

Ο ρόλος του ανθρώπινου μικροβιώματος του γαστρεντερικού συστήματος σε ασθενείς με λοίμωξη από *Clostridium difficile*

Ελευθέριος Τσινταράκης, Μελανία Καχριμανίδου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας Σχολής Επιστημών Υγείας Τμήματος Ιατρικής
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης



Περίληψη

Το ανθρώπινο σώμα αποικίζεται από μικρόβια τουλάχιστον 10 φορές περισσότερα από τον αριθμό των κυττάρων του, η πλειοψηφία των οποίων ανευρίσκεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε συνθήκες υγείας και ασθένειας. Η μικροβιακή χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες του ξενιστή και κυρίως στην αντίσταση αποικισμού του εντέρου σε ευκαιριακά παθογόνα όπως το *Clostridium difficile* προλαμβάνοντας τη λοίμωξη.

Τα αντιβιοτικά προκαλούν σημαντικές και μακροχρόνιες επιδράσεις στη χλωρίδα του εντέρου, μεταβάλλοντας την σύνθεση της, διαταράσσονται οι ωφέλιμες λειτουργίες που επιτελεί, με συνέπεια την μείωση της αντίστασης αποικισμού σε παθογόνους μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του *C. difficile*. Η λοίμωξη από *C. difficile* (CDI) αποτελεί μια ιδιαίτερη στην αντιμετώπιση λοίμωξη διότι ο μικροοργανισμός σχηματίζει σπόρους που είναι δύσκολο να εξλειφθούν και ευθύνονται για υποτροπιάζουσες λοιμώξεις. Η CDI σχετίζεται με την απομάκρυνση

μικροβιακών πληθυσμών του εντέρου που είτε δρουν προστατευτικά έναντι του αποικισμού από το παθογόνο, είτε αυξάνουν την ευαισθησία στη λοίμωξη. Η αποκατάσταση της εντερικής μικροχλωρίδας με μεταμόσχευση εντερικού περιεχομένου από υγιή δότη αποτελεί αποτελεσματική και ασφαλή θεραπεία για τη λοίμωξη από *C. difficile*. Η ταυτοποίηση των συμβιωτικών βακτηρίων της γαστρεντερικής οδού που είναι ικανά να παρέχουν προστασία έναντι του *C. difficile*, θα μπορούσε στο μέλλον να οδηγήσει στη χρήση αυτών για την καταπολέμηση και την πρόληψη της λοίμωξης. Η παρούσα ανασκόπηση στοχεύει να εστιάσει στα νεότερα δεδομένα στη μελέτη των μικροχλωρίδων του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου, να καταδείξει τις συσχετίσεις της εντερικής μικροχλωρίδας με τη φυσιολογική λειτουργία αλλά και με παθολογικές καταστάσεις όπως η λοίμωξη από *C. difficile*.



Λέξεις κλειδιά

Μικροβίωμα, λοίμωξη, *Clostridium difficile*, έντερο

Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Ελευθέριος Τσιντάρακης,

Κομνητών 60,

TK 68 100,

Τηλ.: 6977191563

E-mail: tsintarakis@windowslive.com

1. Εισαγωγή

Η μελέτη της ανθρώπινης μικροχλωρίδας έχει κερδίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον την τελευταία δεκαετία με την ανάπτυξη νέων τεχνικών μοριακής βιολογίας και βιοπληροφορικής.

Το σύνολο των μικροοργανισμών σε συγκεκριμένο φυσικό περιβάλλον αποτελεί την μικροχλωρίδα (microbiota ή microflora). Ένας τεράστιος αριθμός μικροοργανισμών, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι βακτηριακά είδη, αποικίζουν και σχηματίζουν πολύπλοκες κοινότητες στο δέρμα, στις βλεννογόνιες επιφάνειες και στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, όπου και ανευρίσκεται η πλειοψηφία αυτών.¹ Εκτιμάται ότι η μικροβιακή χλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα αποτελείται από 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς (10^{14} μικρόβια), η μεγάλη πλειοψηφία των οποίων βρίσκεται στο παχύ έντερο, όπου ο πληθυσμός τους προσεγγίζει τα 10^{11} - 10^{12} κύτταρα/ml, ο μεγαλύτερος που καταγράφηκε για οποιοδήποτε μικροβιακό οικοσύστημα.² Η ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες του ξενιστή, όπως η επεξεργασία τροφίμων, η ρύθμιση της ανάπτυξης του εντερικού επιθηλίου, η ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, η σύνθεση βασικών βι-

ταμινών και η προστασία από παθογόνους παράγοντες.³⁻⁶ Η χορήγηση αντιβιοτικών έχει καθοριστική σημασία για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων, αλλά ταυτόχρονα διαταράσσει την ισορροπία των βακτηρίων του εντέρου και συνεπώς τις ωφέλιμες λειτουργίες που επιτελούν.⁷⁻⁹ Στην πραγματικότητα η χρήση αντιβιοτικών έχει συσχετιστεί με βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες μεταβολές στην εντερική μικροχλωρίδα, μειώνοντας την αντίσταση αποικισμού σε ευκαιρικά παθογόνα όπως το *C. difficile*.^{7,10-13}

Η παρούσα ανασκόπηση θα επιχειρήσει να παρουσιάσει τις νεότερες εξελίξεις στη μελέτη της μικροβιακής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου, να καταδείξει τις συσχετίσεις της με τη φυσιολογική λειτουργία αλλά και με παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η λοίμωξη από *C. difficile*.

