

# Allogene Mikrobiotarekonstitution bei Reizdarm – die AMIRA Studie

16. Symposium Infektionsmedizin Tübingen  
09. März 2018

Prof. Dr. med. M. Wagner

## Definition nach S3-Leitlinie der DGVS und DGNM

- einzelne oder kombinierte chronische (>3 Monate) Darmsymptome
- eine relevante Einschränkung der Lebensqualität
- keine andere im Rahmen der klinischen Untersuchung erhobene Ursache/Erkrankung für die Beschwerden

## Epidemiologie

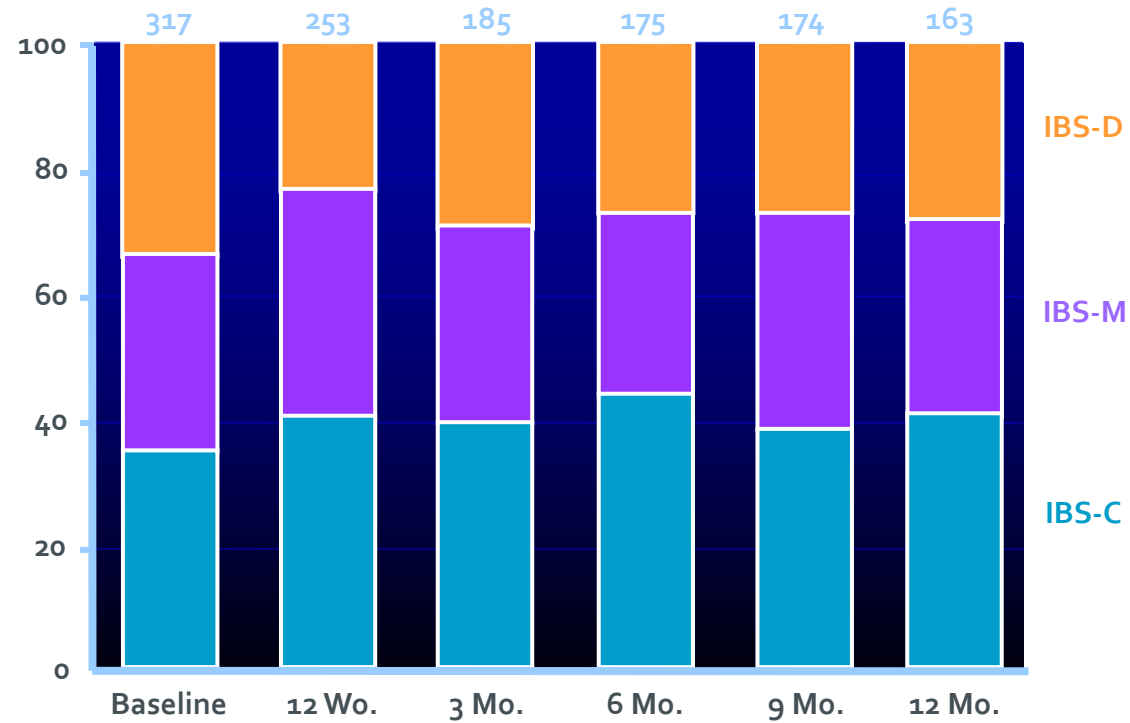
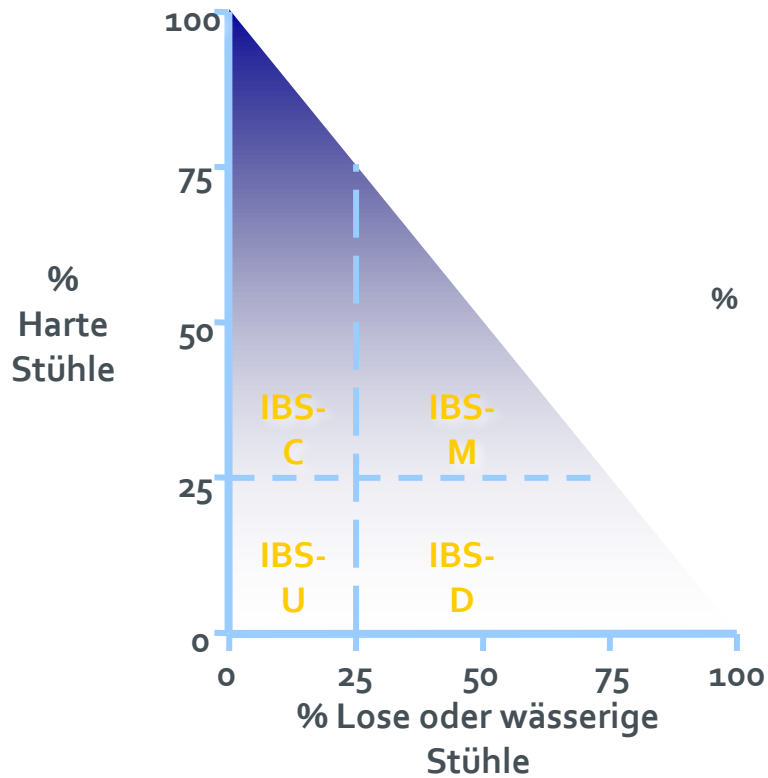
- Prävalenz zwischen 2,5 und 25% . In Deutschland 12%.
- Frauen : Männer 2:1

## Sozioökonomische Folgen

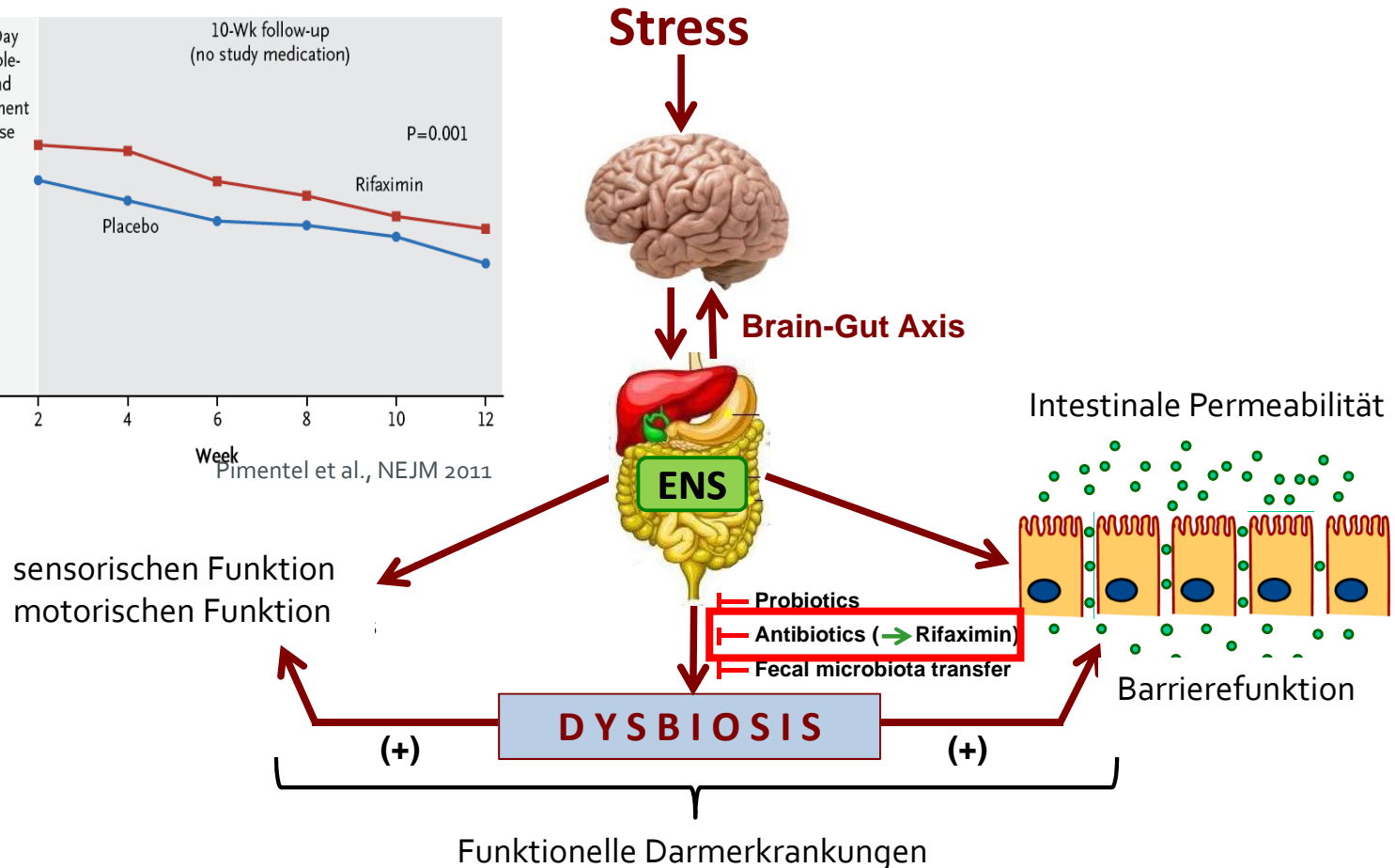
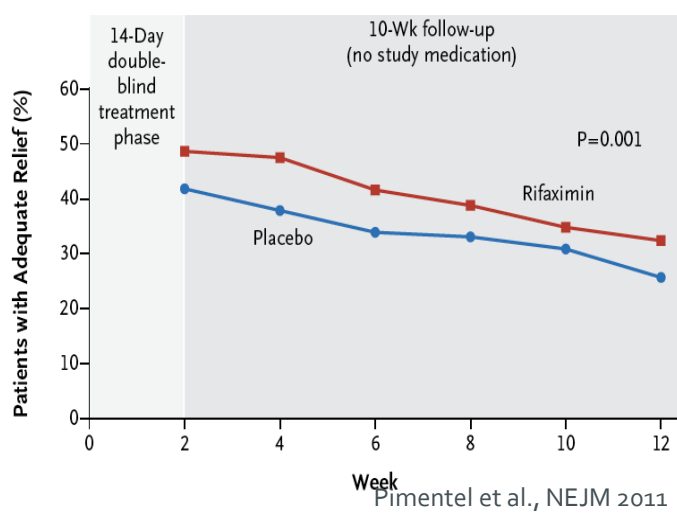
- direkte Kosten: 9 Milliarden\$ jährlich (USA)
- indirekte Kosten: 16 Milliarden\$ jährlich (USA)



# IBS-D – ROME III



# Allogene Mikrobiotarekonstitution- Rationale



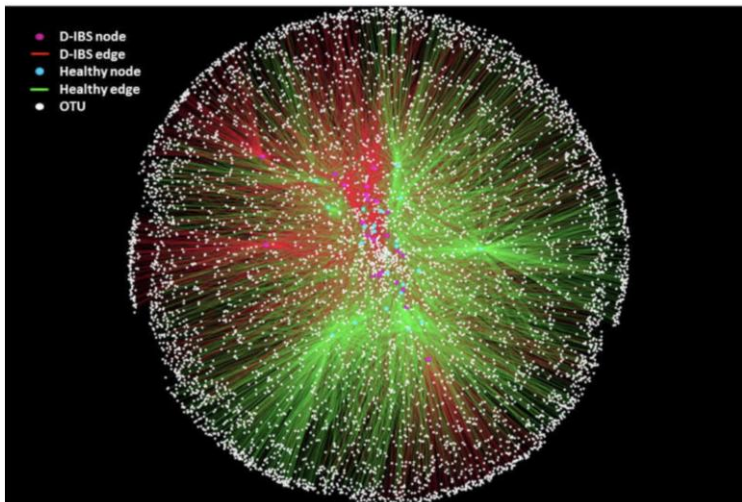
- **Funktionelle Störungen** verändern das Mikrobiom – das **Mikrobiom** verändert die Darmfunktion
- **Persistierende Beschwerden** nach akuten Infekten
- Modulation der **Signalübertragung** vom Darm zum ZNS (Hypersensitivität)

## Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

I. M. CARROLL,\* T. RINGEL-KULKA,† J. P. SIDDLE\* & Y. RINGEL\*

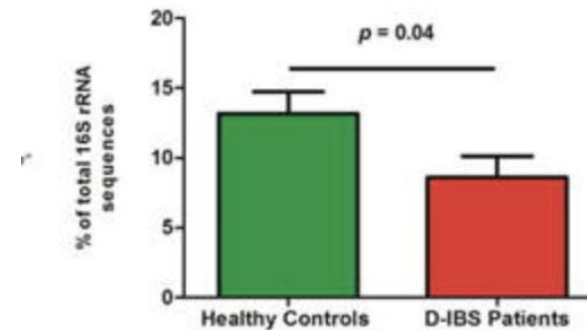
\*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

†Gillings School of Global Public Health, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

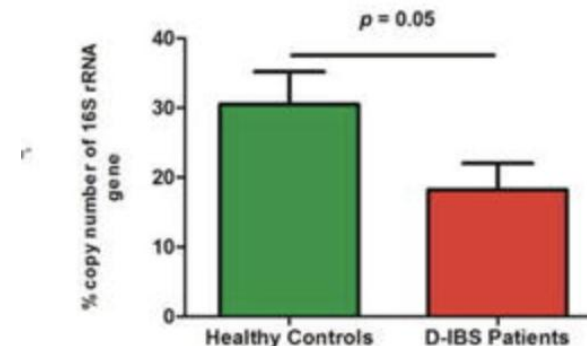


Operational Taxonomic Unit (OTU) network analysis of bacterial communities from D-IBS patient and healthy control fecal samples for the V1-3 16S rRNA region. Nodes represent individual D-IBS samples (red circles), individual healthy control samples (green circles), and OTUs (white circles). Edges (lines) connecting D-IBS nodes (red edges) or healthy control nodes (green edges) to OTUs indicate whether a given OTU was found in that sample. The pattern of green and red edges indicates that although both groups share common OTUs, D-IBS samples share more OTUs in common and segregate from healthy control shared OTUs.

