



Современные представления о трансплантации микробиоты

Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П.Павлова;
НИИ Детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой

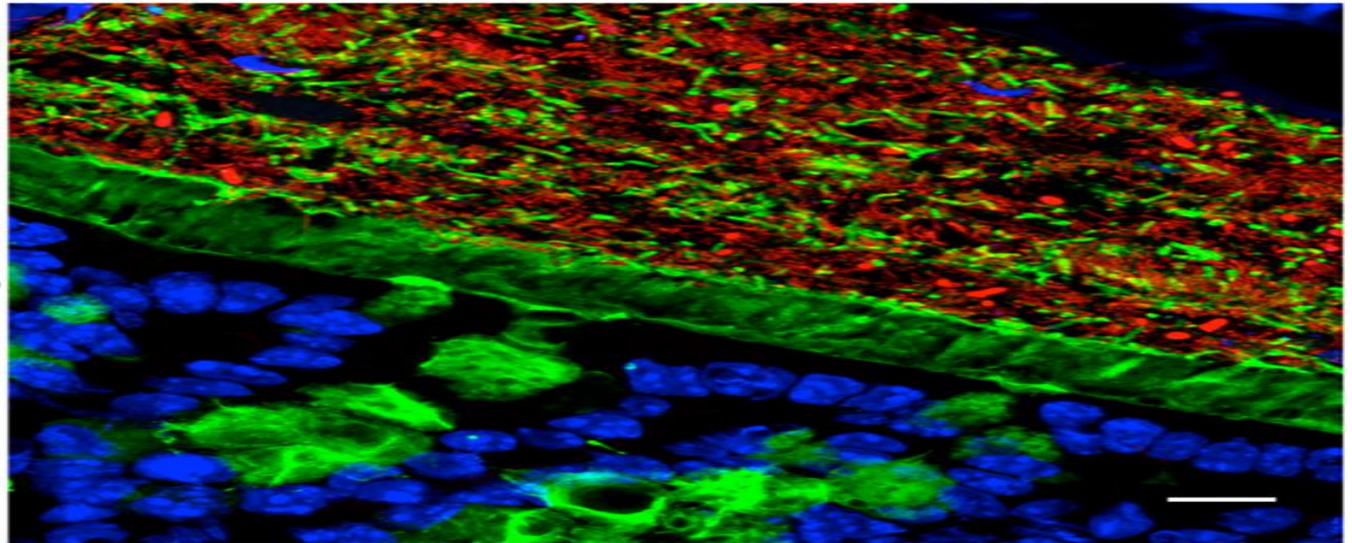
Кучер М. А.
Санкт-Петербург, 2017

Формирование микробиоты

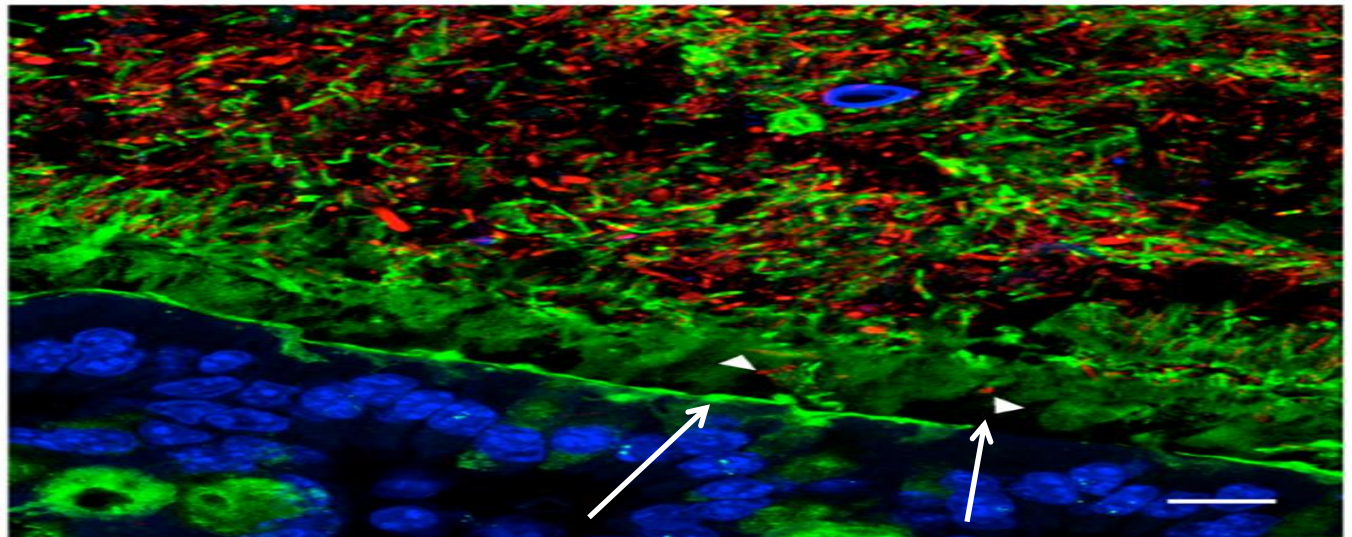
- В первые часы после рождения заселение штаммами микроорганизмов из родовых путей матери
- Окончательное формирование к 3 годам жизни:
 - Кесарево сечение
 - Отказ от грудного вскармливания (дефицит β -лактазы)
 - Лечение антибиотиками
 - Вид питания: стерилизованные продукты, полуфабрикаты, продукты включающие консерванты и антибиотики

Микробиота толстой кишки

Норма



Единичное
проникновение
патогенных бактерий



Функции микробиоты кишечника



Просвет

Мукозный
слой

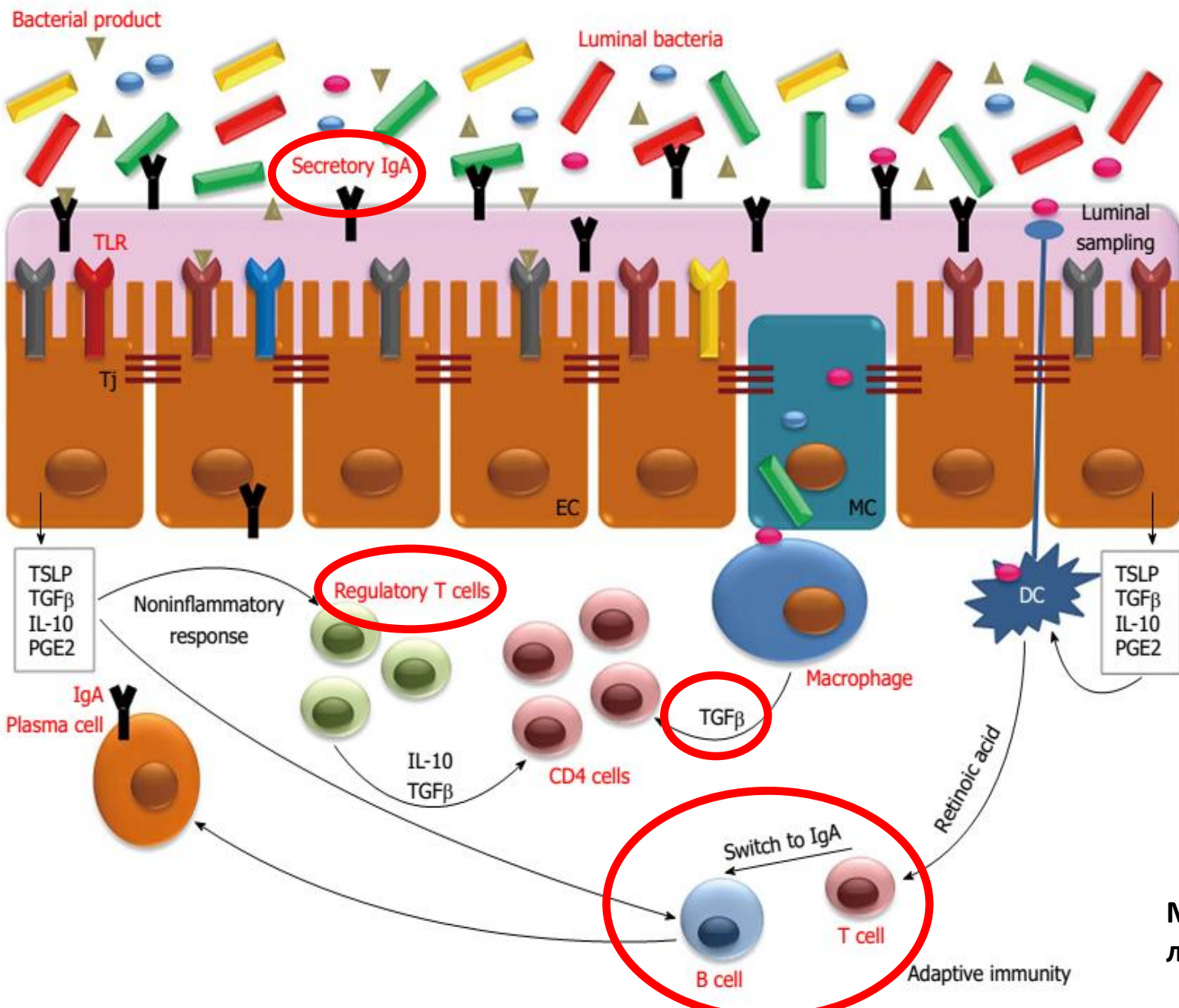
- LPS
Flagellin
Peptidoglycans
Formylated peptides
- MAMPs

