ-free myší než kolonizace „štíhlou mikrobiotou“, přestože jsou krmeny standardní stravou [49,50].

Z výše uvedeného vyplývá, že na interakci mezi mikrobiomem a hostitelem je potřeba nazírat jako na složitý komplex, který vedl k vytvoření pojmu „holobiont“. Holobiont označuje komplex organismů, které žijí v těsné interakci a tvoří funkční ekologickou jednotku. Tento koncept zahrnuje nejen samotného hostitele (např. zvíře nebo rostlinu), ale i všechny mikroorganismy, které v jeho těle nebo na jeho povrchu žijí, jako jsou bakterie, viry, houby a další symbiotické organismy. Holobiont tedy představuje jakýsi "superorganismus", kde jednotlivé složky spolupracují a ovlivňují se navzájem, což může mít dopad na zdraví a přežití hostitele [51]. Je tedy zřejmé, že na mikrobiotu osídlující lidský organismus není možno nahlížet jako na infekci, která člověka ohrožuje a se kterou je potřeba bojovat se snahou lidské buňky chránit. Naopak, je žádoucí blíže porozumět tomuto vztahu a snažit se najít vyvážený přístup vedoucí k optimálnímu složení individuální mikrobioty jednotlivce.

1.5.1. Mikrobiota a její vztah k obezitě, diabetu a metabolickým chorobám

Obezita i diabetes mellitus jsou charakterizovány chronickým subklinickým zánětem spolu s abnormální expresí a produkcí mnoha zánětlivých mediátorů a zvýšenými hladinami cirkulujících zánětlivých markerů [52]. Obezita vyvolaná dietou s vysokým obsahem tuků je spojena se zánětem v tukové tkáni (infiltrace makrofágů a T-buněk), který produkuje zánětlivé cytokiny, jako je IL/interleukin-1 β , IL-6 a TNF α (tumor necrosis factor), které interferují s inzulinovou signalizací a ovlivňují inzulinovou rezistenci [52]. Nedávné studie prokázaly vztah mezi složením střevní mikrobioty a metabolickými onemocněními včetně diabetes mellitus 2. typu (DM2T). U pacientů s DM2T byla zjištěna nižší rozmanitost střevního mikrobiomu a menší množství bakterií produkujících SCFA v porovnání se zdravými jedinci [46,53]. Tato dysbióza může ovlivnit imunitní buňky ve střevě prostřednictvím mikrobiálních produktů včetně LPS. Zástupci kmene Bacteroidota a další gramnegativní bakterie obsahují ve své buněčné stěně LPS, silný aktivátor imunitní reakce, jehož cirkulující hladiny jsou zvýšené u obézních a DM2T

myší, potkanů a lidí [52]. FMT od zdravých štíhlých lidských dárců obézním pacientům s inzulinovou rezistencí je spojena se zlepšením celotělové inzulinové senzitivity u příjemců, což dále podporuje názor, že fenotyp spojený s mikrobiotou může být alespoň do určité míry přenesen a reprodukován u geneticky náchylného příjemce [54]. Práce, které potvrdily, že díky přenosu mikrobioty lze přenést i fenotyp obezity, jsou zmíněné výše.

1.5.2. Mikrobiota a její vztah k ateroskleróze a kardiovaskulárním onemocněním

Ačkoli je mnoho prací věnováno pravděpodobným příčinám aterosklerózy, jako jsou dyslipidemie, hypertenze, obezita, diabetes a kouření, v poslední době se stále více diskutuje také vliv výživy a složení střevní mikrobioty [55]. Je velmi pravděpodobné, že střevní dysbióza asociována s rozvojem obezity a diabetu, je klíčovým rizikovým faktorem při vývoji aterosklerózy a souvisejících závažných komplikací kardiovaskulárních chorob [56]. Vztah mezi mikrobiotou a aterosklerózou dokumnetují recentně publikované animální studie které ukázaly, že střevní mikrobiální metabolismus fosfatidylcholinu (lecitinu) a l-karnitinu ze stravy produkuje trimethylamin, který následně v játrech podléhá oxidaci na trimethylamin-N-oxid (TMAO). Zvýšené hladiny proaterosklerotického metabolitu TMAO byly po podání antibiotik výrazně suprimovány a poté se znovu objevily po vysazení antibiotik. Tím se prokázala závislost na metabolismu střevní mikrobiotou.

Zvýšené plazmatické hladiny TMAO byly spojeny se zvýšeným rizikem závažných nežádoucích kardiovaskulárních příhod [57]. Studie na myším modelu ukázala, jak orální aplikace strukturního analogu cholinu inhibovala mikrobiální produkci trimethylaminu, čímž následně došlo ke snížení hladiny TMAO v plazmě, a zabránila rozvoji aterosklerózy bez zjevných vedlejších účinků, a to navzdory aterogenní dietě (u myší krmených dietou s vysokým obsahem cholinu nebo karnitinu). Tyto studie ukazují na specificky střevní mikrobiální produkci TMA a mohou sloužit jako potenciální terapeutický přístup pro léčbu kardiometabolických onemocnění [58].

1.5.3. Mikrobiota a její vztah k nádorovým onemocněním

Střevní mikrobiom je zkoumán v oblasti onkologie již dlouhou dobu. Je popisována asociace některých mikrobiálních druhů s různými typy nádorů, ale také schopnost některých komenzálních bakterií modulovat nádorové mikroprostředí a protinádorovou terapii. Rozvoj maligního onemocnění v souvislosti s mikrobiotou může být způsoben různými mechanismy. Některé bakteriální druhy stimulují zánět a produkci toxinů, které mohou podporovat karcinogenezi, měnit signální dráhy protinádorových imunitních pochodů či ovlivnit progresi buněčné dysplazie v karcinogenezi [59]. Některé bakterie, jako je *Helicobacter pylori* či *Salmonella typhi* mohou přímo přispívat k procesu tumorigeneze tím, že ovlivňují intracelulární signální dráhy zapojené do regulace buněčného růstu a proliferace [60]. Virus hepatitidy C (HCV) a virus hepatitidy B (HBV) má přímý vliv na rozvoj hepatocelulárního karcinomu. Přibližně 16 % maligních onemocnění člověka na celém světě souvisí s infekčními agens nebo chronickým zánětem spojeným s infekcí, ve vyšším procentu v méně rozvinutých zemích (22,9 %) než ve vyspělejších zemích (7,4 %) [61].

Četné studie naznačují, že střevní mikrobiota má zásadní význam také v patogenezi kolorektálního karcinomu (KRK). Kolorektální karcinogeneze je velmi složitá a ovlivňují ji genetické faktory i faktory prostředí. Nové studie naznačují také vliv zánětu, patogenních bakterií, genotoxinů, oxidačního stresu a metabolitů mikrobioty. Byly popsány rozdíly ve složení střevní mikrobioty mezi zdravými jedinci a pacienty s KRK. Obdobné specifické složení střevní mikrobioty, jako je u pacientů s KRK, se vyskytuje dokonce i u pacientů se střevními adenomovými polypy (prekanceróza KRK) a časného stadia KRK [62,63]. Byly popsány určité bakteriální druhy, která jsou asociována s KRK jako je *Streptococcus bovis*, enterotoxigenní *Bacteroides fragilis* nebo *Fusobacterium nucleatum* [64–66]. Existují však i bakterie, které mají pravděpodobně protektivní vliv na střevní sliznici a snižují riziko karcinogeneze, jako je například butyrát produkující *Clostridium butyricum* nebo producent laktátu *S. thermophilus*. Pravděpodobně za vznik KRK tedy není zodpovědný jeden konkrétní mikroorganismus, ale skupina bakterií, jejichž škodlivé účinky převažují účinky prospěšných komenzálů a urychlí tak proces karcinogeneze [64].

V onkologii je nyní také velmi studovaný vliv střevní mikrobioty na ovlivnění odpovědi hostitele na onkologickou terapii. V některých studiích bylo popsáno využití modulace střevní mikrobioty jako možné léčebné strategie při ovlivnění protinádorové terapie pomocí blokády imunitních kontrolních bodů (checkpoint inhibitory). K hlavním zástupcům patří monoklonální protilátky cílené proti PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1) a CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) receptoru. Tato léčba je úspěšně používána v indikaci např. metastazujícího maligního melanomu a indikace se stále rozšiřují na širokou škálu solidních tumorů. Střevní mikrobiota ovlivňuje pravděpodobně metabolismus protinádorových látek a reguluje imunitní odpověď hostitele [67]. Animální i humánní studie ukázaly, že protinádorový účinek léčby checkpoint inhibitory je potencován specifickými druhy střevní mikrobioty (např. *B. thetaiotaomicron* nebo *B. fragilis*). Nádory u myší léčených antibiotiky nebo u GF myší nereagovaly na tuto léčbu, dokud jim nebyla tato mikrobiota inokulována [68]. FMT pacientům neragujícím na protinádorovou terapii od dárců stolice z řad pacientů, kteří byli k této terapii vnímaví, potvrdila potenciální strategii k překonání této rezistence. FMT upravila složení mikrobiomu směrem k taxonům podporujícím účinnost této terapie a navodila klinickou odpověď i u pacientů, kteří původně na tuto léčbu nereagovali [69,70].

1.5.4. Mikrobiota a její vztah k imunitně podmíněným onemocněním

V poslední době byly popsány druhy patřící do lidské střevní mikrobioty, které mají terapeutický potenciál u zánětlivých onemocnění. Např. *Lactococcus lactis* exprimující interleukin-10, protizánětlivý cytokin, se v animálních studiích ukázal jako účinný při snižování zánětu při kolitidě a alergického zánětu dýchacích cest [7].

Na rozdíl od malého vlivu perorálně podávaných probiotik na systémová onemocnění dospělých, nedávná prospektivní multicentrická studie sledující 8 676 novorozenců se zvýšeným genetickým rizikem diabetu 1. typu (genotyp HLA-DR3/4) prokázala účinek časně podávaných probiotik. V této studii měli novorozenci, kteří dostávali probiotika podávaná mezi 0 až 27 dny po narození, o 60% nižší riziko autoimunitního onemocnění pankreatických ostrůvků ve srovnání s novorozenci bez

suplementace nebo se suplementací po 27 dnech od narození. Toto snížení rizika vzniku autoimunitní choroby nebylo prokázáno u dětí s nerizikovým genotypem [71].

Také zvýšená konzumace rostlinné stravy, bohaté na vlákninu má kromě efektu na snížení BMI i vliv na bakteriální složení ve střevě. Dochází ke snížení počtu oportunních patogenů, zvýšení produkce SCFA, snížení obsahu LPS a zánětlivých cytokinů, což vede ke snížení míry systémového zánětu, zlepšení citlivosti tkání na inzulin a podpoře optimální energetické rovnováhy [33,34]. Tento předpoklad byl potvrzen v krátké randomizované placebem kontrolované studii, v ní došlo u pacientů s astmatem, kterým byla perorálně podávaná rozpustná vláknina inulin, ke zlepšení zánětu dýchacích cest a kontroly astmatu spolu se změnami střevního mikrobiomu. Tato studie by mohla být příslibem možného potenciálu rozpustné vlákniny jako nefarmakologické léčby astmatu [72].

1.5.5. Mikrobiota a její vztah k IBD

IBD je onemocnění charakterizované chronickým zánětem gastrointestinálního traktu zahrnující ulcerózní kolitidu (UC) a Crohnovu chorobu (CD) s pozoruhodným celosvětovým nárůstem výskytu. Přestože patofyziologie není dosud zcela objasněna, byla u pacientů s IBD zjištěna významná role aberantní imunitní reakce proti střevní mikrobiotě [73]. Střevní mikrobiota u těchto pacientů vykazuje výrazně sníženou diverzitu, vyšší zastoupení potenciálních patogenů, a naopak snížené zastoupení bakterií produkujících butyrát. Míra dysbiózy u těchto pacientů ovlivňuje průběh a klinickou manifestaci IBD [74]. Pacienti s IBD mají vyšší riziko rozvoje a horší klinický průběh infekce *Clostridioides difficile* (CDI) včetně vyššího rizika recidivy CDI, nutnosti kolektomie i mortality [75].

1.5.6. Specifika střevní mikrobioty u pacientů na JIP

Prvotní inzult, způsobující kritické onemocnění, má zásadní vliv na změnu složení střevní mikrobioty. Během prvních šesti hodin po vzniku kritického onemocnění dojde ke ztrátě až 90 % komenzálních mikroorganismů a je následováno přemnožením střevních patogenů. Extrémní míra dysbiózy u pacientů na jednotce intenzivní péče (JIP) je spojena se zvýšenou náchylností k orgánovému selhání, sepsi a septickému šoku [76].

Analýza mikrobioty pacientů JIP, kteří byli v sepsi nebo v septickém šoku, vykazovala specifické dysbiotické „JIP enterotypy“, které není možné vysvětlit vlastnostmi hostitele nebo vnějšími faktory, a koreluje s klinickými příznaky i APACHE skóre pacientů [77]. Mezi hlavní zevní faktory ovlivňující mikrobiotu kriticky nemocných pacientů patří invazivní vstupy, medikace a reakce těla na stresové podněty jako je např. snížená produkce ochranného hlenu žaludku nebo hypoperfuze střevní stěny. Mezi další faktory patří katabolické hladovění a snížená pohyblivost střev, která ovlivňuje eliminaci bakterií z gastrointestinálního traktu. Tyto procesy vedou k pomnožení patogenních bakterií na úkor protizánětlivých mikroorganismů produkujících SCFA jako je *Faecalibacterium prausnitzii* aj. [78]. Faktory narušující střevní mikrobiální homeostázu vedou k apoptóze střevních epitelálních buněk, ke snížení integrity vrstvy hlenu, narušení tight junction a následnému průniku mikroorganismů a toxinů střevní stěnou do systémového oběhu cestou ductus thoracicus, což pravděpodobně přispívá k vyššímu počtu nosokomiálních infekcí, sepse a orgánovému selhání (MODS) [78]. V longitudinální studii případů a kontrol s téměř 11000 pacienty bylo demonstrováno, že nemocní hospitalizovaní s onemocněními asociovanými s dysbiózou, měli výrazně zvýšené riziko závažné sepse 90 dní po propuštění z nemocnice oproti pacientům hospitalizovaných pro onemocnění nesouvisející s narušenou střevní mikrobiotou [79,80].

1.6. Možnosti ovlivnění složení střevní mikrobioty

Spolu s rozvojem znalostí o vlivu mikrobioty na lidský organismus je v poslední době akcentována snaha najít možnosti, jak ovlivnit lidský mikrobiom cílenými terapeutickými přístupy. Posunulo se i chápání cíle intervence, a to od pouhé eliminace patogenů, které mohou způsobit onemocnění, směrem k zachování nebo obnovení „zdravého“ mikrobiomu. V lékařské praxi bylo použito mnoho metod ve snaze o manipulaci s hostitelskými bakteriemi. Patří mezi ně zejména dietní intervence, prebiotika, probiotika nebo fekální mikrobiální transplantace (FMT). Z těchto možností má FMT největší potenciál vyvolat významné změny v celkové komunitě střevní mikrobioty [9]

1.6.1. Prebiotika a probiotika

Prebiotika a probiotika jsou látky, díky nimž se snažíme ovlivnit složení mikrobioty za účelem zlepšení zdraví hostitele nebo zmírnění příznaků onemocnění [81]. Zaměřují se nejčastěji na gastrointestinální oblast, ale zkoumá se i jejich přímý vliv na jiná místa, jako je dutina ústní, vaginální trakt a kůže.

Prebiotika, poprvé definovaná v roce 1995, jsou složky potravy, nejčastěji oligosacharidy rostlinného původu nestravitelné pro člověka, které slouží jako substrát indukující růst nebo aktivitu zdraví prospěšných mikroorganismů [82]. Prebiotické účinky zahrnují obranu proti patogenům, modulaci střevního metabolismu a imunity, ovlivnění absorpce minerálů a pocit sytosti [83]. Z prebiotik jsou dobře osvědčené glukany a fruktany a přibývají důkazy o prebiotických účincích jiných látek (například oligomerů manózy, glukózy, xylózy, pektinu, škrobů, mateřského mléka a polyfenolů).

Probiotika jsou dle definice WHO živé mikroorganismy, které podány v dostatečném množství působí příznivě na lidský organismus [83]. Nejčastěji se probiotika odvozují od různých druhů a poddruhů rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Saccharomyces*. Nově se experimentuje i se zástupci dalších druhů bakterií, např. *Roseburia spp.*, *Akkermansia spp.*, *Propionibacterium spp.* a *Faecalibacterium spp.*. Zatím však využití těchto a dalších druhů probiotik naráží zejména na technologické problémy jako je manipulace s anaerobními druhy v aerobním prostředí, aj. [83]. Protože probiotika nejsou v USA ani v Evropě považována za léčiva, není jejich použití přísně regulováno, jako je tomu u léčivých přípravků. Odhaduje se, že v roce 2015 užilo nějakou formu probiotik nebo prebiotik 3,9 milionu dospělých Američanů, což je 4krát více než v roce 2007 [84]. Ačkoli existuje značný počet studií zkoumajících probiotika u různých gastrointestinálních onemocnění, jsou tyto studie vedeny rozdílně s použitím odlišných druhů a poddruhů mikrobů, dávkách i způsobu podávání, a proto je interpretace výsledů značně svízelná.

Přesto existují klinické indikace pro použití určitých probiotik podložené silnými důkazy. Na základě oficiálního doporučení Americké gastroenterologické asociace (AGA) o úloze probiotik při léčbě gastrointestinálních poruch bychom měli jejich užití zvážit zejména u onemocnění souvisejících s *Clostridioides difficile*, zánětlivých onemocnění střev, syndromu dráždivého tračníku (IBS), infekční gastroenteritidy a nekrotizující

enterokolitidy (NEC), tedy stavů, u nichž se běžně léčba probiotiky indikovala. Na základě AGA doporučení je indikováno použití probiotik *Lactobacillus spp* a *Bifidobacterium spp*. nebo *L. reuteri* jako prevence NEC u předčasně narozených dětí, neboť enterální suplementace probiotik u nich zabraňuje závažným NEC a snižuje mortalitu [84,85]. Stejně tak je dle AGA doporučeno užití probiotik při diagnóze pouchitis u dětí i dospělých. Další využití probiotik se dle doporučení AGA mají řídit klinickým rozhodnutím. Klinické studie při použití probiotik v prevenci i léčbě CDI vyznívají nejednoznačně. Metaanalýza v JAMA s 63 RCT, která zahrnovala 11811 účastníků, popsala statisticky významnou souvislost profylaktického či léčebného podávání probiotik se snížením průjmu spojeného s antibiotickou léčbou [86]. Byly publikovány i jiné metaanalýzy, jejichž závěry vyzněly ve prospěch probiotik v prevenci CDI, přesto evropská i americká guidelines probiotika obecně nedoporučují pro rutinní léčbu i profylaxi CDI [87,88].

Mezi další indikace použití probiotik mohou patřit nespecifické střevní záněty. Dosud bylo provedeno několik metaanalýz shrnujících současný výzkum probiotik u IBD. Metaanalýza hodnotící 18 placebem kontrolovaných studií zahrnujících 1491 pacientů s UC, kteří byli léčeni probiotiky, prebiotiky nebo synbiotiky vs. placebem nezaznamenala žádný významný účinek na udržení remise. Probiotika však pomohla dosáhnout remise v aktivní fázi onemocnění [89]. Další metaanalýza zahrnující 38 studií ukázala, že probiotika, prebiotika a synbiotika jsou účinná při dosažení a udržení remise, jejich použití snížilo index aktivity onemocnění u UC, ale ne u CD [90].

Výsledky klinických studií týkající se užití probiotik u kriticky nemocných pacientů jsou rozporuplné. V systematickém review a metaanalýze RCT z roku 2020 nebylo podávání probiotik u kriticky nemocných pacientů na JIP spojeno se statisticky významným zkrácením délky hospitalizace, ale snížilo výskyt VAP (ventilator-associated pneumonia), trvání mechanické ventilace, délku pobytu na JIP, výskyt průjmu a nemocniční mortalitu [91,92]. Jiná metaanalýza s 30 RCT dospěla k závěru, že probiotická terapie byla spojena s významným snížením infekce včetně VAP u kriticky nemocných, ale neměla žádný významný vliv na mortalitu, délku hospitalizace nebo průjem [93].

Rizika podávání probiotik. Modulace střevní mikrobioty probiotiky u rizikových pacientů s sebou může nést i řadu rizik, jak ukázala publikace popisující fungémii

Saccharomyces cerevisiae u pacientů na JIP léčených probiotiky obsahující *Saccharomyces boulardii*, kde se při genetické analýze kmeny z těchto probiotických kapslí shodovaly s klinickými izoláty od pacientů [94].

Další závažné nežádoucí účinky související s probiotickou terapií byly popsány také v multicentrické, dvojité zaslepené a placebem kontrolované klinické studii u pacientů s těžkou akutní pankreatitidou, kterým bylo podáno subpyloricky enterální multidruhé probiotikum. Ve skupině, která dostávala probiotika, zemřelo 24 ze 152 pacientů (16 %), oproti skupině s placebem, kde zemřelo 9 ze 144 pacientů (6 %) [95]. Nekróza tenkého střeva a následná mortalita byly pravděpodobně způsobeny kombinací poškození střevních epitelálních buněk proteolytickými pankreatickými enzymy spolu s podanou probiotickou terapií. Tato data poukazují na nutnost zvýšené opatrnosti při použití probiotik, zvláště u imunosuprimovaných nebo kriticky nemocných pacientů.

1.6.2. Fekální mikrobiální transplantace (FMT)

FMT představuje další metodu, která může významně měnit střevní mikrobiotu. Zdá se, že navýšení množství komenzálních protektivních bakterií střeva spolu s jejich mikrobiálními produkty cestou FMT může zamezit růstu patogenů, a tím zastavit progresi dysbiózy a jejích následků. Tento koncept je již často úspěšně používán při léčbě recidivujících CDI či jejích závažných forem, což je jediná indikace FMT dle mezinárodních guidelines, jak je uvedeno dále [88,96–98]. Mnohokrát však byl pozitivní klinický efekt po FMT popsán i v jiných indikacích, jako je jaterní encefalopatie, IBD (zejména ulcerózní kolitida), IBS (syndrom dráždivého tračníku) aj. kde je však metoda FMT zatím omezena pouze na výzkumné prostředí, nebo záchranné použití v případě neexistence alternativních terapeutických možností [96].

1.7. Dosavadní znalosti o metodě FMT

1.7.1. Princip FMT

Metodou fekální mikrobiální transplantace (FMT) se rozumí přenos minimálně zpracované stolice s mikroorganismy (zejména bakteriemi) a jejich produkty od zdravého dárce do zažívacího traktu příjemce. Aplikaci zpracované stolice lze provést

horní cestou (pomocí kapsle, gastroskopie nebo nasojejunální sondy) nebo dolní cestou (klyzmatem, sigmoidoskopií nebo kolonoskopií). Cílem tohoto výkonu je obnovení fyziologické diverzity střevní mikrobioty příjemce a zamezení rozvoje a následkům chorob, které dysbióza způsobuje či ovlivňuje.

Jako zásadní se v mechanismu působení FMT zdá obnovení střevní mikrobiální diversity a soupeření o prostor a živiny „zdravých“ komensálních bakterií od dárce se „škodlivými“ patogeny ve střevě příjemce, a tím potlačení růstu patogenů. Dále pak transplantovaná mikrobiota syntetizuje řadu protektivních látek (SCFA aj.), metabolizuje žlučové kyseliny ve střevě a tím zvyšuje obsah sekundárních žlučových kyselin, z nichž některé např. inhibují aktivaci spor a tím jejich přechod do metabolicky aktivního stavu i vegetativního růstu *C. difficile* aj. [45,99]. Novější údaje však ukázaly, že účinnost FMT nemusí být vysvětlena pouze obnovou střevních bakterií jako takových, ale i řadou jiných dalších faktorů, neboť FMT provedená se sterilním filtrátem či kapslí s minimálním množstvím bakterií byla při léčbě CDI také účinná [100–102]. Je tedy pravděpodobné, že další složky FMT filtrátu potenciálně zprostředkovávají mechanismus jejího účinku.

1.7.2. Doporučené postupy pro FMT

Přestože je FMT zejména v léčbě CDI zavedenou léčebnou metodou, její široké použití má řadu omezení. Dosud nejsou schváleny jednotné doporučené postupy ohledně výběru a testování vhodných dárců, stejně tak je samotný protokol FMT veden v různých zemích i jednotlivých centrech odlišně. Vzhledem k výše uvedenému je porovnávání studií se změřením na FMT zatíženo chybou při rozdílně vedeném protokolu, počtu opakování aplikace, samotné přípravě transplantátu či výběru dárců. V České republice se od roku 2018 řídí většina pracovišť provádějících FMT doporučeným postupem Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně, ve kterém je detailně popsána indikace i metodologie výkonu [103].

1.7.3. Vlastní metodologie FMT

Pokud lékař indikuje provedení metody FMT, je zapotřebí řádně edukovat pacienta a samozřejmě provést všechna potřebná administrativní opatření (podepsání informovaného souhlasu aj.).

V případě řádné indikace pak lékař kontaktuje pracoviště, které v dané nemocnici metodu FMT provozuje. Podle možností daného pracoviště je stolice pro filtrát (transplantát), který bude podán pacientovi, získána od zdravého vyšetřeného dárce v době indikace nebo může být použit již zpracovaný filtrát z banky stolice, zmražený na -80°C od dříve vyšetřeného dárce. Zmražené i čerstvé fekální suspenze jsou při správně vedeném protokolu přípravy a skladování stejně účinné pro léčbu infekce *Clostridioides difficile* [88,104–111]. Zmražené vzorky mají oproti čerstvým určité výhody, a to zejména větší bezpečnost (umožňují opakované testování dárce a dodržení doby karantény vzorku vzhledem k různé inkubační době virových infekcí), dostupnost a možnost flexibilního a rychlého podání pacientovi do několika hodin od indikace [112]. Bohužel však tato varianta není k dispozici na mnoha pracovištích v ČR. Velmi často proto musí být zvolena cesta akutního shánění vhodného dárce, který bývá většinou vybrán z řad rodinných příslušníků. Tato cesta má nevýhodu časové prodlevy, která čítá často několik dní (od chvíle indikace FMT přes vyšetření dárce, zpracování dárcovské stolice až k vlastnímu podání transplantátu).

1.7.3.1. Vyšetření dárce

Dárcem stolice by obecně měl být zdravý člověk ve věku 18-60 let. Dárce stolice jak pro akutní použití nebo pro zmražení filtrátu pro potřeby banky stolice musí být řádně vyšetřen (odebrání anamnézy, fyzikální vyšetření, laboratorní vyšetření) a musí vyplnit podrobný dotazník zaměřený na výskyt vylučujících kritérií dárce. Dotazník obsahuje seznam otázek, které jsou zaměřeny na odhalení rizikového chování, rizika infekčních chorob či vylučujících kritérií souvisejících s anamnézou potenciálních dárců. Pokud je dle dotazníku dárce shledán vhodným, je podroben komplexnímu vyšetření. Mezi laboratorní vyšetření dárce patří: **základní krevní vyšetření** (krevní obraz a diferenciál, CRP (C-reaktivní protein), ALT (alanin-aminotransferáza), AST (aspartát-aminotransferáza), ALP (alkalická fosfatáza), GGT (gama-glutamyltransferáza), bilirubin, kreatinin, glykémie), **vyšetření stolice**¹ na přítomnost *Clostridioides difficile* PCR

¹ pro rychlou analýzu stolice lze použít Gastrointestinální (GI) panel k záchytu běžných gastrointestinálních patogenů včetně virů, bakterií a parazitů. Systém integruje přípravu vzorků, amplifikaci, detekci i analýzu. Celková doba vyšetření je 1h. V naší nemocnici používáme přístroje BIOFIRE® FILMARRAY® (certifikace FDA, CE-IVD, TGA).

(polymerázovou řetězovou reakcí), kulturační vyšetření na běžné střevní patogeny (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*), standardní parazitologické vyšetření stolice a **sérologická vyšetření** jako jsou testy HIV 1,2 (protilátky proti HIV 1,2, antigenní test) a syfilidy (RRR nebo TPPA), screening virových hepatitid B a C (HBsAg, anti-HCV).

V případě testování dárců pro banku stolice či pro vysoce imunokompromitované pacienty je vyšetření dárce obsáhlejší než v doporučení pro ČR [103] a dle mezinárodních guidelines je doplněno o sérologická vyšetření virových hepatitid A a E (anti-HAV IgM, anti-HEV), vyšetření dárcovské stolice na přítomnost enteropatogenních *E.coli* (*EPEC*, *EAEC*, *ETEC*, *EIEC*, *STEC*), *Vibrio cholerae* (pokud byl dárce v posledních 6 měsících v tropických oblastech), *Listeria*, vyšetření stolice na přítomnost virů CMV (cytomegalovirus), Norovirus, Rotavirus, antigen *Helicobacter pylori* ze stolice, parazitologické vyšetření stolice na *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, Isospora, Microsporidia, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*, Strongyloides stercoralis (PCR), cyclospora and Isospora, *Blastocystis hominis*, laboratorní vyloučení přítomnosti mikroorganismů rezistentních na ATB (MDRO): VRE, ESBL, CRE ze stolice a MRSA z nasofaryngu, vyšetření na okultní krvácení a nasofaryngeální stěr PCR SARS-CoV-2 [96,111–113].

1.7.3.2. Příprava filtrátu stolice k FMT

Vzhledem k tomu, že naprostá většina bakterií ve stolici je anaerobní, vzorek čerstvé stolice dárce musí být co nejdříve zpracován a ihned využit k FMT, nebo smíchan s glycerolem a zamražen na -80 °C k pozdějšímu použití. Stolica by měla být zpracována nejpozději do 6 hodin po defekaci, aby nedošlo k zásadnímu poklesu množství viabilních bakterií. Z tohoto důvodu je dárce vyzván, aby donesl stolicí nejpozději do 2hodin od defekace. Ve studiích, kde byl tento interval prodloužen, došlo následně k snížení efektivity FMT [96,114].

K analýze se použijí předpřipravené panely BIOFIRE® FILMARRAY®GI Panel. Výčet patogenů BIOFIRE® FILMARRAY®GI Panel zahrnuje: *Campylobacter* (*jejuni*, *coli* & *upsaliensis*), *Clostridium difficile* (Toxin A/B), *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Yersenia enterocolica*, *vibrio* (*cholerae* parahaemolyticus, vulnificus), *E.coli* (EAEC, EPEC, ETEC, STEC, EIEC), Adenovirus, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus A, Sapovirus (I,II,IV,V), *Cryptosporidium*, *Cyklospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*.

Po donesení stolice dárce musí dojít k časnému zpracování stolice, v místě k tomu určenému (po konzultaci s nemocničním hygienikem), v němž je možné provést sanitaci prostoru a příslušenství dle doporučení. Nejčastěji se zpracování stolice provádí v laminárním boxu, který se využívá pouze ke zpracování vzorků stolice a jeho sanitace spolu s příslušenstvím probíhá podle platné směrnice, která je závazná pro dané zdravotnické pracoviště [96].

