

***EXPLORAREA POTENȚIALULUI TRANSPLANTULUI DE MATERII
FECALĂ ÎN PATOLOGII DIGESTIVE ȘI EXTRADIGESTIVE***

REZUMAT

Microbiota intestinală, reprezintă amprenta noastră genetică de la naștere, și este, de asemenea, influențată de o serie de diferiți factori declanșatori, cum ar fi alimentele și mediul. Cartografierea genetică a microbiotei intestinale a stabilit că aceasta conține în medie 100 de miliarde de microorganisme, aproximativ de 10 ori mai mult decât celulele corpului uman. Este important de subliniat că phyla Firmicutes și Bacteroidetes alcătuiește majoritatea microbiotei intestinale sănătoase și urmată de phyla Actinobacteria și Verrucomicrobia, iar disbioza poate modifica numărul de microbi saprofiți și poate provoca diferite boli.

Există o variație notabilă a diversității și cantității de bacterii de la esofag la rect, datorită predispoziției genetice, declanșatorilor alimentației și altor factori de mediu care modifică microbiota și provoacă disbioză. Mai mult, consumul de antibiotice este o altă poartă către disbioză, datorită atâtor factori care schimbă raportul între bacterii sănătoase și nesănătoase. Transferul de materii fecale (F.M.T.) este un instrument medical semnificativ în îmbunătățirea sănătății intestinelor. Microbiota gastrointestinală și produsele lor genetice joacă un rol semnificativ în dezvoltarea sistemului imunitar, apărarea gazdei, metabolismul energetic și nutriția într-un echilibru complicat. Perturbarea compozițională necorespunzătoare a acestui echilibru cunoscut sub numele de disbioză, a fost legată de o serie de stări de boală. Microbiota intestinală este implicată în răspunsul la diferite boli prin influențarea diferitelor axe metabolice și a sistemului imunitar. Studii recente au arătat că microbiota umană este, de asemenea, implicată în răspunsul imun la infecția cu SARS-CoV-2. Cercetătorii sugerează că SARS-CoV-2 duce la modificări ale microbiotei intestinale prin afectarea ACE2, leziuni mitocondriale și axa microbiotă-plămân sau axa microbiotă ficat-intestin. De asemenea, este posibil ca inflamația intestinală cauzată de COVID-19 să predisună indivizii cu alți agenți patogeni gastrointestinali. În plus, multe complicații ale bolilor au o corelație pozitivă cu o suprapopulare de bacterii patogene (*Coprobacillus*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium hathewayi*). O scădere a bacteriilor

antiinflamatoare benefice precum *Faecalibacterium prausnitzii*, phyla Firmicutes, Bacteroidetes (care reprezintă majoritatea microbiotei intestinale sănătoase) sau phyla Actinobacteria și Verrucomicrobia influențează în mod negativ homeostazia intestinală. Studiile recente și rapoartele de caz se concentrează asupra importanței microbiotei intestinale în dezvoltarea oncogenetică și răspunsul la chimioterapie în diferite tipuri de cancer. De asemenea, meta-analiza recentă realizată de Yuanyuan Zhao et. al. subliniază implicațiile microbiotei intestinale în dezvoltarea bolilor hepatice cum ar fi boala ficatului gras, ciroza sau chiar hepatocarcinomul. Această revizuire evidențiază importanța F.M.T. prin evaluarea axei intestin-ficat în recuperarea după aceste patologii.

Pentru a modifica direct compoziția microbiană a primitorului și pentru a oferi un beneficiu clinic, transplantul de microbiotă fecală (F.M.T.) implică administrarea unei soluții de material fecal de la un donator sănătos (se efectuează obligatoriu multiple analize de scaun și serologice pentru a exclude infecții virale) în tractul digestiv al primitorului. Deoarece are beneficiul clinic de a schimba microbiota intestinală a receptorilor săi, F.M.T. este considerată o abordare inovatoare pentru tratarea disbiozei și a complicațiilor acesteia. Conform ghidurilor din 2013, F.M.T. a fost aprobat ca tratament terapeutic pentru tratarea infecției recurente cu *Clostridium difficile* (C.D.I.), iar eficacitatea sa clinică a ajuns la aproximativ 92%. F.M.T. a fost până acum o metodă de terapie de succes pentru C.D.I. recurente. Cu toate acestea, se anticipează că standardele F.M.T. vor fi stabilite în următorii ani și, pe lângă metodele convenționale, reglementările sale se vor extinde pentru a exploata potențialul maxim oferit de transplantul de materii fecale în patologia extradigestivă, inclusiv în restaurarea răspunsului la chimioterapie în caz de patologie neoplazică.

Tema Tezei de Abilitare se înscrie în principalul interes de cercetare al autorului și a fost aleasă pentru a evidenția direcții importante de cercetare legate de beneficiile clinice aduse de transferul de materii fecale, atât sub forma crudă proaspătă, cât și noi concepte ce îmbunătățesc siguranța transferului, cum ar fi microbiota centrifugată (washed microbiota transplantation) sau transferul de spori.

Structura tezei de abilitare a fost concepută astfel încât să acopere elemente, după cum urmează: principalele contribuții științifice ale autorului acesteia de la acordarea titlului de Doctor în medicină, dezvoltarea carierei și propunerile ulterioare de dezvoltare, rezumate în limbile română și engleză, dar și bibliografia.

Capitolul introductiv prezintă foarte succint dezvoltarea profesională a autorului, prezentând activități în legătură cu interesul particular pe care autorul îl are pentru patologia prezentată în această teză, precum și aspecte particulare ale transferului de materii fecale, metode de transfer și beneficiile clinice surprinse în multiple studii realizate de autor.

Principalele contribuții științifice ale autorului sunt prezentate în capitolul 2 și sunt structurate după cum urmează: primele subcapitole se axează pe cercetarea principală privind rata de succes a transferului de materii fecale și prevenirea recurenței, beneficiile clinice observate în cadrul transferului de materii fecale la pacienții cu SARS COV 2 și coinfectie cu *C. Difficile* și analizarea aspectelor legate de implicații ale transferului de materii fecale asupra sistemului imunitar.

Subcapitolul următor se concentrează asupra unor aspecte particulare ale transferului de materii fecale la pacienții oncologici și la cei cu infecții cu TBC respirator și intestinal, precum și asupra restaurării răspunsului la tratament la bolnavii cu rezistență la chimioterapicele uzuale în context de infecție TBC (multidrog rezistentă).

Următorul capitol prezintă contribuția autorului la realizarea unor studii științifice în cadrul unor colective de cercetare, studii publicate de asemenea în Web of Science Core Collection, dar a căror temă nu face parte din direcția principală de interes a autorului.

Capitolul final al acestei teze prezintă biografia didactică și științifică a autorului și câteva aspecte ale viitoarelor direcții de dezvoltare a carierei universitare.

Capitolul care se ocupă de principalele contribuții științifice ale autorului începe cu o serie de studii ce evidențiază importanța transferului de materii fecale în caz de recurență a episoadelor de *Clostridoides Difficile*. Autorul a efectuat un studiu retrospectiv alături de echipa de cercetare în studiul intitulat "*Transplantul de microbiotă la pacienții severi și non-severi în infecția cu Clostridoides Difficile. Rolul F.M.T. în infecția primară cu Clostridoides difficile*", cu scopul de a analiza caracteristicile clinice și rezultatele a 96 de pacienți cu F.M.T. cu un parcurs anterior de 10 zile de tratament cu antibiotice în fișele medicale, dintre care 71 de pacienți cu C.D.I. recurentă și 25 de pacienți cu C.D.I. primar. Rezultatele studiului au evidențiat o rată generală de vindecare primară de 88,5%, iar rata de vindecare primară pentru formele severe a fost de 85,7%. Analiza datelor a evidențiat rate de recurență a F.M.T. de 5,25%, 15,15% și 27,3% pentru C.D.I. severă primară, secundară și terțiară. Riscul de recurență a fost asociat semnificativ cu F.M.T. după al

doilea și al treilea episod sever de C.D.I. ($p < 0,05$), dar nu și cu F.M.T. după primul episod sever de C.D.I.