Эпителиальные
клетки

- TLRs
FPRs
NODs
- PRRs

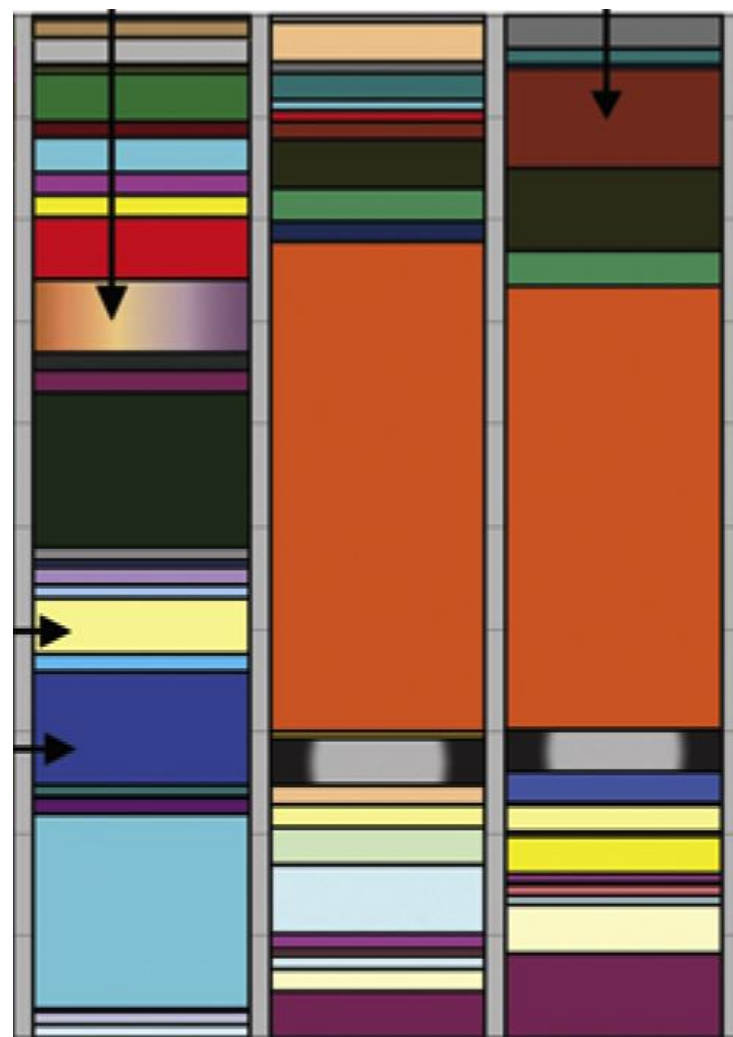
Собственная
пластинка

Мезентериальные
лимфатические
узлы



Трансплантация фекальной микробиоты

- ТФМ – введение жизнеспособных микроорганизмов от здорового донора в желудочно-кишечный тракт реципиента с дисбиоз-ассоциированной болезнью, с целью восстановления функций микробиоты



Пациент Д 0 Донор Пациент Д 14

История вопроса – 2 000 лет?



Плиний Старший

- Плиний-старший – древнеримский писатель-эрудит
- Лечение кишечной инфекции у воинов римских легионов
- I век н.э
- Энциклопедия «Естественная история»

История вопроса – 1 700 лет?



葛
洪

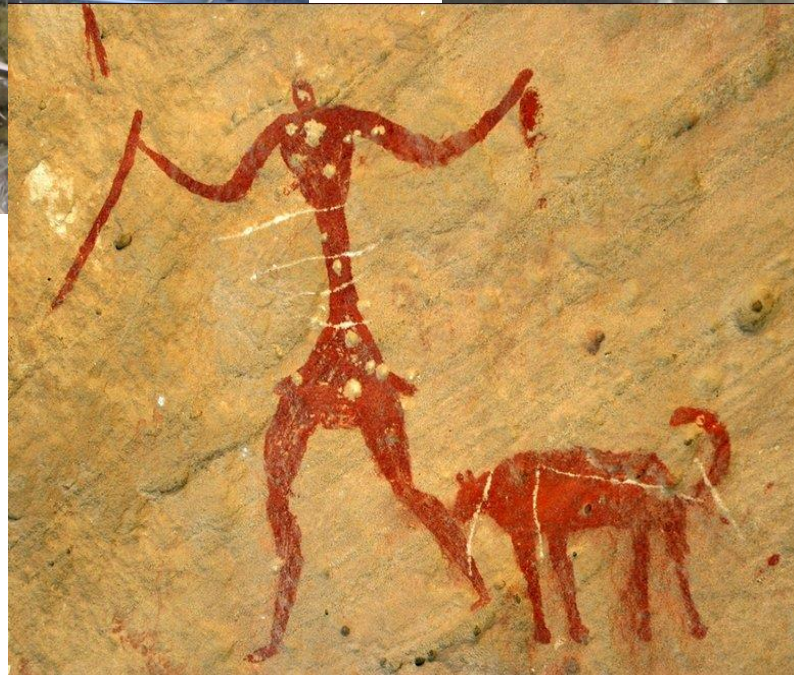
- Гэ Хун – даосский ученый, алхимик, доктор
- Лечение диареи и отравлений
- IV век н.э.
- «Zhou Hou Bei Ji Fang» – первая книга о неотложной медицине в древнем Китае

История вопроса – 400 лет?



- Ли Шичжэнь – врач, фармаколог
- XVI век, династия Мин
- Лечение диареи
- Научный труд “Ben Cao Gang Mu”, желтый суп

...или 12 000 лет?



Наскальная живопись Ливии (12 тыс. лет до н. э.)

Современная эра

- 1958 год – 4 случая успешного лечения псевдомембранозного колита [1]
- 1960-1980 – накопление клинического опыта ТФМ при псевдомембранозном колите [2]
- 1990 – клинические исследования при:
 - воспалительные заболевания кишечника: неспецифический язвеный колит, болезнь Крона с инфекционным компонентом
 - заболевания ассоциированные с дисбиозом ЖКТ [3, 4]

1. Eiseman B., et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*. 1958;44:854-859
2. Kump P. Any Future for fecal microbiota transplantation as treatment strategy for inflammatory bowel diseases? *Dig Dis* 2016;34(suppl 1):74–81
3. Rossen N.G. Fecal microbiota transplantation as novel therapy in gastroenterology: A systematic review *World J Gastroenterol* 2015 May 7; 21(17): 5359-5371
4. Evrensel A. Fecal microbiota transplantation and its usage in neuropsychiatric disorders // *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* - 2016;14(3):231-237

Современная эра

- 2012 год – создан биобанк для хранения замороженных образцов, сеть взаимодействия с 750 клиниками США
- 2013 год – разрешение FDA и регулирование клинических исследований по лечению резистентных инфекций ассоциированных с *Clostridium difficile* [1]

1. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Enforcement policy regarding investigational new drug requirements for use of fecal microbiota for transplantation to treat *Clostridium difficile* infection not responsive to standard therapies. Dept Health and Human Services, July 2013.
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm361379.htm>

Современная эра

- 2014 год – ТФМ включена в рекомендации ESCMID по лечению ванкомицин-резистентной инфекции, вызванной *Clostridium difficile*, с уровнем доказательности AI [1]
- 2014 год – ТФМ одобрена ЕССО для лечения хронических неспецифических воспалительных заболеваний кишечника [2]
- 2016 год – терапия резистентной к стандартной терапии острой реакции трансплантат против хозяина [3]

1. Debast S.B., et al. European society of clinical microbiology and infectious diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection // Clin Microbiol Infect. – 2014. – Vol.20, №2. – P.1-26
2. Rahier J.F., et al. Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel diseases // J Crohns Colitis – 2014. – Vol.8. – P.443-468
3. Kakhana K. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut // Blood. – 2016. – Vol.128, №16. – P.2083-88

Эффективность и безопасность

- 53 исследования (661 пациент)
- Ремиссия: 36% - неспецифический язвенный колит, 50,5% - болезнь Крона, 21,5% - поухит
- Лучше результаты при неоднократных манипуляциях, введение в нижние отделы ЖКТ
- Регистр ТФМ – www.gastro.org/patient-care/registries-studies/fmt-registry
- **Осложнения**
 - Транзиторные гастроэнтерологические нарушения

Диагностика микробиоты

- Культуральный метод
- Копрограмма
- Real-time ПЦР – количественная оценка
 - Тест-системы: колонофлор-8, колонофлор-16, прото-скрин



- Секвенирование 16S рибосомальной РНК – выявление бактериальных изолятов (high throughput sequencing)

Секвенирование

- Выделение микробной ДНК из фекалий
- Амплификация с помощью ПЦР V4-V5 участков гена 16S рРНК
- Секвенирование (Illumina MiSeq, USA)
- Сравнение с базой данных образцов (NCBI Sequence Read Archive database)



Требования к донору

- Аллогенный донор
- Нет приема антибиотиков в течение 1 месяца
- Отсутствие патологии ЖКТ, онкологии
- Отсутствие гемотрансмиссивных инфекций
- Отсутствие в образце стула:
 - *C. difficile*
 - энтерогеморрагического класса *Escherichia coli*
 - *Salmonella*
 - *Shigella*
 - *Yersinia*
 - *Campylobacter*
 - Паразитарной инвазии

Протокол приготовления трансплантата

- **сбор** фекалий 60-120 граммов, взвешивание, тайминг ≤ 6 часов
- добавление 100 мл физиологического раствора (0,9% NaCl) к фекалиям и **суспендирование** до получения равномерной суспензии
- **фильтрование** полученного материала



Хранение микробиоты



Human Microbiota Biobank (HUMB) at University of Tartu, Estonia

eP501

T. Rööp¹, M. Mikelsaar¹, H. Mändar² and R. Mändar¹

¹ Department of Microbiology, University of Tartu, Ravila 19, Tartu 50411, Estonia

² Institute of Physics, University of Tartu, Riia 142, Tartu 51014, Estonia

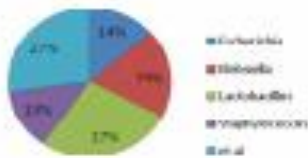
About HUMB

Human Microbiota Biobank (HUMB) at University of Tartu was established in 1994. In 2010 it was registered at WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms (WDCM) as WFCC Estonian Human Microbiota Biobank (collection no. 977, acronym HUMB), and it is a member of European Culture Collections' Organisation (ECCO).

The collection can be found also through website of Estonian Electronic Microbial database <http://eemb.ut.ee/eng/>

HUMB in numbers

- > 7500 isolates
- 68 genera
- 170 species
- > 1000 microbiota samples
- > 1500 DNA
- > 120 papers
- 20 PhD thesis



Distribution of bacterial genus in HUMB. There are species from 68 genus in HUMB.