### C Level of *Faecalibacterium* genus in fecal samples determined by 454 pyro-sequencing



### D Level of *Faecalibacterium prausnitzii* in fecal samples determined by qPCR

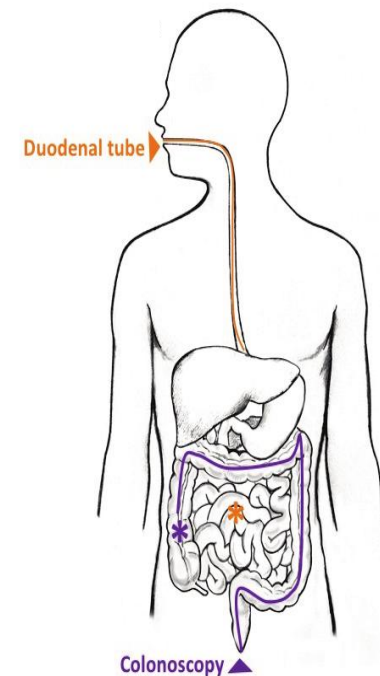
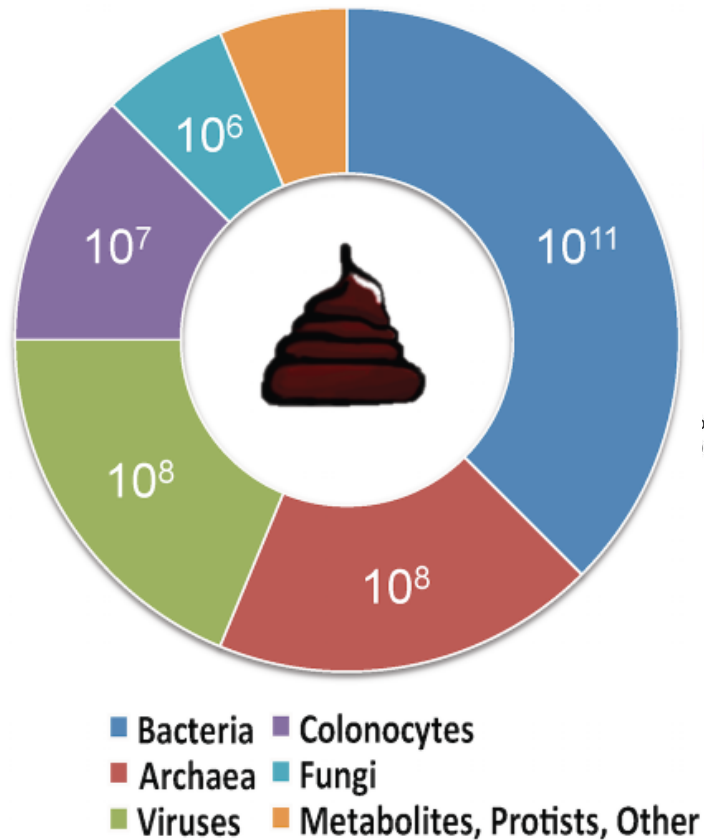




Die Gesamtheit aller nicht-menschlichen DNA bzw. allen nicht-menschlichen Lebens (Mikrobiota/Mikroflora) am menschlichen Körper.

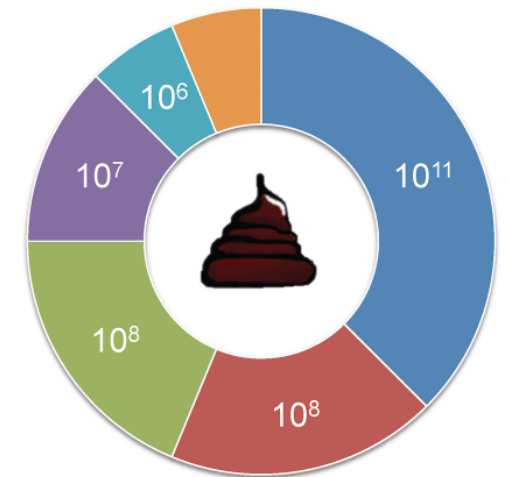
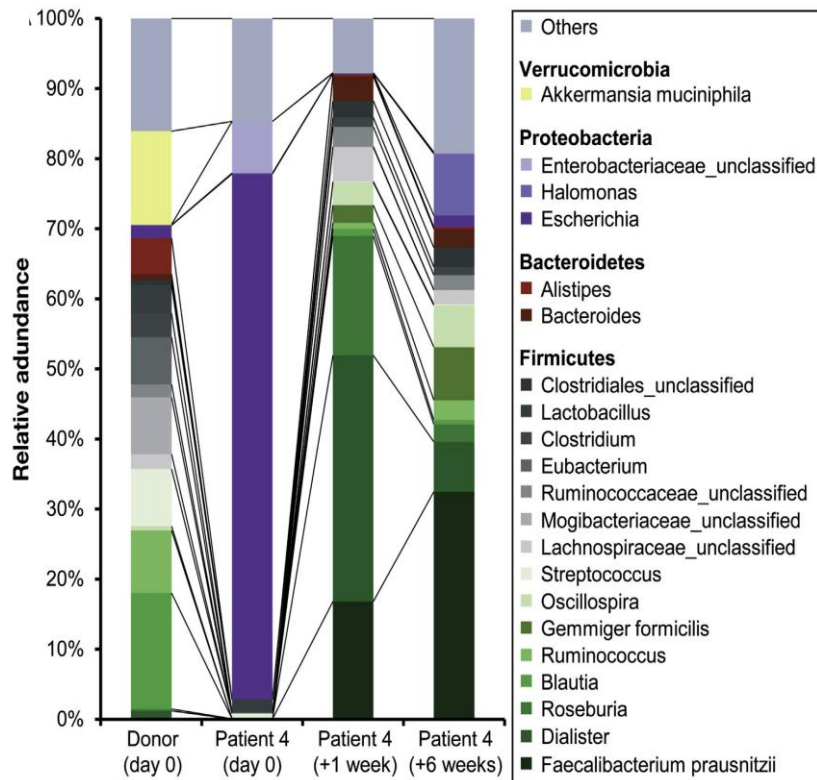
- ca.  $10^{14}$ - $10^{18}$  unterschiedliche Organismen (Bakterien, Viren, Protozoen, ...)
- ca. 1000 bakt. Spezies
- unser „Hauptaugenmerk“ gilt dem „gut-microbiome“, insbesondere dem Colon-Mikrobiom

# Komplexität des Metagenoms und damit des „Stuhltransplantats“

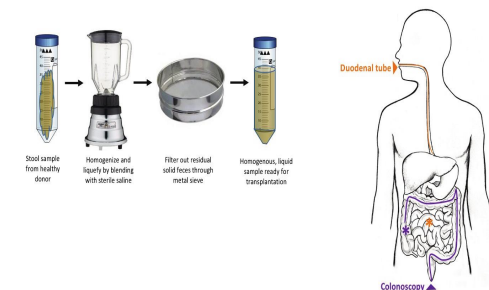




## AMR, Indikation: C. diff. Colitis

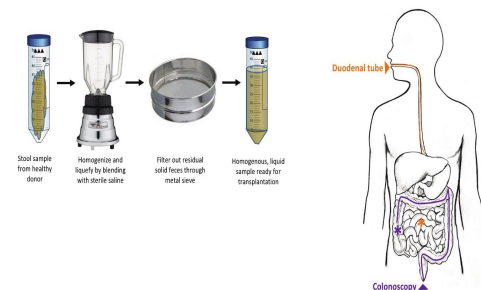
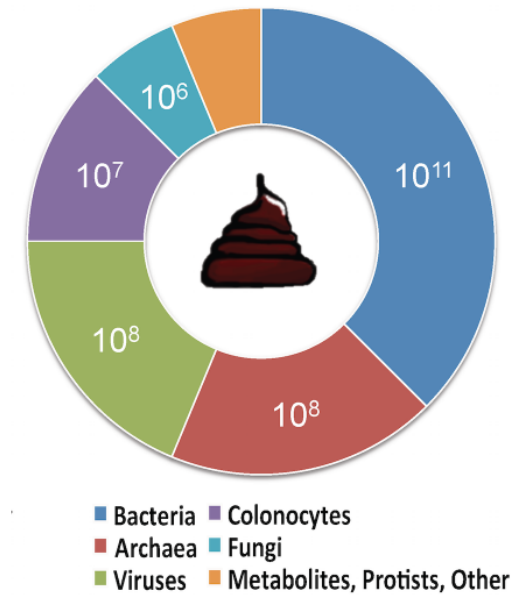
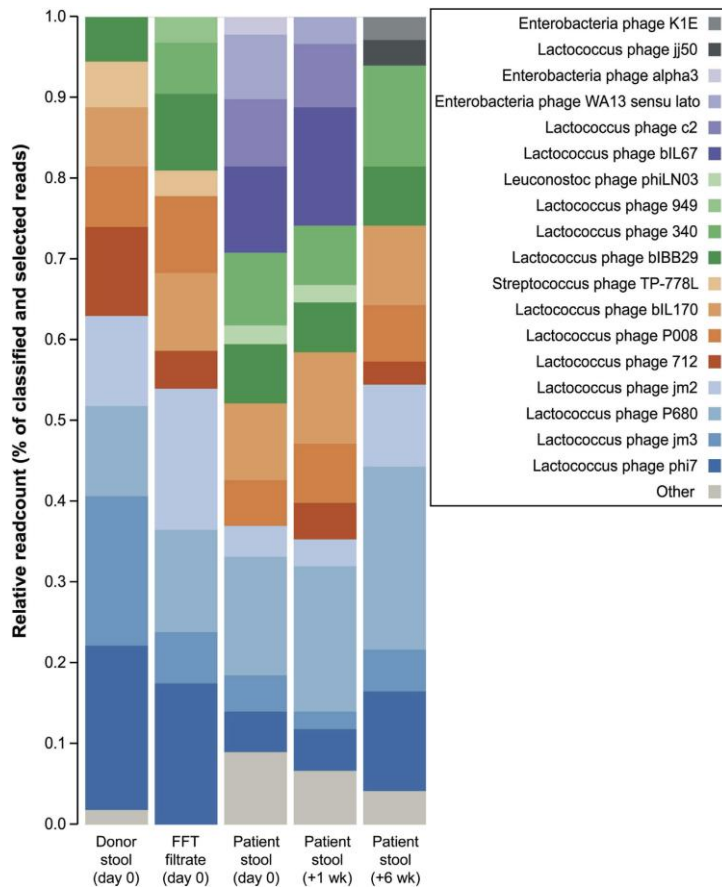


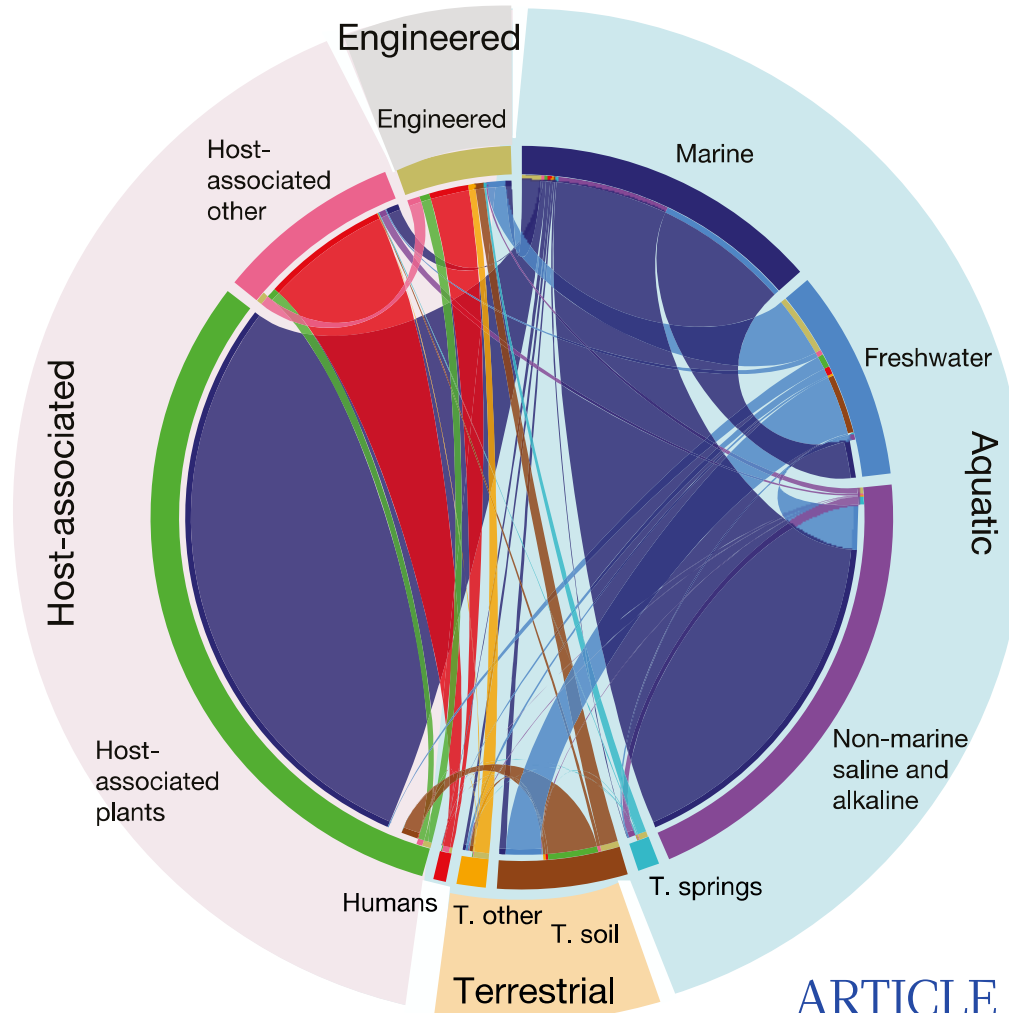
■ Bacteria   ■ Colonocytes  
■ Archaea   ■ Fungi  
■ Viruses   ■ Metabolites, Protists, Other