2. Μικροχλωρίδα του εντέρου

Ως μικροχλωρίδα (gut microbiota) του εντέρου ορίζεται το σύνολο των μικροοργανισμών που διαβιούν στο έντερο και αποτελείται από μέλη βακτηρίων, φάγων, μυκήτων και ευκαρυωτικών μικροοργανισμών. Ενώ το μικροβίωμα (gut microbiome) του εντέ-

ρου συνίσταται στο σύνολο των γονιδίων των μικροβίων της εντερικής μικροχλωρίδας ενός ατόμου και το περιβάλλον στο οποίο αλληλεπιδρούν.¹⁴⁻¹⁵ Οι διαταραχές στο μικροβίωμα του εντέρου έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και η νόσος του Crohn.¹⁶⁻¹⁹ Η ποικιλομορφία και η αφθονία της ανθρώπινης μικροβιακής χλωρίδας και ειδικότερα αυτής του εντέρου, αποτελεί πρόκληση για τους ερευνητές που διερευνούν τις αλλαγές στην σύνθεση της με την πάροδο του χρόνου. Οι κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροβίων σε θρεπτικά υποστρώματα και αποτελούσαν τον κύριο πυρήνα της μικροβιολογίας για έναν αιώνα, έχουν αποκαλύψει μόνο μια μειοψηφία των ειδών που βρίσκονται στο έντερο.²⁰⁻²¹ Ωστόσο, προκύπτει η ανάγκη ανάπτυξης συγχρόνων ποιοτικών και ποσοτικών τεχνικών στις οποίες δεν απαιτείται καλλιέργεια και απομόνωση των μικροβίων. Οι τεχνικές αυτές αρχικά βασίζονταν σε μεθόδους DNA υβριδισμού και PCR. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η χρησιμοποίηση της μεθόδου ταξινόμησης των μικροβίων βάσει της αλληλουχίας του 16S rRNA. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου επέτρεψε λεπτομερή περιγραφή της σύνθεσης των μικροχλωρίδων και ιδιαίτερα εκείνης του εντέρου.^{14,22} Το γονίδιο αυτό είναι παρόν σε όλα τα βακτήρια και διαθέτει τόσο σταθερές, όσο και μεταβλητές περιοχές (V1-V9). Οι σταθερές περιοχές χρησιμοποιούνται για την κατάταξη των βακτηρίων σε επίπεδο γένους, ενώ οι μεταβλητές περιοχές για την κατάταξη σε επίπεδο είδους. Η συγκεκριμένη μοριακή τυποποίηση είναι ιδιαίτερα πολύτιμη για βακτήρια που αναπτύσσονται αργά, είναι βιοχημικά αδρανή ή απαιτούν λεπτούς και ειδικούς χειρισμούς για την ταυτοποίησή τους. Πιο πρόσφατα, η ανάπτυξη ταχύτερων και πιο εξελιγμένων μεθόδων προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, όπως είναι η αλληλούχηση νέας γενεάς (Next Generation Sequencing) και η επεξεργασία του πλήθους των δεδομένων με προγράμματα βιοπληροφορικής επιτυγχάνει τη μελέτη των μικροβιακών πληθυσμών κατευθείαν από το περιβάλλον τους χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας και απομόνωσης. Η μεταγονιδιωτική αυτή ανάλυση είναι σημαντική για την ανάλυση των μικροβίων απευθείας από το περιβάλλον τους, παρέχοντας πληροφορίες για την νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων από το σύνολο του γονιδιώματος της μικροχλωρίδας και την αναγνώριση του βιολογικού ρόλου των μικροχλωρίδων τόσο στη φυσιολογική όσο και στη νοσηρή κατάσταση στον άνθρωπο.¹⁴ Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι δίνει πληροφορίες για τη σύνθεση της μικροχλωρίδας και συγχρόνως για το σύνολο των γονιδίων των μικροβίων που υπάρχουν σε αυτή. Στα μειονεκτή-

ματα αυτής της τεχνικής περιλαμβάνονται το κόστος, η ανάγκη εξελιγμένων υπολογιστικών συστημάτων και λογισμικού και ειδικευμένο προσωπικό στη βιοπληροφορική ανάλυση. Η έρευνα για το ανθρώπινο μικροβίωμα συμπληρώνεται και από μεθόδους για το χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών (πρωτεωμική ανάλυση) και των μεταβολικών διαδικασιών (μεταβολωμική ανάλυση) επιτυγχάνοντας όχι μόνο τη μελέτη της σύνθεσης των μικροχλωρίδων, αλλά και τη μελέτη μεταβολικών λειτουργιών, την αλληλεπίδραση μικροβίων μεταξύ τους και με τον ξενιστή, καθώς και των παραγόντων που επιδρούν στη διατήρηση των μικροχλωρίδων.^{20,21} Οι μέχρι τώρα μελέτες που έχουν γίνει, ή βρίσκονται σε εξέλιξη, αφορούν κυρίως στη μελέτη του μικροβιώματος του εντέρου. Όσον αφορά την κατάταξή τους με βάση το φύλο, την πλειοψηφία αποτελούν τα φύλα Firmicutes και Bacteroides, όπου πάνω από το 80% των αναγνωρισμένων φυλότυπων ανήκουν σε αυτά τα δύο φύλα. Την μειοψηφία αποτελούν τα φύλα Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota και Fusobacteria.¹⁴ Στο ανθρώπινο παχύ έντερο είναι άφθονα τα Bacteroides και ιδιαίτερα άφθονες είναι οι οικογένειες των Lachnospiraceae και Ruminococcaceae που ανήκουν στο φύλο Firmicutes, που τυπικά αντιπροσωπεύουν το 50-70% των βακτηρίων, βάσει αναλύσεων του 16S rRNA.²³ Στο λεπτό έντερο επικρατέστερα είναι τα φύλα των Firmicutes και Actinobacteria.²⁴ Η σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου χαρακτηρίζεται από έντονη διαφοροποίηση από άτομο σε άτομο. Μελέτη έδειξε ότι μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρεις εντερότυπους ανάλογα με την επικράτηση των γενών: Bacteriodes (εντερότυπος 1), Prevotella (εντερότυπος 2) ή Ruminococcus (εντερότυπος 3).¹⁹ Κάθε άτομο διαθέτει σταθερά στελέχη βακτηρίων, αν και η σύνθεση μπορεί να μεταβληθεί. Σε μελέτη διαδοχικών δειγμάτων κοπράνων από 207 άτομα διαπιστώθηκε ότι παρά τις αλλαγές στη συνολική σύνθεση των κοπράνων σε διάφορες χρονικές στιγμές, τα άτομα διατηρούσαν συγκεκριμένα στελέχη όπως φάνηκε από την ανίχνευση ταυτόσημων μεταλλάξεων (SNP) στα μικρόβια αυτά στις διάφορες χρονικές στιγμές.^{14,25} Συνεπώς στην εντερική χλωρίδα κάθε ατόμου υπάρχουν βακτηριακά στελέχη που χαρακτηρίζουν το μικροβίωμα του, και τα οποία δεν αντικαθίστανται εύκολα.