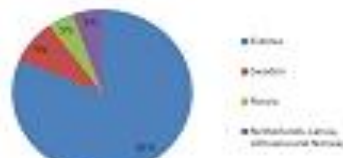
Strains and samples from:

- Gastrointestinal tract
- Urogenital tract
- Respiratory tract
- Mouth
- Skin
- Healthy and diseased people
- Newborns, children, adults, elderly

Hundreds of new samples each year.

Subcollections

- Continuing cohort of Estonian and Swedish children since 1994: faecal samples, bacterial strains, clinical data
- Faecal and oral lactobacilli from Estonia, Norway and Sweden
- Urinary tract infections causing *E. coli*
- Opportunists from neonates
- ESBL-positive opportunists from different countries
- ... and many others



Origin of isolates

Probiotic development

Ongoing in collaboration with University of Tartu, Bio-Competence Centre of Healthy Dairy Products and Competence Centre on Reproductive Medicine and Biology.

Probiotics on the market:

Lactobacillus fermentum ME-3
Lactobacillus plantarum TENGA*



Database

The database includes :

- Preservation data
- Origin
- Identification
- Properties
- Clinical and animal trials
- Publications

Special procedures and functions are designed for data edit, consistency check, browsing, search, statistical analysis and presentation either in digital or printed form.

Digital information of the biobank is based on MySQL database that was composed by programs dbForge Studio (Devart) and MS_DB (University of Tartu).



This code opens electronic catalogue



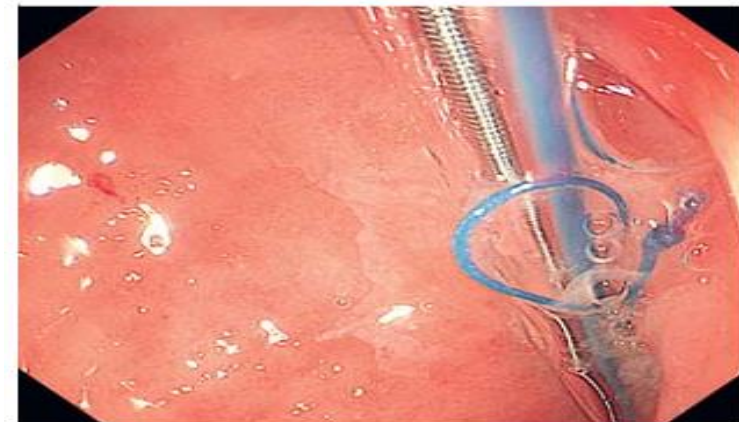
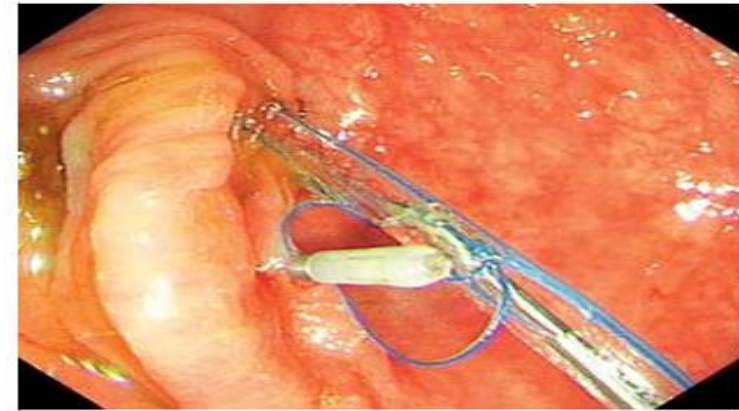
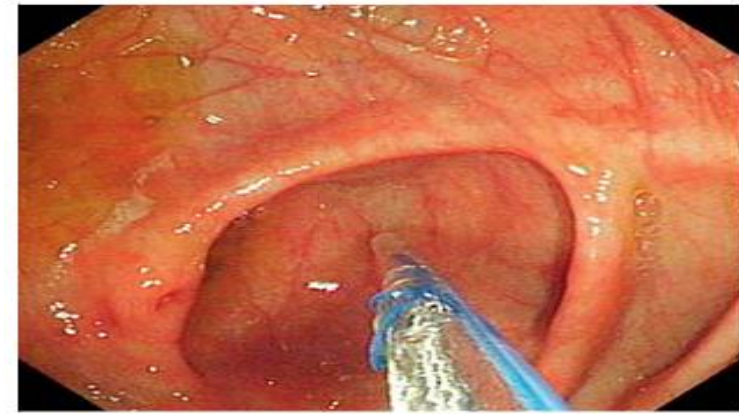
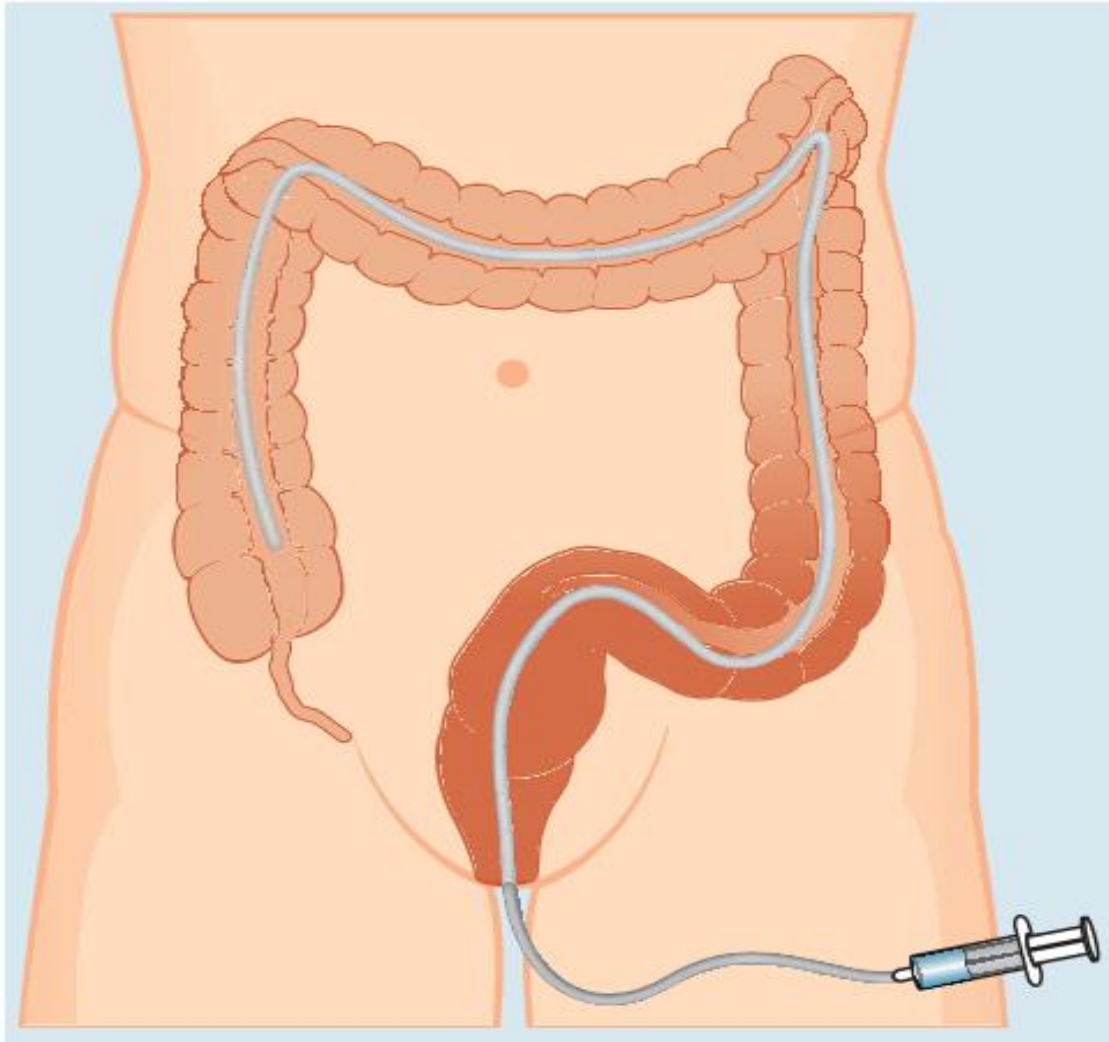
Looking forward to possible scientific collaboration. Visit our website:
Contact us: <http://eemb.ut.ee/eng>

tiiu.roop@ut.ee, reet.mandar@ut.ee

Методика трансплантации микробиоты

- **Общая эффективность 87%**
- Капсулы – per os (нет данных)
- ФГДС – желудок – 81%
- ФГДС – 12-перстная кишка – 86%
- ФКС – восходящая кишка – 93%
- Глубокая клизма – нисходящая кишка (нет данных)

Трансэндоскопическая доставка в слепую кишку



Замороженные желатиновые капсулы



Повышение эффективности ТФМ

- Терапия яблочным пектином:
 - увеличивает ферментирование пищевых волокон с образованием короткоцепочечных жирных кислот (бутират)

Цель исследования

- Повысить эффективность лечения полирезистентных инфекционных осложнений ассоциированных с *Clostridium difficile* и *Klebsiella pneumoniae* после аллогенной ТГСК