## AMR, Indikation: C. diff. Colitis





ARTICLE

doi:10.1038/nature19094

## Uncovering Earth's virome

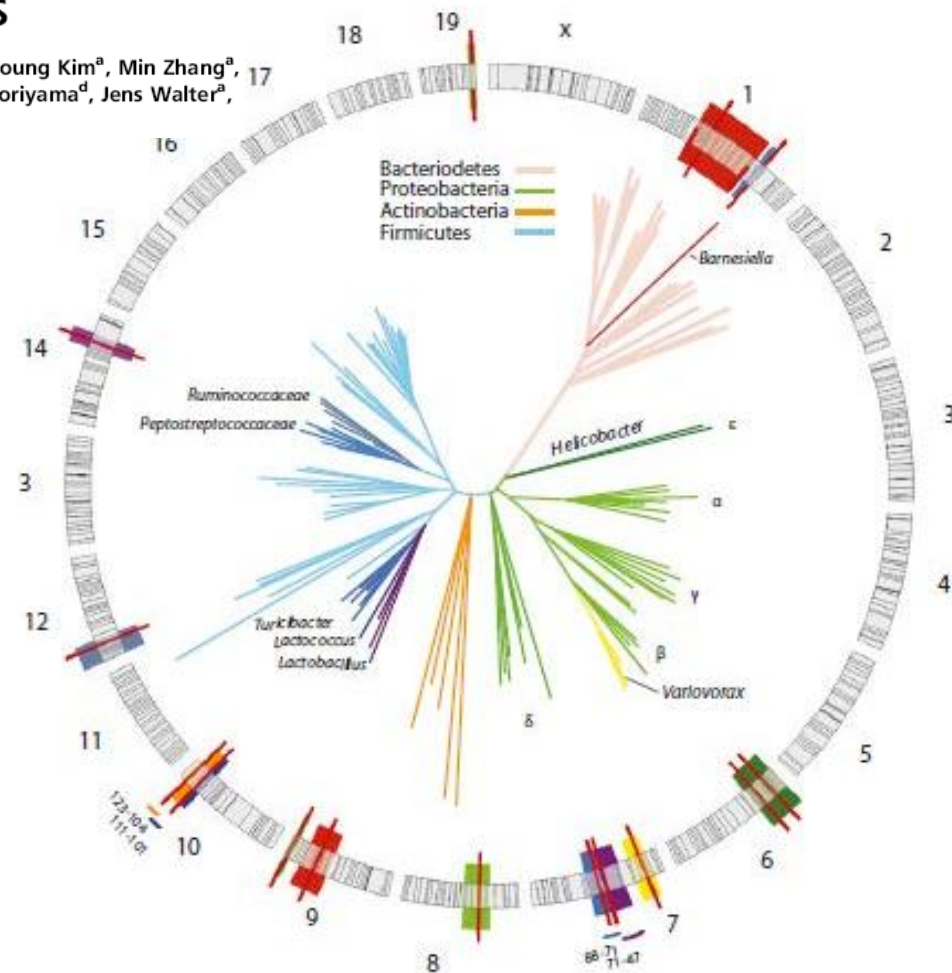
David Paez-Espino<sup>1</sup>, Emiley A. Eloe-Fadrosh<sup>1</sup>, Georgios A. Pavlopoulos<sup>1</sup>, Alex D. Thomas<sup>1</sup>, Marcel Huntemann<sup>1</sup>, Natalia Mikhailova<sup>1</sup>, Edward Rubin<sup>1,2,3</sup>, Natalia N. Ivanova<sup>1</sup> & Nikos C. Kyrpides<sup>1</sup>

## Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors

Andrew K. Benson<sup>a,1</sup>, Scott A. Kelly<sup>b</sup>, Ryan Legge<sup>a</sup>, Fangrui Ma<sup>a</sup>, Soo Jen Low<sup>a</sup>, Jaehyoung Kim<sup>a</sup>, Min Zhang<sup>a</sup>,  
Phaik Lyn Oh<sup>a</sup>, Derrick Nehrenberg<sup>b</sup>, Kunjie Hua<sup>b</sup>, Stephen D. Kachman<sup>c</sup>, Etsuko N. Moriyama<sup>d</sup>, Jens Walter<sup>a</sup>,  
Daniel A. Peterson<sup>a</sup>, and Daniel Pomp<sup>b,e</sup>

Intercross differenter Mauslinien  
Korrelation Genetik und Mikrobiom

➤ Enge Assoziation distinkter Loci mit der mikrobiellen Besiedelung



## Browsing metabolites

Filter by metabolite status:

Detected and quantified  Detected but not quantified  Expected but not quantified  Predicted

Filter by biofluid:

Other Fluids  Saliva  Cerebrospinal Fluid  Urine  Blood  Feces  Sweat

Filter by origin:

Plant  Microbial  Cosmetic  Toxin/Pollutant  Food  Drug  Exogenous  Endogenous  Drug Metabolite

Clear

Apply Filter

Extract data from these results ^

My Extractions

Displaying metabolites 1 - 25 of 1170 in total

1 2 3 4 5 ... Next » Last »

HMDB ID <sup>+</sup>

CAS Number

Name

Structure

Formula

Average Mass

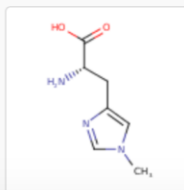
Mono Mass

Biofluid Location

HMDB0000001

332-80-9

1-Methylhistidine



C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

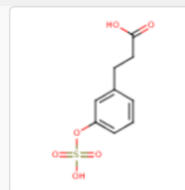
169.1811

169.085126611

Blood  
Cerebrospinal Fluid (CSF)  
Feces  
Saliva  
Urine

HMDB0094710

3-[3-(Sulfooxy)phenyl]propanoic acid



C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>S

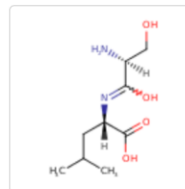
246.23

246.019809216

Feces

HMDB0094712

Serylleucine



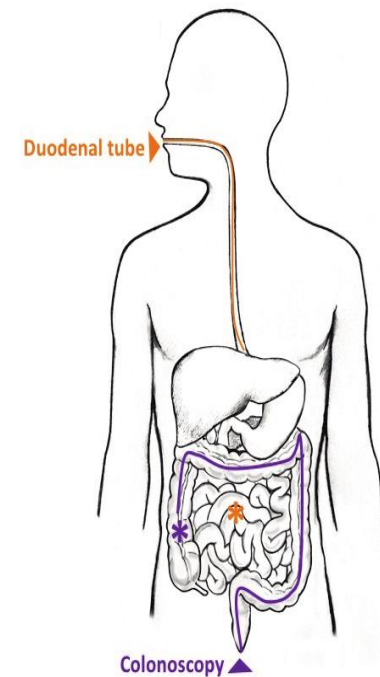
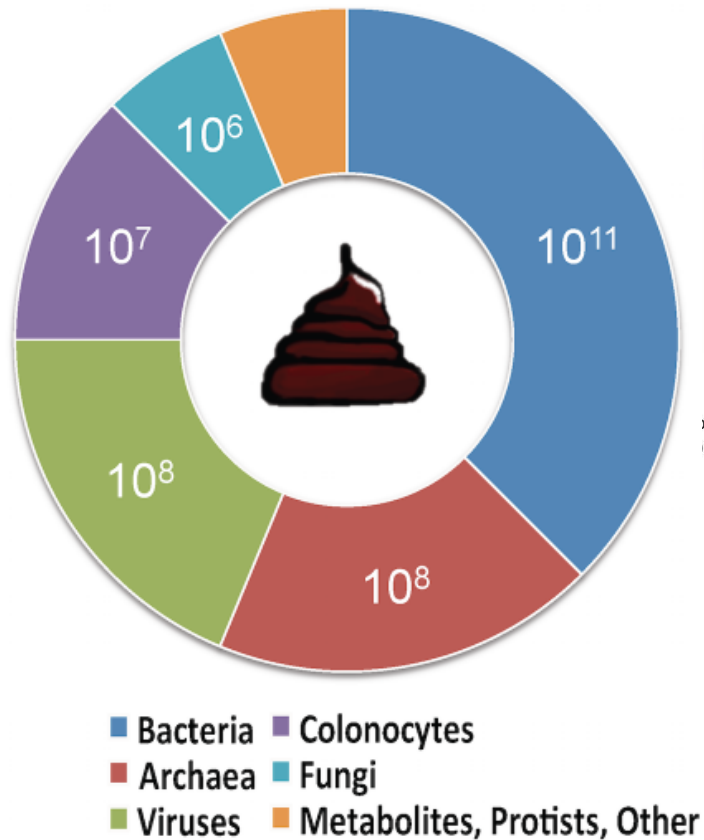
C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

218.253

218.126657068

Feces

# Komplexität des Metagenoms und damit des „Stuhltransplantats“



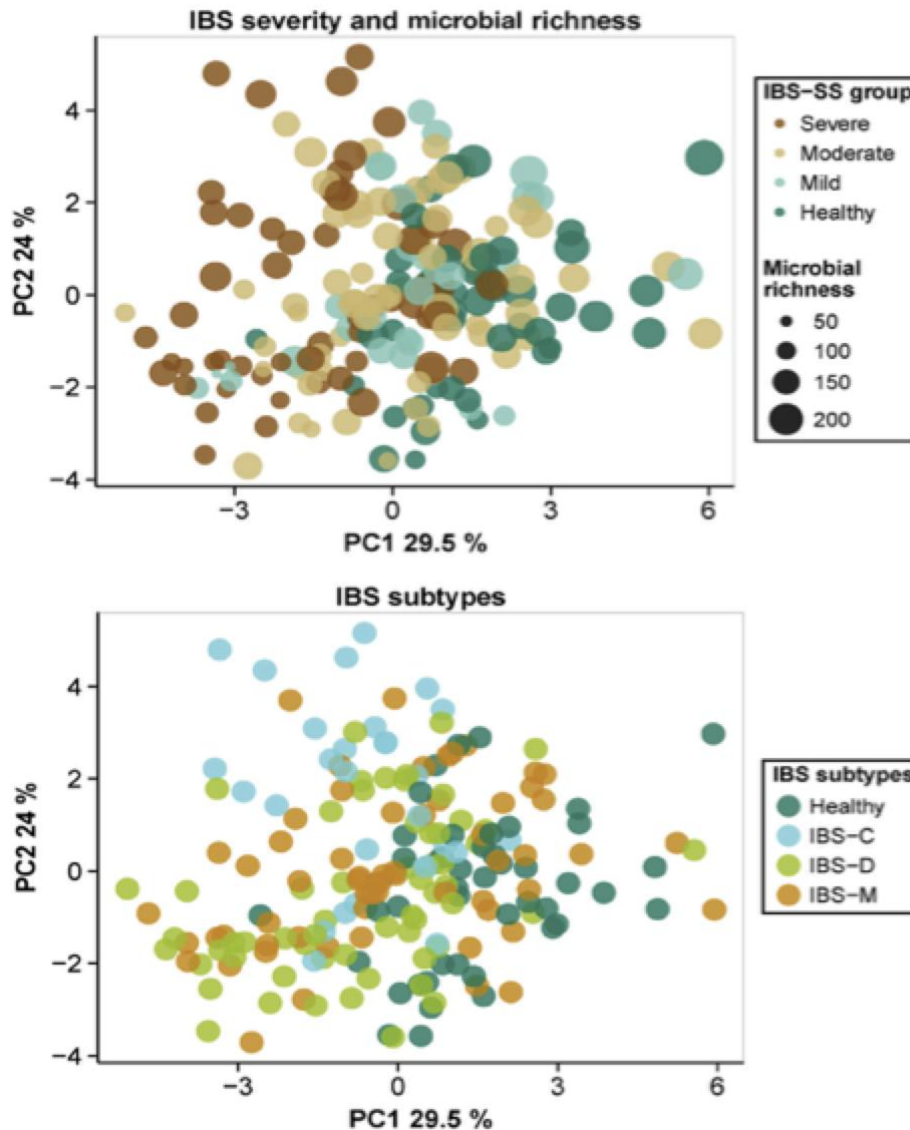
# Allogene Mikrobiota Rekonstitution bei IBS-D – Rationale 2014

Table 1 Microbiota alterations in irritable bowel syndrome

Sample type/method	Subjects recruited	Key finding	Ref.
Faecal microbiota (at 3 mo intervals)/Q-PCR (covering about 300 bacterial species)	IBS (27, Rome II Criteria; IBS-D = 12; IBS-C = 9; IBS-A = 6); Healthy Controls (22)	Decreased <i>Lactobacillus</i> spp in IBS-D; increased <i>Veillonella</i> spp in IBS-C; Differences in the <i>Clostridium coccooides</i> subgroup and <i>Bifidobacterium catenulatum</i> group between IBS patients and controls	[22]
Faecal microbiota/Q-PCR (10 bacterial groups), Culture, HPLC	IBS (26, Rome II / III; IBS-D = 8; IBS-C = 11, IBS-A = 7); Healthy Controls (26)	Higher counts of <i>Veillonella</i> and <i>Lactobacillus</i> in IBS vs controls; Higher levels of acetic acid, propionic acid and total organic acids in IBS vs controls	[52]
Faecal microbiota(0, 3, 6 mo)/Culture-based techniques, PCR-DGGE analysis	IBS (26, Rome II; IBS-D = 12; IBS-C = 9; IBS-A = 5); Healthy Controls (25)	More temporal instability in IBS group; No difference in the <i>bacteroides</i> , <i>bifidobacteria</i> , spore-forming bacteria, <i>lactobacilli</i> , <i>enterococci</i> or yeasts, Slightly higher numbers of coliforms as well as an increased aerobic:anaerobe ratio in IBS group	[23]
Faecal microbiota/DNA-based PCR-DGGE, RNA-based RT-PCR-DGGE	IBS (16, Rome II; IBS-D = 7; IBS-C = 6; IBS-A = 3); Healthy Controls (16)	Higher instability of the bacterial population in IBS compared to controls; Decreased proportion of <i>C. coccooides-Eubacterium rectale</i> in IBS-C	[24]
Faecal Microbiota/GC Fractionation, 16S ribosomal RNA gene cloning and clone sequencing, qRT-PCR	IBS (24, Rome II; IBS-D = 10; IBS-C = 8; IBS-A = 6); Healthy Controls (23)	Significant differences in phylotypes belonging to the genera <i>Coprococcus</i> , <i>Collinsella</i> and <i>Coprobacillus</i>	[20]
Faecal Microbiota/GC Fractionation, 16S ribosomal RNA gene cloning and clone sequencing, qRT-PCR	IBS (12, Rome II, All IBS-D); Healthy Controls (22)	Significant differences between clone libraries of IBS-D patients and controls; Microbial communities of IBS-D patients enriched in <i>Proteobacteria</i> and <i>Firmicutes</i> , reduced <i>Actinobacteria</i> and <i>Bacteroidetes</i> compared to control; Greater abundance of the family <i>Lachnospiraceae</i> in IBS-D	[26]
Faecal Microbiota/qRT-PCR	IBS (20, Rome II; IBS-D = 8; IBS-C = 8; IBS-M = 4); Healthy Controls (15)	Intestinal microbiota of the IBS-D patients differed from other sample groups; A phylotype with 85% similarity to <i>C. thermosuccinogenes</i> significantly different between IBS-D and controls/IBS-M; A phylotype with 94% similarity to <i>R. torques</i> more prevalent in IBS-D than controls; A phylotype with 93% similarity to <i>R. torques</i> was altered in IBS-M compared to controls; <i>R. bromii</i> -like phylotype altered in IBS-C comparison to controls	[244]
Faecal Microbiota/DGGE 16S rRNA	IBS (11, Rome II); Healthy Controls (22)	Biodiversity of the bacterial species was significantly lower in IBS than controls; presence of <i>B. vulgatus</i> , <i>B. ovatus</i> , <i>B. uniformis</i> and <i>Parabacteroides</i> sp. in healthy volunteers distinguished them from IBS	[31]
Faecal Microbiota/DGGE 16S rRNA, qRT-PCR	IBS (11, Rome II; Non-IBS pa-	IBS subjects had a significantly higher diversity <i>Bacteroides</i> -	[51]