Lucrarea "*Fecal Microbiota Transplantation in Patients Co-Infected with SARS-CoV2 and Clostridioides difficile*", prezintă date evaluate în perioada pandemiei de COVID 19. Pandemia COVID-19 a reprezentat o provocare în tratarea pacienților infectați cu Clostridioides Difficile (C.D.I.), având în vedere numărul tot mai mare de co-infecții cu coronavirus 2 (SARS-CoV-2), cu sindrom respirator acut sever. În acest context, transplantul de microbiotă fecală (FMT) a reprezentat o alternativă promițătoare în modularea funcției sistemului imunitar și atenuarea sarcinilor asociate cu această afecțiune. Pentru a atinge acest obiectiv, s-a efectuat un studiu comparativ, retrospectiv, unicentric pe 86 de pacienți (internați în perioada ianuarie 2020 – martie 2022). Studiul nostru și-a bazat abordarea pe criteriile specifice de includere:

1. Grupul de studiu a inclus 46 de pacienți co-infecțați (COVID-19 și C.D.I.) care au primit antibiotice și FMT;

2. Grupul de control, 40 de pacienți co-infecțați, au primit numai antibiotice. Rezultatele noastre nu au arătat diferențe semnificative de grup în ceea ce privește sexul, vârsta, factorii de risc, cum ar fi bolile cardiovasculare și neurologice, diabetul zaharat de tip 2 și obezitatea ($p > 0,05$) sau în starea inflamatorie pre-tratament, evaluată prin leucocite (WBC) și nivelurile de proteină C reactivă (CRP). Raportăm o scădere semnificativă a sindromului inflamator (CRP, WBC) la pacienții coinfecțați care primesc F.M.T. în plus față de antibiotice ($p < 0,05$), cu o rată mai scăzută a recăderilor și atenuarea crampelor și a durerii abdominale (91,3%). În plus, un nivel mai ridicat de fibrinogen, dureri abdominale moderate persistente (82,5%) și o rată semnificativ mai mare de recidivă a infecției C.D.I. (42,5%) au fost înregistrate la pacienții co-infecțați tratați numai cu antibiotice ($p < 0,05$).

Studiul nostru oferă date noi pentru a susține beneficiile multiple ale F.M.T. în cazul co-infecției cu COVID-19 și C.D.I. prin îmbunătățirea calității vieții pacienților, dar și a sindromului inflamator. Măsurile de siguranță pentru personalul de endoscopie în timpul pandemiei de COVID-19 au fost implementate în conformitate cu ghidurile actuale stabilite de Organizația Mondială a Sănătății și Organizațiile Internaționale de Gastroenterologie. Aceste măsuri de precauție au inclus practicarea unei distanțe fizice stricte și reducerea la minimum a numărului de personal din sala de proceduri. În plus, tot personalul care a efectuat colonoscopii pacienților cu COVID-19 și C.D.I., a purtat echipament de protecție complet, inclusiv respirator (FFP2, FFP3, N95, N99, N100

sau echivalent), halat, ochelari de protecție, protecție facială, mănuși și șorț, aplicând totodată măsurile standard de precauție în acordarea îngrijirii pacienților.

Au existat trei rezultate primare pentru studiul nostru. Primul s-a bazat pe reducerea markerilor inflamatori. Al doilea a fost legat de rezolvarea durerii abdominale după tratament. În cele din urmă, cel de-al treilea rezultat a vizat recurența bolii, definită în conformitate cu deficiția Societății Europene de Microbiologie Clinică și Boli Infecțioase. Actualizarea din 2021 privind documentul de ghidare de tratament pentru infecția cu *Clostridioides Difficile* la adulți, descrie durerea ca apărând în decurs de 8 săptămâni după un episod anterior, la finalizarea tratamentului inițial. În consecință, am stabilit o perioadă de urmărire de 8 săptămâni în studiul nostru, după primul episod de C.D.I. al pacienților și tratamentul ulterior. Rezultatul secundar a fost legat de efectele adverse atribuite procedurii F.M.T.

În lucrarea următoare, inclusă în această teză și denumită " *Fecal Microbiota Transplantation in Inflammatory Bowel Disease* " se prezintă printr-un rezumat de literatură perspectivele terapeutice ale transferului de materii de fecale în cadrul bolilor inflamatorii intestinale, realizat atât la pacienții refractari la tratament cât și pe model animal. Bolile inflamatorii intestinale reprezintă o serie complexă de boli cu etiologie incomplet cunoscută care au dus la inflamația cronică a tractului gastrointestinal. În boala inflamatorie intestinală, o metodă promițătoare de tratament este reprezentată de transplantul de microbiotă fecală (F.M.T.). F.M.T și-a demonstrat eficacitatea și siguranța, în ultimii ani, pentru C.D.I. recurente. În plus, a arătat beneficii clinice reale în tratarea co-infecției cu SARS-CoV-2 și C.D.I. Boala Crohn și colita ulceroasă sunt caracterizate prin dereglarea imunității, care duce la leziuni ale tractului digestiv cauzate de răspunsurile imune. Majoritatea strategiilor terapeutice actuale sunt asociate cu costuri ridicate și multe efecte adverse prin direcționarea răspunsului imun, astfel încât modificarea mediului microbial prin F.M.T. oferă o abordare alternativă care ar putea influența indirect sistemul imunitar al gazdei într-un mod sigur. Studiile subliniază îmbunătățirile endoscopice și clinice ale Colitei Ulcerative și C.D.I. la pacienții cu F.M.T., prin comparație cu grupurile de control. Această analiză subliniază multiplele beneficii ale F.M.T. în cazul bolii inflamatorii intestinale (I.B.D.) prin îmbunătățirea intestinului dezechilibrat la pacienți. Ne propunem să subliniem importanța clinică și beneficiile F.M.T. pentru a preveni crizele sau complicațiile I.B.D. și să subliniem faptul că este nevoie de validare suplimentară pentru stabilirea unui protocol clinic pentru F.M.T. în I.B.D.

Următorul studiu publicat în 2023, “Therapeutic Perspectives for Microbiota Transplantation in Digestive Diseases and Neoplasia - A Literature Review”, indexat într-o bază internațională WOS Core Collection, descrie o analiza ce urmărește perspectivele terapeutice ale transferului de materii fecale la pacienții cu patologie digestivă și extra digestivă, inclusiv patologie oncologică. Într-o legătură reciproc avantajoasă cu gazda sa, microbiota intestinală afectează nutriția, imunitatea și metabolismul gazdei. Un număr tot mai mare de studii au arătat legături între anumite tipuri de boli și disbioza intestinală sau microorganisme specifice. Transplantul de microbiotă fecală (F.M.T.) este recomandat pentru tratamentul infecției cu *Clostridium difficile* (C.D.I.) recurentă sau rezistentă, datorită eficacității sale clinice remarcabile împotriva C.D.I. Potențialul terapeutic al F.M.T. pentru alte tulburări, în special bolile inflamatorii intestinale și bolile maligne, primește în prezent din ce în ce mai multă atenție. Am rezumat cele mai recente dovezi preclinice și clinice pentru a arăta perspectivele F.M.T. în gestionarea cancerului, precum și a complicațiilor legate de tratamentul cancerului, după ce am analizat cele mai recente cercetări privind microbiota intestinală și relația acesteia cu cancerul. De asemenea, având în vedere anii pandemiei, ne-am concentrat pe eficacitatea dovedită a F.M.T. la pacienții cu COVID-19. Au fost efectuate mai multe studii pentru a investiga o posibilă legătură între microbiota intestinală și răspunsul clinic la imunoterapia cancerului, în special inhibitorii punctelor de control imun (I.C.P.I.). Analiza descrie rezultatele obținute de multiple studii ce au inclus pacienți cu melanom metastatic rezistent la tratament. Doi pacienți cu melanom avansat, care au avut un răspuns complet de lungă durată la tratament, au servit drept donatori F.M.T. Procedura a fost efectuată atât prin administrare orală, cât și prin colonoscopie, apoi a fost utilizat retratamentul anti-PD-1. Fiecare pacient a obținut imagini complete ale corpului, biopsii ale intestinului și țesutului tumoral și probe de scaun înainte și după tratament. Creșterea infiltrației post-F.M.T. a celulelor prezentatoare de antigen CD68+ în intestin și tumoră a fost observată prin etichetarea imunohistochimică a probelor. În urma tratamentului, a existat și o creștere a infiltrației celulelor T CD8+. După F.M.T., trei pacienți au prezentat un răspuns total sau parțial la tratament. Lucrarea descrie beneficiile clinice ale *Bifidobacterium comensal* în îmbunătățirea imunității anti-tumorale și prezintă, de asemenea, un rol în facilitarea eficacității anti-PD-L1. Ei au investigat formarea melanomului la șoareci cu microbiotă comensală diferită și au descoperit diferențe în imunitatea spontană anti-tumorală, diferențe ce au fost reduse după cohousing sau transferul fecal. Acest lucru ar putea explica modul în care pacienții rezistenți la imunoterapie au recuperat răspunsul după

instilarea F.M.T. Concluzia acestui studiu întărește importanța microbilor comensali în imunitatea antitumorală și rolul F.M.T. în cancer, în special la pacienții care sunt supuși imunoterapiei.