Ampicillin

No antibiotics

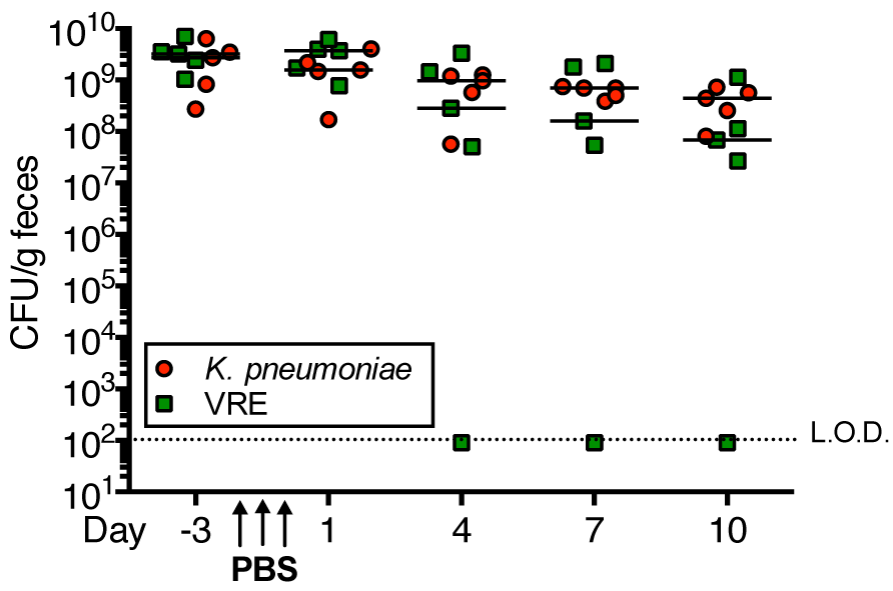
day: -13 -8 -5 -3 -2 -1 0 1 4 7 10

▲
VRE
+
Kpn

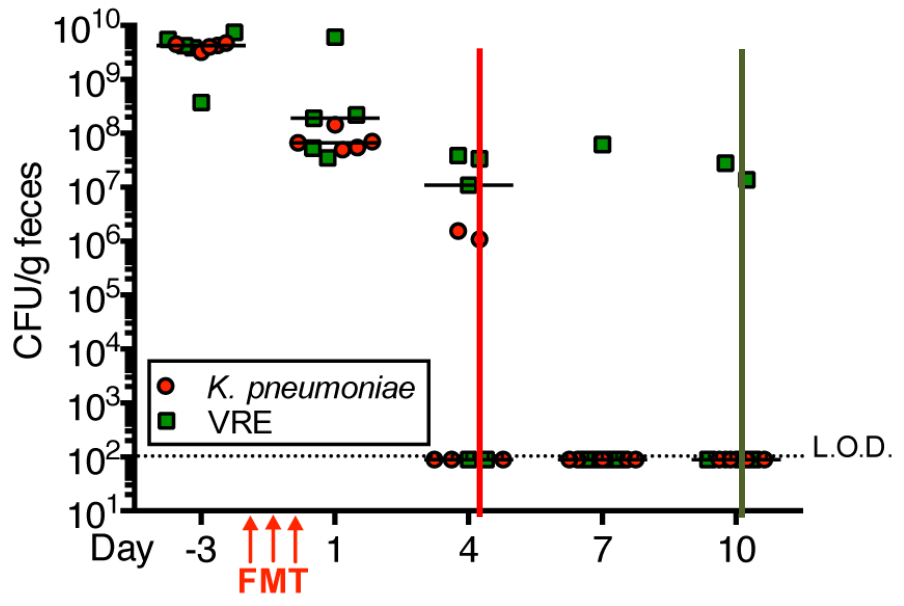
▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲
FMT Fecal sample

Klebsiella pneumoniae
не определялась
к 4 дню

Enterococcus faecium
(VRE) - к 10 дню



плацебо

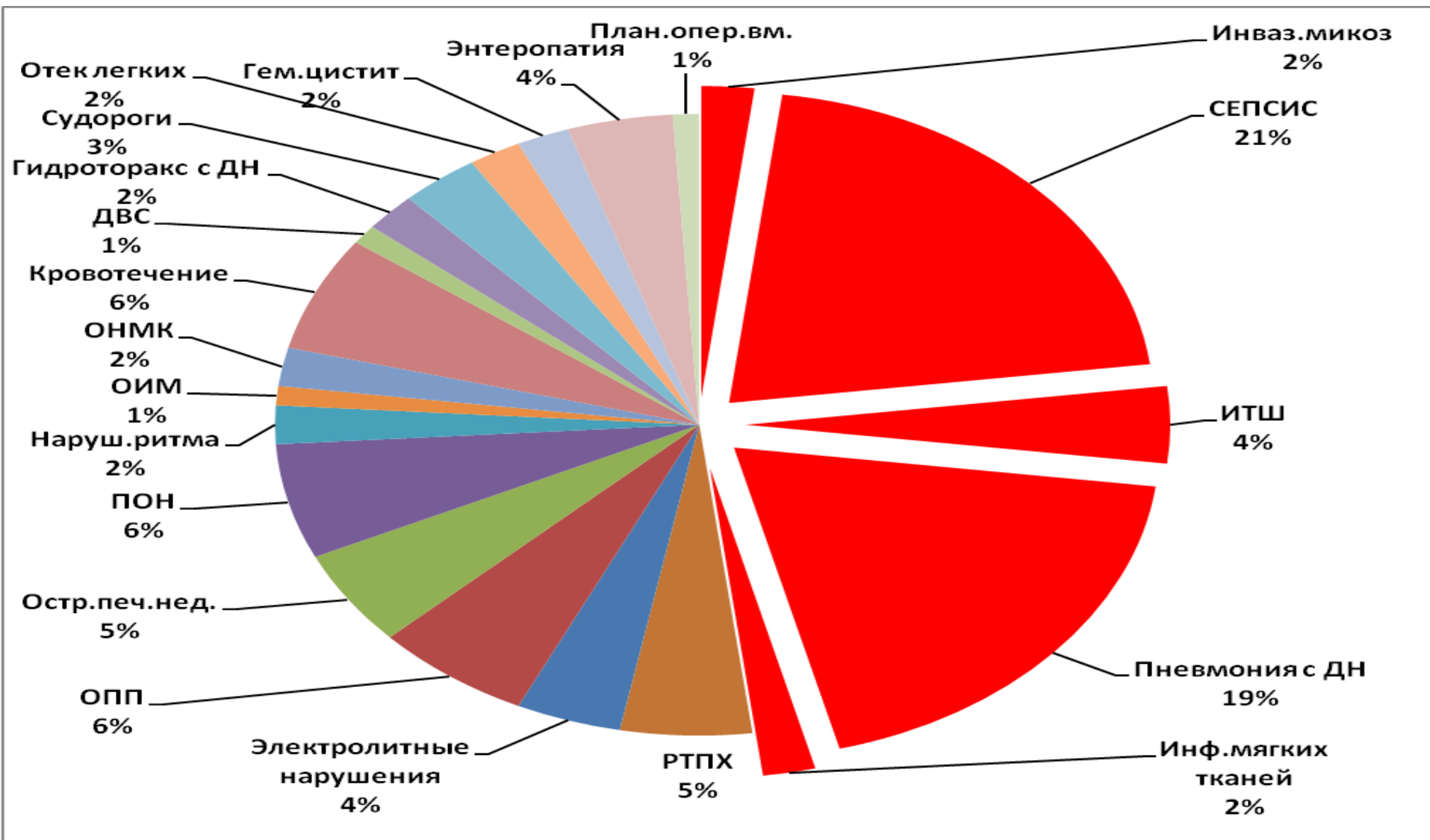


**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ
ФЕКАЛЬНОЙ
МИКРОБИОТЫ**

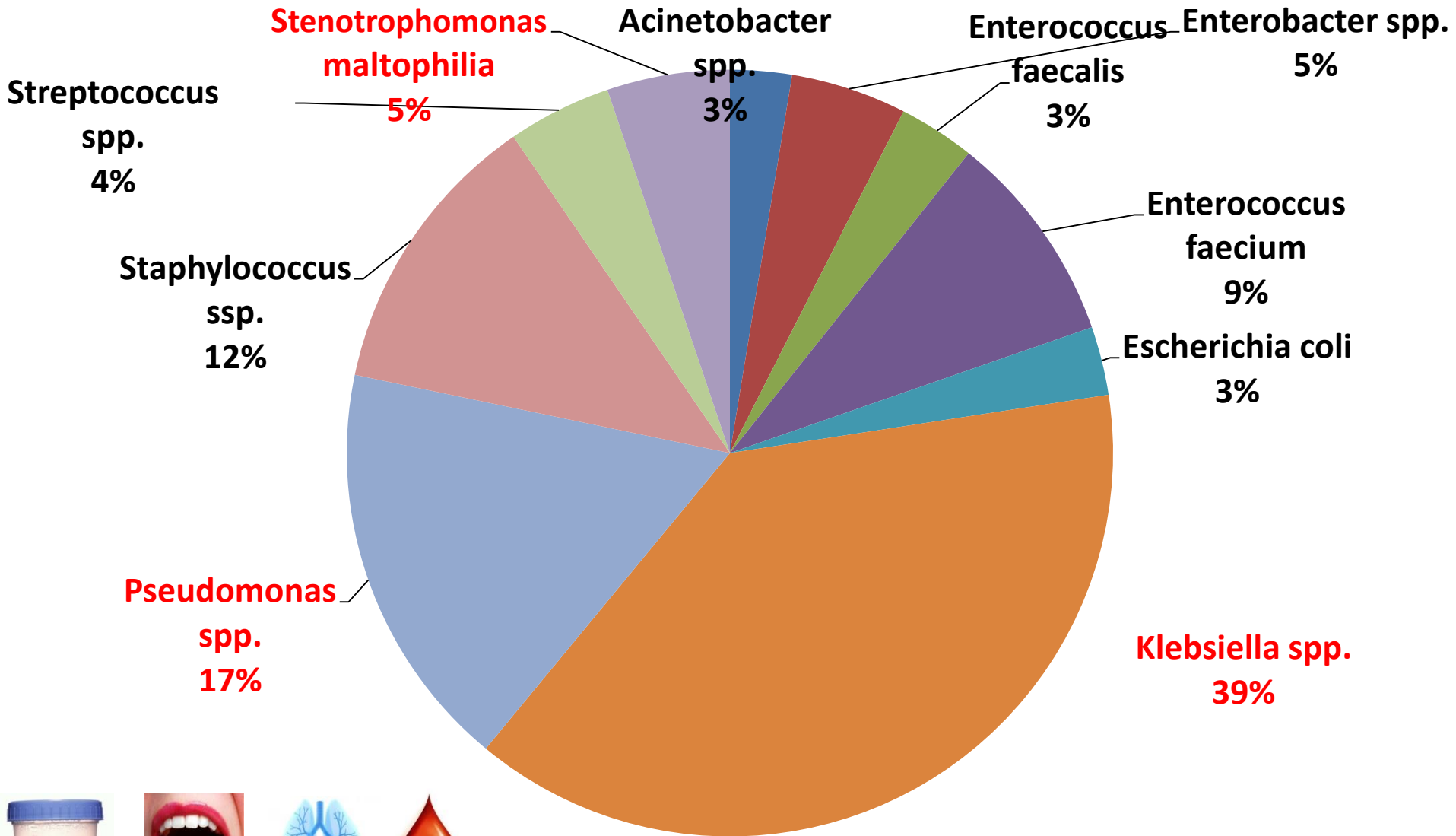
Нормативно-правовая база

- Федеральный закон от 23.06.2016 N 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»
- Одобрение проблемной комиссии кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФПО от 09.12.2016
- Разрешение локального этического комитета от 30.01.2017