Před vlastním zpracováním je důležitá vizuální kontrola stolice, která by neměla být průjemovitá (hodnocení dle Bristol Stool Score) a neměla by obsahovat hlen či krev. Pokud je vzorek vyhodnocen jako vhodný, je zapotřebí provést homogenizaci čerstvé stolice. K homogenizaci se používá sterilní fyziologický roztok, kterým se stolice zředí přibližně v poměru 1:3 až 1:5 dle požadované výsledné konzistence. Pro výsledný transplantát je důležitá hustota, které se podřídí i doba mixování cca 1-2 min. V případě transplantátu podávaného formou klyzmatu odpovídá hustota řidší kaši, aby snadněji ulpívala na povrchu sliznice. Naopak pro aplikaci nasojejunální sondou je výhodnější nižší hustota, aby nedošlo k ucpání sondy. Homogenizace se provádí pomocí mixéru různých typů, vyhrazených pouze k těmto účelům s možností optimální sanitace. Po každém použití je provedena sterilizace dle vyhlášky č. 306 dvojestupňovou dezinfekcí. Homogenizát se poté filtruje přes gázu k odstranění nestrávených zbytků potravy a dalších nežádoucích příměsí. Použití dvou vrstev gázy se zdá jako optimální. Při použití pouze jedné vrstvy gázy dochází k nežádoucí příměsi velkých nestravitelných zbytků, pokud se naopak použije více vrstev, dochází k nedostatečné filtraci a ztrátě velkého množství nefiltrovaného materiálu. Podle plánované cesty podání se vzniklý extrakt stolice nasaje do sterilních stříkaček či irigačního vaku. Pro potřeby zmrazení filtrátu pro pozdější použití je potřeba výsledný extrakt ošetřit kryoprotektivní látkou. Pro tyto účely se dle doporučení používá glycerol tak, aby jeho koncentrace ve výsledném produktu činila cca 10-15 % [96]. Glycerol zabraňuje tvorbě velkých ledových krystalů a chrání tak bakterie před účinkem mrazu [115]. Extrakt s obsahem zmražený na teplotu -80°C může být dle doporučení uchováván a následně použit po dobu maximálně 12 měsíců. Banky stolice ve vyspělých zemích, např. OpenBiome nebo The Netherlands Donor Feces Bank, mají za těchto podmínek dobré zkušenosti se skladováním dokonce až po dobu 2 let. Pokud je filtrát zamražen pouze na -20 °C, nedoporučuje se jeho použití po 30ti dnech od zmražení z důvodu jeho snížené efektivity [96].

1.7.3.3. Karanténní a bezpečnostní opatření pro zamražený transplantát

V bankách stolice nesmí být vzorky zamražených FMT filtrátů z důvodů karanténních opatření rozmrazeny a použity k FMT po dobu dvou měsíců od data odběru. Dárce je povinen informovat lékaře o jakékoli změně svého zdravotního stavu, zejména o infekčním onemocnění, průjmu apod. kdykoliv od doby darování stolice. Pokud dárce daruje stolicí opakovaně, vždy znovu při každém donesení stolice aktuálně vyplní dotazník a minimálně každé 3 měsíce absolvuje kompletní screening na základě analýzy krve a stolice (viz výše) [96,112]. Po uplynutí nejméně čtyř týdnů od posledního odběru stolice je dárce opět kompletně vyšetřen (fyzikální vyšetření, vyšetření krve a stolice totožné se vstupním vyšetřením) z důvodu možné falešné negativity serologického vyšetření na infekční choroby. Do doby vyhodnocení výsledků je zamražená stolice umístěna do karantény a nelze ji použít. Až při potvrzení negativních výsledků všech odebraných vzorků na přítomnost infekce je možné považovat dárce za neinfekčního, zmražený vzorek za bezpečný a může být použit pro potřeby FMT [96]. Referenční vzorek z každé zmražené šarže má být uchován určitou dobu po provedení FMT pro možnost potenciální další analýzy, pokud by se vyskytly komplikace spojené s výkonem [96,112].

1.7.3.4. Vlastní provedení transplantace stolice

Transplantace stolice se zpravidla provádí během krátkodobé hospitalizace z důvodu rizika možných komplikací. Na základě indikace, kontraindikací, lokálních zvyklostí a pacientových preferencí je volena cesta podání transplantátu. V případě, že se filtrát podává endoskopicky horní cestou pomocí nasojejunální sondy zavedené gastroskopem do tenkého střeva či spodní cestou kolonoskopem, provádí aplikaci gastroenterolog. Při jiných formách podání pak může filtrát aplikovat také internista či infektolog. V případě, že je použitý čerstvý vzorek stolice, aplikace do zažívacího traktu je provedena ihned po zpracování dárce stolice. V případě, že jde o aplikaci zmraženého vzorku, rozmrazování se provádí ponořením kontejneru s extraktem stolice do vody o teplotě 37 °C na cca 30 min. Rozmražený vzorek musí být použit do dvou hodin od doby rozmražení. Opětovné zmražení rozmraženého nebo částečně rozmraženého extraktu není přípustné.

Aplikace transplantátu cestou klyzmatu či kolonoskopicky. Den před provedením FMT je pacientovi orálně podáno osmotické laxativum (Fortrans) v množství 2-4l dle individuálního zhodnocení stavu pacienta (závažnost průjmu, indikace k FMT, celkový stav). Ráno v den výkonu pacient lační, dvě hodiny před FMT je podán Loperamid 2 mg p.o. Poté je dle protokolu do tlustého střeva pomalu cca 15 min aplikováno 250-350 ml filtrátu a následně je zaváděcí systém (irigátor/kolonoskop) pomalu extrahován. Poté se pacient napoložuje nejdříve do levostranné a pak do pravostranné semilaterální Trendelenburgovy polohy na 15 min. Aplikace filtrátu kolonoskopicky se dle literatury jeví jako efektivnější než klyzmatem či orální cestou [116,117].

Aplikace transplantátu cestou gastrokopu či nasojejunální sondy. Při podání extraktu do horního úseku GIT pacient lační minimálně 6-8 hodin před výkonem a 2 dny před výkonem jsou podány inhibitory protonové pumpy (omeprazol 20mg 2x denně). Také při aplikaci filtrátu z indikace recidivující CDI horní cestou je indikováno použití osmotického projímadla v redukováném množství (2l Fortrans) den před výkonem, z důvodu očisty střeva od spor CD. Cca 2-3 hod před výkonem se podávají perorálně či intravenózně prokinetika. Pacientovi je v poloze na levém boku zaveden gastrokop do žaludku, poté pylorem do bulbu dudoena a dále do oblasti orálního jejunu, kde buď pracovním kanálem gastrokopu nebo pomocí zavedené nasojejunální sondy aplikujeme 200-300 ml tekutého extraktu pomalou aplikací 15-30 min. Po výkonu nesmí pacient minimálně dvě hodiny přijímat nic perorálně [96].

Aplikace transplantátu cestou kapslí. Velice zajímavé jsou nedávno publikované studie, kdy k léčbě CDI byla použita FMT ve formě kapslí. Tyto studie popisují, že použití lyofilizovaných kapslí je srovnatelně účinné a bezpečné jako „klasická“ FMT bez procedurálních rizik kolonoskopie [108,116,118–123]. O tom, že lyofilizací lze udržet viabilní mikrobiotu po desetiletí, existuje řada prací [124,125]. Recentně byla publikovaná metaanalýza, která dospěla k závěru, že míra vyléčení CDI při FMT podávané kolonoskopicky je vyšší než při FMT podávané nazogastrickou sondou nebo klyzmatem, přičemž míra vyléčení FMT podávané v kapslích je srovnatelná s mírou vyléčení při FMT aplikované kolonoskopicky [116]. Více nežádoucích účinků se vyskytlo u pacientů, kteří podstoupili FMT prostřednictvím kolonoskopie než u pacientů, kteří dostali klyzma nebo perorální kapsle [87,119,126].

1.7.4. Komplikace FMT

I přes obavy ohledně bezpečnosti této metody však bylo v dosavadních studiích prokázáno, že FMT je bezpečná a účinná metoda, dokonce u imunokompromitovaných pacientů [127]. Práce hodnotící nežádoucí události (AEs) související s FMT popsala mezi roky 2000-2020 tento jev u 19 % FMT výkonů, přičemž nejčastěji hlášenými AEs byly průjemy (10 %) a diskomfort, bolesti a křeče břicha (7 %). Závažné nežádoucí události (SAEs), včetně infekcí a úmrtí, byly hlášeny u 1,4 % pacientů, kteří podstoupili FMT, a všechny souvisely s poraněním střevní stěny [128]. Jiná metaanalýza hodnotící míru závažných nežádoucích příhod (SAE) souvisejících s FMT ukázala, že k nežádoucím účinkům u pacientů s CDI podstupujících FMT došlo u 0,65 % (95%CI 0,45-0,89; $P < 0,001$) pacientů [129]. Závažné komplikace FMT jsou z dostupných dat pouze ojedinělé a související většinou s aplikací, jako např. aspirace po podání transplantátu horní cestou, krvácení do horní části gastrointestinálního traktu po zavedení nazogastriické sondy, perforace tlustého střeva během kolonoskopie, nebo raritně přenos multirezistentních bakterií [130,131]. Aplikace do dolního gastrointestinálního traktu či FMT cestou kapslí je bezpečnější [88,118].

Současné pokyny pro FMT v klinické praxi zdůrazňují důležitost speciálních protokolů pro screening dárců, jejichž hlavním cílem je zajistit bezpečnost a minimalizovat riziko přenosu patogenních infekčních agens [130,132]. Tato problematika se stala mimořádně aktuální po přenosu patogenních kmenů *Escherichia coli* z dárce stolice na dva imunokompromitované příjemce, u kterých se vyvinula bakteriémie se smrtelným následkem u jednoho z pacientů [112,130]. To přimělo FDA k požadavku na zahrnutí vyšetření multirezistentních organismů (MDRO) do protokolů bank stolice pro screening dárců vhodných pro FMT [133]. Ze stejného důvodu je doporučeno z potenciálních dárců stolice vyloučení osob se zvýšeným rizikem expozice MDRO (tj. zdravotnických pracovníků, nedávno hospitalizovaných osob atd.) [112].

Existuje diskuse ohledně rizika přenosu „prokancerogenních“ bakteriálních kmenů, jako např. enterotoxigenní *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum* nebo colibactin-produkující *E. coli* [134]. Současná doporučení pro screening dárců zahrnují vyloučení jedinců s maligními nebo chronickými zánětlivými onemocněními. Zda jsou tato kritéria dostatečná k zamezení přenosu potenciálně patogenních mikrobiálních

kmenů, není dosud známo a bude potřeba dalších studií pomocí metagenomického sledování bakteriálních kmenů dárce a příjemce k pochopení toho, do jaké míry může jejich přenos vyvolat rozvoj specifických onemocnění [135].

1.8. FMT - zavedené indikace

FMT je používána zejména pro léčbu onemocnění souvisejících s dysbiózou. Tato metoda, nyní široce používána po celém světě, byla popsána již 300-400 let před naším letopočtem v Číně lékařem Hong G, jako použití fekální suspenze k léčbě vážných stavů, např. otravy jídlem nebo horečky [136]. V novodobých dějinách došlo k renesanci této metody zejména v souvislosti s nárůstem užívání antibiotik a terapií pseudomembranózní enterokolitidy, kde FMT slouží k navýšení komensální střevní mikrobioty a k následné obnově rezistence ke kolonizaci a inhibici růstu patogenů, včetně *C. difficile*. V současné době je metoda FMT dle evropských i amerických guidelines schválena pouze v indikaci recidivující CDI (rCDI). V této indikaci mnoho studií potvrdilo, že namísto potlačení infekce více antibiotiky je účinnější obnovení vlastní zdravé mikrobioty, která může „bojovat“ s patogeny [87,88,96–98,119,137–143]. Kromě efektivity FMT v léčbě CDI je v neposlední řadě věnována pozornost také jejím finančním výhodám ve srovnání s klasickou antibiotickou léčbou. Je dokumentována nákladová efektivita se snížením ekonomické zátěže, pokud se do terapie CDI začlení jako alternativa FMT [140,144].

FMT je s opakovaně dokumentovaným pozitivním klinickým efektem používána i v dalších indikacích jako je IBD, IBS (syndrom dráždivého tračníku), jaterní encefalopatie aj., kde je však zatím metoda FMT omezena pouze na výzkumná prostředí nebo nouzové použití v nepřítomnosti alternativních terapeutických možností [45,96,128].

1.8.1. Infekce způsobené *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile je obligátní anaerobní, sporulující, grampozitivní tyčinka poprvé identifikovaná v roce 1935 jako *Bacillus difficilis*. Původně byl považován za komezála, teprve v roce 1977 se zjistilo, že souvisí s průjmy spojenými s podáváním antibiotik a pseudomembranózní kolitidou [145,146]. V 90. letech 20. století byla CDI

stále vzácná, avšak od počátku roku 2000 se její výskyt a závažnost mnohonásobně zvýšily a stala se nejčastější nozokomiální infekcí [144].

Bezpříznaková kolonizace *Clostridioides difficile* v zažívacím traktu se vyskytuje u 4% -15% zdravých dospělých a až u 21% hospitalizovaných pacientů [88]. Pokud dojde k narušení fyziologické mikrobiální diverzity střeva, např. při léčbě antibiotiky, mohou se tyto potenciálně patogenní mikroby pomnožit ve sliznici tlustého střeva a zvýšenou produkcí toxinů způsobit těžkou kolitidu až s nekrózou sliznice. CDI je zodpovědná za 15–25 % průjmů spojených s léčbou antibiotiky, z nichž nejrizikovější jsou peniciliny, cefalosporiny, klindamycin a fluorochinolony [144,147]. Jako rizikový pro rozvoj CDI je dále věk nad 65 let, medikace (PPI, nesteroidní antirevmatika, imunosuprese), závažné komorbidity (chronické onemocnění ledvin, DM, IBD, malignity aj.), invazivní přístupy (orotracheální intubace, nasogastrická sonda) či dlouhodobý pobyt v nemocnici [144,148–150]. V dnešní době je CD jedním z nejčastějších patogenů způsobujících nozokomiální infekce. Klinický obraz CDI je variabilní, od asymptomatického přenašečství nebo mírného průjmu až po fulminantní, život ohrožující kolitidu s toxickým megakolon, perforací tlustého střeva, multiorgánovým selháním a dokonce smrtí.

CDI je spojena s významnou morbiditou a mortalitou. Údaje z Healthcare Cost and Utilization Project v USA v letech 1993–2008 odhalily trvalý nárůst počtu hospitalizací spojených s CDI, který v roce 2008 dosáhl 348 950 hospitalizací [151]. Podobně se v tomto období zvýšil podíl pacientů s komplikovaným onemocněním, definovaným jako rozvoj toxického megakolon, perforace, nutnost kolektomie nebo vazopresorické podpory či úmrtí.[151]. Průjem způsobený CDI vyvine 0,9 % ze všech hospitalizovaných pacientů a 2 % pacientů hospitalizovaných na JIP. Ze všech pacientů s průjmem na JIP je 11 % CDI pozitivních, z nichž 25 % vyvine pseudomembranózní kolitidu [152]. Mortalita pacientů s CDI je celkově 2-6 %, u pacientů na JIP je dle dostupných studií až 20 % [31]. Rozsáhlá studie v USA odhadla 30denní hrubou úmrtnost po stanovení diagnózy CDI na 9,3 % mezi infekcemi souvisejícími se zdravotní péčí [153]. Z předchozích informací jasně vyplývá, že se léčba pacientů s CDI stala za poslední desetiletí mimo jiné obrovskou finanční zátěží pro zdravotnický systém [140,144].

1.8.1.1. *Terapie primoinfekce CDI*

Racionální antibiotická terapie s odpovídající dávkou a délkou léčby zůstává jedním z klíčových způsobů, jak snížit riziko závažného CDI [87,88,138]. Přerušení podávání antibiotik může být komplikované, neboť mnoho pacientů s CDI má souběžně dokumentovanou infekci, pro kterou jsou léčeni antibiotiky [38,41,49]. Antibiotická terapie je na druhé straně metodou volby pro primární terapii CDI, které vyléčí asi 80 % případů [45]. V České republice byl recentně vydán aktualizovaný doporučený postup pro léčbu nemocných s kolitidou vyvolanou *Clostridioides difficile*, který je v některých aspektech odlišný od evropských guidelines z roku 2021, zejména s ohledem na délku primární antibiotické terapie [138,154]. Mezi hlavní antibiotika při léčbě CDI patří perorální vankomycin, fidaxomicin, metronidazol a tigecyklin. Lékem volby u hospitalizovaných pacientů je orálně podávaný fidaxomicin nebo vankomycin, u ambulantně léčených nemocných s lehkým průběhem první ataky CDI lze použít rovněž metronidazol. Při nemožnosti orální terapie je lékem první volby tigecyklin intravenózně, neboť se do střevního lumen dostává intestinální sekrecí. Při útlumu peristaltiky a rozvoji ileu je v některých případech nutné zajistit přístup do ilea nebo céka a do takto vytvořených vstupů aplikovat laváže s vankomycinem nebo fidaxomicinem. Vankomycin i metronidazol působí proti vegetativním formám CD. Jejich nevýhodou je, že neinhibují tvorbu spor a vedou k významnému narušení střevní mikrobiální diverzity. Naopak fidaxomicin je nové baktericidní antibiotikum, které inhibuje činnost bakteriální DNA-dependentní RNA-polymerázy. Důsledkem je zastavení proteosyntézy, což vede k přerušení syntézy toxinů a zablokování schopnosti sporulace. Tím se výrazně snižuje riziko opakování infekce CDI [138,155].

Nejnovějších studie z Evropy a Austrálie ukazují, že použití antibiotik jako „předléčby“ CDI u pacientů s vysokým rizikem rekurence není efektivní, což zdůrazňuje benefit FMT terapie již při první infekci CDI [156]. Je tedy velmi pravděpodobné, že se v nejbližší době na základě dalších studií změní doporučení ohledně léčby primoinfekce CDI ve prospěch FMT oproti antibiotické léčbě.

1.8.1.2. *Terapie rekurentní a fulminantní CDI*

Asi u 20-30 % pacientů s primární CDI se vyvíjí **rekurentní infekce CD (rCDI)**, zejména v důsledku přetrvávání spor v gastrointestinálním traktu, proto se riziko relapsu zvyšuje s každou další recidivou [88]. K rekurenci CDI obvykle dochází do dvou měsíců od předchozí ataky. Při léčbě první rekurence je dle doporučení indikována terapie fidaxomicinem, druhou možností je podat vankomycin s následnou FMT. Při léčbě druhé a další rekurence je indikováno podání vankomycinu následované FMT. Pouze v případě, že není možné provést FMT, je vhodné prodloužené podávání vankomycinu nebo fidaxomicinu v klesajícím režimu (*taper, pulse*) [138].

Podle mezinárodních doporučených postupů je FMT indikována pouze u pacientů s rCDI, kteří absolvovali odpovídající léčbu antibiotiky po dobu alespoň dvou epizod CDI, u kterých se následně objeví třetí nebo další epizoda [88,97,137,150,157]. Účinnost FMT v této indikaci ověřily různé randomizované kontrolované studie (RCTs) a metaanalýzy [117,120,143,158–160]. Průměrná účinnost léčby rCDI pomocí FMT byla v recentních metaanalýzách mezi 82-95% [119,161]. Kromě toho je míra rekurence CDI po FMT nižší (5-15 %) ve srovnání s antibiotiky vankomycinem (35-65 %) a fidaxomicinem (25 %) [141,159,162].

FMT u fulminantní CDI (fCDI). Dle doporučení lze FMT zvážit také jako terapeutickou možnost pro závažné a fCDI (definované jako závažné CDI s hypotenzí nebo šokem, ileem či toxickým megakolon) bez odpovědi na standardní terapii po 48 hodinách [96,126]. Pacienti s fulminantní kolitidou jsou často kriticky nemocní nebo starší lidé s mnohočetnými komorbiditami a záchranná FMT pro ně může být účinnější a bezpečnější terapií než operace [88,163–167]. V retrospektivní kohortové studii u hospitalizovaných 111 pacientů se závažnou CDI dramaticky snížila časná FMT úmrtnost oproti kontrolní skupině léčené pouze standardní antibiotickou terapií (12,1 % vs 42,2 %) a byla doporučena autory jako součást léčby první volby v této indikaci [168].

FMT byla popsána jako účinná a bezpečná metoda také u **imunokompromitovaných pacientů** po transplantaci solidních orgánů léčených pro rekurentní, závažnou nebo fulminantní CDI. Přestože se jednalo o vysoce rizikovou skupinu pacientů, závažné nežádoucí účinky související s FMT se vyskytly pouze ve 3,2 % případů bez zaznamenané bakteriémie související s FMT [169].

1.8.2. Použití FMT z indikace nespecifických střevních zánětů

Také u pacientů s nespecifickými střevními záněty (IBD) je opakovaně popsán příznivý efekt FMT. Přestože FMT je jako léčebná metoda pro CDI zavedena po celá desetiletí, její využití pro IBD začalo až v roce 2012 [170]. Použití FMT v indikaci léčby CDI bylo u pacientů s IBD méně úspěšné než u pacientů bez IBD (74,4 % vs 92,1 %; $P = 0,0018$) pravděpodobně kvůli vyšší míře dysbiózy způsobené vlastním střevním zánětem.

RCT popisující použití FMT u pacientů s IBD prokazují klinické, endoskopické a histologické zlepšení ve výrazně větším procentu než placebo [131,171,172]. Existuje několik případů kriticky nemocných pacientů s IBD, u kterých byla FMT úspěšně použita jako záchranná léčba. Prospektivní studie jednoho centra popsala pacienty s refrakterní UC, u nichž selhala protizánětlivá a imunosupresivní terapie, a FMT byla jejich poslední šance před operací. Po záchranné FMT bylo u 43,3 % pacientů dosaženo klinické, endoskopické a laboratorní remise bez závažných nežádoucích účinků. Podle těchto zjištění lze FMT považovat za možnou modalitu záchranné léčby před chirurgickým zákrokem u pacientů s refrakterní UC [173]. Je však potřeba mít na paměti, že u části pacientů s IBD může FMT naopak zhoršit průběh onemocnění a způsobit klinicky významný relaps [174,175].

1.8.3. Použití FMT z indikace závažných postantibiotických průjmů a syndromu bakteriálního přerůstání v tenkém střevě

Nedávná čínská práce popisuje 18 kriticky nemocných pacientů z JIP s průměrem asociovaným s antibiotickou terapií (AAD), kteří byli úspěšně léčeni záchrannou FMT z čínské fmtBanky. Průměrné skóre APACHE II při přijetí na JIP bylo $21,7 \pm 8,3$ (rozmezí 11–37) a všichni pacienti měli komplikovanou extraintestinální infekci. Většina pacientů dosáhla po FMT klinického zlepšení a poklesu laboratorních parametrů zánětu bez závažných komplikací souvisejících s FMT [176]. Recentně publikovaná placebem kontrolovaná studie na 55 pacientech s bakteriálním přerůstáním tenkého střeva (SIBO) prokázala klinické zlepšení po FMT (lyofilizované kapsle jednou týdně po dobu 4 týdnů) a žádné klinické zlepšení při podávání placeba [177]. K jasným doporučením je však zapotřebí rozsáhlejších studií.

1.8.4. Použití FMT z dalších indikací

Mezi další onemocnění, která jsou v literatuře popsána jako úspěšně léčená pomocí FMT, patří jatrní encefalopatie, eradikace střevních multirezistentních Enterobacteriaceae, IBS nebo kazuistiky popisující léčbu septických stavů při těžké dysmikrobii [96,178–180]. Byly uskutečněny studie, které naznačují, že FMT může být slibnou možností léčby některých neurologických onemocnění [181].

Příznivý efekt FMT byl popsán také na inzulinovou senzitivitu u obézních osob s metabolickým syndromem a hladinu glykovaného hemoglobinu u pacientů s DM2T [182,183]. U pacientů s pokročilým maligním melanomem, refrakterních na terapii checkpoint inhibitory (ICIs), byla po aplikaci FMT filtrátu od pacientů reagujících na tyto léky (ICI respondenti) zvýšená klinická odpověď na tuto léčbu [184,185]. Mezi zajímavou indikací použité FMT patří kazuistika tří pacientů s těžkou refrakterní kolitidou (acute graft-versus-host disease GI-aGvHD) po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (allo-HSCT), kde se FMT prokázala jako atraktivní léčebná modalita spojená s ústupem symptomů po opakované FMT navzdory snížení souběžné imunosupresivní medikace. Je zajímavé, že i přes dočasné vysazení profylaktických antibiotik (na ochranu transplantované mikrobioty) nebyly pozorovány jakékoli infekční komplikace, bakteriemie či systémové infekce související s FMT [186].

Dostupných studií popisujících efektivitu a bezpečnost metody FMT v těchto indikacích je však stále málo a s rozporuplnými výsledky. K dalšímu ověření účinku a bezpečnosti FMT v těchto experimentálních indikacích jsou zapotřebí rozsáhlé dvojité zaslepené randomizované kontrolované studie.

1.9. Optimální složení filtrátu stolice pro metodu FMT

Stejně jako dosud neexistují jednotná doporučení pro přípravu a aplikaci FMT filtrátu, neexistuje ani jasná definice toho, jaké by měl mít filtrát stolice složení a který dárce je pro potenciálního příjemce optimální. Z dostupné literatury je zřejmé, že zdravý dárce, který dodržuje zdravý životní styl, má větší pravděpodobnost, že složení jeho stolice bude mít příznivý klinický efekt na terapii dysbiózy, pokud bude dodržen

optimální protokol přípravy a aplikace filtrátu. Jak ale definovat optimální složení stolice a jaké složky jsou zásadní pro klinický efekt metody, není dosud přesně objasněno.

1.9.1. Složení filtrátu stolice

Odhaduje se, že stolice dospělých jedinců tvoří průměrně 75 % vody a 25 % pevných látek, z nichž tvoří bakterie cca 25-54 %, a tedy 6,3 až 13,5 % z celkového množství stolice. Průzkum 14 literárních zdrojů uvádí průměrnou hodnotu $0,9 \times 10^{11}$ bakterií/g vlhké stolice [2]. Dle dostupné literatury je pravděpodobné, že princip fungování FMT není zprostředkován pouze přenosem bakterií ze stolice dárce do střeva příjemce ale i řadou dalších složek FMT filtrátu připraveného ze stolice dárce jako jsou mrtvé mikroorganismy, jejich metabolické produkty, bakteriofágy, střevní virom, střevní epitelie dárce, organické látky pocházejí ze zbytků nestrávené potravy, imunitní buňky a protilátky (například imunoglobulin A) [100,102,187]. Mezi důležité látky produkované mikroorganismy během trávení a metabolismu obsažené ve filtrátu patří například SCFA, butyrát, propionát a acetát, které mají významné protizánětlivé účinky. Různé další faktory, z nichž celá řada není dosud objasněna, ovlivňují úspěch FMT.

1.9.2. Výběr vhodného dárce stolice

Výběr vhodného zdravého dárce stolice a optimální rychlé zpracování vzorku je klíčovou součástí úspěchu FMT [188]. Mimo doporučení týkající se kompletního vyšetření dárce s cílem vyloučit možné rizikové faktory přenosu infekce či jiných onemocnění (viz výše) je dosud nejasný pohled na to, která kombinace dárce – příjemce vede k nejlepšímu výsledku. Dostupná literatura, která se zabývá otázkou, jak využití stolice od příbuzného nebo anonymního dobrovolného dárce ovlivní klinickou účinnost FMT, nabízí rozporuplné výsledky [13,189–191]. Jsou studie, které popisují, že volba dárce, ať už jde o příbuzného, manžela/manželku nebo anonymního dobrovolníka, nemá vliv na klinickou účinnost FMT [189,190]. Jiné práce pak popisují, že stolice od rodinných příslušníků má menší klinický efekt ve srovnání s použitím filtrátu z banky stolice [13].

V literatuře se objevuje také fenomén, který ukazuje na to, že některý dárce stolice je pro metodu FMT vhodnější než jiný, takzvaný „superdárce“. Bylo dokumentováno, že mikrobiální rozmanitost stolice dárce je spolehlivým ukazatelem

pravděpodobného klinického úspěchu FMT [188,191–194]. Tento fenomén je způsoben pravděpodobně schopností dárce poskytnout nezbytné taxony schopné obnovit metabolické deficity u příjemců přispívající k onemocnění [45,188,195]. Nicméně nejen tento parametr je zásadní. Předpokládá se, že existují jednotlivci, jejichž střevní mikrobiom má určité charakteristiky, jako je přítomnost nebo nepřítomnost specifických (bohužel ne ještě plně prozkoumaných) bakterií, fágů a metabolitů, které chrání dárce před vznikem dysbiózy [196]. Také vliv individuálních dominujících bakteriálních kmenů ve stolici dárce interagující s bakteriálními kmeny ve střevě příjemců byl popsán jako možný faktor ovlivňující výslednou mikrobiální komunitu a efekt FMT [197]. Bakteriální střevní osídlení dárce i příjemce i jejich vzájemná kompatibilita jsou tedy pravděpodobně velmi důležitým parametrem, který však v tuto chvíli neumíme vyhodnotit tak, abychom dokázali každému pacientovi přiřadit dle analýzy stolice optimálního dárce [198].

1.10. Efekt FMT

Definice úspěchu FMT je především založena na pozitivní klinické odpovědi u příjemce, ať už se jedná o snížení počtu průjmů (CDI, AAD, IBD), zmenšení dyspeptických obtíží (IBS) nebo pokles zánětlivých parametrů (IBD). Nicméně z mikrobiologického hlediska lze úspěch FMT také definovat jako posun v profilu střevní mikrobioty jedince směrem k dárce. Sekvenačními technikami ve vzorcích stolice dárce a příjemce bylo zjištěno, že příjemci s vyšším zastoupením dárce kmenů (mikrobiální engraftment) měli při hodnocení napříč studiemi větší pravděpodobnost klinického úspěchu po FMT [199].

1.10.1. Faktory ovlivňující úspěch FMT

Úspěch FMT ovlivňují faktory na straně dárce (dieta, střevní bakteriální diverzita, přidružená onemocnění aj.), příjemce (celkový imunitní stav, genetické faktory, věk, strava, přidružená onemocnění, skladba střevní mikrobioty aj.), vedení protokolu přípravy a aplikace FMT filtrátu [135]. Neexistuje však univerzální pravidlo, co je pro kterého dárce optimální. Například pacienti s některými chorobami mohou po FMT profitovat z navýšení butyrát produkujících bakterií (např. CDI, IBD), což však neplatí

u jiných indikací (např. jaterní encefalopatie), kde jsou pravděpodobně benefitní jiné bakteriální druhy. Další faktory, které bude třeba lépe definovat, jsou kritéria kompatibility dárce a příjemce, které mají pravděpodobně zásadní význam pro úspěšnou kolonizaci střeva příjemce dárcovskou mikrobiotou a klinický úspěch FMT [45].

1.10.2. Ovlivnění mikrobiomu po FMT

Podpora transplantovaného mikrobiomu prostřednictvím stravy by mohla být prospěšným doplňkem protokolů FMT. Vyšší konzumace vlákniny je prediktivní pro úspěch transplantace mikrobioty u podskupiny pacientů s CDI [200]. Mezi další ovlivnitelné faktory, které vyvíjí selekční tlak na příjemcův mikrobiom, patří kromě stravy, expozice xenobiotiky včetně antibiotik, doba trvání a závažnost onemocnění, prostředí, ve kterém se pacient nachází, fyzická aktivita aj. [45,191,192].