Cel mai recent studiu cu privire la sfera de interes a autorului include lucrarea: "*Exploring the Potential of Fecal Microbiota Transplantation as a Therapy in Tuberculosis and Inflammatory Bowel Disease*". Acest rezumat sistematic publicat în 2023 în WOS Core Collection, atinge o sferă de interes internațional cu privire la implicații ale transferului de microbiotă în restituiră răspunsului la chimioterapie în caz de TBC rezistent la multiple linii terapeutice sau în caz de TBC intestinal. Această revizuire explorează potențialele beneficii ale transplantului de microbiotă fecală (F.M.T.) ca tratament adjuvant în tuberculoză (TB), făcând paralele cu eficacitatea acestuia în boala inflamatorie intestinală (I.B.D.). F.M.T. s-a arătat promițător în restabilirea echilibrului microbiotei intestinale și modularea răspunsurilor imune la pacienții cu I.B.D. Având în vedere asemănările în imunomodulare și disbioză dintre I.B.D. și TB, această analiză emite ipoteza că F.M.T. poate oferi beneficii terapeutice ca terapie adjuvantă în TB. Astfel, am efectuat o analiză sistematică a literaturii existente despre F.M.T. în I.B.D. și TB, evidențiind mecanismele și potențialele implicații ale F.M.T. în managementul terapeutic al ambelor afecțiuni. Descoperirile contribuie la înțelegerea rolului potențial al F.M.T. în tratamentul TB și subliniază necesitatea cercetărilor viitoare în această direcție pentru a valorifica pe deplin aplicațiile clinice.

Integrarea F.M.T. în managementul cuprinzător al TB ar putea îmbunătăți rezultatele tratamentului, ar putea reduce rezistența la medicamente și atenua efectele secundare ale terapiilor convenționale. Eforturile viitoare de cercetare ar trebui să se concentreze pe studii clinice bine concepute pentru a dezvolta protocoale privind siguranța și beneficiile pe termen scurt și lung ale F.M.T. la pacienții cu TB, precum și pentru a evalua riscurile potențiale. Cercetări recente au arătat că variațiile genetice ale genelor asociate cu axa interleukinei (IL)-23/IL-17 pot avea un impact asupra integrității mucoasei digestive prin influența lor asupra diferențierii celulelor Th17, cu implicații în ambele boli. IL-17 și IL-22 joacă un rol crucial în modularea funcției celulelor Th17, iar IL-22 are un rol important în menținerea imunității mucoasei și a diversității în flora bacteriană, contribuind la bariera biologică. În plus, IL-17 este implicată în răspunsuri imune multiple, inclusiv recrutarea neutrofilelor și promovarea răspunsurilor inflamatorii optime de către celulele Th1. Studiile pe modele animale subliniază că IL-17 și IL-22 sunt, de asemenea, importante în ceea ce privește localizarea celulelor T în foliculii limfoizi din plămâni, facilitând activarea eficientă a macrofagelor și oferind beneficii în stimularea răspunsului imun împotriva MTB. O

altă asemănare importantă între C.D.I. și infecția TB este prezența granuloamelor, care pot afecta atât mucoasa intestinală, cât și țesutul peri-intestinal, beneficiile clinice ale IL-17 jucând un rol crucial în limitarea formării granuloamelor necrotice și, prin urmare, reducerea severității tuberculozei. Lucrarea descrie faptul că îmbunătățirea funcțiilor celulelor T asociate mucoasei (MAIT) ar putea reprezenta un mecanism potențial care influențează microbiota intestinală și aduce contribuția sa protectoare la asigurarea unei siguranțe extinse împotriva colonizării MTB, inclusiv a tuberculozei respiratorii și a diseminării extrapulmonare. Tot în acest articol se descriu asemănările dintre C.D.I. și infecția TB, cu evidențierea impactului polimorfismelor genelor în cadrul axei IL-23/IL-17 cu răspuns asupra susceptibilității la I.B.D. și a dezvoltării TB. În același sens, studiile de asociere la nivel de genom efectuate pe populații japoneze și coreene au relevat asocieri între diverse gene care semnalează această cale și care pot predispuce indivizii la dezvoltarea I.B.D. sau, în cazul infecției cu TBC, la dezvoltarea TB. Integrarea F.M.T. în managementul cuprinzător al infecției TB ar putea îmbunătăți rezultatele tratamentului, reduce rezistența la medicamente și ar putea atenua efectele secundare ale terapiilor convenționale. Eforturile viitoare de cercetare ar trebui să se concentreze pe studii clinice bine concepute pentru a evalua siguranța, eficacitatea și beneficiile pe termen mediu și lung ale F.M.T. la pacienții cu TBC. În cele din urmă, descoperirile din astfel de studii ar putea deschide calea pentru dezvoltarea de noi strategii de tratament care valorifică potențialul terapeutic al microbiotei intestinale în combaterea infecției TB, îmbunătățirea rezultatelor pacienților, optimizarea managementului medicamentelor și prevenirea rezistenței la mai multe medicamente.

Un alt punct de interes în transplantul de materii fecale cu implicații în Gastroenterologie se referă la impactul microbiotei asupra axei intestin ficat și implicațiile transplantului de materii fecale la pacienții cu ciroză hepatică. Analiza "Fecal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease", reprezintă un articol de mare importanță ținând cont de faptul că mortalitatea datorată bolilor hepatice cronice a crescut exponențial până la nivel global.

Datorită venei porte care leagă ficatul direct de intestine, bacteriile și metaboliții acestora pot afecta ficatul indiferent de starea acestuia. Mai mult, prin eliberarea acizilor biliari în sistemul biliar, ficatul comunică cu intestinul bidirecțional.

O serie de abordări noi pentru modularea microbiotei au fost propuse în ultimii ani, având multe rezultate promițătoare în ceea ce privește eficacitatea și aplicarea clinică, inclusiv diete personalizate, antibiotice, probiotice și prebiotice, intervenții asupra stomacului, terapia cu fagi și

transplantul de microbiotă fecală (F.M.T.). În acest studiu, F.M.T. este investigat ca un potențial tratament viitor pentru una dintre cele mai cunoscute boli hepatice cronice, mai exact ciroza hepatică (L.C.), împreună cu complicații pe care această patologie le generează, cum ar fi encefalopatia hepatică (H.E.) etc. Tratamentul pentru ciroza hepatică poate varia în funcție de cauza de bază și de severitatea bolii. În prezent, ciroza hepatică este considerată etapa finală în progresia bolii hepatice, iar tratamentele moderne nu sunt curative și nu au îmbunătățit semnificativ funcția hepatică și rata de supraviețuire. Modificările în stilul de viață pot încetini progresia bolii și pot îmbunătăți calitatea vieții, dar în unele cazuri pot să nu afecteze direct ratele de supraviețuire și să nu fie suficiente pentru bolnavii cu forme avansate de ciroză. Mai mult, eficacitatea medicamentelor în tratarea cirozei hepatice variază în funcție de cauza și stadiul bolii. Trebuie subliniat faptul că prognosticul bolii nu trebuie niciodată subestimat, deoarece este un factor primordial care necesită o atenție constantă. Cercetările au demonstrat că tehnicile de nanoindentare sunt capabile să evalueze și să urmărească deformările nucleare în celulele hepatice, permițând diferențierea dintre probele provenind de la o populație sănătoasă și cele afectate de tulburări de ciroză hepatică. Medicamentele antivirale pentru hepatita virală pot încetini progresia bolii, dar rezultate nu sunt spectaculoase. Transplantul hepatic rămâne cel mai eficient tratament pentru ciroza avansată, cu rate ridicate de supraviețuire. Deși este un tratament salvator, acesta rămâne dificil de accesat pentru pacienți și se efectuează doar în cazuri excepționale, cu liste de așteptare extrem de lungi. În cazurile în care pacienții primesc acest tratament, șansele de supraviețuire cresc semnificativ, un studiu arătând chiar că, bolnavii care au suferit un transplant de ficat în stadiul terminal de boală hepatică, au avut un avantaj de supraviețuire de până la 13-17 ani în comparație cu cei care nu a avut acces la un transplant.