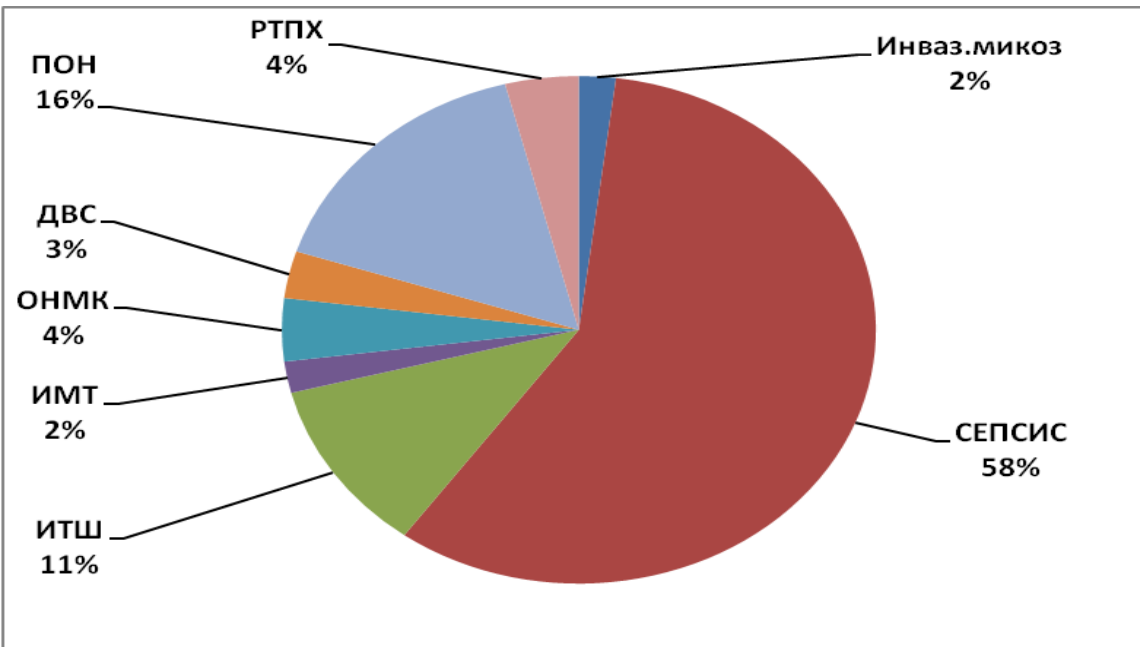
Осложнения при ТГСК в НИИ ДОГиТ



Возбудители инфекционных осложнений



Причины летальности в ОРИТ



- Инфекция после ТГСК - 37% [Kernan N., 1993]
- Сепсис после ТГСК - 55,1% [Kumar G., et al 2015]

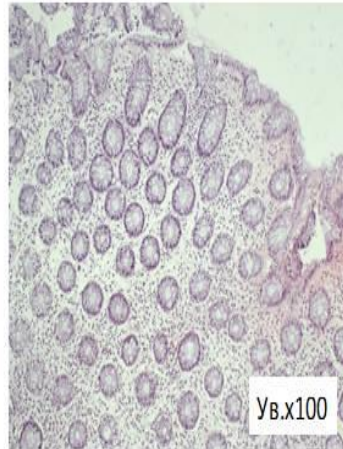
Терапия резистентной *Klebsiella spp.*

- Антибактериальная терапия:
 - **Монотерапия – летальность 57,8%** [Qureshi Z., et al. 2012]
 - Комбинированная – 13,3%
- Наиболее эффективные комбинации:
Тигециклин + Карбапенем; Колистин + Карбапенем

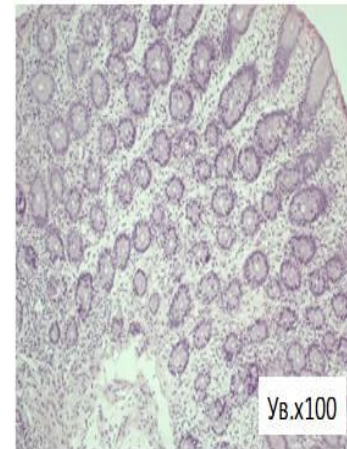
Острая реакция «трансплантат против хозяина» кишечника III и IV степени



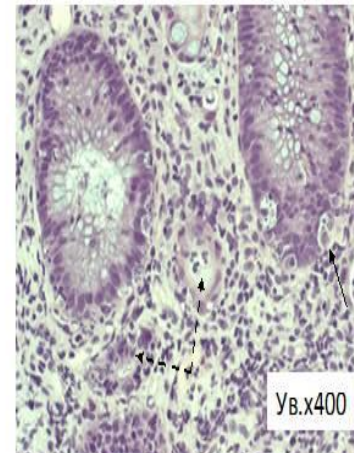
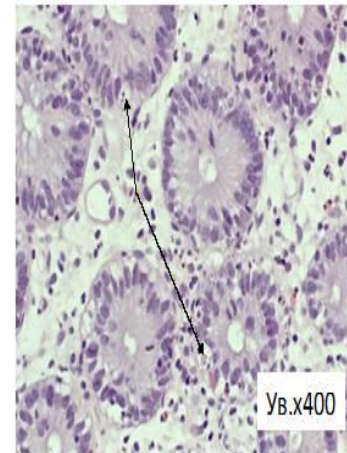
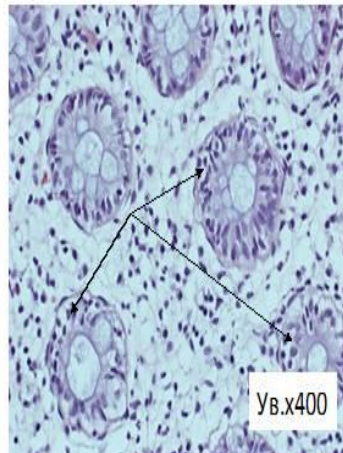
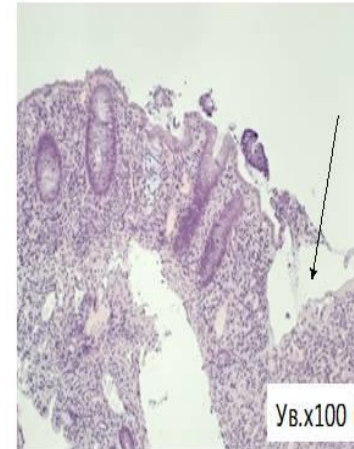
А. Легкая степень



Б. Средняя степень



В. Тяжелая степень



Пациенты и методы

Пациент	Возраст	Длительность диареи, мес	<i>Clostridium difficile</i> токсин В	Псевдо-мембранозный колит	РТПХ ЖКТ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1	10	6	+	+	+	-
2	28	1	+	+	+	+
3	3	3	+	+	+	+

- Донор микробиоты – родственник пациента

Обследование пациента и донора

Показатель	Пациент	Донор
Информированное согласие	+	+
Комплекс стандартных клинических и лабораторных исследований	+	+ *
Колонофлор- 16	+	+
Фекальный кальпротектин	+	-
Клостридиальный токсин А и В	+	-
Копрограмма	+	-
Биоптаты слизистой ЖКТ, ИГХ	+	-
Бактериологическое исследование	+	+
ПЦР на энтеропатогенные вирусы	+	+
Кал: гельминты и простейшие	-	+

* комплекс клинических и лабораторных методик обследования доноров по схеме для доноров крови (согласно приказу Минздрава РФ от 14 сентября 2001 г. №364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов»)

Подготовка пациента

Препарат	Сроки до ТФМ, часы
Инулин 1гр x 4 р/сут	72
Отмена антибиотиков	24
Дексаметазон 2 мг x 2р/сут	1
Ондансетрон 2 мг x 2р/сут	1
Метоклопрамид 10 мг	1
Омепразол 20 мг	2

Раннее
энтеральное
питание после
ТФМ!!!