- IBS Patienten können über die intestinale Bakterienflora differenziert werden
- IBS Patienten unterscheiden sich im Firmicutes : Bacteroides Verhältnis von der Referenzpopulation
- Heterogene Studienlage in Abhängigkeit von
  - Methodik
  - Studienpopulation





- IBS Patienten können über die intestinale Bakterienflora differenziert werden
- IBS Patienten unterscheiden sich im Firmicutes : Bacteroides Verhältnis von der Referenzpopulation
- Heterogene Studienlage in Abhängigkeit von
  - Methodik
  - Studienpopulation
- Aus aktueller Sicht differenzieren (bakterielle) Signaturen zwischen
  - Klinischer Ausprägung
  - Schwere der Symptomatik



## Fragen:

- Patienteninteresse?
  - kurzfristig hohes Interesse von > 20 Patienten mit IBS-D in der gastroenterologischen Ambulanz (aktuelle „Warteliste“ von 30 Patienten!)
- Sicherheit?
- Gesetzliche Regularien einer Allogenen Mikrobiota Rekonstitutionsstudie?
  - umfangreiche Konsultation BfArM, PEI und RKI
  - keine Festlegung der BOB
  - Entscheidung zur Konzeption einer „MPG“ Studie mit umfangreichen Monitoring, DSMB, Pharmakovigilanz, Verblindung, ....
- Finanzierung?
  - Programm Klinische Studien der DFG
  - SE 676/13-0

## Publizierte Nebenwirkungsrate

Effect	Number of patients	Overall % (N = 1190)
Abdominal distension/bloating/ cramping	28	2.35%
Flatulence	25	2.1%
Diarrhoea	23	1.93%
'Irregularity of bowel movements'	14	1.18%
IBS symptoms	13	1.09%
Constipation	13	1.09%
Abdominal pain/tenderness	11	0.92%
Fever	11	0.92%
Nausea	7	0.59%
IBD flare/deterioration	5	0.42%
Gram-negative bacteraemia	4	0.34%
Perforation/tear	3	0.25%
Belching	3	0.25%
Attributable death <sup>a</sup>	3	0.25%
Blood in stools	2	0.17%

IBS, irritable bowel syndrome; IBD, inflammatory bowel disease.

<sup>a</sup> This includes a case report<sup>85</sup> published since the search; therefore, this one case is not represented in the overall denominator figure (the percentage rate, however, remains unchanged by this addition).

- 
- Arzneimittel gemäß AMG §2
    - BOB: BfArM
    - Erlaubnisfreie Herstellung (AMG §67) nur im 1:1 individuellem Heilversuch durch Ärzte und zur Ausübung der Heilkunde bei Menschen befugten Personen gemäß § 13 Abs. 2b AMG und § 20d AMG
  - Indikationsstellung
  - Studien entsprechend den Regularien der Arzneimittelprüfung
  - Herstellung entsprechend den (Industrie-) Standards der Arzneimittelproduktion
  - Herstellungserlaubnis durch die zuständige Bezirksregierung
  - Qualitätssicherung entsprechend den Regularien der Arzneimittelherstellung

- Stuhlsuspension ausdrücklich nicht als Arzneimittel eingestuft!

Mitteilungen

1485

## Empfehlungen zur Anwendung der fäkalen Mikrobiotatransplantation „Stuhltransplantation“: Konsensus der Österreichischen Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie (ÖGGH) in Zusammenarbeit mit der Österreichischen Gesellschaft für Infektiologie und Tropenmedizin (OEGIT)

Recommendations for the use of faecal microbiota transplantation „stool transplantation“: consensus of the Austrian Society of Gastroenterology and Hepatology (ÖGGH) in cooperation with the Austrian Society of Infectious Diseases and Tropical Medicine

### Autoren

P. K. Kump<sup>1</sup>, R. Krause<sup>2</sup>, C. Steininger<sup>3</sup>, H. P. Gröchenig<sup>4</sup>, A. Moschen<sup>5</sup>, C. Madl<sup>6</sup>, G. Novacek<sup>7</sup>, F. Allerberger<sup>8</sup>, C. Högenauer<sup>1</sup>

### Institute

Die Institutsangaben sind am Ende des Beitrags gelistet.

az. Urheberrechtlich geschützt.

### Statement 3. Andere Indikationen

- ▶ Die Anwendung der FMT bei Patienten mit Colitis ulcerosa kann in einigen Fällen zu einer Verbesserung der Krankheitsaktivität führen. Da die Wirksamkeit durch Studien nicht sicher belegt ist und keine allgemein etablierten FMT-Protokolle vorhanden sind, sollten Colitis-ulcerosa-Patienten nur im Rahmen von klinischen Studien mittels FMT behandelt werden (*EL 4, RG C*)
- ▶ Der Einsatz der FMT zur Behandlung der rekurrenden *C.-difficile*-Infektion bei gleichzeitig bestehender chronisch-entzündlicher Darmerkrankung (CED) ist eine Therapiemöglichkeit, die außerhalb von klinischen Studien erfolgen kann. Die Therapieerfolge sind jedoch im Vergleich zu Patienten ohne CED geringer (*EL 4, RG C*)
- ▶ Andere mögliche Indikation zur therapeutischen Anwendung der FMT wie der Morbus Crohn, funktionelle Magen-Darmerkrankungen (inkl. Reizdarmsyndrom), metabolische Erkrankungen (inkl. Adipositas) oder Autoimmunerkrankungen sollten wegen fehlender Evidenz derzeit nur im Rahmen von klinischen Studien erfolgen (*EL 5, RG D*)

## Herstellung KASUISTIK

• Herstell

1. Die  
8901

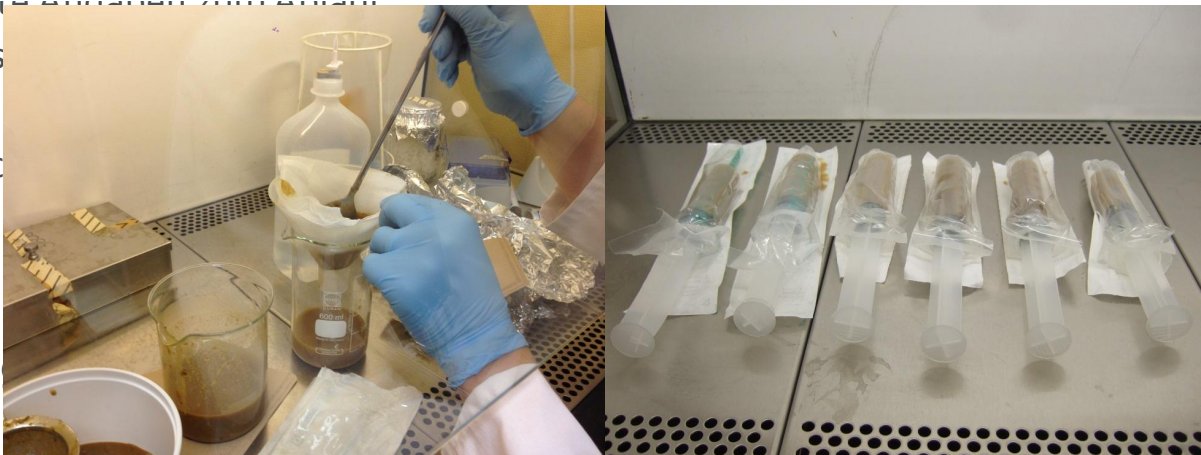
# Stuhltransplantation bei therapierefraktärer Clostridium-difficile-assoziiierter Kolitis

1.1 Es ist  
Stat  
abd  
vor  
die

Alexander Kleger, Jacqueline Schnell, Andreas Essig, Martin Wagner, Martin Bommer, Thomas Seufferlein, Georg Härter

- Frischen (< 6 Stunden) Spenderstuhl wiegen
- Für die koloskopische Applikation kann die gesamte Stuhlmenge verwendet werden
- Für die nasogastrale Applikation verwenden von etwa 30–50 g Stuhl
- Auflösen des Spenderstuhls in 250–500 mL (koloskopische Applikation) beziehungsweise 25–100 mL (nasogastrale Applikation) sterilem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung
- Homogenisieren der Lösung durch Rühren oder Schütteln
- Filtrieren der Suspension über Gaze oder Kaffeefilter oder 0,25-mm-Laborsiebe, um feste Bestandteile zu entfernen (insgesamt 2–3-mal)
- Aufziehen der Suspension in 50-mL-Spritzen und Aufbewahrung bei Raumtemperatur bis zur Applikation

- Anforder
- Detaillier
- Nachweis
- Als Arzt n
- Neueinric
- Schleuse
- Angaben
- Begehun



rdingerstr. 5,  
suspension ab.

; Ulm,  
nsion  
übungen  
die durch

einschließlich

## Investigator Brochure (IB) für eine Stuhlsuspension nach AMG

### 7.5 APPENDIX 2:

#### TABLE OF CONTENTS OF INVESTIGATOR'S BROCHURE (*Example*)

-	Confidentiality Statement (optional) .....
-	Signature Page (optional) .....
1	Table of Contents .....
2	Summary .....
3	Introduction .....
4	Physical, Chemical, and Pharmaceutical Properties and Formulation .....
5	Nonclinical Studies .....
5.1	Nonclinical Pharmacology .....
5.2	Pharmacokinetics and Product Metabolism in Animals .....
5.3	Toxicology .....
6	Effects in Humans .....
6.1	Pharmacokinetics and Product Metabolism in Humans .....
6.2	Safety and Efficacy .....
6.3	Marketing Experience .....
7	Summary of Data and Guidance for the Investigator .....

NB: References on      1. Publications  
                                 2. Reports

These references should be found at the end of each chapter


Appendices (if any)

## Investigational Medicinal Product Dossier nach AMG für die Stuhlsuspension und das Placebo (NaCl 0.9% / Glycerol 25% w/w)

das **Dossier zum Prüfpräparat** („Investigational Medicinal Product Dossier“, **IMPD**) mit folgendem Inhalt:

- a) Unterlagen über **Qualität** und **Herstellung**
- b) Unterlagen über die **pharmakologisch-toxikologischen Prüfungen** [Die Ergebnisse präklinischer Studien zur Pharmakokinetik, Sicherheitspharmakologie und Toxikologie sollen in einer Tabelle dargestellt sein. Eine Beispieltabelle findet sich auf den Seiten des BfArM unter:  
„[http://www.bfarm.de/clin\\_042/nn\\_671748/SharedDocs/FAQ/DE/Arzneimittel/klinPr/tox/2nz/at-amklinpr-tox2-faq20.html](http://www.bfarm.de/clin_042/nn_671748/SharedDocs/FAQ/DE/Arzneimittel/klinPr/tox/2nz/at-amklinpr-tox2-faq20.html)]
- c) **Entwurf der vorgesehenen Kennzeichnung des/der Prüfpräparates/e** entsprechend [§ 5 GCP-V](#)
- d) die **Herstellungserlaubnis** aller Hersteller mit Sitz in der EU oder dem EWR in Kopie,
- e) soweit zutreffend, die **Einfuhrerlaubnis** in die EU in Kopie
  - bei Importeuren mit Sitz im Geltungsbereich des AMG gemäß [§ 72 AMG](#),
  - bei Importeuren mit Sitz in einem anderen Mitgliedstaat der EU gemäß Artikel 13 Abs. 1 der [Richtlinie 2001/20/EG](#),zusätzlich zur Einfuhrerlaubnis ist ein von der sachkundigen Person des Importeurs unterzeichnetes **Zertifikat auf GMP-konforme Herstellung (GMP-Compliance)** einzureichen,
- f) Unterlagen über **Ergebnisse von bisher durchgeführten klinischen Prüfungen** sowie weitere bekannt gewordene klinische Erkenntnisse
- g) zusammenfassende **Nutzen-Risiko-Bewertung**



Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien	Voruntersuchungen
<p>Alter 21-35 Jahre Body Mass Index 19-25 kg/m<sup>2</sup> ausgefüllter Screeningfragebogen und unterschriebene Einwilligung</p>	<p>Alter &gt; 35 Jahre, Übergewicht/Adipositas (BMI &gt; 25) oder Mangelernährung, Raucher Regelmäßige Dauermedikation (ausgenommen Kontrazeptiva) Vorliegen einer Hepatitis-, HIV-Infektion; frische, aktive EBV/CMV-Infektion, infektiöse Darmerkrankungen (Viren, Bakterien, Würmer, ...) akute Diarrhoe in den letzten 4 Wochen frühere Typhus- oder Salmonelleninfektion in den <b>letzten 6 Monaten stattgefundene Reise in Länder mit niedrigem Hygienestandard und/oder erhöhtes Risiko für infektiöse Darmerkrankungen</b> Erhalt von Bluttransfusionen in der Vergangenheit Risikoverhalten wie häufig wechselnde Geschlechtspartner, kürzliche Tätowierung oder Piercings, Drogenkonsum, Gefängnisaufenthalt, ... anamnestisch bestehende Risikofaktoren für vCJD (Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit), Antibiotische Therapie in den letzten 3 Monaten, Anamnestisch regelmäßige abdominelle Beschwerden, Anamnestisch Stuhlnunregelmäßigkeiten in den letzten 6 Monaten, Chronische Diarrhoe oder chronische Obstipation, Sprachliche Barriere bei der Einwilligung Bei Frauen: bestehende Schwangerschaft Jegliches Vorliegen einer gastrointestinalen Erkrankung, z.B. chronisch-entzündliche Darmerkrankung, Sprue, Darmpolypen, Vorliegen eines Malignoms aktuell oder in der Vorgeschichte Vorliegen eines Reizdarmsyndroms Vorliegen von Diabetes mellitus, Übergewicht (BMI &gt;25) oder Metabolischem Syndrom Vorliegen einer neurologischen oder psychiatrischen Erkrankung Vorliegen eines chronischen Schmerzsyndroms (z.B. Fibromyalgie, Fatigue-Syndrom, ...) Vorliegen einer autoimmunen Erkrankung Vorliegen von Allergien und atopischen Erkrankungen</p>	<p><b>Blutuntersuchungen:</b> Differentialblutbild, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium), Kreatinin und Leberfunktionsparameter (Bilirubin, AST, ALT, GGT) Hepatitisserologie (Anti-HAV, anti-HBc, HBs-Ag, anti-HCV, Hepatitis E-IgG/IgM) HIV-Serologie (HIV-1,-2) HTLV-1/-2-Serologie CMV- und EBV-Serologie Syphilis-Serologie (Treponema pallidum) Toxoplasma-Serologie Strongyloides stercoralis Trichinella species</p>  <p><b>Stuhluntersuchungen:</b> Clostridium-difficile-PCR Stuhlkulturen auf Campylobacter spp., Shigellen, Salmonellen, Yersinien und darmpathogene E. coli (EHEC) Adeno-, Rota-, Astro- und Noroviren, Enteroviren Stuhlmikroskopie auf Parasiten/Wurmeier (beinhaltet Untersuchung auf Lamblien) Amöben Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora Blastocystis species Microsporidium Helicobacter pylori-Antigen Listeria monocytogenes</p>

„ Stuhlsender zu werden ist schwieriger, als in Harvard angenommen zu werden“, sagte Edelstein von OpenBiome

# AMIRA- Studie: AMR: Stuhlaufbereitung und Applikation



Stuhlprobe wird unter Zugabe von 5ml 0.9 % Kochsalzlösung / 1g Feuchtgewicht im autoklavierten Homogenisator aufgeschwemmt und homogenisiert



1. Zentrifugation: bei 300g / 1200rpm / 4°C / 10min → Sedimentation fester Bestandteile
2. Zentrifugation: bei 6000g / 5400rpm / 4°C / 30min, der Überstand wird abgenommen und die bakterienhaltige Interphase (Volumen ca. 5ml) für die weitere Aufbereitung abgenommen



Das Konzentrat wird mit 50% Glycerol und 0.9% NaCl Lösung auf ein Endvolumen von 10ml eingestellt und bei -80°C gelagert



Stuhllösung oder Kochsalzlösung wird über den Spülkatheter tief in das Duodenum appliziert

## Einschlusskriterien

- Alter 18-70 Jahre
- Vorliegen eines Reizdarmsyndroms vom Diarrhoe-dominanten Typ nach den ROM III- Kriterien
- Relevante Beschwerden und Symptome entsprechend einer reduzierten Lebensqualität nach den IBS-QOL Fragebogen (Score < 60 Punkte)
- Dauer der Beschwerden > 1 Jahr vor Studieneinschluss
- Anhaltende Beschwerden > 1 Jahr vor Studieneinschluss
- Keine wegweisenden Befunde in einer Gastroskopie und Koloskopie mit Stufenbiopsien, die innerhalb den letzten 2 Jahre durchgeführt worden seien müssen.

## Ausschlusskriterien

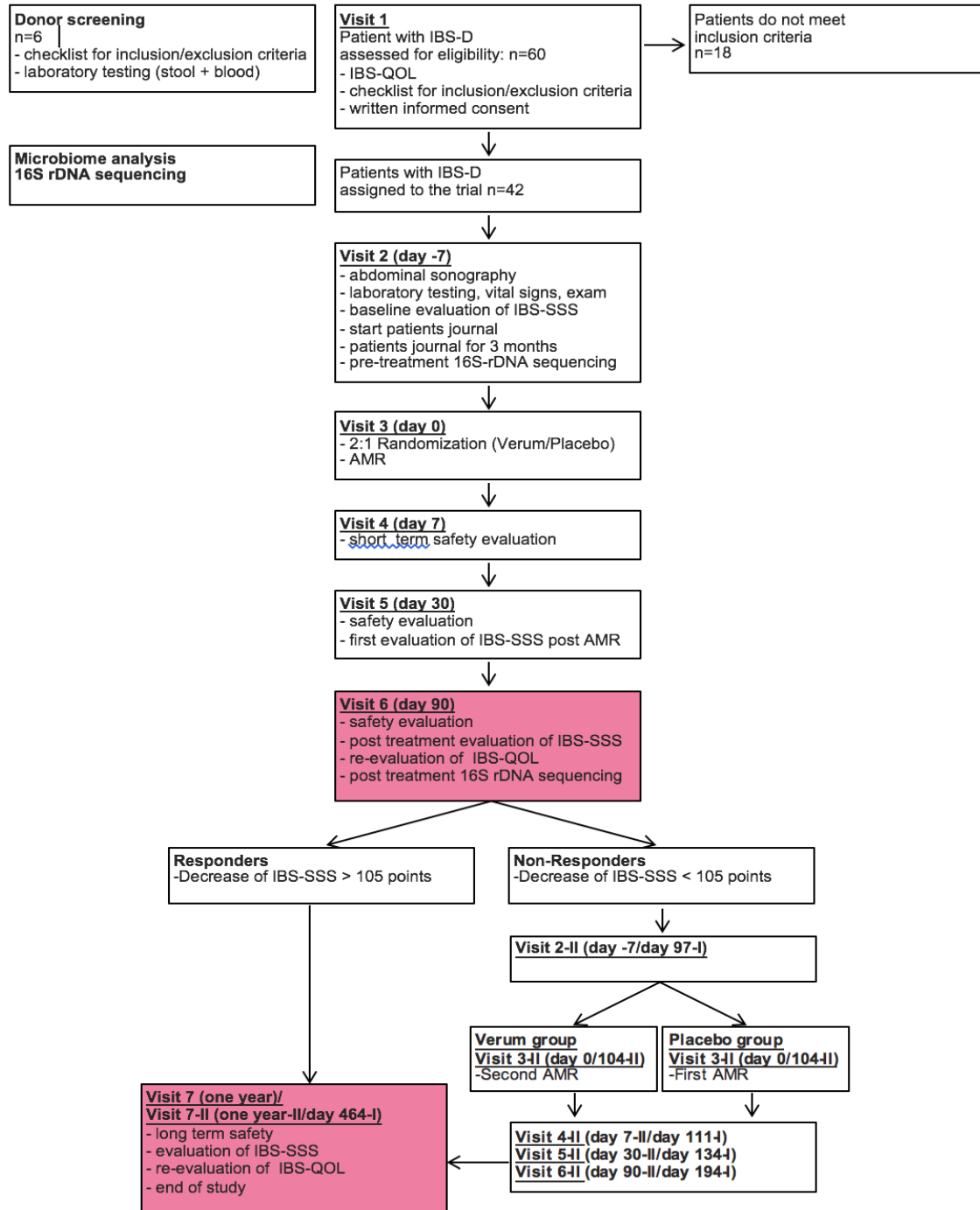
- Infektiöse Enteritiden
- Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
- Kollage/Lymphozytäre Kolitiden
- Sprue
- Chologene Diarrhoen
- Fruktose-/Glukoseintoleranz
- Neoplasien im Gastrointestinaltrakt
- Antibiotische Therapie in den letzten 3 Monaten
- Z.n. Operationen im Bereich des Abdomens
- Schwangerschaft, Demenz, etc.

## Primärer Endpunkt

- Verbesserung des Irritable Bowel Syndrome – Severity Scoring System (IBS-SSS) um **105 Punkte** bei Pat. mit RDS-D an **Tag 90 nach AMR** gegenüber dem Ausgangswert.

## Sekundäre Endpunkte

- **Sicherheit** (Follow up Visiten, Patiententagebuch)
- Verbesserung des **Irritable bowel Syndrome – Quality of life (IBS-QOL)** Fragebogens
- Erfassung von **Veränderungen und Akzeptanz** des **Spendermikrobioms nach AMR** (16S rRNA Sequenzierung und Evaluation der quantitativen Diversität)
- Korrelation der Übernahme des Spendermikrobioms mit der Verbesserung des IBS-SSS.



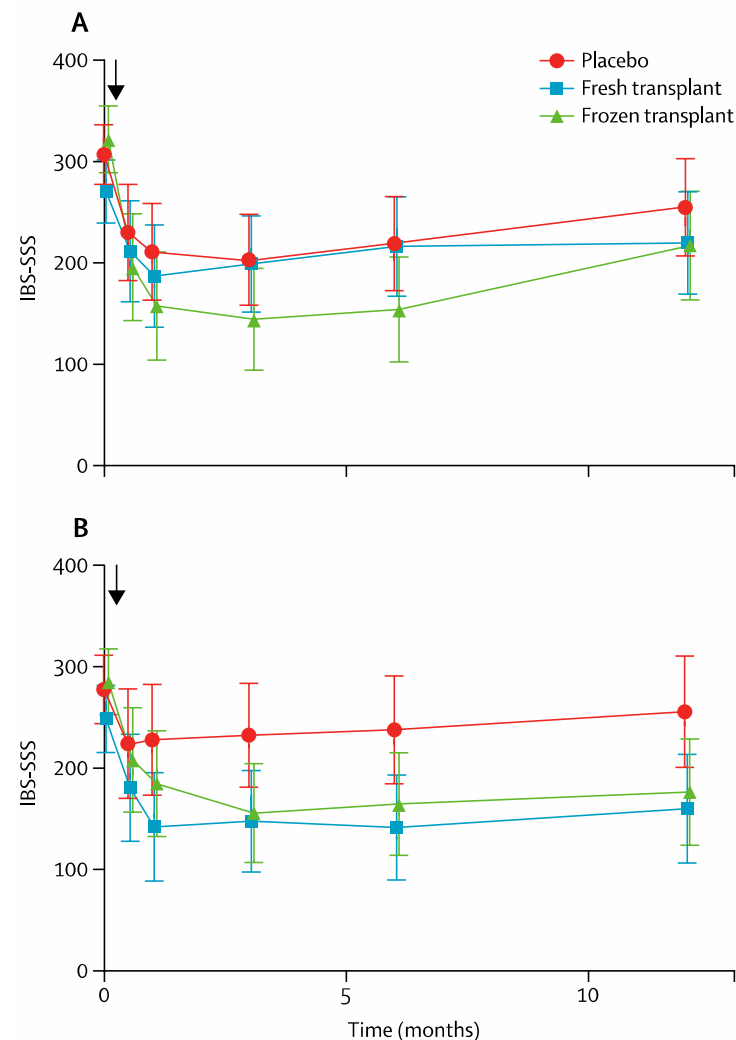
# Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial

Peter Holger Johnsen, Frank Hilpüsch, Jorunn Pauline Cavanagh, Ingrid Sande Leikanger, Caroline Kolstad, Per Christian Valle, Rasmus Goll

	Placebo (n=28)	Active (n=55)
Age (years)	45 (34 to 57)	44 (33 to 54)
Sex		
Women	19 (68%)	36 (65%)
Men	9 (32%)	19 (35%)
IBS subtype		
IBS with diarrhoea and constipation (mixed)	15 (54%)	24 (44%)
IBS with diarrhoea only	13 (46%)	31 (56%)
Time with IBS (years)	10 (6 to 16)	10 (5 to 19)
IBS-SSS at inclusion	278 (223 to 254)	260 (226 to 313)
Functional disorder comorbidity*	9 (32%)	14 (25%)
Total FODMAP before FMT (g/day)†	0.0 (-4.0 to 4.7)	0.0 (-6.9 to 4.9)

Data are median (IQR) or n (%). FODMAP=fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, and polyols. FMT=faecal microbiota transplantation. \*Self-reported by questionnaires at inclusion; includes fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, jaw pain, and pelvic pain. †Calculated from the 5-day dietary record. IBS=irritable bowel symptom. SSS=severity scoring system.