3. *Clostridium difficile* infection (CDI). Επιδημιολογία - Παθογένεια

Το *C. difficile* είναι ένα Gram θετικό, υποχρεωτικά αναερόβιο, σπορογόνο βακτήριο. Ο μικροοργανισμός υφίσταται είτε με την βλαστική μορφή του, η οποία είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο οξυγόνο είτε με την



σπορογόνο μορφή που επιβιώνει σε δύσκολες συνθήκες. Το *C. difficile* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1935, αλλά μόλις το 1975 ταυτοποιήθηκε ως παθογόνο αίτιο διάρροιας, που σχετίζεται με λήψη αντιβιοτικών και κολίτιδα.^{26,27} Το φάσμα της CDI κυμαίνεται από ήπια αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη έως απειλητική για τη ζωή κολίτιδα.^{28,29} Το *C. difficile* μεταδίδεται με την κοπρανοστοματική οδό. Οι σπόροι του μικροοργανισμού μπορούν να επιβιώσουν για μακρές χρονικές περιόδους στο περιβάλλον και μπορεί να διεισδύσουν μέσα από το όξινο φραγμό του στομάχου.³⁰⁻³² Στο λεπτό έντερο οι σπόροι βλαστάνουν και μετατρέπονται σε βλαστική μορφή. Οι μικροοργανισμοί της εντερικής χλωρίδας λειτουργούν ως προστατευτικός φραγμός απέναντι στον αποικισμό του εντέρου με *C. difficile*. Ο φραγμός αυτός διαταράσσεται όταν η χλωρίδα αλλοιωθεί από παρατεταμένη λήψη αντιμικροβιακών.³³ Μετά τον αποικισμό του εντέρου από το *C. difficile*, ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται, παράγει και απελευθερώνει δύο εξωτοξίνες την εντεροτοξίνη Α (TcdA) και την κυτταροτοξίνη Β (TcdB), οι οποίες αποτελούν τους κύριους λοιμογόνους παράγοντες του μικροοργανισμού. Οι τοξίνες αυτές συνδέονται με τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και ευθύνονται για την πρόκληση φλεγμονής, την έκκριση υγρού, βλέννης καθώς και την βλάβη του εντερικού βλεννογόνου. Η TcdA είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως η IL-6 και η IL-8 από τα ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α από τα μονοκύτταρα. Ωστόσο η TcdB φαίνεται να είναι απαραίτητη για την παθογόνο δράση του μικροοργανισμού.³⁴ Ορισμένα στελέχη *C. difficile* παράγουν μια επιπλέον τοξίνη, την δυαδική τοξίνη (ADP-ριβουλοτρανσφεράση, CDT) η οποία αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες, την *cdtA* που έχει δεσμευτική δράση και καταλύει την ADP-ριβουσλίωση της ακτίνης, αποδιοργανώνοντας τον κυτταρικό σκελετό και την *cdtB*, που έχει δεσμευτική δράση και συνδέεται με υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων και βοηθά την ενδοκύτωση της *cdtA*.³⁴ Βασικοί προδιαθεσικοί παράγοντες της λοίμωξης από το *C. difficile* είναι η λήψη αντιβιοτικών που διαταράσσουν τη χλωρίδα του εντέρου, η παρατεταμένη νοσοκομειακή περίθαλψη και η προχωρημένη ηλικία. Ωστόσο, ένα ποσοστό του πληθυσμού είναι ασυμπτωματικοί φορείς του μικροοργανισμού. Ανευρίσκεται στα κόπρανα στο 5% των υγιών ενηλίκων και σε περίπου 30-70% των βρεφών.^{35,36} Η πλειονότητα των νοσηλεύομενων ασθενών, που έχουν μολυνθεί είναι ασυμπτωματικοί φορείς και αποτελούν πηγή εξάπλωσης του παθογόνου στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα παθογόνα στελέχη του *C. difficile* ανθεκτικά στις συμβατικές θεραπείες έχουν προκύψει οδηγώντας σε

σοβαρές λοιμώξεις από το βακτήριο αυξάνοντας τη νοσηρότητα, και τη θνητότητα από τη λοίμωξη.^{37,38}

4. Διαταραχή του μικροβιώματος του εντέρου και παράγοντες κινδύνου CDI

Η αλλαγή στη σύνθεση της φυσιολογικής μικροβιακής εντερικής χλωρίδας, επηρεάζεται τόσο από φυσικούς παράγοντες (ηλικία, περιβάλλον) όσο και από εξωτερικούς παράγοντες (διατροφή, χρήση αντιβιοτικών, χρήση αναστολέων αντλίας πρωτονίων-PPIs), που το καθιστούν ευάλωτο στον αποικισμό του από παθογόνα στελέχη όπως τοξινογόνα στελέχη *C. difficile*.

– Εντερική χλωρίδα και αντιβιοτικά

Ο κύριος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη CDI παραμένει η χρήση αντιβιοτικών, όπως αποδεικνύεται από μελέτες σε πειραματόζωα καθώς και σε ανθρώπους.^{39,40} Βραχυπρόθεσμες αλλά και μακροπρόθεσμες αλλαγές παρατηρήθηκαν στο μικροβίωμα του εντέρου μετά τη λήψη αντιβιοτικών. Οι μεταβολές στη σύσταση του μικροβιώματος είναι ανιχνεύσιμες τόσο κατά τη διάρκεια χορήγησης όσο και αρκετές μέρες μετά τη διακοπή του αντιβιοτικού,^{40,41} εξαρτώνται από το χορηγούμενο αντιβιοτικό καθώς και από τη μικροχλωρίδα του ατόμου.⁴² Η αποκατάσταση του μικροβιώματος του εντέρου εμφανίζεται μετά την παύση των αντιβιοτικών, ενώ η ανάκτηση της αρχικής σύστασης μπορεί να είναι ατελής. Οι Dethlefsen και συν. διαπίστωσαν ότι παρόλο που η ανάκτηση άρχισε μέσα σε λίγες εβδομάδες από την παύση του χορηγούμενου αντιβιοτικού, η νέα σύσταση δεν περιελάμβανε όλα τα βακτηριακά στελέχη που παρατηρήθηκαν πριν την έναρξη της αγωγής.⁴² Έχουν αναπτυχθεί διάφορα ζωικά μοντέλα για να διευκολυνθεί η μελέτη της παθογένειας του *C. difficile*. Το 2008, οι Chen και συν. ανέπτυξαν ένα μοντέλο ποντικού που προσεγγίζει την ανθρώπινη λοίμωξη με *C. difficile*, χρησιμοποιώντας πέντε αντιβιοτικά (gentamicin, kanamycin, colistin, metronidazole, vancomycin). Οι Reeves και συν., χρησιμοποίησαν το μοντέλο του Chen και παρατήρησαν μείωση των Firmicutes (Lachnospiraceae) και Bacteroides και αύξηση των Proteobacteria και συγκεκριμένα των μελών της οικογένειας Enterobacteriaceae¹² σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η ίδια ομάδα διερεύνησε επίσης σε ποντικούς, το ρόλο των στελεχών των Enterobacteriaceae και Lachnospiraceae στην αντίσταση αποικισμού από *C. difficile*.⁴³ Διαπίστωσαν ότι μόνο το στέλεχος Lachnospiraceae ήταν σε θέση να αποκαταστήσει μερικώς την αντίσταση αποικισμού, καθώς τα εμβολιασμένα με Lachnospiraceae ποντίκια παρουσίασαν μειωμένο αποικισμό από *C. difficile*, χαμηλότερα επίπεδα εντερικής κυτταροτοξίνης και λι-