1.11. Legislativa FMT

1.11.1. Právní regulace metody FMT ve světě

Přestože je metoda FMT široce využívána po celém světě a její potenciál i patofyziologii zkoumalo v době přípravy této práce více než 460 klinických studií, dosud chybí standardizované pokyny pro nábor a screening dárce, odběr, způsob přípravy a skladování filtrátu FMT i pro vlastní aplikaci metody [110,201,202]. Je zřejmé, že protokol přípravy a skladování filtrátu ovlivňuje jeho konečné složení, zejména množství a diverzitu životaschopné mikrobioty [109,203–206]. Mezinárodní konsenzus nabízí doporučení na osvědčené postupy, nicméně pokyny pro přípravu ani požadavky na konečnou kvalitu a složení filtrátu stolice, zejména pokud jde o životaschopnost bakterií, nejsou dosud jednotně definovány [96,111,157]. Přístupy k legislativnímu zařazení FMT se celosvětově výrazně liší. V mnoha zemích je produkt získaný ze stolice pro účely FMT považován regulačními orgány za léčivý přípravek, který podléhá přísným regulačním opatřením. V jiných zemích je klasifikován jako produkt lidských buněk a tkání, případně jako biologická léčba. V některých zemích je regulace FMT flexibilnější a jeho použití je povoleno v rámci běžné lékařské praxe. Například v USA, Kanadě, Francii a České republice je FMT filtrát klasifikován jako léčivý přípravek, jehož použití je možné pouze

v rámci klinických studií nebo s výjimkami v nemocničním prostředí [113,128,135]. V červenci 2022 vydala Komise EU legislativní návrh na zahrnutí fekální mikrobioty do eurounijní legislativy týkající se krve, tkání a buněk. Rada Evropy zveřejnila pátou verzi Pokynů pro kvalitu a bezpečnost tkání a buněk, která obsahuje kapitolu o střevní mikrobiotě. Jsou zde uvedena doporučení pro screening, ale nejvhodnější rámec zůstává věcí členského státu [113].

1.11.2. Standardizace FMT jako léčivého přípravku

Zařazení FMT do skupiny léčivých přípravků vyvíjí tlak na její standardizaci z hlediska bezpečnosti a účinnosti. Na rozdíl od chemicky syntetizovaných léků s dobře definovanou strukturou je definice biologických látek, jako je stolice, složitá a obtížná k charakterizaci. V České republice bylo roku 2016 Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL) rozhodnuto, že FMT spadá do kategorie léčivých přípravků. Z tohoto důvodu bylo požadováno standardizovat metodu FMT a pokusit se definovat optimální složení filtrátu. Vzhledem k tomu, že viabilita bakterií je klíčovým ukazatelem optimálního složení filtrátu FMT, bylo ze strany SÚKL stanovení množství viabilních bakterií v FMT filtrátu určeno jako jeden ze zásadních parametrů jeho kvality [96,206,207].

1.12. Stanovení bakteriální viability ve vzorcích stolice

Řada autorů zabývajících se mikrobiotou tvrdí, že nazývat buňku „živou“, lze pouze v případě, že je neporušená, schopná reprodukce a metabolicky aktivní. Na základě tohoto tvrzení existují tři aspekty mikrobiální životaschopnosti: (1) přítomnost funkčních nukleových kyselin, které umožňují transkripci/translaci a replikaci DNA, (2) přítomnost buněčné energie a (3) přítomnost neporušené buněčné membrány, která udržuje jedinečné vnitrobuněčné prostředí [208,209]. Mezi nejčastěji používané metody stanovení životaschopnosti mikroorganismů patří kultivační metody a metody nezávislé na kultivaci. Vzhledem k tomu, že existuje velké množství různých bakteriálních druhů s různými vlastnostmi (grampozitivní/negativní buněčná stěna, rychle rostoucí nebo s nízkým buněčným metabolismem atd.), je nutné zvolit správnou metodu stanovení životaschopnosti [209].

1.12.1. Kultivační metody

V roce 1881 zavedl Robert Koch techniku kultivace a identifikace mikroorganismů pomocí charakterizace jejich biochemických a fyziologických vlastností. Kultivační metody určené ke stanovení bakteriální viability prokazují schopnost buňky dělit se do kolonií v laboratorních podmínkách na kultivačním médiu, které se snaží napodobit prostředí, které poskytuje hostitelský organismus. Pro optimální růst, množení a metabolismus bakterií na umělých médiích musí být splněno několik základních podmínek, jako je přítomnost zdroje živin, kultivační atmosféra, teplota, vlhkost prostředí, osmotický tlak, pH atd. Jedná se o relativně levnou a široce dostupnou metodu, která je stále považována za zlatý standard pro stanovení životaschopnosti buněk. Neúspěšná kultivace však není důkazem nepřítomnosti života [6,208–210]. Některé bakterie jsou živé, ale nedaří se je prokázat běžnými kultivačními technikami z důvodu nevhodných kultivačních podmínek, kultivačního média nebo extrémně pomalého růstu. Tyto organismy se obecně označují jako „nekultivovatelné“ bakterie, ale lepší název by měl být „životaschopné, ale nekultivovatelné“ [6,208,209]. Pouze 15-20 % mikrobů žijících v lidském střevě je snadno kultivovatelných [196].

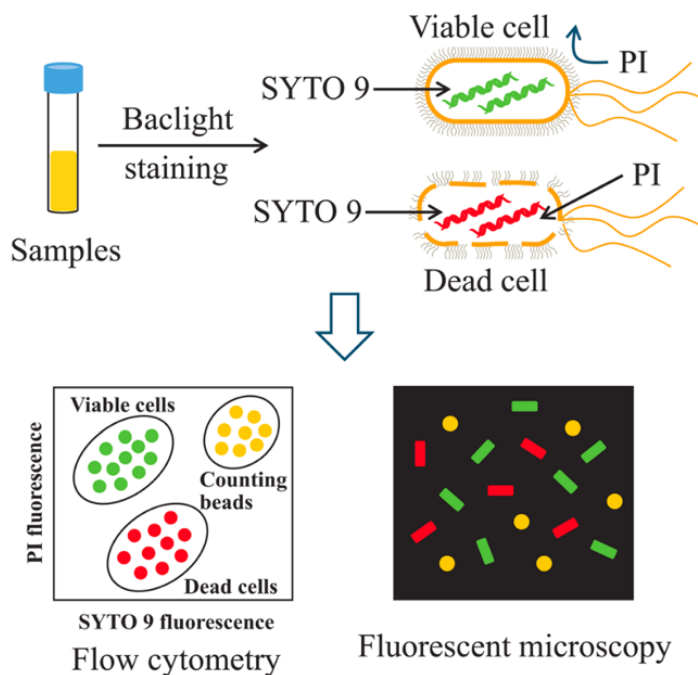
1.12.2. Stanovení integrity buněčných membrán pomocí barvení SYTO9 a propidium jodidu

Bakteriální membrána tvoří bariéru mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím. Její závažné poškození vede k buněčné smrti v důsledku neschopnosti udržet jedinečné intracelulární prostředí zvýšením propustnosti pro látky, které za normálních okolností nemohou mezi vnitřním a vnějším prostředím volně procházet. Nejčastěji používanou metodou pro stanovení integrity membrány je fluorescenční barvení spojené s průtokovou cytometrií pomocí předem namíchaných a k použití připravených duálních barvicích souprav, jako je například BacLight™ (Live/Dead Bacterial Viability Kit, L-7007). Výhodou je rychlé a spolehlivé posouzení životaschopnosti bakterií, které poskytuje navíc kvantitativní výsledky [211]. Tato souprava se skládá ze dvou látek, SYTO9 a propidium jodidu (PI), pro označení DNA, která umožňují specifickou analýzu pomocí fluorescenční emise. Bakterie jsou obvykle malé buňky o velikosti od 0,5 do 10 µm a je obtížné je odlišit od šumu pozadí

generovaného cytometrem. Z tohoto důvodu se k oddělení bakterií od rušivých elementů používá marker cílený na DNA. První barvivo (např. SYTO9) obarví všechny nukleové kyseliny čímž lze spočítat všechny buňky ve vzorku (mrtvé i živé). Druhé barvivo (např. propidium jodid, PI) proniká pouze narušenou buněčnou membránou a barví tak pouze mrtvé nebo odumírající buňky, ale také extracelulární DNA. Lokalizace barviva uvnitř buněk umožňuje sčítání všech buněk. Porovnáním počtů z obarvených a neobarvených vzorků tak lze určit počet viabilních buněk [208,210,211].

Charakterizace PI a SYTO9: PI je velké (668 Da), červené fluorescenční barvivo s vysokou afinitou, které se běžně používá k identifikaci mrtvých buněk v populaci, protože proniká pouze do buněk s poškozenými membránami. Následně se váže na nitrobuněčné nukleové kyseliny (dvouřetězcovou DNA) s jednou molekulou barviva na čtyři až pět párů bází, bez preference sekvence. Po navázání na DNA se fluorescence PI zvýší 20 až 30krát. Naproti tomu zeleně fluoreskující barvivo nukleové kyseliny SYTO9 proniká do živých i mrtvých bakteriálních buněk a barví tak všechny buňky. Když je barvivo SYTO9 vázáno na nukleovou kyselinu, jeho fluorescenční signál je významně zesílen. Pokud ale naopak barvivo není vázáno, vykazuje vlastní fluorescenční signál nízký. Ve chvíli kdy jsou přítomna obě barviva, PI má silnější afinitu k nukleovým kyselinám než SYTO9, a proto je SYTO9 vytěsněno barvivem PI. Výsledné barvení tedy způsobí, že živé buňky s neporušenými buněčnými membránami fluoreskují zeleně (DNA obarvená SYTO9), zatímco mrtvé buňky, s poškozenými membránami (DNA obarvená PI), fluoreskují červeně (viz Obrázek 1.1) [208,210–214].

Obrázek 1.1. Schéma barvení živých/neživých buněk barvivem SYTO9 a PI a jeho aplikace v kombinaci s průtokovou cytometrií a fluorescenční mikroskopií.



Živé a mrtvé *E. coli* obarvené pomocí soupravy pro stanovení životaschopnosti bakterií jsou znázorněny zeleně, resp. červeně. Obrázek použit z článku Zhuang, Linlin, et al. "Progress in methods for the detection of viable *Escherichia coli*." *Analyst* 149.4 (2024): 1022-1049.

1.12.3. Jiné metody využívající integritu membrány ke zjištění životaschopnosti buněk

Mezi další metody nezávislé na kultivaci, které slouží k posouzení životaschopnosti mikrobiomu, patří například propidium monoazid (PMA). PMA se váže na mrtvé bakterie a inhibuje amplifikaci PCR tím, že se nevratně váže na dvouřetězcovou DNA v buňkách s poškozenými membránami nebo extracelulární DNA, kde inhibuje další detekci DNA pomocí ddPCR (digitální kapková PCR, *droplet digital PCR*). Životaschopné buňky PMA vyloučí. To dále umožní vypočítat životaschopnost bakterií kvantifikací poměru DNA s PMA a bez PMA pomocí ddPCR [215,216]. Buňky pozitivní a negativní na PMC lze oddělit na separačním průtokovém cytometru a následně určit taxonomické složení obou subpopulací pomocí některé ze sekvenačních metod. [216,217]. Na základě nedávné studie však nelze životaschopnost bakterií pomocí PMA v různých komplexních společenstvech přesně kvantifikovat. Tato metoda je účinná pro semikvantitativní účely v jednoduchých syntetických společenstvech, ale ve skutečných komplexních vzorcích

mikrobiálních společenstev poskytuje pouze kvalitativní hodnocení, které není schopno přesně kvantifikovat životaschopné taxony zobecnitelným způsobem [218].

1.13. Banka stolice

Použití zamraženého filtrátu ze zásob banky stolice je výhodné nejen s ohledem na časovou dostupnost a bezpečnost metody, ale i celá logistika přípravy a aplikace FMT, řízena jedním týmem s odpovídající zkušeností podle jasně stanovených pravidel, je z mnoha důvodů výhodnější (viz výše).

Banky stolice mají celosvětově přísné protokoly pro screening a testování dárců s cílem zabránit přenosu infekčních nebo jiných nemocí od dárce k příjemci. Rozšířený screening dárců pomocí molekulárních metod testování je zásadní pro snížení rizika přenosu multirezistentních bakterií, které byly nedávno FDA ve Spojených státech amerických vyhlášeny za riziko pro FMT [133]. Jak již bylo řečeno, neexistuje jednotný postup vyšetření dárců ani přípravy, skladování a aplikace FMT filtrátu, tudíž jednotlivé banky stolice postupují dle lokálních pravidel založených na doporučení odborníků.

Mezi hlavní výhody bank stolice patří: 1. zmražené FMT filtráty zvyšují bezpečnost metody (umožňují opakované testování dárce a dodržení doby karantény vzorku); 2. připravené zmražené FMT filtráty můžou být použit prakticky ihned od stanovení diagnózy a rozhodnutí o indikaci k FMT a není tak opožděna léčba pacienta; 3. logistické a ekonomické výhody [112]. Podle dostupných doporučení lze správně připravený a zmražený FMT filtrát od testovaných dárců v bance stolice skladovat při teplotě -80°C po dobu 12–24 měsíců, bez snížení jeho účinnosti [96,105,111,219].

2. Hypotézy a cíle práce

- I. Přenos fekální mikrobioty jako terapeutický postup je dosud v ČR schválen pouze v případě rekurentní infekce *Clostridioides difficile*, v kontextu prospektivních randomizovaných studií se uvažuje o testování FMT v širším spektru nemocí asociovaných s dysbiózou.

Cílem této části práce bylo navrhnout protokol randomizované klinické studie zaměřené na hodnocení účinnosti, proveditelnosti a bezpečnosti metody fekální mikrobiální transplantace (FMT) při léčbě a prevenci recidivy postantibiotického průjmu u kriticky nemocných pacientů na jednotce intenzivní péče, ve srovnání se standardní léčbou.

- II. Významnou limitací klinického využití FMT je doba použitelnosti zmrazeného biologického materiálu. Přísné požadavky na bezpečnost, zejména dodržení karanténní doby v délce 2 měsíců, by představovaly závažnou překážku, pokud by kvalita materiálu významně klesala i při střednědobé délce zmražení.

Cílem této části práce bylo stanovit změny viability zmrazeného biologického materiálu uchovávaného po dobu jednoho roku metodou aerobní a anaerobní kultivace.

- III. Metoda kvantifikace viabilních bakterií na principu stanovení integrity buněčných membrán pomocí fluorescenčního barvení je validována na použití v čistých bakteriálních kulturách. Využití v heterogenním matrix, kterou je stolice, může být problematické a výsledky mohou být zkresleny.

Cílem této části práce bylo ověřit spolehlivost metody založené na fluorescenčním barvení živých a mrtvých buněk při hodnocení viability bakterií ve vzorcích stolice.

- IV. Množství viabilních bakterií v materiálu pro FMT je důležitým parametrem kvality, přesto dosud neexistují závazné postupy pro ověření množství viabilních mikroorganismů v FMT filtrátu. Zvolená metoda testování viability bakterií výrazně ovlivňuje výsledek a nevhodná metoda může vést ke zkreslení.

Cílem poslední části práce bylo srovnání dvou metod stanovení viability bakterií (kultivační vs měření integrity bakteriální membrány) v podmínkách testování FMT filtrátu s ohledem na jejich spolehlivost a reproducibilitu a navrhnout postup aplikovatelný v podmínkách rutinního klinického využití.

3. Metodologie

3.1. Protokol randomizované studie

V souladu s klinickými požadavky jsme navrhli protokol prospektivní, multicentrické, randomizované, otevřené, kontrolované studie FEBATRICE (Faecal bacteriotherapy for postantibiotic diarrhoea in critically ill patients). Studie byla vypracovaná v souladu s pokyny pro design protokolu dle SPIRIT guidelines (Standard Protocol Items: Recommendations for Interventional Trials). Na základě kritérií pro zařazení a vyloučení ze studie (inclusion a exclusion criteria) bude do studie zařazeno 36 kriticky nemocných pacientů starších 18 let, kteří splňují diagnostická kritéria pro průjem asociovaný s antibiotiky (AAD). Každé centrum bude provádět screening subjektů samostatně, dokud nebude dosaženo cílové velikosti vzorku (36 subjektů). Pacienti budou randomizováni do jedné ze dvou skupin v poměru 1:1 pomocí počítačově generované náhodné sekvence čísel vytvořené v softwaru R (<http://www.randomization.com>). Intervenční skupině bude podána standardní léčba doplněná o FMT aplikovanou formou klyzmatu. V kontrolní skupině budou pacienti dostávat standardní léčbu AAD. Primárně sledovaným výsledkem studie je selhání léčby definované jako nepodání intervenční léčby nebo přetrvávající průjem 7. den po randomizaci. Sekundární výsledky zahrnují sledování bezpečnosti a také recidiva průjmu do 28 dnů od randomizace. Experimentální výsledky se zaměřují především na funkci střevní bariéry a hledání vztahu mezi úspěšností léčby a složením dárcovské mikrobioty. Jedná se o nezaslepenou studii a zkoušející i klinický tým budou informováni o přidělení léčby pacientům. Při hodnocení primárních výsledků bude nezávislý hodnotitel, který nebude znát léčbu pacienta, a bude získávat údaje o výsledcích z ošetřovatelských záznamů. Údaje budou zadávány do na míru vytvořeného elektronického formuláře (eCRF), který bude přístupný online, což zajistí snadné zadávání a konzistentní sběr dat na různých pracovištích. Po dokončení studie budou soubory anonymizovaných údajů zpřístupněny pro sekundární výzkum pomocí platformy REDCap (Research Electronic Data Capture). Postupy správy dat v rámci studie budou v souladu s etickými pokyny a právními požadavky, včetně nařízení GDPR. Na monitorování a hodnocení bezpečnosti

a průběhu studie bude dohlížet Rada pro dohled nad bezpečností a monitorováním dat (DMSB).

Studie byla schválena Etickou komisí pro multicentrické klinické studie FNKV (rozhodnutí č. KH/40/00/2021), získala povolení SÚKL pro klinické hodnocení léčiv (Sp.zn. sukls134460/2021), je zapsána v databázi EudraCT (2021-002290-25) a je registrována na ClinicalTrials.gov (NCT05430269). Protokol studie je v souladu s Helsinskou deklarací (změna z roku 2013) a všichni dárci poskytli písemný, prospektivní informovaný souhlas. Studie byla zahájena v únoru 2023 a předpokládaný termín dokončení je v červenci 2025.

3.2. Subjekty

3.2.1. Charakteristika dárců stolice pro FMT

Vzorky lidské stolice byly odebrány v rámci studie FEBATRICE. Dárci podstoupili screening podle protokolu klinické studie FEBATRICE (NCT05430269) [220]. Celkem byla získána stolice od devíti dárců (2 ženy, 7 mužů), medián věku 36 let (min 25; max 42), medián BMI 23,7 kg/m² (min 17,6; max 27,8). Celkem bylo zpracováno 15 vzorků stolice. Sběr stolice od dárců pro tuto studii začal 1. března 2022 a nábor skončil 1. června 2022. Protokol studie byl schválen Etickou komisí pro multicentrické klinické studie FNKV (rozhodnutí č. KH/40/00/2021) a je v souladu s Helsinskou deklarací (změna z roku 2013). Všichni dárci poskytli písemný, prospektivní informovaný souhlas.

3.2.2. Myší modely

Vzorky stolice germ-free (GF) myší C57Bl6/J byly získány z kolonie chované v Gnotobiologické laboratoři Mikrobiologického ústavu AV ČR, Nový Hrádek, ČR. Vzorky z konvenčně chovaných (CONV) myší C57Bl6/J byly získány z chovného zařízení IKEM, Praha.

3.3. Zpracování vzorků

3.3.1. Příprava FMT filtrátu z dárcovské stolice

Stolice dárců neprůjmovité konzistence (Bristol stool scale 2-4) bez hlenu nebo krve byla zpracována do čtyř hodin od defekace podle standardního postupu schváleného pro klinickou studii FEBATRICE [220]. Vzorky byly zředěny ve sterilním 0,9% NaCl v poměru 1:3 až 1:5 dle konzistence a homogenizovány speciálním ručním mixérem (Mulinex, typ DD45A1). Vzniklá směs byla filtrována přes sterilní gázu pro zajištění homogenity, smíchána s glycerolem (do výsledné koncentrace 10 %) a skladována ve sterilních kontejnerech při -80 °C po dobu jednoho roku.

3.3.2. Zpracování FMT filtrátu pro stanovení bakteriální viability pomocí kultivace

Z připraveného FMT filtrátu byly odebrány vzorky ke zpracování kvantitativní kultivací. První vzorek byl zpracován ihned po odběru (čas 0 měsíců), další čtyři byly zamrazeny na -80°C a zpracovány po uplynutí 3, 6 a 12 měsíců. Zmražené FMT filtráty byly před analýzou rozmrazeny při 36 °C po dobu 10 minut. Optimální ředění vzorku bylo vyhodnoceno po sérii testů s různým ředěním odlišného množství homogenátu. Finální protokol zahrnoval odběr 300 µl (0,3 ml) homogenátu, který byl následně ředěn do 3ml fyziologického roztoku (FR). Výsledný roztok byl dále ředěn desítkovou řadou až do ředění 1:10 000 (viz Tabulka 3.1). Vzhledem k tomu, že filtrát obsahoval drobné částice, které mohly ovlivnit přesnost měření pomocí pipety, u stanoveného odměřeného objemu byla pro ověření přesnosti odběru změřena také hmotnost vzorku.

Tabulka 3.1. Ředění FMT filtrátu pro in vitro kultivaci

označení zkumavky	ředění	vzorek	FR
A	1 : 10	0,3 ml <u>homogenátu</u>	2,7 ml
B	1 : 100	0,3 ml A	2,7 ml
C	1 : 1000	0,3 ml B	2,7 ml
D	1 : 10 000	0,3 ml C	2,7 ml

3.3.3. Zpracování vzorků pro určení bakteriální viability pomocí stanovení membránové integrity

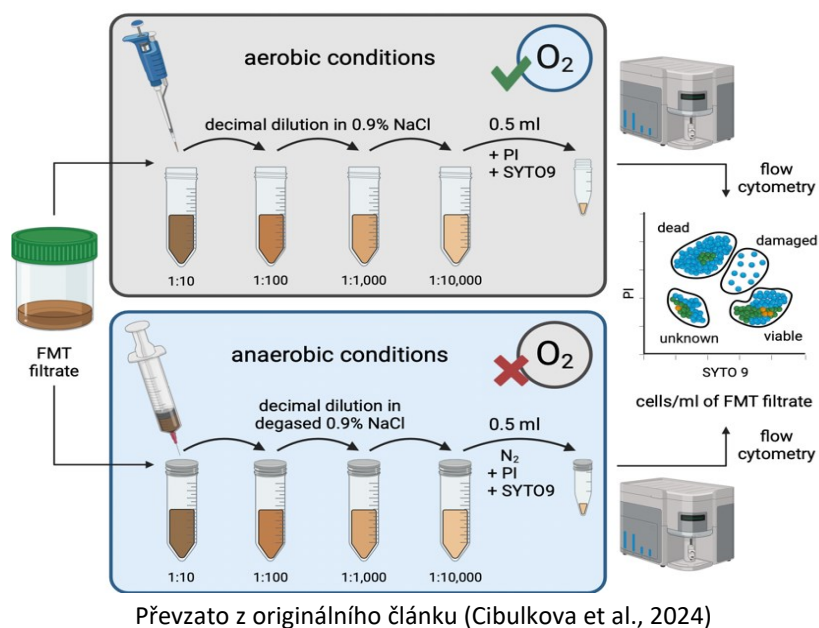
3.3.3.1. Zpracování FMT filtrátu v aerobních podmínkách

Zmražené FMT filtráty byly rozmrazeny při 36 °C po dobu 10 minut a postupně naředěny fyziologickým roztokem do výsledné koncentrace 1:10 000. V některých experimentech, kde bylo nutné zvýšit počet mrtvých bakterií, byly vzorky inkubovány při 80 °C po dobu 15 minut, čímž se zvýšil počet usmrčených bakterií. Pro stanovení viability na základě měření integrity buněčné membrány metodou průtokové cytometrie byly vzorky smíchány s fluorescenčními barvivami (SYTO9 a PI) podle pokynů výrobce.

3.3.3.2. Zpracování FMT filtrátu v anaerobních podmínkách

Připravili jsme alikvoty odplyněného fyziologického roztoku. Fyziologický roztok byl rozplněn po 9 ml do sterilních skleněných lahvíček, 15 minut probubláván dusíkem a uzavřen pryžovou zátkou s hliníkovým okrajem. Nepřítomnost kyslíku byla kontrolována pomocí resazurinu. Následně byl FMT filtrát zamražený na -80 °C rozmražen v uzavřené nádobě po dobu 10 minut při 36 °C. Po rozmražení byla nádobka s FMT filtrátem otevřena, obsah byl nasát 18G jehlou do injekční stříkačky a 1 ml suspenze byl vstříknut jehlou přes gumový uzávěr do lahvičky s odplyněným fyziologickým roztokem (ředění 1:10). Obsah lahvičky byl vortexován a stejný postup se opakoval, dokud jsme nedosáhli ředění 1:10 000. Alikvotní část (500 ul) naředěné suspenze byla přenesena do jiné zkumavky a byla přidána barviva (SYTO9 a PI) dle pokynů výrobce. Zkumavka byla umístěna do 50 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem, která byla naplněna plynným dusíkem, uzavřena šroubovacím uzávěrem a utěsněna parafilmem. Takto byl vzorek uchováván až do měření na průtokovém cytometru (viz Obrázek 3.1).

Obrázek 3.1. Postup aerobního a anaerobního barvení vzorků filtrátu stolice



3.3.3.3. Zpracování myší stolice

Všechny vzorky myší stolice byly před zpracováním v našem experimentu uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před experimentem byly vzorky myší stolice (100 mg) rozmrazeny při pokojové teplotě po dobu 10 minut, zředěny s 0,9% NaCl v hmotnostním poměru 1:4, homogenizovány vortexováním a následně byl do směsi přidán glycerol (do výsledné koncentrace 10 %) tak, aby se výsledná směs myší stolice co nejvíce podobala FMT filtrátu z lidské stolice. Před analýzou pomocí průtokové cytometrie byly vzorky smíchány s fluorescenčními barvivami (SYTO9 a PI) podle pokynů výrobce.

3.3.3.4. Zpracování bakteriální kultury

V experimentech byla použita přes noc kultivovaná kultura *E. coli* ATCC 10536 (CCM 3988) (50 ml Luria-Bertani média, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 ot./min), která byla z roztoku získána centrifugací. Peleta byla resuspendována v 10 ml 0,9% roztoku NaCl a poté naředěna desítkovou řadou na konečnou koncentraci 1:20000. Jedna polovina vzorku byla ponechána (živé bakterie), druhá polovina byla tepelně ošetřena při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut a následně byly namíchány směsi s různými poměry živých a tepelně ošetřených bakterií. Před stanovením viability bakterií na základě měření integrity buněčné membrány metodou průtokové cytometrie byly vzorky smíchány s fluorescenčními barvivami (SYTO9 a PI) podle pokynů výrobce.

Všechny laboratorní práce spojené s měřením, ředěním, barvením a přípravou vzorků před analýzou na průtokovém cytometru byly prováděny v Centru experimentální medicíny *IKEM*.

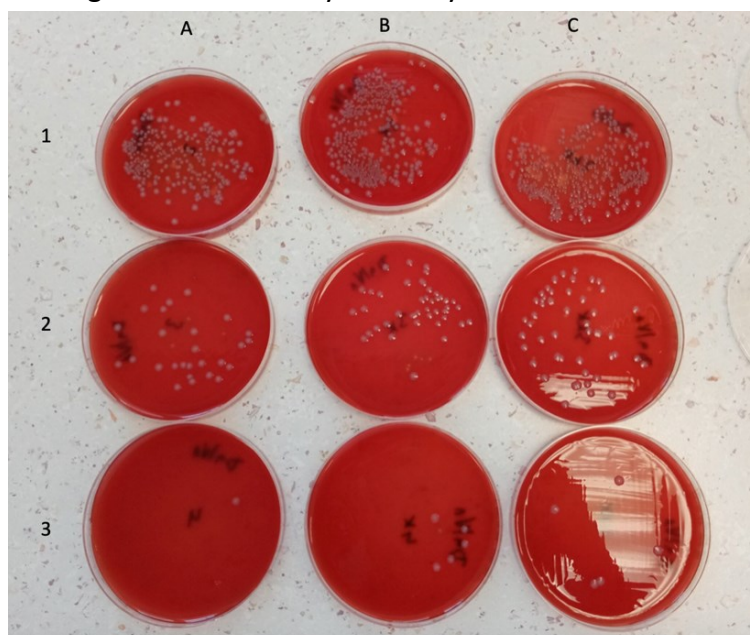
3.4. Kultivace FMT filtrátu in vitro

Alikvoty po 10 µl z ředění B, C, D, E byly naočkovány na krevní agar Columbia pro aerobní kultivaci a na Schaedlerův agar obohacený vitaminem K pro anaerobní kultivaci. Kultivace v prostředí bez kyslíku probíhala v anaerobní komoře se složením plynu 85 % dusíku, 10 % vodíku a 5 % oxidu uhličitého. Krevní agarové desky pro aerobní kultivaci byly inkubovány při 37 °C 24 hodin, Schaedlerovy agarové desky byly v anaerobním systému inkubovány při 37 °C po dobu 48 hodin.

Výpočet CFU:

Po uplynutí kultivační doby byl vypočítán počet jednotek vykultivovaných kolonií (CFU) v 1 ml původního homogenátu (CFU/ml). Z jednoho vzorku FMT filtrátu byly zpracovány paralelně tři alikvotní části (každý vzorek odebrán samostatně), které byly následně zředěny a kultivovány výše uvedeným způsobem při všech procesech (viz Obrázek 3.2). Počet kolonií (N) na každé desce byl spočítán manuálně a výsledný počet CFU/ml byl stanoven podle vzorce: $CFU/ml = N \times 100 \times \text{faktor ředění}$.

Obrázek 3.2. Kvantitativní aerobní kultivace jednoho vzorku FMT filtrátu na kultivačních plotnách s krevním agarem Columbia vyočkovaným v různém ředění.



Sloupce A; B; C ukazují 3 technické replikáty jednoho vzorku. Řádky 1; 2; 3 značí postupná ředění (1:100; 1:1000; 1:10 000).

Všechny laboratorní práce spojené s měřením, ředěním a kultivací vzorků, včetně výpočtu CFU, byly prováděny v laboratoři Ústavu mikrobiologie FNKV.

3.5. Průtoková cytometrie

Ke stanovení viability bakterií na základě měření integrity buněčné membrány byl použit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (ThermoFisher Scientific, USA) pro mikroskopii a kvantitativní testy, kat. č. L7012, podle pokynů výrobce [214]. V prvním kroku byly ke každému vzorku (500 ul) přidána fluorescenční barviva (0,75 ul SYTO9 a 0,75 ul propidium iodide). Směs byla inkubována 15 minut ve tmě při pokojové teplotě a poté podrobena analýze. V druhém kroku byly vzorky měřeny mezi 15. a 30. minutou po přidání fluorescenčních barviv. K analýze na průtokovém cytometru jsme použili 100 µl naředěného vzorku. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech opakováních na čtyřlaserovém průtokovém cytometru BD LSR II s excitací 488nm a emisí 525/50nm (=500-550nm) pro SYTO9 a s excitací 561nm a emisí 610/20nm (=600-620nm) pro propidium jodid v laboratoři Cytometrického a mikroskopického pracoviště Mikrobiologického ústavu AV ČR.