Инулин
Повышение иммунитета и нормализация пищеварения

- ➔ Снижение усвоения сахара
- ➔ Улучшение микрофлоры кишечника
- ➔ Повышение усвоения минеральных веществ
- ➔ Повышение иммунитета

Инулин
Повышение иммунитета и нормализация пищеварения

100% пребиотик

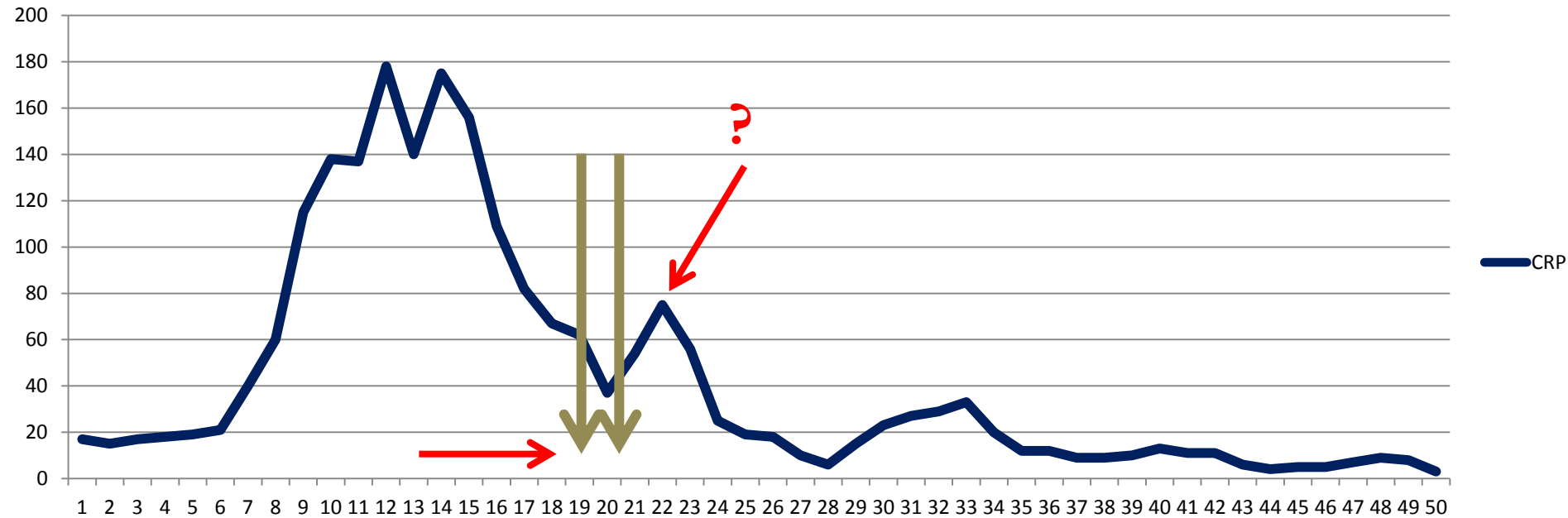
20 таблеток по 5 г

Инулин
Повышение иммунитета и нормализация пищеварения

СИЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ:
 - Инулин снижает сахар, нормализует и стабилизирует. Тем самым увеличивается усвоение сахара в организме, что отражается на обмене сахара в крови.
 - Инулин, как пребиотик, нормализует деятельность кишечника, эффективен при желудочно-кишечных заболеваниях, дисбактериозе, гастрите, при запорах, инфлюэнце, гриппе.
 - Инулин рекомендуется принимать, если у пациента снижена микрофлора, т.е. при лечении антибиотиками или припухлости кишечника.
 - Инулин повышает усвоение минеральных веществ и витаминов, в том числе кальция, железа, цинка, меди, селена. Прием и повышает глазную функцию, способствует усвоению минеральных веществ в костной ткани на 15% и минеральной плотности костей более чем на 25%.
 - Инулин стимулирует гипоталамическую систему и повышает иммунитет, улучшает обмен веществ, укрепляет иммунную систему организма и повышает усвоение минеральных веществ.

- Инулин ($C_6H_{10}O_5)_n$ - органическое вещество из группы полисахаридов, полимер D-фруктозы

CRP



<u>Glucosae 20%-500 ml</u>	} №1/24	
<u>CaCl 10% - 10мл</u>		
<u>MgSO4 25% - 5 мл</u>		
<u>KCl 10% - 50ml</u>		
<u>Адламель 5мл</u>		
<u>Аминовен 10% - 100мл</u>	/24	
<u>Омепразол 20мг</u>	№2	
<u>Тазобак 1,6гр + 100 ml NaCl 0,9%</u>	№4	Пауза
<u>Таваник 125мг + 100 ml NaCl 0,9%</u>	№2	Пауза
<u>Tigacil 20 mg + 100 ml NaCl 0,9%</u>	№2	Пауза
<u>Кансидас 30мг + 100 ml NaCl 0,9%</u>	№1/за 2ч	Пауза

Отмена антибиотиков!

Опасно? Да.

Но необходимо!

Результаты исследования

Пациент	Кратность ТФМ	<i>Clostridium difficile</i> токсин В после ТФМ	Кальпротектин до ТФМ, мкг/г	Кальпротектин после ТФМ, мкг/г	Время ответа, нед
1	2	Отрицательный	290	10	2
2	1	Положительный	44	83	2
3	3	Отрицательный	183	61	4

- С 35 суток отмечалось появление микробиоты донора в других локусах организма (ротоглотка, мочеполовая система)
- Замещение полирезистентной *Klebsiella pneumoniae* на другие маловирулентные штаммы, что позволило купировать инфекционные осложнения

Д-7 перед ТФМ

Посев мочи

Антибиотики/Культуры

Klebsiella pneumoniae

Ampicillin

R

Amoxicillin/Clavulanic Acid

R

Ampicillin/Sulbactam

R

Cefuroxime

R

Cefotaxime

R

Ceftazidime

R

Ceftriaxone

R

Meropenem

R

Amikacin

R

Gentamicin

R

Ciprofloxacin

R

Trimethoprim/Sulfamethoxazole

R

Chloramphenicol

S

ТФМ

Д+5 после ТФМ

Посев мочи

Антибиотики/Культуры

Proteus mirabilis

Ampicillin

S

Amoxicillin/Clavulanic Acid

S

Ampicillin/Sulbactam

S

Cefotaxime

S

Ceftazidime

S

Ceftriaxone

S

Meropenem

S

Amikacin

S

Gentamicin

S

Trimethoprim/Sulfamethoxazole

S

Chloramphenicol

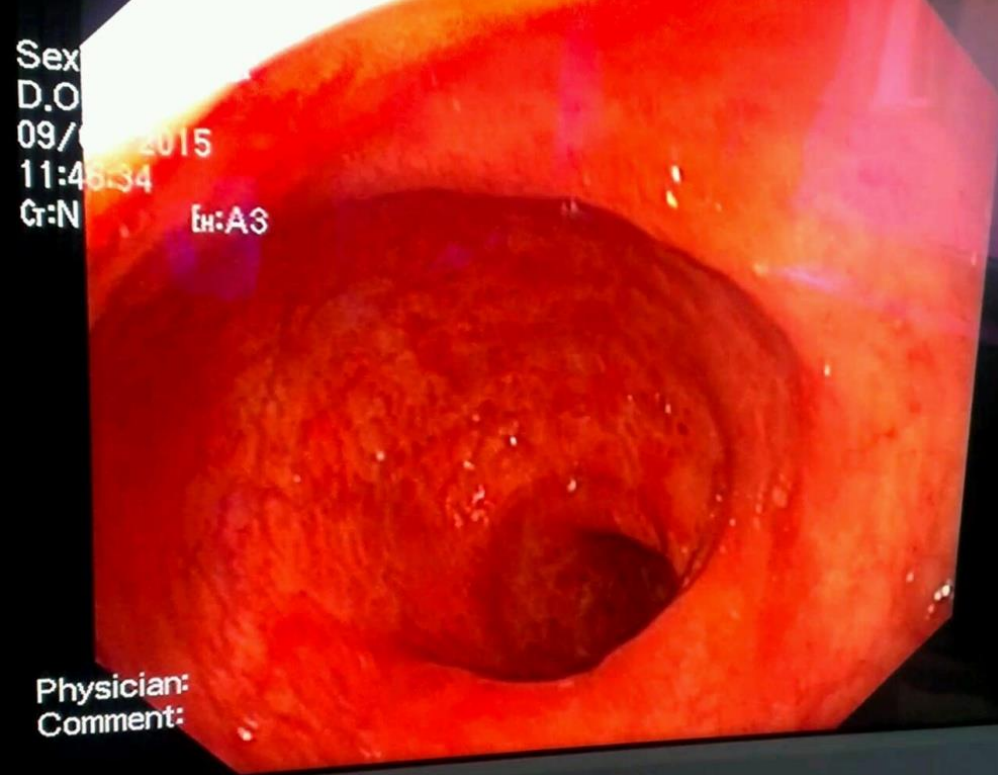
S

Пациентка 10 лет, девочка, масса тела 15,5кг

- **Основной диагноз: Острый лимфобластный лейкоз, B1 –** иммунологический вариант, транслокация t(12;21) TEL/AML.NR. I полная клинико-гематологическая ремиссия. I поздний костно-мозговой рецидив. II полная клинико-гематологическая ремиссия. **Аллогенная родственная ТГСК (донор – брат).** Первичное неприживление. II очень ранний костно-мозговой рецидив. III полная клинико-гематологическая ремиссия. **Гаплоидентичная ТГСК (донор – мать).** Молекулярная ремиссия.
- **Осложнение основного диагноза: Хроническая РТПХ** распространенная форма, с поражением кожи, слизистых, желудочно-кишечного тракта (волнообразное, стероидрезистентное течение). **Хроническая рецидивирующая форма эрозивно-язвенного колита, II ст. Псевдомембранозный колит (токсин В), тяжелой степени.** Синдром мальабсорбции. **Кахексия.**

Поступление в ОРИТ

- Сепсис
- Синдром мальдигестии
- Синдром мальабсорбции – водянистый стул с прожилками крови кратностью 6-17 раз/сут, общим объемом 250-970 мл/сут
- Умеренный абдоминальный болевой синдром
- Лихорадка 1-2 раз/сут до 38,9°C

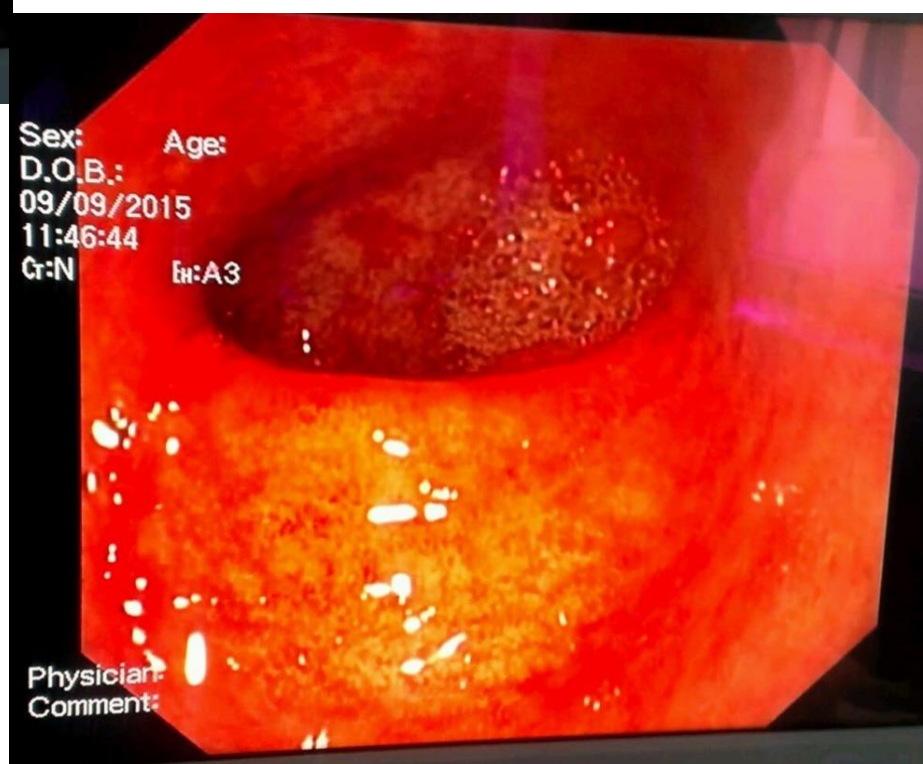


Хр.РТПХ ЖКТ.