γότερο σοβαρά κλινικά ευρήματα. Ενώ ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με cefoperazone, παρουσίασαν αύξηση στη μικροχλωρίδα του εντέρου τους, των Firmicutes και Proteobacteria και συγκεκριμένα των οικογενειών Lactobacillaceae και Pseudomonadaceae αντίστοιχα.¹² Παρομοίως οι Buffie και συν. παρατήρησαν ότι η θεραπεία μόνο με clidamycin κατέδειξε ως επικρατέστερο φύλο το Proteobacteria (οικογένεια Enterobacteriaceae) με ταυτόχρονη μείωση στα γένη *Bifidobacterium*, *Clostridium* και *Bacteroidetes*.^{44,45} Οι συγκεκριμένες αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου των ποντικών έχουν συσχετιστεί με την απώλεια της αντίστασης αποικισμού στο *C. difficile*. Συνοψίζοντας, όλες οι κατηγορίες αντιβιοτικών έχουν συσχετιστεί με CDI, αν και τα συνηθέστερα εμπλεκόμενα αντιβιοτικά είναι οι φθοριοκινολόνες, οι κεφαλοσπορίνες, η κλινδαμυκίνη και οι πενικιλίνες. Πρόσφατη μελέτη του 2013 των Antharam και συν. συνέκρινε την μικροχλωρίδα του εντέρου 40 υγιών μάρτυρων, 36 ασθενών με διάρροια σχετιζόμενη με αντιβιοτικά (antibiotic-associated diarrhea AAD) και 39 ασθενών με CDI. Στις AAD και CDI περιπτώσεις σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες παρατηρήθηκε μείωση στα βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ, από την οικογένεια Ruminococcaceae και Lachnospiraceae και από τα Clostridie clusters IV και XIVa. Επιπλέον σε περιστατικά λοίμωξης CDI παρατηρήθηκε αύξηση σε στελέχη *Enterococcus*, *Veillonella* και *Lactobacillus*, και σε μέλη από την κλάση

Gammaaproteobacteria.⁴⁶ Σε μελέτη των Manges και συν., συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων 599 ασθενών. Είκοσι πέντε ασθενείς εμφάνισαν διάρροια σχετιζόμενη με *C. difficile* (CDAD) των οποίων τα δείγματα κοπράνων αναλύθηκαν βάσει της αλληλουχίας 16SrRNA. Οι ασθενείς με CDI παρουσίασαν αύξηση στα φύλα Firmicutes, Proteobacteria και Actinobacteria και μείωση στα Bacteroidetes. Επίσης και αύξηση στις οικογένειες Lactobacillaceae και Enterococcaceae.⁴⁷ Οι Rea και συν. το 2012 συνέκριναν το μικροβίωμα του εντέρου ασθενών που ήταν θετικοί στην καλλιέργεια για *C. difficile* (φορείς) και ασθενών με αρνητική καλλιέργεια για *C. difficile*. Οι θετικοί ασθενείς είχαν μείωση στα Bacteroides, Prevotella και Bifobacteria και αύξηση των μελών από τις οικογένειες Lactobacillaceae και Enterobacteriaceae.⁴⁸ (Πίνακας 1)

– Εντερική χλωρίδα και Ηλικία

Η προχωρημένη ηλικία (>65 ετών) αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη CDI. Οι σχετιζόμενες με την ηλικία φυσιολογικές μεταβολές στον γαστρεντερικό σωλήνα, καθώς και οι αλλαγές στον τρόπο ζωής, οι διατροφικές συνήθειες, οι συχνότερες επισκέψεις στα νοσοκομεία και η λειτουργικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, επηρεάζουν αναπόφευκτα τη μικροβιακή σύσταση της χλωρίδας του εντέρου με αποτέλεσμα μεγαλύτερη ευαισθησία στον αποικισμό του από ευκαιριακά

Πίνακας 1

Οι ταξινομικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με τους παράγοντες κινδύνου CDI σε σύγκριση με ένα υγιές μικροβιακό πληθυσμό έντερου.⁶¹

Παράγοντες Κινδύνου CDI	Μείωση βακτηριακού πληθυσμού	Αύξηση βακτηριακού πληθυσμού
Προχωρημένη ηλικία	<i>Ruminococcaceae</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Faecalibacterium</i>	<i>Bacteroides</i> , <i>Proteobacteria</i>
Έκθεση σε αντιβιοτικά	<i>Bacteroidiaceae</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Bifidobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>
IBD	<i>Firmicutes</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> <i>Clostridiales Bifidobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> , συμπεριλαμβανομένου <i>E. coli</i> <i>Fusobacterium</i> , <i>Mycobacterium</i>
PPI	<i>Ruminococcaceae</i> , <i>Clostridiales</i>	<i>Lactobacillales</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i>

παθογόνους μικροοργανισμούς. Ενώ το μικροβίωμα του εντέρου των υγιών ενηλίκων εμφανίζεται σχετικά σταθερό, στα άτομα άνω των 65 ετών έχει παρατηρηθεί μείωση των προσστατευτικών ειδών των *Bifidobacteria* και ορισμένων μελών των *Firmicutes*, καθώς και αύξηση των *Bacteroidetes* και των πιο επιβλαβών ειδών όπως τα *Proteobacteria*.^{49,50} (Πίνακας 1)