3.6. Statistické metody

Pro kulturační metody byly v každém časovém bodě zaznamenány počty jednotek tvořících kolonie (CFU), které slouží jako ukazatel množství živých bakterií. Výsledky z průtokového cytometru byly uváděny jako počet událostí (counts). Pro některé analýzy byly naměřené hodnoty logaritmovány ($\log_{10}$). Vliv doby zamražení na viabilitu bakterií byl testován pomocí lineárního regresního modelu se smíšenými efekty. U každého vzorku proběhla opakovaná měření, takže v modelu byla zohledněna variabilita jak uvnitř vzorku během skladování, tak mezi vzorky. V tomto modelu byl faktor času považován za faktor s pevným efektem v rámci vzorků a podmínky kultivace a označení vzorků za faktory s náhodnými efekty. Statistická významnost pevných efektů byla posouzena pomocí Waldova testu. Analýza byla provedena v jazyce Python (MixedLM package). Statistická analýza výsledků z průtokové cytometrie byla provedena pomocí Mannova-Whitneyho U-testu (Prism v5.0, GraphPad). Variační koeficienty byly vypočteny jako (směrodatná odchylka/průměr) x 100 %. Na hladině významnosti 0,05 byly všechny testy statisticky významné.

4. Výsledky

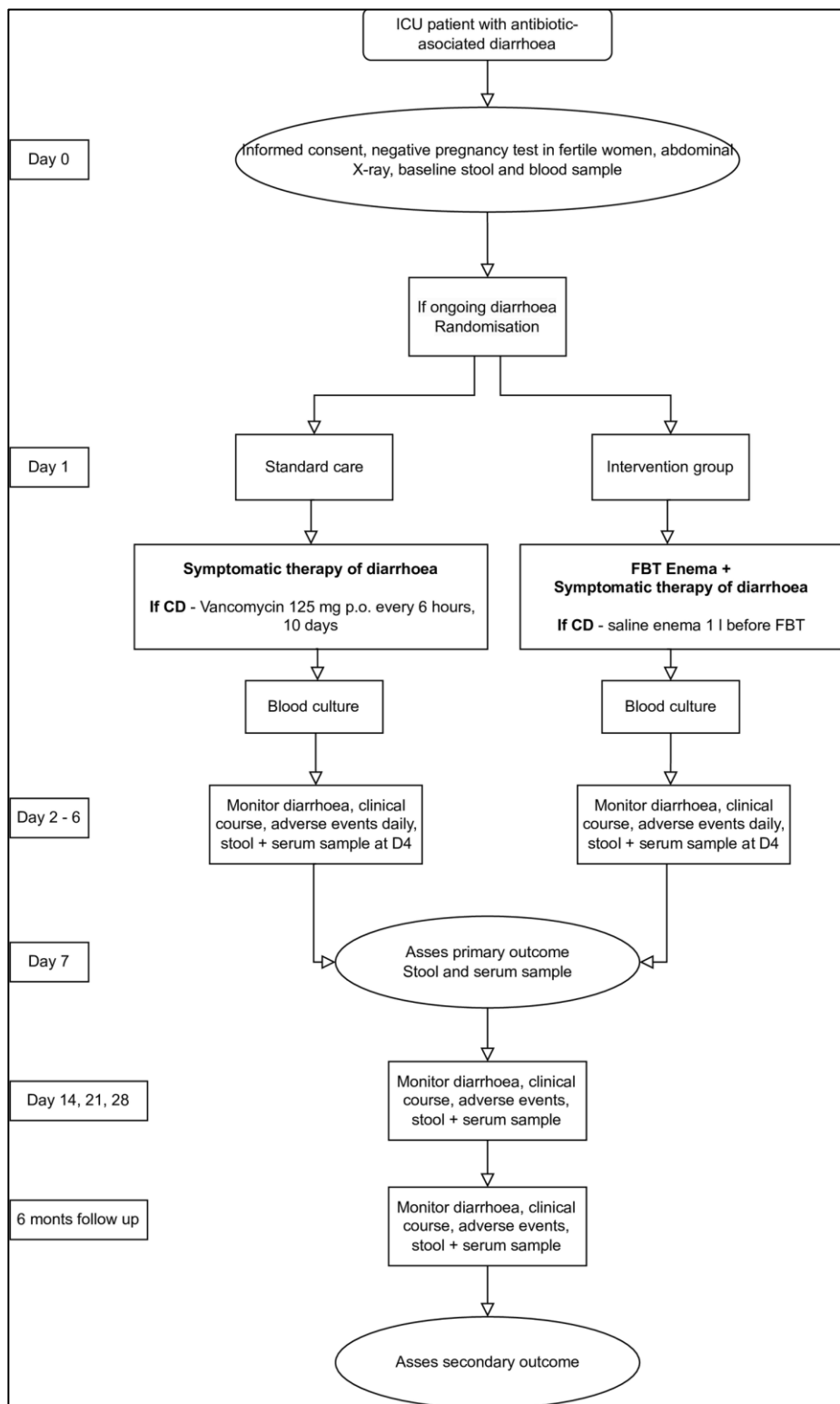
4.1. Protokol studie FEBATRICE

Vypracovali jsme protokol multicentrické randomizované kontrolované studie zaměřené na použití alogenní FMT u kriticky nemocných pacientů s postantibiotickým průjmem FEBATRICE (Faecal bacteriotherapy for postantibiotic diarrhoea in critically ill patients). Protokol studie byl schválen Etickou komisí FNKV, zadán do databáze EUDRA CT (2021-002290-25), schválen ze strany SÚKL v režimu KHL (klinické hodnocení léčiv) a studie byla registrována na www.clinicaltrials.gov (NCT05430269). Design studie je znázorněn na obrázku 4.1.

Studie předpokládá zařazení 36 kriticky nemocných pacientů s postantibiotickým průjmem (AAD) hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče ve FNKV. Ze studie budou vyloučeni pacienti s probíhající sepsí, s potřebou systémových antibiotik nebo pacienti, kteří z nějakého důvodu nemohou podstoupit FMT. Pacienti budou do studie randomizováni v poměru 1:1. V kontrolní skupině budou pacienti dostávat standardní léčbu AAD, což zahrnuje enterální podávání diosmektitu v dávce 2 g každých 8 hodin po dobu 5 dnů, parenterální nebo enterální rehydrataci a korekci acidobazických a elektrolytových abnormalit. V případě potvrzení infekce CD bude léčba modifikována přidáním perorálního vankomycinu (125 mg každých 6 hodin). V intervenční skupině budou kromě standardní léčby (viz výše) pacienti indikováni k FMT cestou klyzmatu o objemu 350 ml. FMT filtrát bude připraven jako směs ze sedmi 50 ml hluboce zmražených alikvotů FMT filtrátů, pocházejících od sedmi různých dárců. V případě potvrzení infekce CD bude léčba modifikována podáním klyzmatu s 1 litrem předeřátého fyziologického roztoku tři hodiny před FMT. Primárním sledovaným parametrem bude selhání léčby definované jako neprovedení intervence nebo přetrvávající průjem 7. den po randomizaci. Sekundární výsledky budou sledovat bezpečnost léčby (nežádoucí události, systémová zánětlivá odpověď aj.) a také recidivu průjmu do 28 dnů. Experimentální část se zaměří především na hledání vztahu mezi primárním sledovaným parametrem (úspěšnost léčby) a složením dárcovské mikrobioty. Dalšími sledovanými výstupy budou kolonizační úspěšnost dárcovské mikrobioty, vliv na

integritu střevní bariéry a dynamiku složení střevní mikrobioty příjemce v průběhu follow-up.

Obrázek 4.1. Design studie FEBATRICE. Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)



4.2. Kvantitativní analýza viability bakterií v hluboko zmraženém FMT filtrátu pomocí kultivačních metod

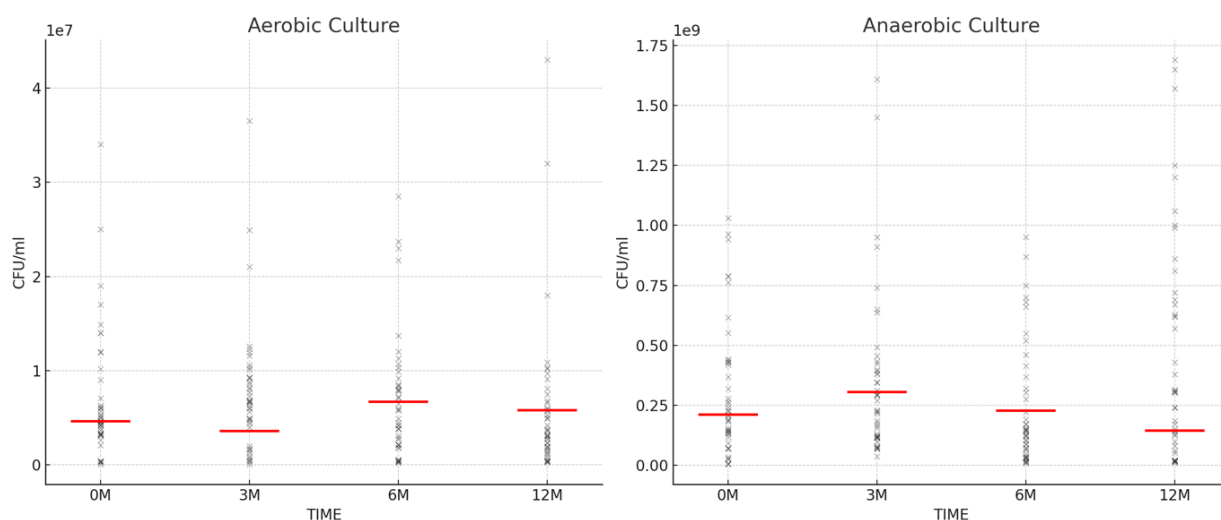
Cílem této studie bylo zhodnotit počet životaschopných bakteriálních populací v patnácti vzorcích FMT filtrátu skladovaném při teplotě -80 °C v den 0 (T0) a po 3 (T3), 6 (T6) a 12 (T12) měsících metodou kultivace za aerobních a anaerobních podmínek. Jako parametr viability jsme zvolili počet CFU (colony-forming units)/ml FMT filtrátu. Při anaerobní kultivaci jsme zjistili významně vyšší počet CFU než za aerobních podmínek ($p = 0,001$). Neprokázali jsme významný vliv doby zamražení ($p = 0,09$) (viz Tabulka 4.1, Obrázek 4.2). Měření ve třech technických replikátech ze stejného vzorku prokázalo koeficienty variability $30 \pm 22 \%$ pro aerobní a $30 \pm 19 \%$ pro anaerobní kultury. Variabilita mezi jednotlivými vzorky byla $102 \pm 21 \%$ pro aerobní kultury a $100 \pm 13 \%$ pro anaerobní kultury.

Tabulka 4.1. Počet CFU/ml v čase T₀ až T₁₂

doba zamražení	aerobní kultivace (x 10 ⁶ CFU/ml)		anaerobní kultivace (x 10 ⁸ CFU/ml)	
	průměr	95% CI	průměr	95% CI
0 měsíců (T0)	6.8	4.9 - 8.8	3.1	2.3 - 3.9
3 měsíce (T3)	7.4	5.5 - 9.4	3.4	2.4 - 4.4
6 měsíců (T6)	6.9	5.0 - 8.9	2.4	1.6 - 3.1
12 měsíců (T12)	5.8	3.5 - 8.2	4.7	3.3 - 6.1

Průměrná hodnota byla zjištěna z 15 technických replikátů. Počet CFU/ml v čase T0 byl stanoven v čerstvém nezamraženém vzorku. 95% CI, konfidenční interval s 95% intervalem spolehlivosti. Převzato z originálního článku (Soukupova et al., 2024)

Obrázek 4.2. Množství viabilních bakterií v FMT filtrátu skladovaném při -80 °C po dobu 12 měsíců.



Jednotlivá data označují černé křížky, mediány označují červené horizontální čáry. CFU, jednotky tvořící kolonie (colony forming units). Převzato z originálního článku (Soukupova et al., 2024)

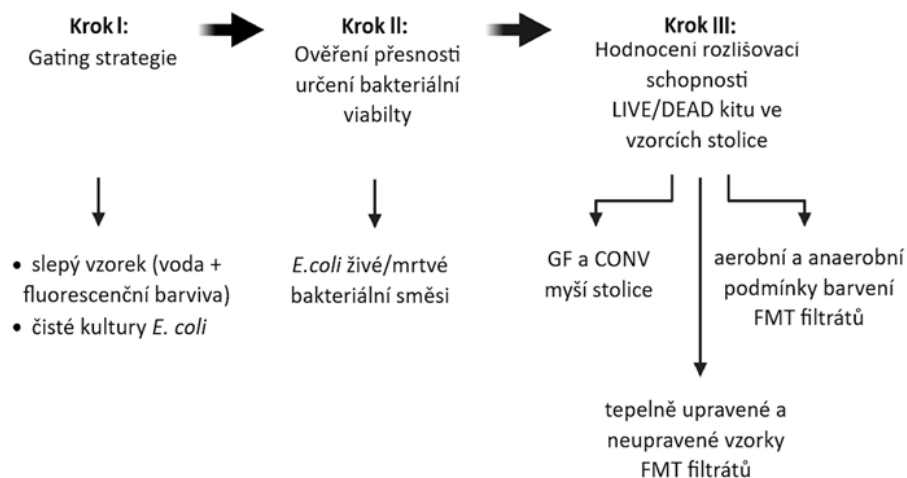
Závěr: Nebyl prokázán významný pokles životaschopnosti bakterií v průběhu 12 měsíců jak u aerobních, tak u anaerobních kultur.

4.3. Stanovení viability bakterií na základě měření integrity buněčné membrány

4.3.1. Ověření použitelnosti metody měření integrity bakteriální buněčné membrány v materiálu stolice

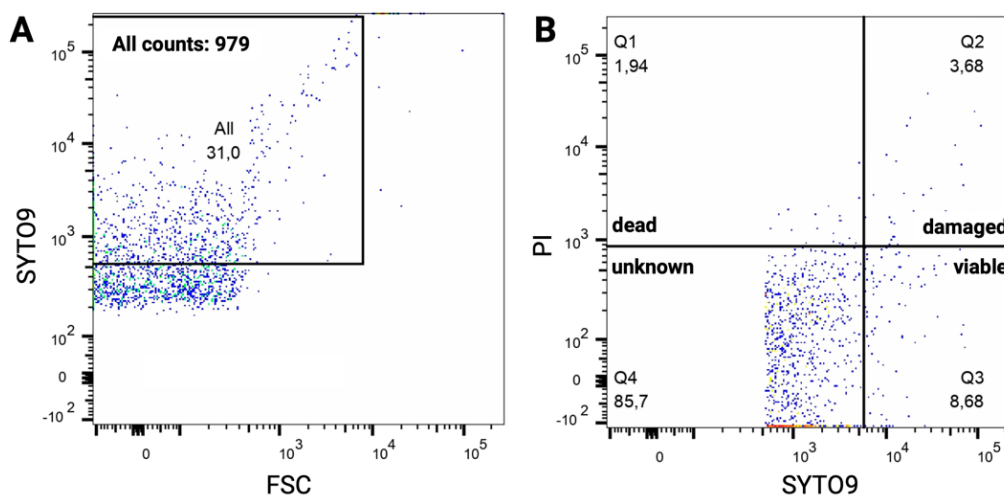
Komerčně dostupné kity určené k hodnocení viability bakterií jsou obvykle validovány pro čisté bakteriální kultury pěstované in vitro. Vzorky stolice však představují výrazně odlišný materiál obsahující autofluorescenční materiál (žlučové kyseliny, deriváty bilirubinu, bakteriální metabolity apod.), který může potenciálně velmi zkreslit výsledky. Zvolili jsme běžně používaný LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit a testovali jsme, zda jej lze použít pro stanovení viability bakterií ve FMT filtrátu. Sled jednotlivých kroků je vidět na obrázku 4.3.

Obrázek 4.3. Postup ověření aplikovatelnosti komerčního kitu pro stanovení viability bakterií ve vzorku stolice



Nejprve bylo nutné stanovit úroveň šumu, tedy kvantifikovat falešně pozitivní události způsobené šumem v optickém a elektronickém systému, nečistotami v deionizované vodě a agregáty v činidlech SYTO9 a PI. K tomu jsme využili slepý vzorek s deionizovanou vodou a oběma fluorescenčními barvivy (viz Obrázek 4.4).

Obrázek 4.4. Stanovení základního signálu pro metodu flow cytometrie



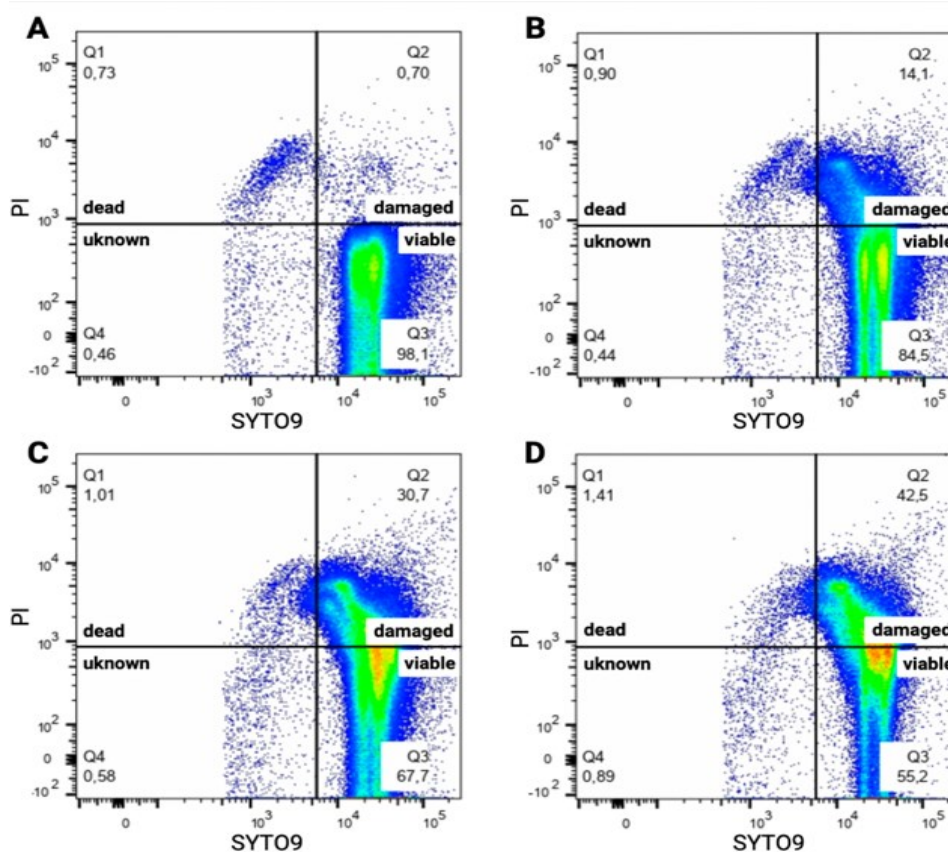
Stanovení základního signálu pomocí slepého vzorku s deionizovanou vodou (A) a oběma fluorescenčními barvivy (B). Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

Následně jsme ve vzorku čisté bakteriální kultury *E. coli* stanovili gating strategii, která umožňuje definovat a odlišit čtyři kvadranty viability bakterií na základě

fluorescence SYTO9 a PI. Podle tohoto rozdělení jsme určily 4 skupiny bakterií: mrtvé, umírající nebo poškozené, živé nebo neurčitého stavu.

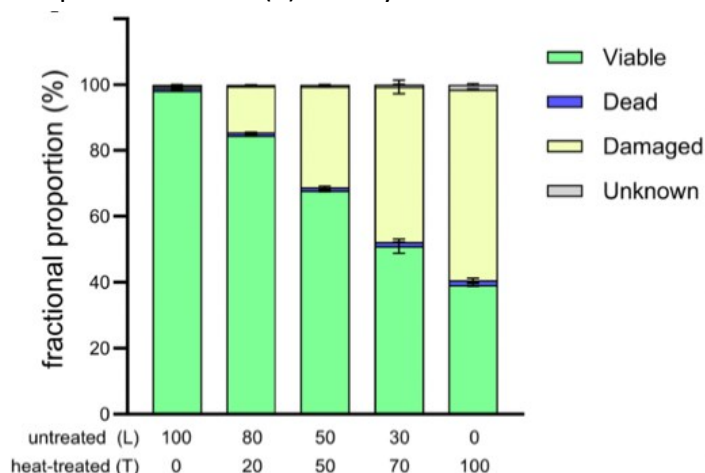
Spolehlivost gating strategie jsme ověřili měřením viability ve vzorcích s definovaným poměrem živých a mrtvých bakterií *E. coli*. Pro potvrzení přesnosti kitu a zvolené gating strategie v odlišení živých a mrtvých buněk jsme se rozhodli využít směsi živých a tepelně ošetřených (usmrčených) bakteriálních kultur *E. coli*. Tepelným ošetřením vzorku inkubací při 70 °C po dobu 10 minut jsme docílili snížení počtu životaschopných bakterií ve vzorku z 98,1 % na 39,2 %. Dále jsme namíchali směsi s různými poměry mezi tepelně ošetřenými a neošetřenými vzorky (100/0, 80/20, 50/50, 30/70, 0/100). Podíl neživých buněk se zvýšil úměrně s podílem tepelně ošetřeného vzorku (viz Obrázek 4.5, Obrázek 4.6).

Obrázek 4.5. Analýza viability bakterií metodou flow cytometrie ve směsi intaktní (L) a tepelně ošetřené (T) kultury *E. coli*.



Směs intaktní (L) a tepelně ošetřené (T) kultury *E. coli*. A: neošetřený vzorek; B: poměr L/T směsi 80/20; C: poměr L/T směsi 50/50; D: poměr L/T směsi 30/70.

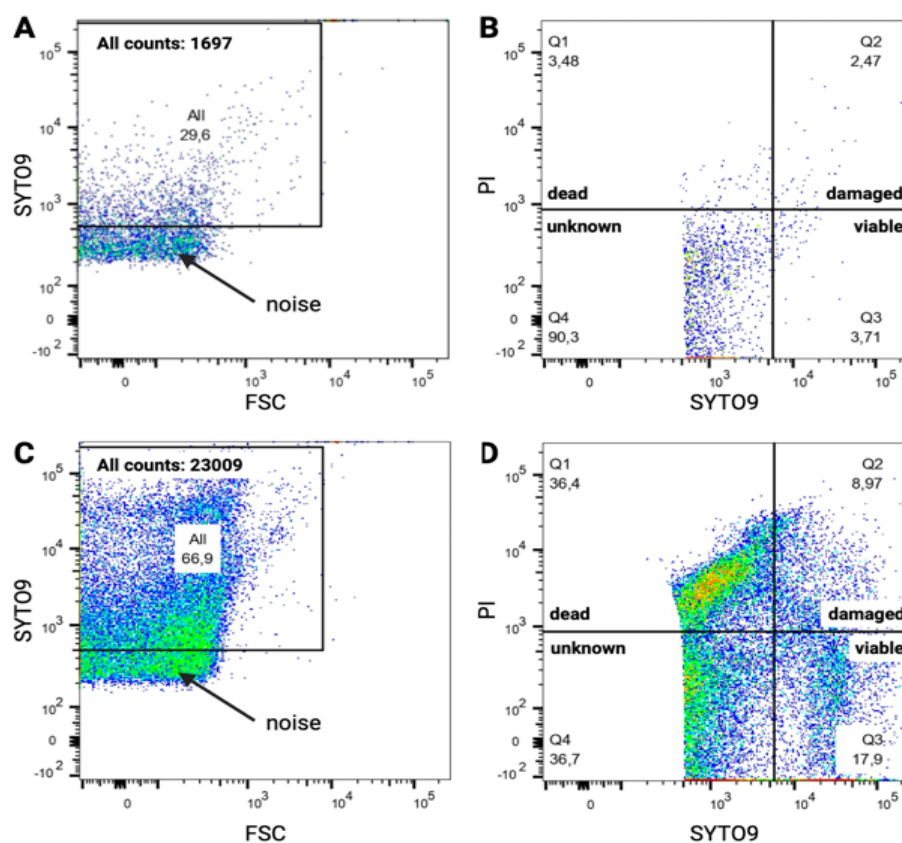
Obrázek 4.6. Kvantifikace výsledků měření viability bakterií metodou flow cytometrie ve směsi intaktní (L) a tepelně ošetřené (T) kultury *E. coli*.



Kvantifikace živých a mrtvých buněk ve směsi intaktní (L) a tepelně ošetřené (T) kultury *E. coli* v různých poměrech. Hodnoty představují průměry technických triplicátů a jsou uvedeny jako zastoupení frakcí v procentech. Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

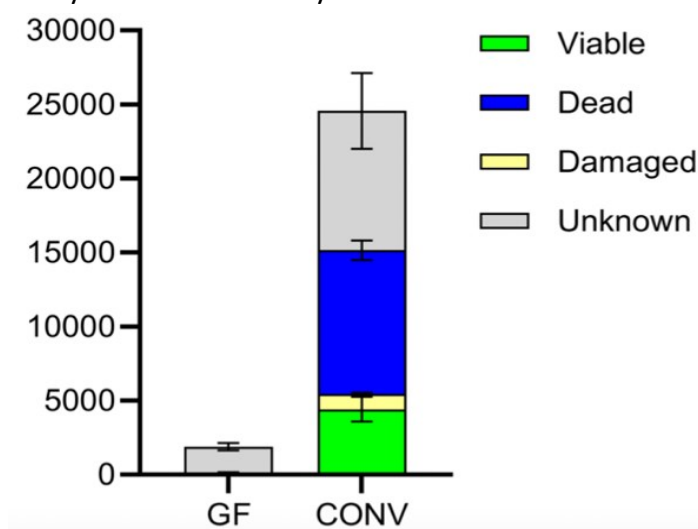
Filtrát pro FMT se od čisté bakteriální kultury v mnoha ohledech liší, např. přítomností potenciálně autofluorescenčního materiálu jako jsou žlučové kyseliny a podobně. Vhodnost zvolené metody v dané matrix (stolice) jsme testovali na stolici germ-free (GF) myši, která neobsahuje žádné mikrorganismy. Dle předpokladu jsme ve vzorcích stolice GF myši pozorovali o dva řády nižší počet fluorescenčních událostí odpovídajících buněčným elementům než ve stolici konvenčně chovaných (CONV) myši (1612 ± 121 versus 22719 ± 737). Většina (90 %) z detekovaných fluorescenčních událostí změřených ve stolici GF myši byla klasifikována jako neurčitěho stavu, což lze přičíst nebakteriální autofluorescenci nebo artefaktům barvení (viz Obrázek 4.7, Obrázek 4.8). Skutečnost, že jsme ve stolici myši GF detekovali malé množství bakterií, je pravděpodobně důsledkem kontaminace v průběhu barvení vzorku, které neprobíhalo za přísně sterilních podmínek. Tento pokus potvrdil, že komerčně dostupný kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit, určený primárně pro čisté bakteriální kultury, funguje s dostatečným rozlišením i na heterogenních vzorcích jako je stolice.

Obrázek 4.7. Analýza viability bakterií metodou flow cytometrie ve vzorcích stolice GF a CONV myši.



A,B: germ-free (GF) myši; C,D: konvenčně chované (CONV) myši. Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

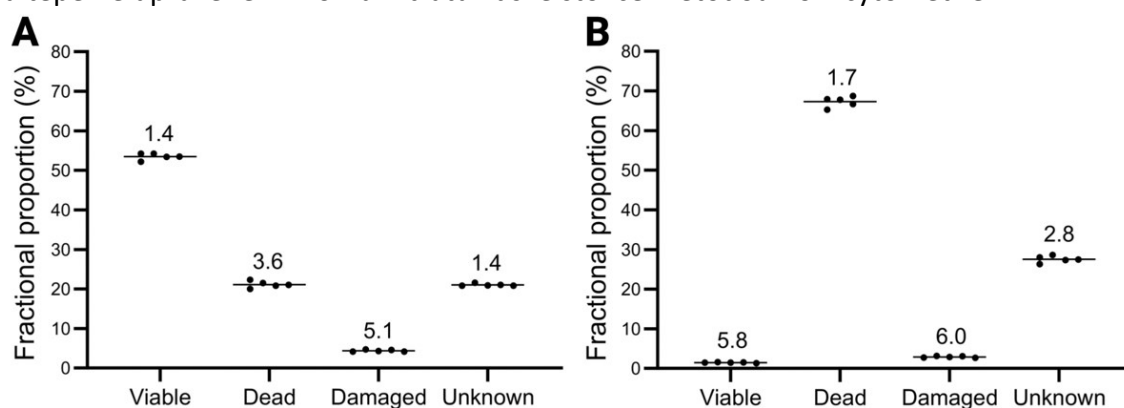
Obrázek 4.8. Výsledky kvantitativní a kvalitativní analýzy množství bakterií ve vzorcích stolice GF a CONV myši metodou flow cytometrie.



Germ-free (GF) myši; konvenčně chované (CONV) myši. Hodnoty představují průměry technických triplicátů a jsou uvedeny jako počet zaznamenaných událostí (counts). Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

Citlivost zvolené metody jsme testovali dále na vzorcích lidské stolice, kde byly porovnávány nativní a tepelně upravené vzorky. Použili jsme alikvoty rozmraženého FMT filtrátu od jednoho lidského dárce, zpracované buď v nativním stavu (bez ošetření), nebo vzorky před barvením tepelně upravené inkubací při 80 °C po dobu 10 min. Procento živých bakteriálních buněk z celkového počtu všech buněk se tepelnou úpravou významně snížilo ($53,5 \pm 0,7$ vs. $1,4 \pm 0,1$), zatímco procento mrtvých bakterií se odpovídajícím způsobem zvýšilo ($21,1 \pm 0,8$ vs. $68 \pm 1,4$). Medián koeficientu rozptylu (CV %) v pěti technických replikátech byl 2,7% (min. 1,1; max. 6,7 %) (viz Obrázek 4.9).

Obrázek 4.9. Výsledky kvantitativní a kvalitativní analýzy bakteriální viability v nativním a tepelně upraveném vzorku filtrátu lidské stolice metodou flow cytometrie



A: rozmražený nativní vzorek. B: rozmražený a tepelně upravený vzorek. Tepelně upravené vzorky byly inkubovány 10 minut při 80 °C. Každé měření bylo provedeno v pěti technických replikátech.

Horizontální čáry představují mediány frakcí, čísla označují medián koeficientu variance v procentech (CV %). Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

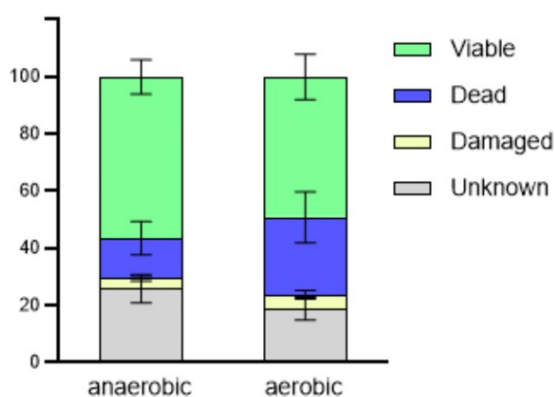
Výsledek: Metodu založenou na stanovení integrity buněčné membrány lze využít k hodnocení viability bakterií v FMT filtrátu.