**Table 1: Baseline characteristics**











## **Studiendesign:**

- Prospektive, 2:1 randomisierte, oligozentrische, Placebo-kontrollierte, doppelblinde Interventionsstudie

## **Studienziel:**

- Evaluation einer allogenen Mikrobiom-Rekonstitution (AMR) als neue Therapieoption in der Behandlung von Patienten mit Diarrhoe-dominanten Reizdarmsyndrom (RDS-D) entsprechend den ROME III-Kriterien

## **Intervention:**

- gastroduodenale Mikrobiom-Infusion (Verum) / Glycerol-Kochsalzlösung (Placebo)
- Follow-up pro Patient: 3 Monate (doppelblind) gefolgt von 9 Monaten open-label Follow-up

## **Einschlusskriterien:**

- Patienten mit einem Diarrhoe-dominanten Reizdarmsyndrom entsprechend den ROME III Kriterien
- Symptombdauer mindestens 1 Jahr
- IBS-QOL < 60 points

## **Primärer Endpunkt:**

- Verbesserung des IBS-SSS um >105 Punkten bei Patienten mit RDS-D (dichotomes Outcome: ja/nein) an Tag 90 nach AMR (Visite 6) gegenüber dem Ausgangswert (Visite 2)

## **Sekundäre Endpunkte:**

- Sicherheit, Verbesserung des IBS-QOL, Erfassung von Veränderungen und Akzeptanz des Spendermikrobioms nach AMR (16S rDNA-Sequenzierung und Evaluation der quantitativen Diversität), Korrelation der Übernahme des Spendermikrobioms mit der Verbesserung des IBS-SSS

## Statistik:

- Primärer Endpunkt:
  - Wirksamkeit der AMR versus Placebo durch Verbesserung des IBS-SSS um  $> 105$  Punkte gegenüber dem Ausgangswert (dichotomes Ereignis), Chi-Quadrat-Test (zweiseitig, Signifikanzlevel 5%)
  - Explorative logistische Regressionsanalyse zur Untersuchung der Kovariablen Spender und Zentrum
- Sekundäre Endpunkte:
  - Deskriptive Statistik, explorative Analyse durch entsprechende statistische Tests (u.a. Mann-Whitney U-Test, t-Test, Chi-Quadrat-Test)
- Fallzahlschätzung:
  - Geplantes Screening:  $n=60$
  - Studieneinschluss, ITT-Kollektiv:  $n=42$
  - Per Protocol-Kollektiv:  $n=33$





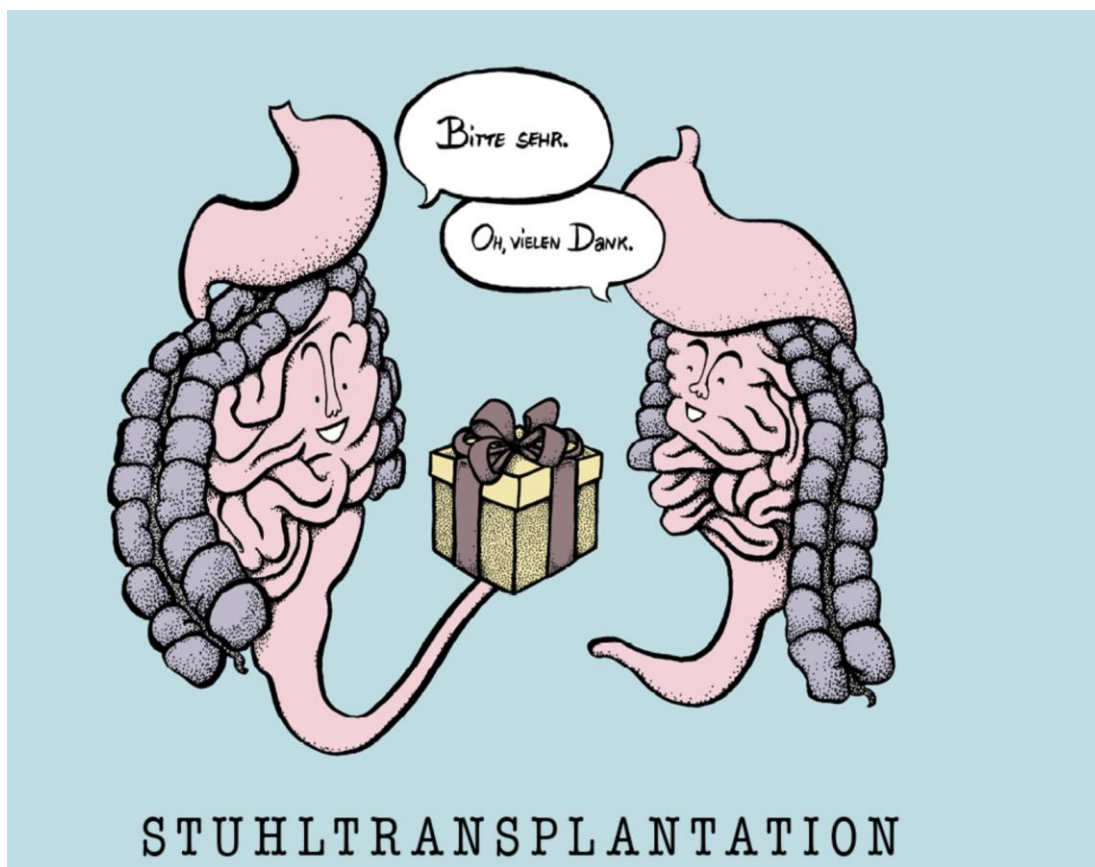
Abdominale Schmerzen und Unwohlsein verbunden mit:

- veränderten Stuhlgewohnheiten > 3 Monaten (2-3 Tagen)
- Fehlen struktureller Abnormalitäten

Assoziiert mit <2 der folgenden Parameter:

- Besserung der Beschwerden mit Stuhlentleerung
- Beschwerdebeginn mit Veränderung der Stuhlfrequenz
- Beschwerdebeginn mit Veränderung der Stuhlkonsistenz

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit !





# Zubereitung der Suspension

## Materialpräparation

- Frischen (< 6 Stunden) Spenderstuhl wiegen
- Für die koloskopische Applikation kann die gesamt Stuhlmenge verwendet werden
- Für die nasogastrale Applikation Verwenden von etwa 30–50 g Stuhl



# Zubereitung der Suspension

KASUISH



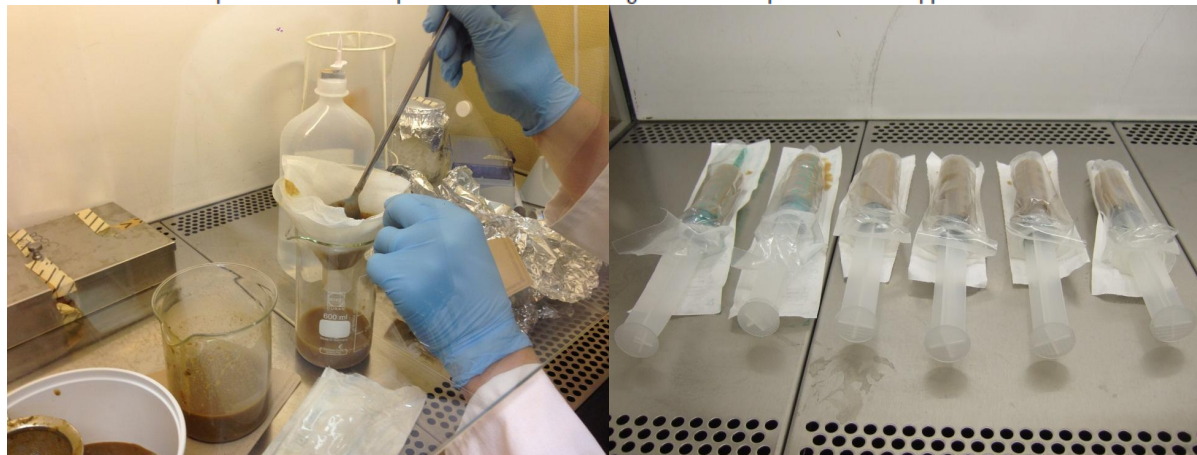
UNIVERSITÄTS  
KLINIKUM  
ulm

## Stuhltransplantation bei therapierefraktärer Clostridium-difficile-assoziiierter Kolitis

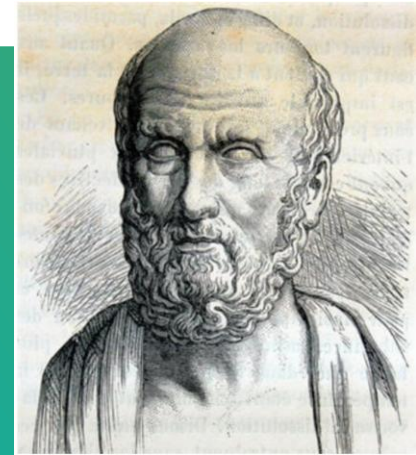
Alexander Kleger, Jacqueline Schnell, Andreas Essig, Martin Wagner, Martin Bommer, Thomas Seufferlein, Georg Härter

### Materialpräparation

- Frischen (< 6 Stunden) Spenderstuhl wiegen
- Für die koloskopische Applikation kann die gesamt Stuhlmenge verwendet werden
- Für die nasogastrale Applikation Verwenden von etwa 30–50 g Stuhl
- Auflösen des Spenderstuhls in 250–500 mL (koloskopische Applikation) beziehungsweise 25–100 mL (nasogastrale Applikation) sterilem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung
- Homogenisieren der Lösung durch Rühren oder Schütteln
- Filtrieren der Suspension über Gaze oder Kaffeefilter oder 0,25-mm-Laborsiebe, um feste Bestandteile zu entfernen (insgesamt 2–3-mal)
- Aufziehen der Suspension in 50-mL-Spritzen und Aufbewahrung bei Raumtemperatur bis zur Applikation



## Mikrobiom in der Praxis – Wann ist ein Stuhltransfer indiziert?

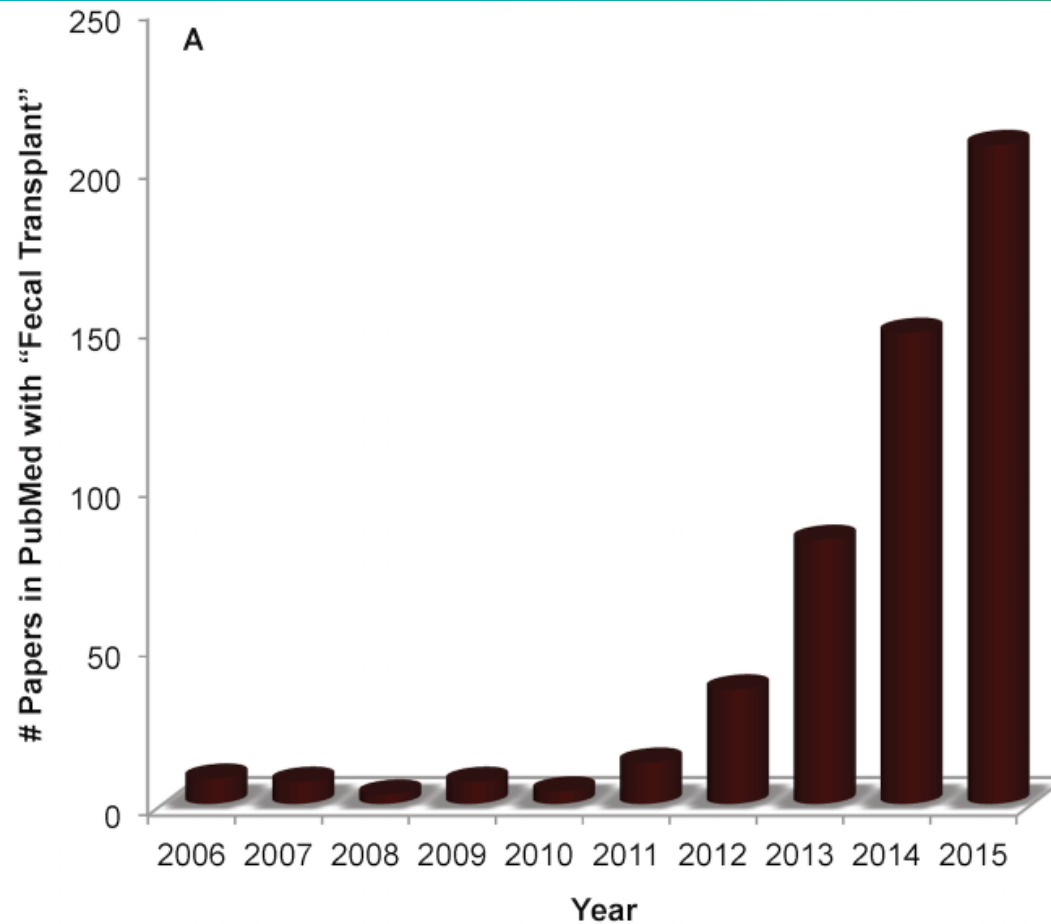


IMMER  
den

„.....alle Krankheiten beginnen im Darm....“

Hippokrates

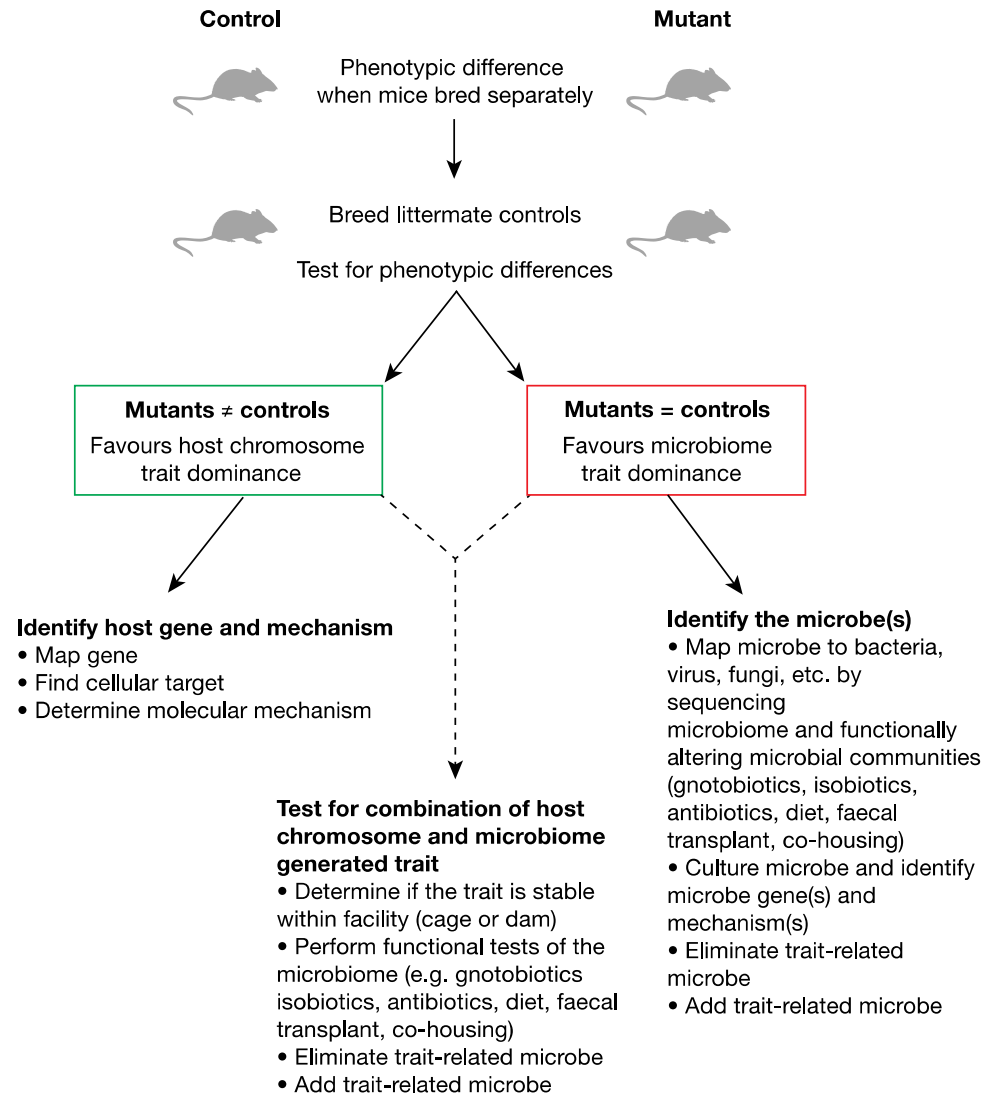
# Stuhltransplantation „immer“



## Übersicht

- Das Reizdarmsyndrom
- Die Mikrobiom-Analyse
- Bisherige Erfahrungen mit Stuhltransplantationen beim Reizdarmsyndrom
- Studiendesign
- Studienziel
- Auswahl der Spender und der Patienten
- Allogene Mikrobiota Rekonstitutionstherapie: Stuhlaufbereitung und Applikation