– Αναστολείς αντλίας πρωτονίων (PPIs)

Η χρήση αναστολέων της αντλίας πρωτονίων (PPIs), ιδιαίτερα σε συνδυασμό με αντιβιοτικά διαταράσσει το μικροβίωμα του εντέρου και σχετίζεται με την ανάπτυξη CDI. Οι Dial και συν., αναφέρουν ότι την δεκαετία 1994-2004 τα περιστατικά με CDI αυξήθηκαν κατά 2,9% ενώ μειώθηκε το ποσοστό λήψης αντιβιοτικών κατά την περίοδο αυτή και αυξήθηκε το ποσοστό λήψης αναστολέων της αντλίας πρωτονίων.⁵¹ Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι οι PPIs μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του *Lactobacillus*,⁵² και συγχρόνως να προκαλέσουν μείωση των *Bacteroides* και αύξηση των *Firmicutes* σε επίπεδο φύλων, σε επίπεδο ειδών αύξηση του *Holdomonia filiformis* και μείωση του *Pseudoflavonifractor capillosus*.⁵³ (Πίνακας 1)

– Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) και CDI

Οι ασθενείς που νοσούν από άλλες γαστρεντερικές νόσους έχουν πιθανό αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοίμωξης από *C. difficile*.^{54,55} Έχει μελετηθεί η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) σε σχέση με τη λοίμωξη από *C. difficile* και παρατηρήθηκε μειωμένη ποικιλομορφία των *Firmicutes* και των *Bacteroidetes* στο μικροβίωμα του εντέρου αυτών των ασθενών.⁵⁶ Επιπρόσθετα το μικροβίωμα των ασθενών με IBD έχει συσχετιστεί με την παρουσία πολλών δυνητικά παθογόνων βακτηριδίων, κυρίως *Proteobacteria*.^{57,58} Οι Clayton και συν. αξιολόγησαν τους εξωτερικούς ασθενείς με IBD οι οποίοι ήταν σε κλινική ύφεση και δεν είχαν πρόσφατη έκθεση σε αντιμικροβιακά, κορτικοστεροειδή, ανοσορρυθμιστικά φάρμακα ή νοσηλείες.⁵⁹ Αυτοί οι ασθενείς ήταν φορείς του *C. difficile* κατά 8,2%, σε σύγκριση με το 1% του υγιούς πληθυσμού εξωτερικών ασθενών. Η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή έχει επίσης την ικανότητα να ρυθμίζει το μικροβίωμα. Η παρατήρηση ότι η IBD μπορεί να επιδεινώσει την έκβαση της CDI, υποδηλώνει ότι η φλεγμονή μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της CDI. Τα φλεγμονώδη προϊόντα, όπως τα αντιμικροβιακά πεπτιδία *Ilipocalin-2* και *calprotectin* περιορίζουν τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών στο περιβάλλον του εντέρου, επηρεάζοντας ενδεχομένως την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.⁶⁰ Αυτές οι μεταβολές μπορεί να παρέχουν ευνοϊκό περιβάλλον για τον αποικισμό του εντέρου από *C. difficile* και την επακόλουθη CDI. (Πίνακας 1)

5. Μεταβολές του μικροβιώματος του εντέρου στην CDI

Η φυσιολογική εντερική χλωρίδα παίζει ουσιαστικό ρόλο στην πρόληψη της λοίμωξης αυξάνοντας την αντίσταση αποικισμού του εντέρου στο *C. difficile*.

Η αντίσταση αποικισμού του εντέρου με παθογόνα επιτυγχάνεται είτε με την άμεση αναστολή των παθογόνων μικροοργανισμών από ουσίες που παράγονται από την μικροχλωρίδα (βακτηριοσίνες, αναστολείς παραγωγής συστατικών κυτταρικού τοιχώματος, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας SCFA), είτε με ανταγωνισμό για την εξάντληση των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών, ή έμμεσα μέσω της διέγερσης των ανοσοποιητικών αμυντικών μηχανισμών.⁶² Η μείωση της αντίστασης αποικισμού οδηγεί στην εξάλειψη συγκεκριμένων ειδών ή γενών, μείωση στη ποικιλότητα του μικροβιώματος, αλλαγές στη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και στη φυσιολογία των βλεννογόνων.⁶³ Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους η εντερική χλωρίδα περιορίζει την ανάπτυξη του *C. difficile*, συνδέεται με την αλλοίωση του μεταβολισμού των χολικών αλάτων, τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά και με την μείωση των βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ.

– Χολικά οξέα και *C. difficile*

Τα πρωτογενή χολικά οξέα που παράγονται από το ανθρώπινο ήπαρ αποτελούνται κυρίως από χολικό και χηνοδεοξυχολικό οξύ, τα οποία είναι συζευγμένα με ταυρίνη ή γλυκίνη. Το κλάσμα των χολικών οξέων που δεν επαναπορροφάται στον ειλεό (<5%) διέρχεται από το κόλον, όπου υφίσταται βακτηριακό μεταβολισμό,⁶⁴ τα πρωτογενή χολικά οξέα μεταβολίζονται σε δευτερογενή όπως το λιθοχολικό και το δεσοξυχολικό αντίστοιχα.^{65,66} *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι συζευγμένες και αποσυζευγμένες μορφές χολικού οξέος προκαλούν την βλάστηση των σπόρων του *C. difficile*, ενώ το χηνοδεοξυχολικό οξύ την αναστέλλει.^{67,68} Το λιθοχολικό οξύ αναστέλλει την βλάστηση των σπόρων ενώ το δεσοξυχολικό την ευνοεί αλλά είναι τοξικό για την φυτική μορφή του *C. difficile*.^{67,69} Όταν η χλωρίδα του εντέρου διαταραχθεί από την λήψη αντιβιοτικών, τα πρωτογενή χολικά οξέα δεν μετατρέπονται σε δευτερογενή, με αύξηση της αναλογίας χολικού προς τα παράγωγα του χηνοδεοξυχολικού λόγω της ταχύτερης απορρόφησης του τελευταίου από το επιθήλιο του παχέως εντέρου, προκαλεί την βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη του *C. difficile*.⁶⁹

– Θρεπτικά συστατικά και *C. difficile*

Τα αντιβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο έντερο με διάφορους τρόπους. Μειώνοντας την ποικιλομορφία της