4.3.2. Ověření vlivu aerobních podmínek při přípravě vzorku pro analýzu

Výrazná část bakterií přítomných v lidském střevě je anaerobních. Zpracování vzorku v běžných laboratorních podmínkách v prostředí obsahujícím kyslík by mohlo způsobit uhynutí části těchto bakterií v důsledku nevhodné manipulace a umělému podhodnocení viability mikroorganismů ve vzorku. S cílem zhodnotit vliv způsobu manipulace se vzorkem během barvení jsme provedli srovnání výsledků při dodržení aerobních nebo anaerobních podmínek během přípravy vzorků pro analýzu. Použili jsme

dva zmražené alikvoty FMT filtrátu od téhož lidského dárce a provedli jsme barvení za anaerobních i aerobních podmínek. Naše výsledky ukazují, že počet živých bakterií se za aerobních podmínek snížil o 8% ve srovnání s anaerobními podmínkami ($49,6 \pm 5,3$ vs. $57,3 \pm 5,5$ %). Procento mrtvých buněk ($25,2 \pm 7,8$ vs. $13,1 \pm 6,6$ %) a poškozených buněk ($8,0 \pm 3,1$ vs. $5,5 \pm 2,3$ %) bylo vyšší za aerobních podmínek, ale procento buněk neurčitého stavu bylo vyšší za anaerobních podmínek ($20,4 \pm 5,8$ vs. $17,1 \pm 3,2$ %). Žádný z těchto rozdílů nedosáhl statistické významnosti (viz Obrázek 4.10).

Obrázek 4.10. Kvantifikace vlivu aerobních a anaerobních podmínek barvení na viabilitu bakterií ve vzorku filtrátu lidské stolice



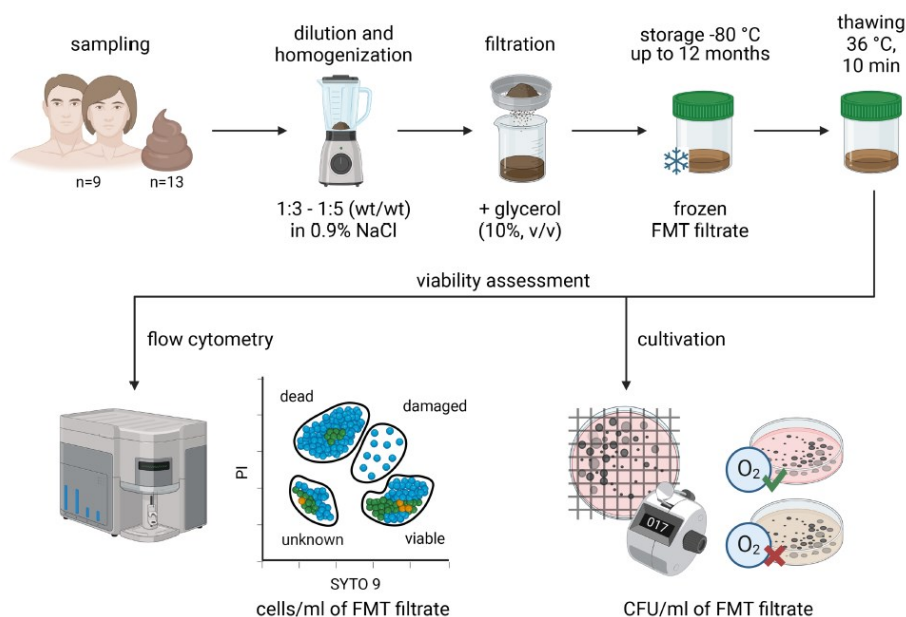
Hodnoty představují průměry technických triplicátů $\pm$ s.d. a jsou uvedeny jako zastoupení frakcí v procentech. Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

Závěr: Neprokázali jsme, že zpracování vzorku stolice v aerobním prostředí vede k signifikantnímu snížení počtu viabilních buněk ve srovnání s anaerobním postupem. Přesto však považujeme za vhodné vzít v úvahu možnost určitého podhodnocení viability vzorku v důsledku aerobní manipulace.

4.4. Srovnání různých metod stanovení viability bakterií

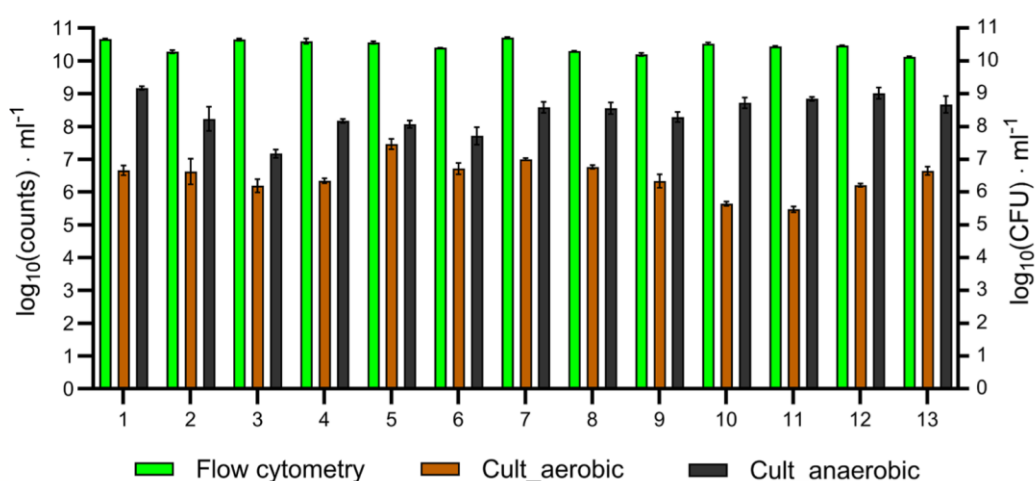
Na základě výsledků popsanych v předchozí části jsme přistoupili ke srovnání dvou metod stanovení viability bakterií v FMT filtrátu, konkrétně metody založené na kultivaci (aerobní i anaerobní) a metody využívající stanovení integrity buněčných membrán. K analýze jsme použili vzorky 13 FMT filtrátů, skladovaných při -80 °C po dobu 12 měsíců. Uspořádání experimentu je znázorněno na obrázku 4.11.

Obrázek 4.11. Schéma experimentu srovnání dvou různých metod stanovení viability bakterií v FMT filtrátu. Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)



Metodou založenou na stanovení integrity buněčné membrány byl průměrný počet viabilních buněk stanoven na $3,1 \pm 1,2 \times 10^{10}$ buněk/ml filtrátu stolice. Při použití kultivační techniky jsme při aerobní kultivaci zjistili průměrně $5,9 \pm 8,3 \times 10^6$ CFU/ml filtrátu v aerobních a $4,6 \pm 4,6 \times 10^8$ CFU/ml filtrátu v anaerobních podmínkách (viz Obrázek 4.12).

Obrázek 4.12. Viabilita bakterií v FMT filtrátech hodnocená různými metodami.

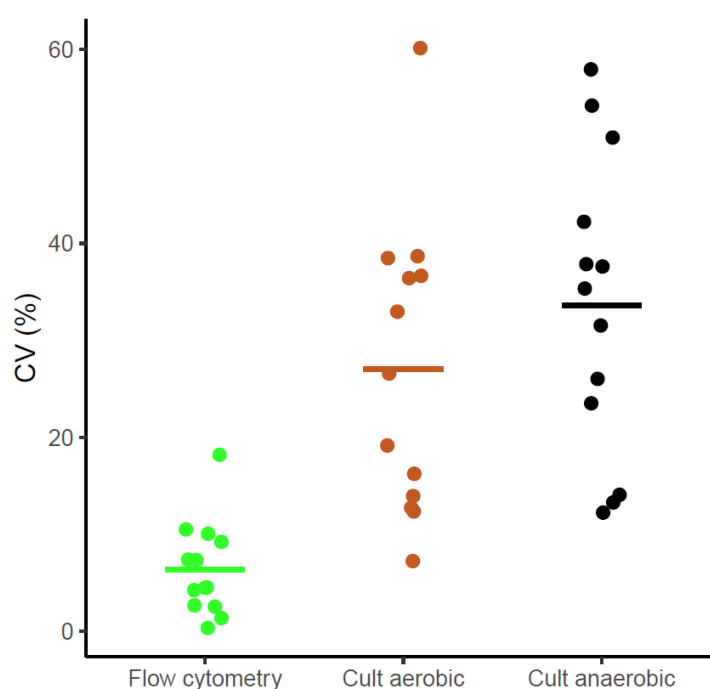


Počet životaschopných bakterií hodnocených podle integrity buněčné membrány je vyjádřen jako počet zaznamenaných událostí (counts), výsledky aerobní nebo anaerobní kultivace jsou uvedeny v CFU.

Všechny výsledky byly normalizovány na 1 ml neředěného filtrátu stolice FMT a logaritmicke transformovány (log10). Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

V případě kultivačních metod bylo měření zatíženo značnou variabilitou uvnitř vzorku s průměrným CV 27,1 % (min. 7,4; max. 60,1 %) pro aerobní kultivaci a 33,6 % (min. 12,4; max. 58,1 %) pro anaerobní kultivaci. Průtoková cytometrie předčila kultivační metody v konzistenci, s výrazně nižším průměrným CV pro frakci životaschopných buněk v ml filtrátu stolice (průměrné CV 6,4 % pro životaschopné buňky; min 0,19 %; max 18,2 %) (viz Obrázek 4.13).

Obrázek 4.13. Variační koeficienty různých metod stanovení bakteriální viability



Alikvoty stejné šarže FMT filtrátů byly použity pro stanovení viability bakterií průtokovou cytometrií nebo kultivací za aerobních a anaerobních podmínek. Každá analýza byla provedena ve třech technických opakováních a byl vypočten variační koeficient (CV). Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

Hodnocení viability bakterií na základě stanovení integrity buněčné membrány navíc poskytuje komplexnější informace o FMT filtrátu, protože určuje nejen životaschopné bakterie, ale také celkový počet bakterií včetně mrtvých nebo poškozených bakteriálních buněk (viz Tabulka 4.2 a 4.3).

Tabuka 4.2. Viabilita bakterií ve zmražených vzorcích FMT filtrátu stolice stanovená na základě integrity buněčné membrány

číslo vzorku	průměr ± SD (%)			
	živé	mrtvé	poškozené	neurčitého stavu
1	36 ± 0.6	21.3 ± 1.3	5.7 ± 0.1	37.1 ± 0.7
2	36.3 ± 3.1	30.7 ± 2.9	7 ± 0.3	26.1 ± 0.1
3	24.2 ± 0.2	19.3 ± 0.1	7.1 ± 0	49.5 ± 0.1
4	29.8 ± 0.6	31.2 ± 0.5	6.5 ± 0.2	32.6 ± 0
5	20.8 ± 0.4	30.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	44.2 ± 0.2
6	26.3 ± 0.1	29.5 ± 0	5.2 ± 0	39.1 ± 0.1
7	65.9 ± 0	10.9 ± 0	4.2 ± 0.1	19.1 ± 0
8	41 ± 0.8	23.7 ± 0.4	9.2 ± 0.1	26.2 ± 0.6
9	43.6 ± 0.3	26.3 ± 0.8	6.7 ± 0	23.3 ± 0.5
10	43 ± 0.7	20.9 ± 0.5	3.7 ± 0.1	32.5 ± 0.1
11	45.6 ± 0.3	15.4 ± 0.1	6.6 ± 0	32.5 ± 0.2
12	44.5 ± 0.4	23.5 ± 0.5	7.4 ± 0.1	24.7 ± 0.2
13	38.8 ± 0	34.5 ± 0.6	9.5 ± 0.2	17.4 ± 0.4

Hodnoty představují průměry technických triplikátů ± SD a jsou uvedeny jako zastoupení frakcí v procentech. Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

Tabulka 4.3. Absolutní počet bakterií ve zmražených vzorcích FMT filtrátu stolice určený na základě stanovení integrity buněčné membrány

číslo vzorku	průměr ± SD 10 ¹⁰ (buněk/ml)			
	živé	mrtvé	poškozené	neurčitého stavu
1	4.61 ± 0.21	2.85 ± 0.09	0.5 ± 0.03	5.1 ± 0.25
2	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.04	0.26 ± 0.01	1.55 ± 0.06
3	4.44 ± 0.33	3.88 ± 0.34	0.88 ± 0.07	9.92 ± 0.85
4	4.03 ± 0.73	4.4 ± 0.96	0.59 ± 0.12	4.86 ± 0.98
5	3.64 ± 0.33	5.66 ± 0.64	0.44 ± 0.05	8.54 ± 0.96
6	2.48 ± 0.05	2.92 ± 0.02	0.31 ± 0.01	4.07 ± 0.02
7	5.14 ± 0.13	0.9 ± 0.02	0.24 ± 0.01	1.67 ± 0.05
8	1.96 ± 0.05	1.18 ± 0.01	0.29 ± 0.01	1.36 ± 0.01
9	1.58 ± 0.16	1.01 ± 0.14	0.16 ± 0.02	0.93 ± 0.08
10	3.33 ± 0.25	1.72 ± 0.05	0.19 ± 0.01	2.81 ± 0.17
11	2.71 ± 0.12	0.99 ± 0.06	0.28 ± 0.01	2.24 ± 0.12
12	2.92 ± 0.04	1.63 ± 0.03	0.35 ± 0.01	1.82 ± 0.02
13	1.32 ± 0.05	1.23 ± 0.07	0.22 ± 0.01	0.65 ± 0.01

Hodnoty představují průměry technických triplicátů ± SD a jsou uvedeny jako celkový počet bakteriálních buněk (counts) v FMT filtrátu stolice. Počet buněk je normalizován na 1 ml vzorku filtrátu stolice před ředěním. Převzato z originálního článku (Cibulkova et al., 2024)

Závěr: Hodnocení viability bakterií ve FMT filtrátu metodou stanovení integrity buněčných membrán poskytuje robustní a reprodukovatelné výsledky. Údaje získané kultivačními metodami jsou zatíženy významně vyšší mírou variability uvnitř vzorku

5. Diskuze

Cílem dizertační práce bylo 1/ vytvořit design randomizované klinické studie u pacientů s postantibiotickým průjemem na JIP; 2/zjistit stabilitu zamraženého FMT filtrátu při -80 °C s ohledem na viabilitu bakterií pomocí standartních kultivačních metod; 3/ validovat metodu určení bakteriální viability v FMT filtrátu pomocí stanovení integrity buněčných membrán následované flow cytometrií; 4/ porovnat výsledky obou předchozích metod stanovení bakteriální viability u stejných vzorků FMT filtrátu.

V příslušných kapitolách jsou diskutovány výsledky jednotlivých částí studie.

5.1. Protokol klinické studie FEBATRICE

Problematika střevní dysbiózy a využití FMT u kriticky nemocných pacientů se v řadě ohledů liší od běžné populace. Nedávná studie prokázala, že během prvních šesti hodin pobytu na JIP dochází ke ztrátě až 90 % komenzální střevní mikrobioty, což vede k přemnožení střevních patogenů a k rozvoji specifického vzorce střevní dysbiózy charakteristického pro pacienty na JIP [76–78,221]. Mezi faktory, které přispívají ke střevní dysbióze u pacientů na JIP jsou kromě prvního impulsu, způsobující vlastní kritické onemocnění, také invazivní vstupy (endotracheální intubace, nasogastrické sondy, intravaskulární katétry), medikace (antibiotika, inhibitory protonové pumpy, sedativa, opiáty, systémové katecholaminy), enterální výživa aj. [78]. Na JIP je léčeno antibiotiky přibližně 70 % pacientů, což často vede ke komplikacím, jako je průjem nebo závažné CDI [39,40,76,86,222]. Průjem přímo ovlivňuje a zatěžuje pacienty nejenom problémy jako je podráždění kůže, zápach, bolesti a celkový dyskomfort, ale zvyšuje u nich také riziko iontové nerovnováhy, podvýživy a celkové morbidity a mortality [223,224]. Možnosti terapeutické intervence při průjemech spojených s antibiotiky (AAD) na JIP v současnosti zahrnují prebiotika, probiotika a FMT. Žádná z nich však není podložena spolehlivými důkazy [81,82,84]. Přestože existuje značné množství studií zkoumajících probiotika u různých gastrointestinálních onemocnění, tyto studie se svými výsledky velmi liší a jejich doporučení jsou omezená (viz výše) [81,84–

86,92,93,221]. Kromě diskutabilního efektu probiotik jsou u rizikových pacientů na JIP v neposlední řadě popisovaná i závažná rizika spojená s jejich podáváním [84,91–93].

V literatuře je rovněž popsána možnost využití metody FMT u pacientů v kritickém stavu na JIP, s cílem ovlivnit střevní dysbiózu a komplikace s ní spojené. U těchto rizikových a křehkých pacientů je však nezbytné postupovat s maximální opatrností vzhledem k vyššímu riziku komplikací spojených s alternativními léčebnými postupy. Z tohoto důvodu jsou studie zabývající se využitím FMT u této vysoce rizikové skupiny spíše ojedinělé. Dostupná literatura uvádí, že FMT byla použita u pacientů v kritickém stavu z indikace CDI, IBD, septických stavů spojených s dysmikrobií a v dalších specifických případech popsaných pouze v jednotlivých kazuistikách [222].

U kriticky nemocných pacientů je CDI zodpovědná za 15-25 % nozokomiálních průjmů spojených s antibiotiky. Tito pacienti jsou ohroženi nejen během vlastní hospitalizace, ale CDI také zvyšuje riziko další hospitalizace pro sepsi o 70 % [149,225,226]. Podle evropská studie CDI (ECDIS) je 1 z 10 případů CDI buď přeložen na JIP, podstoupí kolektomii nebo zemře [88,227]. Kolektomie je invazivní zákrok s 50% mortalitou, proto je FMT dle doporučení možné zvážit jako záchrannou léčbu u pacientů s fulminantní CDI (fCDI), kteří nemají absolutní indikaci k operaci (např. perforace tlustého střeva) [138,149,227,228]. Tato doporučení podporuje práce, která popisuje záchrannou FMT jako slibnou alternativou ke kolektomii u 9 kriticky nemocných pacientů na JIP s fCDI s primární mírou vyléčení u 7 pacientů (78 %). Tento přístup umožnil 8 pacientům (88,9 %) vyhnout se zvažované operaci s kolektomií během téže hospitalizace [165]. Dostupné důkazy tak naznačují, že FMT je u kriticky nemocných pacientů na JIP s fCDI proveditelná a vede ke snížení mortality a morbidit ve srovnání se samotnou antibiotickou léčbou [164,165,176,179,189,222,227,229–235]. Mezi další indikace, kdy u pacientů na JIP byla použita FMT s příznivým efektem, patří refrakterní IBD, včetně použití FMT jako záchranné léčby, která zabránila chirurgickému zákroku [173,222]. Ve většině publikovaných případů bylo využito rektálního podání FMT a tento postup se jevil jako bezpečný [222]. K dalším indikacím FMT u pacientů na JIP dokumentované v literatuře patří septický šok s těžkou dysmikrobií a průjmem. Několik kazuistik a dvě série případů s 31 pacienty popisují použití FMT v této indikaci, podané většinou do horní části zažívacího traktu s následným snížením systémového zánětu, obohacením střevní mikrobioty o komenzály a snížení počtu oportunních

mikroorganismů [179,235,236]. Charakter těchto publikovaných studií neumožňuje vyvozovat závěry o účincích FMT u sepse nebo u AAD a je potřeba je vnímat opatrně vzhledem k nemožnosti ověření těchto dat kontrolovanými studiemi. Celkově dostupné informace podporují hypotézu, že FMT je u kriticky nemocných pacientů na JIP bezpečná a účinná [222]. Specifickou otázkou je použitelnost FMT léčby u imunokompromitovaných pacientů. Multicentrická retrospektivní studie u 94 pacientů po transplantaci solidních orgánů léčených pro rCDI a fCDI antibiotiky spolu s FMT popsala 63,8% míru primárního vyléčení (60/94) v prvním měsíci po FMT a 91,3 % (84/92) po třech měsících léčby. Přestože se jednalo o vysoce rizikovou skupinu pacientů, závažné nežádoucí účinky související s FMT se vyskytly pouze ve 3,2 % případů bez zaznamenané bakteriemie související s FMT [169]. Podobnou účinnost a bezpečnost FMT u takto vysoce rizikové populace potvrdila multicentrická retrospektivní studie u 75 dospělých imunokompromitovaných pacientů s rCDI a fCDI, která prokázala, že FMT je u těchto křehkých pacientů (HIV/AIDS, transplantace solidních orgánů, onkologické choroby atd.) účinná (míra vyléčení 78 %) bez významnějších komplikací [127].

Dle výše uvedeného je zřejmé, že počet publikovaných kazuistik a případových studií pro využití FMT u kriticky nemocných pacientů v průběhu času narůstá, což naznačuje stále častější off-label a experimentální použití této metody [96,165,176,179,189,229,232,235]. Většina dostupných informací o účincích FMT u kriticky nemocných pacientů však pochází z nekontrolovaných studií nebo kazuistik, proto tyto údaje mohou podléhat výběrovému a publikačnímu zkreslení a měly by být interpretovány s velkou opatrností. S ohledem na nedostatek studií zabývajících se touto problematikou a absenci jasně definovaných pravidel pro přípravu a aplikaci FMT filtrátu je zřejmé, že pro rozšíření a zajištění bezpečnosti metody FMT je nezbytné organizovat přísně definované randomizované klinické studie, které potvrdí její účinnost a bezpečnost. S ohledem na tuto skutečnost jsme navrhli randomizovanou prospektivní kontrolovanou studii u kriticky nemocných pacientů s AAD (FEBATRICE) s primárním cílem porovnat efekt FMT ve srovnání se standardní péčí na přetrvávající průjem po 7 dnech léčby a řadou sekundárních cílů, jako je přetrvávající či recidivující průjem, bezpečnost, proveditelnost, hodnocení integrity střevní bariéry a bakteriální translokace a vlivu intervence na složení střevního mikrobiomu aj.

Vzhledem k tomu, že zajištění vhodného FMT filtrátu je pro optimální využití a bezpečnost metody FMT zcela zásadní, v námi navrženém protokolu studie využíváme předem připravený a zamražený FMT filtrát od dříve otestovaných dárců po uplynutí karanténny doby. Hlavními důvody takto zvoleného postupu je omezená dostupnost vhodných dárců, kteří musí projít zdlouhavým procesem fyzikálních i laboratorních vyšetření (viz výše). Udává se, že cca 20 % dárců je během testování pro některý z parametrů vyřazeno a jejich stolice nemůže být pro metody FMT použita [96,111,237]. Dalším zásadním důvodem je pak časová náročnost testování dárců a zpracování stolice. Pro využití metody FMT ve studii FEBTRICE je velmi důležité, aby mohly být filtráty k použití „ihned“ a pacienti dostali léčbu co nejdříve. Z tohoto důvodu je možnost využití zamražených vzorků stolice od prověřených dárců ideální, navíc non-inferiorita těchto přípravků oproti čerstvé stolici byla opakovaně prokázána řadou studií, a to až po dobu dvou let [96,105,111,219]. Zatímco použití zamraženého produktu za účelem FMT v indikaci rCDI je víceméně tolerováno i při absenci jasného legislativního rámce, v případě použití takového preparátu k experimentálním účelům vyvstává požadavek na zajištění optimální kontroly kvality takto „vyráběného“ a uchovávaného přípravku.

Protože jsme již v minulosti na našem pracovišti indikovali a aplikovali metodu FMT u pacientů s rCDI dle platných českých i mezinárodních doporučení, rozhodli jsme se zjistit možnosti využití FMT také v dalších, dle guidelines off-label a experimentálních indikacích, a proto jsme v roce 2016 vznesli dotaz na SÚKL, do jakého legislativního rámce spadá metoda FMT v České republice. SÚKL ČR v roce 2016 rozhodl, že metoda FMT spadá do kategorie „léčivý přípravek“. Vzhledem k tomuto rozhodnutí jsou pro tuto metodu použity stejné principy regulace a dozoru, jaké jsou platné pro klinické studie s léky. V návaznosti na toto rozhodnutí tak bylo nutné pro potřeby studie FEBATRICE podstoupit administrativní schválení v rámci KHL. Jednou z podmínek SÚKL pro schválení studie byla standardizace zmraženého filtrátu stolice, který bude ve studii použit, podobně jako je doporučeno regulačními úřady v jiných zemích [112]. Na tento podnět byla námi navrhnutá a provedená stabilitní studie, s účelem určit množství bakterií v preparátech FMT filtrátů pomocí kvantitativní kultivační metody a porovnat je v časovém odstupu 3, 6 a 12 měsíců od zmražení. Následně, po schválení studie EK, předložení potřebných dokumentů stran výběru a testování dárců stolice, protokolu přípravy FMT filtrátu, sanitace přístrojů a prostor, hodnocení kvality FMT filtrátu

a mnoho dalšího, byla ze strany SÚKL studie schválena, registrována na clinicaltrials.gov (NCT05430269), a roku 2023 úspěšně zahájena. Na výsledky studie, která je plánovaná do konce roku 2025, však je potřeba ještě počkat.

5.2. Kvantitativní analýza viability bakterií v hluboko zmraženém FMT filtrátu pomocí kultivačních metod

5.2.1. Použití kultivačních metod pro stanovení viability bakterií ve stolici

Mezi nejčastěji používané možnosti pro stanovení životaschopnosti bakterií patří metody kultivační, nebo naopak na kultivaci nezávislé. Vzhledem k tomu, že existuje velké množství bakteriálních druhů s různými vlastnostmi (grampozitivní/negativní buněčná stěna, rychle rostoucí nebo s nízkým buněčným metabolismem atd.) žijících v odlišných prostředích (čisté bakteriální kultury, bakteriální společenstva, heterogenní prostředí s mnoha složkami, jako je lidská stolice, aj.), je nutné zvolit optimální metodu pro stanovení bakteriální viability na základě zmíněných parametrů [209].

Za zlatý standard pro stanovení životaschopnosti buněk se považují metody založené na kultivaci. Jedná se o relativně levné a široce používané metody, která prokazují schopnost buňky dělit se do kolonií za laboratorních podmínek na kultivačním médiu. Neúspěšná kultivace však není důkazem toho, že bakteriální kultura není viabilní [209,210]. Existují bakterie, které jsou živé, ale nedělí se kvůli nevhodným kultivačním metodám, kultivačním médiím nebo extrémně pomalému růstu. Tyto organismy se běžně označují jako „nekultivovatelné“ [208,209]. S ohledem na požadavky klinické praxe tak čelí kultivační metody pro stanovení viability bakterií ve stolici několika problémům. Jak již bylo řečeno, většina bakterií žijících v tlustém střevě jsou striktní anaeroby a pro svůj růst vyžadují anaerobní podmínky, dále pak pouze malá část (cca 15-20 %) mikrobů žijících v lidském střevě je snadno kultivovatelných [196]. Jako další důležitý parametr je pak problematické praktické využití, neboť kultivační metody vyžadují delší čas (několik dní) k získání výsledků.

Přestože jsou kultivační metody v řadě ohledů pro měření množství viabilních bakterií ve vzorku nepřesné, poskytují odhad životaschopnosti, který lze porovnat v čase a lze jej tak dle doporučení využít k základnímu hodnocení stability vzorku FMT filtrátu [112].

5.2.2. Stabilitní studie, kvantitativní analýza viability mikrobioty

Literárních údajů o množství viabilních bakterií ve filtrátech stolice k FMT stanovených pomocí kultivace je poměrně málo, a tudíž je obtížné porovnat naše data s jinými výsledky. Existují práce, které pomocí standardních kultivačních metod hodnotí životaschopnost bakterií v materiálu stolice [107,109,121,196,203,238–240]. Costello et al. ukázal, že viabilita šesti skupin bakterií v zamraženém vzorku stolice závisí na podmínkách skladování. Pokud byl vzorek uchováván v -80 °C v 10% glycerolu, počet živých bakterií stanovený jako CFU/ml byl i po dvou a šesti měsících srovnatelný s výchozí hodnotou. Pokud však byl vzorek uchováván jen naředěný fyziologickým roztokem, životnost bakterií po šesti měsících významně poklesla [109]. Dalším faktorem, který ovlivňuje informaci o počtu viabilních bakterií, jsou podmínky kultivace, zejména přítomnost kyslíku. Za aerobních podmínek jsou získané hodnoty přibližně o řád menší [238]. Při porovnání výsledků naší práce s obdobnými publikacemi hodnotícími viabilitu bakterií v FMT filtrátu pomocí kultivace parametrem počtu CFU, jsou naše výsledky srovnatelné u anaerobů a o něco nižší u aerobů. Tento rozdíl může být způsoben tím, že agary použité ke kultivaci v naší i jiných studiích jsou obecně používána neselektivní média a pozorované rozdíly tak mohou být způsobené rozdíly v jejich složení [109,203].

Naše studie neprokázala významný pokles viability bakterií v zmražených FMT filtrátech ošetřených kryoprotektivní látkou při -80 °C v průběhu 12 měsíců, což je v souladu jinými publikacemi [109,206,238]. V recentně publikované práci byl stanoven celkový počet kultivovatelných bakterií $10,9 \pm 0,6 \log_{10}$ CFU/g čerstvého filtrátu stolice, přičemž během 12 měsíců skladování také v této studii nedošlo k významnému poklesu celkového počtu kultivovatelných bakterií [241].

Tyto výsledky naznačují, že terapeutický potenciál FMT založený na viabilních bakteriích není dlouhodobým skladováním ohrožen. To potvrzuje i řada klinických publikací, kde bylo prokázáno použití čerstvého, zamraženého nebo lyofilizovaného filtrátu pro léčbu CDI jako stejně účinné [96,105–109,122,241]. Tato data mohou být důležitým argumentem pro vzrůstající využití bank stolice, protože alogenní FMT od nepříbuzných dárců pomocí zamražených filtrátů je proveditelnější a bezpečnější než ad

hoc příprava FMT filtrátů od příbuzných pacientů v čase akutní terapeutické potřeby (viz výše).

Výsledky naší práce také ukázaly pozoruhodná data týkající se variability mezi dárcovskými vzorky. Je otázkou, zda by s ohledem na toto zjištění mohl být výhodnější přístup k FMT smícháním jednoho filtrátu z více vzorků od různých dárců než klasická aplikace filtrátu pouze od jednoho dárce. Tato strategie by mohla zvýšit diverzitu mikrobiálního složení poskytované příjemci, což může potenciálně zvýšit šanci na kolonizaci střeva příjemce dárcovskou mikrobiotou. Dle mezinárodních doporučení není aplikace směsi filtrátů/stolic od více dárců doporučována vzhledem k většímu riziku přenosu infekce spolu s obtížností vedení protokolu [96]. Přesto jsme se za přísných bezpečnostních podmínek ve studii FEBATRICE rozhodli zjistit efektivitu a proveditelnost FMT u postantibiotických průjmů pacientů na JIP pomocí podání směsi 7 alikvotů od více dárců s cílem zvýšení variability a viability bakterií v FMT filtrátu [242]. Na výsledky této probíhající studie však musíme ještě počkat.

Mezi limitace stabilitní studie lze zmínit zejména významnou variabilitu v počtech CFU v rámci měření alikvotů téhož vzorku, kterou lze přičíst několika faktorům. Hlavním problémem byla potenciální nepřesnost v objemu odebraných vzorků v důsledku ucpání pipety drobnými kusy v FMT filtrátu. Tato obava se potvrdila vážením vzorků, které často odhalilo menší množství než předpokládaný objem 0,3 ml (pro zjednodušení se předpokládala hustota odpovídající 1 g/cm³). Mezi další limitace v měření může být potenciální nepřesnost při manuálním počítání CFU nebo nerovnoměrné rozložení bakterií ve vzorku při nedokonalé homogenizaci.