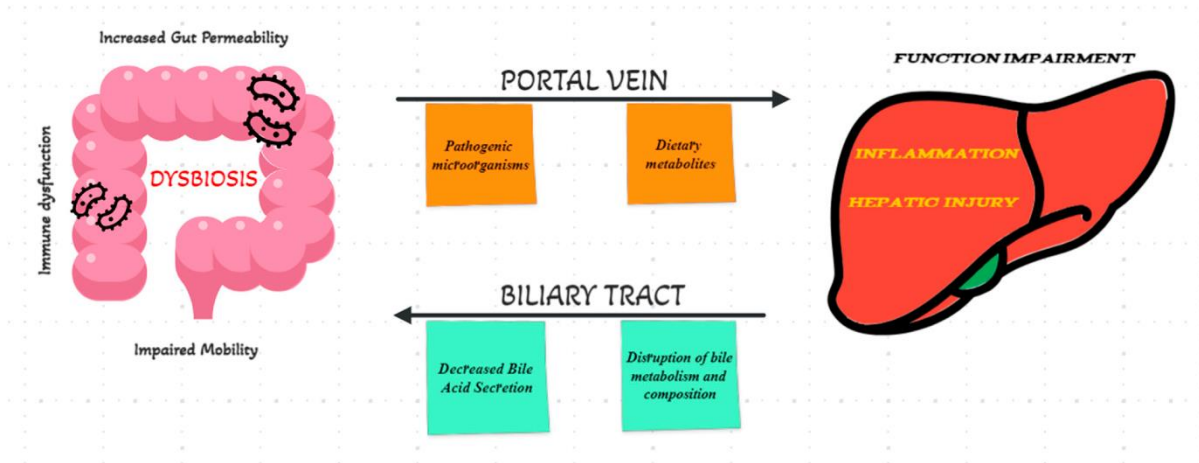


Figura 1. Reprezentare schematică a axei intestin - ficat.

Primele două studii realizate de autor aduc multiple dovezi care susțin importanța transferului de materii fecale la pacienți cu comorbidități semnificative și care previn atât exacerbarea bolii, cât și îmbunătățirea sistemului imunitar, deschizând noi perspective clinice ale transplantului de materii fecale. Grupul de studiu a inclus pacienți care au primit F.M.T. și antibiotice la primul episod, în timp ce grupul de control a fost format din pacienți tratați numai cu antibiotice. Am selectat următoarele criterii de includere:

- pacienți peste 18 ani;
- pacienți cu COVID-19 (diagnosticați prin detectarea acidului nucleic SARS-CoV-2 prin reacția în lanț a polimerazei cu transcriptază inversă în timp real din tampoane nazofaringiene și orofaringiene);
- dovezi microbiologice ale C.D.I. (toxine pozitive A/B);
- pacienți care au urmat protocolul standard de tratament în cazuri de coinfecție: o cură de 10 zile de antibiotice cu vancomicină 250 mg × 4/zi. După 10 zile, dacă s-a impus, metronidazol 500 mg × 3/zi i.v. a fost adăugat împreună cu vancomicina pentru a controla simptomele. Această abordare a fost implementată cu rezultate bune de către Rokas et. al., care a arătat o mortalitate îmbunătățită la pacienții critici cu C.D.I. atunci când metronidazolul a fost adăugat la vancomicină orală. Grupul de control a primit doar terapie cu antibiotice, în timp ce în grupul de studiu, o perfuzie F.M.T. a fost folosită după primele 10 zile.

Acești pacienți au încetat tratamentul cu antibiotice cu 24 de ore înainte de procedura de instilare.

Rudele de gradul I sau II au fost selectate ca potențiali donatori conform ghidurilor actuale. Probele de materii fecale au fost testate copropazitologic și virologic (Ag HBS, ACVHC, HIV, CMV și CD), precum și pentru COVID-19. Donatorii au fost testați pentru SARS-CoV-2 (prin testul RT-PCR) și toți subiecții care au fost testați pozitiv au fost excluși. În plus, au fost excluși și pacienții cu boli autoimune sau alte boli cronice documentate și pacienții care au suferit o intervenție chirurgicală majoră sau au primit produse din sânge cu 12 luni înainte de colectarea materiilor fecale. Au fost excluși și donatorii cu vârsta peste 50 de ani. Am analizat amănunțit eligibilitatea fiecărui donator pe baza dosarelor medicale ale acestuia și a unui interviu personal. Cu o zi înainte de F.M.T., pacienții au fost pregătiți prin lavaj intestinal cu 4 L de PEG (Poly Ethylen Glicol).

Tehnica de transfer al materiilor fecale a implicat dizolvarea a 50 g de fecale donate (la mai puțin de 6 ore după defecare) în 500 ml de soluție salină 0,9%, amestecarea pentru a obține o soluție omogenă și filtrarea. Imediat după, s-a efectuat o colonoscopie totală cu ileoscopie terminală, fără sedare, pentru a păstra controlul sfincterului anal. Suspensia, în stare proaspătă, a fost introdusă din ileonul terminal, cu 2/3 din suspensie în colonul drept și restul în celelalte segmente ale colonului la retragere. Aspectul endoscopic al colonului înainte de transplantul de microbiotă fecală a fost un aspect endoscopic tipic al colitei pseudomembranoase, în ciuda tratamentului cu antibiotice. Mucoasa colonică a prezentat luciu șters, vascularizație ștersă, mucoasă granulară și depozite pseudomembranoase galben-verzui. Clasificarea leziunilor pseudomembranoase se poate face în funcție de gradul și profunzimea modificărilor inflamatorii, cu gradarea leziunilor de la tipul 1 („leziuni de vârf”, inflamație epitelială de suprafață focală sau necroză) până la tipul 3 (necroza mucoasei și resturi inflamatorii semnificative). În total au fost 235 de pacienți cu SARS-CoV-2 și co-infecție C.D.I. documentați în perioada de doi ani a căutării noastre retrospective. 149 de cazuri au fost excluse din cauza următoarelor: lipsa consimțământului informat pentru a participa la studii de cercetare; date lipsă (în special cu privire la rata de recurență); deces în timpul spitalizării sau transferului la ATI; comorbidități semnificative sau caracteristici demografice care ar fi creat neomogenități între grupuri sau care ar fi avut o influență intrinsecă asupra variabilelor de rezultat determinate.

Am înregistrat o diferență notabilă la pacienții proveniți din mediul rural (60,5%) față de pacienții din mediul urban (39,5%), cu același model de distribuție în ambele grupuri ($p < 0,05$). În aceeași notă, ambele grupuri au fost omogene, cu același procent de pacienți (60,4%), hipertensiune arterială ca factor de severitate și diabet zaharat tip 2 asociat. Apoi, în ambele grupuri, a existat o distribuție apropiată a riscului neurologic și metabolic. Aproximativ 7% dintre cazuri au prezentat un accident vascular cerebral în istoricul lor medical, iar obezitatea ca factor de risc a fost observată într-un procent puțin mai mare pentru grupul de studiu (17,4% vs. 15%) ($p < 0,05$).