εντερικής χλωρίδας, μειώνουν τον ανταγωνισμό για περιορισμένους πόρους ευνοώντας την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Παράλληλα η λύση των ευαίσθητων στα αντιβιοτικά βακτηρίων απελευθερώνει πηγές άνθρακα που καταναλώνονται από τα υπόλοιπα μέλη της μικροβιακής κοινότητας.⁷⁰ Οι Wilson και Perini διαπίστωσαν ότι τα συστατικά της βλεννίνης (τα σιαλικά οξέα, N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλονευραμανικό οξύ) τα οποία είναι άφθονα στο έντερο, επηρεάζουν θετικά την ανάπτυξη του *C. difficile* in vitro.⁷¹ Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι μικροοργανισμοί της εντερικής χλωρίδας ανταγωνίζονται για την κατανάλωση των σιαλικών οξέων που απελευθερώνονται από τον βλεννογόνο του εντέρου. Όταν όμως η χλωρίδα καταστέλλεται από αντιμικροβιακά, τα σιαλικά οξέα παραμένουν άφθονα και αυτό παρέχει τη δυνατότητα στο *C. difficile* να χρησιμοποιήσει αυτούς τους μονοσακχαρίτες για τον πολλαπλασιασμό του.⁷²

– Βουτυρικό οξύ και *C. difficile*

Το βουτυρικό οξύ είναι πηγή ενέργειας των κυττάρων του εντέρου και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων και στην διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου. Προστατεύει τον ξενιστή από την λοίμωξη αυξάνοντας τους αμυντικούς φραγμούς μέσω της διέγερσης παραγωγής βλεννίνης και αντιμικροβιακού πεπτιδίου.⁷³ Το λιπαρό οξύ SCFA αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του *C. difficile* in vitro, και έχει αντιφλεγμονώδη δράση.⁷⁴ Η μείωση των βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ μπορεί να μεταβάλει την άμυνα του ξενιστή έναντι του *C. difficile* και να αυξήσει την ευαισθησία στη CDI. Τα γένη *Roseburia* και *Corynebacterium* που ανήκουν στην οικογένεια *Lahnospiraceae* είναι σημαντικά μέλη της χλωρίδας του εντέρου και εμπλέκονται στην παραγωγή βουτυρικού οξέος.⁷⁵ Σε σχετική μελέτη των *Antharam* και συνεργατών του, εμφανίστηκαν μειωμένα αρκετά μέλη των οικογενειών *Ruminococcaceae* και *Lahnospiraceae* σε λοίμωξη από *C. difficile*.⁴⁶

6. Αποκατάσταση της εντερικής μικροχλωρίδας ως θεραπευτική αντιμετώπιση της CDI

Η χορήγηση αντιβιοτικών, όπως βανκομυκίνη και μετρονιδαζόλη, είναι συνήθως αποτελεσματική στη θεραπεία της CDI, ωστόσο όμως η αντιμετώπιση των υποτροπιάζουσων λοιμώξεων από *C. difficile* αποτελεί μεγάλη θεραπευτική πρόκληση, όπου η μεταμόσχευση εντερικής μικροχλωρίδας φαίνεται ιδιαίτερα ελπιδοφόρα.

Η ετερόλογη μεταμόσχευση κοπράνων (Fecal ma-

terial transplantation, FMT) χρησιμοποιήθηκε ως θεραπευτική αντιμετώπιση με σκοπό την αποκατάσταση της φυσιολογικής χλωρίδας του παχέος εντέρου. Στη τεχνική αυτή, κόπρανα από έναν υγιή δότη τοποθετούνται στο παχύ έντερο ασθενούς με υποτροπιάζουσα νόσο μετά από φιλτράρισμα μέσω ρινογαστρικού καθετήρα, κλύσματος ή κολονοσκόπησης.^{76,77} Οι ιδανικοί λήπτες του FMT είναι ασθενείς ηλικίας άνω των 18 ετών με υποτροπιάζουσα CDI και αποτυχία κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής. Ο αριθμός των υποτροπιάζουσων λοιμώξεων που απαιτούνται για τη διεξαγωγή μεταμοσχεύσεων κοπράνων δεν έχει σαφώς προσδιοριστεί. Ωστόσο, πρόσφατες ενδείξεις περιλαμβάνουν περιπτώσεις ασθενών με 3 ή περισσότερα επεισόδια CDI παρά την κατάλληλη θεραπεία, ή 2 ή περισσότερα επεισόδια CDI με νοσηλεία και σημαντική νοσηρότητα, ασθενείς με μέτρια CDI που δεν ανταποκρίνονται στην αγωγή με από του στόματος βανκομυκίνη για περισσότερο από μία εβδομάδα, ή ασθενείς με σοβαρή CDI μη ανταποκρινόμενη στην από του στόματος βανκομυκίνη για 48 ώρες.⁷⁸ Σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη, το 93% των ασθενών που έλαβαν βανκομυκίνη από το στόμα και έκπλυση του εντέρου ακολουθούμενη από FMT έδειξαν σημαντική μείωση των διαρροϊκών επεισοδίων, ενώ μόνο το 31% των ασθενών που έλαβαν βανκομυκίνη μόνο και το 23% αυτών που έλαβαν βανκομυκίνη και πλύση είχαν θετικά αποτελέσματα.⁷⁹ Το FMT αντιπροσωπεύει μια θεραπευτική επιλογή με προοπτική. Το κόστος του FMT είναι πιθανό να είναι χαμηλότερο σε σχέση με το κόστος επαναλαμβανόμενων κύκλων θεραπείας με αντιβιοτικά και νοσηλεία.

Η ταυτοποίηση των συμβιωτικών βακτηρίων της γαστρεντερικής οδού, που είναι ικανά να επάγουν προστασία έναντι του *C. difficile*, θα μπορούσε στο μέλλον να οδηγήσει στη χρήση ωφέλιμων βακτηρίων είτε ενός μόνο γένους είτε ενός μείγματος συμβιωτικών μικροβίων για την καταπολέμηση του εν λόγω παθογόνου και την πρόληψη της λοίμωξης.