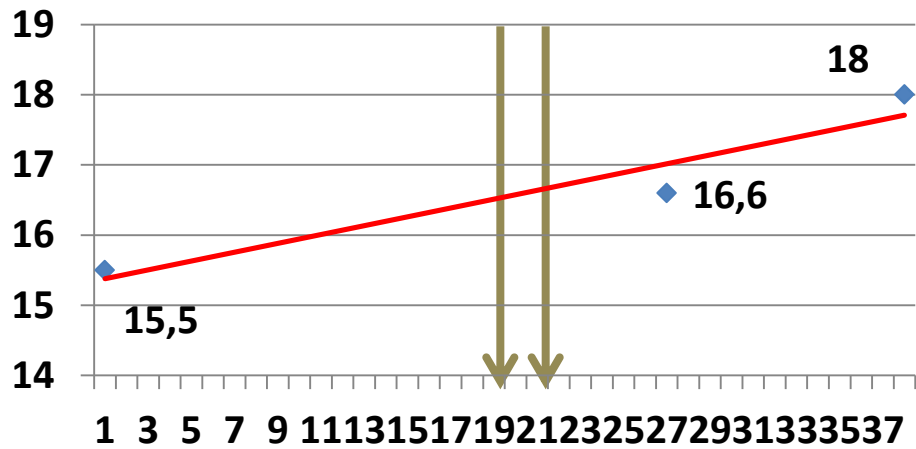
**Хроническая рецидивирующая
форма эрозивно-язвенного
колита II ст.**

**Псевдомембранозный колит
(токсин - В),
тяжелой степени**

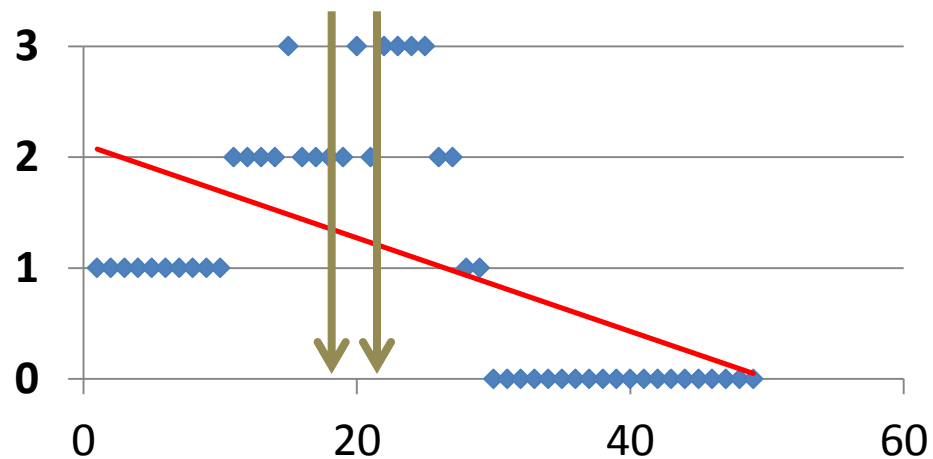
Синдром мальабсорбции



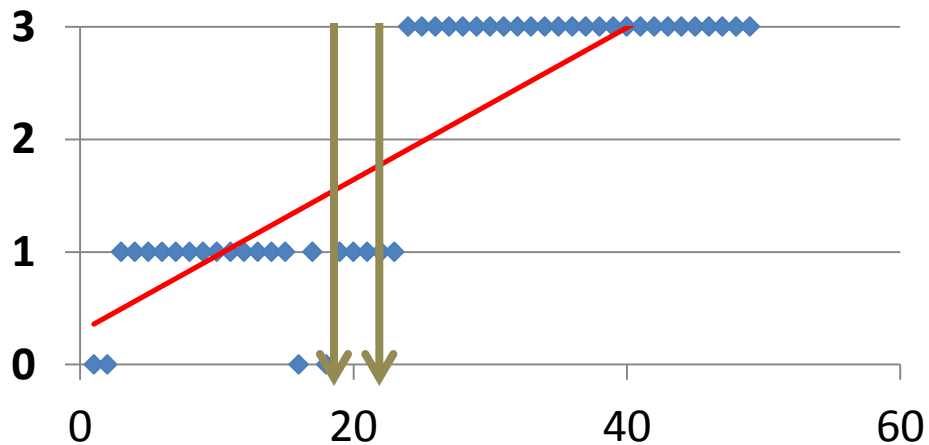
Вес (кг)



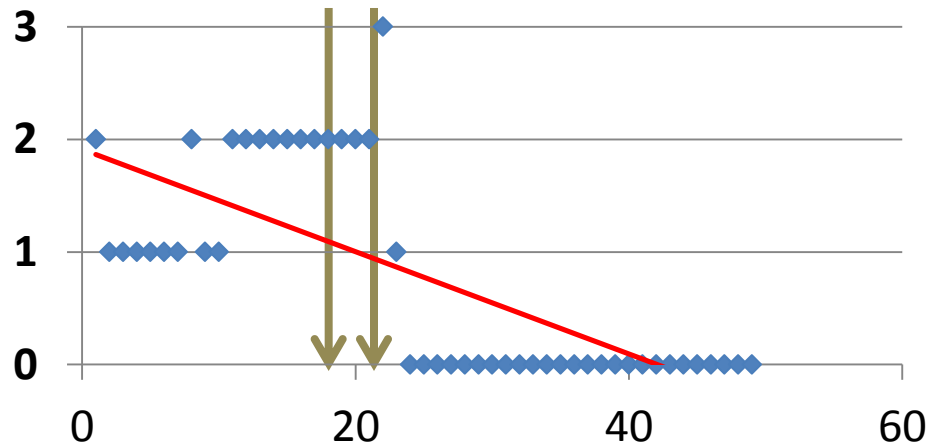
Боль (0-3)



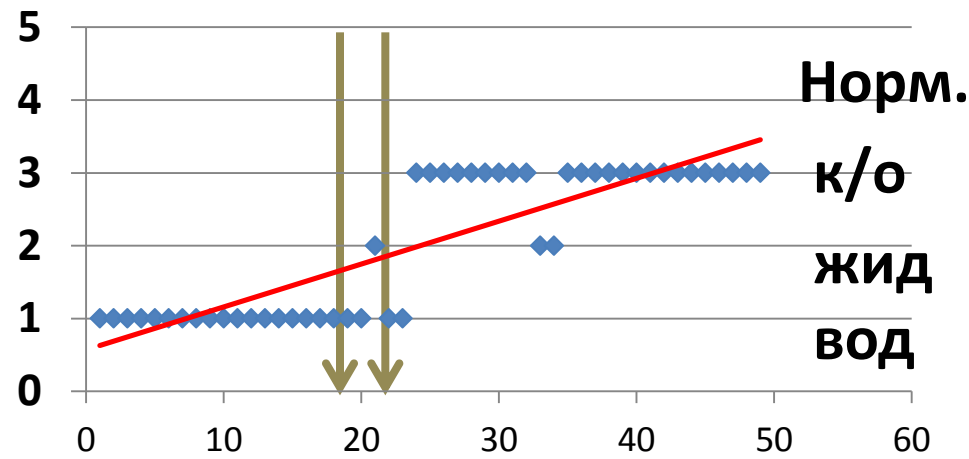
Аппетит (0-3)



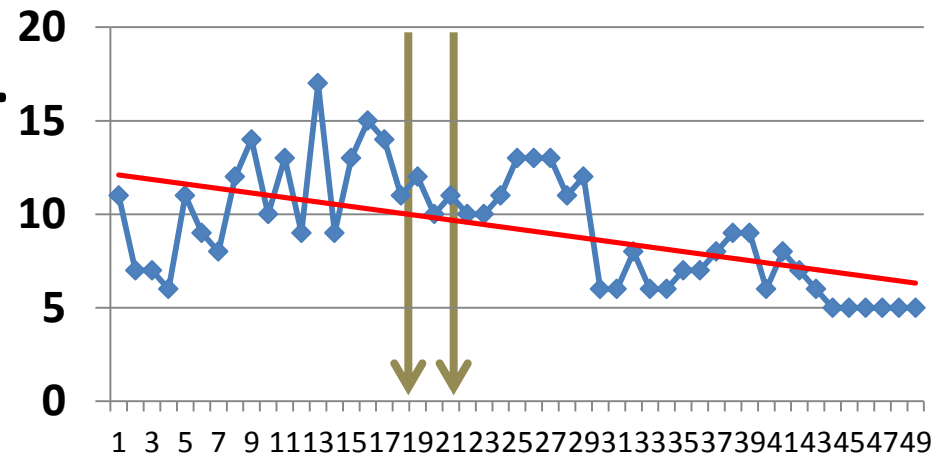
Тошнота (0-3)