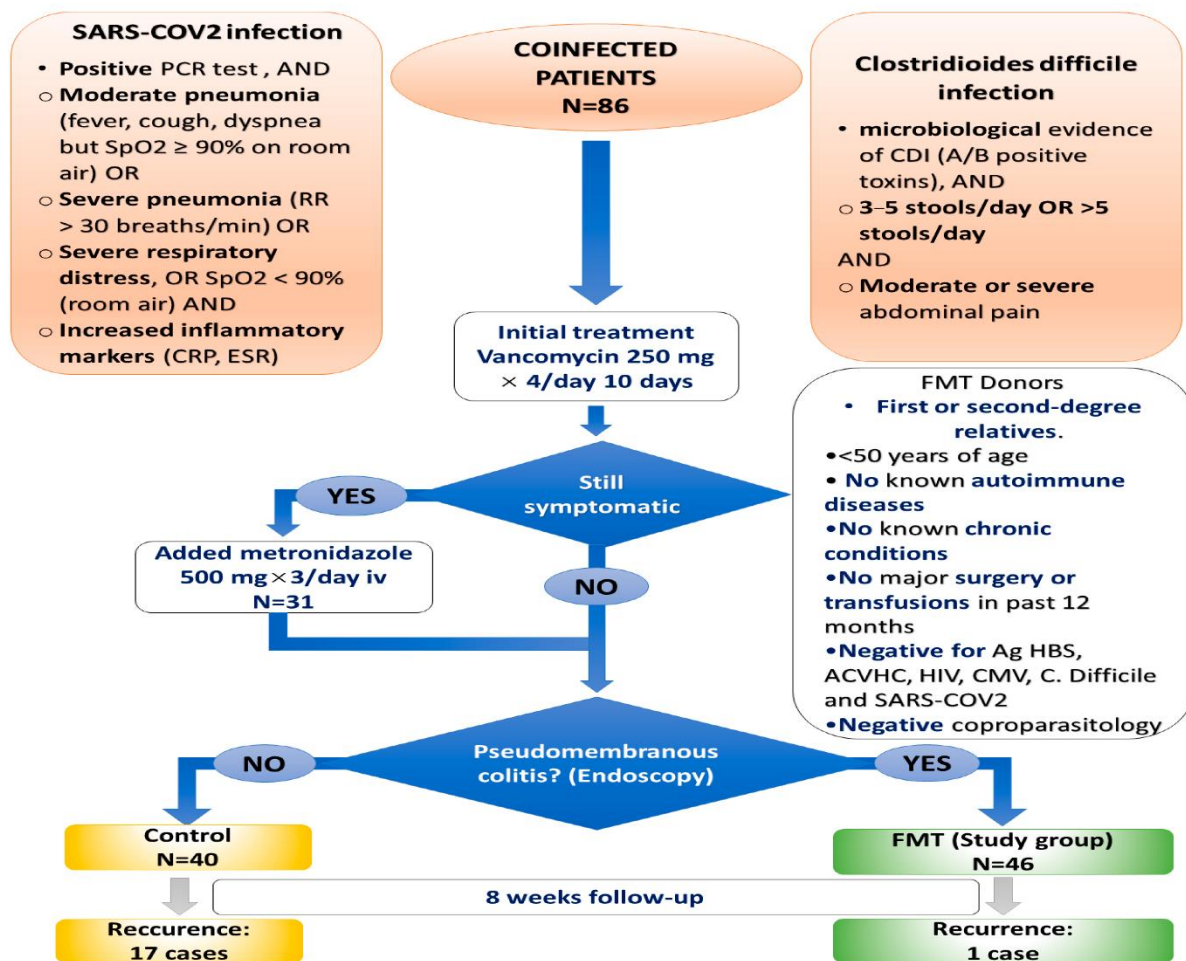


Figura 2. Strategia de cercetare a studiului.

Rezultatele noastre au arătat că în mai mult de 90% din întreaga cohortă (grupuri de studiu și de control), au avut factori de risc specifici, cum ar fi accidentul vascular cerebral, diabetul, obezitatea și hipertensiunea arterială, ceea ce este în concordanță cu literatura actuală.

Rezultatele noastre sunt în conformitate cu Kovacevic et. al. care au înregistrat factori de risc similari pentru coinfecție (boală cardiovasculară (11,96%) și diabet (30,37%).

Clostridioides difficile afectează de preferință pacienții vârstnici și provoacă o rată ridicată a mortalității, în special în cazul coinfecțiilor. În literatura de specialitate, profilul pacienților coinfectați are o vârstă medie de 61,22 ani, provine din mediul urban și are șanse mai mari de a fi femeie (62,5%). În schimb, studiul nostru a observat omogenitate în prevalența de gen în populația inclusă. În plus, un procent mai mare de pacienți proveneau din mediul rural, deși fără a atinge semnificația statistică ($p > 0,05$). Studii clinice recente menționează rolul F.M.T. în boala inflamatorie intestinală (I.B.D.), scleroza multiplă și boala Parkinson. Acest lucru sugerează nu numai un efect intestinal de modulare local, ci și un răspuns imunologic sistemic la F.M.T. cu impact asupra axelor intestin-plămân și intestin-creier. Răspunsul imunologic după F.M.T. a fost asociat cu o reducere substanțială a densității celulelor T CD8+ mucoasei colonice și o scădere a concentrațiilor serice de IL-6 și IP-10. Nivelurile serice de IL-6 și VCAM-1 au fost toate corelate semnificativ cu CRP și ESR, așa cum a fost evidențiat și în studiul realizat de Yanzhi și colab. asupra rolului F.M.T. în tratamentul colitei ulcerative. Având în vedere răspunsul inflamator excesiv în infecțiile cu SARS-CoV2 și C.D.I., cu niveluri crescute de IL-6, TNF- α , IL-1 β și IP-10, precum și disbioza asociată menționată în literatură, F.M.T. ar putea fi un factor cheie în tratamentul C.D.I. sau scenariilor clinice mai severe, cum ar fi SARS-CoV-2 și co-infecțiile C.D.I. F.M.T. ar putea îmbunătăți rezultatul clinic al acestor pacienți.

Evoluția clinică la pacienții cu C.D.I. și/sau SARS-CoV-2 este legată de răspunsul inflamator asociat. Conform Ghidurilor de practică clinică pentru infecția cu *Clostridioides difficile* la adulți și copii (IDSA și SHEA), un punct limită important este leucocitoza (>15.000 celule/ml). Media noastră inițială în leucocitoză (16.613 celule/mL) ar putea fi considerată un predictor crucial pentru rezultatul clinic și supraviețuire. Mai mult, și alte studii au subliniat o reducere semnificativă a CRP după terapia F.M.T. la toți pacienții tratați. De asemenea, datele noastre au arătat normalizarea markerilor inflamatori: CRP 5,67 mg/dl medie, WBC medie 7695 celule/mL și fibrinogen 420 mg/dl la pacienții cu F.M.T. ($p < 0,05$).

Este recunoscut faptul că o co-infecție SARS-CoV-2 și C.D.I. provoacă managementul clinic, deoarece crampele abdominale și durerea pot fi mai severe și mai durabile după rezolvarea bolii. Am înregistrat o corelație semnificativă statistic între F.M.T. și reducerea durerii abdominale pentru pacienții noștri la externare (91,3%, $p < 0,005$). Într-o abordare similară, alte studii care se

concentrează numai pe C.D.I., au evidențiat o reducere semnificativă a durerii abdominale și a balonării la 4-8 săptămâni. Mai mult, o revizuire clinică retrospectivă cu privire la F.M.T. în infecția cu C.D.I. a evidențiat, de asemenea, o îmbunătățire semnificativă a durerii abdominale și a crampelor față de valoarea inițială, la 6 luni de urmărire. Aceste aspecte, pe lângă datele prezentate în studiul nostru, sugerează că restabilirea unei microbiote normale prin instilarea de fecale ameliorează durerile abdominale și îmbunătățește calitatea vieții pacienților.

În aceeași notă, lotul F.M.T. a avut nevoie de o singură clasă de antibiotice (vancomicină) în majoritatea cazurilor (97,82%), cu o evoluție clinică mai bună, în timp ce lotul de control, în 75% din cazuri, a necesitat primirea celei de a doua clase de antibiotice (metronidazol). În mod similar, studiile anterioare privind transplantul de microbiotă fecală folosind colonoscopia, au evidențiat o abordare semnificativ mai eficientă decât antibioterapia (vancomicina) per se sau vancomicina și fidaxomicina, în atenuarea simptomelor clinice ale C.D.I. Literatura de specialitate este totuși limitată când vine vorba de pacienții cu SARS-CoV-2 și C.D.I. Actualmente există doar câteva rapoarte care abordează co-infecțiile cu SARS-CoV-2 și C.D.I. (serie de cazuri). Studiile clinice ulterioare care evaluează un management terapeutic personalizat pentru aceste cazuri ar putea face lumină în ceea ce privește ratele de supraviețuire, reducerea utilizării antibioticelor, asociațiile de antibiotice și efectele secundare ale acestora. În consecință, studiile prezentate adaugă informații importante în literatura de specialitate cu privire la metodologia de tratament a SARS-CoV-2 și C.D.I.

EXPLORING MICROBIOTA TRANSPLANTATION CLINICAL BENEFITS IN DIGESTIVE AND EXTRA-DIGESTIVE DISEASES

ABSTRACT

The gut microbiota, which is our gene fingerprint from birth, is also influenced by a number of different triggers, such as food, environment, and other factors. Genetic mapping of the gut microbiota has established that it contains an average of 100 billion microorganisms, which is 10 times more than the cells of the human body. It is important to point out that phyla Firmicutes and Bacteroidetes make up the majority of healthy gut microbiota. There is notable variation in the diversity and amount of bacteria from the esophagus to the rectum, due to genetic predisposition, dietary triggers, and other environmental factors that alter the microbiota and cause dysbiosis. Moreover, antibiotic consumption is another gateway to dysbiosis, due to so many factors that change the ratio between healthy and unhealthy bacteria and F.M.T. is a significant medical tool in improving gut health. The gastrointestinal microbiota and their genetic products play a significant role in the development of the immune system, host defenses, energy metabolism and nutrition in a complicated, but balanced balance. Improper compositional disturbance of this balance, known as dysbiosis, has been linked to a series of disease states. The gut microbiota is involved in the response to various diseases. Many recent studies suggest that SARS-CoV-2 leads to changes in the gut microbiota by affecting ACE2, mitochondrial damage and the microbiota-lung axis or liver-gut microbiota axis. A concept that is highlighted by new studies. It is also possible that intestinal inflammation caused by COVID-19 predisposes individuals to other gastrointestinal pathogens. In addition, many complications of diseases have a positive correlation with an overpopulation of pathogenic bacteria influencing different metabolic axes and the immune system (*Coprobacillus*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium hathewayi*). A decrease in beneficial anti-inflammatory bacteria *Faecalibacterium prausnitzii*, phyla Firmicutes, Bacteroidetes which make up the majority of healthy gut microbiota, phyla Actinobacteria and Verrucomicrobia are important in intestinal homeostasis. Recent studies and case reports focus on the importance of gut microbiota in oncogenetic development and response to chemotherapy in various types of cancer.