5.3. Stanovení viability bakterií na základě měření integrity buněčné membrány

5.3.1. Ověření použitelnosti metody měření integrity bakteriální buněčné membrány v materiálu stolice

V této části studie jsme se snažili optimalizovat použití komerčně dostupného kitu ke stanovení integrity buněčných membrán na vzorek stolice s cílem najít spolehlivou metodu hodnocení životaschopnosti bakterií v suspenzi FMT filtrátu.

5.3.1.1. *Použití kultivačně nezávislých metod pro stanovení viability bakterií ve stolici*

Kromě kultivačních metod, které jsou diskutované výše, lze pro stanovení životaschopnosti bakterií využít kultivačně nezávislé metody. I tyto metody mají řadu výhod a nevýhod [208]. Nejčastěji používanou metodou z této indikace je stanovení integrity membrán pomocí fluorescenčního barvení ve spojení s průtokovou cytometrií. Metoda je standardně používána s pomocí předem připravených duálních barvicích souprav, jako je například BacLight™ (Live/Dead Bacterial Viability Kit, L-7007), kterou jsme využili i v naší práci. Tato souprava se skládá ze dvou fluorescenčních barviv DNA, SYTO9 a PI, která umožňují specifickou analýzu pomocí fluorescenční emise [211]. PI je červené fluorescenční barvivo, které proniká pouze do buněk s poškozenými membránami a používá se proto k identifikaci mrtvých buněk v populaci. SYTO9 je zeleně fluoreskující barvivo nukleové kyseliny, které proniká do živých i mrtvých bakteriálních buněk a barví tak všechny buňky (viz výše). PI má k nukleovým kyselinám silnější afinitu než SYTO9. Výsledné barvení tedy způsobí, že živé buňky s neporušenými buněčnými membránami fluoreskují zeleně (DNA obarvená SYTO9), zatímco mrtvé buňky s poškozenými membránami fluoreskují červeně (DNA obarvená PI) [208,210–214].

Tato metoda stanovení bakteriální viability je však optimalizována pro použití v čistých bakteriálních kulturách a údaje o její použitelnosti pro vzorky stolice jsou vzácné [107,196,203,239,243,244]. V případě analýzy čisté bakteriální kultury nebo definovaného bakteriálního společenstva je možné předvídat potenciální komplikace a zvolit nejvhodnější barvivo nebo postup pro konkrétní bakteriální taxony. Použití této metody v heterogenní matrix, jako je filtrát stolice, naráží na určité limitace. Barviva obvykle používaná k hodnocení integrity membrán nemusí srovnatelně obarvit různé typy bakterií. Jsou například méně účinná proti buňkám s odolnou silnou membránou nebo buněčnou stěnou, jako jsou spory. Bylo popsáno, že barvivo SYTO9 může být při barvení některých gramnegativních bakterií špatně účinné [245]. U komplexního bakteriálního společenstva, jakým je mikrobiota stolice, je tak pravděpodobné, že některé bakteriální taxony budou podhodnoceny. Tento problém byl zmíněn například ve studii, která shledala jako nevhodné použití propidium monoazidu (PMA) ke stanovení a kvantifikaci životaschopných bakterií v komplexních společenstvech, jako je

například lidská stolice [218]. Dalším problémem, kterého jsme si byli při naší práci vědomi, byla potenciální možnost falešných signálů fluorescence, které mohou být způsobeny složkami stolice. Části stolice, jako jsou například žlučové kyseliny, degradační produkty hemoglobinu či bakteriální metabolity, mohou způsobovat autofluorescenci v kanálu FITC (excitace 488 nm, emise 500-550 nm), která má za cíl určit právě bakterie obarvené SYTO9.

5.3.1.2. Validace použití komerčně dostupného kitu na vzorky stolice

Pokud je nám známo, dosud neexistuje práce, která by popsala přesnost a spolehlivost LIVE/DEAD kitů s FC pro materiál stolice. Vzhledem k tomu, že vzorky stolice představují oproti čistým bakteriálním kulturám výrazně odlišný a heterogenní materiál, určili jsme testovací protokol pro stanovení spolehlivé strategie, která dokáže potvrdit, zda metoda spolehlivě odliší bakteriální buňky od okolní matrix stolice i šumu pozadí a určí stav jejich viability. V naší práci jsme hodnotili použití kitu BacLight™ (Live/Dead Bacterial Viability Kit, L-7007) v několika krocích. K ověření správnosti námi vedeného protokolu jsme nejprve testovali metodu FC s barvením PI a SYTO9 v čistých bakteriálních kulturách. V čisté bakteriální kultuře bylo zjištěno, že naprostá většina materiálu vzorku jsou bakterie, z nichž většina byla živých. Tyto reprezentativní a přesné výsledky potvrdily správné vedení našeho laboratorního protokolu. Pro ověření, že metoda dokáže spolehlivě odlišit živé a mrtvé buňky, jsme porovnali měření živé a tepelně upravené kultury smíšené v různých poměrech, které potvrdilo přesnost měření. Na základě těchto údajů jsme dospěli k závěru, že tato metoda spolehlivě identifikuje živé a mrtvé/poškozené buňky v čistých bakteriálních kulturách a že dodržujeme správný postup barvení a přípravy vzorku.

V dalším kroku jsme se snažili zjistit, zda i v nehomogenním materiálu, jakým je stolice, dokáže metoda správně odlišit bakterie od okolí. Nejzávažnějším potenciálním problémem by mohly být autofluorescenční složky stolice, které standardní barvicí metody nezohledňují (viz výše). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli porovnat vzorky bezmikrobní a normálně kolonizované, které se liší právě přítomností či nepřítomností bakterií. Bohužel, lidský GF model stolice není možno pro takový pokus získat, proto jsme využili zvířecího modelu (GF a CONV myši), který se nám zdál jako nejlepší dostupná možnost pro rozlišení potenciální autofluorescenční kontaminace pocházející ze složek

stolice. Při přípravě tohoto pokusu jsme si byli samozřejmě vědomi, že lidskou a myší stolici nelze z různých důvodů srovnávat, zejména kvůli jejich odlišné stravě, složení mikroflóry a metabolitům obsažených ve stolici. Použitím modelů GF a CONV myší jsme neměli v úmyslu porovnávat vzorky myší a lidské stolice a/nebo jejich složení, ale potvrdit, že komerčně dostupná souprava, která byla původně určena pro bakteriální kultury, funguje s dostatečnou spolehlivostí také v komplexních společenstvech, jako jsou vzorky stolice. Z tohoto důvodu jsme porovnali pouze vzorky myší stolice mezi sebou (myši GF a CONV) a nikoli lidskou a myší stolici. Ve stolici GF myší jsme pozorovali o dva řády nižší počet fluorescenčních událostí než ve stolici CONV myší, přičemž většina z nich byla klasifikována jako neznámá, což lze přičíst nebakteriální autofluorescenci nebo artefaktům barvení. Tento pokus nám umožnil potvrdit, že komerčně dostupná souprava, určená pro čisté bakteriální kultury, dokáže s dostatečným rozlišením odlišit bakterie od okolních složek stolice. Malé množství bakterií stanovené ve stolici u GF myší je pravděpodobně způsobeno tím, že ředění a příprava vzorku byla vedena v nesterilním prostředí. Pokud je nám známo, v dostupné literatuře jsme nenašli žádnou publikovanou práci, která by podobnou analýzu provedla, a tudíž nelze námi získané výsledky jak porovnat.

Vzhledem k tomu, že lidská a myší stolice je odlišná (viz výše), bylo nutné použít a validovat metodu také na vzorcích lidské stolice. Komerční kit BacLight™ jsme použili pro vzorky zmrazeného FMT filtrátu a prokázali jsme přesnost metody stanovením životaschopnosti bakterií v alikvotech zpracovaných za aerobních podmínek v jejich nativním stavu a po tepelném ošetření. Procento živých bakteriálních buněk k celkovému počtu všech buněk bylo tepelným ošetřením významně sníženo, zatímco procento mrtvých bakterií se odpovídajícím způsobem zvýšilo. Naše data prokázala, že hodnocení viability bakterií v FMT filtrátu průtokovou cytometrií poskytuje vysoce reprodukovatelné výsledky (medián CV byl 2,7 %) a odráží manipulaci se vzorkem. Pokud je nám známo, podobný pokus k validaci této metody pomocí tepelně ošetřených vzorků stolice nebyl dosud proveden, a proto nemůžeme naše výsledky porovnat s výsledky jiné práce.

5.3.1.3. *Ověření vlivu aerobních podmínek při přípravě vzorku pro analýzu*

Anaerobní bakterie tvoří většinu fekální mikrobioty a proto nás zajímalo, zda zpracování a barvení FMT filtrátu před FC za aerobních či anaerobních podmínek ovlivňuje výslednou viabilitu vzorku [203,204]. Byly publikované práce, které prokázaly, že způsob zpracování stolice pro FMT, ať už aerobní nebo anaerobní, může ovlivnit viabilitu bakterií [203,205,206,246,247]. V žádné dostupná literatuře jsme však nenalezli informaci, do jaké míry ovlivňuje aerobní laboratorní postup následné manipulace a barvení již vzniklého FMT filtrátu výslednou bakteriální viabilitu vzorku. Z tohoto důvodu jsme použili dva zmražené alikvoty FMT filtrátu od stejného lidského dárce a barvicí postup jsme provedli jak za anaerobních, tak za aerobních podmínek. Naše výsledky ukázaly, že počet živých bakterií se za aerobních podmínek snížil přibližně o 8 % ve srovnání s anaerobními podmínkami, tento rozdíl však nedosáhl statistické významnosti. Navzdory představě o významu obligátních anaerobů pro klinický efekt FMT existuje pouze omezený počet prací zabývajících se vlivem kyslíku na životaschopnost bakterií a složení FMT filtrátů [203,205,246,247].

Ačkoli podmínky během přípravy FMT homogenátu pravděpodobně ovlivňují viabilitu přítomných bakterií, dle dostupné literatury zmražení a rozmražení transplantátu při dodržení doporučeného protokolu významně množství životaschopné mikrobioty nemění [205,248,249]. Zcela zásadní pro praktické a klinické použití je zjištění, že anaerobní zpracování stolice pro FMT nezvyšuje klinický efekt a míru vyléčení pacientů s rCDI, a proto je podle mezinárodních doporučení možné připravovat filtrát pro tuto indikaci v aerobních podmínkách. [96,250]. Vysvětlení tohoto jevu je komplexní, nicméně je pravděpodobné benefitní působení i řady jiných složek stolice, než jsou pouze viabilní bakterie [18,121]. Mezi další tvrzení také patří, že většina anaerobních bakterií dokáže po omezenou dobu snášet přítomnost kyslíku a nedojde tak k jejich usmrcení. Jiným možným mechanismem bylo nedávné zjištění, že velké množství bakterií v trávicím traktu produkuje rezistentní spory, které umožňují přenos anaerobních bakterií a jejich následné množení za optimálních podmínek [96,251].

5.3.2. Kvantitativní a kvalitativní analýza viability mikrobioty v hluboko zmraženém FMT filtrátu pomocí stanovení membránové integrity a flow cytometrie

I přes obrovský nárůst indikací k FMT bylo dosud publikováno jen několik prací, které hodnotily bakteriální viabilitu ve stolici či filtrátu stolice pomocí metody stanovení membránové integrity [107,196,252]. V naší práci jsme touto metodou zjistili průměrný počet viabilních bakterií $3,1 \pm 1,2 \times 10^{10}$ buněk/ml filtrátu stolice. Celkový počet buněk byl v průměru $8,8 \pm 0,5 \times 10^{10}$ /ml filtrátu stolice, z čehož průměrný počet mrtvých buněk byl 24 %. Podobné výsledky byly publikované i v jiných pracech. Ve studii hodnotící celkový počet bakterií ve vzorcích čerstvé stolice se pohyboval celkový počet bakterií od $1,19 \times 10^{11}$ do $3,03 \times 10^{11}$ /gram stolice [252]. Jednotlivé analyzované vzorky se výrazně lišily v podílu mrtvých bakterií, který byl průměrně 28 %. Vyšší celkový počet bakterií ve stolici v této práci ve srovnání s našimi výsledky může být vysvětlen naředěním našeho vzorku (filtrát stolice) fyziologickým roztokem a glycerolem oproti vzorku čerstvé stolice v citované práci. Dalším důvodem rozdílných výsledků může být odlišný protokol měření vzorku, kdy v naší práci byl počet bakterií stanoven k objemovým jednotkám (ml), v citované práci je počet bakterií vztažen k hmotnostním jednotkám (g). Téměř totožný poměr mrtvých bakterií v porovnání s našimi výsledky potvrzuje malý vliv zmražení i aerobně vedeného protokolu barvení na výslednou viabilitu bakterií. Přestože je frakce mrtvých bakterií v naší práci srovnatelná s citovanou publikací, je potřeba zdůraznit, že výsledky mohou být zkresleny odlišným gatingem. V naší práci jsme neodlišovali pouze mrtvé a živé buňky, ale dle stanovených parametrů buňky živé, mrtvé, umírající a nejasného stavu. V citované publikaci není podobná strategie gatingu upřesněna. V jiné, recentně publikované práci byl homogenizovaný filtrát stolice rozdělen na tři části. První byla určena k hodnocení pomocí flow cytometrie metodou LIVE/DEAD, druhá pomocí klasické kultivace a třetí pro izolaci DNA pro sekvenování variabilní oblasti 16S rDNA [196]. Výsledky kvantifikace bakterií pomocí FC ukázaly, že průměrný celkový počet buněk všech vzorků byl $1,7 \pm 0,9 \times 10^{10}$ buněk/ml filtrátu, což je velmi podobný výsledek jako v naší práci.

5.4. Srovnání různých metod stanovení viability bakterií

Ačkoli bylo provedeno několik studií, které hodnotily viabilitu bakterií ve stolici pomocí kultivačních metod nebo na základě měření integrity buněčné membrány, jejich výsledky nejsou konzistentní [107,109,121,196,203,238,239,253,254]. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli tyto dvě nejčastěji používané metody aplikovat na FMT filtrát 13 stejných hlubokozmražených vzorků, stanovit jejich přesnost a výsledky obou metod porovnat. Pro srovnání ke standardní kultivační metodě jsme použili stejný komerčně dostupný kit, jehož použití pro materiál stolice jsme validovali v předchozí fázi studie. Výsledky naší práce ukázaly, že obě metody vykazovaly značnou variabilitu mezi vzorky od různých dárců, jejich výsledky však nekorelovaly. Reprodukovatelnost měření hodnocená pomocí variačního koeficientu (CV %) byla při měření integrity bakteriálních membrán řádově vyšší ve srovnání se standardními kultivačními metodami. V dostupné literatuře jsme našli práce, které k hodnocení kvality stolice na základě viability bakterií využívaly kultivaci nebo průtokovou cytometrii, v žádné z těchto prací jsme ale nenašli jejich porovnání. Apajalaht et al. popisuje kombinaci obou metod, kdy byl pomocí flow cytometrie a barvením Syto24 stanoven celkový počet bakterií, barvením s propidium jodidem počet mrtvých bakterií. Ke stanovení počtu viabilních bakterií však byl použit výpočet vykultivovaných bakterií ve vzorku. Frakce živých bakterií vzorku pak byla stanovena jako procento vykultivovaných bakterií z celkového počtu všech bakterií stanovené FC [239]. Vzhledem k výsledkům naší práce a znalosti nízké kultivovatelnosti fekálních bakterií se tento přístup jeví minimálně jako sporný. V recentně publikované práci byl stanoven celkový počet kultivovatelných bakterií $10,9 \pm 0,6 \log_{10}\text{CFU/g}$ čerstvého filtrátu stolice [241]. V této práci byl každý vzorek nanesen na dvě kultivační plotny (anaerobní a anaerobní), takže na rozdíl od naší studie, kde byl každý vzorek stanoven ve třech technických triplicátech pro aerobní i anaerobní kultivaci, nebylo možné stanovit CV%. Obdobné výsledky, kde byla použita metoda výpočtu životaschopných bakterií pomocí CFU na mililitr nebo gram ve zředěném filtrátu stolice pomocí kultivačních metod, byly zveřejněny v jiných publikacích, avšak bez stanovení přesnosti a reproducibility metody [196,247,255,256].

V nedávné studii zaměřené na multimodální hodnocení fekální mikrobioty byly u 3 dárců stolice (celkem 30 vzorků) použity 3 různé metody (hodnocení integrity

membrán, kultivace, sekvenování variabilní oblasti 16S rDNA) ve snaze co nejlépe definovat složení stolice pro metodu FMT. Každá z jednotlivých metod prokázala jiné informace ohledně složení mikrobioty ve stolici, porovnání možností a přesnosti jednotlivých metod však autoři v této studii nesledovali [196]. Pokud je nám známo, v naší studii jsme jako první porovnali výsledky dvou odlišných metod stanovení viability bakterií ve stolici, kultivační metody a průtokové cytometrie. Zjistili jsme, že tyto dvě metody spolu nekorelují. Na základě měření membránové integrity jsme zjistili vyšší průměrné počty viabilních bakterií ($3,1 \pm 1,2 \times 10^{10}$ buněk/ml) než u kultivačních metod ($4,6 \pm 4,6 \times 10^8$ a $5,9 \pm 8,3 \times 10^6$ CFU/ml filtrátu stolice za anaerobních a aerobních podmínek). Tento rozdíl lze vysvětlit odlišným principem obou metod, kdy metoda stanovení integrity membrán s FC detekuje všechny životaschopné buňky, zatímco kultivační metoda se omezuje pouze na bakterie, které lze kultivovat.

Jako další velmi důležitý parametr při porovnání obou metod se ukázala rozdílná reprodukovatelnost, což je klíčovým aspektem laboratorních metod, protože zajišťuje nezávislé ověření a potvrzení výsledků experimentů, které jsou tak spolehlivé a nejsou náhodné. Při použití kultivačních metod jsme v naší práci zaznamenali vysokou variabilitu v rámci vzorku s průměrnou hodnotou CV 30.3 %. Naproti tomu metoda stanovení integrity membrán s FC prokázala pozoruhodnou konzistenci s průměrným CV 6.4 % pro životaschopné buňky. Pokud je nám známo, podobá analýza ani porovnání těchto dvou metod nebyla dosud publikována.

V naší práci jsme záměrně neanalyzovali taxonomické složení mikrobioty, protože cílem naší studie nebyla identifikace nekultivovatelných bakterií stolice, ale určení, zda je metoda stanovení membránové integrity jednoduchý a spolehlivý nástroj, který by mohl být snadno implementován jako součást rutinní kontroly kvality materiálu pro FMT. Pro pochopení komplexního složení životaschopné mikrobioty v FMT filtrátu by však bylo velmi zajímavé navázat na naší práci další studií, která by tyto chybějící informace doplnila, zejména s ohledem na analýzu taxonomického složení viabilních frakcí identifikovaných pomocí flow cytometrie a bakteriálních kolonií kultivovaných za aerobních a anaerobních podmínek založenou na některé z metod NGS (Next Generation Sequencing – sekvenování nové generace).

Výsledky naší práce naznačují, že metoda založená na stanovení integrity membrány v kombinaci s průtokovou cytometrií poskytuje konzistentní

a reprodukovatelné údaje o životaschopnosti bakterií v FMT filtrátu. Zároveň je tato metoda rychlá a nevyžaduje ani drahé laboratorní vybavení či pokročilé dovednosti. Z tohoto důvodu se domníváme, že pokud se má bakteriální viabilita stát rutinně stanovovaným parametrem k hodnocení FMT filtrátu v bankách stolice či před FMT, metoda stanovení integrity membrán se nám na základě našich výsledků a zkušeností jeví pro takové hodnocení jako optimální.

6. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Poznatky, ke kterým jsem dospěla v předložené disertační práci lze shrnout následovně.

- I. Navrhli a publikovali jsme protokol prospektivní, randomizované, kontrolované klinické studie zaměřené na hodnocení účinnosti, proveditelnosti a bezpečnosti metody fekální mikrobiální transplantace (FMT) při léčbě a prevenci recidivy postantibiotického průjmu u kriticky nemocných pacientů na jednotce intenzivní péče. Studie byla zahájena ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady v únoru 2023 a předpokládaný termín dokončení je červenec 2025.
- II. Ve stabilitní studii, která probíhala jako kvantitativní analýza viability bakterií pomocí klasických kultivačních metod za aerobních a anaerobních podmínek, jsme prokázali, že během zamražení nedochází k významnému snížení počtu viabilních bakterií. Množství viabilních bakterií stanovené v naší práci bylo v souladu s dostupnou literaturou. Potvrdili jsme, že protokol přípravy filtrátu pro metodu FMT na našem pracovišti odpovídá požadovaným parametrům a uskladnění zamraženého FMT filtrátu ovlivňuje viabilitu bakterií pouze minimálně.
- III. Na základě pokusů se vzorky čistých bakteriálních kultur, stolice bezmikrobních a konvenčně chovaných myší a lidské stolice jsme prokázali, že metoda stanovení viability bakterií, založená na měření integrity buněčných membrán pomocí průtokové cytometrie, vyvinutá pro *in vitro* rostoucí bakteriální kultury, je použitelná i pro filtrát stolice. Rovněž jsme ověřili, že nezbytná manipulace se vzorkem v aerobním prostředí v rámci přípravy pro měření na flow cytometru nevede k významnému snížení viability bakterií.
- IV. Porovnali jsme výsledky stanovení viability bakterií získané pomocí kultivačních metod s metodou založenou na měření integrity buněčných membrán bakterií pomocí průtokové cytometrie. Zjistili jsme, že metoda založená na měření integrity

buněčných membrán je zatížena významně nižší variabilitou uvnitř vzorku. Navíc tato metoda poskytuje komplexnější informace o FMT filtrátu, protože určuje počet nejen životaschopných bakterií, ale také celkový počet bakterií včetně mrtvých nebo poškozených bakteriálních buněk. Ve srovnání s kultivačními metodami je i významně rychlejší. Na základě našich zjištění navrhujeme tuto metodu jako standardní součást hodnocení kvality materiálu pro FMT.

7. Souhrn

Mikrobiota je klíčovou složkou lidského organismu, která ovlivňuje mnoho jeho fyziologických funkcí. Každý člověk má jedinečné složení své mikrobioty, které může být ovlivněno různými faktory, včetně způsobu porod, stravy, věku, genetických faktorů i environmentálních podmínek. Vyvážená a rozmanitá mikrobiota společně s oboustranně výhodnou symbiózou mezi střevními bakteriemi a hostitelem jsou zásadní pro zdraví člověka. Opačným stavem pak je těžká dysbióza, stav s nízkou bakteriální diverzitou, kdy dochází k narušení mikrobiální rovnováhy a poškození hostitele. Tato patologická mikrobiální nerovnováha je asociována s řadou chorob, jako jsou nespecifické střevní záněty, obezita, diabetes mellitus, kardiovaskulární choroby, nádorová onemocnění aj.

Rostoucí vědomosti o složení a funkci mikrobioty vedly k identifikaci jejích zásadních rolí ve vývoji a udržení zdraví, ale také při vzniku nemocí člověka. Dlouhou dobu byl považován vztah mezi dysbiózou a některými chorobami jako asociativní, avšak recentní studie prokázaly, že mikrobiota hraje kauzální roli v patofyziologii vzniku i průběhu řady onemocnění. Z tohoto důvodu je v poslední době vedena usilovná snaha o nalezení možností modulace lidské mikrobioty s cílem obnovit její diverzitu a rovnováhu v organismu. Mezi takové potenciální metody se řadí dietní intervence, prebiotika, probiotika a fekální mikrobiální transplantace (FMT).

Principem FMT je přenos minimálně zpracované stolice zdravého dárce do trávicího traktu příjemce. Její účinnost byla opakovaně potvrzena při podávání tradiční horní cestou (nazojejunální sondou) nebo dolní cestou (klyzmatem nebo kolonoskopií), ale také ve formě kapslí, které mají velký potenciál pro rutinní využití. Použití čerstvého, zmrazeného nebo lyofilizovaného filtrátu se dle literárních údajů zdá jako stejně účinné. Cílem FMT je obnovit fyziologickou diverzitu střevní mikrobioty a potlačit či preventivně zamezit rozvoji onemocnění způsobených dysbiózou. Klíčovým mechanismem účinnosti FMT je tzv. „kolonizační rezistence“, kdy zdravé bakterie dárce soupeří s patogeny o živiny a prostor, čímž omezují jejich růst. Mezi další pak patří bakteriální syntéza protektivních látek (SCFA aj.) nebo metabolismus žlučových kyselin. Velmi pravděpodobně však klinický efekt FMT zprostředkovávají i nebakteriální složky stolice,

jako jsou bakteriofágy, střevní epitelie či mrtvé mikroorganismy. Přesný mechanismus účinku však není doposud plně vysvětlen.

Nejčastější indikací pro FMT je léčba recidivující a fulminantní infekce způsobené bakterií *Clostridioides difficile* (CDI), kde její efektivita dosahuje 82-95 %, což je významně vyšší než při použití antibiotik. FMT je tak z této indikace podle evropských i amerických lékařských doporučení optimální a doporučenou léčebnou metodou. Kromě CDI byl pozitivní klinický efekt FMT popsán i pro další onemocnění, včetně syndromu dráždivého tračníku, nespecifických střevních zánětů (IBD), jaterní encefalopatie, neurologických a metabolických poruch atd., kde je však její použití zatím omezeno pouze na výzkumná pracoviště nebo nouzové použití při absenci alternativních terapeutických možností. V literatuře je rovněž popsána možnost využití metody FMT u pacientů v kritickém stavu na JIP z indikace CDI, IBD nebo septických stavů spojených s dysmikrobií, avšak charakter těchto publikovaných prací je omezen zejména na kazuistiku a případové studie, takže neumožňuje vyvozovat spolehlivé závěry o účincích a bezpečnosti FMT u takto rizikových pacientů.

I přes vysokou účinnost při léčbě řady chorob a celosvětově rozšířenému použití čelí metoda FMT v dnešní době několika výzvám. V různých zemích a centrech se používají odlišné protokoly pro přípravu, skladování a aplikaci FMT filtrátu. Neexistující jednotná metodologie tak komplikuje porovnání výsledků různých studií. Další výzvou jsou pak legislativní opatření. V některých zemích včetně České republiky je FMT považována za léčivý přípravek, což klade nároky na přísné regulace a certifikace FMT filtrátu. Standardizace metodiky a legislativní úpravy jsou klíčovými faktory pro budoucí rozvoj této terapie. S narůstající potřebou rychlého a účinného přístupu k FMT roste zájem o využití zamražených vzorků ve fekálních bankách nejen pro terapii CDI, ale i z indikací léčby a prevence jiných onemocnění v režimu klinických studií. Na rozdíl od chemicky syntetizovaných léčiv s přesně definovanou strukturou je definice biologických látek, jako je stolice, složitá a obtížně charakterizovatelná. Přestože existují studie zdůrazňující význam diverzity a množství živých bakterií ve filtrátu FMT pro její klinický účinek, chybí shoda na spolehlivé metodě kvantifikace viabilních bakterií a charakterizaci složení FMT filtrátu. Ačkoli jsou kultivační metody často považovány za zlatý standard pro hodnocení životaschopnosti buněk, jejich přesnost při určování viability bakterií ve stolici je omezená, neboť pouze malé množství (15-20 %) bakterií

lidské střevní mikrobioty je snadno kultivovatelných. Je tedy zřejmé, že kultivační metody nezaručují, že nekultivovatelné bakterie nejsou životaschopné, a stanovení kvality FMT filtrátu na základě počtu kultivovatelných bakterií může být zavádějící. Metody nezávislé na kultivaci sice obcházejí problémy s kultivovatelností, mají ale svá vlastní omezení. Fluorescenční barvení a stanovení membránové integrity následované průtokovou cytometrií je běžně používanou metodou, jejíž účinnost se může lišit u různých bakteriálních taxonů a použití ve vzorcích heterogenní matrix, jakým je stolice, tak může představovat potenciální problémy. Ačkoli bylo provedeno několik studií, které hodnotily životaschopnost bakterií ve stolici pomocí kultivačních metod nebo LIVE/DEAD kitu, jejich výsledky nejsou konzistentní.

S ohledem na nedostatek studií zabývajících se touto problematikou a absenci jasně definovaných pravidel pro přípravu a aplikaci FMT filtrátu je zřejmé, že pro rozšíření a zajištění bezpečnosti metody FMT je nezbytné pokusit se standardizovat metodu hodnocení složení FMT filtrátu a organizovat přísně definované randomizované klinické studie, které potvrdí účinnost a bezpečnost metody FMT. S ohledem na tuto skutečnost jsme designovali protokol randomizované, prospektivní, kontrolované studie u kriticky nemocných pacientů s antibiotiky asociovaným průjmem FEABTRICE (NCT05430269). Studie je zaměřená zejména na hodnocení účinnosti, proveditelnosti a bezpečnosti metody FMT při léčbě a prevenci recidivy postantibiotického průjmu u kriticky nemocných pacientů na jednotce intenzivní péče, ve srovnání se standardní léčbou. Při přípravě protokolu studie byl v rámci schvalovacího řízení pro klinické hodnocení léčiv vznesen požadavek ze SÚKL na standardizaci složení FMT filtrátu. Na základě tohoto podnětu jsme designovali stabilitní studii k posouzení změny viability bakterií v FMT filtrátu skladovaném při -80 °C po dobu 12 měsíců a zároveň jsme porovnali dvě odlišné metody měření životaschopnosti bakterií s cílem najít optimální metodu pro charakterizaci FMT filtrátu.

Stabilitní studie kvantitativní analýzy viability fekální mikrobioty ve zmrazených štěpech pomocí kultivačních metod prokázala, že viabilita bakterií skladovaných při -80 °C zůstává stabilní po dobu 12 měsíců. U vzorků zamražených s 10% glycerolem nedošlo k významnému poklesu počtu životaschopných bakterií ($p = 0,09$). Tento výsledek je v souladu s dříve publikovanými pracemi, které rovněž ukazují, že dlouhodobé zmražení nevede k významnému poklesu viabilních bakterií. Variabilita mezi jednotlivými vzorky

byla ovšem značná. Měření třech technických replikátů stejného vzorku prokázalo koeficienty variability $30 \pm 22 \%$ pro aerobní a $30 \pm 19 \%$ pro anaerobní kultury. Variabilita mezi jednotlivými vzorky byla větší, $102 \pm 21 \%$ pro aerobní kultury a $100 \pm 13 \%$ pro anaerobní kultury.