Επίσης η κατανόηση των μεταβολικών μονοπατιών που χρησιμοποιούνται από συμβιωτικά μικρόβια προκειμένου να ανταγωνιστούν τα παθογόνα μικρόβια μπορεί να οδηγήσει σε γενετική τροποποίηση των συμβιωτικών μικροβίων με αυξημένη ικανότητα να περιορίζουν τον αποικισμό από παθογόνα. Μια τέτοια εξέλιξη θα ενίσχυε τη θεραπευτική μας φαρέτρα για την καταπολέμηση εντερικών λοιμώξεων, όπως αυτές που προκαλούνται από το *C. difficile*.

Επίσης έχει εκτιμηθεί πως η αλλαγή στον τρόπο διατροφής και η χρήση πρεβιοτικών ή προβιοτικών θα μπορούσε πιθανόν να αποκαταστήσει τη αντίσταση αποικισμού έναντι του *C. difficile*. Τα πρεβιοτικά είναι μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων (κυρίως ίνες)



που προάγουν την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων στο έντερο. Τα προβιοτικά είναι ζωντανά μικροβιακά παρασκευάσματα από ένα καθορισμένο βακτήριο ή συνδυασμό βακτηρίων (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* GG, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum* 299n, *Enterococcus faecium* [SF68]) και ζυμομυκήτων (*Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*), τα οποία όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, θεωρείται ότι αντισταθμίζουν την διαταραχή της χλωρίδας του εντέρου αποκαθιστώντας έτσι την αντίσταση αποικισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών.

7. Συμπέρασμα και προοπτικές

Γνωρίζοντας την παθογένεια της λοίμωξης από το *C. difficile*, είναι σημαντική η κατανόηση του ρόλου του μικροβιώματος του εντέρου στην πρόληψη αλλά και

την έκβαση της πορείας της νόσου. Ο ρόλος του μικροβιώματος του εντέρου είναι κυρίαρχος καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του *C. difficile*, από τη μετάδοση σπόρων, τη βλάστηση και την ανάπτυξη τους, έως την εκδήλωση της λοίμωξης. Αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει τη σύνθεση της χλωρίδας του εντέρου σε άτομα που αναπτύσσουν αποικισμό ή λοίμωξη από *C. difficile*, ωστόσο οι αλλοιώσεις που σχετίζονται με την απώλεια της αντίστασης αποικισμού και την επακόλουθη ανάπτυξη της CDI παραμένουν ασαφείς. Νέες τεχνικές όπως η μεταγονιδιωματική, η πρωτεωμική και η μεταβολωμική ανάλυση είναι δυνατόν να καθορίσουν στο μέλλον τον τρόπο με τον οποίο το *C. difficile* εξαλείφει την αντίσταση αποικισμού στο έντερο, ανοίγοντας τον δρόμο για την ανάπτυξη νέων θεραπειών για την πρόληψη και την ίαση της CDI.



Summary

The role of human gut microbiota in *Clostridium difficile* infection

Eleftherios Tsintarakis, Melania Kachrimanidou

*Microbiology Department, School of Medicine, Faculty of Health Sciences
Aristotle University of Thessaloniki*

Clostridium difficile infection (CDI) has emerged as a major health problem. Data from human studies have shown that the presence of *C. difficile*, either as a colonizer or as a pathogen, is associated with decreased level of gut microbiota diversity. The investigation of the gut's microbial communities, in both healthy subjects and patients with CDI, elucidate the role of the microbiota and will improve the current biotherapeutics for patients with CDI.

Antibiotics cause important and long term alterations in gut microbiota, by altering its composition and the gut's metabolic functions. This may result in the reduction of colonization resistance in opportunistic pathogens, such as *C. difficile*. CDI represents a significant health problem, since the bacteria has the capacity to form seeds, which are extremely difficult to be eradicated and may cause recurrent infections. CDI is involved in the removal of specific microbial population from the gut, which protects human body from harmful colonization. Faecal microbiota transplantation is the administration of minimally manipulated microbial community from the stools of a healthy donor, into the patients' gut and acts as a safe and effective therapy in CDI. The identification of symbiotic bacteria in the gastrointestinal tract offers protection against *C. difficile* and probably is a solution in the prevention and therapy of CDI.

The aim of the present review is to focus on the recent data concerning the human gut microbiota and also on the important role of it in health and disease.



Key words

microbiota, *Clostridium difficile* infection, gut

Βιβλιογραφία

1. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract, *Annu Rev Microbiol* 1977; 31:107-133.
2. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6578-6583.
3. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon GI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:83-307.
4. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 8:512-9.
5. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal micro-



- biome: a new frontier of human biology. *DNA Res* 2009; 16:1-12.
6. Montalto M, D'Onofrio F, Gallo A, Cazzato A, Gasbarrini G. Intestinal microbiota and its functions. *Dig Liver Dis* 2009; 3:30-34.
 7. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156: 3216-3223.
 8. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9:233-243.
 9. Perez-Cobas A, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Artacho A, Eismamm K, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* 2013a; 62:1591-1601.
 10. Vollard EJ, Clasener HA. Colonization resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:409-414.
 11. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002; 346:334-339.
 12. Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, Huffnagle GB, Schloss PD, Young VB. The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 2011; 2:145-158.
 13. Britton RA, Young VB. Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. *Trends Microbiol* 2012; 20: 313-319.
 14. Μεντής Α-ΦΑ, Γύπας Φ, Μεντής ΑΦ. Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου: Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2013;30:272-288.
 15. Gordon JL. Honor thy gut symbionts redux. *Science* 2012; 336:1251-1253.
 16. Kang S, Denman SE, Morrison M, Yu Z, Dore J, Leclerc M, et al. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16:2034-2042.
 17. Sekirov I, Russel SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90:859-904.
 18. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012; 13:79.
 19. Shanahan F. The colonic microbiota in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29:49-54. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:312-322
 20. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9:312-322.
 21. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308:1635-1638.
 22. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7:688-693.
 23. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* 2012; 3:289-306.
 24. Dumas ME. The microbial-mammalian metabolic axis: Beyond simple metabolism. *Cell Metab* 2011; 13:489-490.
 25. Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature* 2013; 493:45-50.
 26. Hall JC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935; 49:390-402.
 27. Bartlett JG, Gorbach SL. Pseudomembranous enterocolitis (antibiotic-related colitis). *Adv Intern Med* 1977; 22:455-76.
 28. Dubberke E. *Clostridium difficile* infection the scope of the problem. *J Hosp Med* 2012; 7suppl:s1-s4.
 29. Sunenshine RH, McDonald LC. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from a established pathogen. *Cleve Clin J Med* 2006; 73:187-197.
 30. Underwood S, et al. Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production. *J Bacteriol* 2009; 191:7296-7305.
 31. Kim KH, et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1984; 143:42-50.
 32. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ. Asymptomatic carries are a potential source for transmission of epidemic and non-epidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis* 2007; 45:992-998.
 33. Chasampalioti M, Kagalou G, Kachrimanidou M. Insights into *Clostridium difficile* infection. *J Hellenic Society Micro* 2017; 62:63-72.
 34. Kachrimanidou M, Malisiovas N. *Clostridium difficile* infection: a comprehensive review. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37:178-87.
 35. Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, Maherault AC, Le Monnier A, Colligno A. *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains. *Clin Infect Dis* 2012; 55:1209-1215.
 36. Collignon A, Ticchi L, Depitre C, Gaudelus J, Delmee M, Corthier G. Heterogeneity of *Clostridium difficile* isolates from infants. *Eur J Pediatr* 1993; 152:319-322.
 37. Dubberke ER, Olsen MA. Burden of *Clostridium dif-*