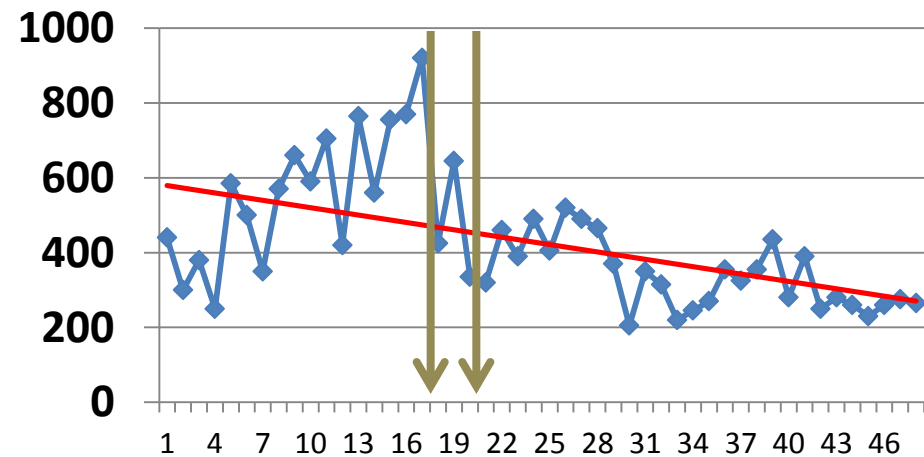
Стул, консистенция



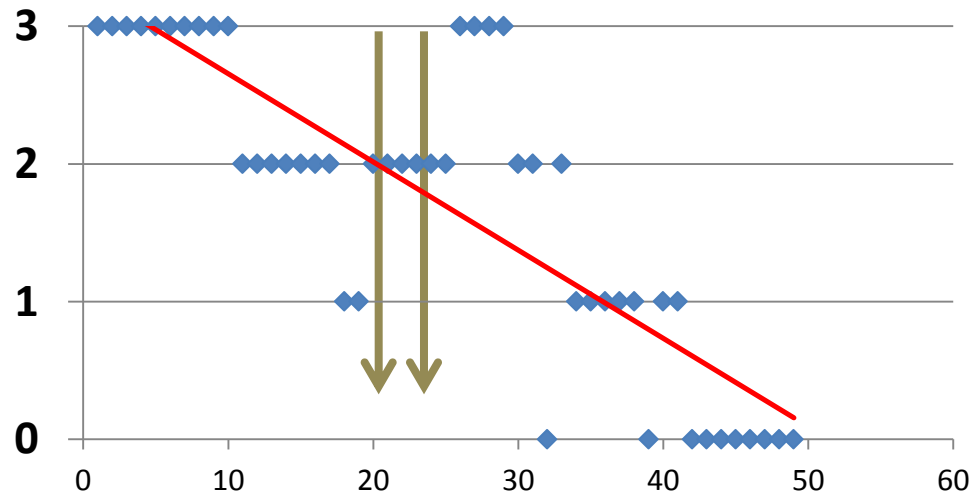
Стул кратность/сут



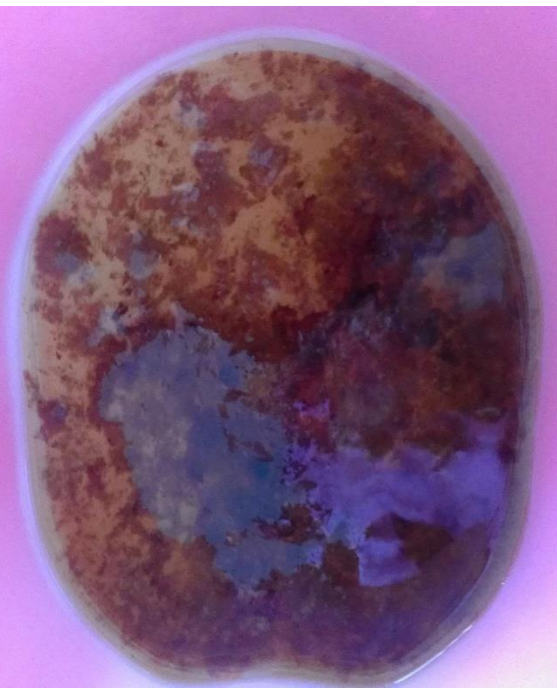
Стул объем (мл/сут)



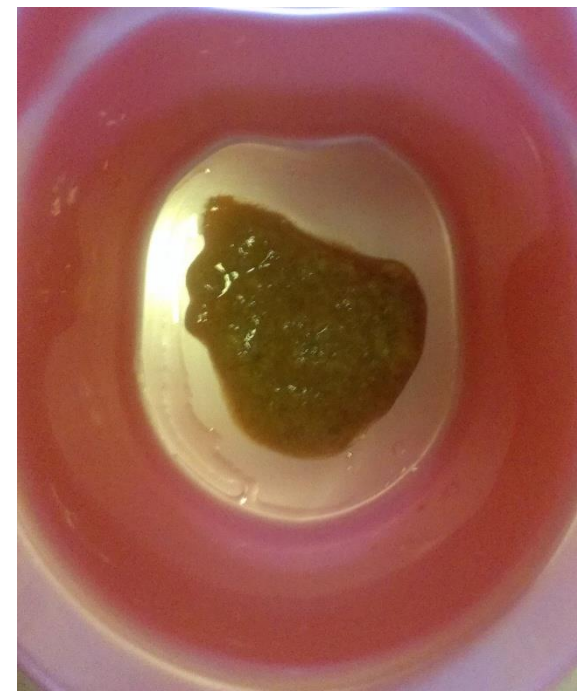
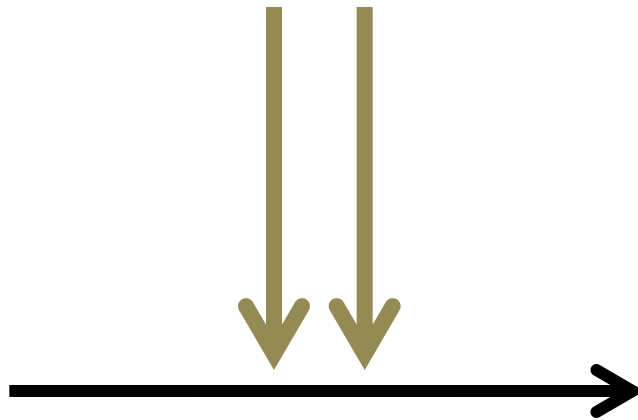
Стул кровь (0-3)



09.09.2015



16.09.2015





Пол	жен	жен	жен	
Лет	10	36	10	
	РЕЦИПИЕНТ до ТФМ	ДОНОР	РЕЦИПИЕНТ после ТФМ (Д+30)	
Показатель	Результат	Результат	Результат	Норма
Общая бактериальная масса		3*10 ¹²	3*10 ¹²	не более 10 ¹²
Lactobacillus spp.	1*10 ⁸	2*10 ⁷	6*10 ⁹	10 ⁷ -10 ⁸
Bifidobacterium spp.	<1*10 ⁷	6*10 ⁸	6*10 ⁹	10 ⁹ -10 ¹⁰
Escherichia coli	не обнаружено	3*10 ⁹	7*10 ¹⁰	10 ⁷ -10 ⁸
Bacteroides fragilis group	не обнаружено	2*10 ¹²	3*10 ¹²	10 ⁹ -10 ¹²
Faecalibacterium prausnitzii	не обнаружено	4*10 ⁸	не обнаружено	10 ⁸ -10 ¹¹
Соотношение Bacteroides fragilis/Faecalibacterium prausnitzii		5000	более 1000	меньше 100
Klebsiella pneumoniae/ Klebsiella oxytoca	не обнаружено/ не обнаружено	не обнаружено/ 3*10⁸	не обнаружено/ 8*10⁸	не более 10 ⁴ / не более 10 ⁴
Candida spp./Staphylococcus aureus	1*10 ²	не обнаружено/ 2*10 ⁷	не обнаружено/ не обнаружено	не более 10 ⁴ / не более 10 ⁴
Escherichia coli enteropathogenic	0	10 ⁹	3*10 ¹⁰	не более 10 ⁴
Enterococcus spp.	<1*10 ⁵	менее 10 ⁵	8*10 ⁶	не более 10 ⁸
Bacteroides thetaiotaomicron		не обнаружено	не обнаружено	10 ⁹ -10 ¹²
Clostridium difficile/Clostridium perfringens	<1*10 ⁵	не обнаружено/ не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено
Proteus vulgaris/ Proteus mirabilis	не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено	не более 10 ⁴ / не более 10 ⁴
Citrobacter spp.	не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено	не более 10 ⁴ / не более 10 ⁴
Enterobacter spp.	не обнаружено	3*10 ⁸	3*10 ⁹	не более 10 ⁴
Fusobacterium spp.	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено
Shigella spp./Salmonella spp.	не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено	не обнаружено/ не обнаружено

Выводы

- Первый опыт эффективных и безопасных ТФМ у пациентов с ТГСК, позволяют рассматривать этот метод, как дополнительную или альтернативную технологию терапии инфекционных и иммунных осложнений после аллогенной ТГСК
- При ТФМ происходит изменение состава кишечной микробиоты, что приводит к эрадикации инфекции *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae*, купированию антибиотик-ассоциированной диареи, замене резистентной к антибиотикам микробиоты в других локусах организма

Будущее ТФМ – управление микробиотой

- Селекция микроорганизмов и создание трансплантата/пробиотического препарата с оптимальным механизмом действия и инфекционной безопасностью
- Персонализированное манипулирование микробиомом



Спасибо за внимание!

Благодарность:

Афанасьев Б.В.
Боровкова А.С.
Голощанов О.В.
Екушов К.А.
Зубаровская Л.С.
Клементьева Р.В.
Кожокарь П.С.
Моисеев И.С.
Мухинова А.С.
Паина О.В.
Семенова Е.В.
Суворова М.А.
Чухловин А.Б.
Швецов А.Н.
Щербаков А.А.



Контакты: Максим Анатольевич Кучер
doctorkucher@yandex.ru +79219939902