Also, the recent meta-analysis by Yuanyuan Zhao et. al. highlights the implications of the gut microbiota in the development of liver diseases such as fatty liver disease, cirrhosis, even implications in hepatocarcinoma. This review highlights the importance of F.M.T. by assessing the gut-liver axis in recovery from these pathologies.

To directly improve the recipient's microbial composition and provide clinical benefit, fecal microbiota transplantation (F.M.T.) involves administration of a polyetilen glycol solution instilled into the patients colon up to the cecum by colonoscopy. Because it has the clinical benefit of changing the gut microbiota of its receptors, F.M.T. is considered an innovative approach to treating dysbiosis and its complications. According to 2013 guidelines, F.M.T. has been approved as a therapeutic treatment to treat recurrent *Clostridium difficile* (C.D.I.) infection, and its clinical efficacy has reached approximately 92%. F.M.T. has so far been a successful therapy. However, it is anticipated that F.M.T. standards will be established in the coming years in addition to conventional methods and that its regulations will expand to exploit the maximum potential offered by faecal transplantation in extradigestive pathology, including in restoring the response to chemotherapy in case of neoplastic pathology.

The topic of the Habilitation Thesis is part of the author's main research interest and was chosen to highlight important research directions related to the clinical benefits brought by the transfer of fecal matter both in fresh raw form and new concepts that improve the safety of transfer, such as washed microbiota transplantation or spore transfer.

The structure of the habilitation thesis has been designed to cover the essential elements of such a thesis, as follows: it contains the main scientific contributions of its author since the award of the title of Doctor of Medicine, a chapter that includes career development and subsequent development proposals, abstracts in Romanian and English and bibliography.

The introductory chapter presents very briefly the professional development of the author, presenting activities related to the particular interest that the author has for the pathology presented in this thesis, as well as particular aspects of fecal transfer, methods of transfer and clinical benefits captured in multiple studies conducted by the author.

The main scientific contributions of the author are presented in chapter 2 and are structured as follows: the first subchapters focus on the author's main research on the success rate of faecal transfer and prevention of recurrence, clinically observed benefit in faecal transfer in patients with SARS COV 2 and coinfection with *C. difficile*, analysing aspects related to the implications of

faecal transfer on the immune system. The next subchapter focuses on particular aspects of faecal transfer in oncological patients and those with respiratory and intestinal TB infections, as well as restoration of treatment response in patients with resistance to usual chemotherapy in the context of TB infection (multidrug resistance).

The next chapter presents the author's contribution to scientific studies within research groups, studies also published in the Web of Science Core Collection, but whose topic is not part of the main direction of interest of the author.

The final chapter of this thesis presents the didactic and scientific biography of the author and some aspects of future directions of university career development.

The chapter dealing with the main scientific contributions of the author begins with a series of studies highlighting the importance of faecal transfer in case of recurrence of episodes of *Clostridoides difficile*. The author conducted a retrospective study with the research team in the study titled "Microbiota transplantation in severe and non-severe patients in *Clostridoides difficile* infection. The role of F.M.T. in primary infection with *Clostridoides difficile* " to analyze clinical characteristics and outcomes of 96 F.M.T. patients with an prior 10-day course of antibiotic treatment in their medical records, including 71 patients with recurrent IDU and 25 patients with primary IDU. The results of the study showed an overall primary cure rate in the study of 88.5%, and the primary cure rate for severe forms was 85.7%. Analysis of the data revealed FMT recurrence rates of 5.25%, 15.15%, and 27.3% for severe primary, secondary, and tertiary IDUs. The risk of recurrence was significantly associated with F.M.T. after the second and third severe episodes of IDU ($p < 0.05$), but not with F.M.T. after the first severe episode of C.D.I.

The paper "Microbiota transplantation in patients co-infection SARS-CoV2 and *Clostridoides difficile*", presents data evaluated during the COVID 19 pandemic. The COVID-19 pandemic has posed a challenge in treating patients infected with *Clostridoides difficile* (CD), given the increasing number of coronavirus 2 (SARS-CoV-2) co-infections with severe acute respiratory syndrome. In this context, fecal microbiota transplantation (F.M.T.) represented a promising alternative in modulating. To achieve this goal, we conducted a comparative, retrospective, single-center study of 86 patients (hospitalized between January 2020 and March 2022). We based our approach on specific inclusion criteria:

1. The study group included 46 co-infected patients (COVID-19 and CD) who received antibiotics and FMT;

2. In the control group, 40 co-infected patients received only antibiotics.

Our results showed no significant group differences in gender, age, risk factors such as cardiovascular and neurological disease, type 2 diabetes and obesity ($p > 0.05$), or in pre-treatment inflammatory status, assessed by leukocytes (WBCs) and C-reactive protein (CRP) levels.

We report a significant decrease in inflammatory syndrome (CRP, WBC) in coinfecting patients receiving F.M.T. in addition to antibiotics ($p < 0.05$), with a lower relapse rate and alleviation of cramps and abdominal pain (91.3%). In addition, higher fibrinogen levels, moderate persistent abdominal pain (82.5%) and a significantly higher rate of CD infection relapse (42.5%) were recorded in co-infected patients treated with antibiotics alone ($p < 0.05$). Our study provides new data to support the multiple benefits of F.M.T. in COVID-19 and CD co-infection by improving patients' quality of life and inflammatory syndrome. Safety measures for endoscopy staff during the COVID-19 pandemic have been implemented in accordance with current guidelines established by the World Health Organization and international gastroenterology organizations. These precautions included practicing strict physical distancing and minimizing the number of staff in the procedure room. In addition, all staff performing colonoscopies of COVID-19 and CDI patients wore full personal protective equipment, including a respirator (FFP2, FFP3, N95, N99, N100 or equivalent), gown, goggles, face protection, gloves and apron, while applying standard precautions in providing patient's care.

There were three primary outcomes for our study. The first was based on reducing inflammatory markers. The second was related to resolving abdominal pain after treatment. Finally, the third outcome concerned disease recurrence, defined according to the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: the 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults as occurring within 8 weeks. Accordingly, we established an 8-week follow-up period in our study after patients' first episode of CDI and subsequent treatment.

The secondary outcome was related to adverse effects attributed to the FMT procedure.

In the following paper, included in this thesis, "Microbiota transplantation in inflammatory bowel diseases", presents an analysis of the therapeutic perspectives of fecal matter transfer in inflammatory bowel diseases performed both in patients refractory to treatment and in animal models. Inflammatory bowel diseases are a complex series of diseases of incompletely known etiology that have led to chronic inflammation of the gastrointestinal tract. In inflammatory bowel

disease, a promising method of treatment is fecal microbiota transplantation (F.M.T.). F.M.T. has demonstrated its increasing efficacy and safety in recent years for recurrent IDU. In addition, it has shown real clinical benefits in treating co-infection with SARS-CoV-2 and CDI. Crohn's disease and ulcerative colitis are characterized by dysregulation of immunity, leading to damage to the digestive tract caused by immune responses. Most current therapeutic strategies are associated with high cost and many adverse effects by directly targeting the immune response, so modifying the microbial environment by F.M.T. provides an alternative approach that could indirectly influence the host's immune system in a safe way. Studies highlight endoscopic and clinical improvements in CU and CD in F.M.T. patients over control groups. This analysis highlights the multiple benefits of F.M.T. in I.B.D. by improving unbalanced gut in patients, thereby improving endoscopic and clinical symptoms. We aim to highlight the clinical importance and benefits of F.M.T. to prevent I.B.D. seizures or complications and to stress that further validation is needed for establishing a clinical protocol for F.M.T. in I.B.D.