Vzhledem k nevýhodám kultivačních metod pro rutinní použití jsme se v další části naší práce rozhodli využít metody k určení bakteriální viability na základě stanovení integrity buněčných membrán pomocí průtokové cytometrie s využitím kitu LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit. Tento komerčně dostupný kit je výrobcem validován pouze na čisté bakteriální kultury a dosud nebylo popsáno, zda jeho použití v materiálu FMT filtrátu skutečně hodnotí bakterie a není zatíženo chybou, jako je např. autofluorescence některých složek stolice. Na základě pokusů s tepelně ošetřenými vzorky čistých bakteriálních kultur a následně lidské stolice jsme ověřili, že metoda dokáže správně odlišit mrtvé a živé buňky. Následným porovnáním výsledků analýzy stolice germ-free (GF) a konvenčně chovaných (CONV) myší jsme zjistili, že vzorky stolice GF myší, která je sterilní, ale obsahuje heterogenní složky, poskytují řádově nižší signál než vzorky myší CONV, bez významné autofluorescence. Tímto pokusem jsme ověřili, že metoda dokáže spolehlivě odlišit bakterie od okolních autofluorescenčních složek stolice. Na základě těchto výsledků jsme prokázali, že metoda stanovení bakteriální viability použitím LIVE/DEAD kitu je dobře použitelná s konzistentními výsledky i pro vzorky stolice. Následně jsme vedením dvojího protokolu barvení FMT filtrátu za aerobních a anaerobních podmínek určili, že počet živých bakterií se za aerobních podmínek snížil přibližně o 8 % ve srovnání s anaerobními podmínkami, a vliv atmosférického vzduchu během barvení vzorků má tedy na výsledný počet viabilních buněk pouze malý vliv.

Po ověření protokolu barvení a validaci LIVE/DEAD kitu na vzorky stolice jsme provedli kvantitativní a kvalitativní analýzu viability bakterií ve 13 vzorcích FMT filtrátu zmražených po dobu 12 měsíců pomocí stanovení integrity buněčných membrán následované flow cytometrií. Souběžně jsme ve stejných vzorcích stanovili kvantitativní stav bakteriální viability pomocí kultivačních metod za aerobních a anaerobních podmínek určením počet CFU/ml. Všechna měření vzorků byla provedena ve 3 technických replikátech. Kultivační technika ukázala významný rozdíl v počtu CFU/ml mezi aerobními a anaerobními podmínkami a poskytla velmi variabilní výsledky v rámci

vzorků s průměrným CV 30,3 %. Naproti tomu metoda stanovující membránovou integritu s FC prokázala pozoruhodnou konzistenci s průměrným CV 6,4 % pro viabilní buňky. Při porovnání absolutního počtu bakterií byl průtokovou cytometrií detekován vyšší počet životaschopných bakterií (průměrně $3,1 \pm 1,2 \times 10^{10}$ buněk/ml), naproti tomu kultivační metoda poskytovala nižší hodnoty (aerobní kultivace $5,9 \pm 8,3 \times 10^6$ CFU/ml, anaerobní kultivace $4,6 \pm 4,6 \times 10^8$). Tyto výsledky lze vysvětlit rozdílným principem obou metod, kdy FC detekuje všechny životaschopné buňky, zatímco kultivační metoda se omezuje pouze na bakterie, které mohou růst mimo střevo a tím podhodnocovat skutečný počet životaschopných bakterií. Průtoková cytometrie tak dokáže detekovat i bakterie, které jsou životaschopné, ale nekultivovatelné. Domníváme se, že to je hlavní příčina rozdílu, ale jistě je zapotřebí dalších studií, zejména s ohledem na analýzu taxonomického složení frakcí vytříděných FC a bakteriálních kolonií pěstovaných za aerobních a anaerobních podmínek, které pomůžou objasnit tyto rozdíly.

Z výsledků naší práce je tedy patrné, že v hluboce zamraženém FMT filtrátu při správně vedeném protokolu přípravy a uskladnění dochází pouze k minimálnímu snížení počtu viabilních bakterií, což umožňuje zlepšit dostupnost a logistiku FMT v klinické i experimentální praxi použitím zmražených vzorků z biobank stolice. Vzhledem k legislativním opatřením v ČR i celosvětově a při vzrůstajících počtech výkonů a indikací k FMT je kladen důraz na standardizaci složení biologického materiálu s ohledem na počet viabilních bakterií. Výsledky naší práce nás vedou k přesvědčení, že metoda využití LIVE/DEAD kitu v kombinaci s průtokovou cytometrií je díky své přesnosti a spolehlivosti oproti kultivačním metodám vhodná pro rutinní hodnocení bakteriální viability v transplantované stolici, což se jeví jako klíčové pro ověření správnosti protokolu přípravy a skladování FMT filtrátu, stejně jako pro zajištění optimálního klinického účinku FMT při léčbě a prevenci různých onemocnění.

8. Summary

The microbiota is a key component of the human body that influences many of its physiological functions. Each person has a unique composition of his or her microbiota, which can be influenced by a variety of factors, including mode of birth, diet, age, genetic factors and environmental conditions. A balanced and diverse microbiota and a beneficial symbiosis between gut bacteria and the host are essential for human health. The opposite condition is severe dysbiosis, a condition with low bacterial diversity, where the microbial balance is disrupted and the host is harmed. This pathological microbial imbalance is associated with a number of diseases such as inflammatory bowel disease, obesity, diabetes mellitus, cardiovascular disease, cancer, etc.

Growing knowledge of the composition and function of the microbiota has led to the identification of its essential roles in the development and maintenance of health, but also in the development of human disease. For a long time, the relationship between dysbiosis and some diseases was considered to be associative, but recent studies have shown that the microbiota plays a causal role in the pathophysiology of the onset and progression of many diseases. For this reason, recent efforts have been made to find ways to modulate the human microbiota in order to restore its diversity and balance in the body. Such potential methods include dietary interventions, prebiotics, probiotics and fecal microbial transplantation (FMT).

The principle of FMT is the transfer of minimally processed stool from a healthy donor into the digestive tract of the recipient. Its efficacy has been repeatedly confirmed when administered by the traditional upper route (nasojunal tube) or lower route (enema or colonoscopy), but also in the form of capsules, which have great potential for routine use. The use of fresh, frozen or freeze-dried filtrate seems to be equally effective according to literature data. The aim of FMT is to restore the physiological diversity of the gut microbiota and to suppress or prevent the development of diseases caused by dysbiosis. The key mechanism of efficacy of FMT is called "colonization resistance" where healthy donor bacteria compete with pathogens for nutrients and space, thereby limiting their growth. Others include bacterial synthesis of protective substances (SCFAs, etc.) or bile acid metabolism. However, it is very likely that the clinical effect of FMT is

also mediated by non-bacterial components of stool such as bacteriophages, intestinal epithelia or dead microorganisms. However, the exact mechanism of action has not yet been fully explained.

The most frequent indication for FMT is the treatment of recurrent and fulminant infection caused by *Clostridioides difficile* (CDI), where its efficacy reaches 82-95%, which is significantly higher than with antibiotics. Thus, FMT is the optimal and recommended treatment method for this indication according to European and American guidelines. In addition to CDI, a positive clinical effect of FMT has been described for other diseases, including irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease (IBD), hepatic encephalopathy, neurological and metabolic disorders, etc., but its use is so far limited to research facilities or emergency use in the absence of alternative therapeutic options. The literature also describes the possibility of using FMT in critically ill patients in the ICU for CDI, IBD or septic conditions associated with dysmicrobia, but the nature of these published papers is limited mainly to case reports and case series, so that it does not allow drawing reliable conclusions about the effects and safety of FMT in such high-risk patients.

Despite its high efficacy in treating a number of diseases and widespread use worldwide, FMT faces several challenges today. Different countries and centers use different protocols for preparation, storage and application of FMT filtrate. Thus, the lack of a uniform methodology makes it difficult to compare the results of different studies. Legislative measures are another challenge. In some countries, including the Czech Republic, FMT is considered a medicinal product, which places demands on strict regulation and certification of FMT filtrate. Standardization of methodology and legislative adjustments are key factors for the future development of this therapy. With the increasing need for rapid and efficient access to FMT, there is a growing interest in the use of frozen samples in fecal banks not only for the therapy of CDI but also for indications of treatment and prevention of other diseases. Unlike chemically synthesized drugs with well-defined structures, the definition of biological substances such as stool is complex and difficult to characterize. Although there are studies highlighting the importance of the diversity and abundance of live bacteria in FMT filtrate for its clinical effect, there is a lack of consensus on a reliable method to quantify viable bacteria and characterize the composition of FMT filtrate. Although culture

methods are often considered the gold standard for assessing cell viability, their accuracy in determining the viability of bacteria in stool is limited, as only a small number (15-20%) of bacteria in the human gut microbiota are readily culturable. Thus, it is clear that they do not guarantee that non-culturable bacteria are not viable, and determination of the quality of FMT filtrate based on the number of culturable bacteria may be misleading. Although culture-independent methods circumvent cultivability problems, they have their own limitations. Fluorescence staining and determination of membrane integrity followed by flow cytometry is a commonly used method whose efficiency may vary among different bacterial taxa and thus its use in heterogeneous matrix samples such as stool may present potential problems. Although several studies have been performed to assess the viability of bacteria in stool using culture methods or LIVE/DEAD kits, their results are not consistent.

In view of the lack of studies dealing with this issue and the absence of clearly defined rules for the preparation and application of FMT filtrate, it is obvious that to expand and ensure the safety of the FMT method, it is necessary to try to standardize the method of evaluating the composition of FMT filtrate and to organize strictly defined randomized clinical trials to confirm the efficacy and safety of the FMT method. With this in mind, we designed the protocol for the randomized, prospective, controlled trial in critically ill patients with antibiotic-associated diarrhea FEABTRICE (NCT05430269). The study is mainly aimed at evaluating the efficacy, feasibility and safety of FMT in the treatment and prevention of recurrence of postantibiotic diarrhea in critically ill patients in the intensive care unit, compared to standard treatment. During the preparation of the study protocol, a request was made by the SÚKL for standardisation of the composition of the FMT filtrate as part of the clinical drug approval procedure. Based on this suggestion, we designed a stability study to assess the change in bacterial viability in FMT filtrate stored at -80 °C for 12 months, while comparing two different methods of measuring bacterial viability to find the optimal method for characterizing FMT filtrate.

A stability study of quantitative viability analysis of faecal microbiota in frozen grafts using culture methods showed that the viability of bacteria stored at -80 °C remained stable for 12 months. Samples frozen with 10% glycerol did not show a significant decrease in the number of viable bacteria ($p = 0.09$). This result is consistent

with previously published work which also shows that long-term freezing does not lead to a significant decrease in viable bacteria. However, the variability between samples was considerable. Measurements of three technical replicates of the same sample showed coefficients of variability of 30 ± 22 % for aerobic and 30 ± 19 % for anaerobic cultures. The inter-sample variability was greater, 102 ± 21 % for aerobic cultures and 100 ± 13 % for anaerobic cultures.

Due to the disadvantages of culture methods for routine use, in the next part of our work we decided to use methods to determine bacterial viability based on the determination of cell membrane integrity by flow cytometry using the LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit. This commercially available kit is only validated by the manufacturer on pure bacterial cultures, and it has not yet been described whether its use in FMT filtrate material actually evaluates bacteria and is not burdened by errors such as autofluorescence of some stool components. Based on experiments with heat-treated samples of pure bacterial cultures and subsequently human stool, we have verified that the method can correctly distinguish between dead and live cells. By subsequently comparing the results of stool analysis of germ-free (GF) and conventionally reared (CONV) mice, we found that stool samples from GF mice, which are sterile but contain heterogeneous components, provide an order of magnitude lower signal than those from CONV mice, without significant autofluorescence. With this experiment, we verified that the method can reliably distinguish bacteria from surrounding autofluorescent stool components. Based on these results, we demonstrated that the method for determining bacterial viability using the LIVE/DEAD kit is well applicable with consistent results for stool samples. Subsequently, by conducting a dual staining protocol of FMT filtrate under aerobic and anaerobic conditions, we determined that the number of live bacteria decreased by approximately 8% under aerobic conditions compared to anaerobic conditions, and the effect of atmospheric air during sample staining has little effect on the resulting viable cell counts.

After verification of the staining protocol and validation of the LIVE/DEAD kit on stool samples, we performed quantitative and qualitative analysis of bacterial viability in 13 FMT filtrate samples frozen for 12 months by cell membrane integrity determination followed by flow cytometry. In parallel, we determined the quantitative status of bacterial viability in the same samples by culture methods under aerobic and

anaerobic conditions by determining the number of CFU/ml. All sample measurements were performed in 3 technical replicates. The culture technique showed a significant difference in CFU/ml counts between aerobic and anaerobic conditions and gave highly variable results within samples with an average CV of 30.3%. In contrast, the method determining membrane integrity with FC showed remarkable consistency with an average CV of 6.4% for viable cells. When comparing the absolute number of bacteria, flow cytometry detected a higher number of viable bacteria (mean $3,1 \pm 1,2 \times 10^{10}$ cells/ml), in contrast, the culture method provided lower values (aerobic culture $5,9 \pm 8,3 \times 10^6$ CFU/ml, anaerobic culture $4,6 \pm 4,6 \times 10^8$). These results can be explained by the different principle of the two methods, where FC detects all viable cells, whereas the culture method is limited to bacteria that can grow outside the gut, thus underestimating the actual number of viable bacteria. Thus, flow cytometry can also detect bacteria that are viable but not culturable. We believe that this is the main reason for the difference, but further studies are certainly needed, especially with respect to the analysis of the taxonomic composition of the fractions of sorted FC and bacterial colonies grown under aerobic and anaerobic conditions, to help clarify these differences.

Thus, our results show that in deep-frozen FMT filtrate, with a properly managed preparation and storage protocol, there is only a minimal reduction in the number of viable bacteria, which makes it possible to improve the availability and logistics of FMT in clinical and experimental practice by using frozen stool biobank samples. Due to legislative measures in the Czech Republic and worldwide, and with the increasing number of procedures and indications for FMT, emphasis is placed on standardizing the composition of biological material with respect to the number of viable bacteria. The results of our work lead us to believe that the method of using LIVE/DEAD kit in combination with flow cytometry is suitable for routine assessment of bacterial viability in transplanted stool due to its accuracy and reliability compared to culture methods, which seems to be crucial for verifying the correctness of the protocol of preparation and storage of FMT filtrate, as well as for ensuring the optimal clinical effect of FMT in the treatment and prevention of various diseases.

9. Seznam zkratek

AAD - s antibiotiky asociovaný průjem

AEs - nežádoucí události

AGA - americká gastroenterologická asociace

AIDS - syndrom získaného imunodeficitu

ALP - alkalická fosfatáza

ALT - alanin-aminotransferáza

APACHE skóre - Acute Physiological And Chronic Healt Evaluation, skórovací systém

AST - aspartát-aminotransferáza

ATB - antibiotika

ATP - adenosintrifosfát

BMI - body mass index

CDI - infekce *Clostridioides difficile*

CMP - cévní mozková příhoda

CONV - konvenční

COX-2 - cyklooxygenáza 2

KRK - kolorektální karcinom

CRE - Carbapenem-rezistentní enterobakterie

CRP - C-reaktivní protein

CTLA4 - receptor - receptor proti cytotoxickému T-lymfocytárnímu antigenu 4

ddPCR - digitální kapková PCR

DM2T - diabetes mellitus 2. typu

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EAEC - *Enteroadgregativní E. coli*

EIEC - *Enteroinvazivní E. coli*

EPEC- *Enteropatogenní E. coli*

ESBL - širokospektré betalaktamázy

ETEC - *Enterotoxigenní E. coli*

FC - flow cytometrie

fCDI - fulminantní infekce *Clostridioides difficile*

FMT- fekální mikrobiální transplantace

GABA - gamma-aminomáselná kyselina
GF - bezmikróbní, germ-free
GGT - gama-glutamyltransferáza
HBV- virus hepatitidy B
HCV - virus hepatitidy C
HIV - virus lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency Virus)
CHRI - chronická renální insuficience
IBD - nespecifický střevní zánět
IM – infarkt myokardu
JIP – jednotka intenzivní péče
KHL - klinické hodnocení léčiv
LPS - lipopolysacharid
MDRO- multilékově rezistentní organismy
MODS - syndrom multiorgánového selhání
MRSA - Methicillin-Resistentní *Staphylococcus Aureus*
NEC - nekrotizující enterokolitida
NGS - sekvenování nové generace
PCR - polymerázová řetězová reakce
PD-1 receptor - programovaný receptor buněčné smrti ligandu 1
PI - propidium jodid
rCDI - recidivující infekce *Clostridioides difficile*
RNA - ribonukleová kyselina
SAEs - závažné nežádoucí události
SARS-CoV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SCFA - mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SIBO - syndrom bakteriálního přerůstání tenkého střeva
STEC - Shiga toxin produkující *Escherichia coli*
SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv
tCLA - trans-linolové kyseliny
TMAO - trimethylamin N-oxid
VAP - s ventilátorem asociovaná pneumonie
VRE - Vankomycin-rezistentní enterokoky

WHO - Světová zdravotnická organizace

ŽK - žlučové kyseliny

10. Seznam použité literatury

1. Rastelli M, Knauf C, Cani PD (2018) Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders. *Obesity* 26: 792–800.
2. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164: 337–340.
3. V Černý JHJBHT (2023) A word on the microbiome: considerations about the history, current state, and terminology of an emerging discipline. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 112-118.
4. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, et al. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486: 207–214.
5. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM (2012) Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9: 312–322.
6. Adak A, Khan MR (2019) An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76: 473–493.
7. Lynch S V., Pedersen O (2016) The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine* 375: 2369–2379.
8. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 488: 178–184.
9. Najmanová L, Vídeňská P, Cahová M (2022) Healthy Microbiome – A Mere Idea or a Sound Concept? *Physiol Res* 71: 719–738.
10. Khanna S (2018) Microbiota Replacement Therapies: Innovation in Gastrointestinal Care. *Clin Pharmacol Ther* 103: 102–111.
11. Wen L, Duffy A (2017) Factors influencing the gut microbiota, inflammation, and type 2 diabetes. *Journal of Nutrition* 147: 1468S-1475S.
12. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14.
13. Watts AE, Sninsky JA, Richey MM, et al. (2022) Family Stool Donation Predicts Failure of Fecal Microbiota Transplant for Clostridioides difficile Infection. *Gastro Hep Advances* 1: 141–146.
14. Walters KE, Martiny JBH (2020) Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS One* 15.
15. Al-Rashidi HE (2021) Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. *Saudi J Biol Sci*.
16. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, et al. (2014) Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63: 1913–1920.
17. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500: 541–546.
18. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, et al. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53: 685–693.
19. Kverka M, Tlaskalova-Hogenova H (2013) Two faces of microbiota in inflammatory and autoimmune diseases: Triggers and drugs. *APMIS* 121: 403–421.

20. Carvalho BM, Abdalla Saad MJ (2013) Influence of Gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators Inflamm* 2013.
21. Najmanová L, Vídeňská P, Cahová M Healthy microbiome-one size does not fit all.
22. Usuda H, Okamoto T, Wada K (2021) Leaky gut: Effect of dietary fiber and fats on microbiome and intestinal barrier. *Int J Mol Sci* 22.
23. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14691–14696.
24. Pickens CI, Wunderink RG (2019) Principles and Practice of Antibiotic Stewardship in the ICU. *Chest* 156: 163–171.
25. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6.
26. Prince AL, Ma J, Kannan PS, et al. (2016) The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 214: 627.e1-627.e16.
27. de Goffau MC, Lager S, Sovio U, et al. (2019) Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature* 572: 329–334.
28. Mishra A, Lai GC, Yao LJ, et al. (2021) Microbial exposure during early human development primes fetal immune cells. *Cell* 184: 3394-3409.e20.
29. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. (2015) Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 17: 690–703.
30. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11971–11975.
31. Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A (2018) Human milk oligosaccharides and immune system development. *Nutrients* 10.
32. Kishino S, Takeuchi M, Park SB, et al. (2013) Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 17808–17813.
33. Pfefferle PI, Keber CU, Cohen RM, et al. (2021) The Hygiene Hypothesis – Learning From but Not Living in the Past. *Front Immunol* 12.
34. Beam A, Clinger E, Hao L (2021) Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota. *Nutrients* 13.
35. De Filippo C, Di Paola M, Ramazzotti M, et al. (2017) Diet, environments, and gut microbiota. A preliminary investigation in children living in rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Front Microbiol* 8.
36. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, et al. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486: 222–227.
37. Bach JF (2021) Revisiting the Hygiene Hypothesis in the Context of Autoimmunity. *Front Immunol* 11.
38. Bach JF (2018) The hygiene hypothesis in autoimmunity: The role of pathogens and commensals. *Nat Rev Immunol* 18: 105–120.
39. McClave SA, Lowen CC, Martindale RG (2018) The 2016 ESPEN Arvid Wretling lecture: The gut in stress. *Clinical Nutrition* 37: 19–36.
40. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units.

41. Al-Rashidi HE (2022) Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. *Saudi J Biol Sci* 29: 1628–1643.
42. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, et al. (2016) Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138: 1122–1130.
43. Nishino K, Nishida A, Inoue R, et al. (2018) Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 53: 95–106.
44. Cui L, Zhao T, Hu H, et al. (2017) Association Study of Gut Flora in Coronary Heart Disease through High-Throughput Sequencing. *Biomed Res Int* 2017.
45. Wilson BC, Vatanen T, Cutfield WS, et al. (2019) The super-donor phenomenon in fecal microbiota transplantation. *Front Cell Infect Microbiol* 9.
46. Lynch S V., Pedersen O (2016) The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *New England Journal of Medicine* 375: 2369–2379.
47. Gregory JC, Buffa JA, Org E, et al. (2015) Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *Journal of Biological Chemistry* 290: 5647–5660.
48. Elinav E, Strowig T, Kau AL, et al. (2011) NLRP6 inflammasome is a regulator of colonic microbial ecology and risk for colitis.
49. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027–1031.
50. Thaïss CA, Itav S, Rothschild D, et al. (2016) Persistent microbiome alterations modulate the rate of post-dieting weight regain. *Nature* 540: 544–551.
51. Guerrero R, Margulis L, Berlanga M (2013) Symbiogenesis: The holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology* 16: 133–143.
52. Carvalho BM, Abdalla Saad MJ (2013) Influence of Gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. *Mediators Inflamm* 2013.
53. He C, Shan Y, Song W (2015) Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutrition Research* 35: 361–367.
54. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, et al. (2012) Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 143.
55. Rahman MM, Islam F, -Or-Rashid MH, et al. (2022) The Gut Microbiota (Microbiome) in Cardiovascular Disease and Its Therapeutic Regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 12.
56. Almeida C, Barata P, Fernandes R (2021) The influence of gut microbiota in cardiovascular diseases—a brief review. *Porto Biomed J* 6: e106.
57. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, et al. (2013) Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *New England Journal of Medicine* 368: 1575–1584.
58. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al. (2015) Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* 163: 1585–1595.
59. Sędzikowska A, Szablewski L (2021) Human gut microbiota in health and selected cancers. *Int J Mol Sci* 22.
60. Wang F, Meng W, Wang B, et al. (2014) Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett* 345: 196–202.

61. Dzutsev A, Goldszmid RS, Viaud S, et al. (2015) The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *Eur J Immunol* 45: 17–31.
62. Yu J, Feng Q, Wong SH, et al. (2017) Metagenomic analysis of faecal microbiome as a tool towards targeted non-invasive biomarkers for colorectal cancer. *Gut* 66: 70–78.
63. Chen W, Liu F, Ling Z, et al. (2012) Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 7.
64. Cheng Y, Ling Z, Li L (2020) The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol* 11.
65. Liu X, Cheng Y, Shao L, et al. (2020) Alterations of the Predominant Fecal Microbiota and Disruption of the Gut Mucosal Barrier in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *Biomed Res Int* 2020.
66. Chung L, Orberg ET, Geis AL, et al. (2018) Erratum: Bacteroides fragilis Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells (Cell Host & Microbe (2018) 23(2) (203–214.e5) (S1931312818300428) (10.1016/j.chom.2018.01.007)). *Cell Host Microbe* 23: 421.
67. Oey O, Liu Y-Y, Sunjaya AF, et al. (2022) Gut microbiota diversity and composition in predicting immunotherapy response and immunotherapy-related colitis in melanoma patients: A systematic review. *World J Clin Oncol* 13: 929–942.
68. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, et al. (2015) Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science (1979)* 350: 1079–1084.
69. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, et al. (2021) Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science (1979)* 371: 602–609.
70. Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients.
71. Uusitalo U, Liu X, Yang J, et al. (2016) Association of Early Exposure of Probiotics and Islet Autoimmunity in the TEDDY Study. *JAMA Pediatr* 170: 20–28.
72. McLoughlin R, Berthon BS, Rogers GB, et al. (2019) Soluble fibre supplementation with and without a probiotic in adults with asthma: A 7-day randomised, double blind, three way cross-over trial. *EBioMedicine* 46: 473–485.
73. Caterina Foppa 1 TR 2, AR 3, CH 3, AS 4 (2024) Microbiota and IBD: Current knowledge and future perspectives. *Dig Liver Dis* 911–922.
74. Oka A, Sartor RB (2020) Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci* 65: 757–788.
75. Lucio Capurso MK (2021) Clostridium difficile infection and chronic inflammatory bowel disease.
76. McClave SA, Patel J, Bhutiani N (2018) Should fecal microbial transplantation be used in the ICU? *Curr Opin Crit Care* 24: 105–111.
77. Liu W, Cheng M, Li J, et al. (2020) Classification of the Gut Microbiota of Patients in Intensive Care Units During Development of Sepsis and Septic Shock. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 18: 696–707.
78. Nakov R, Segal JP, Settanni CRS, et al. (2020) Microbiome: What intensivists should know. *Minerva Anesthesiol* 86: 777–785.
79. Prescott HC, Dickson RP, Rogers MAM, et al. (2015) Hospitalization type and subsequent severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 192: 581–588.

80. Cibulková I, Řehořová V, Duška F (2022) Importance of intestinal microbiota in critically ill patients and possibilities of its influence. *Anesteziologie a Intenzivní Medicina* 33.
81. Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, et al. (2019) Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. *J Microbiol Biotechnol* 29: 1335–1340.
82. Gibson Y, Roberfroid MB (1995) Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics.
83. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, et al. (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16: 605–616.
84. Su GL, Ko CW, Bercik P, et al. (2020) AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders. *Gastroenterology* 159: 697–705.
85. Alfaleh K, Anabrees J (2014) Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evidence-Based Child Health* 9: 584–671.
86. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, et al. (2012) Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea A Systematic Review and Meta-analysis.
87. van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH, et al. (2021) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. *Clinical Microbiology and Infection*.
88. Kelly CR, Fischer M, Allegretti JR, et al. (2021) ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of *Clostridioides difficile* Infections. *Am J Gastroenterol* 116: 1124–1147.
89. Astó E, Méndez I, Audivert S, et al. (2019) The efficacy of probiotics, prebiotic inulin-type fructans, and synbiotics in human ulcerative colitis: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 11.
90. Zhang XF, Guan XX, Tang YJ, et al. (2021) Clinical effects and gut microbiota changes of using probiotics, prebiotics or synbiotics in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr* 60: 2855–2875.
91. Batra P, Soni KD, Mathur P (2020) Efficacy of probiotics in the prevention of VAP in critically ill ICU patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *J Intensive Care* 8.
92. Shimizu K, Hirose T, Ogura H (2021) Efficacy of probiotics in the prevention of diarrhea in ventilated critically ill ICU patients: meta-analysis of randomized control trials. *J Intensive Care* 9.
93. Manzanares W, Lemieux M, Langlois PL, et al. (2016) Probiotic and synbiotic therapy in critical illness: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 20.
94. Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, et al. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases* 1625–1634.
95. Bongaerts GPA, Severijnen RSVM (2016) A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nat Biotechnol* 34: 55–63.
96. Keller JJ, Ooijevaar RE, Hvas CL, et al. (2021) A standardised model for stool banking for faecal microbiota transplantation: a consensus report from a

- multidisciplinary UEG working group. *United European Gastroenterol J* 9: 229–247.
97. Thabit AK, Alsolami MH, Baghlaf NA, et al. (2019) Comparison of three current *Clostridioides difficile* infection guidelines: IDSA/SHEA, ESCMID, and ACG guidelines. *Infection* 47: 899–909.
 98. Johnson S (2019) Recent changes in CDI treatment guidelines.
 99. Weingarden AR, Chen C, Bobr A, et al. (2014) Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306: 310–319.
 100. Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, et al. (2017) Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology* 152: 799-811.e7.
 101. Varga A, Kocsis B, Sipos D, et al. (2021) How to Apply FMT More Effectively, Conveniently and Flexible – A Comparison of FMT Methods. *Front Cell Infect Microbiol* 11.
 102. Bojanova DP, Bordenstein SR (2016) Fecal Transplants: What Is Being Transferred? *PLoS Biol* 14.
 103. MUDr. Sylvia Polívková PhD, MUDrLVPhD, ProfMUDrPHCSc, ProfMUDrJBCSc (2018) Doporučený postup fekální bakterioterapie pro léčbu rekurentní klostridiové kolitidy, 2018.
 104. Satokari R, Mattila E, Kainulainen V, et al. (2015) Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection - An observational cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* 41: 46–53.
 105. Lee CH, Steiner T, Petrof EO, et al. (2016) Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent *clostridium difficile* infection a randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 315: 142–149.
 106. Ramai D, Zakhia K, Ofosu A, et al. (2019) Fecal microbiota transplantation: Donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness. *Ann Gastroenterol* 32: 30–38.
 107. Bilinski J, Dziurzynski M, Grzesiowski P, et al. (2022) Fresh Versus Frozen Stool for Fecal Microbiota Transplantation—Assessment by Multimethod Approach Combining Culturing, Flow Cytometry, and Next-Generation Sequencing. *Front Microbiol* 13.
 108. Jiang ZD, Ajami NJ, Petrosino JF, et al. (2017) Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection – fresh, or frozen, or lyophilised microbiota from a small pool of healthy donors delivered by colonoscopy. *Aliment Pharmacol Ther* 45: 899–908.
 109. Costello SP, Conlon MA, Vuaran MS, et al. (2015) Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective: Clinical efficacy and bacterial viability data. *Aliment Pharmacol Ther* 42: 1011–1018.
 110. Allegretti JR, Elliott RJ, Ladha A, et al. (2020) Stool processing speed and storage duration do not impact the clinical effectiveness of fecal microbiota transplantation. *Gut Microbes* 1806–1808.

111. Cammarota G, Ianiro G, Kelly CR, et al. (2019) International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 68: 2111–2121.
112. Carlson PE (2020) Regulatory Considerations for Fecal Microbiota Transplantation Products. *Cell Host Microbe* 27: 173–175.
113. Rossier L, Matter C, Burri E, et al. (2023) Swiss expert opinion: current approaches in faecal microbiota transplantation in daily practice. *Swiss Med Wkly* 153.
114. Hota SS, Sales V, Tomlinson G, et al. (2017) Oral vancomycin followed by fecal transplantation versus tapering oral vancomycin treatment for recurrent clostridium difficile infection: An open-label, randomized controlled trial. *Clinical Infectious Diseases* 64: 265–271.
115. Achá SJ, Kühn I, Mbazima G, et al. (2005) Changes of viability and composition of the *Escherichia coli* flora in faecal samples during long time storage. *J Microbiol Methods* 63: 229–238.
116. Ramai D, Zakhia K, Fields PJ, et al. (2021) Fecal Microbiota Transplantation (FMT) with Colonoscopy Is Superior to Enema and Nasogastric Tube While Comparable to Capsule for the Treatment of Recurrent *Clostridioides difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci* 66: 369–380.
117. Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, et al. (2017) Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 46: 479–493.
118. Vaughn BP, Fischer M, Kelly CR, et al. (2023) Effectiveness and Safety of Colonic and Capsule Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 21: 1330-1337.e2.
119. Pomares Bascuñana R, Veses V, Sheth CC (2021) Effectiveness of fecal microbiota transplant for the treatment of *Clostridioides difficile* diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Lett Appl Microbiol* 73: 149–158.
120. Kao D, Roach B, Silva M, et al. (2017) Effect of oral capsule– vs colonoscopy–delivered fecal microbiota transplantation on recurrent *Clostridium difficile* infection: A randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 318: 1985–1993.
121. Varga A, Makszin L, Bufa A, et al. (2023) Efficacy of lyophilised bacteria-rich faecal sediment and supernatant with reduced bacterial count for treating patients with *Clostridioides difficile* Infection – A novel method for capsule faecal microbiota transfer. *Front Cell Infect Microbiol* 13.
122. Vigvári S, Sipos D, Solt J, et al. (2019) Faecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection using a lyophilized inoculum from non-related donors: A case series involving 19 patients. *Acta Microbiol Immunol Hung* 66: 69–78.
123. Keller JJ, Vehreschild MJGT, Hvas CL, et al. (2019) Stool for fecal microbiota transplantation should be classified as a transplant product and not as a drug. *United European Gastroenterol J* 7: 1408–1410.
124. Kupletskaya MB, Netrusov AI (2011) Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage. *Microbiology (N Y)* 80: 850–853.
125. Antheunisse J (1973) Viability of lyophilized microorganisms after storage.