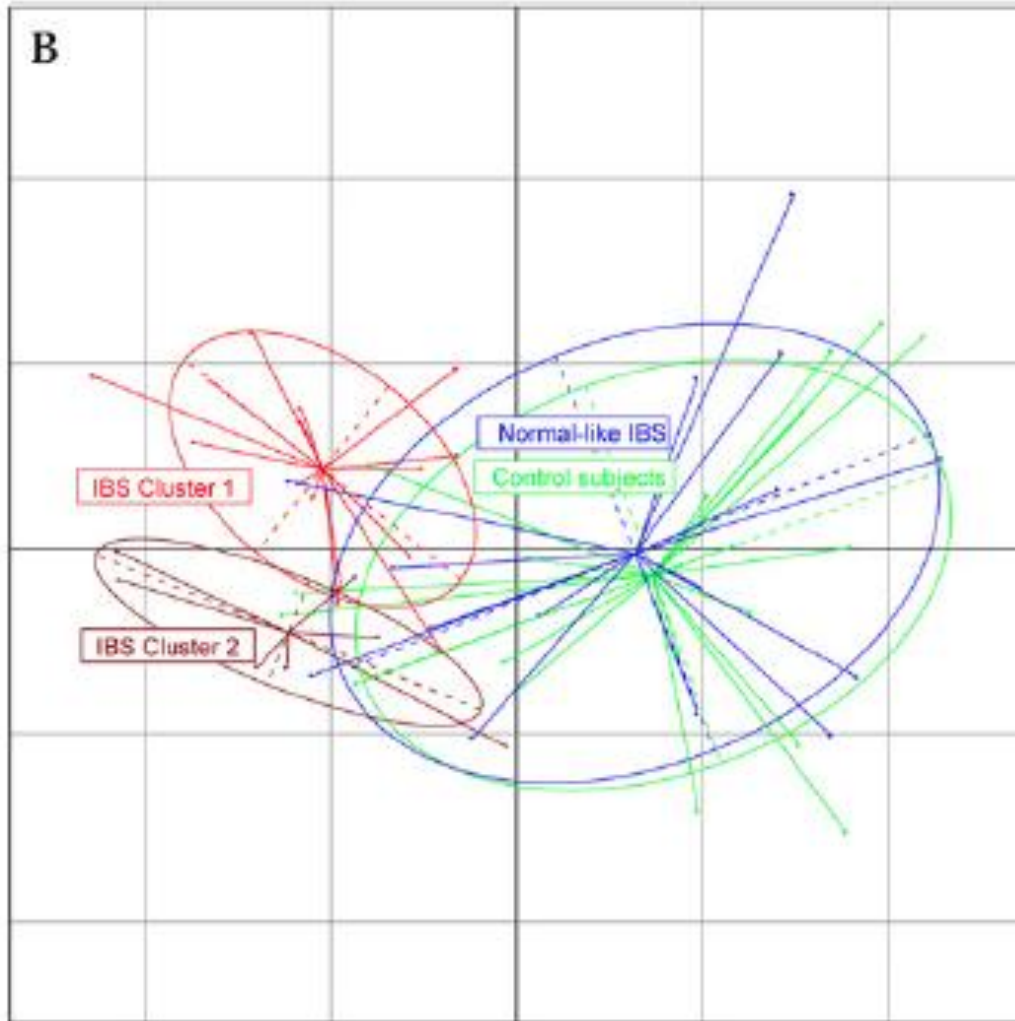
# Komplexität des Metagenoms – Grundlagenwissenschaft







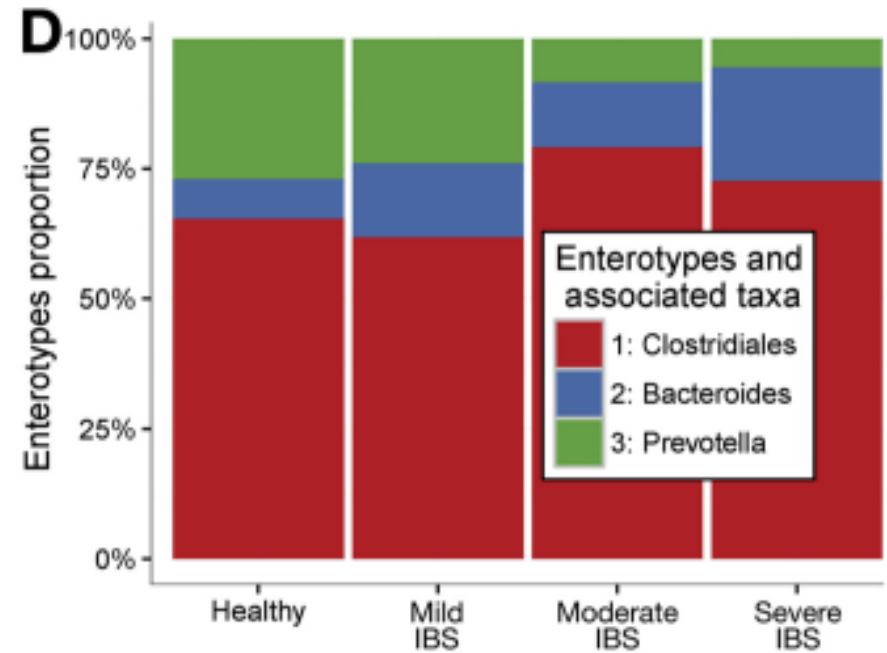
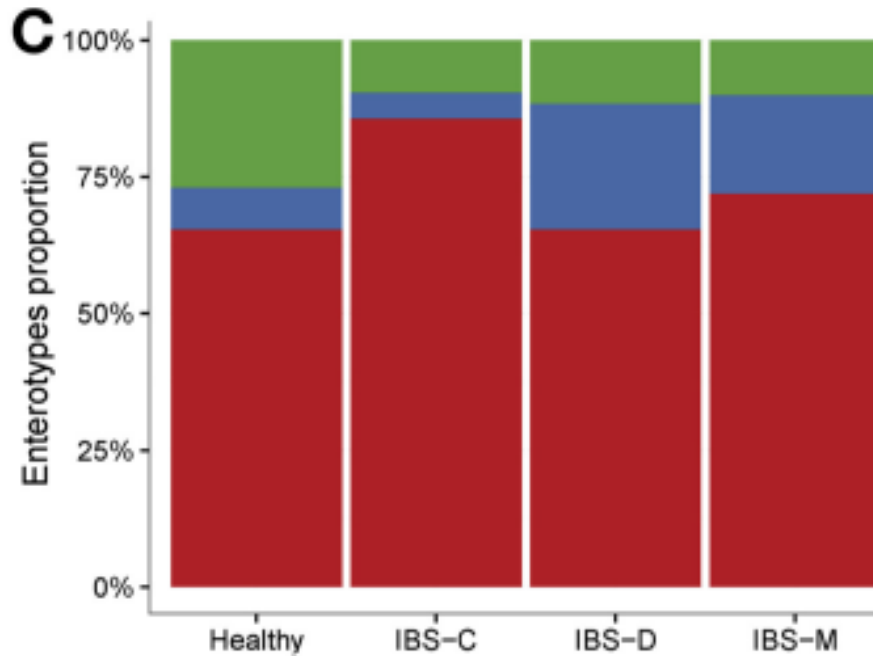
# Allogene Mikrobiota Rekonstitution bei IBS-D – Rationale 2012

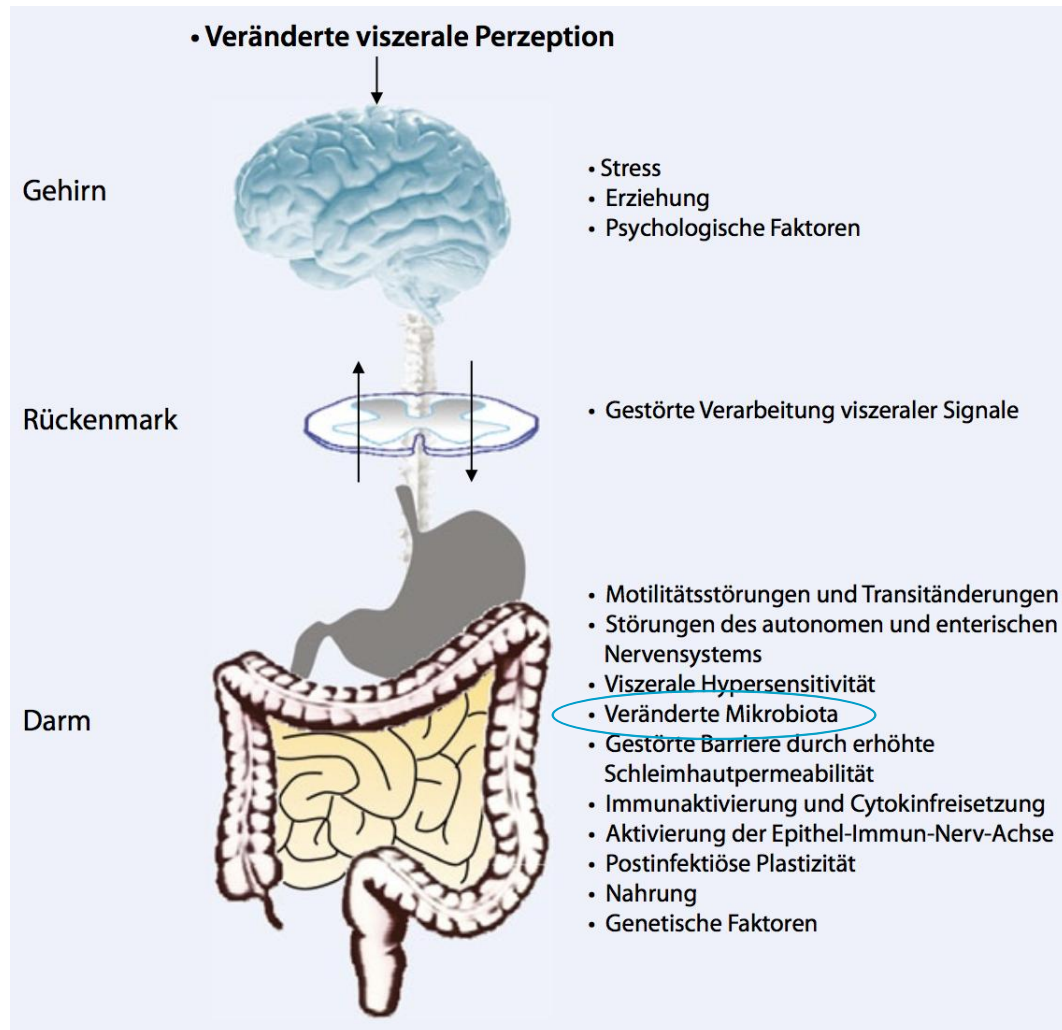


- IBS Patienten können über die intestinale Bakterienflora differenziert werden
- IBS Patienten unterscheiden sich im Firmicutes : Bacteroides Verhältnis von der Referenzpopulation