The following study, published in 2023 in an international database WOS Core Collection, describes an analysis that tracks the therapeutic prospects of fecal transfer in patients with digestive and extradigestive pathology, including oncological pathology. In a mutually beneficial connection with its host, the gut microbiota affects the nutrition, immunity, and metabolism of the host. An increasing number of studies have shown links between certain types of diseases and intestinal dysbiosis or specific microorganisms. Fecal microbiota transplantation (F.M.T.) is recommended for the treatment of recurrent or resistant *Clostridium difficile* (C.D.I.) infection due to its outstanding clinical efficacy against C.D.I.

The therapeutic potential of F.M.T. for other disorders, especially inflammatory bowel disease and malignant diseases, is currently gaining more and more attention. We summarized the latest preclinical and clinical evidence to show FMT's promise in managing cancer, as well as complications related to cancer treatment, after reviewing the latest research on gut microbiota and its relationship to cancer. Several studies have been conducted to investigate a possible link between gut microbes and clinical response to cancer immunotherapy, particularly immune checkpoint inhibitors (ICPIs). The meta-analysis describes the results of multiple studies involving patients with treatment-resistant metastatic melanoma. Two patients with advanced melanoma, who had a long-lasting complete response to treatment, served as FMT donors. F.M.T. was performed by both oral administration and colonoscopy, then anti-PD-1 retreatment was used.

Each patient received complete body images, biopsies of the intestine and tumor tissue, and stool samples before and after treatment. Increased post-FMT infiltration of CD68+ antigen-presenting cells into gut and tumor was observed by immunohistochemical labeling of samples. Following treatment, there was also an increase in CD8+ T cell infiltration. After F.M.T, three patients had a total or partial response to treatment.

The paper describes the clinical benefits of Bifidobacterium comensal in improving anti-tumor immunity and also shows a role in facilitating the efficacy of anti-PD-L1. They investigated melanoma formation in mice with different commensal microbiota and found differences in spontaneous anti-tumor immunity that were reduced after cohousing or fecal transfer. This could explain how immunotherapy-resistant patients recovered response after F.M.T. instillation. The conclusion of this study reinforces the importance of commensal microbes in antitumor immunity and the role of F.M.T. in cancer, especially in patients undergoing immunotherapy.

The author's latest study on the author's sphere of interest includes the paper: "Exploring the potential of fecal microbiota transplantation as a therapy in tuberculosis and inflammatory bowel disease". This systematic review, published in 2023 in the Core Collection, touches on an area of international interest on the implications of microbiota transfer in the return of the response to chemotherapy in the case of TB resistant to multiple therapeutic lines or in the case of intestinal TB. This review explores the potential benefits of fecal microbiota transplantation (F.M.T.) as an adjuvant treatment in tuberculosis (TB), drawing parallels with its effectiveness in inflammatory bowel disease (I.B.D.). F.M.T. has shown promise in restoring balance to the gut microbiota and modulating immune responses in patients with I.B.D. Given the similarities in immunomodulation and dysbiosis between I.B.D. and TB, this meta-analysis hypothesizes that FMT may provide therapeutic benefits.

We conducted a systematic meta-review of existing literature on F.M.T. in I.B.D. and TB, highlighting the mechanisms and potential implications of F.M.T. in the therapeutic management of both conditions. The findings contribute to our understanding of F.M.T.'s potential role in TB treatment and highlight the need for future research in this direction to fully capitalize on its clinical applications. Integrating F.M.T. into comprehensive TB management could improve treatment outcomes, reduce drug resistance, and mitigate side effects of conventional therapies. Future research efforts should focus on well-designed clinical trials to develop protocols on the safety and short and long-term benefits of F.M.T. in TB patients, as well as to assess potential risks. Recent

research described in the meta-analyses, has shown that genetic variations in genes associated with the interleukin (IL)-23/IL-17 axis may impact the integrity of the digestive mucosa through their influence on Th17 cell differentiation, with implications in both diseases. IL-17 and IL-22 play a crucial role in modulating Th17 cell function. IL-22 plays an important role in maintaining mucosal immunity and diversity in bacterial flora, contributing to the biological barrier.

Another important similarity between C.D. and ITB is the presence of granulomas, which can affect both the intestinal mucosa and peri-intestinal tissue, with the clinical benefits of IL-17 playing a crucial role in limiting the formation of necrotic granulomas and therefore reducing the severity of tuberculosis. The paper describes that improving mucosa-associated invariant T cell functions could represent a potential mechanism influencing gut microbiota and makes its protective contribution to providing extensive protection against MTB colonisation, including respiratory tuberculosis and extrapulmonary dissemination. This analysis describes similarities between CD and ITB highlighting the impact of gene polymorphisms within the IL-23/IL-17 axis on IBD susceptibility and ITB development. In the same vein, genome-wide association studies conducted on Japanese and Korean populations have revealed associations between various genes signaling this pathway, which may predispose individuals to the development of I.B.D. or, in the case of TB infection, to the development of ITB. Integrating F.M.T. into comprehensive ITB management could improve treatment outcomes, reduce drug resistance, and mitigate side effects of conventional therapies. Future research efforts should focus on well-designed clinical trials to evaluate the safety, efficacy and long-term benefits of F.M.T. in TB patients. Ultimately, findings from such studies could pave the way for the development of new treatment strategies that harness the therapeutic potential of the gut microbiota in combating ITB, improving patient outcomes, optimizing drug management and preventing multidrug resistance.

Another point of interest in faecal transplantation with implications in Gastroenterology refers to the impact of microbiota on the gut liver axis and the implications of faecal transplantation in patients with cirrhosis of the liver. The meta-analysis "Fecal transplantation in patients with cirrhosis of the liver" is a point of interest of the author considering that mortality due to chronic liver disease has increased exponentially to a global level. Thus, the imbalance of the gut microbiota can be exacerbated by liver diseases, which are mutually harmful. Due to the portal vein that connects the liver directly to the intestines, bacteria and their metabolites can affect the

liver in both healthy and diseased condition. Moreover, by releasing bile acids into the biliary system, the biliary system, liver communicates with the bidirectional intestine.

A number of novel approaches to microbiota modulation have been proposed in recent years, with many promising results in terms of efficacy and clinical application, including personalized diets, antibiotics, probiotics and prebiotics, stomach surgery, phage therapy, and fecal microbiota transplantation (F.M.T.). In this study, F.M.T. is being investigated as a potential future treatment for one of the best-known chronic liver diseases represented by cirrhosis of the liver (LC). Treatment for cirrhosis of the liver may vary depending on the underlying cause and severity of the disease. Currently, cirrhosis of the liver is considered the final stage in the progression of liver disease, and modern treatments are not curative and have not significantly improved liver function. A first step is lifestyle changes. The changes may slow disease progression and improve quality of life, but may not directly affect survival rates and may not be sufficient for cases.

In addition, it is essential to emphasize that the prognosis of the disease should never be underestimated, since it is a primary factor that requires constant attention. Research has demonstrated that nanoindentation techniques are able to evaluate and track nuclear deformities in liver cells, allowing differentiation between samples from a healthy population and those affected by liver cirrhosis disorders. Antiviral drugs for viral hepatitis can slow the progression of the disease. Liver transplantation remains the most effective treatment for advanced cirrhosis with high survival rates. Although it is a life-saving treatment, it remains difficult for patients to access and is performed only in exceptional cases with extremely long waiting lists. In cases where patients receive this treatment, the chances of survival increase significantly, with one study even showing that those who underwent a end-stage liver transplant had a survival advantage of up to 13-17 years compared to those who underwent a liver transplant. did not have access to a transplant.