- ficile on the healthcare system. *Clin Infect Dis* 2012; 55:S88-92.
38. Lucado J, Could C, Elixhauser A. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. 2006.
 39. Theriot CM, Koenigsnecht MJ, Carlson Jr PE, et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun* 2014; 5:3114.
 40. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008; 6:e280.
 41. Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, Young VB. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infect Immun* 2009; 77:2367-2375.
 42. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:4554-4561.
 43. Reeves A.E., Koenigsnecht M.J., Bergin I.L., Young V.B. Suppression of *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tracts of germfree mice inoculated with a murine isolate from the family Lachnospiraceae. *Infect. Immun.* 2012; 80:3786-3794.
 44. Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, Lipuma L, Goboume A, Viale A, Ubeda C, Xavier J, Pamer EG. Profound alterations of intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002995.
 45. Jernberg C, Sullivan A, Edlund C, Jansson JK. Monitoring of Antibiotic-Induced Alterations in the Human Intestinal Microflora and Detection of Probiotic Strains by Use of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:501-506.
 46. Antharam VC, Li EC, Ishmael A, Shama A, Mai V, Rand KH, Wang GP. Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2884-92.
 47. Manges AR, Labbe A, Loo VG, Atherton JK, Behr MA, Masson L, Tellis PA, Brousseau R. Comparative metagenomic study of alterations to the intestinal microbiota and risk of nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease. *J Infect Dis* 2010; 202:1877-84.
 48. Rea MC, et al. *Clostridium difficile* carriage in elderly subjects and associated changes in the intestinal microbiota. *J Clin Microbiol* 2012; 50:867-875.
 49. Claesson MJ, et al. Composition, variability and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:4586-4591.
 50. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001; 48:198-205.
 51. Dial S, Delaney JA, Barkum AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *JAMA* 2005; 294:2989-2995.
 52. Altman KW, et al. Effect of proton pump inhibitor pantoprazole on growth and morphology of oral *Lactobacillus* strains. *Laryngoscope* 2008; 118:559-604.
 53. Clooney AG, Bernstein CN, Leslie WD, et al. A comparison of the gut microbiome between long-term users and non-users of proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* 2016; 43:974-984.
 54. Nguyen GC, Kaplan GG, Harris ML, Brant SR. A national survey of the prevalence and impact of *Clostridium difficile* infection among hospitalized inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:1443-1450.
 55. Berg AM, Kelly CP, Farrare FA. *Clostridium difficile* infection in the inflammatory bowel disease patient. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:194-204.
 56. Manichanh C, et al. Reduced diversity of fecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006; 55:205-211.
 57. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18:968-984.
 58. Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Okayasu I. *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis simulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:849-853.
 59. Clayton EM, Rea MC, Shanahan F, Quigley EM, Kiely B, Hill C, Ross RP. The vexed relationship between *Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease: an assessment of carriage in an outpatient setting among patients in remission. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104:1162-1169
 60. Faber F, Baumler AJ. The impact of intestinal inflammation on the nutritional environment of the gut microbiota. *Immunol Lett* 2014; 162:48-53.
 61. Ross CL, Spinler JK, Savidge TC. Structural and functional changes within the gut microbiota and susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*. 2016 Oct; 41:37-43.
 62. Stecher B., Hardt W.D. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr. Opin. Microbiol.* 2011; 14:82-91
 63. Stecher B., Hardt W.D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.* 2008; 16:107-114.
 64. Guérard P. Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens.* 2014; 3:14-24.
 65. Ridlon J.M., Kang D.J., Hylemon P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.*



66. Jones B.V., Begley M., Hill C., Gahan C.G., Marchesi J.R. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 13580–13585.
67. Sorg J.A., Sonenshein A.L. Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol*. 2008;190:2505–2512
68. Sorg J.A., Sonenshein A.L. Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol*. 2009; 191:1115–1117.
69. Sorg J.A., Sonenshein A.L. Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogs of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *J Bacteriol*. 2010; 192:4983–4990.
70. Britton R.A., Young V.B. Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Gastroenterology*. 2014;146:1547–1553.
71. Wilson K.H., Perini F. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infect Immun*. 1988; 56:2610–2614.
72. Ng K.M., Ferreyra J.A., Higginbottom S.K., Lynch J.B., Kashyap P.C., Gopinath S., Naidu N., Choudhury B., Weimer B.C., Monack D.M., et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 2013;502:96–99.
73. Guilloteau P., Martin L., Eeckhaut V., Ducatelle R., Zabielski R., van Immerseel F. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*. 2010;23:366–384.
74. Rolfe R.D. Role of volatile fatty acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. 1984;45:185–191.
75. Pryde S.E., Duncan S.H., Hold G.L., Stewart C.S., Flint H.J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett*. 2002; 217:133–139.
76. Aas J, Gessert CE, Bakken JS. Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis*. 2003 Mar 1;36:580-5.
77. Rubin TA, Gessert CE, Aas J. Stool transplantation for older patients with *Clostridium difficile* infection. *J Am Geriatr Soc*. 2009 Dec; 57:2386.
78. Johan S, Bakken T. B. Treating *Clostridium difficile* Infection with Fecal Microbiota Transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011; 9:1044-1049.
79. Els van Nood, M.D., Anne Vrieze, M.D., Max Nieuwdorp, M.D., Ph.D., Sussana Fuentes, Ph.D et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*. 2013; 368:407-415.