126. Kelly CR, Yen EF, Grinspan AM, et al. (2021) Fecal Microbiota Transplantation Is Highly Effective in Real-World Practice: Initial Results From the FMT National Registry. *Gastroenterology* 160: 183-192.e3.
127. Kelly CR, Ihunnah C, Fischer M, et al. (2014) Fecal microbiota transplant for treatment of clostridium difficile infection in immunocompromised patients. *American Journal of Gastroenterology* 109: 1065–1071.
128. Wang Y, Zhang S, Borody TJ, et al. (2022) Encyclopedia of fecal microbiota transplantation: A review of effectiveness in the treatment of 85 diseases. *Chin Med J (Engl)* 135: 1927–1939.
129. Rapoport EA, Baig M, Puli SR (2022) Adverse events in fecal microbiota transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Ann Gastroenterol* 35: 150–163.
130. DeFilipp Z, Bloom PP, Torres Soto M, et al. (2019) Drug-Resistant E. coli Bacteremia Transmitted by Fecal Microbiota Transplant . *New England Journal of Medicine* 381: 2043–2050.
131. Zhang X, Luo X, Tian L, et al. (2023) The gut microbiome dysbiosis and regulation by fecal microbiota transplantation: umbrella review. *Front Microbiol* 14.
132. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, et al. (2017) European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice, *Gut*, BMJ Publishing Group, 569–580.
133. FDA (2019). Important safety alert regarding use of fecal microbiota for transplantation and risk of serious adverse reactions due to transmission of multi-drug resistant organisms. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/important-safety-alert-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation-and-risk-serious-adverse>.
134. Drewes JL, Corona A, Sanchez U, et al. (2019) Transmission and clearance of potential procarcinogenic bacteria during fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridioides difficile. *JCI Insight* 4.
135. Porcari S, Benech N, Valles-Colomer M, et al. (2023) Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: From microbiome to clinic. *Cell Host Microbe* 31: 712–733.
136. Brandt LJ (2012) Response to Zhang et al. *American Journal of Gastroenterology* 107: 1755–1756.
137. McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. (2018) 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). *Clinical Infectious Diseases* 66: e1–e48.
138. Beneš J, Stebel R, Musil V, et al. Aktualizovaný doporučený postup pro léčbu nemocných s kolitidou vyvolanou Clostridioides difficile Updated Czech guidelines for the treatment of Clostridioides difficile infection.
139. Kumar V, Fischer M (2020) Expert opinion on fecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridioides difficile infection and beyond. *Expert Opin Biol Ther* 20: 73–81.
140. Dehlholm-Lambertsen E, Hall BK, Jørgensen SMD, et al. (2019) Cost savings following faecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection. *Therap Adv Gastroenterol* 12.

141. Gough E, Shaikh H, Manges AR (2011) Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent clostridium difficile infection. *Clinical Infectious Diseases* 53: 994–1002.
142. Tanveer Singh 1 PB 2, KB 2, DG 3, TA 4, NV 5, MS 6, MPR 7, RG 1, BV 1, MRS 8 (2022) Fecal Microbiota Transplantation and Medical Therapy for Clostridium difficile Infection : Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin Gastroenterol* 881–888.
143. Ianiro G, Maida M, Burisch J, et al. (2018) Efficacy of different faecal microbiota transplantation protocols for Clostridium difficile infection: A systematic review and meta-analysis. *United European Gastroenterol J* 6: 1232–1244.
144. Gupta A, Ananthakrishnan AN (2021) Economic burden and cost-effectiveness of therapies for Clostridioides difficile infection: a narrative review. *Therap Adv Gastroenterol* 14.
145. Gorbach SL, Bartlett JG (1977) COLITIS ASSOCIATED WITH CLINDAMYCIN THERAPY Pseudomembranous Enterocolitis: A Review of Its Diverse Forms.
146. Kelly 1994.
147. Schneider KM, Wirtz TH, Kroy D, et al. (2018) Successful Fecal Microbiota Transplantation in a Patient with Severe Complicated Clostridium difficile Infection after Liver Transplantation. *Case Rep Gastroenterol* 12: 76–84.
148. Maseda D, Zackular JP, Trindade B, et al. (2019) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter the microbiota and exacerbate clostridium difficile colitis while dysregulating the inflammatory response. *mBio* 10.
149. Antonelli M, Martin-Loeches I, Dimopoulos G, et al. (2020) Clostridioides difficile (formerly Clostridium difficile) infection in the critically ill: an expert statement. *Intensive Care Med* 46: 215–224.
150. De Roo AC, Regenbogen SE, De Roo AC, et al. (2020) Clostridium difficile Infection: An Epidemiology Update. *Clin Colon Rectal Surg* 33: 49–57.
151. Ananthakrishnan AN (2011) Clostridium difficile infection: Epidemiology, risk factors and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8: 17–26.
152. Karanika S, Paudel S, Zervou FN, et al. (2016) Prevalence and clinical outcomes of Clostridium difficile infection in the intensive care unit: A systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect Dis* 3.
153. Fernanda C Lessa YMWMBZGBGKDJRDMMSMHJIMECPLEWLGWJACBMLSKFDNG (2015) Burden of Clostridium difficile infection in the United States. *N Engl J Med* 825–834.
154. The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases <https://www.escmid.org/esgcd/>.
155. Al Momani LA, Abughanimeh O, Boonpherg B, et al. (2018) Fidaxomicin vs Vancomycin for the Treatment of a First Episode of Clostridium Difficile Infection: A Meta-analysis and Systematic Review. *Cureus*.
156. Roshan Annabel Clancy Thomas J Borody NK Faecal Microbiota Transplantation is Effective for the Initial Treatment of Clostridium difficile Infection: A Retrospective Clinical Review.
157. Mullish BH, Quraishi MN, Segal JP, et al. (2018) 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. *Gut* 67: 1920–1941.

158. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. (2013) Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine* 368: 407–415.
159. Cammarota G, Masucci L, Ianiro G, et al. (2015) Randomised clinical trial: Faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 41: 835–843.
160. Kelly CR, Khoruts A, Staley C, et al. (2016) Effect of fecal microbiota transplantation on recurrence in multiply recurrent *clostridium difficile* infection a randomized trial. *Ann Intern Med* 165: 609–616.
161. Lai CY, Sung J, Cheng F, et al. (2019) Systematic review with meta-analysis: review of donor features, procedures and outcomes in 168 clinical studies of faecal microbiota transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 49: 354–363.
162. Cornely OA, Crook DW, Esposito R, et al. (2012) Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. www.thelancet.com/infection 12: 281–289.
163. Neemann K, Eichele DDD, Smith PPW, et al. (2012) Fecal microbiota transplantation for fulminant *Clostridium difficile* infection in an allogeneic stem cell transplant patient. *Transplant Infectious Disease* 14.
164. Cheng YW, Fischer M (2020) Fecal Microbiota Transplantation: Redefining Surgical Management of Refractory *Clostridium difficile* Infection. *Clin Colon Rectal Surg* 33: 92–97.
165. Alukal J, Dutta SK, Surapaneni BK, et al. (2019) Safety and efficacy of fecal microbiota transplant in 9 critically ill patients with severe and complicated *Clostridium difficile* infection with impending colectomy. *J Dig Dis* 20: 301–307.
166. Cheng Y-W, Fischer M (2019) Treatment of Severe and Fulminant *Clostridioides difficile* Infection. *Curr Treat Options Gastroenterol* 17: 524–533.
167. Fischer M, Sipe B, Cheng YW, et al. (2017) Fecal microbiota transplant in severe and severe-complicated *Clostridium difficile*: A promising treatment approach. *Gut Microbes* 8: 289–302.
168. Hocquart M, Lagier JC, Cassir N, et al. (2018) Early fecal microbiota transplantation improves survival in severe *clostridium difficile* infections. *Clinical Infectious Diseases* 66: 645–650.
169. Cheng YW, Phelps E, Ganapini V, et al. (2019) Fecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and severe *Clostridium difficile* infection in solid organ transplant recipients: A multicenter experience. *American Journal of Transplantation* 19: 501–511.
170. Tan P, Li X, Shen J, et al. (2020) Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Front Pharmacol* 11.
171. Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, et al. (2015) Fecal Microbiota Transplantation Induces Remission in Patients With Active Ulcerative Colitis in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* 149: 102-109.e6.
172. Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, et al. (2017) Faecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis* 11: 1180–1199.

173. Uygun A, Ozturk K, Demirci H, et al. (2017) Fecal microbiota transplantation is a rescue treatment modality for refractory ulcerative colitis. *Medicine (United States)* 96.
174. Khoruts A, Rank KM, Newman KM, et al. (2016) Inflammatory Bowel Disease Affects the Outcome of Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 14: 1433–1438.
175. Fischer M, Kao D, Mehta SR, et al. (2016) Predictors of Early Failure after Fecal Microbiota Transplantation for the Therapy of *Clostridium Difficile* Infection: A Multicenter Study. *American Journal of Gastroenterology* 111: 1024–1031.
176. Dai M, Liu Y, Chen W, et al. (2019) Rescue fecal microbiota transplantation for antibiotic-associated diarrhea in critically ill patients. *Crit Care* 23.
177. Xu F, Li N, Wang C, et al. (2021) Clinical efficacy of fecal microbiota transplantation for patients with small intestinal bacterial overgrowth: a randomized, placebo-controlled clinic study. *BMC Gastroenterol* 21.
178. Li Q, Wang C, Tang C, et al. (2014) Therapeutic modulation and reestablishment of the intestinal Microbiota with fecal Microbiota transplantation resolves sepsis and diarrhea in a patient. *American Journal of Gastroenterology* 109: 1832–1834.
179. Li Q, Wang C, Tang C, et al. (2015) Successful treatment of severe sepsis and diarrhea after vagotomy utilizing fecal microbiota transplantation: A case report. *Crit Care* 19.
180. Huttner BD, de Lastours V, Wassenberg M, et al. (2019) A 5-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a randomized clinical trial. *Clinical Microbiology and Infection* 25: 830–838.
181. Vendrik KEW, Ooijevaar RE, de Jong PRC, et al. (2020) Fecal Microbiota Transplantation in Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol* 10.
182. Proença IM, Allegretti JR, Bernardo WM, et al. (2020) Fecal microbiota transplantation improves metabolic syndrome parameters: systematic review with meta-analysis based on randomized clinical trials. *Nutrition Research* 83: 1–14.
183. Aron-Wisnewsky J, Clément K, Nieuwdorp M (2019) Fecal Microbiota Transplantation: a Future Therapeutic Option for Obesity/Diabetes? *Curr Diab Rep* 19.
184. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors.
185. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. (2018) Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science (1979)* 359: 97–103.
186. Spindelboeck W, Schulz E, Uhl B, et al. (2017) Repeated fecal microbiota transplantations attenuate diarrhea and lead to sustained changes in the fecal microbiota in acute, refractory gastrointestinal graft-versus-host-disease. *Haematologica* 102: e210–e213.
187. Zuo T, Wong SH, Lam K, et al. (2018) Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection is associated with treatment outcome. *Gut* 67: 634–643.

188. Vermeire S, Joossens M, Verbeke K, et al. (2016) Donor Species Richness Determines Faecal Microbiota Transplantation Success in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* 10: 387–394.
189. Cheng Y-WMHXEPNRSSMBZKMJAMMFM (2017) Fecal Microbiota Transplant Decreases Mortality in Patients With Refractory Severe and Severe Complicated *Clostridium difficile* Infection Not Eligible for Colectomy. *American Journal of Gastroenterology* 112: 100.
190. Osman M, Stoltzner Z, Kelsey O'brien ;, et al. (2016) I D W E E K 2 0 1 6 ORAL ABSTRACTS 841. Donor Efficacy in Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile*: Evidence From a 1,999-Patient Cohort.
191. Kump P, Wurm P, Gröchenig HP, et al. (2018) 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* 47: 67–77.
192. Rees NP, Shaheen W, Quince C, et al. (2022) Systematic review of donor and recipient predictive biomarkers of response to faecal microbiota transplantation in patients with ulcerative colitis. *EBioMedicine* 81: 104088.
193. Vaughn BP, Vatanen T, Allegretti JR, et al. (2016) Increased Intestinal Microbial Diversity Following Fecal Microbiota Transplant for Active Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 22: 2182–2190.
194. He R, Li P, Wang J, et al. (2022) The interplay of gut microbiota between donors and recipients determines the efficacy of fecal microbiota transplantation. *Gut Microbes* 14.
195. Kump P, Wurm P, Gröchenig HP, et al. (2018) 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* 47: 67–77.
196. Bilinski J, Dziurzynski M, Grzesiowski P, et al. (2020) Multimodal approach to assessment of fecal microbiota donors based on three complementary methods. *J Clin Med* 9: 1–17.
197. Koo H, Morrow CD (2022) Time series strain tracking analysis post fecal transplantation identifies individual specific patterns of fecal dominant donor, recipient, and unrelated microbial strains. *PLoS One* 17.
198. Safarian S, Rajendran C, Müller H, et al. (2016) Structure of a bd oxidase indicates similar mechanisms for membraneintegrated oxygen reductases. *Science (1979)* 352: 583–586.
199. Ianiro G, Punčochář M, Karcher N, et al. (2022) Variability of strain engraftment and predictability of microbiome composition after fecal microbiota transplantation across different diseases. *Nat Med* 28: 1913–1923.
200. S. Thompson¹ HGATABDMJJFKSSHH ¹University of I at U-C ²OSF SFMC ³University of IC of M (2016) Dietary Predictors of Fecal Microbiota Transplantation Success. *J Acad Nutr Diet* 116: 9–9.
201. <https://clinicaltrials.gov/search?cond=FMT&viewType=Table>.
202. Baunwall SMD, Terveer EM, Dahlerup JF, et al. (2021) The use of Faecal Microbiota Transplantation (FMT) in Europe: A Europe-wide survey. *The Lancet Regional Health - Europe* 9.

203. Bellali S, Lagier JC, Raoult D, et al. (2019) Among live and dead bacteria, the optimization of sample collection and processing remains essential in recovering gut microbiota components. *Front Microbiol* 10.
204. Widjaja F, Rietjens IMCM (2023) From-Toilet-to-Freezer: A Review on Requirements for an Automatic Protocol to Collect and Store Human Fecal Samples for Research Purposes. *Biomedicines* 11.
205. Papanicolas LE, Choo JM, Wang Y, et al. (2019) Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine* 41: 509–516.
206. Chu ND, Smith MB, Perrotta AR, et al. (2017) Profiling living bacteria informs preparation of fecal microbiota transplantations. *PLoS One* 12.
207. Singh A, Mahajan R, Kahlon BK, et al. (2022) Early fecal microbiome transfer after donor defecation determines response in patients with moderate to severe ulcerative colitis. *Indian Journal of Gastroenterology* 41: 389–396.
208. Emerson JB, Adams RI, Román CMB, et al. (2017) Schrödinger’s microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome* 5: 86.
209. Hammes F, Berney M, Egli T (2011) Cultivation-independent assessment of bacterial viability. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 124: 123–150.
210. Servain-Viel S, Aknin ML, Domenichini S, et al. (2023) A flow cytometry method for safe detection of bacterial viability. *Cytometry Part A*.
211. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, et al. (2015) Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol* 15.
212. Stocks SM (2004) Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry Part A* 61: 189–195.
213. Arndt-Jovin DJ, Jovin TM Fluorescence Labeling and Microscopy of DNA.
214. LIVE/DEAD® BacLight® Bacterial Viability Kits (2015) <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp07007.pdf>, 2015.
215. Xie J, Acosta EM, Gitai Z (2023) Bacterial viability in the built environment of the home. *PLoS One* 18: e0288092.
216. Papanicolas LE, Wang Y, Choo JM, et al. (2019) Optimisation of a propidium monoazide based method to determine the viability of microbes in faecal slurries for transplantation. *J Microbiol Methods* 156: 40–45.
217. Young GR, Smith DL, Embleton ND, et al. (2017) Reducing viability bias in analysis of gut microbiota in preterm infants at risk of NEC and sepsis. *Front Cell Infect Microbiol* 7.
218. Wang Y, Yan Y, Thompson KN, et al. (2021) Whole microbial community viability is not quantitatively reflected by propidium monoazide sequencing approach. *Microbiome* 9.
219. Costello SP, Conlon MA, Vuaran MS, et al. (2015) Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective: Clinical efficacy and bacterial viability data. *Aliment Pharmacol Ther* 42: 1011–1018.
220. Cibulková Ivana; Řehořová Veronika; Soukupová Hana; Waldauf Petr; Cahová Monika; Maňák Jan; Matějovič Martin; Duška František (2024) Allogenic faecal

- microbiota transplantation for antibiotic-associated diarrhoea in critically ill patients (FEBATRICE) a Study protocol for a multi-centre randomised controlled trial (phase II) . *PLoS One*, 2024, (v tisku).
221. Wischmeyer PE, McDonald D, Knight R (2016) Role of the microbiome, probiotics, and ‘dysbiosis therapy’ in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 22: 347–353.
 222. Cibulková I, Řehořová V, Hajer J, et al. (2021) Fecal microbial transplantation in critically ill patients—Structured review and perspectives. *Biomolecules* 11.
 223. Bloos F, Thomas-Rüddel D, Rüddel H, et al. (2014) Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: A prospective observational multi-center study. *Crit Care* 18.
 224. Arulkumaran N, Routledge M, Schlebusch S, et al. (2020) Antimicrobial-associated harm in critical care: a narrative review. *Intensive Care Med* 46: 225–235.
 225. Kootte RS, Levin E, Salojärvi J, et al. (2017) Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab* 26: 611-619.e6.
 226. Zhang D, Prabhu VS, Marcella SW (2018) Attributable Healthcare Resource Utilization and Costs for Patients With Primary and Recurrent *Clostridium difficile* Infection in the United States. *Clin Infect Dis* 66: 1326–1332.
 227. Cheng YW, Phelps E, Nemes S, et al. (2020) Fecal Microbiota Transplant Decreases Mortality in Patients with Refractory Severe or Fulminant *Clostridioides difficile* Infection. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 18: 2234-2243.e1.
 228. Zilberberg MD, Nathanson BH, Sadigov S, et al. (2009) Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile*-associated disease among patients on prolonged acute mechanical ventilation. *Chest* 136: 752–758.
 229. Ianiro G, Masucci L, Quaranta G, et al. (2018) Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy plus vancomycin for the treatment of severe refractory *Clostridium difficile* infection—single versus multiple infusions. *Aliment Pharmacol Ther* 48: 152–159.
 230. Ubeda C, Bucci V, Caballero S, et al. (2013) Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun* 81: 965–973.
 231. Bilinski J, Grzesiowski P, Sorensen N, et al. (2017) Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Blood Disorders Inhibits Gut Colonization With Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study. *Clinical Infectious Diseases* 65: 364–370.
 232. Karakan T, İbiş M, Cindoruk M, et al. P639 Faecal microbiota transplantation as a rescue therapy for steroid-dependent and/or non-responsive patients with ulcerative colitis: a pilot study. P640 Co-detection of infliximab and antibodies in an ECLIA assay amongst IBD patients treated with infliximab.
 233. Fischer M, Kao D, Kelly C, et al. (2016) Fecal Microbiota Transplantation is Safe and Efficacious for Recurrent or Refractory *Clostridium difficile* Infection in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 22: 2402–2409.
 234. Costello SP, Day A, Yao CK, et al. (2020) Faecal microbiota transplantation (FMT) with dietary therapy for acute severe ulcerative colitis. *BMJ Case Rep* 13.
 235. Wei Y, Yang J, Wang J, et al. (2016) Successful treatment with fecal microbiota transplantation in patients with multiple organ dysfunction syndrome and diarrhea following severe sepsis. *Crit Care* 20.

236. Wurm P, Spindelboeck W, Krause R, et al. (2017) Antibiotic-associated apoptotic enterocolitis in the absence of a defined pathogen: The role of intestinal microbiota depletion. *Crit Care Med* 45: e600–e606.
237. Chen J, Zaman A, Ramakrishna B, et al. (2021) Stool Banking for Fecal Microbiota Transplantation: Methods and Operations at a Large Stool Bank. *Front Cell Infect Microbiol* 11.
238. Fouhy F, Deane J, Rea MC, et al. (2015) The effects of freezing on faecal microbiota as determined using miseq sequencing and culture-based investigations. *PLoS One* 10.
239. Apajalahti JHA, Kettunen A, Nurminen PH, et al. (2003) Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl Environ Microbiol* 69: 5731–5735.
240. Bottino P, Vay D, Leli C, et al. (2024) Evaluation of Bacterial Viability for Fecal Microbiota Transplantation: Impact of Thawing Temperature and Storage Time. *Microorganisms* 12.
241. Reygner J, Charrueau C, Delannoy J, et al. (2020) Freeze-dried fecal samples are biologically active after long-lasting storage and suited to fecal microbiota transplantation in a preclinical murine model of *Clostridioides difficile* infection. *Gut Microbes* 11: 1405–1422.
242. Řehořová V, Cibulková I, Soukupová H, et al. (2021) Multi-donor Fecal Microbial Transplantation for Critically Ill Patients: Rationale and Standard Operating Procedure.
243. Duquenoy A, Bellais S, Gasc C, et al. (2020) Assessment of Gram- and Viability-Staining Methods for Quantifying Bacterial Community Dynamics Using Flow Cytometry. *Front Microbiol* 11.
244. Ben-Amor K, Heilig H, Smidt H, et al. (2005) Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 4679–4689.
245. Berney M, Hammes F, Bosshard F, et al. (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73: 3283–3290.
246. Shimizu H, Arai K, Asahara T, et al. (2021) Stool preparation under anaerobic conditions contributes to retention of obligate anaerobes: potential improvement for fecal microbiota transplantation. *BMC Microbiol* 21.
247. Bénard M V., Arretxe I, Wortelboer K, et al. (2023) Anaerobic Feces Processing for Fecal Microbiota Transplantation Improves Viability of Obligate Anaerobes. *Microorganisms* 11.
248. Allegretti JR, Elliott RJ, Ladha A, et al. (2020) Stool processing speed and storage duration do not impact the clinical effectiveness of fecal microbiota transplantation. *Gut Microbes* 1806–1808.
249. Chu ND, Smith MB, Perrotta AR, et al. (2017) Profiling living bacteria informs preparation of fecal microbiota transplantations. *PLoS One* 12.
250. Emanuelsson F, Claesson BEB, Ljungström L, et al. (2014) Faecal microbiota transplantation and bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection: A retrospective evaluation of 31 patients. *Scand J Infect Dis* 46: 89–97.

251. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, et al. (2016) Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature* 533: 543–546.
252. Apajalahti JHA, Kettunen A, Nurminen PH, et al. (2003) Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl Environ Microbiol* 69: 5731–5735.
253. Burz SD, Abraham AL, Fonseca F, et al. (2019) A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation. *Sci Rep* 9.
254. Galazzo G, van Best N, Benedikter BJ, et al. (2020) How to Count Our Microbes? The Effect of Different Quantitative Microbiome Profiling Approaches. *Front Cell Infect Microbiol* 10.
255. Costello SP, Conlon MA, Vuaran MS, et al. (2015) Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective: Clinical efficacy and bacterial viability data. *Aliment Pharmacol Ther* 42: 1011–1018.
256. Quaranta G, Fancello G, Ianiro G, et al. (2020) Laboratory handling practice for faecal microbiota transplantation. *J Appl Microbiol* 128: 893–898.

11. Seznam publikací

11.1. Publikace, které jsou podkladem dizertace

- a) **CIBULKOVÁ, I.**; ŘEHOŘOVÁ, V.; WILHELM, M.; SOUKUPOVÁ, H.; HAJER, J.; DUŠKA, F.; DAŇKOVÁ, H.; CAHOVÁ, M. Evaluating Bacterial Viability in Faecal Microbiota Transplantation: A Comparative Analysis of In Vitro Cultivation and Membrane Integrity Methods. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2024, **38**(19-20), e25105. ISSN 0887-8013. DOI 10.1002/jcla.25105.
IF: 2.600/2023; Kvartil IF: Q2/2023; Kvartil AiS: Q3/2023
- b) **CIBULKOVÁ, I.**; ŘEHOŘOVÁ, V.; HAJER, J.; DUŠKA, F. Fecal Microbial Transplantation in Critically Ill Patients - Structured Review and Perspectives. *Biomolecules*. 2021, **11**(10): 1459. ISSN 2218-273X, e-ISSN 2218-273X. DOI: [10.3390/biom11101459](https://doi.org/10.3390/biom11101459).
IF: 6.064/2021; Kvartil IF: Q2/2021, Kvartil AiS: Q2/2021
- c) **CIBULKOVÁ, I.**; ŘEHOŘOVÁ, V.; SOUKUPOVÁ, H.; WALDAUF, P.; CAHOVÁ, M.; MAŇÁK, J.; MATĚJOVIČ, M.; DUŠKA, F. Allogenic faecal microbiota transplantation for antibiotic-associated diarrhoea in critically ill patients (FEBATRICE) a Study protocol for a multi-centre randomised controlled trial (phase II). *PLoS One*. 2024, (v tisku), ISSN 1932-6203. ID: OBD-3LF: 43902628
IF: 2.900/2023; Kvartil IF: Q1/2023; Kvartil AiS: Q1/2023
- d) SOUKUPOVÁ, H.; ŘEHOŘOVÁ, V.; **CIBULKOVÁ, I.**; DUŠKA, F. Assessment of Faecal Microbiota Transplant Stability in Deep-Freeze Conditions: A 12-Month Ex Vivo Viability Analysis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2024, **38**(7): e25023. ISSN 0887-8013, e-ISSN 1098-2825. DOI: [10.1002/jcla.25023](https://doi.org/10.1002/jcla.25023).
IF: 2.600/2023; Kvartil IF: Q2/2023; Kvartil AiS: Q3/2023
- e) **CIBULKOVÁ, I.**; ŘEHOŘOVÁ, V.; DUŠKA, F. Význam střevní mikrobioty u kriticky nemocných pacientů a možnosti jejího ovlivnění. *Anesteziologie a intenzivní medicína*. 2022, **33**(1): 32-38. ISSN 1214-2158, e-ISSN 1805-4412. DOI: [10.36290/aim.2022.003](https://doi.org/10.36290/aim.2022.003).
IF: 0.100/2022; Kvartil IF: 0/2022, Kvartil AiS: Q4/2022
- f) ŘEHOŘOVÁ, V.; **CIBULKOVÁ, I.**; SOUKUPOVÁ, H.; DUŠKA, F. Multi-Donor Fecal Microbial Transplantation for Critically Ill Patients: Rationale and Standard Operating Procedure. *Future Pharmacology*. 2022, **2**(1): 55-63. ISSN 2673-9879, e-ISSN 2673-9879. DOI: [10.3390/futurepharmacol2010005](https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2010005).

11.2. Publikace, které nejsou podkladem dizertace

- a) ĎÁSKOVÁ, N.; HECZKOVÁ, M.; MÓDOS, I.; HRADECKÝ, J.; HUDCOVIC, T.; KUZMA, M.; PELANTOVÁ, H.; BUŠKOVÁ, I.; STICOVÁ, E.; FUNDA, D.; GOLIÁŠ, J.; DRABOŇOVÁ, B.; JARKOVSKÁ, J.; KRÁLOVÁ, M.; **CIBULKOVÁ, I.**; GOJDA, J.; CAHOVÁ, M. Protective Effect of Vegan Microbiota on Liver Steatosis Is Conveyed by Dietary Fiber: Implications for Fecal Microbiota Transfer Therapy. *Nutrients*. 2023, **15**(2): 454. ISSN 2072-6643, e-ISSN 2072-6643. DOI: [10.3390/nu15020454](https://doi.org/10.3390/nu15020454).
IF: 4.800/2023; Kvartil IF: Q1/2023; Kvartil AiS: Q2/2023
- b) JAROŠOVÁ, J.; ZARIVNIJOVÁ, L.; **CIBULKOVÁ, I.**; MAREŠ, J.; MAČINGA, P.; HUJOVÁ, A.; FALT, P.; URBAN, O.; HAJER, J.; ŠPIČÁK, J.; HUCL, T. Endoluminal radiofrequency ablation in patients with malignant biliary obstruction: a randomised trial. *Gut*. 2023, **72**(12): 2286-2293. ISSN 0017-5749, e-ISSN 1468-3288. DOI: [10.1136/gutjnl-2023-329700](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-329700).
IF: 23.000/2023; Kvartil IF: D1/2023; Kvartil AiS: D1/2023
- c) DURÍČ, T.; **CIBULKOVÁ, I.**; HAJER, J. Prevention of Musculoskeletal Injuries in Gastrointestinal Endoscopists. *Gastroenterology Insights*. 2024, **15**(2): 285-302. ISSN 2036-7414, e-ISSN 2036-7422. DOI: [10.3390/gastroent15020021](https://doi.org/10.3390/gastroent15020021).
IF: 1.500/2023; Kvartil IF: Q3/2023; Kvartil AiS: Q4/2023
- d) DURÍČ, T.; **CIBULKOVÁ, I.**; HAJER, J. Musculoskeletal Injuries in the Endoscopy Practitioner Risk Factors, Ergonomic Challenges and Prevention—Narrative Review and Perspectives. *Gastroenterology Insights*. 2023, **14**(3): 352-362. ISSN 2036-7414, e-ISSN 2036-7422. DOI: [10.3390/gastroent14030026](https://doi.org/10.3390/gastroent14030026).
IF: 1.500/2023; Kvartil IF: Q3/2023; Kvartil AiS: Q4/2023
- e) NOVÁK, M.; ROSINA, J.; GÜRLICH, R.; **CIBULKOVÁ, I.**; HAJER, J. Construction of a Wireless-Enabled Endoscopically Implantable Sensor for pH Monitoring with Zero-Bias Schottky Diode-based Receiver. *JoVE - Journal of Visualized Experiments*. 2021, **174**(August): e62864. ISSN 1940-087X, e-ISSN 1940-087X. DOI: [10.3791/62864](https://doi.org/10.3791/62864).
IF: 1.424/2021; Kvartil IF: Q3/2021; Kvartil AiS: Q3/2021

12. Přílohy

Příloha 1: Originální článek, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Cibulkova et al. 2024

Příloha 2: Originální článek, *PLoS One*, Cibulkova et al. 2024

Příloha 3: Originální článek, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Soukupova et al. 2024

Příloha 4: Originální článek, *Biomolecules*. Cibulkova et al. 2021