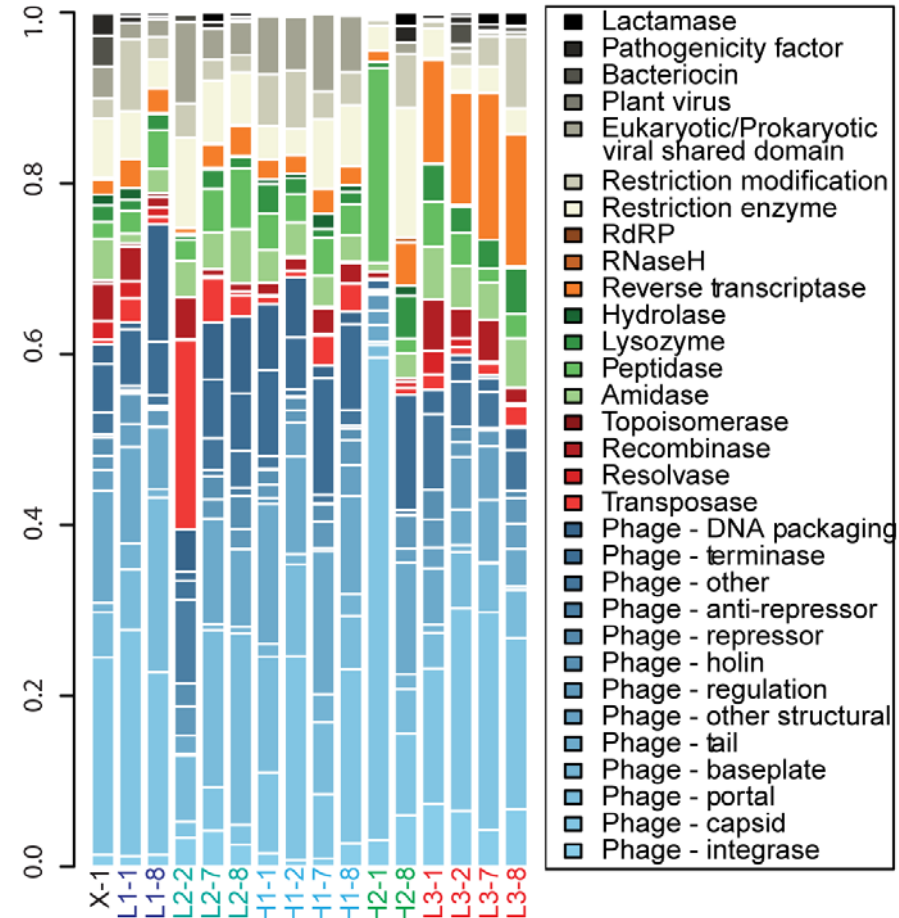
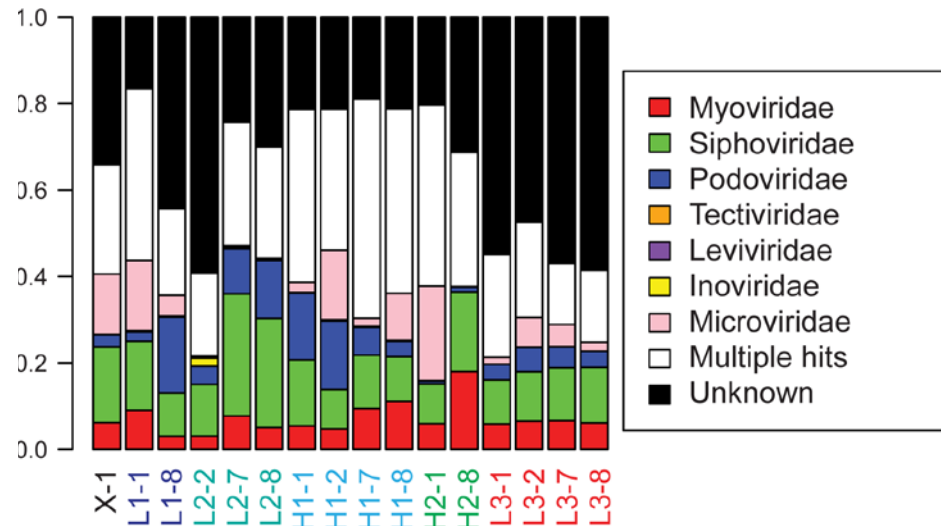


# Enterotypen bei Reizdarmpatienten - zufällige Assoziationen



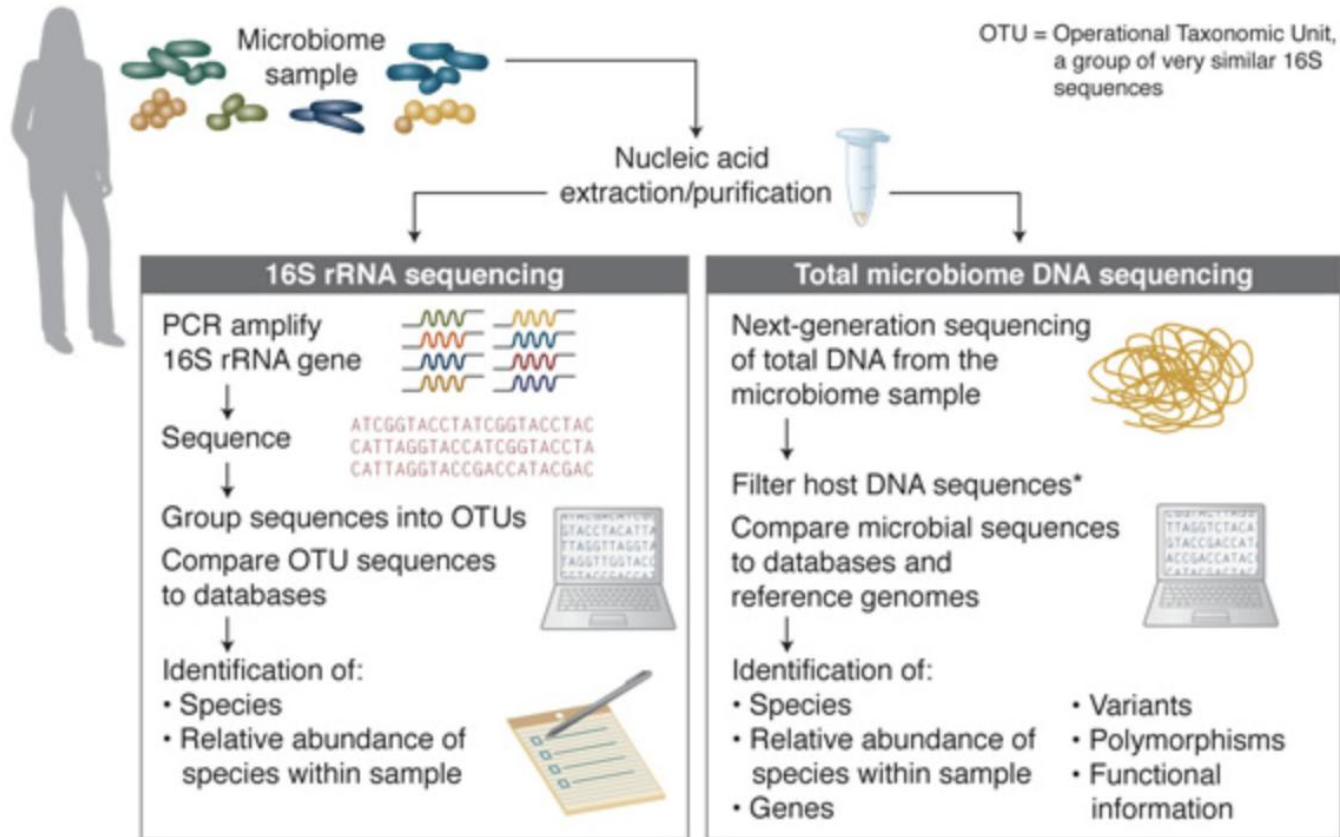


# Gut virome characterization



Also found 22 CRISPR arrays, one example of CRISPR spacer targeting another virus in the same individual





**WHO Definition:** „Probiotika sind lebende Mikroorganismen, welche ... einen Gesundheitseffekt auf den Wirt haben.“

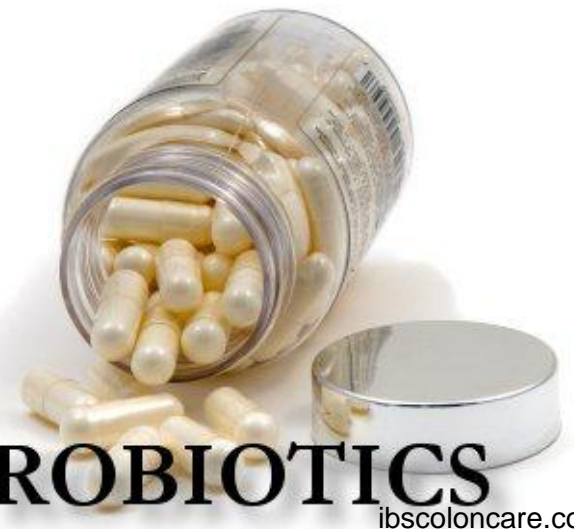
Dazu zählen z.B. *E. coli* Nissle, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*

## Probleme

Kolonisationsresistenz

Probiotika sind kommensale Bakterien

- Remissions-Therapie bei UC (*E. coli* Nissle)  
(Kruis, Gut, 2004)
- Allergie-Prävention bei Kaiserschnitt-geborenen Kindern  
(Kuitunen, J Allergy Clin Immunol, 2009)
- Unterstützende Therapie bei Rotavirus-Infektionen (Kinder)  
(Moreno Muñoz Appl Environ Microbiol, 2011)
- Therapie bei Frühchen mit NEC (necrotizing enterocolitis)  
(Ganguli K, J Clin Gastroenterol. 2011)
- Puchitis nach Kolonrekonstruktion  
(Gionchetti, Gastroenterol., 2003)



**PROBIOTICS**  
ibscoloncare.com



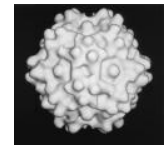
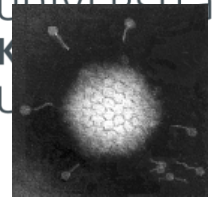
# The Human Virome

## Persistent/latent infections

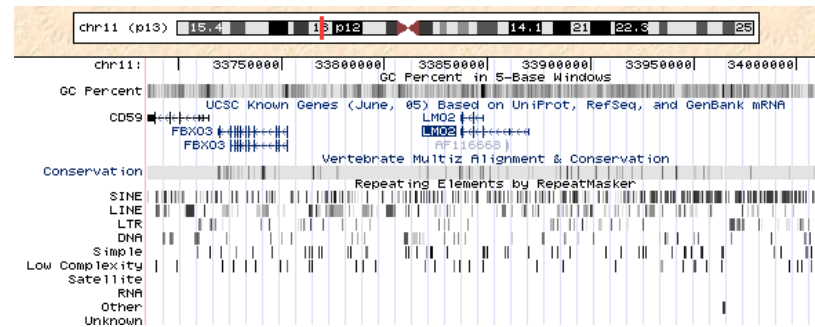
Virus	% of population seropositive
EBV	100%
VZV	95%
Herpes simplex	80%
HSV1	68%
Papilloma	60%
CMV	59%
HSV2	22%
HIV	1%
HCV	1%



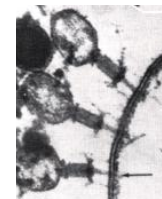
## Transient infections with animal cell viruses



## Endogenous retroviruses 8% of human DNA

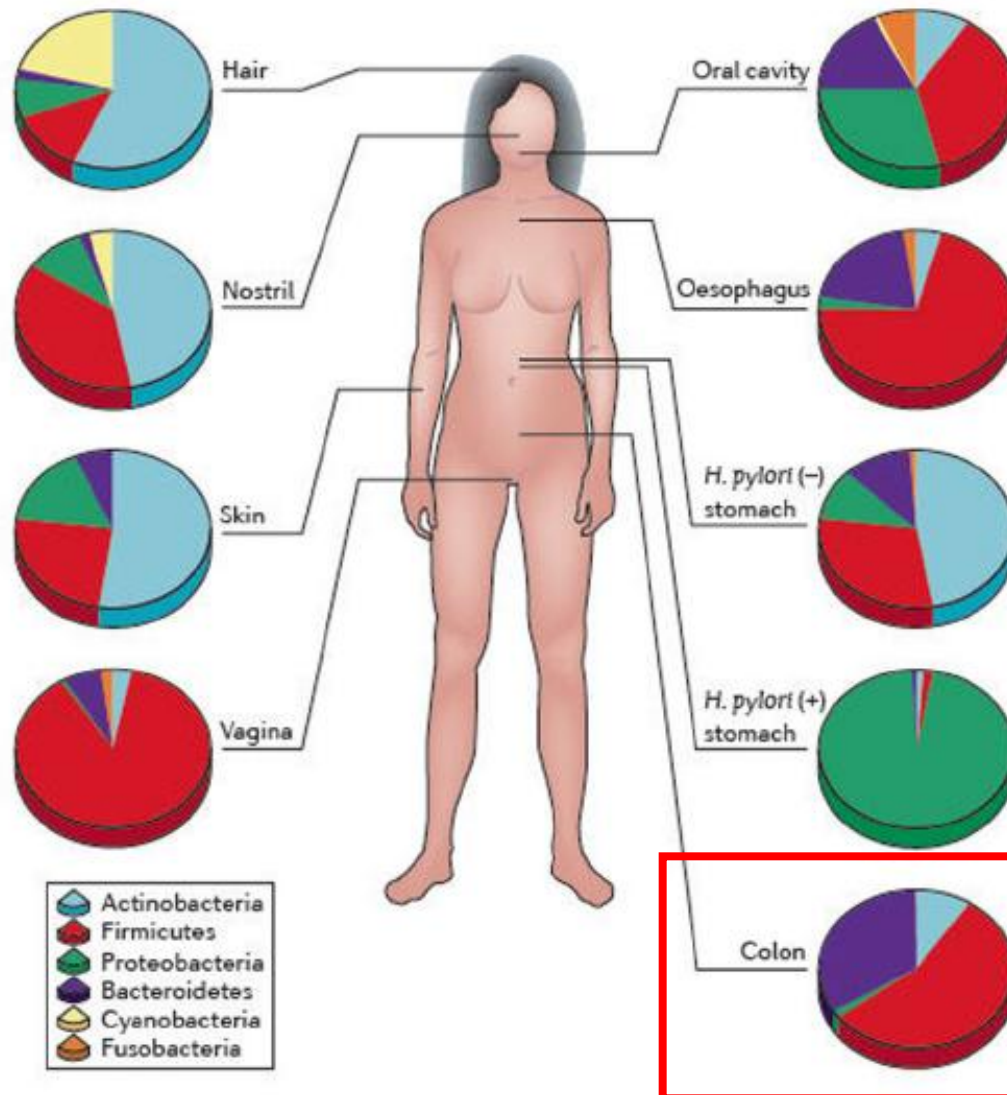


## Bacteriophage predators of bacteria and archaea



$10^{10}$ - $10^{11}$   
per gram  
of stool

# Biotop Mensch - Metagenom



- das “vergessene Organ”
- ca.  $10^{14}$  Bakterien (Viren, Hefen, Protozoen...)
- 3.3 Millionen nicht redundante Gene
- 150x komplexer im Vergleich zum Humanen Genom
- nur im Bruchteil kultivierbar