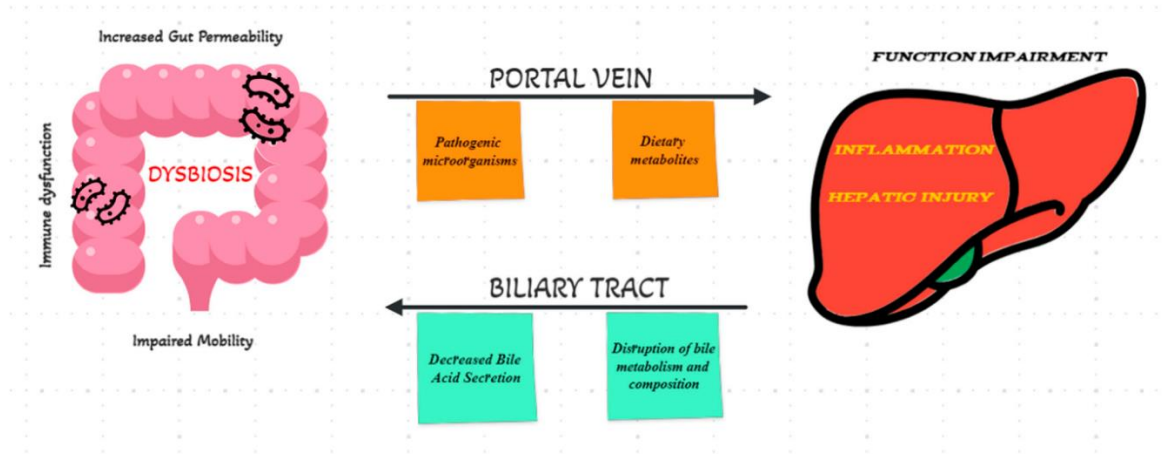


Figure 1. Schematic representation of the liver-intestine axis

The first two studies conducted by the author provide multiple evidences supporting the importance of fecal transfer in patients with significant comorbidities and which affect both exacerbation of the disease and improvement of the immune system, opening new clinical perspectives of this therapy. The study group included patients who received F.M.T. and antibiotics at the first episode, while the control group consisted of patients treated with antibiotics alone.

We have selected the following inclusion criteria:

1. patients over 18 years of age;
2. patients with COVID-19 (diagnosed by detection of SARS-CoV-2 nucleic acid by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction from nasopharyngeal and oropharyngeal swabs);
3. Microbiological evidence of IDUs (A/B positive toxins);
4. Patients who followed the standard treatment protocol in cases of co-infection: a 10-day course of antibiotics with vancomycin 250 mg \times 4 / day. After 10 days, if necessary, metronidazole 500 mg \times 3/day IV was added with vancomycin to control symptoms.

This approach was implemented with good results by Rokas et al., which showed improved mortality in critical patients with CDI when i.v. metronidazole was added to oral vancomycin. The control group received only antibiotic therapy, while in the study group, an F.M.T. infusion was used after the first 10 days of treatment. These patients stopped taking antibiotics 24 hours before

the instillation procedure. The decision to administer F.M.T. during the first episode of C.D.I. was made similarly to and considered the presence of pseudomembranous colitis at endoscopy.

First or second degree relatives were selected as potential donors according to current guidelines. Faecal samples were tested copropazitologically and virologically (HBsAG, ACVHC, HIV, CMV and CD), as well as for COVID-19. Donors were tested for SARS-CoV-2 (via RT-PCR test) and all subjects who tested positive were excluded. In addition, patients with autoimmune or other documented chronic diseases and patients who had undergone major surgery or received blood products 12 months prior to faecal collection were also excluded. Donors over the age of 50 were also excluded. We thoroughly analyzed each donor's eligibility based on their medical records and a personal interview. The day before FMT, patients were prepared by intestinal lavage with 4 L of PEG (Poly Ethylene Glycol).

The faecal transfer technique involved dissolving 50 g of donated faeces (less than 6 hours after defecation) in 500 ml of 0.9% saline, mixing to obtain a homogeneous solution, and filtering. Soon after, a total colonoscopy with terminal ileoscopy without sedation was performed to maintain control of the anal sphincter. The suspension, fresh, was introduced from the terminal ileum, with 2/3 of the suspension in the right colon and the rest in the other segments of the colon at receding. Endoscopic appearance of the colon was a typical endoscopic appearance of pseudomembranous colitis, despite antibiotic treatment.

The colonic mucosa showed faded luster, erased vascularity, granular mucosa and yellowish-green pseudomembranous deposits. The classification of pseudomembranous lesions can be made according to the degree and depth of inflammatory changes, with the gradation of lesions from type 1 ("peak lesions", focal surface epithelial inflammation or necrosis) to type 3 (mucosal necrosis). and significant inflammatory debris).

There were a total of 235 patients with SARS-CoV-2 and CD co-infection documented during the two-year period of our retrospective search. 149 cases were excluded due to one or more of the following: lack of informed consent to participate in research studies; missing data (in particular on the rate of recurrence); death during hospitalization or transfer to ICU; significant comorbidities or demographic characteristics which would have created inhomogeneities between groups or which would have had an intrinsic influence on the result variables determined.

We registered a notable difference in patients from rural areas (60.5%) compared to patients from urban areas (39.5%), with the same pattern of distribution in both groups ($p > 0.05$). On the

same note, both groups were homogeneous, with the same percentage of patients (60.4%), hypertension as a severity factor and type 2 diabetes. Then, in both groups, there was a close distribution of neurological and metabolic risk factors. About 7% of cases had a stroke in their medical history, and obesity as a risk factor was observed in a slightly higher percentage for the study group (17.4% vs. 15%) ($p > 0.05$).

Our results showed that in more than 90% of the entire cohort (study and control groups), specific risk factors such as stroke, diabetes, obesity and hypertension were present as important comorbidities for both infections, which is consistent with the current literature. Our results are in line with Kovacevic et. al. who had similar risk factors for coinfection (cardiovascular disease (11.96%) and diabetes (30.37%). *Clostridioides difficile* preferentially affects elderly patients and causes a high mortality rate, especially in case of coinfections. In the literature, the profile of coinfecting patients has an average age of 61.22 years, comes from urban areas and has higher chances of being a woman (62.5%). Instead, our study observed homogeneity in gender prevalence in the included population. In addition, a higher percentage of patients came from rural areas, although without reaching statistical significance ($p > 0.05$). Recent clinical studies mention the role of F.M.T. in inflammatory bowel disease (IBD), multiple sclerosis, and Parkinson's disease. This suggests not only a local intestinal modulation effect, but also a systemic immunological response to F.M.T. impacting the gut-lung axis and gut brain axis. Immunological response after F.M.T. was associated with a substantial reduction in colonic mucosal CD8+ T cell density and a decrease in serum IL-6 and IP-10 concentrations. Serum levels of IL-6 and VCAM-1 were all significantly correlated with CRP and ESR, as highlighted in the study conducted by Yanzhi et al. on the role of FMT in the treatment of ulcerative colitis. Given the excessive inflammatory response in SARS-CoV2 and CDI infections, with elevated IL-6 levels, TNF- α , IL-1 β and IP-10, as well as associated dysbiosis mentioned in the literature, F.M.T. could be a key factor in the treatment of IDUs or more severe clinical scenarios such as SARS-CoV-2 and C.D.I. co-infections. F.M.T. could improve the clinical outcome of these patients. The clinical course in patients with C.D.I. and/or SARS-CoV-2 is related to the associated inflammatory response. According to the Clinical Practice Guidelines for *Clostridioides difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), an important cut-off point is leukocytosis (>15,000 cells/ml). Our baseline average in leukocytosis (16,613 cells/mL) could be considered a crucial predictor.

Furthermore, other studies have shown a significant reduction in CRP after FMT therapy in all treated patients. Our data also showed normalization of inflammatory markers: CRP 5.67 mg/dl mean, mean WBC 7695 cells/mL and fibrinogen 420 mg/dl in FMT patients ($p < 0.05$). It is recognized that co-infection of SARS-CoV-2 and CDI causes clinical management, meaning that abdominal cramps and pain may be more severe and lasting after disease resolution.

We recorded a statistically significant correlation between F.M.T. and reduction in abdominal pain for our patients at discharge (91.3%, $p < 0.005$). In a similar approach, other studies focusing only on C.D.I. have shown a significant reduction in abdominal pain and bloating at 4-8 weeks. Furthermore, a retrospective clinical review of F.M.T. for C.D.I. infection also revealed a significant improvement in abdominal pain and cramps compared to baseline at 6 months of follow-up. These aspects, in addition to the data presented in our study, suggest that restoring a normal microbiota through fecal instillation relieves abdominal pain and improves patients' quality of life. On the same note, the F.M.T. group needed only one class of antibiotics (vancomycin) in most cases (97.82%) with a better clinical course, while the control group, in 75% of cases, received a second class of antibiotics (metronidazole) associated with proper case management. Similarly, previous studies of fecal microbiota transplantation using colonoscopy have shown a significantly more effective approach than antibiotic therapy (vancomycin) per se or vancomycin and fidaxomicin to alleviate clinical symptoms of CDI.

The literature is, however, limited when it comes to patients with SARS-CoV-2 and CDI. As far as we know, there are only a few reports addressing SARS-CoV-2 and CDI co-infections (case series). Further clinical trials evaluating personalized therapeutic management for these cases could shed light on survival rates, reduction in antibiotic use, antibiotic associations and their side effects. Consequently, the study presented by the author adds important information to the literature on the treatment methodology of SARS-CoV-2 and CDI.